

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS



Generación de masa celular y evaluación de la actividad metabólica en cultivos *in vitro* de *Galipea longiflora*

Presentada por : MARINA GUARACHI CONDORI

(Tesis para optar al grado académico de *Magíster Scientarum*, en Ciencias Biológicas y Biomédicas, Mención Biotecnología Vegetal)

La Paz – Bolivia
2009

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS



Generación de masa celular y evaluación de la actividad metabólica en cultivos *in vitro* de *Galipea longiflora*

Presentada por : MARINA GUARACHI CONDORI

ASESORES: Magali Paz Garcia MsC.
Teresa Álvarez Aliaga PhD.
Alberto Giménez Turba PhD.

(Tesis para optar al grado académico de *Magíster Scientarum*, en Ciencias Biológicas y Biomédicas, Mención Biotecnología Vegetal)

La Paz – Bolivia
2009

*Saber que no se sabe
es una noble intuición.
Pretender saber y no saber
es una enfermedad.
Y el que reconoce la enfermedad
como tal no la sufre*

Al creador del universo y a mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a los doctores: Alberto Giménez, M. Teresa Álvarez, Ninoska Flores y Magali Paz por su ayuda, apoyo y dedicación durante la realización de esta tesis.

Al personal del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por la colaboración prestada en todo momento para la realización de los experimentos.

Agradezco a los amigos de la Maestría de la gestión 2006 - 2007, por haber marcado momentos especiales que estarán en el arsenal de recuerdos: Ericka, Carla, Vania, Luis, Efraín, Álvaro, Juan Carlos, Víctor Hugo y Juan†.

Como no agradecer a mi familia por estar ahí en el momento en que es necesario.

A las personas que por el espacio no puedo nombrarlos ahora, pero que, cada uno de ellos han contribuido de alguna manera a la realización de este trabajo

Finalmente, mi gratitud al CIPTA por la colecta de material vegetal, al programa ASDI-SAREC, al IRD proyecto "Biolesh", por la concesión de la beca y soporte económico.

Marina

INDICE DE CONTENIDO

Resumen	1
Abstract	2
I. Antecedentes	3
1.1 Biotecnología Vegetal.....	4
1.1.1 Cultivo vegetal <i>in vitro</i>	4
1.1.2 Medio de cultivo.....	5
1.1.2.1 Factores de crecimiento.....	5
1.1.3 Condiciones de cultivo.....	7
1.1.4 Aspectos aplicables a los cultivos <i>in vitro</i>	8
1.2 Células vegetales <i>in vitro</i>.....	9
1.2.1 Callo.....	9
1.2.2 Cinética de crecimiento celular.....	9
1.3 Metabolismo vegetal.....	10
1.3.1 Metabolismo primario.....	10
1.3.2 Metabolismo secundario.....	11
1.3.2.1 Alcaloides.....	13
1.3.2.2 Elicitación.....	16
1.3.3 Actividad enzimática celular.....	19
1.3.3.1 Actividad oxidasa.....	19
1.3.3.2 Actividad peroxidasa.....	20
..	
1.4 <i>Galipea longiflora</i> K.....	21
1.5 <i>Ruta graveolens</i>.....	24
II. Justificación.....	26
III. Objetivos.....	32
3.1 Objetivo general.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
IV. Material y Métodos.....	34
4.1 <i>Ruta graveolens</i>.....	35
4.1.1 Material vegetal.....	35
4.1.2 Desinfección de explantos.....	35
4.1.3 Cultivo celular <i>in vitro</i>	35
4.1.4 Condiciones de cultivo de <i>R. graveolens</i>	37
4.1.5 Cinética de crecimiento de callos de <i>R. graveolens</i>	38

4.1.6	Determinación de la presencia de alcaloides en cultivo de callos de <i>R. graveolens</i>	38
4.2	<i>Galipea longiflora</i>.....	38
4.2.1	Material vegetal.....	38
4.2.2	Desinfección de explantos.....	39
4.2.3	Cultivo celular <i>in vitro</i>	39
4.2.4	Condiciones de cultivo de <i>G. longiflora</i>	39
4.2.5	Cinética de crecimiento de callos de <i>G. longiflora</i>	39
4.2.6	Determinación de la presencia de alcaloides en cultivo de callos de <i>G. longiflora</i>	40
4.2.7	Peso húmedo Vs diámetro del agregado celular de <i>G. longiflora</i> en cultivo.....	40
4.2.7.1	Determinación del diámetro celular.....	40
4.2.7.2	Determinación del peso húmedo de la masa celular cultivada.....	40
4.2.8	Efecto de la variación en la fuente de nutrientes del medio de cultivo sólido MS en el crecimiento de callos de <i>G. longiflora</i> ..	41
4.2.9	Efecto de la variación en la fuente de nutrientes del medio de cultivo sólido MS en la actividad oxidasa y peroxidasa de callos de <i>G. longiflora</i>	42
4.2.9.1	Cuantificación de la actividad Oxidasa.....	42
4.2.9.2	Cuantificación de la actividad Peroxidasa.....	43
4.2.10	Estudios para la detección de alcaloides a partir de extractos de callos de <i>G. longiflora</i>	44
4.2.10.1	Recolección de células generadas en cultivo.....	44
4.2.10.2	Preparación del extracto celular.....	44
4.2.10.3	Estudios cromatográficos del extracto de células de <i>G. longiflora</i>	45
4.2.10.4	Estudios espectroscópicos del extracto de callos de <i>G. longiflora</i> mantenidos en medio MS.....	45
4.2.11	Cultivo en suspensión celular de <i>Galipea longiflora</i> en medio MS.	46
4.2.11.1	Detección de alcaloides en cultivos en suspensión Celular de <i>Galipea longiflora</i>	47
V.	Resultados y Discusión.....	48
5.1	<i>Ruta graveolens</i>.....	49
5.1.1	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>R. graveolens</i>	49
5.1.2	Cinética de crecimiento de callos de <i>R. graveolens</i>	50
5.1.3	Determinación de la presencia de alcaloides en cultivo de callos de <i>R. graveolens</i>	51
5.2	<i>Galipea longiflora</i>.....	52
5.2.1	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Galipea longiflora</i>	52
5.2.2	Cinética de crecimiento celular de <i>G. longiflora</i>	53
5.2.3	Detección de alcaloides en cultivo de callos de <i>G. longiflora</i>	54
5.2.4	Peso húmedo Vs diámetro del agregado celular de <i>G. longiflora</i>	54

5.2.5	Efecto de la variación en la fuente de nutrientes del medio de Cultivo MS en el crecimiento de callos de <i>G. longiflora</i>	56
5.2.6	Efecto de la variación en la fuente de nutrientes del medio de cultivo MS en la actividad oxidasa y peroxidasa de callos de <i>G. longiflora</i>	64
5.2.7	Estudios para la detección de alcaloides a partir de extractos de callos de <i>G. longiflora</i>	66
5.2.7.1	Estudios cromatográficos para la detección de alcaloides a partir de extractos de callos de <i>G. longiflora</i>	66
5.2.7.2	Estudios espectroscópicos del extracto de callos de <i>G. longiflora</i> mantenidos en medio MS.....	70
5.2.8	Cultivo de <i>Galipea longiflora</i> en suspensión celular en medio MS.	72
5.2.8.1	Detección de alcaloides en cultivos de <i>Galipea longiflora</i> en suspensión celular.	75
VI.	Conclusiones	77
6.1	Conclusión general.....	78
6.2	Conclusiones específicas.....	78
VII.	Bibliografía	81
VIII	Anexos	88
IX	Publicaciones	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vías generales del metabolismo primario y secundario de las plantas.....	11
Figura 2.	<i>Galipea longiflora</i> k.....	21
Figura 3.	<i>Ruta graveolens</i>	24
Figura 4.	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Ruta graveolens</i> en medio 4X.....	50
Figura 5.	Cinética de crecimiento de callos de <i>R. graveolens</i>	51
Figura 6.	Cinética de crecimiento celular de <i>G. longiflora</i> en medio 4X y MS.....	53
Figura 7.	Correlación entre el diámetro y peso húmedo de callos de <i>G. longiflora</i>	55
Figura 8.	Efecto del incremento de la concentración de sacarosa, nitrógeno, y fosfato sobre el crecimiento de <i>G. longiflora</i> en medio MS.....	56
Figura 9.	Efecto del incremento dual de la concentración de sacarosa, nitrógeno, y fosfato sobre el crecimiento de <i>G. longiflora</i> en medio MS.....	58
Figura 10.	Efecto del incremento conjunto de sacarosa, nitrógeno, y fosfato sobre el crecimiento de <i>G. longiflora</i> en medio MS.....	59
Figura 11.	Cinética de crecimiento de callos de <i>G. longiflora</i> en medio MS al incrementar nitrógeno, fosfato y sacarosa.....	60
Figura 12.	Cultivo <i>in vitro</i> de callos de <i>G. longiflora</i>	61
Figura 13.	Análisis de Superficie de Respuesta de la Velocidad de Crecimiento (d^{-1}).....	63
Figura 14.	Efecto del incremento de sacarosa, nitrógeno y fosfato en la actividad enzimática de callos de <i>G. Longiflora</i>	64
Figura 15.	Proceso de extracción de alcaloides de callos de <i>G. longiflora</i>	67
Figura 16.	Porcentaje de rendimiento de extracción diclorometánica a partir de callos de <i>G. longiflora</i>	67
Figura 17.	Porcentaje de rendimiento de 4 fracciones a partir del extracto diclorometánico.....	68
Figura 18.	Espectro de Masas del producto de extracción de callos <i>G. longiflora</i>	69
Figura 19.	Espectro de RMN ¹ H del producto de extracción de callos <i>G. longiflora</i>	70
Figura 20.	Estructura de la 2-fenilquinolina.....	71
Figura 21.	Crecimiento de células en suspensión de <i>G. longiflora</i> en medio MS.	72
Figura 22.	Células de <i>G. longiflora</i> cultivadas en medio líquido MS.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales alcaloides en el comercio.....	14
Tabla 2.	Clasificación de elicitores según naturaleza y origen.....	17
Tabla 3.	Composición de alcaloides de diferentes órganos de <i>Galipea longiflora</i>	22
Tabla 4.	Actividad biológica <i>in vitro</i> de alcaloides de <i>Galipea longiflora</i> ..	23
Tabla 5.	Composición del medio completo Murashige y Skoog.....	36
Tabla 6.	Composición del medio de cultivo 4X.....	37
Tabla 7.	Arreglo trifactorial de las variaciones en la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato en el medio de Murashige Skoog.....	41
Tabla 8.	Detección de alcaloides en hojas y callos de <i>R. graveolens</i>	52
Tabla 9.	Detección de alcaloides en hojas y callos de <i>G. longiflora</i>	54
Tabla 10.	Análisis estadístico de la variación de la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato en el medio MS y su influencia en el crecimiento de callos de <i>G. longiflora</i>	61

TABLA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
NAD(P)H	Dinucleótido de Nicotinamida y de Adenina Fosfato Reducido
ATP	Adenosina Trifosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
pH	Potencial de Hidrogeniones
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
IC ₉₀	Concentración Inhibitoria
MS	Murashigue y Skoog
EP	Éter de Petróleo
ABTS	(2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina-6-sulfonato))
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rf	Factor de Retención

RESUMEN

Dentro de la amplia biodiversidad de la Amazonía boliviana, se encuentra la especie vegetal *Galipea longiflora* k. predominantemente en los departamentos de La Paz y Beni, esta especie ha sido estudiada y caracterizada por su contenido de alcaloides quinolínicos los cuales presentan propiedades leishmanicidas *in vitro* e *in vivo*. A partir de explantes de hojas de plántulas, fueron obtenidos cultivos celulares en el medio Murashige y Skoog (MS) sólido con la adición de kinetina 0,1 mg/L, ácido 2,4 diclorofenoxiacético 5 mg/L, sacarosa 30 mg/L, agar 8 g/L; pH 5,8±1, en condiciones de oscuridad continua a 28±2 °C por 4 semanas.

A través del arreglo trifactorial 2³, fueron incrementados las concentraciones de C₁₂H₂₂O₁₁ (de 30 a 40 g/L), NH₄NO₃ (de 1650 a 1655,6 mg/L), KH₂PO₄ (de 170 a 226,6 mg/L). Con el incremento conjunto de los tres componentes se logro obtener el mayor coeficiente de crecimiento (6.57) comparado con el medio testigo (3.96), el crecimiento fue evaluado por la variación en el peso húmedo. De acuerdo a la evaluación estadística de las variables, el incremento de KH₂PO₄ es el que ejerce mayor influencia sobre la formación de biomasa.

Adicionalmente fue evaluado el comportamiento cinético de células de *G. longiflora* en medio líquido MS en el que el valor de coeficiente de crecimiento máximo alcanzó el valor de 1.52 muy por debajo del obtenido en los callos.

En las condiciones de cultivo en medio sólido las actividades de las enzimas oxidasa y peroxidasa fueron determinadas con el cromógeno ABTS (2,2'' azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)). La oxidasa presenta mayor actividad en la tercera semana de cultivo; mientras que, la actividad peroxidasa es mayor a la primera semana de cultivo, con la tendencia posterior a la disminución, la actividad enzimática fue independiente de la variación de nutrientes ensayada. Sin embargo, la actividad oxidasa y peroxidasa son dependiente de la etapa de crecimiento en la que se encuentran los callos

El material seco y molido de callos de *G. longiflora*, fue extraído con diclorometano, para luego ser separados en cromatografía en columna abierta utilizando como eluyente mezclas de: éter de petróleo, diclorometano y metanol. En cromatografía en capa fina se observaron bandas con Rf's similares a: 2-fenilquinolina, 2-(3,4-metilendioxi)-feniletíl-quinolina, 2-*n*-pentilquinolina, 4-metoxi-2-fenilquinolina, 2-(3,4 dimetoxi) feniletílquinolina. La banda con mayor intensidad, presente en todas las extracciones, fue analizada por Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas, confirmándose la producción de 2-fenilquinolina, durante el cultivo. Cabe mencionar que esta sustancia es el componente mayoritario de los alcaloides producidos en las hojas de *G. longiflora* en su hábitat.

Las células cultivadas, *in vitro*, de *G. longiflora* mantienen la capacidad de sintetizar alcaloides quinolinicos, y de acuerdo a las características de crecimiento obtenidos, estos otorgan perspectivas para la obtención continua de alcaloides quinolinicos leishmanicidas haciendo uso de las herramientas de la biotecnología vegetal, para su posible aplicación en el tratamiento de las distintas Leishmaniasis.

ABSTRACT

Among the wide biodiversity found in the Bolivian Amazon region, the medicinal species *Galipea longiflora* k. is found predominantly in the departments of La Paz and Beni, these species has been studied and characterized by the production of leishmanicidal quinolinic alkaloids according to several *in vitro* and *in vivo* studies. From leaves explants were obtained cell cultures in Murashige and Skoog (MS) medium with the addition of kinetine 0,1 mg/L, 2,4 dichlorophenoxyacetic acid 5 mg/L, sucrose 30 mg/L, agar 8 g/L; pH 5,8±1, under conditions of constant darkness at 28±2 °C for four weeks.

Through a trifactorial arrangement 2³, increasing the concentrations of C₁₂H₂₂O₁₁ (from 30 to 40 g/L), NH₄NO₃ (from 1650 to 1655,6 mg/L), KH₂PO₄ (from 170 to 226,6 mg/L). With the increment of the three components was obtained the major coefficient of growth (6.57) compared with the control (3.96), the growth was evaluated by the variation in the fresh weight. Statistical evaluation of the variables shows that the increase of KH₂PO₄ has the greatest influence on the biomass formation.

The kinetic behavior of cells of *G. longiflora* in liquid MS medium was evaluated in which the value of the maximum coefficient growth was only 1.52 far below from the value obtained when working under callus conditions.

Working in solid medium, the oxidase and peroxidase enzymatic activities were determined using the chromogen ABTS (2,2 'Azín-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-sulfonate)). Oxidase activity was increased during the third week of culture, whereas, the peroxidase activity was higher during the first week of culture, with the trend later to the decrease, the enzymatic activity is independent from the variation of nutrients. Nevertheless, the oxidase and peroxidase activity is dependent on the growth stage of the callus.

The dry callus of *G. longiflora* was grounded and extracted with dichloromethane, and then separated by open column chromatography using as eluent mixtures of: Petrol ether, dichloromethane and methanol By means of Thin Layer chromatography analysis of the fractions were observed bands with same Rf's values as for: 2-Phenylquinoline, 2-(3,4-methylendioxy)-phenylethyl-quinoline, 2-n-pentylquinoline, 4-methoxy-2-phenylquinoline, 2-(3,4 dimethoxy) phenylethylquinoline. The major band present in all the fractions was analyzed by Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry, allowing us to confirm the production of the alkaloid 2-phenyl-quinoline during the cell culture conditions. It is important to mention that this molecule is the main component of the alkaloids produced in the wild by leaves of *G. longiflora*.

The *in vitro* cultures of *G. longiflora* are able to synthesize quinolinic alkaloids and in agreement with the growth data obtained, it grants perspectives for the continuous production of the leishmanicidal quinolinic alkaloids by using plant biotechnology tools, for his possible application against the different type of Leishmaniasis.



9. ANTECEDENTES

"A falta de otra prueba, el dedo pulgar por sí solo me convencería de la existencia de Dios".

1.1. Biotecnología Vegetal

En términos generales biotecnología se puede definir en un enfoque multidisciplinario que involucra varias disciplinas y ciencias (biología, bioquímica, genética, virología, agronomía, ingeniería, química, medicina y veterinaria entre otras) con sus instrumentos, procedimientos y metodologías, los cuales son empleados para el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos con el fin de obtener productos de valor para el hombre. Con las técnicas de la biotecnología moderna, es posible producir rápidamente, nueva variedad de plantas con características mejoradas, en mayor cantidad, con tolerancia a condiciones adversas (resistencia a herbicidas específicos, control de plagas), cultivo durante todo el año, entre otras ventajas ⁽¹⁾.

Las plantas poseen una amplia capacidad de acomodarse a las situaciones cambiantes de su entorno, pero en algún momento esa capacidad de amortiguación se vuelve deficiente y los organismos caen en un estado de crecimiento subóptimo que podría inducir cambios genómicos y/o metabólicos. Estos cambios ocurren debido a un mecanismo de respuesta al estrés que comprende la pérdida de control del ciclo celular. El efecto del cambio del ambiente natural a su acondicionamiento en condiciones *in vitro* es considerado por los procedimientos de biotecnología para direccionar, suprimir o incrementar determinada ruta metabólica celular con el fin de que se generen cambios estructurales y/o fisiológicos que sean beneficiosos al fin trazado.

1.1.1 Cultivo vegetal *in vitro*

El cultivo vegetal *in vitro* o cultivo de tejido es un término referido al cultivo aséptico *in vitro* de algún segmento: semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células o protoplastos de plantas superiores, bajo condiciones fisicoquímicas definidas ^(2,3), empleando medios nutritivos artificiales ricos en sales minerales, vitaminas y hormonas.

Las bases teóricas para el cultivo vegetal fueron propuestas por Gottlieb Haberlandt en 1902 considerado el padre del cultivo de tejido vegetal ⁽³⁾. El cultivo, crecimiento, propagación de células tejidos u órganos de plantas *in vitro*, es una herramienta indispensable en la investigación de la biotecnología vegetal, para su aplicación en la

producción de fármacos derivados de plantas. Para las especies raras o de lento crecimiento, el cultivo de plantas es una alternativa para la producción de masa celular y particularmente de metabolitos secundarios ^(4,5).

1.1.2 Medio de cultivo

Los medios de cultivo son la combinación sólida y/o líquida de nutrientes cuya presencia y concentración está en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización, usualmente incluye:

- **Agua**, en el agua se disuelven gases, minerales y otros solutos que penetran en las células vegetales y se mueven entre células y órganos. El agua es reactivo o sustrato de procesos tan importantes como la fotosíntesis y los procesos de hidrólisis, además el agua mantiene la condición de turgor, esencial para el alargamiento y crecimiento celular ⁽⁶⁾.
- **Sustancias orgánicas**, azúcares (sacarosa y glucosa entre otras), aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento (citoquininas y/o auxinas principalmente).
- **Macroelementos**, son requeridos a concentraciones de alrededor de 1000 mg/kg de materia seca, estos son: hidrógeno, carbono, nitrógeno, potasio, calcio, magnesio, fósforo, azufre, etc.
- **Microelementos**, son requeridos a concentraciones de aproximadamente 100 mg/kg de materia seca. Son llamados también oligoelementos o elementos traza, estos son: cloro, hierro, boro, manganeso, zinc, cobre, níquel, molibdeno, cobalto, aluminio, yodo, entre otros.
- **Mezcla de sustancias**, extracto de levadura, leche de coco, extractos vegetales, hidrolizados de caseína, peptona, triptona, etc. ⁽⁶⁾

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían: según la especie, la especificidad de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando, la respuesta que se desea obtener; debido a las necesidades particulares se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivo.

1.1.2.1 Factores de crecimiento

Son compuestos orgánicos que, en pequeñas cantidades inhiben, promueven o modifican, algún proceso fisiológico, se encuentran en las plantas en muy bajas concentraciones, interactuando unos con otros, los reguladores endógenos del crecimiento están presentes en la planta durante todo su ciclo de vida pero su concentración fluctúa, en función del estado fisiológico de la planta y en cada uno de los órganos de esta.

Se distinguen diferentes tipos de factores de crecimiento:

- ❖ **Giberelinas**, inicialmente aislado de hongos, estimulan la división celular más que el alargamiento celular, interrumpen el letargo de brotes, semillas, tubérculos y yemas, estimulan el desarrollo de frutos sin previa fertilización con polen dando lugar a frutos sin semillas.
- ❖ **Citoquininas**, son un grupo de sustancias, naturales (derivados de la adenina) o sintéticas, cuya característica más importante es estimular la división celular de los tejidos vegetales, además estimulan la formación de tallos e inhiben el desarrollo de la raíz principal, estimulan la floración y la formación de frutos sin previa polinización, también puede provocar germinación de semillas y la brotación, retrasan el envejecimiento de órganos vegetales ⁽⁷⁾.
El primer producto activo se aisló a partir de huevos de arenque denominándose kinetina, este compuesto estimula la formación de biomasa de acuerdo al medio en el que se encuentra ⁽⁸⁾.
- ❖ **Abcisinas**, sustancias que presentan un gran poder inhibitor del desarrollo de brotes, cuya concentración aumenta en época invernal.
- ❖ **Auxinas**, el nombre auxina es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación de las células. Una de las auxinas sintéticas es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), este ejerce efectos profundos sobre la respiración celular, el consumo de azúcares y el control de la división celular. Si bien, el modo de acción herbicida del 2,4-D no es totalmente comprendido, aparentemente involucra un incremento sustancial en la transcripción que puede alterar la cromatina, por lo cual, ha sido señalado como inductor de inestabilidad. Lo que algunos autores sugieren es que el 2,4-D induce desdiferenciación y este proceso sería el generador de cambios en cultivos *in vitro* ⁽⁹⁾.

Los efectos estimuladores de los factores de crecimiento presentan una actividad máxima a una concentración óptima, que cuando es rebasada se convierten en inhibidores. La acción de los fitorreguladores en conjunto es poco específica, solapándose los efectos de muchas de ellas. Para lograr la desdiferenciación *in vitro*, juegan un papel primordial los factores de crecimiento que se deben añadir a los medios de cultivo, según los requerimientos de los diferentes medios y los objetivos que se persiguen. Las fitohormonas más utilizadas son las auxinas (ácido indolacético, ácido naftalénacético, 2,4-D) y las citoquininas (kinetina, benciladenina, zeatina) generalmente en concentraciones que oscilan entre 0,1-10,0 mg/L ⁽¹⁰⁾.

1.1.3 Condiciones de cultivo

El estudio de cualquier fenómeno biológico en condiciones de laboratorio exige reproducir de la forma más aproximada posible todos los factores que puedan incidir en el fenómeno estudiado cuando esto sucede en la naturaleza. Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el biotipo de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados.

- **Temperatura**, la temperatura a la que está expuesta el explanto cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar, en general cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Así, temperaturas bajas (del orden de 4-5°C) permiten superar los periodos de dormición de algunas plantas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que temperaturas constantes de 20°C induce la formación de raíces en la mayoría de las coníferas ⁽⁹⁾.
- **pH**, el control del pH inicial del medio y de su dinámica durante el cultivo tiene una gran importancia en el desarrollo de cualquier proyecto de cultivo *in vitro*. Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera acidificación durante el proceso de esterilización en autoclave, para después, evolucionar nuevamente durante el curso del cultivo ⁽⁹⁾.
- **Luz**, es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos; se consideran aspectos relacionados a la irradiación, el espectro de la fuente de luz, la alternancia de los ciclos de luz con los de oscuridad ⁽⁹⁾.
- **Oxígeno**, otro factor a considerar es la concentración de O₂ en el ambiente donde crecen las células, durante el curso del cultivo se genera la deficiencia de O₂, la anaerobiosis resultaría en la producción de etanol el cual podría comportarse como un mutágeno ⁽⁹⁾. Acrecentando las diferencias en el ambiente de cultivo, decir que la tensión del O₂ de las células en la superficie del callo es diferente a la de aquellas células que se encuentran situadas profundamente en la masa del mismo.
- **La acumulación de metabolitos**, producidos por las propias células durante el proceso de cultivo, se ha mencionado que las condiciones de cultivo *in vitro* podrían afectar los niveles de resistencia celular al efecto de la acumulación de los metabolitos que normalmente se encuentran presentes en los tejidos en bajas concentraciones ⁽⁹⁾.

- **Edad del cultivo**, otro factor que afecta el nivel de variación, en cultivos envejecidos aumenta la proporción de variantes ⁽⁹⁾.
- **La deficiencia o exceso de minerales**, también afecta la estabilidad genética *in vitro*. Se ha observado que la deficiencia o exceso de azufre, fósforo, nitrógeno, calcio, magnesio, pueden resultar en cambios genómicos; otros elementos que se encuentran en mínima cantidad en la tierra son importantes para el crecimiento celular vegetal a decir del La^{3+} , Nd^{3+} , Ce^{3+} ^(11,12).

Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo, sino con solo una parte de él (explante), a la dificultad de reproducir las condiciones naturales se debe añadir la dificultad de suministrar a la parte en estudio todo aquello que antes obtenía del sistema completo.

1.1.4 Aspectos aplicables a los cultivos *in vitro*

El reino vegetal tiene características diferenciales que pueden ser mantenidas o no cuando se los cultiva en medios artificiales.

- ⇒ **Fisiología del explante**, el tejido explantado deriva de una parte de la planta que tiene *per se* una velocidad de crecimiento que se encuentra en un estadio temprano o tardío de su desarrollo. Si los explantes se extraen de regiones progresivamente más viejas, puede observarse un gradiente de descenso de la capacidad de producir callos *in vitro*.
Gran parte del éxito del cultivo de tejidos vegetales, está en la edad del explante que va a ser utilizado para los trabajos. La edad de la planta y el grado de diferenciación del tejido están interrelacionados y pueden producir efectos interactivos cuando se los cultiva *in vitro* ⁽¹³⁾.
- ⇒ **Competencia**, muchas células vegetales no tienen la capacidad de regenerar nuevas plantas, aquellas que si tienen esa posibilidad sufren procesos de morfogénesis cuando tienen el estímulo adecuado, así, se dice que tienen competencia. La competencia de una célula se expresa como la habilidad de esta para la regeneración de ciertas partes de la planta, por ejemplo si una célula tiene la facultad de enraizar fácilmente, no tendrá la misma facilidad de formar retoños ⁽¹³⁾.
- ⇒ **Totipotencialidad celular**, la teoría de la totipotencialidad celular, enunciada por Haberlandt a principios del siglo XX, postula que toda célula vegetal individual es capaz de regenerar una planta entera a partir de un cultivo *in vitro* sin importar el grado de desdiferenciación alcanzado. Cada célula retiene en su material genético, toda la información necesaria para especificar cualquier rasgo morfológico, químico y/o funcional, durante su ciclo vital. Estas células expuestas a condiciones específicas referidas al medio de cultivo (relaciones hormonales, temperatura, fotoperiodo, etc.,) desarrollan tipos de organogénesis que excluyen a otros ⁽¹³⁾.

- ⇒ **Desdiferenciación/Rediferenciación**, la desdiferenciación consiste en la transformación y pérdida de las características de especialización de un tipo celular para dar lugar a células de tipo meristemático. El paso involucrado en la regeneración de una planta es la rediferenciación de células previamente desdiferenciadas. Todo proceso de desdiferenciación/rediferenciación está regulado por el balance entre diferentes tipos de reguladores del crecimiento, fundamentalmente de auxinas y citoquininas ⁽¹³⁾.

1.2 Células vegetales *in vitro*

1.2.1 Callo

Nobecourt (1937), obtuvo cultivo de callo a partir de la raíz de la zanahoria (*Daucus carota*) en un medio de cultivo con auxinas. A partir de estos resultados, diferentes grupos de investigación comenzaron a obtener cultivos de tejidos (callos). Murashige y Skoog (1962) aportaron datos sobre la morfogénesis “*in vitro*” de callos ⁽¹⁰⁾.

Un callo es una masa de células desdiferenciadas que proliferan desorganizadamente, lo cual genera considerable variación. En el caso de un callo, la desdiferenciación que se produce durante la inducción del mismo provoca en las células una serie de procesos metabólicos que resultan en reordenamientos genómicos que podrían dar lugar a fenotipos alterados ^(9,14).

El cultivo de tejidos *in vitro* y la producción de callos facilita, entre muchos aspectos: el aislamiento de células y protoplastos, la producción de metabolitos secundarios de interés biológico, el desarrollo de organogénesis y embriogénesis somática, la conservación de germoplasma, la introducción de nueva variabilidad genética ⁽¹⁰⁾.

1.2.2 Cinética de crecimiento celular

El crecimiento de callos y células en suspensión, presenta una serie de fases que se caracterizan por tener naturaleza sigmoideal, cada fase se diferencia de la otra, porque presenta cambios en el peso seco, peso fresco, actividad enzimática, número de células; en función del tiempo estas fases son:

- **Fase de latencia.** Esta fase se inicia cuando las células son transferidas a medio fresco. Estas células inician los procesos metabólicos de división celular, es decir, mitosis. Existe gran producción de NAD(P)H y ATP, es decir, el sistema energético de la célula se activa, las rutas glicolítica y pentosa fosfato producen poder reductor. Estos procesos suceden conforme los carbohidratos aportados normalmente como

sacarosa son asimilados. Además, la cantidad de ácidos nucleicos y de proteínas esta incrementada, debido en parte a una eficiente capacidad de traslación de los ribosomas⁽¹³⁾.

- **Fase de división celular.** Entre los varios cambios que ocurre con el tiempo de incubación señalamos que llega un momento en que la actividad respiratoria se incrementa significativamente y los niveles de estado estacionario de RNA suben hasta en un 90%. Durante la fase lineal de crecimiento, permanece constante el tamaño celular. La tasa de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos permanece relativamente elevada⁽¹³⁾.

El incremento en el número de células precede generalmente al aumento del peso fresco debido al retraso del aumento del tamaño de la célula. Una vez que la célula ha sido inducida a la división celular, esta ocurrirá hasta que uno o más nutrientes comiencen a ser limitantes⁽¹³⁾.

- **Fase estacionaria.** Al parecer, la célula cultivada empieza a organizarse estructuralmente y hay un incremento en la producción de metabolitos secundarios. Esta fase se caracteriza por disminución en la división celular, actividad respiratoria, síntesis de RNA y proteínas, adicionando la elevada proporción de células vacuoladas. La diferenciación estructural y la diferenciación bioquímica en la fase estacionaria se han descrito también por cambios en las actividades de sistemas enzimáticos particulares^(13,15).

1.3 Metabolismo vegetal

Cuando las sustancias nutritivas son incorporadas a un organismo ingresan a una red de reacciones químicas en donde pueden ser degradadas o utilizadas para la construcción de compuestos más complejos. La energía que ingresa, ya sea en forma de luz solar o de energía química almacenada en los nutrientes, es transformada y utilizada por cada célula individual para realizar el trabajo celular que requiere energía. El conjunto de reacciones químicas y de transformaciones de energía que involucran la síntesis y degradación de moléculas constituyen el metabolismo

1.3.1 Metabolismo primario

El metabolismo primario compromete aquellos procesos químicos que cada planta debe llevar a cabo cada día para sobrevivir y reproducir su actuación, como son: fotosíntesis, glicólisis, ciclo del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos, proteínas, enzimas y coenzimas, transaminación, síntesis de materiales estructurales, duplicación del material genético, reproducción de células, absorción de nutrientes, etc.⁽¹⁴⁾.

Los metabolitos primarios se caracterizan por: tener una función metabólica directa, ser compuestos esenciales intermedios en las vías catabólica y anabólica, encontrarse en todas las plantas, a saber, carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas.

La línea divisoria entre el metabolismo primario y secundario es indistinguible porque mucho de los intermediarios en el metabolismo primario son también intermediarios en el metabolismo secundario; las funciones solapadas de varios componentes aseguran la conexión cercana entre el metabolismo primario y secundario, porque muchas de las moléculas generadas en el metabolismo primario son esenciales para construir “bloques estructurales” importantes para las vías del metabolismo secundario ⁽¹⁴⁾.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios parte del metabolismo primario del que se desvía acorde con las vías generales que se muestran en la figura 1.

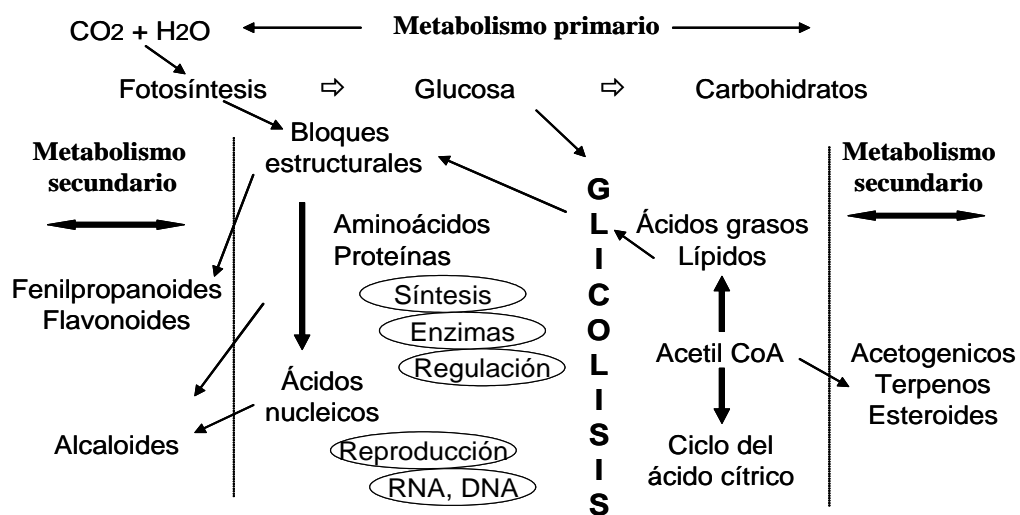


Figura 1. Vías generales del metabolismo primario y secundario de las plantas. Varios intermediarios del metabolismo primario son también intermediarios del metabolismo secundario ⁽¹⁶⁾.

1.3.2 Metabolismo secundario

El sistema vascular de las plantas contiene una enorme variedad de componentes químicos, distintos de los compuestos intermediarios y los productos del metabolismo primario; son productos de las plantas de alto valor frecuentemente restringidos a especies o géneros, estos permiten que se los use como marcadores taxonómicos. El término metabolito secundario, cubre una amplia variedad de componentes no relacionados e

implicaba un rol no importante o secundario para los vegetales. Aunque en la mayoría de los casos la función exacta de los metabolitos secundarios es desconocida, parece que muchos productos secundarios están implicados en establecer y mantener interacciones entre una planta y su ecosistema como componente clave en el mecanismo de defensa frente al ataque de herbívoros y las infecciones microbianas, otro grupo actuaría como atrayentes de insectos polinizadores o como agente de competición planta-planta, etc. ^(2, 17,18,19,20).

Son formados en estados particulares de crecimiento o durante periodos de estrés causado por ejemplo por el ataque de microorganismos o bajo condiciones de nutrientes limitados. Luego de cierto tiempo de ser producidos, algunos metabolitos secundarios son degradados a sus intermediarios metabólicos, por lo que se propone que pueden funcionar como reserva energética de nitrógeno y de carbono; las variaciones estacionales mensuales o diarias de algunos de ellos afirman esta hipótesis, por lo tanto, es posible atribuirles un rol dinámico en los vegetales ⁽¹⁷⁾.

Existen varias publicaciones con respecto a la producción de metabolitos secundarios *in vitro* en callos y suspensiones celulares, en otros casos se requiere una diferenciación celular o cultivo de órganos, esta situación frecuentemente ocurre cuando el metabolito de interés es producido en tejido especializado de la planta entera, el primer ejemplo son las osoninas y otros metabolitos valiosos producidos en las raíces de ginseng (*Panax ginseng*), entonces se requiere el cultivo *in vitro* de raíces para la producción; otro ejemplo es la biosíntesis de anabasina que ocurre en las raíces del tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), seguido por una conversión de anabasina a nicotina en las hojas; el cultivo de callos de tabaco solo produce trazas de nicotina porque carece de un componente sintetizador de anabasina, otros ejemplos la vincristina y vinblastina en *Catharanthus roseus*.

El producir metabolitos secundarios en cultivos celulares otorga una serie de ventajas con relación al cultivo de la planta entera, estas incluyen:

- La producción puede ser más exacta, simple y predecible.
- El aislamiento fitoquímico puede ser rápido y eficiente comparado a la extracción de la planta entera.
- Se puede evitar interferencias en el ciclo celular, que se presentan en los campos de cultivo.
- El cultivo celular puede llegar a ser un recurso fitoquímico standard en volúmenes grandes.
- El cultivo celular es un buen modelo para la evaluación de elicitación ⁽²¹⁾.

Rutas metabólicas de los compuestos secundarios

Para adentrarse adecuadamente en el estudio de los compuestos secundarios, en su posible obtención y utilización, es condición *sine qua non* examinar y conocer el metabolismo de estas sustancias con sus roles fisiológicos y ecológicos.

Los compuestos se ubican en diferentes tipos de tejido vegetal, ya sean, hojas, flores, semillas, tallos, raíces o en la planta entera. Específicamente estos productos son intracelulares en su mayoría, producidos y depositados en vacuolas en pequeña cantidad⁽²²⁾. La especialización de estructuras para la producción y el almacenamiento de metabolitos secundarios en algunos casos, es un mecanismo para mantener secuestrados un componente potencialmente tóxico.

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, en base a sus orígenes biosintéticos:

- **Terpenoides.** Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los del metabolismo secundario (~50 000), son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato o "5-carbono isopentenil difosfato") que se forman en la vía del ácido mevalónico, una ruta que viene de la conjunción de la acetil CoA. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. La distribución de unos pocos de ellos en las plantas es más restringida, como los que forman los aceites esenciales, entre otros.
- **Compuestos fenólicos como los fenilpropanoides y sus derivados.** Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido siquímico o bien por la vía del malonato/acetato, esta ruta es de los policétidos, formado también por la conjunción de la acetil CoA.
- **Compuestos nitrogenados o alcaloides.** Contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a través del fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato que interactúa con el ciclo de los ácidos tricarbónicos para dar aminoácidos aromáticos y aminoácidos alifáticos, que en definitiva generan dos familias de compuestos secundarios alcaloides y fenólicos (ruta del ácido siquímico)⁽²³⁾.

1.3.2.1 Alcaloides

La relación alcaloides-humanidad datan desde las tablas de arcilla de los Sumerios que describen el uso de plantas medicinales; actualmente se conocen las propiedades estimulantes del té, que provienen probablemente de la 12^{va} centuria antes de Cristo en Sichuan, provincia de China, donde el cultivo continúa hoy.

De todos los productos naturales conocidos cerca del 20% (aproximadamente 16000) han sido clasificados como alcaloides ⁽²⁴⁾. Han sido aislados de semillas, raíces, cortezas y hojas de aproximadamente 40 familias y un tercio (35,9%) de los alcaloides que han sido evaluados biológicamente en 20 o más ensayos son farmacéuticamente significativos ⁽²⁵⁾.

Son activos biológicamente aún a bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina como agentes analgésicos potentes hipotensores. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, la estricnina, etc. ^(17,26,27,28,29,30,31,32,33) (tabla 1).

Tabla 1. Principales alcaloides en el comercio.

Alcaloides	Acción fisiológica
Atropina	Antiespasmódico, estimulante, analgésico
Cocaína	Estimulante, anestésico local, sedante
Codeína	Analgésico, sedante, hipnótico
Emetina	Emético, expectorante, antipirético
Morfina	Narcótico, sedante, hipnótico, analgésico
Quinina	Tónico, antiséptico, antipirético
Efredina	Usado contra el asma, insuficiencia circulatoria
Papaverina	Relajante muscular
Reserpina	Control de la hipertensión sanguínea

Morales Carolina, 1999, Alcaloides ⁽³⁴⁾.

Muchos han estudiado el rol de los alcaloides en el organismo huésped, su función en las plantas aun no es completamente conocida, alcaloides de diversa estructura son activos para un receptor particular, otros son activos contra más de una molécula diana, Esto es interpretado como un propósito múltiple, por ejemplo: interacción entre las plantas que contienen alcaloides para evitar ser comidas por herbívoros, actúan como atractores de insectos, evitan la infestación bacteriana, fúngica y/o viral, o como componente de reserva puesto que se les ha considerado como productos terminales del nitrógeno, esencialmente, muchos alcaloides han mostrado ser la única fuente de carbono y nitrógeno en bacterias cuando se encuentran sin nutrientes en el medio. Además se reporta que algunos alcaloides intervienen como reguladores del crecimiento ⁽²⁵⁾.

Los alcaloides no son distribuidos uniformemente en una planta en particular, algunos alcaloides se concentran en la raíz (reserpina), mientras que otros pueden

localizarse predominantemente en las hojas (nicotina), las frutas (estricnina), la corteza (quinina) o en el látex (morfina). El aparato biosintético de alcaloides es localizado mas en determinados sitios que en otros en las células de una planta ⁽²⁵⁾. Con respecto a la localización celular, las vacuolas son organelos característicos de las células vegetales que contienen una variedad de metabolitos secundarios (alcaloides, taninos, etc.), las condiciones a las que se encuentran en este compartimento son peculiares, se menciona por ejemplo que el pH intravacuolar es ácido ⁽³⁵⁾ (ver anexo 1).

La clasificación sistemática de los alcaloides se ve sumamente dificultada al ser tan numerosos y poseer muchas variedades de estructuras. La agrupación de los alcaloides suelen realizarse en base al tipo de anillo heterocíclico y se ordena a medida que va aumentando la complejidad:

- **Derivados de las pirrolidinas (C₄N)**, la higrina y la cuscohigrina son bases oleosas que se encuentran como alcaloides secundarios en las hojas de coca.
- **Derivados de la piperidina (C₅N)**, la piperina, un alcaloide del fruto de la pimienta negra (*Piper nigrum*) que es una amida. La coníina, un alcaloide dextrógiro de olor peculiar aislado en 1827 de la planta venenosa de cicuta (*Conium maculatum*); acompañan a este alcaloide en la cicuta, la conhidrina y la gama coniceína.
- **Derivados de la piridina**, la nicotina, alcaloide principal de la hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum*) se halla acompañado por tres bases afines, la nor-nicotina, miosmina y nicotinima.
- **Derivados del tropano**, la cocaína, la atropina y la escopolamina, son los miembros más importantes del grupo, derivan de la base fundamental denominada tropano, que tiene un anillo de siete átomos de carbono con un puente interior de nitrógeno que fija el esqueleto.
- **Derivados quinolínicos e isoquinolínicos**, la quinina se extrae del árbol de la quina (*Cinchona officinalis*), junto con diversos alcaloides acompañantes; durante varios siglos la quinina ha sido el único agente capaz de curar el paludismo. La mezcalina, alcaloide presente en el cactus, es un potente alucinógeno. La papaverina es un alcaloide isoquinolínico encontrado en el opio, junto con la morfina, narcotina, codeína papaverina y tebaína. Otro derivado, el curare, hallado en *Chondodendrum tomentosum*.
- **Otro tipo de alcaloides son los indólicos**, amplio y variado grupo, contienen sistemas cíclicos elaborados. La estricnina y brucina se aísla junto con otros alcaloides de *Strychnos nuxvomica* ^(17,19,36).

Extracción y purificación de alcaloides

Al estar los alcaloides mayormente contenidos en vacuolas es preciso romper la célula para que se liberen, para esto se recomienda pulverizar las células, además de esta forma se alcanza una superficie mayor de contacto que permite la extracción rápida del alcaloide.

En la diferencia de solubilidades de las bases alcaloideas y de sus sales en agua en los solventes orgánicos se basa el método de extracción. Se distingue 3 métodos de extracción en función del disolvente empleado.

- **Agua acidulada**, con agua acidulada se extrae los alcaloides en forma de sales, las sales que se forman son bastante solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos. Pero el agua también extrae muchas impurezas (proteínas, aminoácidos, etc.). Este método se emplea cuando se hacen purificaciones cromatográficas. Se puede purificar el extracto añadiendo un álcali; tras la alcalinización se puede extraer con disolventes orgánicos.
- **Disolventes orgánicos polares**, se extrae con alcohol 70° acidulado, extrae impurezas (pigmentos, etc.), el extracto se lleva a sequedad, se alcaliniza y se extrae con un disolvente orgánico apolar.
- **Disolventes orgánicos apolares**, es el más utilizado. Los alcaloides han de ser liberados y se añade un álcali con el que es humedecido. Como base débil puede emplearse carbonato sódico, bicarbonato sódico. El grado de separación puede ser inhibida a cierto pH, para esto se recomienda variar el pH con solventes orgánicos ^(37,38).

En la actualidad se innova métodos convencionales como el uso de ultrasonido, surfactantes, solventes supercríticos, extracción con microondas ^(19,39,40,41).

En la maceración se emplean disolventes con alto poder de extracción para alcaloides: cloroformo, cloroformo-éter, cloroformo-isopropanol. En la percolación se emplean disolventes con menor poder extractivo pero más selectivo ⁽⁴²⁾.

1.3.2.2 Elicitación

El término “elicitador” originalmente fue usado en el área de fitopatología para agentes que estimulan algún tipo de respuesta de defensa en las plantas. En la actualidad se considera elicitador a sustancias que al ser introducidas en bajas concentraciones en un sistema celular vivo incrementa la biosíntesis de metabolitos secundarios ⁽⁴³⁾.

Clasificación

Los elicitores se clasifican en base a su naturaleza en elicitador “biótico” y “abiótico” o en base a su origen en “exógenos” o “endógenos” ^(2,21,44,45). La tabla 2 presenta la clasificación de elicitores.

Tabla 2. Clasificación de elicitores según naturaleza y origen.

A) NATURALEZA DEL ELICITOR	
Elicitores Bióticos	Elicitores Abióticos
<ul style="list-style-type: none"> - Directamente liberados por microorganismos y reconocidos por la célula vegetal (enzimas, proteínas, fragmentos de pared celular) - Acción de microorganismos sobre la pared celular vegetal (fragmentos de pectina, polisacáridos, oligosacáridos, glicoproteínas, ácidos grasos, etc.) - Acción de enzimas vegetales sobre la pared celular de microorganismos (chitosan, glucanos). - Componentes endógenos y constitutivos de la naturaleza, formados o liberados por la célula vegetal en respuesta a varios estímulos (ácido salicílico, ácido jasmónico). 	<ul style="list-style-type: none"> - Luz UV - Proteínas desnaturalizadas (RNasa) - Ciclos de congelamiento y descongelamiento - Componentes no esenciales del medio (agarosa, soporte, etc.). - Metales pesados AgNO₃, CdCl₂, La. - Químicos <ul style="list-style-type: none"> o con elevada afinidad al DNA o con actividad destructora de membrana como detergentes (xenobioquímicos). o Fungicidas (Maneb, Butylamine, Benomyl) o Herbicidas (Acifluorfen)
B) ORIGEN DEL ELICITOR	
Elicitores Exógenos	Elicitores Endógenos
<p>Originado fuera de la célula, incluyendo la reacción inmediata o vía mediadores endógenos.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Polisacáridos: (glucomanosa, glucanos, chitosan) - Péptidos, policaciones: Monilicolina, poli-L-lisina, poliaminas, glicoproteínas. - Enzimas: poligalacturonasa, ácido endopoligalacturonico liasa, celulasa. - Ácidos grasos: ácido araquidónico, ácido eicospentanoico 	<p>Formados por reacción secundaria inducidos por una señal de naturaleza biótica o abiótica en la célula.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dodeca-β-1,4-D-galacturonido - Hepta- β-glucósidos - Oligómeros de alginato

Adaptado de Namdeo A. G., 2007 ⁽⁴³⁾.

Los elicitores bióticos son de origen biológico y los elicitores abióticos de origen no biológico a los que se refieren muchas veces como “factor de stress abiótico” reservando el término de “elicitador” solo para componentes de origen biológico.

Mecanismo de elicitación en células vegetales

Es bien conocido que el tratamiento de la célula vegetal con elicitores causa una serie de reacciones de defensa incluyendo la acumulación de metabolitos secundarios en plantas intactas o células vegetales en cultivo. Cuando una célula vegetal está en contacto con un elicitador ocurre una serie de actividades bioquímicas que incluyen:

- Unión del elicitador al receptor en la membrana plasmática.
- Alteración del flujo de iones a través de la membrana celular Ej. Cl^- , K^+ , Ca^{++} .
- Actividad incrementada de fosfolipasas, síntesis de segundos mensajeros.
- Patrones de cambios rápidos en fosforilación de proteínas.
- Activación de la proteína G.
- Activación de NAD(P)H oxidasa.
- Cambios en la presión osmótica.
- Reorganización del citoesqueleto.
- Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).
- Acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis como quitinasas, glucanasas, endopoligalacturonasas, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, inhibidores de proteasa.
- Muerte celular en el sitio de infección (respuesta de hipersensibilidad).
- Cambios estructurales en la pared celular (lignificación, deposición de callos).
- Activación de la transcripción de genes relacionados a la respuesta de defensa como taninos, fitoalexinas.
- Síntesis de ácido jasmónico y salicílico como segundos mensajeros.
- Resistencia sistémica adquirida.

El orden cronológico, la interconexión y la orquestación entre ellos son complejos, aun no entendida completamente y aun no está dilucidado como median la biosíntesis ^(46,47,48).

En años recientes, la estructura molecular exacta del elicitador ha sido elucidada en un número creciente; entre los elicitores el más efectivo y común para estimular la producción de metabolitos secundarios son fracciones de carbohidratos de hongos, paredes de células vegetales, metil jasmonato, quitosan y sales de metales pesados ^(2,43,46). Las interacciones específicas son basadas en las características genéticas de la especie de la planta y del microorganismo, vías de señalización del elicitador y respuesta de defensa ^(49,50).

La síntesis y acumulación de sustancias secundarias en cultivo celular en grandes cantidades puede ser incrementada por cambios en las condiciones físicas de cultivo, con este propósito se toman en cuenta:

- Selección de un sistema de cultivo; cultivo en biorreactores, inmovilización de células, cultivo de órganos enteros.
- Limitación de nutrientes, ultrasonificación, pH, shock térmico, DMSO, detergentes, aceites de silicona, electropermeabilización.
- Dos fases de cultivo, la primera para obtener el máximo de proliferación celular y la segunda fase con el fin de hacer más eficiente la acumulación de metabolitos secundarios ^(2, 51)

1.3.3 Actividad enzimática celular

El curso de las reacciones metabólicas en la célula o en un organismo muestra de qué forma interactúan los elementos implicados, tal interacción está definida por patrones que marcan la economía energética necesaria para la optimización de los procesos.

Si cada reacción ocurriera de forma espontánea resultaría una situación fatal para la naturaleza viviente. Las células vivas utilizan el principio de la catálisis para lo cual sus biocatalizadores son las enzimas.

1.3.3.1 Actividad oxidasa

Las lacasas (oxidases) son un grupo de glicoproteínas que contienen núcleos de cobre, definidas por la Comisión de Enzimas (EC.1.10.3.2) como oxidoreductasas que al contrario de la mayoría de las enzimas que son sustrato específicas, las lacasas catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos incluyendo monofenoles, difenoles, polifenoles, diferentes fenoles sustituidos, diaminas, aminas aromáticas, ácido ascórbico y algunos componentes como el yodo utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones sin el paso de formación del peróxido de hidrógeno ^(52,53,54,55,56).

La primera actividad lacasa fue reportada en 1883 en el látex de la planta *Rhus vernicifera* (árbol de laca Japonés) por Yoshida, del cual deriva la designación de lacasa. Las lacasas también han sido encontradas en otras plantas ej. Sicómoro, melocotón, tabaco, en el álamo; están ubicadas en el xilema, donde presumiblemente oxidan monoligninas en las etapas tempranas de lignificación, estas enzimas tienen una función protectora frente a lesiones de corte o ataque por hongos sufrida por el vegetal, pues la oxidación de fenoles del látex por la lacasa provoca radicales libres que tienden a polimerizar (lignificar) lo que origina una cubierta protectora en la lesión ^(56,57, 58, 59, 60, 61, 62, 63,64).

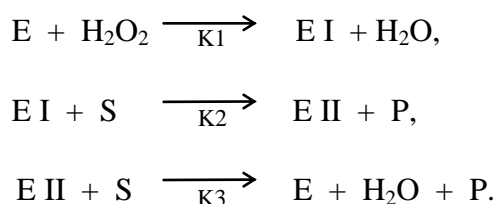
En plantas superiores hasta donde se conoce, se dice que son solubles en el citoplasma, no existen artículos científicos que describan una estructura subcelular

específica ⁽⁶¹⁾, en cultivos *in vitro* de *Acer pseudoplatanus L.* fue demostrado la excreción de lacasa ⁽⁶⁵⁾.

1.3.3.2 Actividad peroxidasa

Las peroxidasas (EC1.11.1.7) constituyen un grupo de glicoproteínas muy extendido en toda la escala filogenética, su función es catalizar reacciones bisustrato de carácter redox de diferentes sustratos fenólicos y sustancias orgánicas e inorgánicas a expensas del H₂O₂ como oxidante (a lo que debe su nombre) y un segundo sustrato de carácter reductor que es oxidado por el peróxido, usando activamente el oxígeno en los radicales intermediarios. En vegetales es de destacar a la peroxidasa del rábano (horse radish peroxidase, HRP), que tiene importantes aplicaciones en técnicas de diagnóstico clínico ⁽⁵⁷⁾.

Considerando la formación del complejo tipo Michaelis, la descripción del mecanismo catalítico de la peroxidasa es representado por las siguientes reacciones químicas.



Donde E, E I y E II son las enzimas inactivas; I y II sus componentes respectivamente S y P son el sustrato y el producto ⁽⁶⁶⁾.

Las peroxidasas son un tipo de las enzimas más estables, en el reino vegetal participan en la síntesis de la pared celular, oxidación de fenoles, lignificación durante la reacción de defensa contra agentes patógenos ⁽⁶⁷⁾. Los efectos directos de la peroxidasa es difícil de precisar con exactitud puesto que tienen un amplio rango de acción puesto que cataliza numerosas reacciones, esta pobre especificidad por el sustrato reductor hace que la afinidad sea también pequeña.

1.4. *Galipea longiflora* k.



Figura 2. *Galipea longiflora* k., planta leñosa que crece en lugares con elevada humedad de llanuras y montañas de Norte y Sur América (IIFB)

Reino : *Plantae*
División : *Magnoliophyta*
Clase : *Magnoliopsida*
Orden : *Sapindales*
Familia : *Rutaceae*
Género : *Galipea, Angostura*
Especie : *longiflora* (k. Krause) kallunki
Nombre común : Yuruma huana epuna, Evanta, Ivab`ta, Tantac ⁽⁶⁸⁾.

El género neotropical *Galipea aublet* comprende alrededor de 20 especies confinadas principalmente en el continente Americano en las regiones limítrofes de Brasil y Bolivia ^(69,70,71). Su hábitat está en bosques con elevada humedad de llanuras y montañas (350-600 m.s.n.m).

Tres especies, *Galipea officinalis*, *Galipea longiflora* y *Galipea bracteata* han sido estudiadas químicamente y caracterizadas por el alto contenido de alcaloides quinolínicos ^(68,71,72,73).

En el noreste de Bolivia, predominantemente en los departamentos de La Paz y Beni se encuentra distribuida la especie *G. longiflora*; es un árbol de 10 a 15 m de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama, con un pecíolo frecuentemente alado, flores blancas y perfumadas en cimas, panículos o racimos,

zigomorfos más o menos vistosos en los meses de Mayo a Junio, los frutos se observan en los meses de Junio a Julio.

El uso recomendado en la literatura popular refiere la utilización de la corteza fresca de esta planta reducido a pasta usado en la medicina tradicional local de las etnias Tacana, Tsimane y Mosekene en cataplasmas para el tratamiento tópico de lesiones cutáneas causadas por *L. braziliensis*, adicionalmente la planta es usada en cocción para el tratamiento de la disentería amebiana y como antihelmíntico, los adultos lo usan como fortificante y para el tratamiento del enflaquecimiento y debilidad en niños ^(68,72).

La actividad biológica leishmanicida de *G. longiflora* es atribuido a un grupo de alcaloides; se han identificado 13 alcaloides quinolínicos (Anexo 2), los cuales fueron obtenidos de la corteza del tronco, raíz y hojas del árbol, la composición de alcaloides en diferentes partes de la planta es resumida en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de alcaloides de diferentes órganos de *Galipea longiflora*.

Rendimiento de alcaloides totales (g/kg)	Tronco	Raíces	Hojas
	32	43	7
Alcaloide	Estimación de la composición de alcaloides (%)		
	Tronco	Raíces	Hojas
1. sikimanina		4,0 %	1,7 %
2. 2- fenilquinolina	47,7 %	66,7%	29 %
3. 4- metoxi-2-fenilquinolina	2,8 %	3,3 %	
4. 2-(3',4'-dimetoxifeniletiquinolona)	1,1 %		
5. 2-(3',4'-metilendioxifeniletil)-quinolina,	10,2 %	6,7 %	
6. 4 metoxi-2-(3',4'-metilendioxifeniletil)quinolina	3,1 %	2,0 %	
7. 4-metoxi-2-n-pentilquinolina	1,0 %		
8. 2-n-pentilquinolina	2,4 %	17,3%	
9. 2-n-propilquinolina	1,3 %		12,5 %
10. 4-metoxi-2-n-propilquinolina (chimanina A)	2,4 %		
11. 2-(E)-prop-1'-enilquinolina (chimanina B)			16,7 %
12. 4-metoxi-2-(E)-prop-1'-enilquinolina (chimanina C)			0,5 %
13. 2-(1',2'-transepoxiopropil)-quinolina (chimanina D)			1,7 %

Fuente: Fournet A. et al, Journal of Natural Products ⁽⁷⁴⁾.

Las propiedades antileishmaniasis han sido evidenciadas *in vitro* como se puede apreciar en la tabla 4.

Los alcaloides 2-alkilquinolina: chimanina B y chimanina D, epóxido de la chimanina B, aislados de las hojas de *G. longiflora*, mostraron actividad con una IC₉₀ alrededor de 0,10 mM contra promastigótes de *L. braziliensis*, mientras que el compuesto 2-n-propilquinolina mostró actividad a una IC₉₀ de 0,20 mM ⁽⁷⁵⁾.

Tabla 4. Actividad biológica *in vitro* de alcaloides de *Galipea longiflora*. 12 alcaloides quinolinicos con actividad contra la *Leishmania braziliensis* y *Trypanosoma cruzi*.

Producto	IC90 (µ/mL)	
	<i>Leishmania braziliensis</i> (2903)	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Tulahuen)
Sikimanina	100	100
2- Fenilquinolina	100	100
4- Metoxi-2-fenilquinolina	50	100
2-(3',4' -Dimetoxifeniletiquinolona)	100	100
2-(3',4' -Metilendioxfeniletil)-quinolina,	100	100
Cusparina	100	100
4-Metoxi-2-n-pentilquinolina	100	100
2-n-Pentilquinolina	100	100
2-n-Propilquinolina	50	50
Chimanina A	100	100
Chimanina B	25	25
Chimanina D	25	50
Pentamidina	1	-
Antimoniato de meglumina	> 100	-
Nifurtimox	-	25
Benzidazole	-	50

Fuente: Fournet A. et al, 1993, Journal of Natural Products ⁽⁷⁴⁾.

En ensayos *in vivo* (lesiones cutáneas causadas por *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*), presentó actividad a concentraciones de 100 mg/kg por día. Este metabolito administrado oralmente (0,54 mmol/kg), suprimió alrededor del 99,9% la presencia de parásitos de *L. donovani* en hígado de ratones BALB/c después de 10 días de tratamiento. De la misma manera, presenta actividad *in vivo* contra parásitos de *L. amazonensis* y *L. donovani*. Otras quinolinas, como la furanoquinolina sikimanina, mostraron también una interesante actividad pero a concentraciones 2 a 4 veces más alta ⁽⁷⁵⁾.

Los alcaloides quinolínicos es una de las familias más estudiadas, debido a sus interesantes propiedades farmacológicas, muchos de sus derivados pueden actuar como agentes analgésicos potentes, hipertensores, amebicidas, virucidas, entre otras propiedades ^(33,75).

1.5. *Ruta graveolens*



Figura 3. *Ruta graveolens*, planta arbustiva de origen europeo de amplia distribución. Flores terminales de hasta 2 cm con pétalos ligeramente dentados de color amarillo; producen frutos redondos en cápsulas

Reino : *Plantae*
División : *Magnoliophyta*
Clase : *Magnoliopsida*
Orden : *Sapindales*
Familia : *Rutaceae*
Género : *Ruta*
Especie : *graveolens*
Nombre común: Ruda (América Latina y España), Arruda, Erruda, Arroda (España), Rue (USA).

Descripción: planta arbustiva aromática perenne de hasta 150 cm de altura, tallos redondos erectos, ramificados, hojas carnosas, verde-amarillentas, muy divididas y alternas provistas de glándulas que le proporcionan su particular olor no muy agradable ^(76,77).

Hábitat: es de origen del Sur Europeo y vive en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados, especialmente en la región del mediterráneo. Puede encontrarse cerca de las casas o viviendas como componente ornamental ⁽⁷⁷⁾.

Principios activos: aceite esencial rico en ácidos, terpenos, alcaloides, taninos, cumarinas, flavonoides, vitamina C, etc. ^(76,78,79,80,81).

El uso de la ruda data desde el siglo XVI, se empleaba para mitigar la fiebre, dolor de riñón y de pecho, inflamación de garganta, también se ha reportado efectos antiparasitarios y antihelmínticos, así como citotóxico afectando aparato digestivo, hígado,

riñón, útero ^(76,77,80,82,83). Entre sus diversas aplicaciones encontramos que se utiliza en la pediculosis, onicomycosis, flebitis, hemorroides solamente para uso externo; emenagogo, antiespasmódico, sudorífica, etc. Es igualmente útil para úlceras llagas, lavados bucales y como loción para el cuero cabelludo. Se dice además que se emplea para regular los cólicos menstruales, ayudar en el parto y estimular la producción de leche. Como se aprecia de la información anterior son múltiples y muy variados los efectos que de la ruda se reportan.



99. JUSTIFICACIÓN

"Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él"

Louis Pasteur

(1822 – 1895)

Las enfermedades infecciosas parasitarias constituyen un problema de Salud Pública para un gran porcentaje de seres humanos que habitan las zonas tropicales de nuestro planeta. Una de ellas es la leishmaniasis, enfermedad producida por parásitos protozoarios del género *Leishmania*.

La Organización Mundial de Salud indica que 88 países en el mundo presentan casos autóctonos de leishmaniasis, con una población en riesgo de 350 millones de personas, con una prevalencia global de 12 a 14 millones de personas de las cuales 1,5 millones corresponden a leishmaniasis cutánea y 500 mil a Leishmaniasis visceral. Estas cifras son de difícil evaluación debido a que en la leishmaniasis existen grandes variaciones en corto tiempo, su distribución es focal en zonas alejadas y dispersas, existiendo casos no diagnosticados, asintomáticos que no se registran en los sistemas de salud y donde la enfermedad no es de declaración obligatoria ^(84,85).

En Bolivia, la enfermedad fue descrita desde la antigüedad en un único foco, el de los Yungas en el departamento de La Paz, en la actualidad las masivas migraciones poblacionales han extendido la enfermedad al área rural de las zonas tropicales y subtropicales de 7 departamentos (La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, Beni, Pando, Tarija y Chuquisaca) ⁽⁸⁶⁾. Existiendo aproximadamente 800 000 individuos en alto riesgo de infectarse con Leishmaniasis. La situación epidemiológica nacional en los últimos años (1983-2006) muestra que la tendencia secular de las Leishmaniasis está en aumento, situación observada al comparar la tasa por 100.000 habitantes de 4.1 el año 1985, que pasa a 16,6 el año 1993 y alcanza 32,7 el año 2006 ^(87,88,89). (Anexo 3)

Para el año 2006, el SNIS ha reportado 3.152 casos sospechosos de Leishmaniasis en 80 municipios (1/4 del total de municipios), de los cuales por lo menos en 50 se evidencia la presencia de casos autóctonos (16% de los municipios). El 71% de los casos notificados corresponden al grupo etario entre los 15 a los 59 años de edad, y alrededor del 80% de estos son del sexo masculino ⁽⁸⁹⁾.

La relación de las Leishmaniasis con la pobreza, proporción de hogares con necesidades básicas insatisfechas (deficiencia en saneamiento ambiental, viviendas precarias, disposición inadecuada de excretas y basura) es una condicionante importante al evidenciar que las personas que enferman de Leishmaniasis son generalmente la población rural y con mayor deterioro económico e inaccesibilidad geográfica ⁽⁸⁹⁾.

La morbilidad y mortalidad asociadas con las enfermedades causadas por parásitos protozoarios han motivado la investigación de nuevos agentes más potentes y selectivos, adicionándose la resistencia múltiple a drogas (MDR), que es un tema de creciente interés en la farmacoterapia para este tipo de enfermedades ^(25,75,90).

Los antimoniales pentavalentes son las drogas anti Leishmaniasis de primera línea desde hace más de 40 años (N-metil-glucamina o glucantime y el stibogluconato de sodio), son más eficaces mientras más precoz sea el tratamiento. La Anfotericina B es el medicamento de segunda elección en el tratamiento de las Leishmaniasis recidivantes o en los casos mucosos graves. Se han propuesto otras drogas como el pamoato de cicloguanil, ketoconazol, itraconazol, rifampicina, alopurinol, que han sido objeto de numerosos ensayos clínicos. En los últimos años se han realizado ensayos clínicos sobre la miltefosina, con menores efectos secundarios.

Si bien, la síntesis y semisíntesis por vía química, son métodos apropiados y económicamente rentables cuando se trata de compuestos sencillos o provenientes de materia prima asequible. En la mayoría de los casos son onerosos y presentan grandes dificultades, dado que involucran numerosos pasos tanto de reacción como de purificación, especialmente si se trabaja con compuestos quirales ⁽⁹¹⁾.

En este sentido, los productos naturales juegan un papel crucial en el desarrollo de una nueva generación de fármacos antiparasitarios, la evaluación científica de plantas medicinales empleadas en la preparación de la medicina tradicional ha suministrado productos farmacéuticos efectivos a la medicina moderna; las plantas son capaces de sintetizar compuestos complejos que puede ser de difícil síntesis en un laboratorio de química, es así que el 75% de las nuevas estructuras químicas descubiertas, provienen de las plantas, que conforman el 25% del total de los medicamentos de la industria farmacéutica ⁽⁷⁸⁾.

Solo se tiene conocimiento de 15% de las 250000 – 500000 especies de las plantas superiores que se creen existen en la tierra, de estas, menos del 5% han sido evaluadas para una o más actividades biológicas, en la actualidad el número de investigaciones se han incrementado, para detectar actividad antimicrobiana, insecticida, moluscida, hormonal y/o farmacéutica ^(21,92).

Actualmente, la mayoría de los productos de origen vegetal, se obtienen de plantas enteras, sin embargo, la extracción de sustancias químicas de plantas intactas, tiene muchos problemas inherentes, debido a la edad de las plantas, variación estacional, factores ambientales y fisiológicos, plagas, enfermedades, calidad y rendimiento del producto inconsistente ⁽⁵¹⁾. Además, en algunos casos, la fuente de material vegetal es limitada debido a que en los últimos años se reporta que ha existido una continua destrucción de bosques y campos de vegetación. Principalmente porque la población se ha incrementado y con ello la necesidad de áreas descubiertas, destinadas a cultivos, pastoreo y explotación maderera, llevando a una pérdida de la biodiversidad antes de una evaluación biológica. En 1998 la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza reportó la “lista roja de especies en peligro” en el que informa que aproximadamente 34000 especies de plantas están en peligro de extinción en 200 países ⁽²⁵⁾.

A raíz de los inconvenientes antes expuestos, surge como alternativa el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* donde las condiciones físicas y químicas son controladas, permite planificar el proceso de producción, acumulación y extracción de metabolitos de interés de acuerdo a la demanda, independientemente de factores naturales externos, localización geográfica, posibilitando el mejoramiento vegetal en tiempos más cortos; haciendo viable la producción de compuestos complejos con uno o más carbonos quirales sin afectar la distribución natural de especies vegetales ^(19,21).

Otra potencial aplicación es la producción de nuevos componentes que normalmente no se encuentran en la planta original, incluyendo el proceso de biotransformación de precursores de bajo costo para transformarlos en componentes valiosos, proceso realizado solo por enzimas provenientes de plantas. Además que en condiciones de aplicación de varios estímulos se puede optimizar la productividad, que en general es demasiado baja, una excepción es el ácido rosmarínico sintetizado por células de *Coleus blumer* (superior al 20 % de peso seco de células) ^(21,93,94).

El interés de aplicar cultivos de células, tejidos y órganos vegetales para la producción controlada de metabolitos secundarios a escala comercial ha crecido considerablemente desde finales de los años cincuenta, cuando fue demostrado que la atropina es sintetizada y acumulada en raíces y callos derivados de raíces de *Atropa belladonna*. Se reconoce que el cultivo de células representa una fuente potencial de

sustancias de valor comercial. Sin embargo, el nivel de metabolitos secundarios es menor a los encontrados en las plantas, esto representa una barrera, para la cual se han evaluado varias propuestas para el incremento de determinadas rutas sintéticas, con la finalidad de optimizar la producción, entre estas mencionamos: el uso de elicitores bióticos y/o abióticos, selección de clones celulares, mutación, co-cultivo, ingeniería metabólica (14,43,44,51,95,96).

Los productos del metabolismo secundario vegetal, han sido incorporados en un amplio rango de aplicaciones industriales y comerciales en muchos casos, el cultivo *in vitro* controlado puede generar los mismos productos valiosos. Las plantas y los cultivos celulares han servido como fuente de saborizantes, aromas y fragancias, plásticos y combustibles biobasados, enzimas, preservativos, cosméticos, pigmentos naturales, pesticidas y otros compuestos bioactivos ⁽²⁾.

Dentro de la amplia biodiversidad de la Amazonía boliviana, se encuentra la especie vegetal *Galipea longiflora* Krause, que es utilizada tradicionalmente por los pobladores Chimanes y Tacanas por sus propiedades contra la diarrea (causada por parásitos intestinales), fortificante para adultos, en niños para debilidad y enflaquecimiento así también como leishmanicida. De esta especie vegetal se ha constatado que la presencia de alcaloides quinolínicos les otorga una actividad biológica importante contra la Leishmaniasis cutánea, además se reporta su actividad antifúngica y antibacteriana ^(97,98). La distribución de esta especie es muy limitada y parece ser exigente en cuanto a condiciones nutricionales y ambientales para su propagación en la naturaleza, adicionando que el tiempo de crecimiento requerido es muy prolongado, la consideración de estos factores hizo enfocar el buscar el cultivo de esta especie en condiciones de laboratorio.

A partir de cultivos *in vitro* de *G. longiflora* que se han establecido en nuestros laboratorios, el objetivo del presente trabajo es incrementar la cantidad de biomasa y disminuir el tiempo de generación de la misma, evaluando diferentes condiciones de incubación y concentración de componentes del medio de cultivo basal, factores que tienen una incidencia directa en el crecimiento y la acumulación de metabolitos secundarios, considerando que la proliferación celular (metabolismo primario) y la biosíntesis de metabolitos secundarios, frecuentemente requieren diferentes condiciones nutricionales que deben ser estandarizadas para cada línea celular ⁽²⁾.

Los cultivos *in vitro* constituyen modelos apropiados para el estudio de la fisiología y la bioquímica vegetal, especialmente en rutas metabólicas secundarias. De hecho los cultivos celulares son un sistema importante para analizar variables particulares sobre todo en ensayos de interacción de vegetales con otros organismos ⁽⁹⁹⁾.

A través de este trabajo se plantea explorar la obtención de metabolitos secundarios (alcaloides quinolínicos) de cultivos vegetales *in vitro* de *G. longiflora*, con el fin de utilizar de manera sostenible esta especie vegetal a través de la biotecnología y su consecuente conservación, contribuyendo de esta manera al desarrollo científico del país.



999. OBJETIVOS

“Cuánto más adelante el hombre en la penetración de los secretos de la naturaleza mejor se le descubre la universalidad del plan eterno”

Johannes Kepler (1571 – 1630)

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento, actividad oxidasa – peroxidasa y producción de alcaloides de *Galipea longiflora* k. cultivadas en medio MS con variación en la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Incrementar la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato en el medio de cultivo sólido MS a través del arreglo trifactorial 2^3 .
 - Evaluar el efecto del incremento de carbono, nitrógeno y fosfato en el medio MS sobre la formación de biomasa de *G. longiflora* mediante la determinación del peso húmedo celular.
 - Evaluar el efecto del incremento de carbono, nitrógeno y fosfato en el medio MS sobre la actividad enzimática oxidasa y peroxidasa en células de *G. longiflora*.

- Evaluar la producción de alcaloides quinolínicos en cultivo *in vitro* de callos de *G. longiflora*.
 - Realizar estudios cromatográficos para detectar la producción de alcaloides quinolínicos a partir de extractos de callos de *G. longiflora* cultivadas *in vitro*.
 - Realizar estudios espectroscópicos para identificar alcaloides quinolínicos obtenidos a partir de extractos de células de *G. longiflora* cultivadas *in vitro*.

- Evaluar la formación de biomasa celular y síntesis de alcaloides en células en suspensión de *G. longiflora* en medio MS.



IV. MATERIAL Y MÉTODOS

"Porque si después no hay nada, evidentemente nunca lo sabré, cuando me hunda en la nada eterna; pero si hay algo, si hay Alguien, tendré que dar cuenta de mi actitud de rechazo"

Blaise Pascal
(1623-1662)

4.1 *Ruta graveolens*

4.1.1 Material vegetal

El material vegetal fue obtenido de ejemplares seleccionados de *Ruta graveolens* crecidas en invernadero en la ciudad de La Paz. Los explantes de hojas fueron mantenidos a 4 °C hasta el proceso de desinfección.

4.1.2 Desinfección de explantos

La metodología de desinfección empleada comprende:

- Lavado en agua corriente por aproximadamente 5 minutos con agitación.
- Enjuague en agua destilada estéril.
- Pasaje por alcohol etílico 70°GL durante 1 minuto.
- Inmersión en solución de DG6 0.15 % por 30 minutos.
(A partir de este paso el proceso fue realizado bajo flujo de aire estéril, en la cámara de flujo laminar)
- Inmersión en solución de hipoclorito de sodio (1,2 % de cloro activo), con el emulsionante tween 20 (3 gotas/100 mL) por 45 minutos con agitación cada 10 minutos.
- Enjuague con agua destilada estéril, 3 veces consecutivas.
- Ecurrido de líquido restante en las hojas en cajas de Petri que contienen discos de papel filtro estéril.

4.1.3 Cultivo celular *in vitro*

En el área de trabajo de la cámara de flujo laminar (Labconco, purifier class II, Kansas), en condiciones de asepsia, se procedió a seccionar los explantes de hojas en segmentos de aproximadamente 0,5 cm de lado e introducirlos en tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio de cultivo.

Los medios de cultivo empleados fueron:

- Medio Murashige y Skoog, suplementado con los factores de crecimiento kinetina y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (composición detallada en la tabla 5), el pH fue ajustado a $5,8 \pm 1$ con NaOH (0,1 y 1 N) y/o HCl (0,1 y 1 N), luego se procedió a la adición de agar (8 g/L) y sacarosa (30 g/L), previo a la esterilización en autoclave (ALL AMERICAN), a 1,5 atmósfera de presión, 120 °C durante 20 minutos. El medio fue preparado a partir de soluciones stock concentrado 10X, mantenidos en refrigeración a 4 °C (Express Cool Turbo).

Tabla 5. Composición del medio completo Murashige y Skoog

Componente	mg/L
Sales inorgánicas	
NH ₄ NO ₃	1,650.00
H ₃ BO ₃	6.20
CaCl ₂	332.20
CoCl ₂	0.025
CuSO ₄ •6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.26
FeSO ₄ •7H ₂ O	27.80
MgSO ₄	180.70
MnSO ₄ •H ₂ O	16.90
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.25
KI	0.83
KNO ₃	1,900.00
KH ₂ PO ₄	170.00
ZnSO ₄ •H ₂ O	8.60
Vitaminas	
Mio-inositol	100.00
Ácido nicotínico	0.50
Piridoxina-HCl	0.50
Tiamina-HCl	0.10
Factores de Crecimiento	
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	5.00
Kinetina	0.10

Product Catalogue and Reference Guide 1995-1996, Life Technologies

- Medio 4X, cuya composición es detallada en la tabla 6, el pH fue ajustado a 5,6±1 con NaOH (0,1 N y 1 N) y/o HCl (0,1 y 1N), luego se procedió a la adición de agar y sacarosa, antes de esterilizar en autoclave a 1,5 atmósferas de presión, a 120 °C durante 20 minutos. El medio fue preparado a partir de soluciones stock concentrado 10X, mantenidos en refrigeración a 4 °C.

Todas las sustancias químicas empleadas fueron grado analítico provisto por Sigma, Chemical. Co, excepto la sacarosa (La Bélgica).

Tabla 6. Composición del medio de cultivo 4X

Medio de cultivo 4X	
Componente	mg/L
Sales inorgánicas	
NaH ₂ PO ₄	130,44
CaCl ₂	113,23
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00
MgSO ₄	121,56
KNO ₃	2500,00
FeNaEDTA	36,70
KI	0,75
MnSO ₄ •H ₂ O	10,00
H ₃ BO ₃	3,00
ZnSO ₃ •7H ₂ O	2,00
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ •6H ₂ O	0,025
Vitaminas	
Mio-inositol	100,00
Ácido nicotínico	1,00
Piridoxina-HCl	1,00
Tiamina-HCl	10,00
Factores de crecimiento	
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,00
Ácido naftilacético	0,50
Ácido indol acético	0,50
Kinetina	0,20
Otros componentes	
Sacarosa	20000,00
Agar	8000,00

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH

4.1.4 Condiciones de cultivo de *R. graveolens*.

Los cultivos fueron mantenidos en dos condiciones:

- ⇒ Con un fotoperiodo programable de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz suministrado por tubos fluorescentes de tipo luz-día, con irradiancia de 40 wats, a temperatura de 28 ± 2 °C.
- ⇒ Oscuridad continua, a 28 ± 2 °C de temperatura.

4.1.5 Cinética de crecimiento de callos de *R. graveolens*.

Cada 7 días fue determinado el peso húmedo de 20 replicados en balanza analítica (KERN, Germany), el coeficiente de crecimiento fue determinado tomando en cuenta el peso fresco final entre el peso fresco inicial de manera individual para ser reportado como coeficiente de crecimiento.

4.1.6 Determinación de la presencia de alcaloides en cultivo de callos de *R. graveolens*.

Una vez realizada la determinación del peso, las células fueron secadas a 60 °C en estufa hasta pérdida de humedad, para luego ser trituradas en mortero.

Se procedió a la extracción de alcaloides con diclorometano durante 4 días a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Para separar las células se procedió a filtrar a través de papel filtro y el sobrenadante fue expuesto a rotaevaporación a 40 °C a presión reducida.

Para detectar la presencia de alcaloides en tubos de ensayo fueron colocadas 2 gotas del residuo de la extracción previamente solubilizada en metanol, al cual se agregó 2 gotas de HCl 1N más 2 gotas del reactivo de Dragendorff (Solución reveladora) (Ver Anexo 4). Para observar la formación de precipitado en el fondo del tubo de ensayo. Para descartar la presencia de precipitado por compuestos proteicos fue adicionado 2 gotas de etanol 96°GL.

También fue realizado la corrida por Cromatografía en Capa Fina usando como sistema eluyente acetato de etilo:metanol 10 %, utilizando placas cromatográficas con soporte de silicagel de 250 µm de espesor con base de aluminio, con indicador de fluorescencia para luz ultravioleta (254 y 366 nm) (Whatman, Germany).

4.2 *Galipea longiflora*

4.2.1 Material vegetal

El estudio se ha realizado utilizando como material vegetal hojas de plántulas seleccionados de *Galipea longiflora* provenientes de la comunidad de Santa Rosa de Maravilla del departamento de La Paz, Bolivia (S13°56'587, W0.68°00'308), depositados en el Herbario Nacional de Bolivia (Voucher specimen SD17). Las plántulas fueron mantenidas en invernadero a 28 °C en la ciudad de La Paz.

4.2.2 Desinfección de explantos

Las hojas de los plantines fueron mantenidas a 4 °C hasta el proceso de desinfección. La metodología de desinfección empleada comprende:

- Lavado en agua corriente por aproximadamente 5 minutos con agitación.
- Enjuague en agua destilada estéril.
- Pasaje por alcohol etílico 70 °GL durante 30 segundos.
- Sumergir en solución de DG6 0.15 % por 30 minutos.
(A partir de este paso el proceso fue realizado bajo flujo de aire estéril, en la cámara de flujo laminar)
- Sumergir en solución de hipoclorito de sodio (2 % de cloro activo), con el emulsionante tween 20 (3 gotas/100mL) por 1 hora con agitación cada 10 minutos.
- Enjuague con agua destilada estéril, 3 veces consecutivas.
- Sumergir en solución con anfotericina B por 30 minutos.
- Dejar que el agua sea absorbido en cajas de Petri que contienen discos de papel filtro estéril ⁽¹⁰⁰⁾.

4.2.3 Cultivo celular *in vitro*

En el área de trabajo de la cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia, se procedió a seccionar los explantes de hojas en segmentos de aproximadamente 0,5 cm de lado e introducidos en tubos de ensayo conteniendo 5 mL de medio de cultivo formulado por Murashige y Skoog y en el medio 4X. (ver composición en tabla 5 y 6),

4.2.4 Condiciones de cultivo de *G. longiflora*.

Una vez sembrados los agregados celulares en los medios MS y 4X, las cajas de Petri fueron selladas con parafilm (Penichey, Menasha). Los cultivos de *G. longiflora* fueron mantenidos en cámara de incubación a 28 ± 2 °C, bajo condiciones de oscuridad continua, con subsecuentes subcultivos de las células cada cuatro semanas a medio fresco.

4.2.5 Cinética de crecimiento de callos de *G. longiflora*.

Cada 7 días fue determinado el peso húmedo de 20 replicados en balanza analítica, el coeficiente de crecimiento fue determinado tomando en cuenta el peso fresco final entre el peso fresco inicial de manera individual para ser reportado como coeficiente de crecimiento.

4.2.6 Determinación de la presencia de alcaloides en cultivo de callos de *G. longiflora*.

Una vez realizada la determinación del peso húmedo las células fueron secadas a 60 °C en estufa hasta la pérdida de humedad, para luego ser trituradas en mortero. Luego se procedió a la extracción de alcaloides con diclorometano durante 4 días a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Para separar las células se procedió a filtrar a través de papel filtro y el sobrenadante someter a rotaevaporación a 40 °C a presión reducida.

Para detectar la presencia de alcaloides fue utilizado el reactivo de Dragendorff y Cromatografía en Capa Fina, utilizando como sistema eluyente éter de petróleo:diclorometano (EP:CH₂Cl₂ 20%)

4.2.7 Peso húmedo Vs diámetro del agregado celular de *G. longiflora* en cultivo

4.2.7.1 Determinación del diámetro celular

Para obtener el promedio del diámetro del callo compacto, callos individuales seleccionados al azar fueron medidos en la superficie inferior de la Caja de Petri, con una regla milimetrada, fueron 4 los puntos medidos por cada callo, 2 mediciones para cada uno de los dos ejes perpendiculares, la medición se llevó a cabo sobre un fondo negro en la misma posición de las cajas, del operador y en los mismos puntos de medición.

Con el promedio de las cuatro mediciones se obtuvo el coeficiente de crecimiento del diámetro celular de callo compacto calculado como se indica a continuación:

$$\text{Coeficiente de Crecimiento (diámetro celular)} = \frac{\text{Diámetro celular final (mm)}}{\text{Diámetro celular inicial (mm)}}$$

4.2.7.2 Determinación del peso húmedo de la masa celular cultivada.

Luego de la medición del diámetro del agregado celular, el peso fresco de la biomasa fue determinado por cada caja de Petri, la masa celular fue extraída del medio de cultivo y pesada en balanza analítica (AND, Japan), para obtener el promedio de peso fresco de tres cajas.

El coeficiente de crecimiento por peso húmedo se determinó tomando en cuenta el peso final y el peso inicial de manera individual por cada unidad de callo⁽⁴⁸⁾.

$$\text{Coeficiente de Crecimiento (peso húmedo)} = \frac{\text{Peso húmedo final (g)}}{\text{Peso húmedo inicial (g)}}$$

4.2.8 Efecto de la variación en la fuente de nutrientes del medio de cultivo sólido MS en el crecimiento de callos de *G. longiflora*.

Se planteó un diseño experimental completamente al azar con arreglo trifactorial 2^3 (8 unidades experimentales), con variación de las concentraciones de los nutrientes mayoritarios del medio de cultivo MS, en base a publicaciones relacionadas con el efecto de estos en la cinética de crecimiento celular y su influencia en la producción de metabolitos secundarios.

Las variables independientes fueron la fuente de carbono ($C_{12}H_{22}O_{11}$), fuente de nitrógeno (NH_4NO_3), fuente de fósforo (KH_2PO_4), la variable dependiente fue el peso húmedo de los callos. La variación de las concentraciones de las fuentes de nitrógeno, carbono y fósforo se detallan en la tabla 7, los otros constituyentes del medio fueron mantenidos constantes. Como medio basal o testigo fue utilizado el formulado MS sin variación en las concentraciones.

El inóculo celular fue aproximadamente 0,4 g de peso fresco sembrados de manera que los bordes y superficie sean los más homogéneos posible sobre la superficie del medio de cultivo (10 mL) contenido en cajas de Petri de 5 cm de diámetro.

Tabla 7. Arreglo trifactorial de las variaciones en la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato en el medio de Murashige Skoog

Exp.	$C_{12}H_{22}O_{11}$ g/L	NH_4NO_3 mg/L	KH_2PO_4 mg/L
1	30	1650	170
2	30	1655.55	170
3	30	1650	226.6
4	30	1655.55	226.6
5	40	1650	170
6	40	1655.55	170
7	40	1650	226.6
8	40	1655.55	226.6

Cada 7 días fueron tomadas al azar 3 cajas por un periodo de 5 semanas, para determinar las características de la cinética de crecimiento determinada por peso húmedo y la actividad enzimática. Cada ensayo fue realizado en tres ensayos independientes y cada ensayo determinado por triplicado; a 28 ± 1 °C, en oscuridad completa.

4.2.9 Efecto de la variación en la fuente de nutrientes del medio de cultivo sólido MS en la actividad oxidasa y peroxidasa de callos de *G. longiflora*

Con el fin de evaluar el efecto de la variación de nutrientes en la actividad enzimática se cuantificó la actividad intracelular oxidasa y peroxidasa. Cada ensayo fue realizado en tres ensayos independientes y cada ensayo determinado por triplicado.

4.2.9.1 Cuantificación de la actividad Oxidasa

Luego de la determinación del peso de los callos, cada cúmulo celular fue colocado en tubos de ensayo a los que se adicionó 2 mL de solución tampón fosfato de sodio pH 7 (19,06mM/30,94mM), esta mezcla fue homogeneizada en vortex (Genie2, USA).

Por ser un método no desnaturizador se utilizó el ultrasonido en un equipo Ultrasonic Homogenizer (Branson 32000) en un ciclo de 30 minutos, para destruir la pared celular y así liberar hacia la solución tampón las enzimas de los compartimentos intracelulares.

Luego, se procedió a separar las células del sobrenadante mediante centrifugación (Jouan CR3i) los tubos de ensayo fueron expuestos a 3000 revoluciones por minuto durante 25 minutos a temperatura ambiente (~ 22 °C).

El sobrenadante resultante de la centrifugación (muestra) fue recolectado para cuantificar la actividad enzimática mediante la oxidación del sustrato ABTS (2,2'-azino-bis(3-etil benzotiazolina-6-sulfonato)) que es ampliamente empleado para la cuantificación de la actividad oxido-reductasa (Ver Anexo 5), 1 mL de la mezcla total de la reacción fue preparada en cubetas de plástico para la lectura en espectrofotómetro, esta contenía:

- 100 µL de ABTS, 10 mM.
- 400 µL de tampón acetato de sodio pH 3,5 (0,84 mM/49,14 mM).
- 400 µL de agua destilada y desionizada, la cubeta fue colocada en el espectrofotómetro UV-Vis (Cintra 5, GBC Scientific Equipment).
- la reacción fue iniciada adicionando 100 uL de sobrenadante de callos.

Inmediatamente se midió la oxidación del ABTS tomando en cuenta la absorbancia inicial al colocar la muestra y el incremento de absorbancia a 420 nm de longitud de onda que es el máximo pico de absorción ^(101,102), por el intervalo de 1 minuto a temperatura ambiente.

Absorbancia de la muestra (420 nm) = Absorbancia final – Absorbancia inicial

La actividad enzimática fue calculada con la siguiente fórmula, considerando un coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{420\text{nm}}=3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el catión radical del ABTS (producto de la reacción).

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\text{Abs}/t \times V_t \times 1\text{cm}}{\epsilon \times V_m}$$

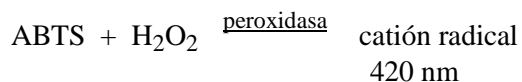
Donde: Abs = Absorbancia de la muestra
t = Tiempo de lectura, 1 minuto.
V_t = Volumen total de la reacción, 1000 µL
1cm = Ancho de la cubeta de lectura
ε = Coeficiente de extinción molar,
V_m = Volumen de la muestra, 100 µL

Una Unidad Internacional (U) de actividad enzimática, se define como la cantidad de enzima requerida para catalizar la formación de 1 micromol de radical ABTS por minuto a temperatura ambiente (~ 22 °C).

La actividad enzimática específica se determinó como Unidades de actividad por gramo de peso húmedo de callos

4.2.9.2 Cuantificación de la actividad Peroxidasa

La peroxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno.



Para la determinación de la actividad peroxidasa en cultivo de células se siguió la misma metodología utilizada para cuantificar la actividad oxidasa con el sustrato reductor ABTS, con las siguientes variantes: 100 µL de peróxido de hidrogeno 0,5 mM y para mantener el volumen total de 1 mL, fue adicionado solamente 300 µL de agua destilada y desionizada.

Para calcular la actividad enzimática peroxidasa fue empleada la formula indicada en el anterior acápite. Al resultado calculado fue restada la actividad oxidasa y el dato obtenido fue reportado como actividad peroxidasa.

4.2.10 Estudios para la detección de alcaloides a partir de extractos de callos de *G. longiflora*.

4.2.10.1 Recolección de células generadas en cultivo

Células cultivadas en medio MS fueron recolectadas a diferentes tiempos de incubación, para formar un cúmulo celular por cada variable, independientemente del tiempo, se tomaron en cuenta las variantes de células sometidas a las siguientes variaciones:

- Presencia de la hormona ácido 2,4-diclorofenoxiacético 5 mg/L (CH)
- Ausencia de la hormona ácido 2,4-diclorofenoxiacético (SH)
- Sometidas a exposición fúngica (CONT). Dos cepas colectadas y aisladas de la planta en su hábitat natural (Santa Rosa de Maravilla), fueron seleccionadas como elicitores para estimular la biosíntesis de alcaloides en cultivo de células. El medio de cultivo empleado para el aislamiento fúngico fue agar papa dextrosa (8 g/L de agar, almidón de papa de 250 g/L, 10 g/L de glucosa) el cultivo fue incubado a 23 °C por 7 días. Una vez aisladas las cepas, estas fueron inoculadas en medio líquido papa dextrosa. Luego de 7 días el micelio fue esterilizado en autoclave a 1.5 atmósfera de presión, 120 °C, durante 30 minutos para luego ser colectado y lavado 2 veces con agua destilada. Cada 1 g de la biomasa fúngica fue resuspendida en 5 mL de medio MS y homogeneizado por agitación mecánica, este homogeneizado fue esterilizado en autoclave nuevamente por 30 minutos. 1 mL de la suspensión miceliar fue empleada como elicitador incorporada a la quinta semana de cultivo de callos, para ser recolectadas a la sexta, séptima y octava semana de cultivo, con los cuales se formó un pool.

4.2.10.2 Preparación del extracto celular

Las células recolectadas fueron desecadas en estufa (FAETA, Argentina) a 60 °C hasta la pérdida total de humedad, la masa celular seca fue triturada en mortero para posteriormente ser sometidas a maceración en diclorometano por 96 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, el solvente fue evaporado a sequedad en rotaevaporador (Heidolph)

a 40 °C a presión reducida, obteniéndose así el extracto diclorometánico. El residuo de la extracción fue redissuelto en diclorometano para realizar los estudios cromatográficos.

4.2.10.3 Estudios cromatográficos del extracto de células de *G. longiflora*

Para el fraccionamiento de los compuestos presentes en los cultivos celulares, fueron empleadas técnicas cromatográficas como:

- **Cromatografía en columna abierta**, con gel de sílice de 0,063-0,020 mm de diámetro, con un volumen de elusión de 60 mL de diferentes mezclas: éter de petróleo:diclorometano (20%), diclorometano, diclorometano:metanol (5%), diclorometano:metanol (30%), obteniéndose así IV fracciones.
- **Cromatografía en capa fina**, las cuatro fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta, fueron sometidas a cromatografía en capa fina utilizando placas cromatográficas con soporte de silicagel de 250 µm de espesor con base de aluminio, con indicador de fluorescencia para luz ultravioleta (254 y 366 nm) (Whatman, Germany). utilizando como sistemas de elusión mezclas de: *n*-Hexano-Et₂O (10%), CH₂Cl₂:Me₂CO (5%), CH₂Cl₂:MeOH (5%) y CH₂Cl₂:MeOH (30%), realizando la corrida cromatográfica junto a alcaloides purificados de *G. longiflora* para la comparación de Rf's.

Para identificar los componentes del extracto de células de *G. longiflora* el Factor de Retención (Rf) fue comparado con sustancias purificadas e identificadas obtenidas del extracto de alcaloides totales de las hojas de la planta.

4.2.10.4 Estudios espectroscópicos del extracto de callos de *G. longiflora* mantenidos en medio MS.

Los estudios espectroscópicos fueron realizados en el Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" de la Universidad de La Laguna-Tenerife-España. Los espectros de RMN ¹H fueron obtenidos en espectrómetros BRUKER AVANCE 300 y AMX500, utilizando programas de HMQC y HMBC.

Para la realización de los experimentos los productos fueron disueltos en un pequeño volumen de CDCl₃ en un vial para la identificación de alcaloides por análisis de

espectrometría de masas. Los espectros de masas de baja resolución fueron realizados en un espectrómetro HEWLETT-PACKARD, modelo 5995 y VGMICROMASS ZAB-2F. La determinación de las fórmulas moleculares de fragmentos y de iones moleculares fue realizada en un espectrómetro VGMICROMASS ZAB-2F, a potencia de ionización de 15 o 70 CV, y FISONS INSTRUMENTS modelo VG Autospec.

4.2.11 Cultivo en suspensión celular de *Galipea longiflora* en medio MS.

El cultivo de tejido vegetal puede ser realizado en medio sólido y/o líquido, pero, la mayoría de los estudios de la producción de metabolitos secundarios han sido llevados a cabo en medio líquido, predominantemente con cultivo de células en suspensión. Una vez conocida las características de crecimiento de las células en medio sólido, se estudió si el comportamiento de crecimiento en medio líquido era similar al del medio sólido. El cultivo en suspensión celular fue iniciado a partir de callos desarrollados en medio sólido.

4 g de células fueron inoculados en 30 mL de medio líquido MS (sin agar) que corresponde a la octava variante del arreglo trifactorial empleado en medio sólido (40 g/L sacarosa, 1655,5 mg/L nitrógeno y 226,6 mg/L fosfato) contenido en matraces Erlenmeyer de 120 mL (Pirex, Mexico). Una vez sellado con papel aluminio y parafilm, fueron puestos en shaker orbital (Heidolph, Unimax 2010) a 100 rpm, con un diámetro de agitación de 50 mm, a 28 ± 2 °C en oscuridad continua en cámara de incubación. Cada ensayo fue realizado en tres ensayos independientes y cada ensayo determinado por triplicado.

Una variante fue la supresión total del factor de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético en el medio de cultivo, para conocer su influencia en la cinética de crecimiento y en la producción de alcaloides.

Se realizaron evaluaciones semanales del peso húmedo para relacionar con el crecimiento de las células. Con este fin, las células en suspensión fueron separadas del medio de cultivo líquido utilizando papel filtro (Whatman^R no. 10), y expuestas a temperatura ambiente hasta observar pérdida de humedad en el papel, aproximadamente 6 horas a aproximadamente 28 °C, El pellet celular fue colectado en cajas de Petri previamente pesado y tarado para determinar el incremento de masa celular.

Además fue evaluado visualmente el aspecto celular y las características de agrupación en cultivo líquido.

4.2.11.1 Detección de alcaloides en cultivos en suspensión celular de *Galipea longiflora*.

Luego de ser determinado el peso húmedo del cúmulo celular, se procedió al desecamiento en estufa a 60 °C hasta la pérdida total de humedad (aproximadamente 30 horas), la masa celular seca fue triturada en mortero para posteriormente junto al sobrenadante (medio de cultivo) ser sometidas a maceración en diclorometano por 96 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, el solvente fue evaporado a sequedad en rotaevaporador a 40 °C a presión reducida, obteniéndose así el extracto crudo diclorometánico. El residuo de la extracción fue redisolto en diclorometano para realizar los estudios cromatográficos.

Finalmente fueron sometidos a Cromatografía en Capa Fina con éter de petróleo:diclorometano (EP:CH₂Cl₂ 20%) como eluyente.



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*“ La imposibilidad en que estoy para probar que Dios no existe me descubre
su existencia ”*

Blaise Pascal (1623 – 1662)

5.1. *Ruta graveolens*

5.1.1 Cultivo *in vitro* de *R. graveolens*

Con el fin de lograr la desdiferenciación celular los explantes de hojas de *R. graveolens* fueron sembrados en los medios de cultivo MS y 4X, adicionalmente fue evaluado el efecto de la luz, puesto que, existen publicaciones con respecto al desarrollo de manera diferente cuando se cultiva *in vitro* en oscuridad o a exposición luminosa^(103,104).

A la evaluación de crecimiento fue observado que:

- En el medio MS el cultivo de explantes de *R. graveolens* en 2 condiciones: oscuridad continua y alternancia de oscuridad-luz de 12 horas (fotoperiodo), al cabo de 35 días de cultivo no produjo ninguna respuesta callogénica, en ninguno de los dos casos.
- Luego de 21 a 28 días de cultivo en el medio 4X en 2 condiciones: oscuridad continua y alternancia de luz-oscuridad de 12 horas, fue observado el inicio de la desdiferenciación celular, en los bordes del corte de los explantes y sobre la superficie abaxial de las hojas de *R. graveolens*, acorde a lo obtenido por Amoo y De Castro^(105,106).

Básicamente la composición química es similar siendo la principal diferencia la ausencia de 2 factores de crecimiento en el medio MS con respecto al medio 4X. La presencia de ácido naftalenacético y ácido indol acético son esenciales para la desdiferenciación de las hojas de *R. graveolens* para su introducción al cultivo celular.

El porcentaje de desdiferenciación de los explantes de hojas introducidos en condiciones *in vitro* en el medio 4X fue del 92 %, a partir de las células que desarrollaron en estas condiciones fueron realizados 3 subcultivos subsecuentes cada 4 semanas manteniendo separadas las que crecían en oscuridad y las que crecían en fotoperiodos de 12 horas.

La figura 4 muestra las características de crecimiento de *R. graveolens* en oscuridad y en fotoperiodo.

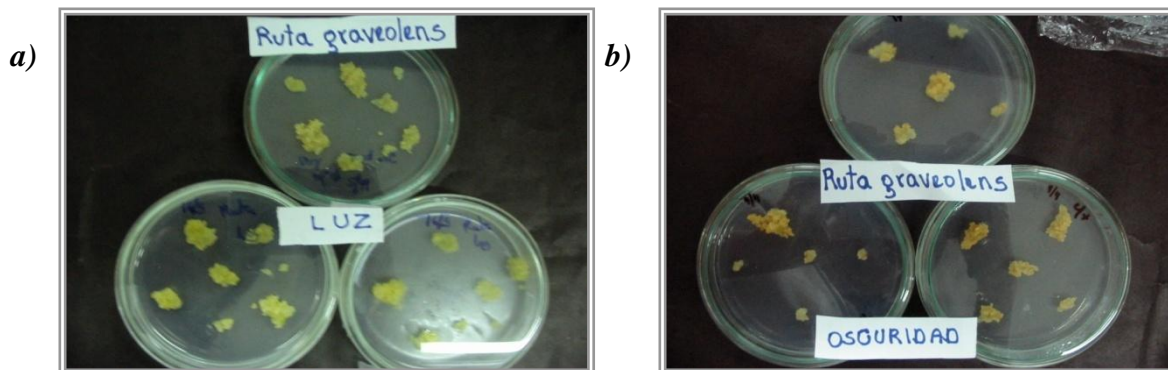


Figura 4. Cultivo in vitro de *Ruta graveolens* en medio 4X. Segmentos de hojas de *R. graveolens* fueron cultivados a 28 ± 2 °C; los callos se muestran a las 6 semanas de iniciado el cultivo en condiciones de: **a)** oscuridad continua y **b)** fotoperiodo de 12 horas.

El aspecto macroscópico varía cuando las células crecen en oscuridad y en periodos de luz, la friabilidad es mayor en caso de exposición a la luz al igual que existe mayor coloración verde en esta condición de cultivo.

Cabe hacer notar que no existió crecimiento de microorganismos contaminantes en la introducción de las hojas a condiciones *in vitro*; es conocido que las hojas de *R. graveolens* es utilizada por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas entre otras, esto permitió obtener un 100% de crecimiento a partir de la desdiferenciación celular.

5.1.2 Cinética de crecimiento de callos de *R. graveolens*

Luego de tres subcultivos en el siguiente cambio de medio fue determinado el aumento de peso húmedo final con respecto al peso húmedo inicial (coeficiente de crecimiento) cada 7 días de cultivo. Los resultados de la evaluación de la cinética de crecimiento celular de *R. graveolens* son mostrados en la figura 5.

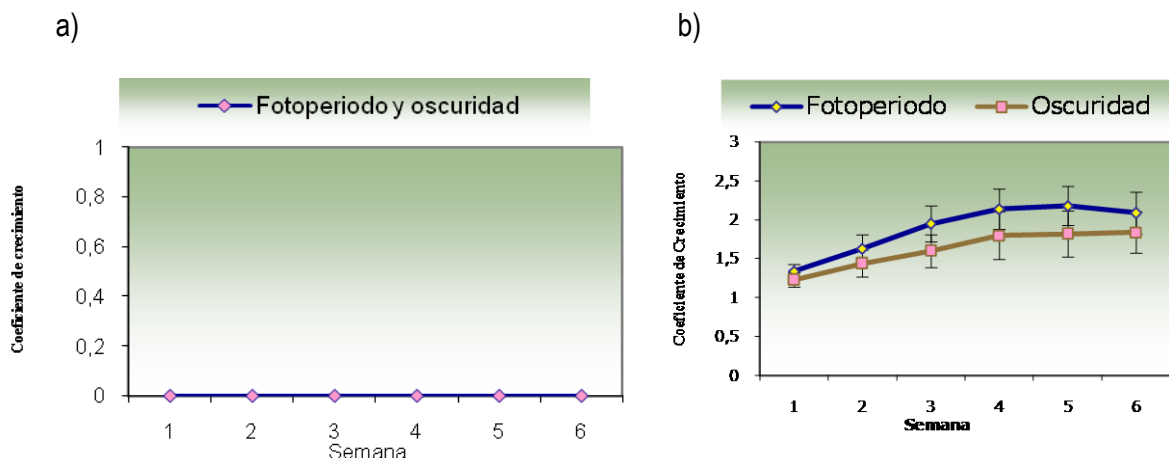


Figura 5. Cinética de crecimiento de callos de *R. graveolens*. Callos cultivados *in vitro*, a) en medio MS y b) en medio 4X, en condiciones de oscuridad continua y fotoperiodo de 12 horas a 28 ± 2 °C.

El cultivo de explantes de *R. graveolens* en el medio MS a exposición a fotoperiodo o en continua oscuridad no dio lugar a la desdiferenciación en callos (figura 5a).

En el medio 4X (figura 5b), el crecimiento de callos en condiciones de fotoperiodo de 12 horas alcanza el valor máximo de 2,18 a la quinta semana de cultivo. Cuando el cultivo es en condiciones de oscuridad continua, el máximo valor de crecimiento es de 1,84 a la sexta semana de cultivo. Luego de este tiempo de cultivo, a la observación de los cultivos se apreció la pérdida de humedad y friabilidad celular.

Las condiciones para la obtención de callos de *R. graveolens* en el IIFB (Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas) son: medio de cultivo 4X, 28 ± 2 °C de temperatura, exposición a fotoperiodo de 12 horas.

5.1.3 Determinación de la presencia de alcaloides en cultivo de callos de *R. graveolens*.

Una parte de las hojas de *R. graveolens* fue utilizada para la introducción a cultivo de callos y otra parte fue conservada para realizar la extracción química.

La detección de alcaloides en los callos y en las hojas de *R. graveolens* fue realizado por la Reacción de Dragendorff y por Cromatografía en Capa Fina, utilizando como control positivo muestras de extracto crudo de las hojas de *R. graveolens* y un control

negativo que contenía el mismo volumen de reactivos utilizados sin muestra alguna. El resultado es mostrado en la tabla 8.

Tabla 8. Detección de alcaloides en hojas y callos de *R. graveolens*

Muestra	Método de detección	Reacción de Dragendorff	Cromatografía en Capa Fina
Hojas de <i>R. graveolens</i>		+	+
Callos de <i>R. graveolens</i>		+	+
Control Negativo		-	-

En la tabla anterior se puede apreciar la presencia de alcaloides en las hojas y los callos de *R. graveolens* determinada por la reacción de Dragendorff y por Cromatografía en Capa Fina.

A partir de hojas de *R. graveolens* fue establecido el crecimiento de callos en el IIFB. Adicionalmente, fue evidenciado que los callos mantienen la capacidad de sintetizar alcaloides *in vitro* con relación a las hojas del arbusto del cual se partieron para el experimento.

Una vez obtenidos los resultados del cultivo *in vitro* de *R. graveolens* hemos iniciado el estudio experimental de otra *Rutacea* de interés en el IIFB, *Galipea longiflora* en condiciones similares a las ensayadas en *R. graveolens*.

5.2 *Galipea longiflora*

5.2.1 Cultivo *in vitro* de *Galipea longiflora*.

Los explantes de hojas de *G. longiflora* fueron sembrados en los medios de cultivo MS y 4X en condiciones de oscuridad continua, aproximadamente a los 25 días de cultivo, se pudo apreciar la formación de callos, en 8% del total de explantes sembrados. El cultivo no fue expuesto a fotoperíodos de luz por antecedentes de que la luz hace que el crecimiento es disminuido en esta condición⁽¹⁰⁰⁾.

La proporción de contaminación fúngica con relación a *R. graveolens* es elevada, de acuerdo a nuestra experiencia atribuimos la presencia de hongos en el cultivo debido a que estos tienen características endofíticas que no son afectados en el proceso de desinfección.

5.2.2 Cinética de crecimiento celular de *G. longiflora*.

Luego de tres subcultivos en el siguiente cambio de medio fue determinada la cinética de crecimiento de los callos de *G. longiflora*. Los resultados pueden ser observados en la figura 6 a y b.

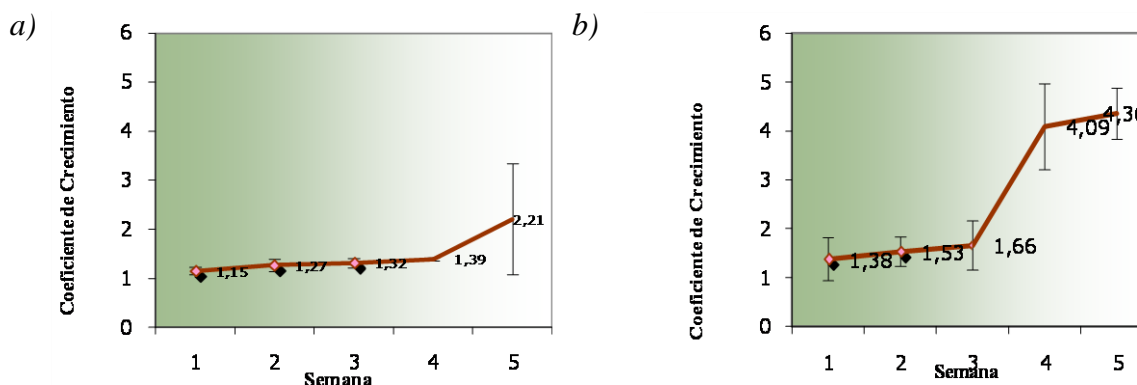


Figura 6. Cinética de crecimiento celular de *G. longiflora* en medio 4X y MS. Células de *G. longiflora* fueron sembradas en medio **a)** 4X y **b)** MS, a 28 ± 2 °C en oscuridad continua.

En cinco semanas de cultivo el máximo valor de coeficiente de crecimiento es 2,21 en el medio 4X, este valor es duplicado a 4,36 cuando las células fueron cultivadas en el medio MS.

La composición nutricional del medio de cultivo 4X no es adecuada para lograr el crecimiento de células de *G. longiflora* de tal manera que el crecimiento forme una curva sigmoidea (figura 6a). A la observación macroscópica, el aspecto celular no presentó cambios notables, sin aparente pérdida de viabilidad; los callos en medio 4X son menos hidratados comparando al cultivo de callos en medio MS.

La figura 6 b, correspondiente a células de *G. longiflora* en medio de cultivo MS muestra una típica tendencia de crecimiento celular, con la fase de adaptación prolongada hasta la tercera semana, la fase de crecimiento abarca entre la tercera y cuarta semana, alcanzando el máximo valor de coeficiente de crecimiento a la quinta semana.

A la observación macroscópica de los cultivos, fue evidenciado que existe disminución de la friabilidad y aumento del turgor en la superficie del agregado celular luego de la quinta semana de cultivo, estos cambios pueden ser atribuidos al agotamiento

de nutrientes del medio de cultivo y/o al decremento del contenido de agua por evaporación.

Las condiciones para la obtención de callos de *G. longiflora* en el IIFB son: medio de cultivo MS, 28±2 °C de temperatura, a oscuridad continua.

5.2.9 Detección de alcaloides en cultivo de callos de *G. longiflora*.

La detección de alcaloides en los callos y en las hojas de *G. longiflora* fue realizada por la reacción de Dragendorff y por Cromatografía en Capa Fina; el resultado es presentado en la tabla 9.

Tabla 9. Detección de alcaloides en hojas y callos de *G. longiflora*.

Método de detección Muestra	Reacción de Dragendorff	Cromatografía en Capa Fina
Hojas de <i>G. longiflora</i>	+	+
Callos de <i>G. longiflora</i>	+	+
Control Negativo	-	-

En la tabla anterior se puede apreciar la presencia de alcaloides en las hojas y los callos de *G. longiflora* determinada por la Reacción de Dragendorff y por Cromatografía en Capa Fina. Los callos mantienen la capacidad de sintetizar alcaloides con relación a las hojas de las cuales fue iniciado el cultivo para realizar el ensayo.

5.2.10 Peso húmedo Vs diámetro del cultivo del agregado celular de *G. longiflora*.

Como parte de los ensayos en forma paralela a la evaluación del crecimiento de *G. longiflora*, fueron determinadas las variaciones del diámetro del agregado celular con respecto a la determinación del peso húmedo en el tiempo de cultivo mantenido en el medio MS, planteando el monitoreo de la variación del crecimiento mediante la medición del diámetro del agregado celular, esto permitiría evaluar el crecimiento sin alterar el tejido ni el ambiente en el cual se encuentra⁽¹⁰⁷⁾. Los resultados se observan en la figura 7.

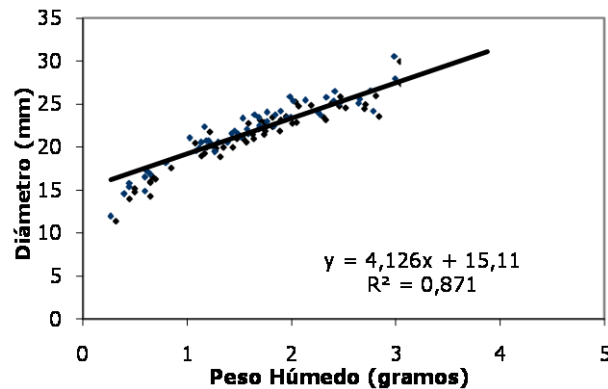


Figura 7. Correlación entre el diámetro y peso húmedo de callos de *G. longiflora*. Determinación del diámetro y el peso húmedo en cultivo de callos de *G. longiflora* durante la cuarta y quinta semana de cultivo en medio MS.

El coeficiente de correlación lineal entre el diámetro y peso húmedo del agregado celular es de 0.8719, la relación fue menor conforme el tiempo de cultivo fue prolongado, esto es atribuido a la característica de expansión de las células vegetales en cultivos *in vitro*, el crecimiento es de tipo bidimensional, por un lado el crecimiento del agregado celular es horizontal y por otro lado, existe un crecimiento vertical, el valor del coeficiente de crecimiento de acuerdo al diámetro es menor, porque no se tomó en cuenta el crecimiento vertical. Además, se conoce que el comportamiento celular normal es el resultado de una compleja cascada de programas genéticos que son sensibles a la disrupción de stress bióticos y/o abióticos. El cultivo *per se* puede ser muy estresante para las células vegetales e involucran procesos mutagénicos durante el establecimiento del explante, la inducción del callo, etc. a esto se atribuiría la diferencia de crecimiento de diferentes clones celulares con variación en el comportamiento.

Se trabajó con los grupos celulares más homogéneos posibles, no obstante, el inoculo celular presentó cierta variación. Para minimizar la respuesta variable del tratamiento atribuible a la naturaleza heterogénea del inóculo celular, fue considerado el coeficiente de crecimiento en forma individual para cada grupo celular como se detalla en Material y Métodos.

A partir de los resultados fueron realizadas las determinaciones del coeficiente de crecimiento en base al peso húmedo

5.2.5 Efecto de la variación en la fuente de nutrientes del medio de cultivo MS en el crecimiento de callos de *G. longiflora*.

Es esencial estudiar el efecto de los diferentes componentes de los medios de cultivo para seleccionar el más apropiado ya sea para el crecimiento celular o con el fin de obtener algún producto en particular. Una vez obtenida suficiente masa celular en cultivo *in vitro*, se estudio la variación de los macronutrientes: sacarosa, nitrógeno y fosfato, considerados por su directa relación con el metabolismo primario, los cuales fueron modificados a partir del medio basal MS; la influencia de los cambios de concentración en el crecimiento celular determinado por peso se aprecian en las siguientes figuras.

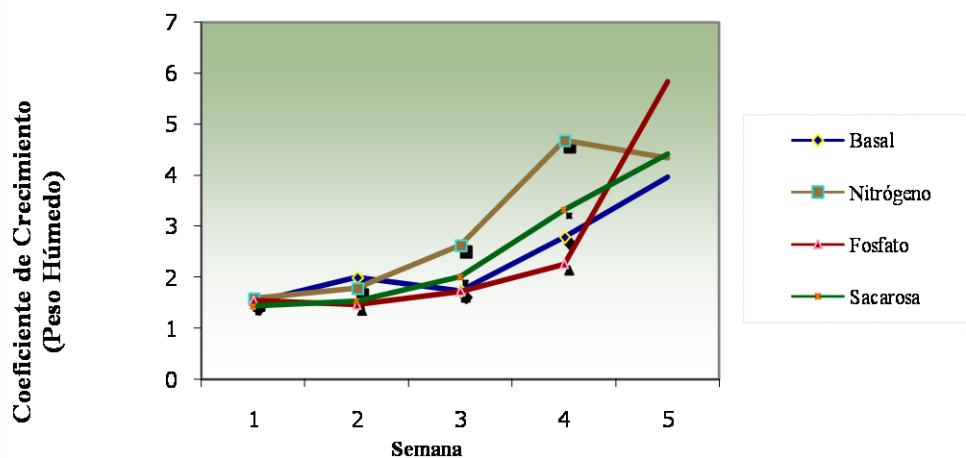


Figura 8. Efecto del incremento de la concentración de sacarosa, nitrógeno, y fosfato sobre el crecimiento de *G. longiflora* en medio MS. Determinación del coeficiente de crecimiento por peso húmedo al variar las concentraciones en forma individual (ver tabla 7). 5 semanas de cultivo a 28 ± 2 °C en oscuridad completa. Los datos representan el promedio de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

(La desviación estándar de los resultados de las figuras 8, 9 y 10 se registran en el Anexo 7)

El incremento de nitrógeno hace que el coeficiente de crecimiento alcance el valor máximo (4,68) a la cuarta semana de cultivo, comparando con el valor máximo alcanzado en el medio basal MS (3,96) a la quinta semana de cultivo.

En vegetales el nitrógeno es considerado como el cuarto elemento más abundante después del carbono, hidrógeno y oxígeno. Como componente de proteínas, coenzimas, nucleótidos y clorofila está implicado en todos los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, las plantas generalmente emplean nitrato como fuente de nitrógeno, y se cree que los cultivos *in vitro* no tendrían dificultad en usar el nitrato como fuente de nitrógeno ⁽¹⁰⁸⁾. Típicamente, los medios de cultivo contienen como fuente de nitrógeno dos compuestos principales, el nitrato inorgánico y el amonio. A decir del amonio, es la fuente más próxima de nitrógeno reducido y posiblemente es absorbido como amina, se sabe de su profunda influencia en la utilización del nitrato reflejado en el incremento del crecimiento, la reducción del crecimiento en cultivos celulares con elevadas concentraciones de amonio, puede reflejar la inhibición de sistemas enzimáticos ^(108,109), aspecto que se consideró, al suministrar el nitrógeno como combinación de las dos formas iónicas NH_4^+ y NO_3^- en el medio de cultivo.

Con respecto a la fuente de fósforo, éste es uno de los nutrientes primarios o macronutrientes para las plantas, se encuentra en todas las células vegetales, forma parte de los ácidos nucleicos, adenosin-fosfatos, piridin nucleótidos. El fósforo se encuentra en la mayoría de las plantas en concentraciones entre 0.1 a 0.4 %, es absorbido en forma iónica como H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} (ortofosfatos), este compuesto fue adicionado al medio de cultivo en la forma de KH_2PO_4 . Con el incremento de fosfato el coeficiente de crecimiento alcanzado es de 5,84 a la quinta semana de cultivo.

Por otra parte, se conoce que las células en cultivo pueden crecer consumiendo un amplio rango de carbohidratos, pero los mejores resultados se han obtenido con sacarosa y glucosa dependiendo de la especie ^(110,111,112). Usualmente las concentraciones de sacarosa empleadas para cultivo celular están en el rango de 2 a 4 %, en algunos casos se emplea una concentración de hasta el 12%, son esenciales los cambios fisiológicos celulares en respuesta a la privación o exceso de carbohidratos, la concentración óptima varía de acuerdo a la especie vegetal ⁽¹¹⁰⁾. Resultados previos ponen de manifiesto una marcada acumulación de biomasa en medios de cultivo que contienen gran cantidad de azúcar, debido a un prolongado periodo de crecimiento y a la vez relacionado con la producción de metabolitos secundarios ^(46,110), el coeficiente de crecimiento máximo obtenido es de 4.42 a la quinta semana de cultivo

En general el incremento en la concentración de las tres fuentes de manera independiente, permite obtener mayor cantidad de biomasa celular, comparado con la masa celular obtenida con el medio basal MS. Otro punto en común, es que fue requerida una fase de adaptación de tres semanas para luego continuar con la fase de crecimiento celular.

El incremento simultáneo de dos nutrientes tuvieron los efectos mostrados en la figura 9.

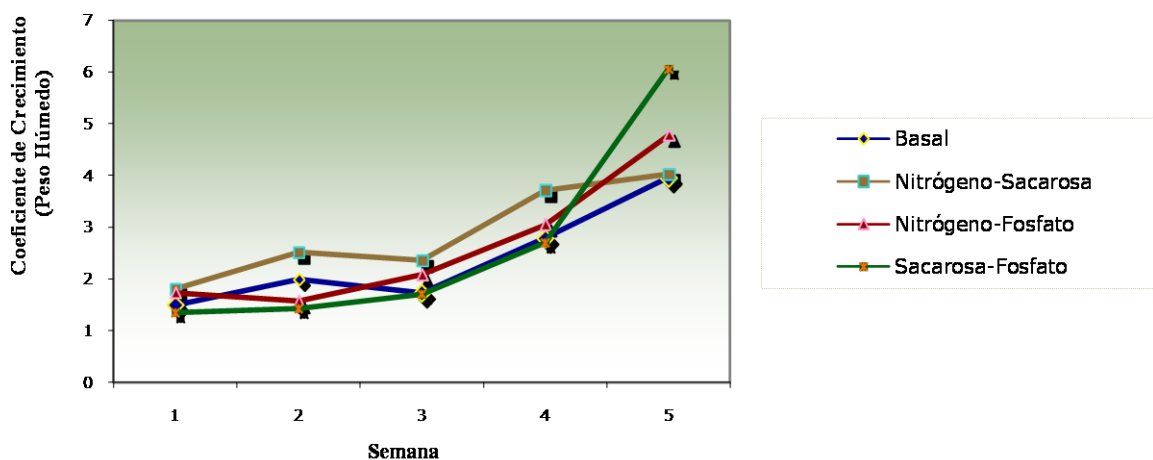


Figura 9. Efecto del incremento dual de la concentración de sacarosa, nitrógeno, y fosfato sobre el crecimiento de *G. longiflora* en medio MS. Determinación del coeficiente de crecimiento por peso húmedo al variar la concentración en forma dual (ver tabla 7). 5 semanas de cultivo a 28 ± 2 °C a oscuridad completa. Los datos representan el promedio de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

En general el incremento en la concentración de dos fuentes de nutrientes permite obtener mayor crecimiento, en comparación con el crecimiento obtenido en el medio basal MS (3.96), el incremento de nitrógeno-fosfato alcanza un coeficiente de crecimiento de 4,78, el de sacarosa-nitrógeno 4.03, y el de sacarosa-fosfato 6.06.

El incremento simultáneo de tres nutrientes permite obtener los siguientes resultados.

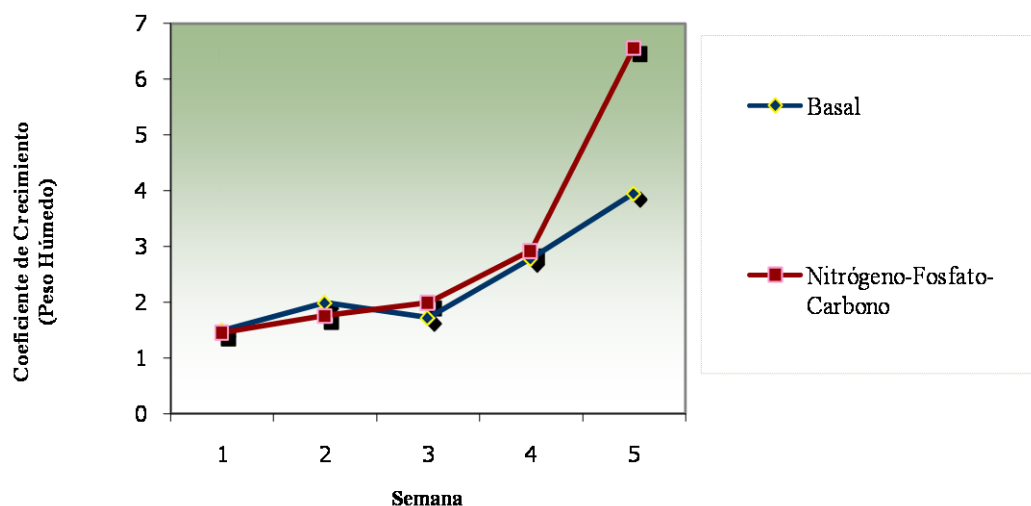


Figura 10. Efecto del incremento conjunto de sacarosa, nitrógeno, y fosfato sobre el crecimiento de *G. longiflora* en medio MS. Determinación del coeficiente de crecimiento por peso húmedo al incrementar la concentración (ver tabla 7. 5 cinco semanas de cultivo a 28 ± 2 °C a oscuridad completa. Los datos representan el promedio de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

El incremento simultáneo de los tres nutrientes permite obtener al máximo de coeficiente de crecimiento 6.57 a la quinta semana de cultivo.

En los anteriores ensayos fue realizado el seguimiento durante cinco semanas de cultivo, solamente en los casos de incremento de nitrógeno y nitrógeno-sacarosa se logra alcanzar la fase estacionaria; para determinar el momento en el cual el crecimiento se detiene, fue evaluado el comportamiento en idénticas condiciones a las que se obtuvo mayor formación de biomasa, el crecimiento se puede apreciar en la figura 11.

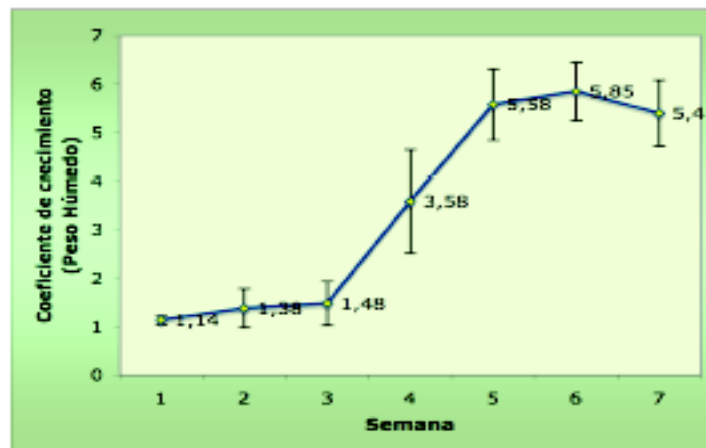


Figura 11. Cinética de crecimiento de callos de *G. longiflora* en medio MS al incrementar nitrógeno, fosfato y sacarosa. Células cultivadas en medio MS, en condiciones de oscuridad completa a 28 ± 2 °C, en 7 semanas de cultivo.

Entre la quinta y la séptima semana de cultivo el crecimiento alcanza la fase estacionaria, los cambios en la última etapa de cultivo, son atribuibles a diferentes factores: la depleción de la concentración de nutrientes por el consumo celular, el tiempo de cultivo que hace que muchos componentes (factores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos, etc.) sean lábiles a las condiciones expuestas; por otra parte, la acumulación de metabolitos secundarios o de desecho del metabolismo hacen que estos lleguen a ser tóxicos en el medio celular, alterando así la fisiología normal de la célula y su viabilidad ⁽⁶⁸⁾. La disminución del peso puede ser atribuida a la pérdida de contenido de agua en la célula, debido al prolongado tiempo de cultivo, estas circunstancias dieron lugar a agregados celulares menos friables especialmente en la superficie (Mas detalles ver anexo 6).

La figura 12 muestra las características morfológicas del cultivo de callos de *G. longiflora* a la quinta semana de cultivo.

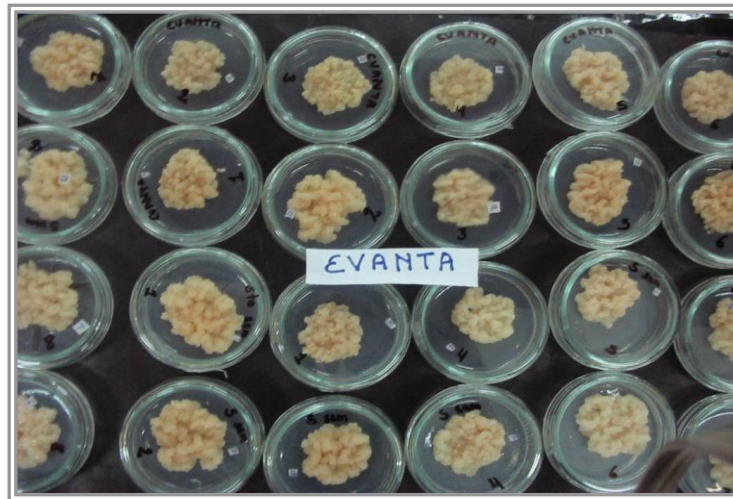


Figura 12. Cultivo *in vitro* de callos de *G. longiflora*. La fotografía corresponde a la quinta semana de cultivo en medio MS, en condiciones de oscuridad completa a 28 ± 2 °C.

Basados en el análisis estadístico STATISTICA v.6 (StaSoft Inc., USA), la influencia individual y conjunta de las variaciones ensayadas se puede apreciar en la tabla 10.

Tabla 10. Análisis estadístico de la variación de la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato en el medio MS y su influencia en el crecimiento de callos de *G. longiflora*.

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(4)	p-level
Intercept			0.167500	0.057500	2.913043	0.043545
Sacarosa [g/L]	0.413795	0.366049	0.065000	0.057500	1.130435	0.321483
Nitrógeno [mg/L]	-0.254643	0.366049	-0.040000	0.057500	-0.695652	0.524947
Fosfato [mg/L]	0.477455	0.366049	0.075000	0.057500	1.304348	0.262104

Regression Summary for Dependent Variable: Vel. de crecimiento d-1 (Spreadsheet1)

R = .68119925 R² = .46403242 Adjusted R² = .06205674

F(3,4)=1.1544 p<.42977 Std. Error of estimate: .08132

El incremento de sacarosa en el medio de cultivo es estadísticamente significativo sobre el crecimiento celular, puesto que, el valor de p (0.321483) está por debajo del p aceptado (0.42977). De manera contraria, la variación de la fuente de nitrógeno no es significativo (0,524947), por ser el valor de p mayor al aceptado, el incremento de

nitrógeno no afecta al crecimiento celular. El incremento de la concentración de fosfato en el medio de cultivo es el que tiene mayor influencia (comparado con la sacarosa) sobre el aumento de la formación de masa celular con un valor de $p = 0.262104$.

A decir del incremento de fósforo, se añadió como fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), como fosfato participa en todas las reacciones energéticas del metabolismo celular, tales como procesos anabólicos y transferencia de los caracteres hereditarios ⁽¹¹³⁾. El potasio es el único catión monovalente esencial no solamente para los vegetales, sino también para casi todos los seres vivos, el principal papel del potasio es el de actuar como activador de numerosas enzimas; no está aún aclarado el porqué para una acción simplemente catalítica como es la de actuar como activador enzimático las plantas requieren concentraciones relativamente elevadas de potasio. Algunos investigadores sugieren, que el potasio mantiene un ambiente iónico apropiado para preservar la estructura tridimensional en orden, el potasio también parece desempeñar un papel importante en el transporte de azúcares por el floema, y de hecho el potasio está implicado en la teoría electro-osmótica de transporte de solutos por el floema ⁽¹¹³⁾, aspectos que afectan la fisiología celular vegetal al momento de su estudio.

El intercepto que evalúa la influencia conjunta de los tres nutrientes es altamente significativo con un valor de $p = 0.04354$ muy por debajo de la p aceptada $0,42977$, esto indica que la interacción de el incremento de nitrógeno, fósforo y carbono favorecen el crecimiento celular. Existe referencia literaria en cuanto a la relación entre dos o más componentes en el metabolismo celular, así nos referimos a la absorción de amonio que suele provocar en las plantas una gran demanda de carbohidratos, puesto que al poder ser utilizado inmediatamente en la síntesis de aminoácidos se requiere un suministro adecuado de esqueletos carbonados que por aminación se transformarán en aminoácidos. En cambio, la absorción de nitrato no provoca este efecto ya que tiene que ser primeramente reducido, por ello, la demanda de carbohidratos es menor. El ión amonio puede actuar como activador de varias enzimas, generalmente los mismos para los que el potasio actúa como catión activador desencadenando o catalizando varias vías sintéticas ⁽¹¹³⁾. Otro dato con respecto a la interacción es que el incremento de fósforo facilita la utilización de azúcar y nitrógeno ⁽¹¹⁴⁾. Otro factor que podría influir, son las condiciones físicas de cultivo, por

ejemplo en oscuridad continua o completa, la reducción de nitratos corre a expensas del contenido de carbohidratos ⁽¹¹³⁾.

Con la variación de sacarosa y fosfato que individualmente presentan significancia estadística fue realizado el análisis de superficie de respuesta. Esto permitió un adecuado y eficiente control del modelo de polinomio de segundo grado Statistica v.6 (Statsoft Inc, EE.UU.) para el análisis de datos estadísticos. Los resultados fueron analizados con ANOVA factorial ($p \geq 0,05$).

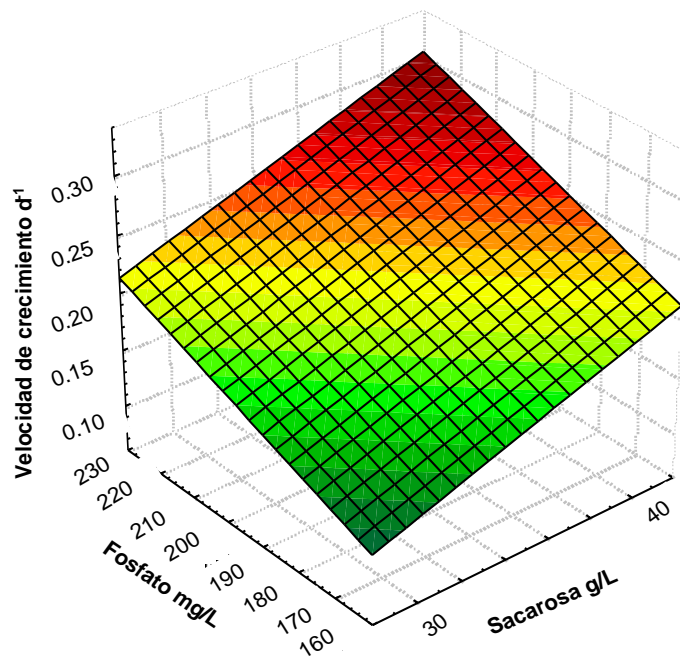


Figura 13. Análisis de Superficie de Respuesta de la Velocidad de Crecimiento (d^{-1}).

Según variación en la concentración de sacarosa y fosfato del medio MS.

El mapeo de la superficie de respuesta de la velocidad de crecimiento según el incremento de la concentración tanto de sacarosa como de fosfato, señala que el incremento favorece la velocidad de crecimiento y la tendencia para obtener mayor masa celular esta direccionada a seguir aumentando las concentraciones hasta llegar a la región del punto idóneo, en el que la formación de biomasa sea optimizada.

5.2.6 Efecto de la variación en la fuente de nutrientes del medio de cultivo MS en la actividad oxidasa y peroxidasa de callos de *G. longiflora*

Como parte del estudio fue evaluado el efecto de la variación de $C_{12}H_{22}O_{11}$, NH_4NO_3 y KH_2PO_4 sobre la actividad enzimática oxidasa y peroxidasa en el curso del crecimiento celular, en la figura 14 se pueden observar los resultados obtenidos.

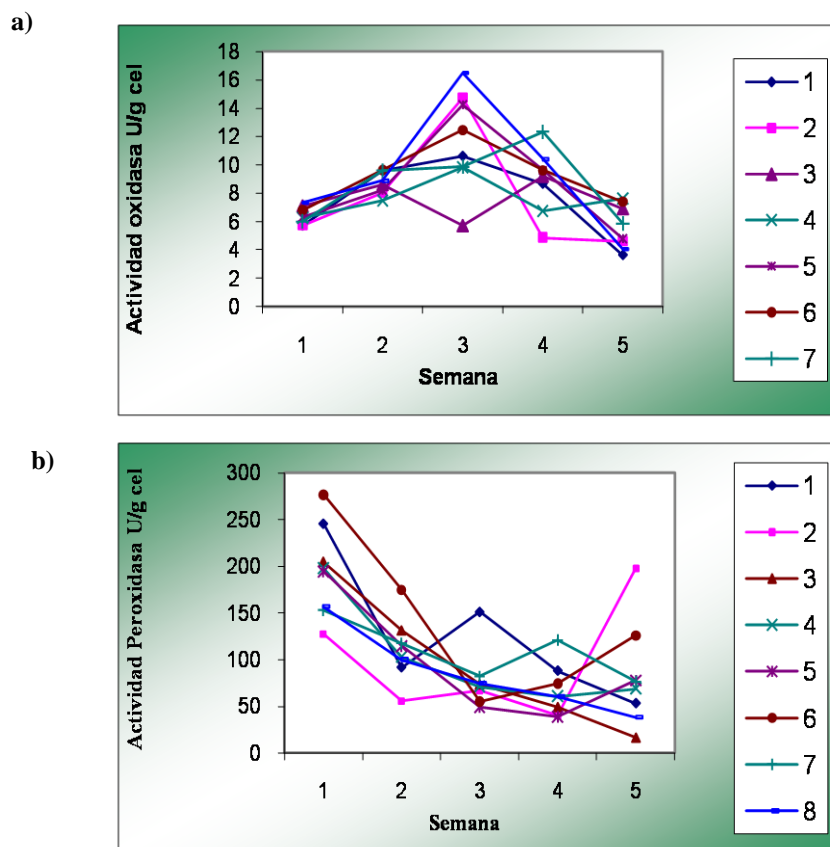


Figura 14. Efecto del incremento de sacarosa, nitrógeno y fósforo en la actividad enzimática de callos de *G. longiflora*. Mediante arreglo trifactorial fue variado la concentración de nutrientes en el medio MS (ver tabla 7), para evaluar el efecto en la actividad a) Oxidasa y b) Peroxidasa. Los datos representan el promedio de tres ensayos independientes realizados por triplicado, mantenidos a $28 \pm 2^\circ C$ en oscuridad continua. (La desviación estándar de los resultados se registra en el Anexo 7).

De manera general, la cuantificación de la actividad oxidasa presenta incremento hasta la tercera semana para luego disminuir progresivamente (Figura 14 a); el punto de mayor actividad coincide con la etapa de cambio entre la fase de acondicionamiento y la fase de crecimiento activo, en este punto de inflexión el cambio de las características de la

etapa de crecimiento podrían definir el cambio de perfil de actividad oxidasa a este tiempo de cultivo de callos de *G. longiflora*. Existen reportes del cultivo celular de *Acer pseudoplatanus* donde la producción de oxidasa (lacasa) es independiente del crecimiento celular⁽¹¹⁵⁾.

En la figura 14 b se aprecia el efecto de la variación de las concentraciones de nutrientes en la actividad peroxidasa en 5 semanas de cultivo, la mayor actividad se presenta a la primera semana de cultivo, para luego, como tendencia general disminuir gradualmente conforme es prolongado el tiempo de cultivo y el crecimiento celular aumenta. Independientemente de la variación de la fuente de nitrógeno, carbono y fosfato en el medio de cultivo, el decremento de la actividad peroxidasa está relacionado con la etapa de crecimiento celular, en concordancia con otros autores^(60,67, 116,117,118,119,120,121). (Detalles de la correlación de la actividad peroxidasa y crecimiento de *G. longiflora* en Anexo 8).

El análisis de ANOVA de 2 factores ($p < 0.05$) tanto para la actividad oxidasa como para la peroxidasa indica que las diferencias no son significativas para la variación de las concentraciones de nutrientes ensayadas, sin embargo, la diferencia es significativa con el tiempo de cultivo en ambos casos.

La marcada actividad de las peroxidasas cuando la célula no está en crecimiento, orienta a otorgarles un rol crucial en el metabolismo secundario, como fue demostrado en *Catharantus roseus*, en la cual se evidenció la participación de oxidasas y peroxidasas en la síntesis de alcaloides⁽¹²²⁾. Añadiendo que, el primer paso en la oxidación del quinol es la formación de la semiquinona, proceso catalizado por la lacasa, con la transferencia de un electrón desde el sustrato al cobre de la enzima, el segundo paso es una reacción no enzimática entre dos moléculas de semiquinonas para dar una molécula de quinona y una de quinol⁽¹²³⁾. Esto proporciona pautas para la optimización de la obtención de un determinado metabolito (moléculas intermedias o productos), dando lugar a la posibilidad de intervenir determinadas rutas metabólicas, para direccionar la síntesis de un producto de interés, esta intervención de las rutas metabólicas también se puede lograr con la manipulación de la actividad de enzimas empleando procesos como el biodireccionamiento, la biotransformación entre otras herramientas de la biotecnología vegetal.

5.2.7 Estudios para la detección de alcaloides a partir de extractos de callos de *G. longiflora*

5.2.7.1 Estudios cromatográficos para la detección de alcaloides a partir de extractos de callos de *G. longiflora*.

El cultivo *in vitro* de células de *G. longiflora* fue realizado a partir de hojas debido a que esta parte de la planta fue asequible a la desdiferenciación celular. En reportes de ensayos de la evaluación de la actividad biológica *in vitro*, los alcaloides presentes en las hojas de *G. longiflora* poseen actividad leishmanicida (dosis letal media) a menores concentraciones, en comparación con los alcaloides de la corteza y de la raíz ^(72,124).

El estudio de la composición de alcaloides en las hojas reportan la presencia de sikimanina (1.7%), 2-fenilquinolina (29%), 2-n-propilquinolina (12.5%), 2-(E)-pro-1'-enilquinolina (chimanina B) (16.7%), 4-metoxi-2-(E)-prop-1'-enilquinolina (chimanina C) (0.5%), 2-(1',2'-transepoxiopropil)-quinolina (chimanina D) (1.7%) ⁽⁷⁴⁾, de acuerdo a la composición de alcaloides de las hojas, se espera que los mismos componentes puedan ser hallados en las células de *G. longiflora* cultivadas *in vitro*; aludiendo a la característica de desdiferenciación en cultivo celular que las hace células totipotenciales capaces de especializarse en cualquier célula de la planta, por ende, con la capacidad de biosintetizar diversos productos.

Una vez secadas y trituradas las células de *G. longiflora* obtenidas por cultivo *in vitro*: en medio MS con ácido 2,4 diclorofenoxiacético (CH, 10.2 g), medio MS sin ácido 2,4 diclorofenoxiacético (SH, 9.9 g) y medio MS con exposición a elicitación con hongos propios de la planta (CONT, 6.2 g), fueron maceradas con diclorometano por 96 horas a temperatura ambiente, al abrigo de la luz; algunos aspectos de los procesos de secado, extracción y fraccionamiento pueden ser apreciados en la figura 15.

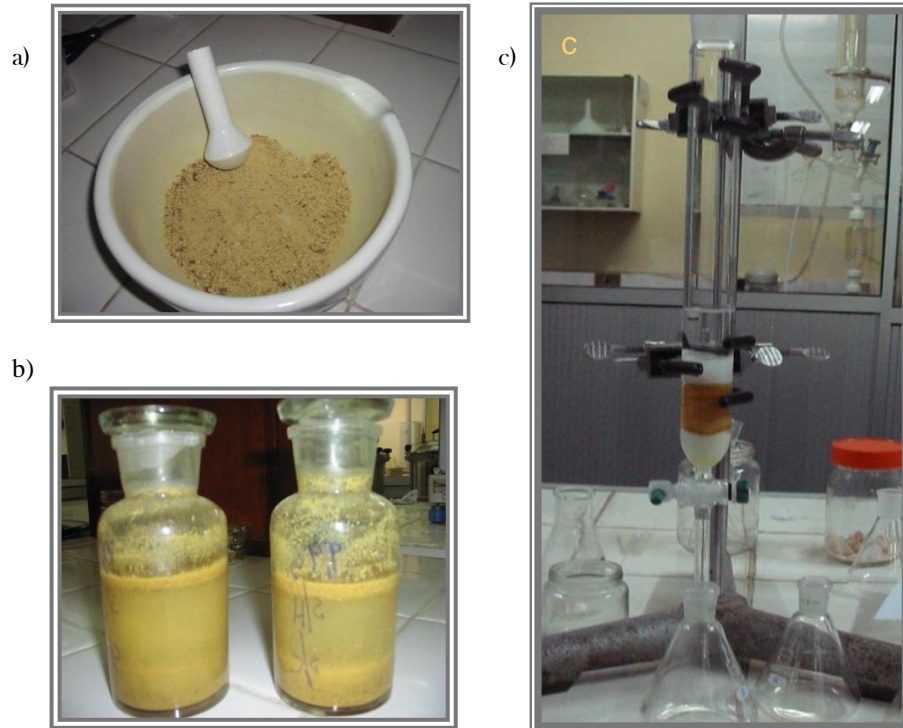


Figura 15. Proceso de extracción de alcaloides de callos de *G. longiflora*. a) Trituración de callos secos en mortero, b) maceración con diclorometano por cuatro días en oscuridad, c) fraccionamiento en columna abierta del extracto diclorometánico.

Posteriormente se procedió a la filtración y separación del disolvente, para obtener los correspondientes extractos diclorometánicos de callos de *G. longiflora*. Los rendimientos obtenidos en cada uno de ellos son mostrados en la figura 16.

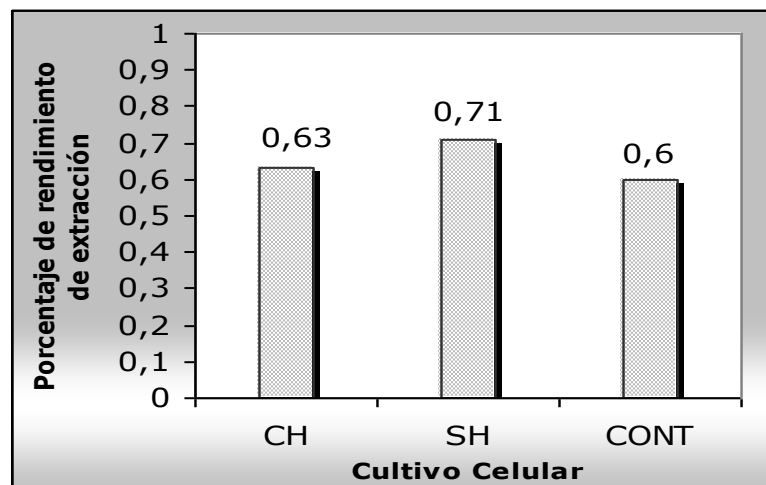


Figura 16. Porcentaje de rendimiento de extracción diclorometánica a partir de callos de *G. longiflora*. Callos cultivados en medio MS a diferentes condiciones: CH=con 2,4-D; SH=sin 2,4-D y CONT=elicitación fúngica, expuestos a extracción diclorometánica.

Usualmente los alcaloides están en bajos niveles de concentración, alcanzando menos del 2 % de peso del material vegetal seco cuando es obtenido de la planta entera ⁽²⁵⁾. El rendimiento del peso de extracción de callos de *G. longiflora*, alcanza el valor por debajo del porcentaje obtenido de plantas, de 0,63 % (64 mg), 0,71 % (70 mg) y 0,6 % (37 mg) para el cultivo celular con el factor de crecimiento 2,4-D (CH), sin 2,4-D (SH) y las expuestas a elicitación fúngica (CONT) respectivamente.

Si bien existen protocolos de aislamiento de alcaloides relativamente sencillos, no todos los grupos siguen el protocolo, usualmente, debido a su estructura particular, ellos pueden quedar escondidos cuando la técnica de aislamiento standard es empleada ⁽³⁷⁾. Es así que se evaluó 4 diferentes sistemas de elusión con diferente polaridad.

Posterior a la extracción con CH₂Cl₂ cada uno de los extractos fue fraccionado por cromatografía en columna abierta, utilizando como sistema de elusión mezclas de éter de petróleo:diclorometano (EP:CH₂Cl₂ 20%) fracción I, diclorometano (CH₂Cl₂) fracción II, diclorometano:metanol (CH₂Cl₂:MeOH 5%) fracción III y diclorometano:metanol (CH₂Cl₂:MeOH 30%) fracción IV, con un volumen de elusión de 60 mL, obteniéndose en cada caso cuatro fracciones, los resultados del rendimiento pueden ser observados en la figura 17.

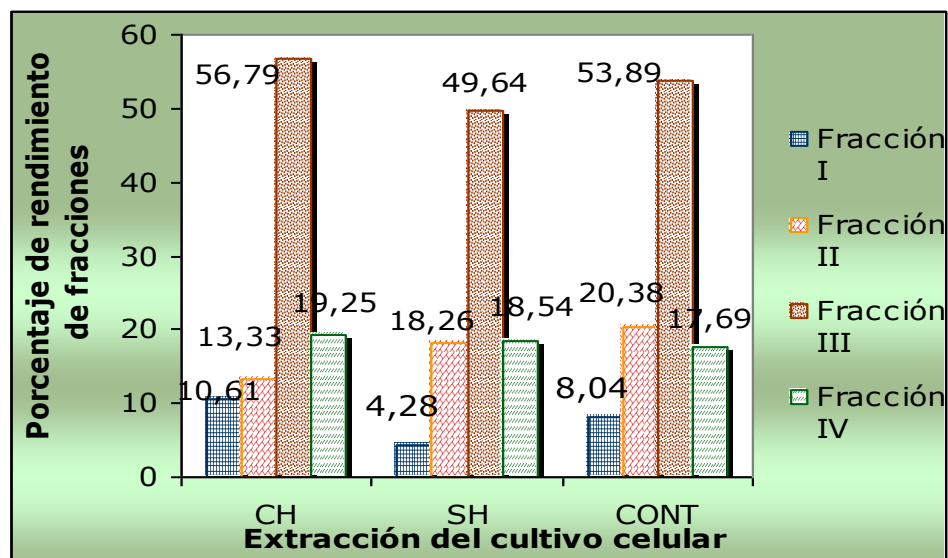


Figura 17. Porcentaje de rendimiento de 4 fracciones a partir del extracto diclorometánico. Fracciones de la cromatografía en columna con EP:CH₂Cl₂ 20% (fracción I), CH₂Cl₂ (fracción II), CH₂Cl₂:MeOH 5% (fracción III) y CH₂Cl₂:MeOH 30% (fracción IV) a partir del extracto diclorometánico.

La mayor fracción obtenida es con diclorometano: metanol 5%, (fracción III) en los tres casos con 56,79 % (36,3 mg); 49,64 % (35,2 mg) y 53,89 % (19,9 mg), siendo la menor fracción obtenida con diclorometano (fracción I) 10.61 % (6,7 mg); 4,28 % (3 mg), 8.04 % (2.9 mg).

Las cuatro fracciones obtenidas fueron sometidas a cromatografía en capa fina utilizando como sistemas de elusión mezclas de: *n*-Hexano-Et₂O (10%), CH₂Cl₂:Me₂CO (5%), CH₂Cl₂:MeOH (5%) y CH₂Cl₂:MeOH (30%), realizando la corrida cromatográfica junto a alcaloides purificados de *G. longiflora* para la comparación de Rf's.

En todas las combinaciones de solventes, la banda presente con mayor intensidad fue la que tenía el Rf correspondiente a la 2-fenilquinolina; además, se observó en menor proporción y frecuencia bandas con Rf's que corresponden a los alcaloides, 2-(3,4-metilendioxi)feniletilquinolina, 2-*n*-pentilquinolina, 4-metoxi-2-fenilquinolina, 2-(3,4-dimetoxi)feniletilquinolina. (Anexo 9)

Con respecto a las condiciones de cultivo: se realizó la diferencia entre el medio con y sin el factor de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético, puesto que existen publicaciones con respecto a que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético y la kinetina inhiben y promueven respectivamente de manera importante la síntesis de algunos metabolitos secundarios en cultivo celular de plantas^(94,125), se suprimió la presencia de este factor de crecimiento manteniendo el de kinetina, y no fue observado diferencias en las bandas de cromatografía. Probablemente sea necesario mayor cantidad de subcultivos para que el efecto de la ausencia de este factor de crecimiento sea expresado fenotípicamente en el metabolismo celular.

De acuerdo a los resultados de producción de alcaloides en callos con elicitación fúngica en las cuatro fracciones, estas células no sintetizan ningún componente alcaloideo exclusivo con respecto al cultivo celular sin la exposición fúngica realizada.

No obstante, no se descarta el efecto elicitor de estos u otros microorganismos para la producción de alcaloides quinolínicos, variables adicionales deben de ser evaluadas para estimular el metabolismo secundario^(2,43,48,94,126,127).

5.2.7.2 Estudios espectroscópicos del extracto de callos de *G. longiflora* mantenidos en medio MS.

El compuesto de mayor y más frecuente presencia de Rf de las 3 fracciones fue aislado mediante Cromatografía en Capa Fina (0,3 mg), en el análisis del Espectro de Masas presenta un pico con la relación masa/carga (m/z) de 205,0921 que corresponde a la fórmula molecular de C₁₅H₁₁N, como se puede observar en la siguiente figura.

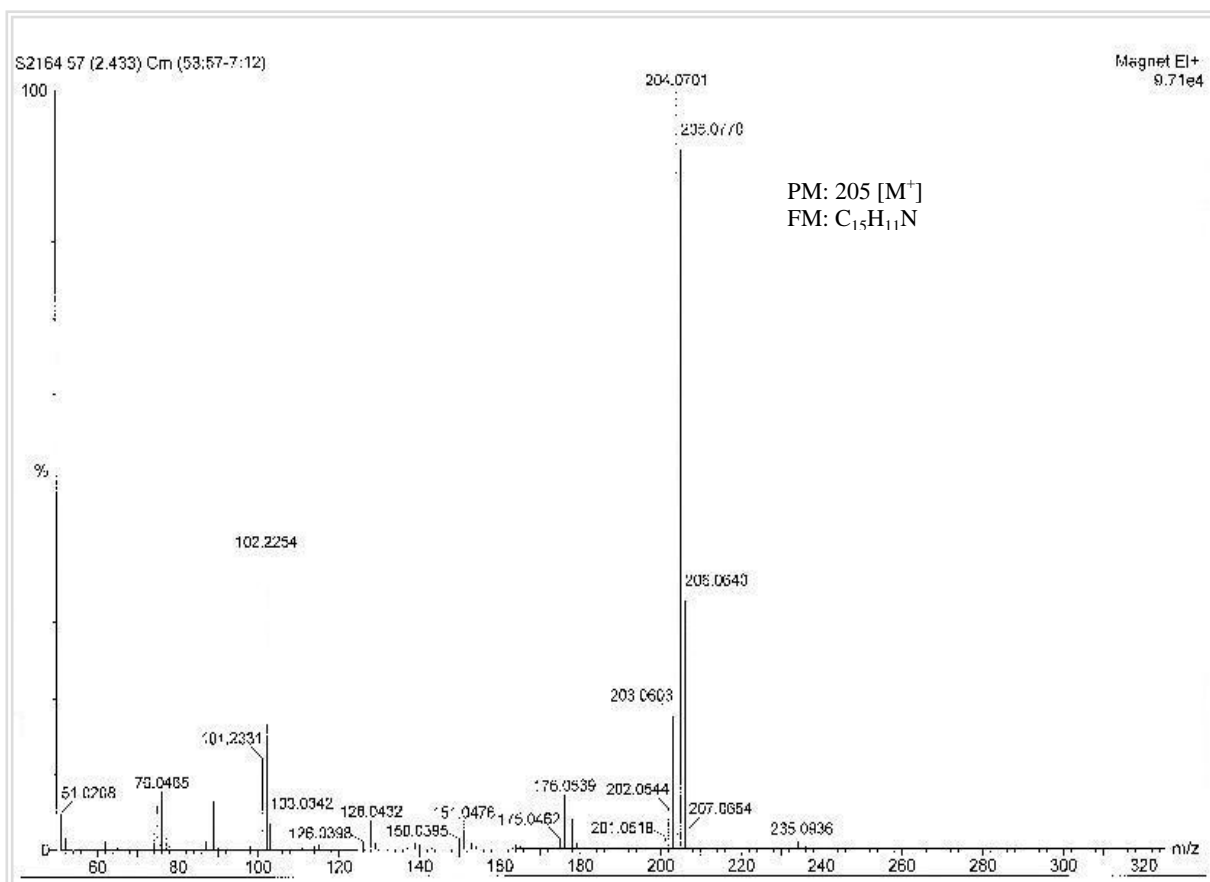


Figura 18. Espectro de Masas del producto de extracción de callos *G. longiflora*. Corresponde al Rf de 2-fenilquinolina en Cromatografía en Capa Fina

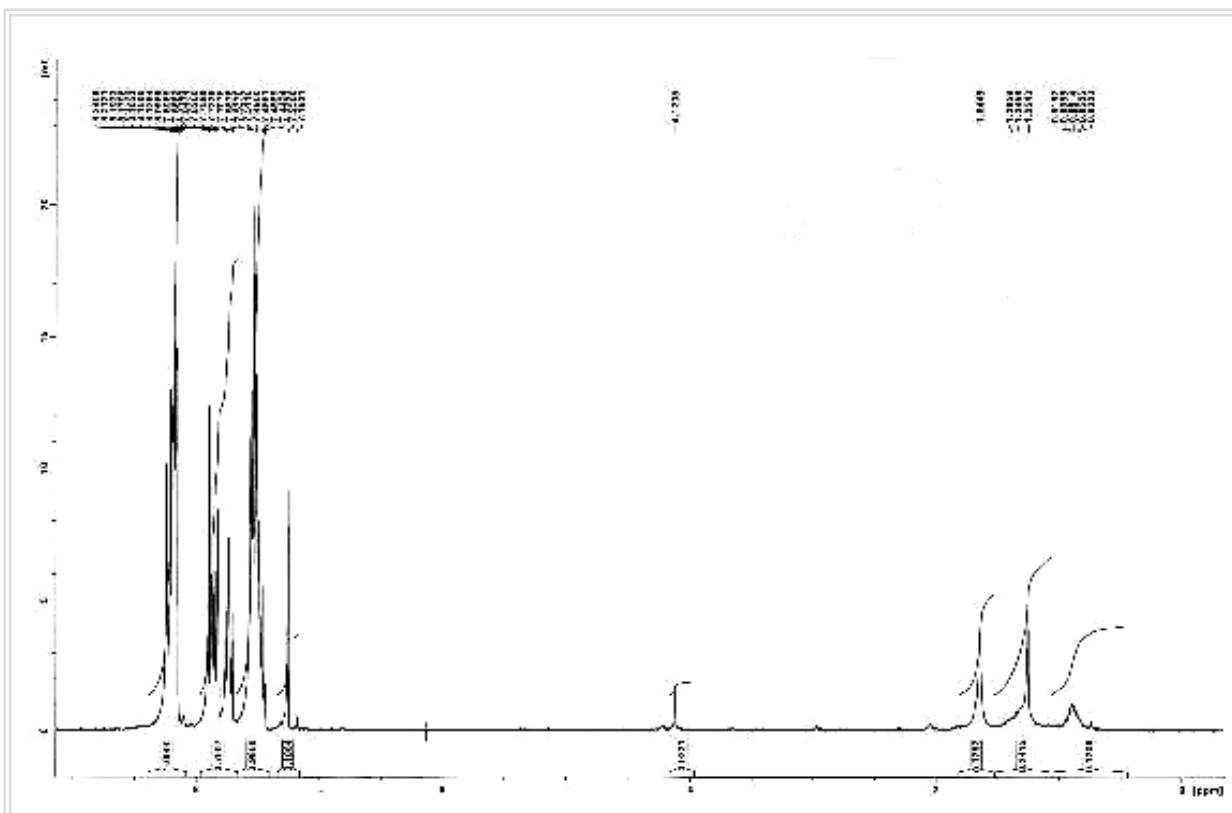


Figura 19. Espectro de RMN¹H del producto de extracción de callos *G. longiflora*.
Corresponde al Rf de 2-fenilquinolina en Cromatografía en capa fina (300MHz)

El espectro de RMN¹H presento un triplete a δ 7,49 (1H, t, J= 7,2 Hz, H-4'); un multiplete a δ 7,51 (1H, m, H-7); presento cuatro señales como tripletes a δ 7,54 (1H, t, J= 6,2 Hz, H-3'); a δ 7,54 (1H, t, J= 6,2 Hz, H-5'); a δ 7,73 (1H, t, J= 7,8 Hz, H-8) a δ 7,83 (1H, t, J= 8,0 Hz, H-6); cinco señales como dobletes a δ 7,88 (1H, d, J= 8,6 Hz, H-3); a δ 8,17 (1H, d, J= 5,2 Hz, H-9); a δ 8,20 (1H, d, J= 5,6 Hz, H-2'); a δ 8,20 (1H, d, J= 5,6 Hz, H-6') y a δ 8,64 (1H, d, J= 8,6 Hz, H-4). Estos datos comparados con los reportados previamente permiten confirmar que las señales corresponden a la estructura de la 2-fenilquinolina⁽¹²⁸⁾.

Naturalmente en las hojas de *G. longiflora* los alcaloides totales representan cerca del 0.5 % en peso, del total de alcaloides la 2 fenilquinolina representa cerca del 30 %, esto correspondería aproximadamente a 0,15 % en peso de las hojas. La fracción mayoritaria obtenida en células cultivadas *in vitro* de *G. longiflora* corresponde a la 2-fenilquinolina, se evidenció que los callos mantienen la capacidad de sintetizar la 2-fenilquinolina (entre otros

alcaloides), este es un alcaloide que aislado de las hojas presenta actividad biológica leishmanicida y tripanocida según previos estudios de la planta ⁽¹²⁴⁾.

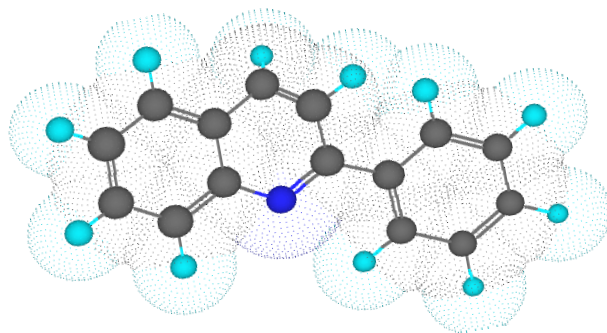


Figura 20. Estructura de la 2-fenilquinolina. Aislado de cultivo de callos de *G. longiflora*.

5.2.8 Cultivo de *Galipea longiflora* en suspensión celular en medio MS.

El cultivo en medio líquido otorga varias ventajas: provee un ambiente homogéneo de crecimiento y agitación uniforme, facilita la absorción de nutrientes por el explanto, simplifica la manipulación para el cambio de medio, diluye con mayor facilidad cualquier exudado de la planta, facilita la extracción de los productos de interés del medio de cultivo sin destruir las células, permite realizar elicitaciones consecutivas, etc. por estas ventajas, los cultivos de células en suspensión son los sistemas más ampliamente empleados. Parte de este estudio fue evaluar el comportamiento celular en medio líquido, dado que, al utilizar medios de cultivo en fase líquida, es factible la adaptación a gran escala en biorreactores, luego de conocer todos los requerimientos para una mayor producción.

Luego de cinco subcultivos en medio sólido MS con incremento de las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono, los callos se tornaron más friables, con características estructurales macroscópicas homogéneas y con mayor crecimiento, estos fueron utilizados para iniciar cultivos en suspensión celular en medio líquido MS con incremento de los tres nutrientes.

Además de la variante física por la ausencia de agar, otra variante fue la supresión del factor de crecimiento ácido 2,4 diclorofenoxiacético, se evaluó el efecto de este factor

de crecimiento en la cinética de crecimiento, los resultados pueden ser observados en la figura 21.

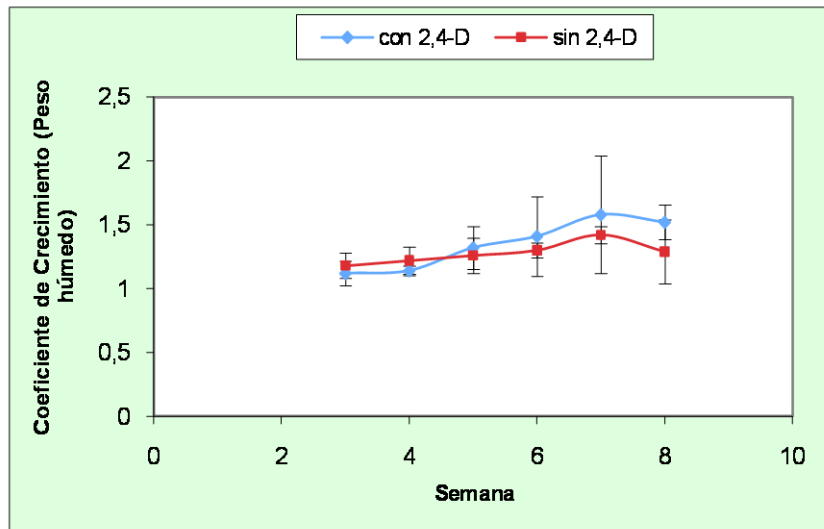


Figura 21. Crecimiento de células en suspensión de *G. longiflora* en medio MS. Células de *G. longiflora* cultivadas con 2,4-D y sin 2,4-D en medio líquido MS; en condiciones de oscuridad completa, agitación a 100 rpm, 28 ± 2 °C.

En medio sólido MS se obtuvo el coeficiente de crecimiento máximo de 6,57 según peso húmedo, comparado con las células cultivadas en medio líquido, que alcanzaron un coeficiente de crecimiento máximo de 1,52 y 1,48 con y sin 2,4 D respectivamente.

No existe gran variación en la formación de masa celular cuando el cultivo se lleva en presencia o ausencia del factor de crecimiento ácido 2,4 diclorofenoxiacético, probablemente este efecto acrecentaría con subcultivos sucesivos en similares condiciones, puesto que, para algunas especies es necesario varios subcultivos para que se exprese fenotípicamente la respuesta a determinado cambio.

Los factores que probablemente influyeron para que el crecimiento celular en el medio de cultivo líquido MS sea escaso son: la aireación a las células de manera no directa, la falta de agregación celular, la naturaleza del callo, etc.

De la observación macroscópica de los cultivos celulares, encontramos que el aspecto del medio de cultivo comenzó a presentar turbidez por la desagregación del acumulo celular que fueron liberados al medio conforme el tiempo de cultivo fue prolongándose.



Figura 22. Células de *G. longiflora* cultivadas en medio líquido MS. Suspensión celular de *G. longiflora* cultivadas en medio líquido MS con incremento de nitrógeno (1655,5 mg/L) fosfato (2226,6 mg/L) y sacarosa (40 g/L); incubados a 28 ± 2 °C, 100 rpm de agitación, en oscuridad continua.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la agregación celular es crucial para el crecimiento *in vitro* de la especie *G. longiflora*, un ensayo adicional fue realizado, en el cual, se disgregó los agregados celulares en medio líquido MS contenidos en tubos de ensayo, para que exista mayor contacto células-nutrientes, la suspensión celular fue sembrada sobre la superficie del medio de cultivo sólido, y con el sedimento celular se formó un agregado que fue inoculado en otra caja de Petri en medio MS sólido, solo hubo crecimiento en las células que fueron inoculadas en agregados y no así en el sembrado distribuido por toda la superficie del medio de cultivo (datos no mostrados).

La tendencia usual de las células vegetales en cultivo, es la de formar agregados celulares típicos cohesivos que contienen cientos de células, variando el tamaño de acuerdo a la fase de crecimiento en la que se encuentra. La mayor o menor agregación celular es atribuida a algunos polisacáridos excretados por las células que aumentan la viscosidad en las últimas etapas del cultivo, el grado de agregación influye en el comportamiento celular en conjunto ^(46,129,130).

Una vez conocido el comportamiento de la cinética de crecimiento del cultivo de la suspensión celular de *G. longiflora* en medio líquido el siguiente paso fue estudiar la producción de alcaloides en estas condiciones.

5.2.8.1 Detección de alcaloides en cultivo de *Galipea longiflora* en suspensión celular.

Luego del cultivo de células de *G. longiflora* en medio líquido, fue realizada la extracción cruda con diclorometano en las células obtenidas y en el sobrenadante (medio de cultivo). A la corrida de la Cromatografía en Capa Fina, la banda con mayor intensidad y frecuencia tiene el Rf que corresponde a la sustancia purificada de la planta *G. longiflora* 2-fenilquinolina usada como patrón de referencia, tanto en la extracción del pellet celular como en el sobrenadante.

Se conoce que los alcaloides están en forma soluble en agua, disueltos en vacuolas intracelulares que mantienen condiciones especiales (pH 4) ^(37,131). Existen pocos artículos científicos de la secreción celular de alcaloides hacia el medio en el que se cultiva; sin embargo, se cuenta con datos de que la elicitación biótica y/o abiótica induce la secreción de metabolitos secundarios, Ej. Alcaloides en suspensión celular de *C. roseus* ⁽¹³²⁾; o finalmente ser producto de la lisis celular ocasionada por la adición de un agente que induce destrucción celular ^(46,48,110,133,134,135). Cualquiera de las posibilidades anteriores podría haber sido la causa de la presencia de alcaloides en el medio de cultivo líquido en el sistema de crecimiento de células de *G. longiflora*-medio MS.

De acuerdo a los resultados obtenidos, planteamos seguir la propuesta del uso de 2 estadios de cultivo:

- El primer estadio de mantenimiento o de crecimiento, implica el enfoque principal en maximizar el crecimiento de las células (metabolismo primario), conservando una elevada densidad celular en medio sólido, a semejanza a su estado natural lo cual otorga estabilidad al material genético, como refieren los resultados para la formación de biomasa *in vitro* de *G. longiflora* obtenido en medio sólido, es fundamental la agregación celular, en comparación con el crecimiento obtenido en suspensión celular.
- El segundo estadio, enfocado principalmente en maximizar la síntesis de un producto de interés (metabolismo secundario). En la fase estacionaria de crecimiento. Es importante, que las células de *G. longiflora* mantengan la capacidad de síntesis de alcaloides *in vitro*, tanto en las mismas células como en el medio de cultivo; la propuesta incluye mejorar la productividad de

metabolitos secundarios, manteniendo el cultivo en fase estacionaria, el bajo nivel de crecimiento celular de *G. longiflora* obtenido en medio líquido sería un estado ideal para inducir o promover procesos correspondientes al metabolismo secundario en forma exclusiva, así incrementar la síntesis y excreción de metabolitos secundarios con elicitaciones sucesivas o variando la osmolaridad del medio de cultivo, entre otras estrategias ^(48,92,110,133,134,136).



VI. CONCLUSIONES

"Al contrario, la historia de Sócrates, que nadie se atreve a poner en tela de juicio, no está tan comprobada como lo está la de Jesucristo".

*Jean Jacques Rousseau
(1712 – 1778)*

6.1 CONCLUSION GENERAL

- A las condiciones ensayadas en el medio de cultivo MS el incremento de sacarosa y fosfato, favorecen la formación de biomasa de *G. longiflora* en cultivo *in vitro*; la actividad oxidasa y peroxidasa no es influenciada por las variantes de concentración. A la vez, las células generadas mantienen la capacidad de sintetizar alcaloides quinolínicos de los cuales fue identificado la 2-fenilquinolina.

6.2 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

- El arreglo trifactorial 2^3 utilizado para incrementar las fuentes de nitrógeno (de 1650 a 1655,6 mg/L, fosfato (de 170 a 226,6 mg/L) y sacarosa (de 30 a 40 g/L) en el medio MS, permite evaluar la influencia individual y conjunta sobre la formación de biomasa y actividad enzimática.
- Con el incremento conjunto de los tres componentes se logro obtener el mayor coeficiente de crecimiento (6.57) comparado con el medio testigo (3.96), que resulta ser altamente significativo. El análisis estadístico indica que la interacción de los nutrientes es importante en el metabolismo primario, probablemente la respuesta de un factor depende del nivel del otro. Las combinaciones ensayadas permiten afirmar que el incremento de KH_2PO_4 es el que mayor influencia ejerce sobre la formación de biomasa, seguido por la sacarosa, con respecto a la variación de nitrógeno, esta no es significativa para la formación de biomasa. La tendencia para obtener mayor biomasa de *G. longiflora* en cultivo se orienta a seguir incrementando las concentraciones de KH_2PO_4 y sacarosa.

- La actividad enzimática oxidasa y peroxidasa no es influenciada significativamente al variar la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato ensayadas en el medio de cultivo MS, las diferencias pudieran ser ampliadas si la variación en la concentración es mayor. La variación en el perfil de la actividad enzimática oxidativa está relacionada fundamentalmente con la etapa de crecimiento en la que se encuentra la célula. En cuanto a la actividad peroxidasa la tendencia general es a disminuir con el tiempo de cultivo, la marcada actividad de las peroxidasas cuando la célula cesa su crecimiento orienta a otorgarles un rol crucial en el metabolismo secundario, como fue demostrado en *Catharantus roseus*, en la cual se evidencio la participación de oxidasas y peroxidasas en la síntesis de alcaloides; esto proporciona pautas para la optimización de la obtención de un determinado producto, empleando procesos como el biodireccionamiento, la biotransformación entre otras herramientas de la biotecnología vegetal.

- Las células de *G. longiflora* cultivadas *in vitro* en medio Murashigue y Skoog mantienen la capacidad de sintetizar alcaloides quinolínicos.

- Los estudios de Cromatografía en Capa Fina a partir de la extracción de callos de *G. longiflora* con diferentes solventes presentan bandas con Rf's correspondientes a las sustancias purificadas de la planta de: 2-fenilquinolina, 2-(3,4-metilendioxi)feniletiquinolona, 2-n-pentilquinolina, 4- metoxi-2-fenilquinolina, 2-(3,4-dimetoxi)-feniletiquinolona, presentes en los diferentes sistemas de elución empleados.

- A partir de la banda con mayor intensidad y presente en todas las fracciones extraídas por Cromatografía en Capa Fina, fue realizado estudios de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de

Masas, identificándose la estructura de la 2-fenilquinolina; este compuesto también es el componente alcaloideo de mayor proporción en las hojas de la planta.

- En el medio de cultivo líquido MS el coeficiente de crecimiento máximo obtenido es de 1,52 mucho menor comparando al obtenido de los callos en medio sólido (6,57), de acuerdo a la observación atribuimos la falta de formación de masa celular a la falta de agregación celular. No obstante, este estadio es ideal para inducir o promover exclusivamente el metabolismo secundario, puesto que al determinar la presencia de alcaloides, las células son capaces de sintetizar estos metabolitos, tanto a nivel intracelular como extracelular (medio de cultivo)

La detección de alcaloides quinolínicos en cultivo *in vitro* de *G. longiflora* otorga perspectivas para el direccionamiento en la biosíntesis celular de estos productos en mayor cantidad para posteriormente realizar la evaluación de la actividad biológica leishmanicida y su posible aplicación en la clínica.



VII. BIBLIOGRAFÍA

Hay un libro abierto siempre para todos los ojos: la naturaleza
Rousseau, Jean-Jacques (1712 – 1778)

1. La biotecnología, <http://www.monografics.com/trabajos14/biotecnologia/biotecnologia.shtml>
2. Gang Zhou, Yong Wu, 2006, Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural Products Reports* 23, pp. 789-810.
3. Chattopadhuay S., Mehra R., Srivastava A., et al, 2003, Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. *Appl Microbiol Biotechnology* 60, pp. 541-546.
4. Li Gang Zhou, Jian Yong Wu, 2006, Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural Product Reports* 23, pp. 789-810.
5. Verpoorte R., Van Der Heijden R., Schripsema J., 1993, Plant cell biotechnology for the production of Alkaloids: present status and prospects. *Journal of Natural Products* 56:2, pp. 186-207.
6. <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/index.html>
7. Barciszewski J., Massino F., Clark B., 2007, Kinetin- A multiactive molecule. *Biological Macromolecules* 4, pp. 182-192.
8. Aki Cüneyt, 2005, Effect of Plant Growth Regulators on Osmotically Stressed Callus Cultures of Some *Capsicum annum* Var. *grossum* L. cultivars. *Journal of Biological Sciences* 5:3, pp. 257-259.
9. Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L., 2004, Biotecnología y mejoramiento vegetal, INTA, Buenos Aires: Argentina pp. 81-96.
10. González Suárez Sergio, Biotecnología Vegetal, Métodos de propagación “in vitro” en plantas, www.fbio.uh.cu/webfv/docencia/biotecnología.
11. Chen S., Zhao B., Wang X., Yuan X., Wang Y., 2004, Promotion of the growth of *Crocus sativus* cells and the production of crocin by rare earth elements. *Biotechnology Letters*, 26:1, pp. 27-30.
12. Yuan X., Wuang Q., Zhao B., Wang Y., 2002, Improved cell growth and total flavonoids of *Saussurea medusa* on solid culture medium supplemented with rare earth elements. *Biotechnology Letters* 24, pp. 1889-1892.
13. Chau Juan, 1999, Visión Fisiológica de la biotecnología, Principios de propagación de plantas, Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
14. Yeoman M., Yeoman C, 1996, Manipulating secondary metabolites in cultured plants cells. *New Phytology* 134, pp.553-569.
15. Lindsey K., Yeoman M., 1983, The Relationship between Growth Rate Differentiation and Alkaloid Accumulation in Cell Cultures. *Journal of Experimental Botany* 34:8, pp. 1055-1065.
16. http://es.wikipedia.org/wiki/Metabolitos_secundarios_de_las_plantas#cite_ref-Buchanan_3-0
17. Bennett R., Wallsgrove R., 1994, Secondary Metabolites in plant defense mechanisms. *New phytology* 127, pp. 617-633.
18. Verpoorte R., Vander Heijden R., Memelink J., 2000, Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research* 9, pp. 323-343.
19. Troiani Rosa, Metabolitos Secundarios Alcaloides, Química III, Universidad Nacional de La Pampa- Facultad de Agronomía. <http://209.85.175.104/search?q=cache:cXRGMRwuCzAJ:www.agro.unlpam.edu.ar/catedras/quimica3/ALCALOIDES.doc+TROIANI+ROSA+METABOLITOS+SECUNDARIOS+ALCALOIDES&hl=es&ct=clnk&cd=2&client=safari>
20. Cortez A., Shipley B., Arnason J., 2004, Growth and chemical defense in relation to resource availability: tradeoffs or common responses to environmental stress??. *Brazilian Journal of Biology* 64:2, pp. 187-194.
21. Lila M., 2005, Plant development and biotechnology. CRC Press LLC, pp. 285-290.
22. Fournet A., Gantier J., Gautheret A., Leysalles L., Munos M., Mayrargue J., Moskowitz H., Cavé A., Hocquemiller R., 1994, The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/C mice infected with *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 33, pp. 537-544.
23. Yoneyama N., Morimoto H., Ye Ch., Ashihara H., Mizuno K., Kato M., 2006, Substrate specificity of N-methyltransferase evolved in purine alkaloids synthesis is dependent upon one amino acid residue of the enzyme, *Mol Gen Genomics* 275, pp. 125-135.
24. Buchanan B., Gruissem W., Jones R., 2000, Biochemistry & Molecular Biology of Plants, United Status: American Society of Plant Physiologists, pp. 1250-1318. http://www2.unil.ch/lpc/docs/pdf/Met_sec.pdf

25. Cordell G., Quinn M., Farnsworth N., 2001, The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. *Phytotherapy research* 15, pp. 183-205.
26. Sun H., Keun W., Cheol H., et al, 1998, Inhibition of Angiotensin II Receptor Binding by Quinoline Alkaloids from *Evodia rutaecarpa*. *Phytotherapy Research* 12, pp. 212-214.
27. Nazrul S., Gray A., Waterman P., Ahasan M., 2002, Screening of eight Alkaloids and ten Flavonoids Isolated from Four Species of the Genus *Boronia* (*Rutaceae*) for Antimicrobial Activities Against Seventeen Clinical Microbial Strains. *Phytotherapy Research* 16, pp. 212-214.
28. Meléndez C., Kouznetsov V., 2005, Alcaloides quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos, *Revista de la Facultad de Ciencias* 10:2, pp. 5-18.
29. Ambrozini A., Mafezoli J., Vieira P., et al, 2005, New Pyrone and Quinoline Alkaloid from *Almeidea rubra* and their Trypanocidal Activity. *Journal Brazilian Chemical Society* 16:3, pp. 434-439.
30. Moraes V., Tomazela D., Ferracin R., et al, 2003, Enzymatic Inhibition Studies of Selected Flavonoids and Chemosystematics Significance of Polymethoxylated Flavonoids and Quinoline Alkaloids in *Neoraputia* (*Rutaceae*), *Journal Brazilian Chemical Society* 14:3, pp. 380-387.
31. Caraballo A., Caraballo B., Rodríguez A., 2004, Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37:2, pp. 186-188.
32. Biavatti M., Vieira P., da Silva M., et al, 2002, Biological Activity of Quinoline Alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray Structure of Flindrsiamine. *Journal Brazilian Chemical Society* 13:1, pp. 66-70.
33. Michael Joseph, 2007, Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Natural Product Reports* 24, pp. 223-246.
34. Morales Carolina, 1999, Alcaloides. Química Industrial II, Universidad Técnica Federico Santa María.
35. Célula Vegetal Introducción a la Biotecnología Vegetal, www.monografias.com/trabajo12/celve.shtml
36. Herbert Richard, 2001, The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Natural Product Reports* 18, pp. 50-65.
37. Colegate Steven, Molyneux Russell, 1993, Bioactive natural products, Detection, Isolation, and Structural Determination CRC Press Inc, pp. 528.
38. Alcantara J., Bird D., Franceschi V., Facchini P., 2005, Sanguinarine Biosynthesis Is Associated with the Endoplasmic Reticulum in Cultured *Opium Poppy* Cells after Elicitor Treatment. *Plant Physiology* 138, pp. 173-183.
39. Djilani A., Legseir B., Soulimani R., et al, 2006, New Extraction Technique for Alkaloids, *J. Braz. Chem. Soc.*, 17:3, pp. 518-520.
40. Fulzele D., Satdive R., 2005, Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*. *Journal of Chromatography* 1063.(1-2), pp. 9-13.
41. Zhang F., Chen B., Xiao S., Yao S., 2005, Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (willd). *R. Br. Separation and Purification Technology* 42:3, pp. 283-290.
42. Panda A., Mishra S., Bisaria V., 1992, Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena antidysenterica* I. effect of major nutrients. *Biotechnology Bioengineering* 39, pp. 1043-1051.
43. Namdeo A. G., 2007, Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy reviews* 1:1, pp. 69-79.
44. Verpoorte R., Contin A., Memelink J., 2002, Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1, pp. 13-25.
45. Godoy G., Loyola V., 1991, Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharantus roseus* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 10:11, pp. 537-540.
46. Zhao J., Zhu W., Hu Q., He X., 2001, Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharantus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose. *Plant Growth Regulation* 33, pp. 33-41.
47. Angelova Z., Georgiev S., Roos W., 2006, Elicitation of plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, pp. 72-83.
48. Wang C., Wu J., Mei X., 2001, Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55:4, pp. 404-410.

49. Stoop J., Pharr D., 1993, Effect of Different Carbon Sources on Relative Growth Rate, Internal Carbohydrates, and Mannitol 1-Oxidoreductase Activity in Celery Suspension Cultures. *Plant Physiology* 103, pp. 1001-1006.
50. Veno M., Shibata H., Kihara J., Honda Y., Arase S., 2003, Increased tryptophan decarboxylase and monoamine oxidase activities induce Sekiguchi lesion formation in rice infected with *Magnaporthe grisea*. *The Plant Journal* 36, pp. 215-265.
51. Poulev A., O'Neal J., Logendra S., pouleva R., Timeva V., Garvey A., Gleba D., Jenkins I., Halpern B., Kneer R., Cragg G., Raskin I., 2003, Elicitation, a New Window into Plant Chemodiversity and Phytochemical Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* 46:12, pp. 2542-2547.
52. Höfer Chrisine, Schlosser Diezmar, 1999, Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters* 451, pp. 186-190.
53. Bar-Nun N., Mayer A. and Sharon N., 1980, Properties of laccase in *Schinus molle*. Botany Department, Hebrew University, Weizman Institute.
54. Joel D., Marach I. and Mayer A., 1977, Laccase in *Anacardiaceae*. *Phytochemistry* 17, pp. 396-397.
55. Lehman E., Harel E., Mayer A., 1974, Copper content and other characteristics of purified peach laccase. *Phytochemistry* 83, pp. 1713-1717.
56. Kiiskinen Laura-Leena, 2005, Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces*, Doctor of Science in Technology, VTT publications 556, Espoo, Finland.
57. Rodríguez Francisco, 2006, Análisis Molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavido-alba*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España, pp. 150.
58. Chibbar R., Van Huystee R., 1984, Characterization of Peroxidase in Plant Cells. *Plant Physiology* 75, pp. 956-958.
59. Xiuyin X., Zhiyong W., Dingquan W., et al, 2002, Microcalorimetric Studies of *Rhus vernicifera* laccase Catalytic Oxidation Reactions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 70:3, pp. 889-896.
60. Van Huystee R., Some Molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies, Annual Reviews, www.annualreviews.org/aronline.
61. Mayer A., Harel E., 1979, Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18, pp. 193-215.
62. Avallone S., Guiraud J., Brillouet J., Teisson C., 2003, Enzymatic Browning and Biochemical Alterations Black Spots of Pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr). *Current Microbiology* 47, pp. 113-118.
63. Mura A., Pintus F., Medda R., et al, 2007, Cabalase and Antiquittin from *Euphorbia characias*: Two proteins Evolved in Plant Defense?. *Biochemistry* 72:5, pp. 501-508.
64. Mayer A., 2006, Polyphenol oxidases in plants and fungus: Going places? A review. *Phytochemistry* 67, pp. 2318-2331.
65. Bligny R., Douce R., 1983, Excretion of laccase by sycamore (*Hacer pseudoplatanus* L.) cells, purification and properties of the enzyme. *Biochemical Journal* 209, pp. 489-496.
66. Hushpulian D., Fechina V., Kazakov S., et al, 2003, Non-Enzymatic Interaction of Reaction Products and Substrates in Peroxidase Catalysis. *Biochemistry*, 68:9, pp. 1006-1011.
67. Andrews J., Malone M., Thompson D., Ho L., Burton K., 2000, Peroxidase isozyme patterns in the skin of maturing tomato fruit. *Plant, Cell & Environment* 23:2, pp. 415-422.
68. UMSA-CIPTA-IRD-FONAMA-EIA, 1999, Tacana. La Paz, Bolivia, pp. 497.
69. Gómez-Laurito J., Quirico J., Madrigal L., 1994, A New Species of *Galipea* (*Rutaceae-Cuspariinae*) from Costa Rica and Nicaragua. *Novon* 4:4, pp. 347-349.
70. Kallunki Jacquelyn, 1988, A new species of *Galipea* (*rutaceae*) from Nicaragua and Costa Rica. *Brittonia* 40:3, pp. 241-244.
71. Jacquemond I., Hannedouche S., Fabre N., Fourasté I., Moullis C., 1999, Two tetrahydroquinoline alkaloids from *Galipea officinalis*. *Phytochemistry* 51:8, pp. 1167-1169.
72. Fournet A., Ferreira M., Rojas A., Torres S., Fuentes S., Nakayama H., Schinini A., Hocquemiller R., 1996, *In Vivo* efficacy of Oral and Intralesional Administration of 2-Substituted Quinolines in Experimental Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40:11, pp. 2447-2451.
73. Vieira P., Kubo I., 1990, Molluscicidal quinoline alkaloids from *Galipea bracteata*, *Phytochemistry* 29:3, pp. 813-815.

74. Fournet A., Hocquemiller R., Roblot F., Cavé A., Richomme P., Bruneton J., 1993, Les chimanines, Nouvelles Quinoleines Substituées en 2, Isolées d'Une plante Bolivienne Antiparasitaire: *Galipea longiflora*. *Journal of Natural Products* 56:9, pp. 1547-1552.
75. Osorio E., Montoya G., Arango G., 2006, Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 13:1, pp. 61-84.
76. *Ruta graveolens* L. IPCINTOX Databank, www.intox.org.databank/documents/plant/rutagrav/rutagrav.htm.
77. Muñoz A., Covarrubias S., Delena J., Pacheco C., Sanchez B., Alvarado Luis, Yahuaca P., Efectos de extractos de *Ruta graveolens* (Ruda) sobre la contractilidad de útero de rata y perro ex vivo. www.ciu.reduaz.mx/investigacion/Biomedicas/WORD/BIO02-017.doc.
78. Chan-Bacab M., Peña-Rodríguez L., 2001, Plant natural products with leishmanicidal activity. *The Royal Society of Chemistry* 18, pp. 674-688.
79. Ruda, <http://www.botanical-online.com/alcaloidesruda.htm>.
80. Sabel K., Al-Said M., El-Ferally F., Ross S., 2000, New Quinoline Alkaloids from *Ruta chalepensis*. *Journal Natural Product* 63, pp. 995-997.
81. Oliva A., Meepagala K., Wedge D., Harries D., Hale A., Aliota G., Duke S., 2003, Natural Fungicides from *Ruta graveolens* L. Leaves, Including a New Quinolone Alkaloid. *Agricultural and food chemistry* 51:4, pp. 890-896.
82. Velásquez N., Galeas J., Murillo E., Vallejo V., 1988, Fitofotodermatitis, fotoreactividad de los psoralenes. *Revista Médica Hondureña* 56:2, pp. 19-30.
83. Alvarez C., Doroteo V., Cabello I., Lock O., 2006, Análisis de rutina en *ruta graveolens* o *ruta spp*, "ruda" utilizando técnicas cromatográficas. http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/practica_VI-5.pdf
84. OMS, 1990, Lutte contre les Leishmanioses, rapport d'un Comité d'experts: Ni 793; Geneve.
85. González F., Zerpa O., 2004, Leishmaniasis cutánea en la infancia. *Dermatología Pediátrica Lat.* 2:2, pp. 97-108.
86. Mollinedo S., Torrez M, Holguin E., Vargas F., Leishmaniasis en Bolivia X. Epidemiología de fin de siglo. <http://www.galenored.com/trabajos/archivos/129.pdf>
87. Ministerio de Salud y Deportes, 2004, Análisis del Sector Salud Bolivia, Resumen ejecutivo, Washington D.C.
88. YTD-SPX, 2004, Manual de técnicas de laboratorio para la evaluación de sustancias tripanocidas y leishmanicidas, ProyectoX.5. UMSA-OEA-IRD, La Paz:Bolivia, pp. 85-87.
89. Ministerio de Salud y Deportes, 2007, Leishmaniasis, Guía operativa para el control en Bolivia. La Paz, Bolivia.
90. Murray Henry, 2001, Clinical and Experimental Advances in treatment of Visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:8, pp. 2185-2197.
91. Kouznetsov V., Vargas L. and Meléndez C., 2005, Recent Progress in the Synthesis of Quinolines. *Current Organic Chemistry* 9, pp. 141-161.
92. Raval K., Hellwig S., Prakash g., et al, 2003, Necessity of a two-Stage Process for the Production of Azadirachtin-Related Limonoids in Suspension Cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96:1, pp.16-22.
93. Chattopadhyay S., Mehra R., Srivastava A., et al, 2003, Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. *Appl Microbiol Biotechnology* 60, pp. 541-546.
94. Buitelaar R., Cesário M., Tramper J., 1992, Elicitation of thiophene production by hairy roots of *Tapetes patula*. *Enzyme Microbiology Technology* 14, pp. 2-7.
95. Strogov S., Zaitseva G., Konstantinova N., Fetisova E., Mikhailova O., Belousova I., turkin V., Ukraintsev A., 2001, The production of Biologically Active Substances by Plant Cell Cultures in Space, *Cosmic Research* 39:4, pp. 328-332.
96. Yamamoto H., Yato A., Yazaki H., Hayashi H., Taguchi G., Inoue K., 2001, Increases of Secondary Metabolite Production in Various Plant Cell Cultures by Co-cultivation with Cork. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry* 65:4, pp. 853-860.
97. Fournet A., Barrios A., Muñoz V., Hocquemiller R., Roblot F., Cavé A., Richomme p., Bruneton J., 1994, Antiprotozoal Activity of Quinoline Alkaloids Isolated form *Galipea longiflora*, a Bolivian Plant Used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis, *Phytotherapy Research* 8:3, pp. 174-178.

98. Munos M., Mayrargue J., Fournet A., Gantier J., Hocquemiller R., Moskowitz H., 1994, Synthesis of an antileishmanial alkaloid isolated from *Galipea longiflora* and of related compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 42:9, pp. 1914-1916.
99. Panda A., Bisaria V., Mishra S., Bhojwani S., 1991, Cell Culture of *Holarrhena antidysenterica*: growth and alkaloid production. *Phytochemistry* 30:3, pp. 833-836.
100. Paz, M., Vázquez, F., Chuqui, R., Paredes, C., Sauvain, M., Giménez, A., 2007, Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Galipea longiflora*, una *Rutaceae* de la Amazonia Boliviana. *Latin American Journal of Pharmacy* 26,15-19.
101. Childs Robert, Bardsley William, 1975, The Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as Chromogen. *Biochemical Journal* 145, pp. 93-103.
102. Dogan S., Turan P., Dogan M., et al, 2007, Variations of peroxidase activity among *Salvia* species. *Journal of Food Engineering* 79, pp. 375-382.
103. Massot B, Milesi E, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A, 2000, Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shorts of *Ruta graveolens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62:11-19.
104. Junghanns K, Kneusel R, Gröger D, Matern U, 1998, Differential regulation and distribution of acridone synthase in *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 49:2, 403-411.
105. Amoo S., Aysire B., 2005, Induction of callus and somatic embryogenesis from cotyledon explants of *Parkia biglobosa* (Jacq.) benth. *African Journal of Biotechnology* 4:1, pp. 68-71.
106. De Castro R., de Barros I., Micropopagation of Rue (*Ruta graveolens* L.), ISHS Acta Horticulturae 502.
107. Mottley J., Been B., 1987, Indirect assessment of callus fresh weight by non-destructive methods. *Plant Cell Reports* 6:5, pp. 389-392.
108. Gamborg Oluf, 1970, The Effects of Amino Acids and Ammonium on the Growth of Plant Cell in Suspension Culture. *Plant Physiology* 45, pp. 372-375.
109. Smolov A., Ladysin V., Semenova G., 2004, Effect of Exogenous Ammonium on Photosynthetic O₂ Evolution and Ultrastructural Organization of Cells in Soybean Callus. *Russian Journal of Plant Physiology* 51:5, pp. 590-596.
110. Günter E., Ovodov Y., 2003, Production of polysaccharides by *Silene vulgaris* Callus Culture Depending on Carbohydrates of the Medium. *Biochemistry* 68:8, pp. 882-889.
111. Komaraiah R., Kavi p., Ramakrishna S., 2001, Production of plumbagin from cell cultures of *Plumbago rosea* L. *Biotechnology Letters* 23, pp. 1269-1272.
112. Zamani Z., Vahdati K., 2001, Influence of Carbohydrate form and nitrogen source on growth of *Persian walnut* shorts *in vitro*, ISHS Acta Horticulturae 544: IV Internacional Walnut Symposium, Bordeaux, France.
113. Funciones de los nutrientes minerales (macronutrientes), http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap03/01_09.htm
114. Zhong J, Zhu Q., 1995, Effect of initial phosphate concentration on cell growth and ginsenoside saponin production by suspended cultures of *Panax notoginseng*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55:3, pp. 241-247.
115. Bligny R., Jacques G., Douce R., 1986, Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells, effects of a copper deficiency. *Biochemical Journal* 237, pp. 583-588.
116. Bacon M., Thompson D., Davies W., 1997, Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium temulentum* L. during drought? *Journal of Experimental Botany* 48:317, pp 2075-2085.
117. Schopfer P., 1996, Peroxidase isozyme patterns in the skin in maize coleotiles, *Planta* 199:1, pp 43-49.
118. Thompson D, Davies W., Hi L., 1998, Regulation of tomato fruit growth by epidermal cell wall enzymes. *Plant Cell and Environment* 21:6, pp 589-599.
119. Chabanet A., Catesson A., Goldberg R., 1993, Peroxidase and phenoloxidase activities in mung bean hypocotyl cell walls. *Phytochemistry* 33:4, pp. 759-763.
120. Thaker V., Saroop S., Vaishnav P., Dev Singh Y., 1986, Role of peroxidase and esterase activities during cotton fiber development. *Journal of Plant Growth Regulation* 5:1, pp. 17-27.
121. Suzuki T., Honda Y., Mukasa Y., Kim S., 2006, Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry* 67, pp. 219-224.
122. Verpoorte R, Van der Heijden R, Memelink J. The plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research*. 2000; 133(9): 323-343.

123. Loyola V., Galaz R., Kú R., 2007, *Catharantus* biosynthetic enzymes: the road ahead. *Pytochemistry Rev.* 6, pp. 307-339.
124. Salamanca E., 2005, Evaluación de la actividad biológica *in vitro* sobre formas parasitarias de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* de *Angostura longiflora* (*krause*) (*kallunki*). UMSA, La Paz, Bolivia.
125. Angelova Y., Petkova S., Zozikova E., Kotseva E., Iliev L., 2001, Effects of kinetin and 4pu-30 on the growth and the content of polyphenols in tobacco callus tissue. *Bulg. J. Plant Physiology* 27:1-2, pp. 36 – 42.
126. Eilert U., 1987, In cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academia Press, San Diego 4, pp. 153-196.
127. Apostol I., low P., Heinstejn P., 1989, Effect of age of cell suspension cultures on susceptibility to a fungal elicitor. *Plant Cell Report* 7:8, pp. 692-695.
128. Ticona J., 2005, Estudio comparativo de métodos de extracción de alcaloides quinolínicos de la *Angostura longiflora* k. *Kallunki* (Evanta), con actividad Leishmanicida. UMSA, La Paz, Bolivia.
129. Honda Y., Inaoka H., Takei A., Sugimura Y., Otsuji K., 1996, Extracellular polysaccharide produced by tuberos callus. *Phytochemistry* 41:6, pp. 1517-1521.
130. Komaraiah R., Kavi p., Ramakrishna S., 2001, Production of plumbagin from cell cultures of *Plumbago rosea* L. *Biotechnology Letters* 23, pp. 1269-1272.
131. Kargi F., Potts P., 1991, Effect of various stress factor on indole alkaloid formation by *C. roseus* (*periwinkle*) cells. *Enzyme Microbial Technology* 13:9, pp. 760-763.
132. Nef C., Rio B., Chrestin H., 1991, Induction of catharanthine synthesis and stimulation of major indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts, *Plant Cell Reports* 10:1, pp. 26-29.
133. Miñano A., Chico J., López E., et al, 2004, Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de antocianinas a partir de cultivos celulares de *Vitis vinifera* L. var. *red globe*. *Revista Perú Biología* 11:2, pp.187-192.
134. Xu F., Ying P., Han A., Su Z., 1998, Enhanced salidroside production in liquid-cultivated compact callus aggregates of *Rhodiola sachalinensis*: manipulation of plant growth regulators and sucrose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55:1, pp. 53-58.
135. Yari A., Valizadeh M., Ghasempour A., khosrowshahli M., Naghdibadi H., Dadpour M., Omid Y., 2006, Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International* 30:3, pp. 262-269.
136. Pan X., Xu H., Liu, Gao X., Lu Y., 2004, Improvement of growth and camptothecin yield by altering nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. *Biotechnology Letters* 26:22, pp. 1745-1748.

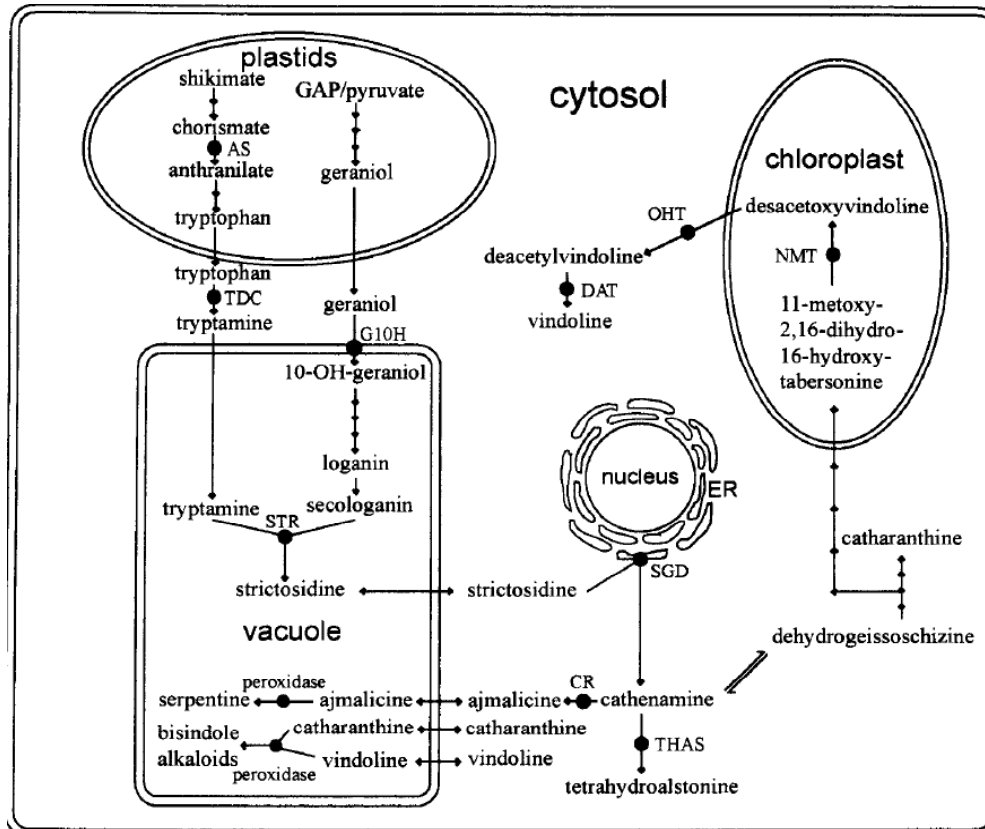


V999. ANEXOS

*"Me basta con examinar una brizna de hierba, o un puñado de tierra, para
confirmar la existencia de Dios."*

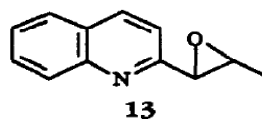
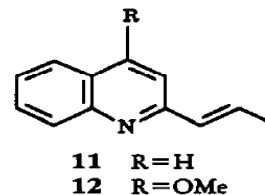
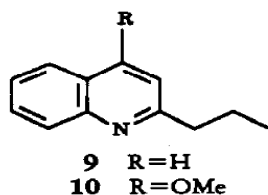
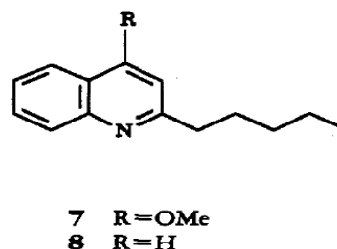
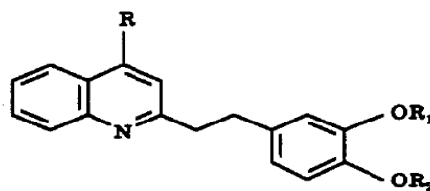
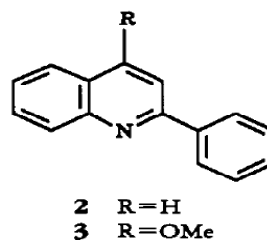
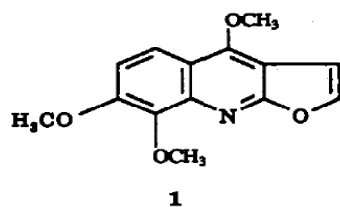
Sir Isaac Newton (1643 – 1727)

Anexo 1



Compartimentalización de la biosíntesis de alcaloides en *Catharanthus roseus*.
 Todos los pasos son mostrados como si ocurrieran en una sola célula, que en realidad no es el caso, los últimos pasos de la biosíntesis de alcaloides diméricos ocurren en células separadas y tal vez diferentes, sin embargo todavía no es conocido que intermediarios son transportados.

Anexo 2



Alcaloides quinolínicos aislados de *G. longiflora*. 2-fenilquinolina (1), 4-metoxi-2-fenilquinolina (2), 2-*n*-pentilquinolina (3), 2-(3,4-metilendioxi)-feniletilquinolina (4), 2-*n*-propilquinolina (5), 4-metoxi-2-(3',4'-metilendioxifeniletil)-quinoleína o cusparina (6), 4-metoxi-2-*n*-pentilquinolina (7), 2-*n*-pentilquinoleína (8), 2-*n*-propilquinoleína (9), 4-metoxi-2-*n*-propilquinoleína o chimanina A (10), 2- ϵ -prop-1'-enilquinoleína o chimanina B (11), 4-metoxi-2- ϵ -prop-1'-enilquinoleína o chimanina C (12), 2-(1',2'-trans-epoxipropil)-quinoleína o chimanina D (13).

Fournet A., Hocquemiller R., Roblot F., Cavé A., Richomme P., Bruneton J., 1993, Les chimanines, nouvelles quinoleines subtouées en 2, isolées d'une plante Bolivienne antiparasitaire: *Galipea longiflora*. *Journal of Natural Products* 56:9, 1547-1552.

Anexo 3

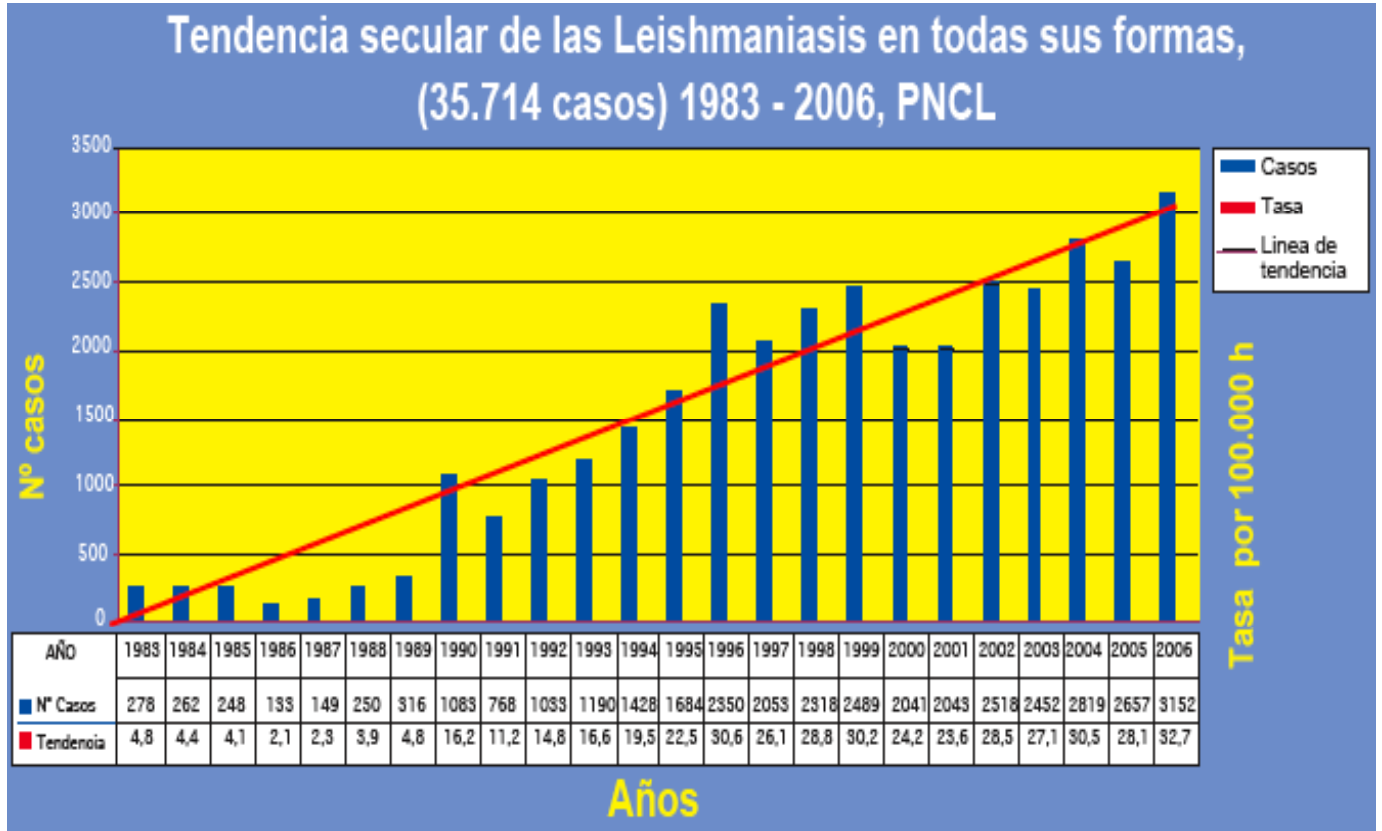


Tabla 1. Tendencia secular de las Leishmaniasis durante 24 años (1983 – 2005), con prevalencia por 100.000 habitantes; fuente Prog. Nac. Leishmaniasis.

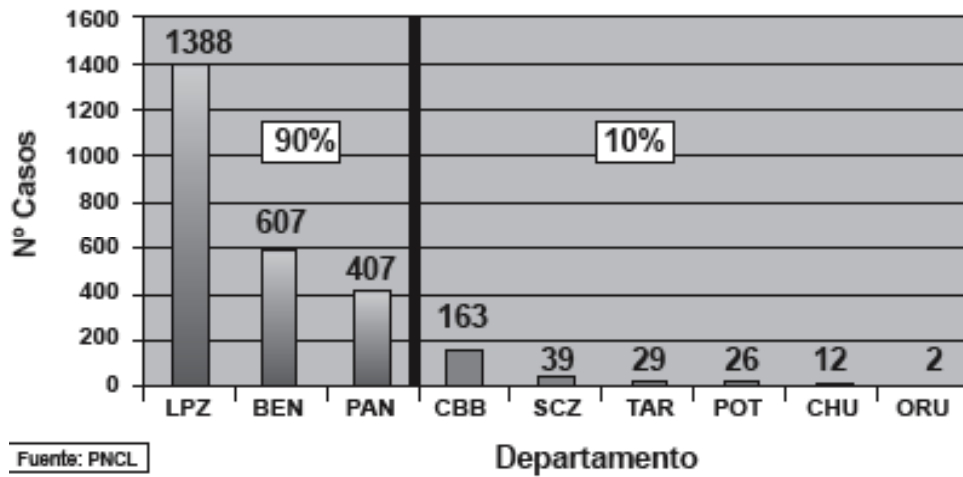


Gráfico 1. Casos notificados de Leishmaniasis en todas sus formas, por departamento, gestión 2006.

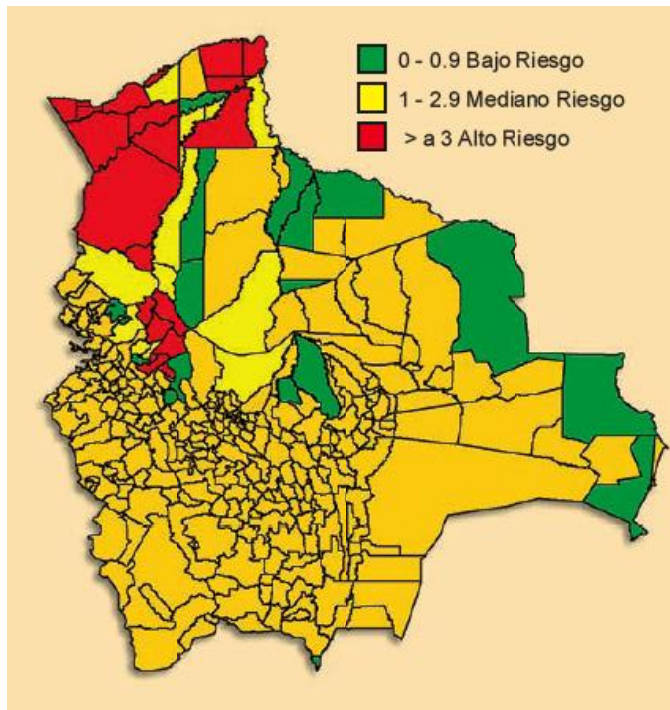


Gráfico 2. Estratificación de casos notificados como sospechosos de Leishmaniasis por Nivel de Riesgo, Programa Nacional de Leishmaniasis, 2007.



Gráfico 3. Tipos clínicos de Leishmaniasis. a) Leishmaniasis Visceral, b) Leishmaniasis Cutánea, Leishmaniasis Muco Cutánea. Fuente PNCL.

Anexo 4

Preparación del reactivo de Dragendorff

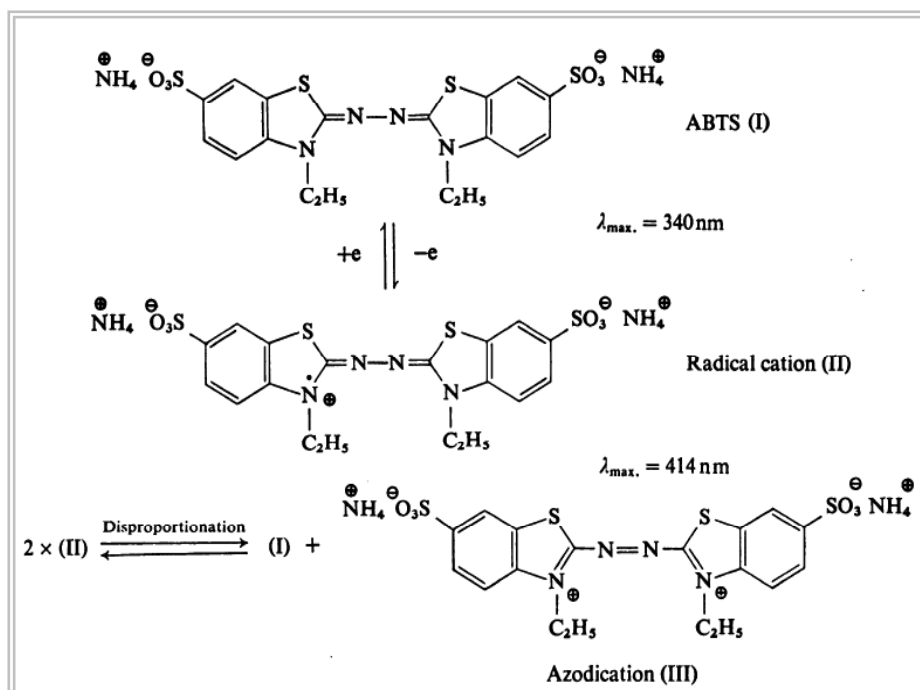
1. Reactivo de Dragendorff (solución stock)

- Solubilizar 2,6 g de carbonato de bismuto y 7,0 g de yoduro de sodio en 25 mL de ácido acético glacial, calentar por 10 minutos a 40°C para solubilizar el reactivo.
- Dejar reposar por 12 horas.
- Filtrar la solución, 20 mL de filtrado (solución rojo-café) se mezclan con 8 mL de acetato de etilo.
- La solución anterior guardarla en un frasco ámbar (la cual es estable por 6 meses).

2. Reactivo de Dragendorff (solución reveladora)

- Mezclar 10 mL de la solución stock con 25 mL de ácido acético glacial y 60 mL de acetato de etilo.

Anexo 5



Fórmula química del ABTS y los productos de su oxidación

2 moléculas de ABTS (I) sufren la oxidación de un electrón (con H_2O_2) para dar lugar a dos moléculas de radical cation metaestable (ABTS^+ o ABTS^- si la carga del grupo sulfonato es considerado), (II), el cual lentamente forma (I) y el azodificación (III) desproporcionadamente. Este último cambio químico en solución alcalina es demasiado lento para afectar las mediciones iniciales pero llega a ser un factor complicado cuando los estudios de equilibrio son llevados a cabo luego de muchas horas o cuando se realizan purificación del componente (II) para el estudio de productos inhibitorios.

 Childs Robert, Bardsley William, 1975, The Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as Chromogen. *Biochemical Journal* 145, pp. 93-103.

Anexo 6

Proporción de coeficiente de crecimiento peso húmedo/diámetro celular. La proporción entre el coeficiente de crecimiento de peso húmedo/diámetro puede razonablemente representar el **grado de compactación** de la estructura de los callos, siendo que a mayor organización y compactación del cultivo celular usualmente existe alta proporción de peso húmedo/diámetro, la tabla permite señalar que a la cuarta y quinta semana de cultivo, el grado de compactación incremento con relación a las primeras tres semanas de cultivo.

Proporción de coeficiente de crecimiento peso húmedo/diámetro celular. Cultivo de células de *G. longiflora* en medio MS con incremento en la fuente de nitrógeno,

Proporción coeficiente de crecimiento peso húmedo / diámetro					
Variables de diseño factorial	1ra semana	2da semana	3ra semana	4ta semana	5ta semana
1	1,44	1,89	1,56	2,2	2,54
2	1,53	1,62	2,11	3,3	2,51
3	1,46	1,4	1,6	1,93	4,06
4	1,78	2,4	1,92	2,56	2,24
5	1,66	1,48	1,84	2,24	3,06
6	1,38	1,43	1,75	2,48	2,7
7	1,34	1,38	1,57	2,18	3,74
8	1,4	1,57	1,75	2,08	4,16

carbono y fósforo por arreglo trifactorial.

En los ensayos la mayor compactación esta en el caso de la octava variante (incremento de sacarosa, fosfato y nitrógeno) con un valor de 4,16 en la quinta semana de cultivo. En general los agregados celulares, son bien organizados, esto hace que por ejemplo se formen ciertas estructuras diferenciadas que transportan oxígeno y nutrientes desde el exterior al interior del agregado, esto daría lugar a que células se especialicen en determinada función, la especialización celular es importante ya que varios autores relacionan íntimamente cierto nivel de diferenciación para la producción y almacenamiento de algunos metabolitos secundarios de interés, además de que, la elevada densidad celular similar a su estado natural otorga estabilidad al material genético y en la síntesis de productos.

Paralelamente al incremento de la biomasa, se observaron algunos cambios característicos: la variación en la **tonalidad del color, aspecto y turgencia de los callos**. Inicialmente el cultivo consistía en agregados celulares con un diámetro similar en los cuatro ejes medidos, la superficie plana, lisa y compacta, de coloración amarillenta, con el tiempo de cultivo, basándonos en la experiencia de las observaciones, las células que no adquirieron un coeficiente de crecimiento alto, no variaron las características macroscópicas de manera apreciable, al contrario de las células con mayor coeficiente de crecimiento, las cuales se tornaron más friables con coloración blanco-amarillento en la sexta semana de cultivo, conforme el tiempo de cultivo fue prolongado la superficie celular se tornó rugosa y la coloración más oscura (amarillo-marrón); con aparente pérdida progresiva de humedad.

Anexo 7

* 1ra semana	2da semana	3ra semana	4ta semana	5ta semana	
1	0,14	0,21	0,24	1,14	1,63
2	0,14	0,39	1,02	1,64	2,04
3	0,14	0,09	0,29	1,19	1,61
4	0,30	1,10	1,04	0,84	0,79
5	0,44	0,03	0,40	1,04	1,62
6	0,14	0,22	0,55	1,38	1,88
7	0,06	0,07	0,54	0,73	1,34
8	0,18	0,28	0,56	1,21	1,88

Desviación estándar de la determinación del peso húmedo de callos de *G. longiflora* correspondiente a las figuras 8, 9 y 10.

Desviación estándar de la determinación de la actividad peroxidasa callos de *G. longiflora* correspondiente a la figura 14.

* 1ra semana	2da semana	3ra semana	4ta semana	5ta semana	
1	42,09	24,46	39,92	41,10	2,20
2	2,29	8,37	27,51	12,92	10,44
3	40,37	42,27	11,86	13,65	0,77
4	15,18	41,73	1,24	10,34	5,60
5	22,69	21,53	7,85	13,79	9,83
6	39,63	38,37	14,69	18,06	8,00
7	37,52	11,05	10,36	28,68	3,32
8	47,25	27,50	0,71	20,14	0,97

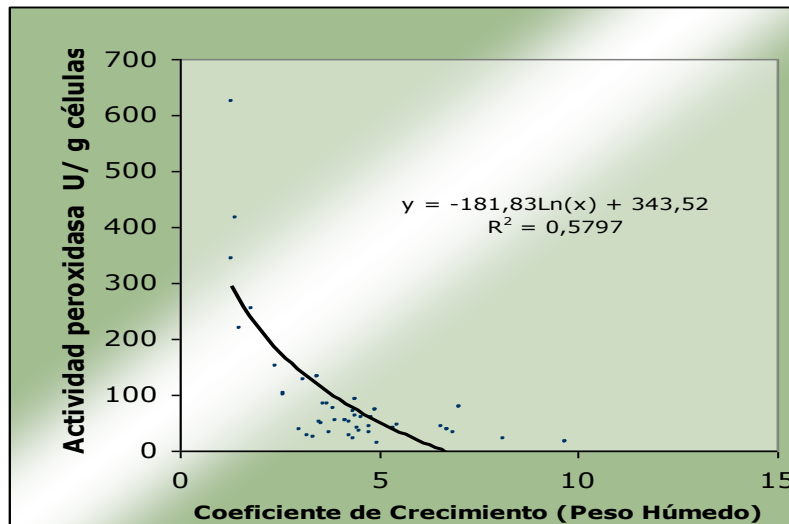
Desviación estándar de la determinación de la actividad oxidasa de callos de *G. longiflora* correspondiente a la figura 14.

* 1ra semana	2da semana	3ra semana	4ta semana	5ta semana	
1	1,28	0,80	2,41	3,01	0,74
2	1,42	3,13	3,33	1,26	4,51
3	2,74	0,69	1,22	2,37	1,09
4	2,37	1,77	1,76	1,38	1,27
5	2,70	2,68	1,86	3,65	0,27
6	3,35	1,93	1,55	2,82	1,32
7	1,46	1,95	3,03	3,10	1,63
8	2,44	3,52	3,41	3,34	2,36

Donde * corresponde al incremento de nitrógeno, sacarosa y fosfato en el medio MS de acuerdo a un arreglo factorial como se detalla en la tabla 7.

Anexo 8

En la figura, se puede apreciar que las células con mayor coeficiente de crecimiento por peso húmedo son los que ejercen menor actividad enzimática y lo contrario sucede con las células con menor coeficiente de crecimiento, en células de *G. longiflora* en cultivo durante cuatro y cinco semanas.



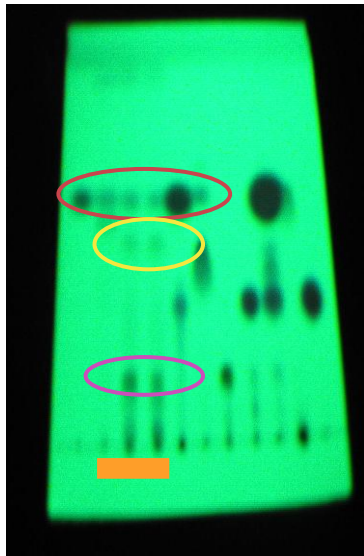
Correlación entre la actividad peroxidasa y el coeficiente de crecimiento de callos de *G. longiflora*. La actividad peroxidasa y el coeficiente de crecimiento por peso húmedo determinadas a la cuarta y quinta semana de cultivo en medio MS.

Los reportes acerca de la condición óptima para alcanzar mayor actividad enzimática incluyen factores como: la concentración del buffer, el pH, la temperatura, la tensión de oxígeno en el medio de cultivo, la especificidad por el sustrato que se está oxidando, entre otros, los cuales son extremadamente diversos para las enzimas redox y varía de acuerdo a la especie en estudio

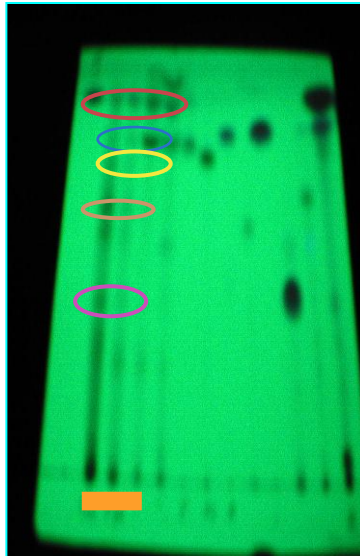
Anexo 9

Cromatografía en Capa Fina

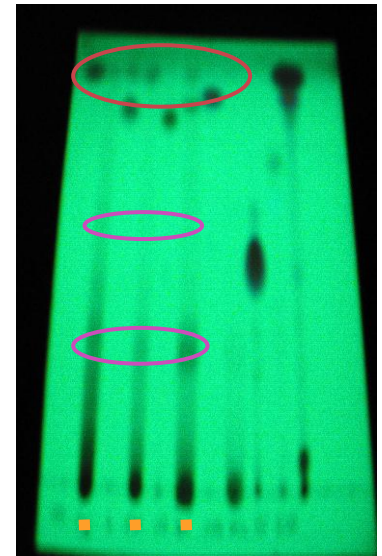
Fracción I



Fracción II



Fracción III



Perfil cromatográfico a partir de células de *G. longiflora* cultivadas *in vitro*.

Fracción I: Sistema de elución *n*-Hexano-Et₂O (10%).

Fracción II: Sistema de elución empleado CH₂Cl₂:Me₂CO (5%).

Fracción III: Sistema de elución CH₂Cl₂:MeOH (5%)

Los R_f's enmarcados en círculos corresponden a las muestras que coinciden con alcaloides purificados de la planta usados como patrón, los alcaloides detectados en los callos de *G. longiflora* son: 2-fenilquinolina, 2-(3,4-metilendioxi)feniletíl-quinolina, 2-n-pentilquinolina, 4- metoxi-2-fenilquinolina, 2-(3,4dimetoxi)feniletílquinolina.



IX. PUBLICACIONES

*"El azar no existe; Dios no juega a los dados."
Albert Einstein (1879-1955)*

Crecimiento, actividad oxidasa y peroxidasa en callos de *Galipea longiflora* K. cultivadas en medio MS, con variación en la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato

Growth, oxidase and peroxidase activity in *Galipea longiflora* K. callus cultured in MS medium, varying concentrations of sucrose, nitrogen and phosphate

Marina Guarachi Condori¹, Magali Paz Garcia¹, Enrique Terrazas Siles¹, Alberto Giménez Turba¹

¹ Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

Dirección para correspondencia: Alberto Giménez Turba Ph.D. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Andrés Av. Saavedra # 2224, Miraflores. La Paz, Bolivia.

E-mail: agimenez@megalink.com

RESUMEN

Dentro de la amplia biodiversidad de la amazonía boliviana, se encuentra la especie vegetal *Galipea longiflora* Krause la cual presenta propiedades medicinales contra la leishmaniasis. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto de la concentración de sacarosa, NH_4NO_3 y KH_2PO_4 del medio MS, sobre el crecimiento, la actividad oxidasa y peroxidasa de callos de *G. longiflora*.

Con el incremento conjunto de los tres componentes se logró obtener el mayor coeficiente de crecimiento (6.57) comparado con el medio testigo (3.96), que resulta ser altamente significativo, el crecimiento fue evaluado por la variación en el peso húmedo.

La actividad oxidasa y peroxidasa fue determinada con el cromógeno ABTS (2,2'-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato)). La oxidasa presenta mayor actividad en la tercera semana de cultivo; mientras que la actividad peroxidasa es mayor a la primera semana de cultivo, con la tendencia posterior a la disminución, repuntando cuando la fase estacionaria es alcanzada, el comportamiento enzimático es independiente de la variación de nutrientes ensayada. Sin embargo, la actividad oxidasa y peroxidasa es dependiente de la etapa de crecimiento en la que se encuentra la célula.

Palabras Clave: *Galipea longiflora* K., peroxidasa, oxidasa, ABTS

ABSTRACT

Inside the wide biodiversity of the Bolivian Amazon, the *Galipea longiflora* Krause plant presents medical

properties against the leishmaniasis. The aim of this work was to characterize the effect of sucrose, NH_4NO_3 , KH_2PO_4 concentrations from MS medium on growth, oxidase and peroxidase activity of *G. longiflora* callus.

With the increase of all three components the major growth ratio (6.57) was obtained, compared to the control (3.96), result that turns out to be highly significant, and its growth was determined by variation in fresh weight.

Oxidase and peroxidase activity were determined with the chromogen ABTS (2,2'-bis(3-ethylbenzotiazolona-6-sulfonate)). The oxidase presents a major activity in the third week of cultivation, whereas the peroxidase activity is higher in the first week of cultivation, and a trend to a later decrease, rebounding when the stationary phase is reached. The enzymatic behavior is independent from the tested variation of nutrients. However, oxidase and peroxidase activity is dependent from the growth phase currently developed by the cell.

Key Words: *Galipea longiflora* K., peroxidase, oxidase, ABTS.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la amplia biodiversidad de la amazonía boliviana, se encuentra la especie vegetal *Galipea longiflora* Krause, que es utilizada tradicionalmente por los pobladores Chimanes y Tacanas debido a sus propiedades contra las diarreas parasitarias y como fortificante para adultos y niños; en esta especie se ha reportado la presencia de alcaloides quinolínicos que han sido aislados y caracterizados, los cuales

presentan una actividad biológica importante contra la leishmaniasis cutánea, además se reporta su actividad antifúngica y antibacteriana^{12,3}. La distribución de *G. longiflora* es muy limitada y parece ser exigente en cuanto a condiciones nutricionales y ambientales para su propagación en la naturaleza, adicionando que el tiempo de crecimiento requerido es muy prolongado. La consideración de estos factores hizo enfocar la búsqueda del cultivo de esta especie en condiciones de laboratorio y conocer las características metabólicas, con el fin de contar con una fuente alternativa continua de compuestos activos.

Se conoce que el curso de las reacciones metabólicas en la célula está definida por patrones que marcan la economía enzimática necesaria para la optimización de los procesos. Las células utilizan el principio de la catálisis para lo cual sus biocatalizadores son las enzimas.

Las peroxidases (EC 1.11.1.7) constituyen un grupo de glicoproteínas muy extendido en la escala filogenética, cataliza reacciones bisustrato de carácter redox de diferentes sustratos fenólicos y sustancias relacionadas orgánicas e inorgánicas. En vegetales es destacada la peroxidasa del rábano (*Armoracia rusticana*) por su importante aplicación en el análisis colorimétrico de material biológico^{4,5,6}.

La primera actividad oxidasa (lacasa) (EC 1.10.3.2) fue reportada en 1883 en el látex de la planta *Rhus vernicifera*, son un grupo de glicoproteínas que catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos, se le atribuye un rol importante en la cicatrización frente al ataque de agentes patógenos o ruptura de la estructura vegetal^{7,8,9}.

En el presente estudio, reportamos el efecto de la variación de nutrientes en condiciones de cultivo *in vitro* en la formación de biomasa y en la producción de enzimas oxidativas de callos de *G. longiflora*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal. Fue empleado callos de *Galipea longiflora* K. previamente establecidos en el laboratorio a partir de explantes de hojas de plántulas provenientes de la comunidad Santa Rosa de Maravilla del departamento de La Paz, Bolivia¹⁰.

Medio de cultivo. Los callos fueron mantenidos en el formulado de Murashige y Skoog (MS), suplementado con kinetina (0.1 mg/L) y 2,4 diclorofenoxiacético (5 mg/L), el pH fue ajustado a 5.8 ± 0.1, para luego adicionar agar (8 g/L), sacarosa (30 g/L) y esterilizar en autoclave (ALL AMERICAN).

Variación en la fuente de carbono, nitrógeno y fósforo. Se planteó un diseño experimental

completamente al azar con un arreglo trifactorial, con variación en la concentración de los nutrientes mayoritarios del medio de cultivo MS, (ver detalles de la variación de concentraciones en la Tabla 1).

Tabla 1. Arreglo trifactorial de las variaciones en la concentración de sacarosa, nitrógeno y fósforo en el medio de Murashige Skoog.

Exp.	Sacarosa g/L	NH ₄ NO ₃ mg/L	KH ₂ PO ₄ mg/L
1	30	1650	170
2	30	1655.55	170
3	30	1650	226.6
4	30	1655.55	226.6
5	40	1650	170
6	40	1655.55	170
7	40	1650	226.6
8	40	1655.55	226.6

Como medio basal o testigo fue utilizado el formulado MS sin variación. Cada ensayo fue realizado en tres ensayos independientes, cada uno realizado por triplicado, a 28±1°C, en oscuridad completa.

Determinación del peso húmedo. Aproximadamente 0.4 g de peso húmedo de callos fue sembrado en 10 mL de medio MS en cajas de Petri de 5 mm de diámetro. Cada 7 días fue determinado el incremento de masa celular (balanza analítica AND, Japan), para luego calcular el coeficiente de crecimiento (según peso húmedo) que es definido como:

$$\text{Coeficiente de crecimiento} = \frac{\text{Peso húmedo final (mg)}}{\text{Peso húmedo inicial (mg)}}$$

Cuantificación de la actividad oxidasa. Una vez determinado el peso de los callos, cada cúmulo celular fue colocado en 2 mL de solución fosfato de sodio pH 7 (19.06 μM/30.94 mM), homogeneizada en vortex (Genie 2, USA), sometida a ultrasonido (Branson 3200) por 30 minutos y posteriormente centrifugada (Jouan CR3) a 3000 rpm por 25 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante luego de la centrifugación fue usada para la cuantificación de la oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato)), con los siguientes volúmenes: 100 μL de ABTS (10 mM), 400 μL de tampón acetato de sodio pH 3.5 (0.84 mM/49.14 mM), 400 μL de agua destilada y deionizada; la reacción fue iniciada adicionando 100 μL de sobrenadante de callos, colocada en cubeta para la lectura en espectrofotómetro UV-VIS (Cintra 5, GBC Scientific Equipment) a 420 nm^{11,12}.

La actividad enzimática fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta \text{abs} \times V_t \times 1 \text{ cm}}{\epsilon \times V_m}$$

Donde: Δabs = absorbancia de la muestra; $t = 1 \text{ min}$;
 $V_t = 1000 \text{ uL}$; $\epsilon = 3600 \text{ uL/cm}$; $V_m = 100 \text{ uL}$.

Cuantificación de la actividad peroxidasa. El procedimiento como el cálculo para determinar la actividad peroxidasa, es el mismo al anterior acápite, con la variante que fue reemplazado 100 uL de agua destilada por 100 uL de peróxido de hidrógeno (0,5 mM).

RESULTADOS

El efecto de la variación de las concentraciones de sacarosa, NH_4NO_3 y KH_2PO_4 en el medio MS sobre la producción de biomasa es presentada en la figura 1. Con los coeficientes de crecimiento fue calculada la velocidad de crecimiento para realizar el análisis por regresión; basados en el análisis estadístico STATISTICA v.6 (StaSoft Inc., USA), de las variaciones ensayadas el intercepto del incremento de los tres nutrientes es altamente significativo con un valor de $P = 0.04354$ muy por debajo de 0.42977 de la P aceptada; de los tres componentes evaluados, el que tiene mayor influencia sobre el aumento de la formación de masa celular es el KH_2PO_4 con el valor de $P = 0.262104$.

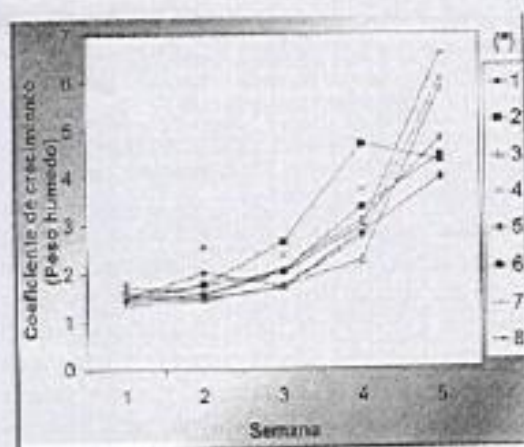


Figura 1. Efecto de la variación de la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato mediante un arreglo trifactorial en el medio MS (**ver Tabla 1), en el aumento de peso húmedo de callos de *G. longiflora* durante cinco semanas de cultivo.

Otra observación en la cinética de crecimiento de callos de *G. longiflora* es que solamente en las variantes 2 y 6 se alcanza la fase estacionaria a la cuarta semana de cultivo.

Por otro lado, la cuantificación de la actividad oxidasa, de manera general, presenta incremento

hasta la tercera semana para luego disminuir progresivamente (Figura 2); el punto de mayor actividad coincide con la etapa de cambio entre la fase de acondicionamiento y la fase de crecimiento activo, en este punto de inflexión el cambio de las características de la etapa de crecimiento podrían definir el cambio de perfil de actividad oxidasa a este tiempo de cultivo.

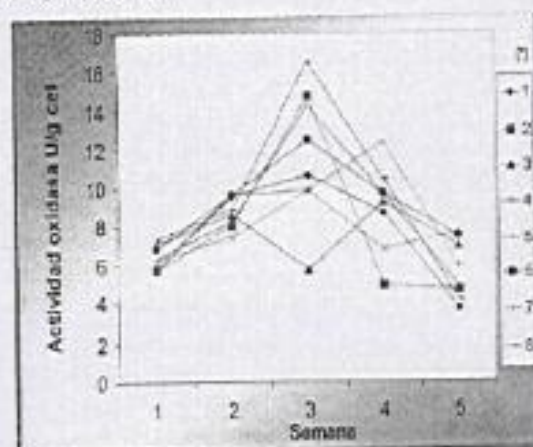


Figura 2. Efecto de la variación de la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato mediante un arreglo trifactorial en el medio MS (**ver tabla 1), en la actividad oxidasa de callos de *G. longiflora* durante cinco semanas de cultivo.

En la Figura 3 se aprecia el efecto de la variación de las concentraciones de nutrientes en la actividad peroxidasa en 5 semanas de cultivo, la mayor actividad se presenta a la primera semana de cultivo, conforme el tiempo de cultivo aumenta la tendencia general de la actividad peroxidasa es a la disminución.

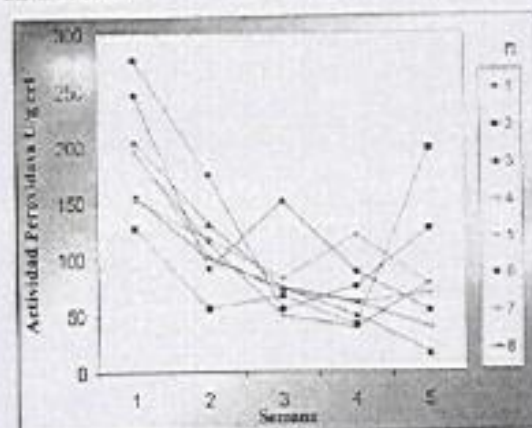


Figura 3. Efecto de la variación de la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato mediante un arreglo trifactorial en el medio MS (**ver tabla 1), en la actividad peroxidasa de callos de *G. longiflora* durante cinco semanas de cultivo.

El análisis de ANOVA de 2 factores ($p < 0.05$) para la actividad enzimática indica que las diferencias no son significativas para las variaciones de las concentraciones de nutrientes ensayados, sin embargo, la diferencia es significativa con el tiempo de cultivo tanto para la oxidasa como para la peroxidasa.

DISCUSIÓN

Es esencial estudiar el efecto de los diferentes componentes de los medios de cultivo para seleccionar el más apropiado ya sea para el crecimiento celular o con el fin de obtener algún producto en particular. En los ensayos fue incrementado la sacarosa, que es el carbohidrato comúnmente empleado, tiene un rol significativo en el control del metabolismo secundario; el nitrógeno, uno de los mas importantes elementos para el desarrollo de una planta, ambas formas (NH_4^+ o NO_3^-) a diferentes concentraciones tienen efectos relevantes sobre el crecimiento y metabolismo celular. A decir del fósforo, se añadió como fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), es conocido el valor energético del fosfato en el curso de las reacciones metabólicas y el papel principal del potasio como activador de numerosas enzimas^{13,14,15}. De acuerdo a los resultados de crecimiento obtenidos en *G. longiflora* la sacarosa, NH_4NO_3 y KH_2PO_4 están implicados en diferente proporción en el aumento de formación de masa celular en el medio MS.

La variación en la actividad oxidasa y peroxidasa en cultivo de callos de *G. longiflora* es atribuida a la etapa de crecimiento en la que se encuentra la célula. De acuerdo a reportes en otras especies vegetales la relación peroxidasa y el crecimiento celular es inversa^{16,17,18}; esto se verificó en *G. longiflora* al comparar el crecimiento en las variantes 2 y 6, que son las únicas que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento y es justamente cuando la actividad peroxidasa repunta a la quinta semana.

La marcada actividad de las peroxidasas cuando la célula cesa su crecimiento, orienta a otorgarles un rol crucial en el metabolismo secundario, como fue demostrado en *Catharanthus roseus*, en la cual se evidenció la participación de oxidasas y peroxidasas en la síntesis de alcaloides¹⁹; también fue demostrada su participación en la reacción defensiva en *Capsicum annuum* L.²⁰. Todo ello proporciona pautas para la optimización de la obtención de un determinado producto, empleando procesos como el biodireccionamiento, la biotransformación entre otras herramientas de la biotecnología vegetal.

En conclusión en este estudio se determinó que al incrementar la concentración de sacarosa, nitrógeno y

fosfato existe interacción entre ellos en el medio de cultivo que hace que la formación de callos de *G. longiflora* sea mayor. La actividad enzimática no es influenciada significativamente al variar la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato ensayadas en el medio de cultivo MS, las diferencias pudieran ser ampliadas si la variación en la concentración fuese mayor. La variación en el perfil de la actividad enzimática oxidativa está relacionada fundamentalmente con la etapa de crecimiento en la que se encuentra la célula.

AGRADECIMIENTOS

Al CIPTA por la colecta de material vegetal, al programa ASDI-SAREC proyecto "Biodiversidad Microbiana"; al IRD proyecto "Biolesh" por la beca de estudio concedida a GM.

REFERENCIAS

1. Fournet A, Barrios A, Muñoz V, Hocquemiller R, Roblot F, Cave A, Richomme P, Bruneton J. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytother Res.* 1994; 8(3): 174-178.
2. UMSA-CIPTA-IRD-FONAMA-EJA. Tacua, conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas. La Paz: Centro de Información para el Desarrollo; 1999.
3. Giménez A, Avila A, Ruiz G, Paz M, Udaeta E, Ticona J, Salamanca E, Paredes C, Rodríguez N, Quintas K, Fernady C, Gutiérrez I, Chuqui R, Quenevo C, Dálencó M, Bascope M. Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora* Krause. *Rev Bol Quim.* 2005; 22(1): 94-107.
4. Bennett R, Wallsgrave R. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol.* 1994; 127: 617-633.
5. Chabanet A, Cateson A, Goldberg R. Peroxidase and phenoloxidase activities in mung bean hypocotyl cell walls. *Phytochemistry.* 1993; 33(4): 759-763.
6. Chibbar R, Van Huystee R. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol.* 1984; 75: 956-958.
7. Mayer A, Staples R. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* 2002; 60: 551-565.
8. Digny R, Jacques G, Douae R. Fixation of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells, effects of a copper deficiency. *Biochem J.* 1986; 237: 583-588.
9. Mayer A. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry.* 2006; 67: 2318-2331.
10. Paz M, Vázquez F, Chuqui R, Paredes C, Sauvain M, Giménez A. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Galipea longiflora*, una Rutaceae de la Amazonia Boliviana. *Acta Farm Bonaerense.* 2007; 26:15-19.

11. Childs R, Bardsley W. The Steady-State kinetics of peroxidase with 2,2'-Azino-di- (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J.* 1975; 145: 93-103.
12. Dogan S, Turan P, Dogan M, Asrtan O, Alkan M. Variations of peroxidase activity among Satara species. *J Food Eng.* 2007; 79:375-382.
13. Chen Y, Yi F, Cai M, Luo J. Effects of aminoacids, nitrate and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*. *J Plant Growth Regul.* 2003; 41:265-268.
14. Chattopadhyay S, Mchra R, Śrīvastava A, Bhojwani S, Bisaria V. Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; 63:541-546.
15. Paul M, Stitt M. Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plan Cell Environ.* 1993; 16: 1047-1057.
16. Andrews J, Malone M, Thompson D, Ho L, Burton K. Peroxidase isozyme patterns in the skin of maturing tomato fruit. *Plan Cell Environ.* 2000; 23(2): 415-422.
17. Suzuki T, Honda Y, Mukasa Y, Kim S. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry.* 2006; 67: 219-224.
18. Van Huystee R. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annurev.* 1987; 38: 205-219.
19. Verpoorte R, Van der Heijden R, Memelink J. The plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic res.* 2000; 133(9): 323-343.
20. Ezzayyani M, Requena M, Candela M. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Ann biol.* 2005; 27: 143-150.

IN VITRO PRODUCTION OF LEISHMANICIDAL ALKALOID 2-PHENYL-QUINOLINE BY *ANGOSTURA LONGIFLORA* KRAUSE A

Marina Guarachi^a, Magaly Paz^a, Rogelio Chuqui^b, Michel Sauvain^c,
Ninoska Flores^c, Ma Teresa Alvarez^c, Alberto Giménez^{a*}

^aInstituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas-IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, P. O. Box 3239 La Paz, Bolivia, ^bComunidad Tacana Santa Rosa de Maravilla, Provincia Abel Iturralde, La Paz, Bolivia ^cMisión IRD, Institut de Recherche pour le Développement, P. O. Box 9214 La Paz, Bolivia

Key Words: *Angostura longiflora*; callus; leishmanicidal alkaloids; 2-phenyl-quinoline; Bolivia

ABSTRACT

Angostura longiflora (K.) Kallunki (Rutaceae) is a medicinal wood tree used by Amazonian tribes for the treatment of stomach parasites and leishmaniasis. Cell cultures from leaves of this species were obtained on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with kinetin (kin) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) based on a factorial design, where concentrations of sucrose and phosphate were changed. The increasing of sucrose and phosphate enhanced the specific growth rate from 0.16 to 0.33d⁻¹. The leishmanicidal alkaloid, 2-phenyl-quinoline was isolated from calli and identified by means of nuclear magnetic resonance (NMR) and mass (EI) spectra. This is the first report concerning the production, isolation and chemical characterization by NMR and mass spectra of the main alkaloid, in *Evanta* leaves, 2-phenyl-quinoline from cell cultures of *A. longiflora*.

Corresponding author: agimenez@megalink.com

INTRODUCTION

Angostura longiflora (Krause) Kallunki (Rutaceae) is a tree 10-15 m tall that thrives along areas where the Andes meet the humid forest in the Amazon planes [1, 2]. The bark of this tree, known locally as *Evanta*, is traditionally used as a beverage for the treatment of stomach parasites, diarrhea with blood, as a fortifying to strengthen physical conditions of children and adults and is also used as a cataplasma and infusion for the treatment of leishmaniasis [3]. Chemical [4] and biological [5] studies on this species have reported a total of 13 leishmanicidal quinoline alkaloids from bark, leaves and roots. Among these alkaloids, 2-phenyl-quinoline is the main component and it is found together with minor amounts of other 4-methoxy, 2-aryl and 2-alkyl quinolines [6].

The total alkaloid-extracts from the bark of this tree are currently undergoing clinical studies to evaluate the efficacy of the plant in the treatment of cutaneous leishmaniasis [7]. Hence, the use of biotechnological tools to establish cell cultures of *Evanta* as potential productive source of the active metabolites, might avoid depredation of the environment [8]. Cell cultures could also facilitate the production, under controlled conditions, of homogenous mixtures of active compounds [9, 10].

Several strategies, such as modifying the nutrient concentrations in the culture medium, are being followed in order to favor specific physiological behavior when cells are cultivated *in vitro*. Nutrients are important to obtain the adequate productive conditions, and vary for each plant species [11]. Thus the aim of this study was to enhance, through a factorial design based on sucrose and phosphate, both the cell biomass concentration and the specific growth rate, in order to have a continuously available cell source for the production of the leishmanicidal quinolinic alkaloids.

RESULTS AND DISCUSSION

Among the nutritional factors, sucrose is the common carbon source for the plant tissue and cell culture, serving as a principal energy source and a component for biosynthesis [12]. Phosphate has been reported to regulate synthesis of secondary metabolites in plant cell cultures [13]. Here, it was demonstrated that the variation of sucrose and phosphate had a positive effect over biomass growth. When, KH₂PO₄ and C₁₂H₂₂O₁₁ sources were increased, the production of biomass was also increased compared to the basal MS medium composition. The highest value of cell

growth rate was 0.33 day^{-1} (Figure 1), two-fold the initial growth rate. According to the results the increasing in the amounts of nutrients enhances the biomass production and might increase the secondary metabolites synthesis [14,15]. The main alkaloid, 2-phenyl-quinoline was detected by TLC analysis of the organic extract from cell culture (R_f 0.57). It was isolated from the raw organic extract using preparative TLC. The ^1H NMR spectrum exhibited signals only in the aromatic region, integrating for a total of 11 protons. At downfield, two doublets, each integrating to one proton, being easily distinguished at δ 8.23 ($J=8.6\text{Hz}$) and 8.18 ($J=7.9\text{Hz}$), characteristic of the protons in *para* and *peri* positions respect to the nitrogen in the quinoline skeleton. A doublet at δ 8.20, ($J=7.0\text{Hz}$), integrating to 2 protons together with two doublet signals, integrating to 3 protons, at δ 7.48 ($J=7.0\text{Hz}$) and 7.55 ($J=7.0\text{Hz}$) are consistent with a mono substituted aromatic ring, confirming the presence of the phenyl ring moiety in carbon 2 in the quinoline substructure of 2-phenyl-quinoline (Figure 2). Mass spectrum, under electron impact mode of the substance showed a molecular ion peak at m/z 205 (80%) which was in agreement with the molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}$ (Calc. 205.0891, observed 205.0890), compatible with the 2-phenyl-quinoline the main alkaloid reported from leaves and bark from *A. longiflora*, it is found in 0.15% (w/w) approximately from dry leaves [5]. The isolation of this component was about 0.06% (w/w) from dried cells.

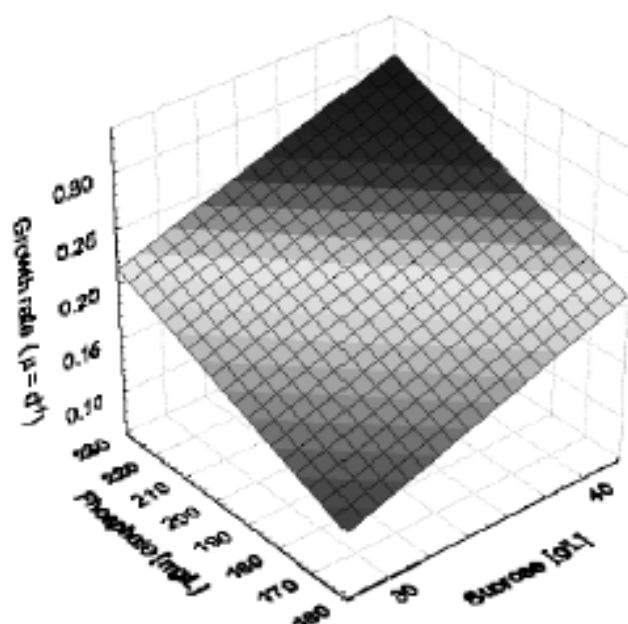
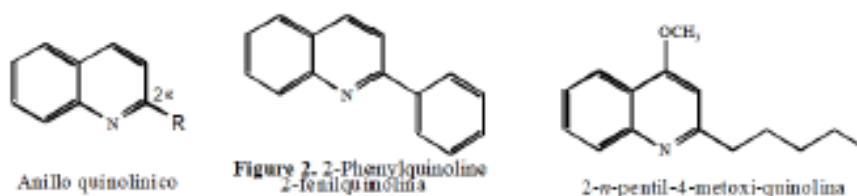


Figure No 1. Response surface of growth rate (d^{-1}) by means of different sucrose and phosphate concentrations.

Studies performed on leaves extracts from the tree growing in nature showed that is found together with at least other 5 minor quinoline alkaloids [5].

In vitro optimization of alkaloids production in cell cultures using elicitors, and simultaneous analysis of the minor chemical components are currently being done.



EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Methods

Plant material and cell culture

Specimens of *A. longiflora* K. Kallunki were collected in Santa Rosa de Maravilla community, Bolivia (S13°56'587, W0.68°00'308) and they were deposited at the Bolivia National Herbarium (Voucher specimen SD17).

Leaves of young plants were surface-sterilized and dissected in order to inoculate on Murashige and Skoog medium. MS medium consist on (mg/L): NH_4NO_3 1650, H_3BO_3 6.2, CaCl_2 332.2, CoCl_2 0.025, $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025, Na_2EDTA 37.26, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8, MgSO_4 180.7, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16.9, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25, KI 0.83, KNO_3 1900, KH_2PO_4 170, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 8.6, myo-inositol 100, nicotine acid 0.5, pyridoxine-HCl 0.5, thiamine-HCl 0.1, glycine 2, agar 8000, sucrose 30000, supplemented with kinetine (0.1 ppm) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (5 ppm). All the chemicals used were of analytical grade (Sigma, Germany) except sucrose. The pH was adjusted to 5.8 and then the culture medium was autoclaved at 121 °C for 20 min.

The cell lines were maintained at 28±2 °C into an acclimated darkness-chamber (Paz et al., 2007) and the callus were re-inoculated in fresh medium every 25 to 30 days.

2² Factorial design for biomass optimization

Three experiments were performed in triplicate inoculating approximately 0.5 g of 4-5 weeks-old callus on the middle of petri dishes with MS medium. The composition in g/L of sucrose and mg/L of phosphate was modified as follow: 1) 30 and 170, 2) 40 and 170, 3) 30 and 227, and finally 4) 40 and 227, respectively. The other constituents were kept constant.

The maximum growth rate was analyzed by using response surface methodology. This allowed efficient fitting and checking of the second-degree polynomial model which was used to estimate the predicted response. STATISTICA v.6 (StatSoft Inc., USA) was applied for the analysis of statistical data. All results were analyzed with factorial ANOVA ($p \geq 0.05$).

Specific cell growth rate

Cellular growth was determined by fresh weight every 7 days for a period of 35 days. The growth indexes were calculated according to the formula: $GI = m_t/m_0$, where m_0 and m_t (g) are the initial and final callus fresh weight, respectively.

The specific cell growth rate (μ , day^{-1}) was calculated from the growth indexes data, according to the formula: $\mu = (m_t/m_0)/t$, where t is the cultivation time (days).

Extraction and characterization of 2-phenyl-quinoline from cell culture.

The calluses were dried at 60 °C until constant weight. The dried cells were homogenized in a mortar (8.77 g) and then, extraction was made with dichloromethane (10:1 v/w) for 48 h in dark conditions at room temperature. The extract obtained was filtered and concentrated under reduced pressure at 25 °C. The residue (57.23 mg, 0.65%) was analyzed by TLC (Thin Layer Chromatography) using silica gel aluminum coated plates (250 μm , Whatman, Germany) eluted with the system *n*-Hexane: CH_2Cl_2 (8:2), the visualization of spots was done by UV (254 and 366nm). The main alkaloid, 2-phenyl-quinoline was detected as dark spot comparing with a reference substance (Sigma-Aldrich 299650). The crude extract was analyzed by PTLC (1mm, glass plates Merck) and eluted with the system *n*-Hexane:Diethyl ether (8:2, three elutions). The upper band was isolated using CH_2Cl_2 and the residue obtained upon evaporation (4.89 mg, 0.06%, from dry callus) was analyzed at 400 MHz NMR (Bruker, CDCl_3 δ 7.24ppm) δ 7.85 (1H, d, $J=8.6\text{Hz}$, H3); 8.23 (1H, brd, $J=8.6\text{Hz}$, H4); 7.81(1H, brd, $J=8.1\text{Hz}$, H6); 7.51 (1H, m, H7); 7.76 (1H, t, $J=7.9\text{Hz}$, H8); 8.18 (1H, brd, $J=7.9\text{Hz}$, H9); 8.20 (2H, d, $J=7.0\text{Hz}$, H2' and 6'); 7.55 (2H, t, $J=7.0\text{Hz}$, H3' and 5'); 7.48 (1H, t, $J=7.0\text{Hz}$, H4'). EI-MS and HR-EI-MS were recorded on a Micromass Autospec spectrometer.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the "Jeunes Equipe" (IRD-BIOLEISH), for financial support. The programs UMSA-SIDA/SAREC and AECID-PCI (A/010794/07) project for chromatographic and spectroscopic support are also grateful.

REFERENCES

- ¹. KILLEEN, T., GARCIA, E., STEPHAN, B. *Guía de árboles de Bolivia*. 1993, Quipus s.r.l., La Paz, 708.
- ². PIRANI, J. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2004, 144, 365
- ³. BOURDY, G., QUENEVO, C., GIMÉNEZ, A. *Tacana, conocamos maestros árboles, maestros hierbas*, 1999, Plural, La Paz: 414-416.
- ⁴. FOURNET, A., HOCQUEMILLER, R., ROELOT, F., CAVE, A., RICHOMME, P., BRUNETON, J. *Journal of Natural Products*, 1993, 56, 1547.
- ⁵. FOURNET, A., FERREIRA, M., ROJAS, A., TORRES, S., FUENTES, S., NAKAYAMA, H., SCHDINI, A., HOCQUEMILLER, R. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40, 2447.
- ⁶. GIMÉNEZ, A., AVILA, A., RUIZ, G., PAZ, M., UDAFTA, E., TICOMA, J., SALAMANCA, E., PAREDES, C., RODRÍGUEZ, N., QUENTS, K., FERAUDY, C., GUTIERREZ, I., CHUQUI, R., QUENEVO, C., DALENCE, M., BASCOPE, M. *Revista Boliviana de Química*, 2005, 22, 94.
- ⁷. GIMÉNEZ, A., MACHICADO, S., MAGARIÑOS, W., SOSA, F., CHOQUE, O. *Ethics aval from the National Committee of Bioethics project UMSA-ASDI-SAREC "Infectious diseases new alternative therapies: Events in the treatment of leishmaniasis cutanea"*, 2006, Bolivia.
- ⁸. PAZ, M., VÁZQUEZ, F., CHUQUI, R., PAREDES, C., SAUVAIN, M., GIMÉNEZ, A. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2007, 26, 15.
- ⁹. YEOMAN, M., YEOMAN, C. *New Phytologist*, 1996, 134, 513.
- ¹⁰. VERPOORTE, R., CONTIN, A., MEMELINK, J. *Phytochemistry Reviews*, 2002, 1, 13.
- ¹¹. COLLIN, H. *Plant Growth Regulation*, 2001, 34, 119.
- ¹². HEA, J., JUNG, E., OH, H.M. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 2005, 13, 87.
- ¹³. LIU, S., ZHONG, J. *Process Biochemistry*, 1998, 33, 69.
- ¹⁴. CHATTOPADHYAY, S., MEHRA, R., SRIVASTAVA, A., BHOJWANI, S., BCSARIA, V. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63, 541-546.
- ¹⁵. NOWAK, B., MICZYNSKI, K., HUDY, I. *Acta Physiologia Plant*, 2007, 29, 479.