

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

INDUCCIÓN DE SESQUITERPENOS EN
CULTIVOS CELULARES DE *Psacalium*
peltatum, PLANTA ANTIDIABÉTICA, POR
HOMOGENADO DE *Aspergillus niger*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

NADIA ASSENETH ROJANO VILCHIS

MÉXICO, D.F.

2005



m349110

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Nadia Asseneth
Rojano Vilchis

FECHA: 29 de septiembre 2005

FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Rojano Vilchis Nadia Asseneth** con número de cuenta **501093611** con la tesis titulada: "Inducción de Sesquiterpenos en Cultivos Celulares de *Psacalium peltatum*, Planta Antidiabética, por Homogenado de *Aspergillus niger*", bajo la dirección del(a) **Dr. Manuel Jiménez Estrada**.

Presidente:	Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Vocal:	Dr. Robert Arthur Bye Boettler
Secretario:	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Suplente:	Dra. María del Rocío Cruz Ortega
Suplente:	Dr. Hans Martin Ricker Reymann

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 21 de septiembre del 2005

[Firma]
Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado a través de la beca crédito 167153 así como al Sistema Nacional de Investigadores por el estímulo económico con el número de expediente 828.

A la técnica académica del Herbario Nacional MEXU, del Instituto de Biología, Gilda Ortiz Calderón y del Sr. Francisco Ramos Marchena, por la identificación taxonómica de la especie y de la vegetación asociada.

A la Ing. María Teresa de Jesús Olivera Flores responsable del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Conjunto E de la Facultad de Química, por las facilidades otorgadas en instalaciones, material y reactivos para llevar a cabo el establecimiento de los diferentes experimentos de los cultivos celulares y por las sugerencias al proyecto de investigación.

Al personal del Laboratorio de Micotoxinas del Instituto de Biología por la donación de la cepa axénica de *Aspergillus niger*.

A los profesores del Instituto de Química por el apoyo proporcionado en la realización de los diferentes espectros, análisis cuantitativo y evaluación de la actividad biológica de los compuestos obtenidos. Maestro Hector Ríos, Maestra Nieves Zavala, Maestra Elizabeth Huerta, Q.F.B. Rocío Patiño y Q. María de los Angeles Peña responsables del laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de Sólidos. Ing. Luis Velasco y Maestro Javier Pérez Flores responsables del laboratorio de Espectrometría de Masas. Erendira García responsable del laboratorio de Infrarrojo. Maestra Carmen Márquez y Angélica Merlo responsables del laboratorio de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia. Maestra Ma. Teresa ramírez Apan de la Unidad de Pruebas Biológicas.

A cada uno de los miembros del Comité Tutorial y jurado por las sugerencias y tiempo dedicado a la revisión del presente proyecto de investigación.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada por otorgarme su confianza, paciencia, experiencia académica y facilidades para realizar el proyecto de investigación así como por el apoyo otorgado para participar en los diferentes cursos, talleres y congresos.

A todos los compañeros de los diferentes laboratorios por sus conocimientos personales y académicos que fueron valiosos en el transcurso del tiempo compartido. A los alumnos de estancias cortas, por su participación en la realización de los diferentes fraccionamientos y subcultivos *in vitro*.

A mi familia por el apoyo personal, técnico y económico para realizar y llevar a buen término la investigación.

Índice	Página
Lista de Abreviaturas.	4
Índice de Tablas.	6
Índice de Figuras.	7
Índice de Espectros.	10
Resumen.	11
Summary.	13
1. Antecedentes.	15
1.1. Metabolitos secundarios de plantas.	15
1.1.1. Importancia de los metabolitos secundarios de plantas para la industria.	17
1.1.2. Terpenos.	17
1.1.3. Biosíntesis de los terpenos.	18
1.1.4. Regulación espacial de la biosíntesis de terpenos.	21
1.1.5. Sesquiterpenos.	22
1.2. Producción de metabolitos secundarios mediante cultivo de tejidos vegetales.	23
1.2.1. Producción de metabolitos secundarios mediante cultivo de células suspensión.	23
1.2.2. Establecimiento y características de los cultivos de células en suspensión.	24
1.2.2.1. Ventajas y desventajas de los cultivos de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios.	26
1.2.3. Elicitación en los cultivos de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios.	27
1.2.3.1. Características del elicitor biótico.	28
1.2.3.2. Aspectos bioquímicos del mecanismo de elicitación.	30
1.2.3.3. <i>Aspergillus niger</i> como elicitor biótico.	33
1.3. <i>Psacalium peltatum</i> .	34
1.3.1. Clasificación taxonómica de <i>Psacalium peltatum</i> .	34
1.3.2. Descripción taxonómica de <i>Psacalium peltatum</i> .	34
1.3.3. El complejo matarique.	35

1.3.4. Aspectos farmacológicos y compuestos químicos de <i>Psacalium decompositum</i> y de <i>Psacalium peltatum</i> .	36
2. Justificación.	39
3. Hipótesis.	39
4. Objetivo general.	40
4.1. Objetivos particulares.	40
5. Materiales y métodos.	41
5.1. Colecta e identificación taxonómica del material biológico.	42
5.2. Estudios fitoquímicos.	42
5.1.1. Extracción y fraccionamiento preliminar.	42
5.1.2. Caracterización espectroscópica, espectrométrica, punto de fusión y Rf de los compuestos obtenidos.	43
5.3. Cultivos de tejidos vegetales.	44
5.3.1. Preparación de los diferentes medios de cultivo.	44
5.3.2. Obtención y desinfección de los explantes.	45
5.3.3. Cultivos de callo.	46
5.3.4. Establecimiento de los cultivos de células en suspensión.	48
5.3.5. Elicitación de sesquiterpenos.	49
5.3.6. Determinación y cuantificación de sesquiterpenos en el paquete celular.	51
6. Resultados y discusión.	53
6.1. Colecta del material vegetal.	53
6.2. Fraccionamiento del extracto hexánico e identificación de los sesquiterpenos.	56
6.2.1 Fracción 83.	56
6.2.2. Fracción 296.	57
6.2.3 Fracción 350.	59
6.3. Cultivos de callo.	62
6.3.1. Explantes de hojas.	62
6.3.2. Inducción del cultivo de callo.	63
6.3.3. Proliferación del cultivo de callo.	65
6.4. Cultivos de células en suspensión.	67
6.4.1. Primer establecimiento de los cultivos de células en	67

suspensión.	
6.4.2. Segundo establecimiento de los cultivos de células en suspensión.	68
6.5. Cinéticas de crecimiento por adición del homogenado.	71
6.6. Determinación y cuantificación de sesquiterpenos.	75
7. Conclusiones.	79
8. Perspectivas.	81
9. Bibliografía.	82
Anexo 1. Medios de cultivo.	95
Anexo 2. Resumen del fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto hexánico de <i>Psacalium peltatum</i> .	97
Anexo 3. Espectros.	99

Lista de Abreviaturas.

AIA	Ácido indolacético.
ANA	Ácido naftalenácético.
AMV	Ácido mevalónico.
BAP	6-bencilaminopurina.
B5	Medio de cultivo base de Gambord.
Biomax	Biomasa máxima en peso seco.
°C	Grados centígrados.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CHCl ₃	Cloroformo.
CH ₃ OH	Metanol.
COSY	Experimento de correlación homonuclear ¹ H- ¹ H. (Correlated Spectroscopy).
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato.
DOXP	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato.
Dt	Incremento por unidad de tiempo.
Dx	Incremento del número celular.
2,4 -D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético.
FPP	Farnesilpirofosfato.
EM-IE ⁺	Espectro de masas por impacto electrónico.
E.U.A.	Estados Unidos Americanos.
gL ⁻¹	Gramos por litro.
g	Gramos.
GAP	Gliceraldehido 3-fosfato.
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato.
GFPP	Geranilfarnesil pirofosfato.
GPP	Geranilpirofosfato.
HETCOR	Experimento de correlación heteronuclear ¹³ C- ¹ H a un enlace.
HMG-CoA reductasa	Hidroxil-metil-glutaril-CoA reductasa.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography. (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia).
IPP	Isopentenildifosfato.
IR	Espectro de infrarrojo.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento.
L.I.	Líquido Intracelular.
mm	Milímetros.
mLL ⁻¹	Mililitros por litro.
min	Minutos.
mM	Milimolar.
mL	Mililitros.
M	Mean (Promedio).
MHz	Mega hertz.
M ⁺	Ión molecular.
MEXU	Herbario Nacional del Departamento de Botánica del Instituto de Biología.
MS	Medio de cultivo base de Murashige y Skoog.

MSC1	Medio de cultivo para callo modificado del MS con la concentración de nitratos completa.
MSC2	Medio de cultivo para callo modificado del MS con la concentración de nitratos a la mitad.
MSB	Medio de cultivo para células en suspensión modificado del MSC2.
mgL ⁻¹	Miligramos por litro de solución.
N	Normal.
PR	Proteínas de resistencia.
P	Probabilidad.
ppm	Partes por millón.
PF	Peso fresco.
PS	Peso seco.
PM	Peso molecular.
R	Genes de resistencia.
R _f	Referencia frontal.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
rpm	Revoluciones por minuto.
SD	Standard deviation. (Desviación estandar).
SE	Standard error. (Error estandar).
td	Tiempo de duplicación en días.
T. ind.	Tiempo de inducción.
TMS	Tetrametilsilano.
Tr	Tiempo de retención.
UV	Luz ultravioleta.
v/v	Volúmen sobre volúmen.
μM	Micromolar.
μ(d ⁻¹)	Velocidad específica de crecimiento.

Índice de Tablas.

	Página
Tabla 1. Rendimiento obtenido de diferentes metabolitos secundarios con importancia farmacológica mediante el cultivo de células en suspensión (DiCosmo y Misawa, 1995).	24
Tabla 2. Formulación de los medios de cultivo base de Murashige y Skoog, 1962 (MS) y Gamborg, 1968 (B5).	44
Tabla 3. Composición de la solución I de nitratos/ amonio para los medios de inducción (MSC1) y proliferación (MSC2) de callo en mgL ⁻¹ .	46
Tabla 4. Parámetros e índice de crecimiento de los cultivos de callo negro (CN) y blanco (CB).	64
Tabla 5. Parámetros e índice de crecimiento del cultivo de callo blanco (CB) en medio MSC1 y MSC2.	66
Tabla 6. Parámetros e índice de crecimiento de los cultivos en suspensión del callo blanco (CB) y negro (CN) en medio MSC2.	68
Tabla 7. Parámetros e índice de crecimiento del cultivo en suspensión de callo blanco (CB) en medio MSC2 y MSB.	70
Tabla 8. Parámetros e índice de crecimiento del cultivo en suspensión de callo blanco (CB) en medio MSC2, MSB y B5 con y sin el homogenado.	74
Tabla 9. Rendimiento en peso seco de cada uno de los diferentes cultivos <i>in vitro</i> y de la raíz <i>in vivo</i> .	77

Índice de Figuras.

	Página
Figura 1. Diagrama modificado del origen biosintético de los principales metabolitos secundarios con interés comercial producidos por plantas (Taiz y Zeiger, 2002).	16
Figura 2. Ruta metabólica del acetato/mevalonato para la formación del isopentenildifosfato (IPP), unidad precursora básica formada de un compuesto isoprenico (C ₅) de 5 carbonos, que origina los diferentes tipos de terpenos.	19
Figura 3. Ruta alterna del piruvato para la formación del IPP.	20
Figura 4. Clases de terpenos que son biosintetizados a partir de la unidad básica de IPP.	20
Figura 5. Regulación espacial sugerida en la biosíntesis de terpenos en plantas superiores, entre el citosol (vía acetato/mevalonato) y plástidos (vía alterna del piruvato).	21
Figura 6. Representación esquemática del establecimiento de los cultivos de callo y de células en suspensión. Aislamiento del explante foliar, sobre un medio de cultivo sólido (1), proliferación (2) y subcultivo del cultivo de callo (3). Establecimiento de los cultivos de células en suspensión en matraces Erlenmeyer (4-4d).	25
Figura 7. Crecimiento sigmoide de los cultivos de tejido vegetal de callo y de células en suspensión. Caracterizado por la etapa de adecuación o latencia (1), exponencial (2) y estacionaria (3).	26
Figura 8. Modelo de activación de las diferentes respuestas de la defensa vegetal, en el cultivo de células en suspensión de la planta de perejil (<i>Petroselinum crispum</i>) (Hammond-Kosack y Jones, 2000).	32
Figura 9. Ejemplar de <i>Psacalium peltatum</i> (H.B.K.) Cass.var. <i>peltatum</i> , colectada en el poblado de La Estanzuela, Hidalgo, México.	35
Figura 10. Aspecto del rizoma y de las raíces de <i>Psacalium peltatum</i> .	36
Figura 11. Principales metabolitos secundarios, aislados de <i>Psacalium</i>	37

	<i>decompositum</i> (1-7) y <i>Psacalium peltatum</i> (4-7).	
Figura 12.	Representación diagramática de la ruta experimental para la inducción de sesquiterpenos en los cultivos <i>in vitro</i> de <i>Psacalium peltatum</i> por homogenado de <i>Aspergillus niger</i> .	41
Figura 13.	Vegetación asociada a <i>Psacalium peltatum</i> (A), encino <i>Quercus rugosa</i> (B).	53
Figura 14.	Diferencias en el desplazamiento (R_f) e intensidad de las manchas de los extractos hexánicos de la raíz y el rizoma, eluidos con el sistema hexano: acetato de etilo (9:1).	54
Figura 15.	Perforación del rizoma (A), por el escarabajo (gallina ciega) (B).	55
Figura 16.	Plantas de <i>Psacalium peltatum</i> , en condiciones de invernadero para la obtención de hojas jóvenes, que sirvieron de explantes para los cultivos de callo.	62
Figura 17.	Cultivos de callo negro (A) y blanco (B) obtenidos del explante de hoja de <i>Psacalium peltatum</i> en medio de cultivo MSC1.	63
Figura 18.	Cinéticas de crecimiento de los cultivos de callo negro y blanco en medio MSC1. ($n=4$) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.001$).	64
Figura 19.	Curvas de crecimiento del callo blanco en medio MSC1 y MSC2. ($n=4$) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.001$).	66
Figura 20.	Cinética de crecimiento en peso seco de los cultivos en suspensión del callo blanco y negro en medio de cultivo MSC1. ($n=4$) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.005$).	67
Figura 21.	Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo MSC2 (A) y MSB (B, C). A 12 (B) y 23 (C) días con el medio de cultivo MSB. ($n=4$) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.005$).	69
Figura 22.	Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo MSC2,	72

-
- durante 5 días, sin y con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*. (n=4) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) (p < 0.005).
- Figura 23. Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo MSC2, durante 14 días, sin y con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*. (n=4) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) (p < 0.005). 72
- Figura 24. Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo MSB, durante 14 días, sin y con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*. (n=4) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) (p < 0.005). 73
- Figura 25. Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo B5, durante 14 días, sin y con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*. (n=4) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) (p < 0.005). 74
- Figura 26. Diferencias en R_f del sesquiterpeno identificado en el cultivo celular con el homogenado (H). En un sistema de elusión hexano: acetato de etilo (7:3). Extracto de la raíz (Ra) Maturinina (M), acetato de maturina (AM) y al angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol (ANG) y cultivo celular sin el homogenado (SH). 75
- Figura 27. Perfil cromatográfico obtenido para la maturinina, el acetato de maturina (maturina) y el angelato de 3-4 dehidro 14-maturinol (angelito). 76
- Figura 28. Cinética de crecimiento y acumulación de los sesquiterpenos en los cultivos en suspensión sin el homogenado (B5) y con el homogenado (B5H), en medio de cultivo B5. Maturinina (M), acetato de maturina (AM) y al angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol (ANG). 78

Índice de Espectros.

	Página
Espectro 1. Espectro de IR (CHCl ₃) de la maturinina.	100
Espectro 2. Espectro de masas (EI) de la maturinina.	101
Espectro 3. Espectro de RMN de ¹ H de la maturinina.	102
Espectro 4. Espectro de IR (CHCl ₃) del acetato de maturina.	103
Espectro 5. Espectro de masas (EI) del acetato de maturina.	104
Espectro 6. Espectro de RMN de ¹ H del acetato de maturina.	105
Espectro 7. Experimento COSY del acetato de maturina.	106
Espectro 8. Experimento DEPT del acetato de maturina.	107
Espectro 9a. Experimento HETCOR del acetato de maturina.	108
Espectro 9b. Experimento HETCOR (ampliado) del acetato de maturina.	109
Espectro 10. Espectro de IR (CHCl ₃) del angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol.	110
Espectro 11. Espectro de masa (EI) del angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol.	111
Espectro 12. Espectro de RMN de ¹ H del angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol.	112
Espectro 13. Experimento DEPT del angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol.	113
Espectro 14. Experimento HETCOR del angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol.	114

Resumen.

La presente investigación describe el estudio de la producción de sesquiterpenos por la adición de un elicitor fúngico de *Aspergillus niger* en los cultivos de células en suspensión de la planta *Psacalium peltatum*.

Psacalium peltatum es una planta medicinal que forma parte del conjunto de plantas medicinales conocido como complejo matarique. Utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades. La planta fue colectada en el municipio de la Estanzuela en Pachuca, Hidalgo, México.

Para obtener los compuestos sesquiterpénicos se realizó un fraccionamiento químico de las raíces de la planta mediante diferentes técnicas cromatográficas. La naturaleza química de los compuestos obtenidos fue confirmada a través de diferentes análisis espectroscópicos, espectrométricos, punto de fusión y R_f . Los sesquiterpenos de los cultivos de callo y de células en suspensión fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Los cultivos de callo fueron establecidos a partir de explantes de hojas, provenientes de plantas aclimatadas en condiciones de invernadero. Los cultivos de callo obtenidos fueron de color negro y blanco, desarrollados en los medios de cultivo sólido MSC1 y MSC2. Ambos medios de cultivo fueron modificados en función del medio de cultivo base de Murashige y Skoog, 1962 (MS). Adicionados con 2 mgL^{-1} de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), 0.3 mgL^{-1} de 6-bencilaminopurina (BAP), 1 mgL^{-1} de sulfato de adenina, 100 mgL^{-1} de ácido ascórbico y una mezcla distinta en concentración de vitaminas y aminoácidos utiliza en el medio de cultivo base MS.

El establecimiento de los cultivos de células en suspensión, se obtuvo con el callo blanco en el medio de cultivo MSC2. La biomasa máxima del callo blanco en peso seco fue de 12.7 gL^{-1} con un tiempo de duplicación (td) de 9.9 días y una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.07 días^{-1} .

Los cultivos de células en suspensión se establecieron en matraces de 150 mL con 60 mL de medio MSC2 y con 4 g en peso fresco de callo. Los matraces se pusieron en un agitador bajo condiciones de obscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 100 rpm. El crecimiento del cultivo celular se caracterizó por su peso seco con inóculos de 1.5 y 10 mL en diferentes tiempos. El medio de cultivo MSB, favoreció el incremento de biomasa. El medio de cultivo B5, y la adición del homogenado fúngico de *Aspergillus niger*, favoreció el incremento de sesquiterpenos.

En conclusión, la adición del homogenado fúngico de *Aspergillus niger* a los cultivos de células en suspensión favoreció el incremento del acetato de matorina de 0.2407 a 0.810 gL^{-1} en peso seco, no así de la matorinina ni del angelato de 3-4 dehidro 14-matorinol.

Summary.

The present research describes the study on sesquiterpene production, by addition of a homogenate fungic elicitor of *Aspergillus niger* in the plant cell suspension cultures of *Psacalium peltatum*.

Psacalium peltatum is a medicinal plant, that belongs the matarique complex and use it for treatment different illness. The plant was collected in the municipio of Estanzuela in Pachuca, Hidalgo, México.

In order to obtain the sesquiterpene compounds was performed a chemical fractionation of the plant roots using different cromatographic techniques. The chemical nature of the compounds obtained was confirmed through different spectroscopics and spectrometrics analysis with melting point and R_f . The sesquiterpene compounds in the callus and cell suspension cultures was measured by high performance liquid chromatography (HPLC).

The callus culture were obtained from the plant leaves, that was acclimated in controled greenhouse conditions. The callus culture obtained were black and white, growing in MSC1 and MSC2 media cultures, modiflicated from Murashige and Skoog, 1962 (MS) media culture. MSC1 and MSC2 cultures were additioned with 2 mgL^{-1} of 2,4 diclorofenoxiacetic acid (2,4 D), 0.3 mgL^{-1} of 6-bencilaminopurine (BAP), 1 mgL^{-1} of adenine sulfat, 100 mgL^{-1} of ascorbic acid and a mixture of vitamines and aminoacids concentration of the MS base media culture.

The cell suspension culture was obtained with the white callus in the MSC2 media culture. The maximum biomass in dry weight of white callus was 12.7 gL^{-1} with duplicating time of 9.9 days and a specific growth speed (μ) of 0.07 days^{-1} .

The cell suspension cultures were grown in 150 mL flasks with 60 mL of the liquid media MSC2 with 4 g of callus. The flasks were shaken in dark conditions at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 100 rpm. The growth of cell suspension culture was measured by

dry weight in inocules of 1.5 and 10 mL at different times. The best cellular growing was obtained with MSB media culture MSB. The B5 media culture and the addition of *Aspergillus niger* fungic homogenate were used to obtain a sesquiterpene production.

In conclusion, the addition of *Aspergillus niger* fungal homogenate in the cell suspension cultures enhanced the production of acetate of maturin from 0.2407 to 0.810 gL⁻¹ dry weight, but not the maturinine nor the angelate of 3-4 dehidro 14-maturinol.

1. Antecedentes.

1.1. Metabolitos secundarios de plantas.

Las plantas presentan una variedad de compuestos químicos que habitualmente se clasifican en primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son sustancias necesarias para los procesos fisiológicos del metabolismo celular básico e incluyen azúcares, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos entre otros, que son acumulados en semillas y órganos vegetativos (Balandrin y col., 1985; Wink, 1990; Waller y col., 2001).

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario, que se pueden dividir en tres grandes grupos: terpenos, fenoles y compuestos nitrogenados (Figura 1). Los metabolitos secundarios son reconocidos por no desempeñar un papel esencial en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación y síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Sin embargo desempeñan un papel ecológico fundamental con una amplia distribución en el reino vegetal y una heterogeneidad química que varía de una planta a otra. Con vías metabólicas complejas altamente reguladas por un gran número de enzimas, las cuales presentan reacciones que se activan o inhiben genéticamente en respuesta a diversos estímulos externos derivados de los diferentes factores ambientales, como los mecanismos de señalización química en los diferentes procesos de polinización, comunicación con microorganismos simbiotes, depredación, competencia, defensa, deshidratación, disponibilidad de nutrientes, material de reserva y protección contra los rayos ultravioleta (Balandrin y col., 1985; Wink, 1990; Eisner y Meinwald, 1995; Turlings y col., 1995; Stowe y col., 1995; Meinwald y col., 1998, Taiz y Zeiger, 2002).

La biosíntesis de los metabolitos secundarios está relacionada con el proceso de diferenciación vegetal. Sintetizándose principalmente en las raíces para transportarse en ocasiones a lugares diferentes por el floema o el xilema y acumulándose en pequeñas cantidades en vacuolas, tricomas glandulares de las

hojas (Ascensao y Pais, 1998) y en semillas de ciertos frutos (Wink, 1987; Wink, 1990; Banthorpe, 1996; Gershenzon y Kreis, 1999; Waller y col., 2001).

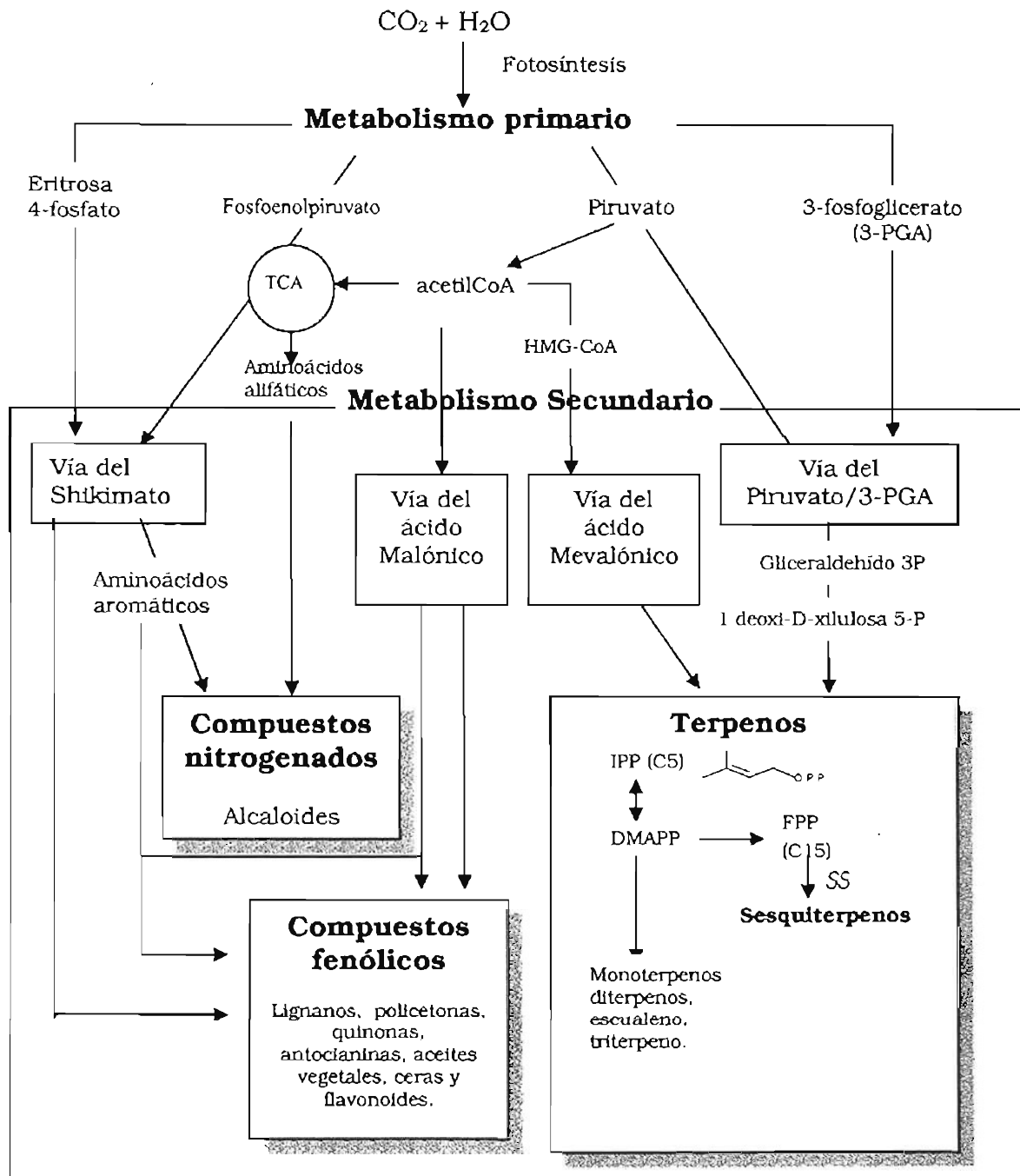


Figura 1. Diagrama modificado del origen biosintético de los principales metabolitos secundarios con interés comercial producidos por plantas (Talz y Zeiger, 2002).

1.1.1. Importancia de los metabolitos secundarios de plantas para la industria.

Los metabolitos secundarios de las plantas son fuente de consumo en la industria alimentaria, agrícola y farmacéutica con un costo por gramo superior a lo que se obtiene de los metabolitos primarios.

Debido a la complejidad estructural que tienen es posible utilizarlos como prototipos en la síntesis de nuevos fármacos con actividad biológica importante (Balandrín y col., 1985; Morris y col., 1985).

Entre los principales metabolitos secundarios de importancia farmacológica, se encuentran las quinonas con actividad anticancerígena, antibacterial, antiinflamatoria, antiparasitaria y cicatrizante. Las antocianinas con propiedades antioxidantes. Los lignanos como anticancerígenos y antiinflamatorios. Los flavonoides con propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antihepatotóxicas, antiulcerantes y antivirales. Los alcaloides con una diversidad de propiedades biológicas, como anticancerígenos y analgésicos. Así como los terpenos: mono, sesqui, di, triterpenos, esteroides y cardenólidos que representan el grupo más abundante en plantas con propiedades medicinales como antimicrobianas y antiinflamatorias (Harborne, 1991; Banthorpe, 1996; Bruneton, 1999).

1.1.2. Terpenos.

Los terpenos representan el grupo de compuestos más abundantes en las plantas con un número aproximado de 22,000 estructuras diferentes. Presentan un origen biosintético a partir de dos rutas independientes de la unidad precursora isopentenilpírofosfato (IPP): la vía del acetato/mevalonato y la vía del 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP), que es una ruta alternativa del piruvato (Manitto, 1981; Luckner, 1984; Rohmer y col., 1993; Eisenreich y col., 1996; Gershenzon y Kreis, 1999).

1.1.3. Biosíntesis de terpenos.

La biosíntesis de los diferentes terpenos sugiere que la vía del mevalonato, utiliza como sustrato tres moléculas de acetil coenzima A para formar el ácido mevalónico (AMV) mediante la acción de la enzima hidroxil-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa). La fosforilación del AMV por la enzima mevalonato quinasa da origen al isopentenilpirofosfato (IPP) (Figura 2).

La vía alterna del piruvato utiliza como sustrato moléculas de gliceraldehido 3-fosfato (GAP) y al piruvato para formar la 1-desoxi-D-xilulosa-5-P a partir de la actividad enzimática de la DOXP-sintasa, dando origen al IPP (Figura 3).

El IPP se isomeriza para formar el dimetilalilpirofosfato (DMAPP), intermediarios obligados en la síntesis de los diferentes terpenos. Una molécula de DMAPP puede condensarse y unirse cabeza-cola con el IPP por la acción de la enzima preniltransferasa. Esta unión produce el geranylpirofosfato (GPP) que da origen a compuestos monoterpénicos formados por dos unidades isoprenicas (Harborne, 1991; Banthorpe, 1996; Bruneton, 1999).

La unión de IPP al GPP por la enzima preniltransferasa da origen al farnesilpirofosfato (FPP) molécula precursora de los sesquiterpenos formados por tres unidades isoprenicas. Las polimerizaciones subsecuentes con este tipo de reacciones pueden repetirse una y otra vez para producir una serie de ésteres de pirofosfato o alcoholes alifáticos. Los ésteres libres de pirofosfatos formados a partir de reacciones enzimáticas se les denominan geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) y geranylarnesil pirofosfato (GFPP), estructuras que por su tamaño tienden a ciclarse.

Las moléculas de GGPP y GFPP dan origen a los diterpenos, formados por cuatro unidades isoprenicas. También hay estructuras más complejas formadas de 6, 8 o más unidades isoprenicas como los triterpenos, carotenos y politerpenos (Figura 4) (Harborne, 1991; Banthorpe, 1996; Dewick, 1998; Bruneton, 1999; Gershenzon y Kreis, 1999).

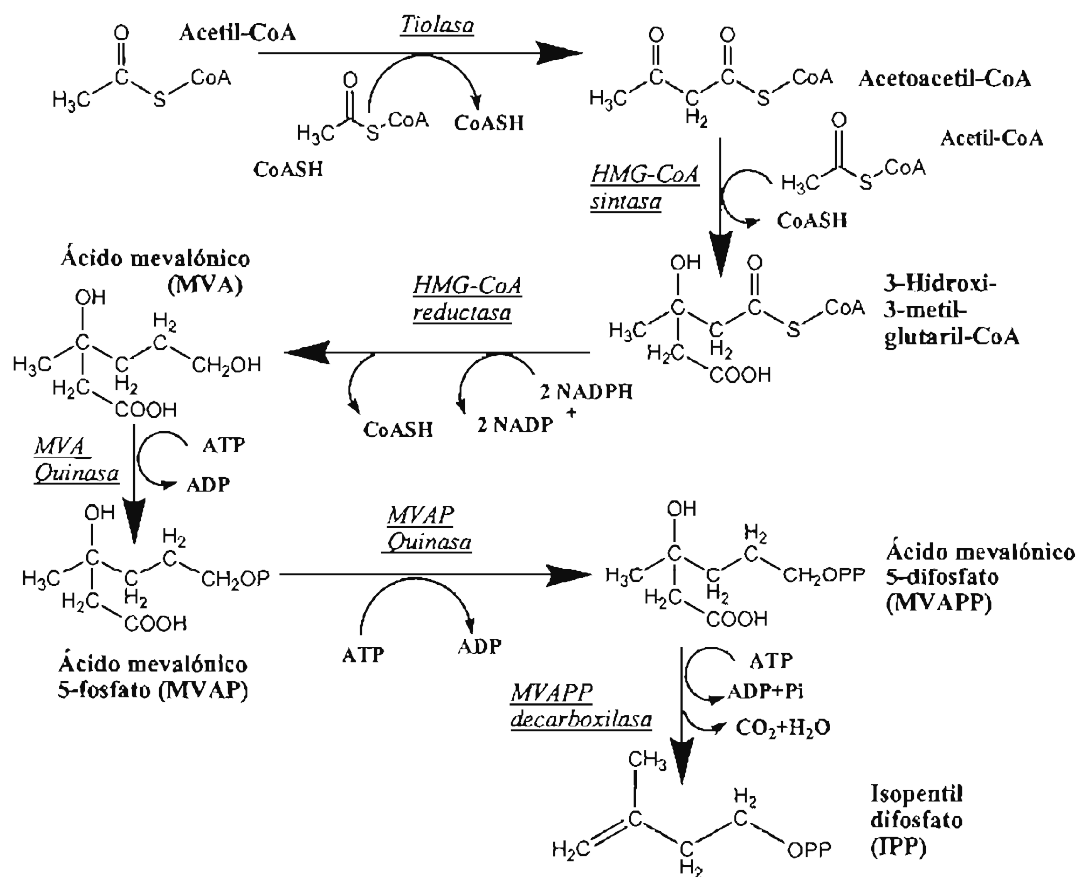


Figura 2. Ruta metabólica del acetato/mevalonato para la formación del isopentenildifosfato (IPP), unidad precursora básica formada de un compuesto isoprenico (C_5) de 5 carbonos, que origina los diferentes tipos de terpenos.

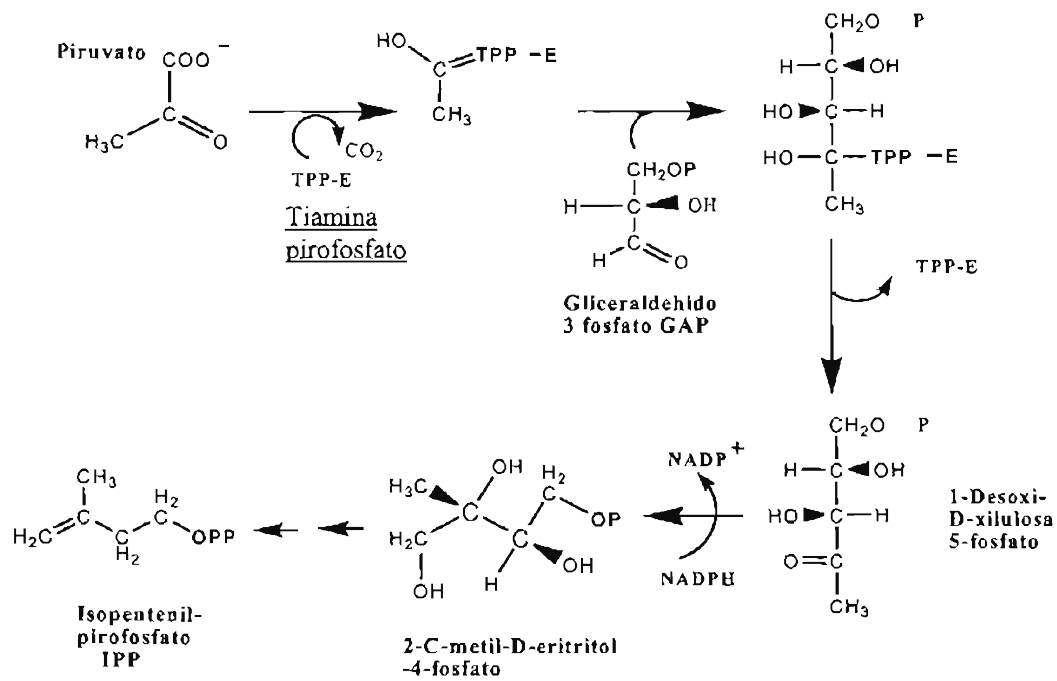


Figura 3. Ruta alterna del piruvato para la formación del IPP.

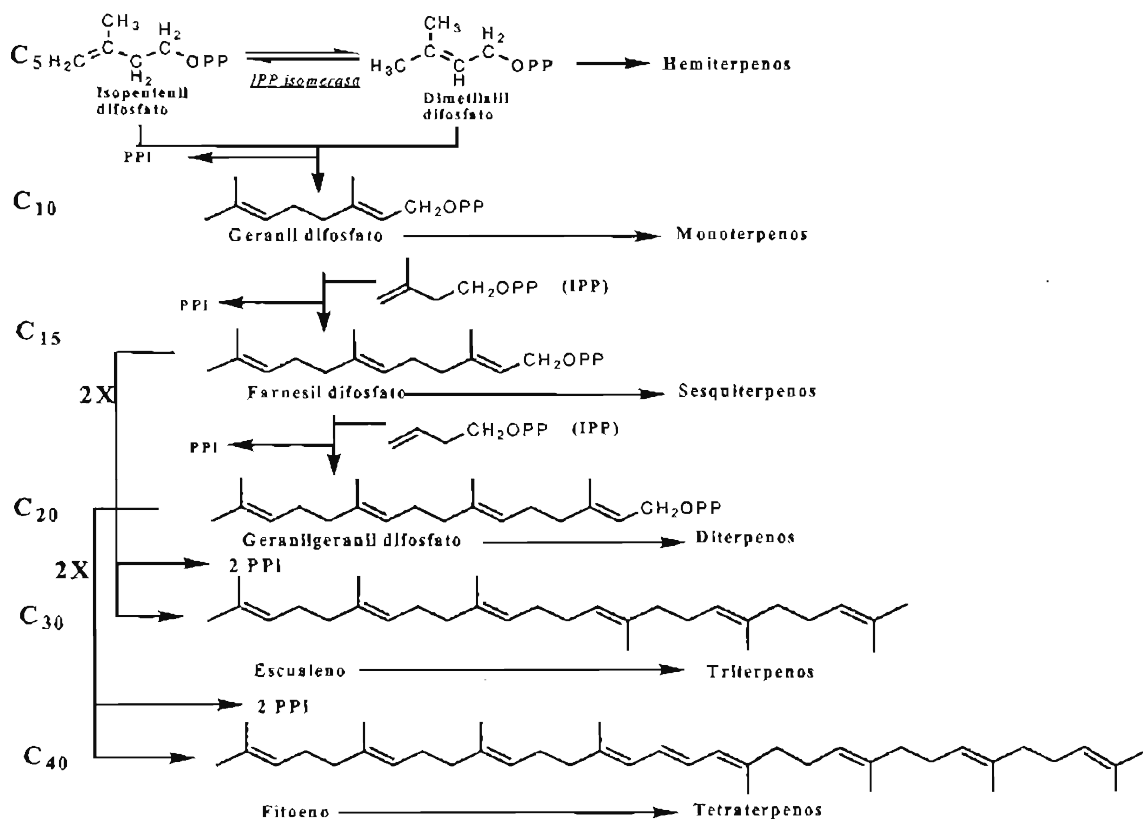


Figura 4. Clases de terpenos que son biosintetizados a partir de la unidad básica de isopentenil difosfato IPP.

1.1.4. Regulación espacial de la biosíntesis de terpenos.

Experimentos realizados para observar la regulación espacial de la biosíntesis de los terpenos con moléculas marcadas sugieren la posibilidad del intercambio de moléculas de IPP entre el citosol y los plastidios.

La ruta del acetato/mevalonato provee las enzimas necesarias para la biosíntesis de sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos en el citosol.

La ruta alterna del piruvato que da origen a los hemiterpenos volátiles, monoterpenos (borneol), diterpenos (taxol, ginkolido) plastoquinonas y carotenos (licopeno), se lleva a cabo en los diferentes plástidos como los cloroplastos, cromoplastos y leucoplastos (Figura 5) (Ramos-Valdivia y col., 1997; Lichtenthaler y col., 1997; Lichtenthaler, 1999). La explicación sobre el origen de la ruta alterna del piruvato, refiere que los cloroplastos que provienen de las cianobacterias conservaron la vía 1-desoxi-D-xilulosa-5-P de origen bacterial para la formación de IPP en la evolución de las células eucarióticas hospederas (Lichtenthaler, 1999).

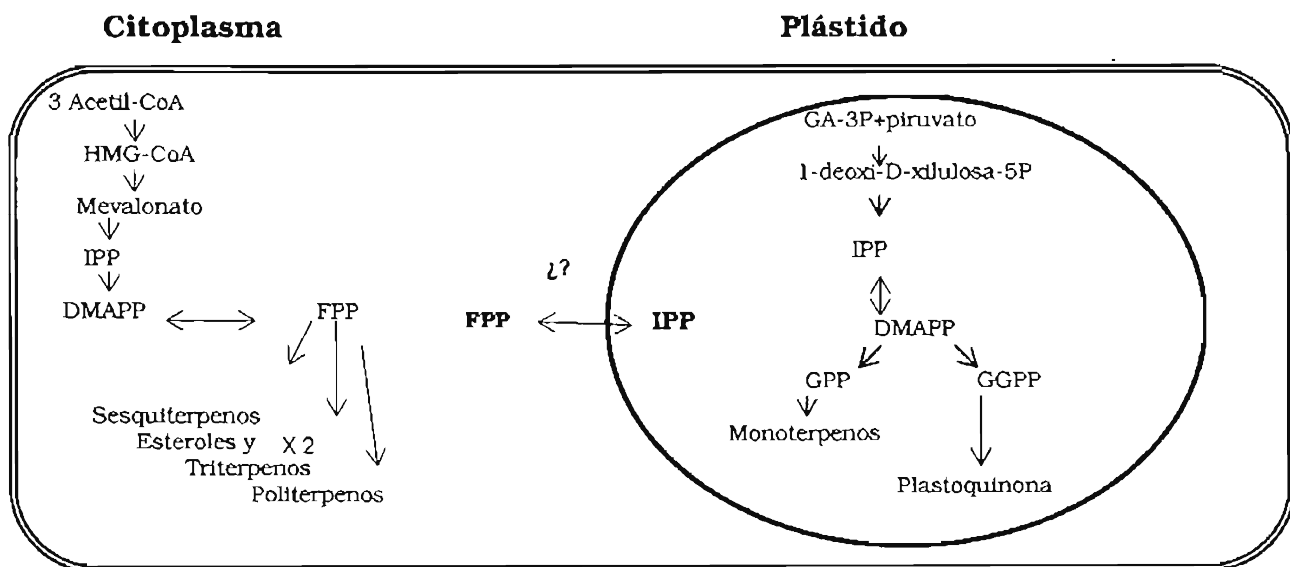


Figura 5. Regulación espacial sugerida en la biosíntesis de los terpenos en plantas superiores, entre el citosol (vía del acetato/mevalonato) y plástidos (vía alterna del piruvato).

1.1.5. Sesquiterpenos.

Los sesquiterpenos son compuestos derivados de los terpenos, tienen 15 átomos de carbono y comprenden más de 200 diferentes estructuras. Se clasifican de acuerdo con el tipo de núcleo y grupo funcional que presentan (Manitto, 1981).

Por ejemplo, los sesquiterpenos con el núcleo tipo furanoeremofilano presentan actividad hipoglucémica (Alarcón-Aguilar y col., 1997) y analgésica contra la migraña (Zhang y col., 1998). Los sesquiterpenos con el grupo funcional lactona poseen la mayor actividad farmacológica de interés como: antiinflamatorias (Abad y col., 1994), antioxidantes (Bork y col., 1997), antihistamínicas (Bruno y col., 1998), antimicrobianas (Tan y col., 1998), antibacterianas y antifúngicas (Bruneton, 1999).

Otro tipo de sesquiterpenos poseen actividad antiúlcera (Yoshikawa y col., 1993), antimalárica (Sy y Brown, 1999), antitumoral, antiviral, citotóxica, inmunosupresiva, fitotóxica, insecticida y hormonal (Cane, 1999).

Los sesquiterpenos capsidiol y risitina son fitoalexinas con actividad antimicrobiana, producidos por *Nicotiana tabacum* (planta del tabaco) (Heldt, 1997).

1.2. Producción de metabolitos secundarios mediante cultivo de tejidos vegetales.

Los metabolitos secundarios con propiedades medicinales conforman el grupo de compuestos más investigados en los últimos años, debido a los avances alcanzados para obtener e incrementar la producción de los diferentes metabolitos secundarios mediante las diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales (Zenk, 1991; Ravishankar y Rao, 2000).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales tienen sus bases en la propiedad de la totipotencialidad que caracteriza a las células y tejidos de las plantas. Este concepto fue propuesto en el año de 1838 por Schwann y Schleiden, que refiere la capacidad que posee cualquier célula y tejido vegetal de formar todos los tipos celulares y de expresar el total de su potencial genético en la síntesis de un producto a semejanza de la célula madre en condiciones de cultivo apropiadas, así como de generar en una planta completa (Funk y col., 1987; Lindsey y Jones, 1989; Pierik, 1997; Zhu y col., 2000).

1.2.1. Producción de metabolitos secundarios mediante cultivo de células en suspensión.

La técnica del cultivo de células en suspensión que se lleva a cabo de manera constante, ilimitada, uniforme y con posibilidad de escalar la biomasa a biorreactores, favorece la producción de diferentes tipos de fármacos en la industria farmacéutica (Tabla 1). También la técnica del cultivo de células en suspensión es reproducible y un medio efectivo para la incorporación de materiales precursores de las diferentes vías metabólicas que son difíciles de administrar en la planta completa (Lindsey y Jones, 1989; Gerats y col., 1991; Payne y col., 1992; Islam, 1996, Pedapudi y col., 2000). Sin embargo, en la práctica los resultados reportados del rendimiento en producción son contradictorios (Zhu y col., 2000), aún en investigaciones de la misma especie. Por ejemplo, con la planta *Catharanthus roseus* (Vinca) se presentó un porcentaje de acumulación diferente de serpentina en plantas hiperproductoras y en cultivo de callos (Mantell y Smith, 1983).

Tabla 1. Rendimiento obtenido de diferentes metabolitos secundarios con importancia farmacológica mediante el cultivo de células en suspensión (DiCosmo y Misawa, 1995).

Especie	Compuesto	Actividad biológica	Rendimiento	
			Cultivo <i>in vitro</i> (mgL ⁻¹ ; % en PS).	Planta completa (% en PS*).
<i>Catharanthus roseus</i>	Ajmalicina	Antihipertensivo	400 mgL ⁻¹	-
<i>Taxus brevifolia</i>	Taxol		9.89 mgL ⁻¹	-
<i>Taxus cuspidata</i>				
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Ajmalicina	Antiarrítmico	1600 mgL ⁻¹	0.3
<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotecina	Anticancerígena	0.00025 % PS	-
		Antihepatoma		
<i>Artemisia annua</i>	Artemisina	Antimalárico	-	-
<i>Coptis japonica</i>	Berberina	Antiinflamatorio	10% PS; 700 mgL ⁻¹	2-4
<i>Coleus forskohlii</i>	Forskolina	Cardiotónico	-	-
<i>Papaver somniferum</i>	Sanguinarina	Antimicrobiano	250 mgL ⁻¹	-
<i>Dioscorea deltoidea</i>	Diosgenina	Anticonceptivo	2.0% PS	2.0
<i>Panax ginseng</i>	Gingenosídeos	Inmunoestimulante	0.4% PS; 150 mgL ⁻¹	4.5
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Sikonina	Antibacterial, antiúlceras, antihemorroides	20% PS; 1400 mgL ⁻¹	1.5

*PS: peso seco.

1.2.2. Establecimiento y características de los cultivos de células en suspensión.

El cultivo de células en suspensión requiere establecer los cultivos de callo. El callo es una masa amorfa de agregados celulares en crecimiento continuo y acelerado, que se obtiene de diferentes tejidos diferenciados como el mesófilo de hoja, el tallo y la raíz, o bien de tejidos meristemáticos como el hipocótilo, cotiledón y yemas apicales o laterales.

El cultivo de callo se obtiene mediante un proceso de desdiferenciación de los diferentes tejidos vegetales en medios de cultivo apropiados, bajo condiciones

controladas y estrictas de asepsia nutricionales y ambientales, que tienen la ventaja de tener una proliferación continua al eliminar la incertidumbre de las condiciones naturales de los suelos, el clima y los problemas de contaminación por microorganismos (Vasil y col., 1994).

Los cultivos de células en suspensión se obtienen transfiriendo tejido de callo a medios nutritivos en agitadores orbitales a 90 y 115 rpm, lo cual favorece la dispersión y el crecimiento debido a un intercambio gaseoso por aireación del cultivo (Figura 6) (Fowler y Rayns, 1993).

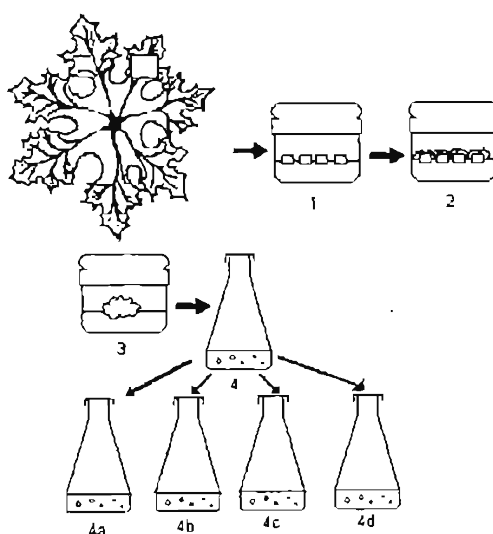


Figura 6. Representación esquemática del establecimiento de los cultivos de callo y de células en suspensión. Aislamiento del explante foliar, sobre un medio de cultivo sólido (1), proliferación (2) y subcultivo del cultivo de callo (3). Establecimiento de los cultivos de células en suspensión en matraces Erlenmeyer (4-4d).

En el cultivo de células en suspensión una vez que las células monodispersas se han establecido, se llevan a cabo ciclos de crecimiento celular característicos para cada especie con curvas de crecimiento sigmoideo, las cuales siguen el mismo comportamiento de las curvas de crecimiento bacteriano (Fowler y Rayns, 1993).

La etapa de inducción se inicia cuando las células se siembran en medios nuevos y presenta en un período muy corto de tiempo. Las células se preparan para entrar en mitosis activando toda la maquinaria energética y enzimática para la multiplicación celular. En la etapa de crecimiento celular exponencial la división celular se dispara en forma logarítmica y se incrementa la biomasa inicial, la cual se ve limitada generalmente hasta que se consumen uno o más de los nutrientes presentes en el medio. Finalmente, la etapa estacionaria se caracteriza porque disminuyen considerablemente las tasas de división celular y se presenta el agotamiento de los nutrientes con la subsecuente producción y acumulación de metabolitos secundarios (Figura 7) (Shuler y Kargi, 1992; Spencer y Rhodes, 1993).

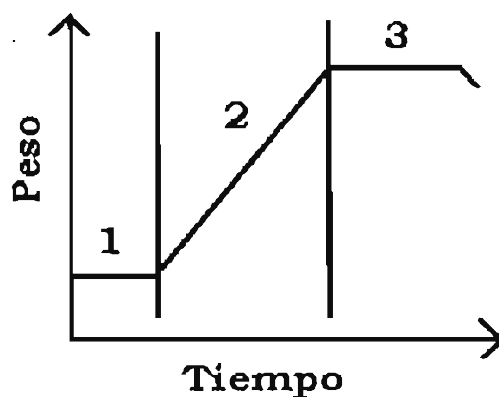


Figura 7. Crecimiento sigmoide de los cultivos de callo y de células en suspensión. Caracterizado por la etapa de inducción (1), exponencial (2) y estacionaria (3).

1.2.2.1. Ventajas y desventajas de los cultivos de células en suspensión, para la producción de metabolitos secundarios.

Las ventajas que presentan los cultivos de células en suspensión se manifiestan cuando se utilizan en conjunto con diversas estrategias biotecnológicas, incrementando la producción y la concentración de los metabolitos secundarios.

Las estrategias biotecnológicas utilizadas son: la selección de líneas hiperproductoras, el tipo de cultivo, la alteración del metabolismo celular por factores externos (Funk y col., 1987; Dörnenburg y Knorr, 1995), la incorporación de precursores de las vías metabólicas, la adición de elicitores (Dixon y col., 1995; Dörnenburg y Knorr, 1995; Ni y col., 1996; Bourgaud y col., 2001; Staniszewska y col., 2003), la inmovilización celular, la regulación enzimática, la incorporación de genes (Goddjin y Pen, 1995), el uso de agitadores orbitales y de biorreactores continuos y estáticos con diferentes formatos de proceso.

Las desventajas que presentan los cultivos de células en suspensión son la baja o nula producción de metabolitos secundarios, debido a factores como: el aumento en longitud y diámetro celular, la formación de agregados celulares, el crecimiento celular muy lento, la elevada sensibilidad del cultivo al estrés por agitación (Dörnenburg y Knorr, 1995), las diferentes velocidades del crecimiento celular y de la formación del producto, el aumento en la concentración de biomasa durante la fase de producción, las mutaciones que se acumulan a través de los subcultivos, los cambios celulares por condiciones fisiológicas (Funk y col., 1987), la separación del sitio de producción con el sitio de síntesis, la ausencia de estructuras diferenciadas y de tejidos específicos, los problemas en el escalamiento de los cultivos y en el tipo de elicitación empleada (Shuler y Hallsby, 1985; Shuler y Kargi, 1992; Scragg, 1994; Scragg, 1995, Rijhwani y Shanks, 1998).

1.2.3. Elicitación en los cultivos de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios.

La elicitación es la estrategia biotecnológica que favorece la producción (Fu y col., 1999) e incremento de metabolitos secundarios, mediante la adición de un agente de estrés a los cultivos de las células en suspensión (Linden y col., 2001; Qian y col., 2004).

El agente de estrés es denominado elicitador y puede ser biótico y abiótico. El elicitador abiótico es la temperatura, luz ultravioleta, sales inorgánicas, pH, y otros

(Bourgaud y col., 2001). El elicitor biótico es un conjunto de moléculas de origen biológico que induce la expresión de genes y la síntesis de compuestos secundarios, en respuesta al estímulo que se origina por la presencia del elicitor (Dörmenburg y Knorr, 1995; Prome, 1996; Dixon, 2001; Qian y col. 2004).

Por ejemplo, para la producción del compuesto antiinflamatorio sanguinario se utilizó la adición de la bacteria *Botrytis* a los cultivos de células en suspensión de la planta de amapola (*Papaver somniferum*) (Reil y Berger, 1996). La acumulación del compuesto aumentó cuando se utilizó además de la bacteria, la eliminación hormonal en los cultivos de células en suspensión de otra planta de amapola (*Papaver bracteatum*) (Fu y col., 1999).

La elicitación no sólo produce y/o aumenta determinados compuestos secundarios, en algunos casos promueve la producción *de novo*. Por ejemplo, la producción *de novo* de los sesquiterpenos lubimina y solavetivona, en los cultivos de raíces de *Hyoscyamus muticus* (Fu y col., 1999); la producción de un monoterpene antifúngico en los cultivos de células en suspensión de *Piqueria trinnervia* (Saad y col., 2000); así como la producción de la escopoletina que es un compuesto cumarínico con actividad antimutagénica en los cultivos de *Ammi majus L.* (árbol de amí) debido a la adición de la bacteria *Enterobacter sakasaki* (Staniszewska y col., 2003).

1.2.3.1. Características del elicitor biótico.

La mayoría de los elicitores bióticos son componentes de hongos y/o plantas con diferente naturaleza química, que se presentan en pequeños fragmentos como los homogenados fúngicos que son las preparaciones de micelio (Dixon, 1991; Ren y West, 1991). La razón por la cual se utilizan elicitores de hongos es porque son los principales parásitos de las plantas, las cuáles han desarrollado mecanismos complejos para detectar su presencia en sus tejidos (DiCosmo y Misawa, 1995; Fu y col., 1999).

Los elicitores con el más amplio espectro de acción y que están ampliamente distribuidos son los constituyentes de la pared celular de los hongos: quitina, quitosan y glucanos. Por eso cualquier tipo de hongo desencadenará la respuesta de estimulación. No obstante, si se trata de inducir una respuesta restringida a un grupo de hongos, entonces es necesario emplear especies asociadas con la planta (DiCosmo y Misawa, 1995).

La concentración del elicitor biótico es un factor que debe determinarse experimentalmente en cada caso y que influye sobre la intensidad de la respuesta (Barz y Mackenbrock, 1994). Usualmente se requieren entre 50 y 100 mg de micelio para matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo (Facchini y Chapell, 1992; Bohlmann y Eilert, 1994). Además de la concentración del elicitor se deben optimizar las condiciones de los cultivos al utilizar fitorreguladores, principalmente las auxinas que son reguladores del crecimiento y que tienen influencia en dicho proceso, así como la iluminación, pH y temperatura (Eilert, 1987; Dixon, 1991).

El tiempo ideal de tratamiento es un factor estratégico para optimizar los rendimientos del compuesto. El periodo mínimo de contacto para que la planta reconozca al elicitor es muy breve, de 2 a 20 minutos y el efecto que resulta es duradero (Kolattukudy y col., 1995). Después de que el sistema fue inducido, se observa un incremento de la actividad biosintética. La acumulación máxima del compuesto, ocurre entre las 12 horas y los cinco días de tratamiento y en general declina rápidamente después de haber alcanzado su valor más alto (Hahlbrock y col. 1995).

Generalmente, después de inducir un proceso de síntesis, los estímulos adicionales no incrementan la producción de metabolitos secundarios. En algunos casos, los mayores incrementos de producción se obtienen de líneas celulares con baja productividad inicial. En otros casos, los niveles de síntesis son similares en todas las líneas celulares al final del proceso de inducción. La cantidad máxima que un metabolito puede acumularse en las células, es

regulada por la etapa de crecimiento en la cual fue inducido (Eilert, 1987; Holden y Yeoman, 1994).

1.2.3.2. Aspectos bioquímicos del mecanismo de elicitación.

La elicitación de metabolitos secundarios en los cultivos de células vegetales en suspensión forma parte del proceso de defensa activa que se expresa durante la infección de la célula vegetal por un organismo patógeno.

El proceso de defensa activa se origina mediante el reconocimiento del elicitor proveniente del organismo patógeno, con un sitio específico de unión de origen proteico en la membrana plasmática vegetal. Este componente activado de la membrana plasmática de las células vegetales actúa como molécula sensitiva (receptor del elicitor) y regulatoria que estimula factores de transcripción y traducción que eventualmente llevan a la inducción de genes de resistencia vegetal (R) para la producción y acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) con la formación de compuestos secundarios como las fitoalexinas que tienen propiedades antimicrobianas (Eilert, 1987; Peters y Verma, 1990; Creelman y Mullet, 1995; Yang y col., 1997 y Hammond-Kosack y Jones, 2000; Hahlbrock y col., 2003), así como la formación de otros compuestos del metabolismo secundario (Sudha y Ravishankar, 2002).

Por ejemplo, en el cultivo de células en suspensión de la planta de perejil *Petroselinum crispum* al adicionar una fracción peptídica del hongo fitopatógeno *Phytophthora sojae* como elicitor. Se llevó a cabo el reconocimiento del elicitor, por un receptor de la membrana plasmática vegetal, que estimuló rápidamente la permeabilidad de la membrana al incrementar los flujos de entrada de los iones H^+ y Ca^{2+} y de los flujos de salida de los iones de K^+ y Cl^- . Este flujo de iones, activó al gen específico de la mitosis Map cinasa y la formación de especies reactivas del oxígeno (O_2^- , OH , H_2O_2), dependientes de la activación de la NADPH oxidasa (Dörnenburg y Knorr, 1995). También se llevó a cabo la fosforilación y desfosforilación proteica (Berglund y Ohlsson, 1995; Yang y col., 1997; Dangl, 1998; Delledonne y col., 1998) con la subsecuente activación de los genes y

proteínas relacionadas a la patogénesis originando la formación de fitoalexinas y compuestos de defensa (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

En algunos casos, se lleva a cabo la activación de moléculas mensajeras como el etileno que es requerido para mediar la resistencia contra hongos patógenos, y en combinación con el ácido salicílico, el cual se encuentra normalmente en las células en una forma inactiva de almacenamiento como ácido salicílico B-glucósido activan determinados genes que codifican para la enzima de la quitinasa hidrolizando la pared celular del fitopatógeno. En otros casos, es liberado el ácido linolénico en respuesta a la alteración de los canales iónicos de la membrana. Este ácido graso es el más abundante de la membrana vegetal y que una vez libre es convertido en ácido jasmónico por un proceso dependiente de una enzima lipooxigenasa (Bargabus y col., 2002), el cual induce los genes y proteínas relacionadas a la patogénesis (Figura 8) (Creelman y Mullet, 1995; Hammond-Kosack y Jones, 2000).

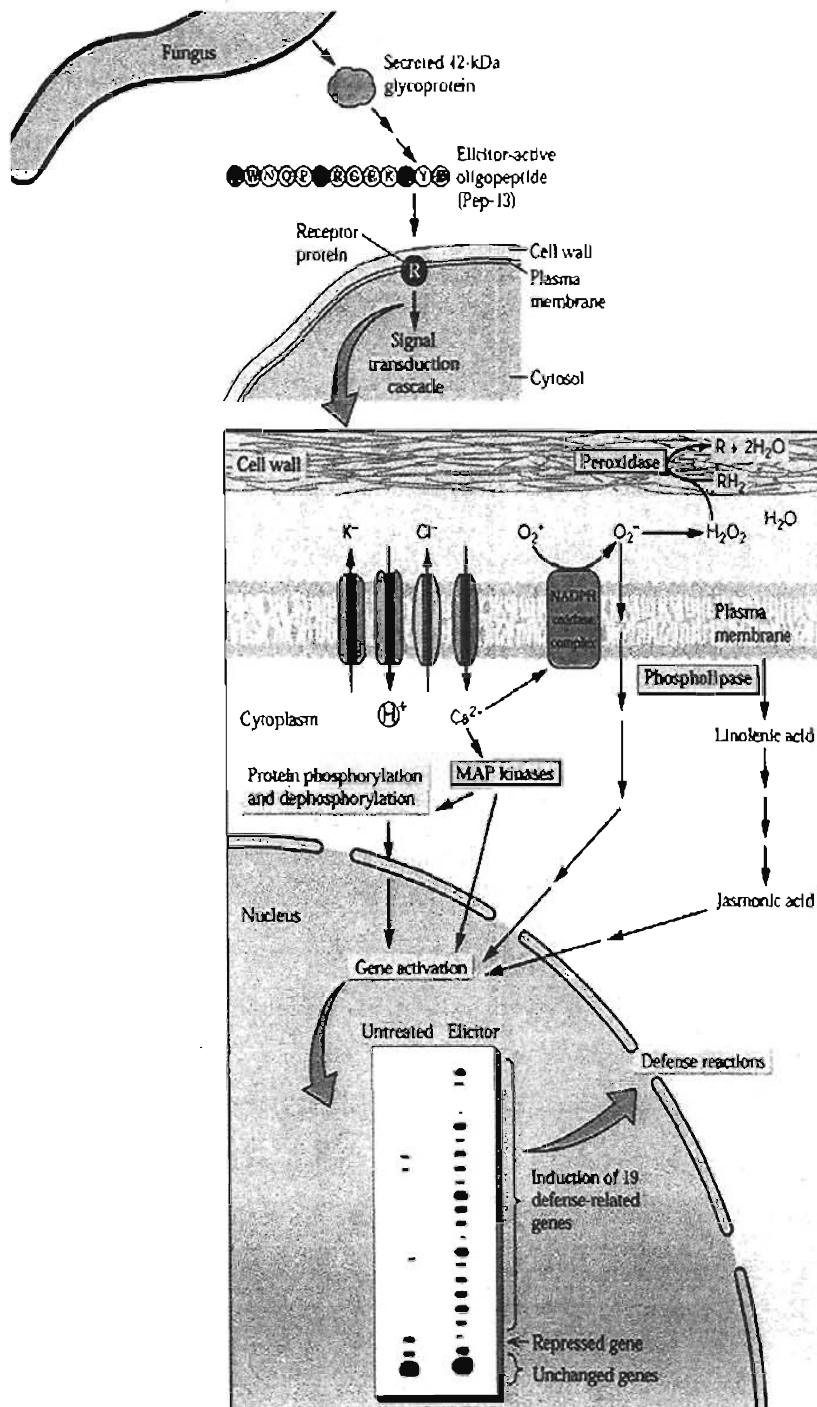


Figura 8. Modelo de activación de las diferentes respuestas de la defensa vegetal, en el cultivo de células en suspensión de la planta de perejil (*Petroselinum crispum*) (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

1.2.3.3. *Aspergillus niger* como elicitador biótico.

Aspergillus niger es un hongo filamentoso, patógeno de plantas y contaminante de alimentos, semillas y granos almacenados (Bennett, 1985). Es causante de la enfermedad de aspergilosis en el humano (Walsh y Pizzo, 1988).

Este hongo tiene la capacidad de asimilar como alimento una enorme variedad de sustancias, debido al gran número de enzimas que puede producir para degradarlas. Por esta razón es utilizado en diverso procesos industriales para la elaboración comercial de ácidos orgánicos como el ácido cítrico, oxálico, glucónico y gálico además de enzimas como la amilasa, invertasa, lipasa y renina (Herrera y Ulloa, 1998).

Aspergillus niger fue utilizado para el incremento del pigmento indirubina en los cultivos de células en suspensión de la planta de *Polygonum tinctorium* (Marero y col., 1997). También, para aumentar la concentración de los compuestos anticancerígenos, shikonina en los cultivos de células en suspensión de la planta de *Arnebia euchroma* (Fu y Lu, 1999) y de plumbagina en el cultivo de *Plumbago rosea* L. (Komaraiah y col., 2002). Además de emplearlo como biocatalizador en diferentes reacciones químicas con diferentes sustratos (Asakawa y col., 1991; Demyttenaere y Willemen, 1998; Kiran y col., 2004).

1.3. *Psacalium peltatum*.

1.3.1. Clasificación taxonómica de *Psacalium peltatum*.

Psacalium peltatum (H.B.K.) Cass. (Syn. *Senecio peltiferus* Hemsl.). Se clasifica en la familia Asteraceae, tribu Senecionenae. Sinonimia principal: *Senecio peltiferus* Hemsl.

La familia Asteraceae (Compuestas) es un grupo de plantas numerosas, con aproximadamente 1535 géneros y alrededor de 23,000 especies conocidas. Se estima que en México existen 2700 especies de compuestas, distribuidas en 323 géneros (Villaseñor, 1993). Para el género *Psacalium*, se calculan 36 especies nativas con 6 especies de distribución amplia, 25 de distribución regional, 8 de distribución local y 2 en peligro de extinción (Turner y Nelson, 1998). También hay 47 especies distribuidas desde el suroeste de los E. U. A. hasta Guatemala (Barkley y col., 1996).

1.3.2. Descripción taxonómica de *Psacalium peltatum*.

La descripción taxonómica refiere que *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. es una planta herbácea perenne, subescaposa, erecta de 0.3 a 1.3 m. de alto. Con rizoma grueso y raíces fasciculadas verticales.

Los tallos, hojas e inflorescencias son densamente pilosos con pelos multicelulares. El tallo principal es estriado-acanalado y meduloso, lanoso en la base cerca de la raíz. Tiene de 3 a 4 hojas basales en roseta, con pecíolos de 6 a 42 cm de largo. Las hojas son principalmente peltadas con láminas suborbiculares peltadas y palmatinervas, profundamente multilobadas, con 6 a 8 nervaduras principales, y de 7 a 9 lóbulos o dientes más pequeños. Las cabezuelas tienen 20 o más flores, sobre pedúnculos de 0.3 a 2 cm de largo, receptáculo plano y ligeramente alveolado. El color de las flores es crema a café, de 14 a 21 mm de largo (Figura 9) (Robinson y Brettell, 1973; Rzedowski y Rzedowski, 1985).

La localización que presenta la planta es variable y compleja, con variedades según el lugar donde se colecta. Crece en el campo asociada a vegetación perturbada de los bosques de encino y juníperos (Pippen, 1968).

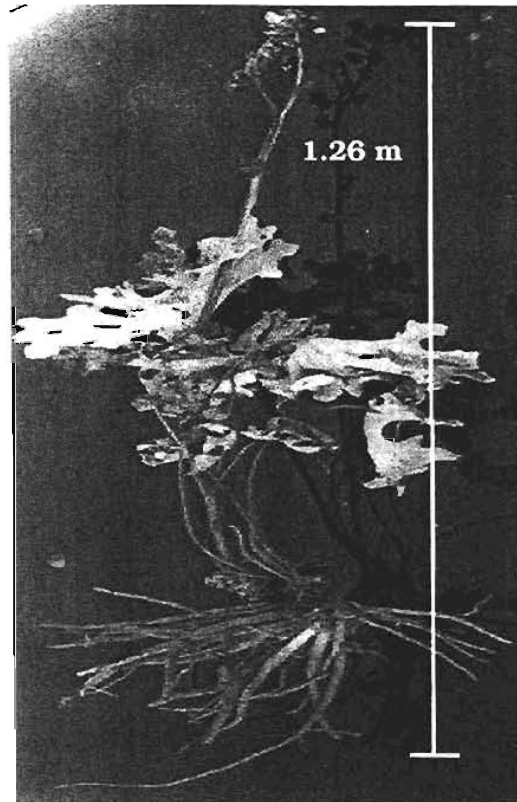


Figura 9. Ejemplar de *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. var. *peltatum*, colectada en el poblado de la Estanzuela, Hidalgo, México.

1.3.3. El complejo matarique.

El término “complejo” se atribuye al conjunto de plantas con nombres comunes órganos y usos similares, además con alguna semejanza anatómica y/o funcional. Por ejemplo las raíces del conjunto de plantas conocido como complejo matarique, está constituido por: *Psacalium peltatum*, *Psacalium palmeri*, *Psacalium sinuatum*, *Psacalium decompositum*, *Psacalium radulifolium* y *Acourtia thurberi*, especies que tienen rizomas, raíces y copetes pilosos de la base del tallo semejantes (Figura 10).

Las raíces del complejo matarique, se emplean en forma individual o con otras diferentes plantas como remedio para la diabetes, el reumatismo, enfermedades renales y gastrointestinales (Bye y col., 1995; Garduño-Ramírez y col., 2001).

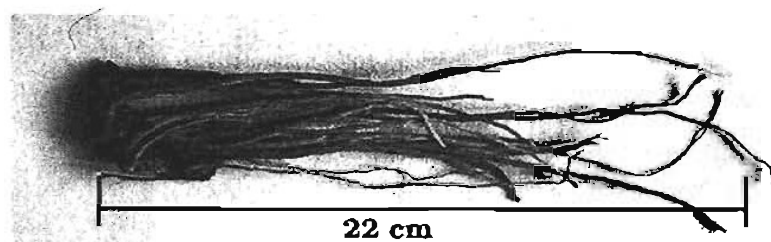


Figura 10. Aspecto del rizoma y raíces de *Psacalium peltatum*.

Debido al efecto hipoglucemiante de estas especies, se originó la sobreexplotación de algunas de ellas, particularmente de *Psacalium decompositum* considerada la planta más utilizada y costosa debido a su ubicuidad en Chihuahua (Inman y col., 1996; Alarcón-Aguilar y col., 1997). Sin embargo se incrementó el uso de *Psacalium peltatum* por su crecimiento cercano a los centros de comercialización y un costo más accesible (Alarcón-Aguilar y col., 1997).

1.3.4. Aspectos farmacológicos y compuestos químicos de *Psacalium decompositum* y *Psacalium peltatum*.

La mayoría de los aspectos farmacológicos y fitoquímicos que se conocen son de *Psacalium decompositum*. De esta especie se aislaron e identificaron diversos sesquiterpenos que pertenecen al grupo del furano naftaleno.

El cacalol (1) que tiene como esqueleto al furano tetrahidronaftaleno, la cacalona (2) con un grupo cetónico en el anillo alifático, el éter metílico del dehidrocacalol (3) con una doble ligadura en el anillo, la maturinina (4) totalmente aromática con un metilo, la maturina (5a) con un hidroximetilo, la maturinona (6) y maturona (7) con el anillo central que está en forma quinoidea (Figura 11) (Romo y Joseph-Nathan, 1964; Correa y Romo, 1966), así como otros compuestos como los alcaloides pirrolizidínicos (Kapadia y col., 1990).

considerados agentes hepatotóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (Bohlman y col., 1990; Plaa, 1991).

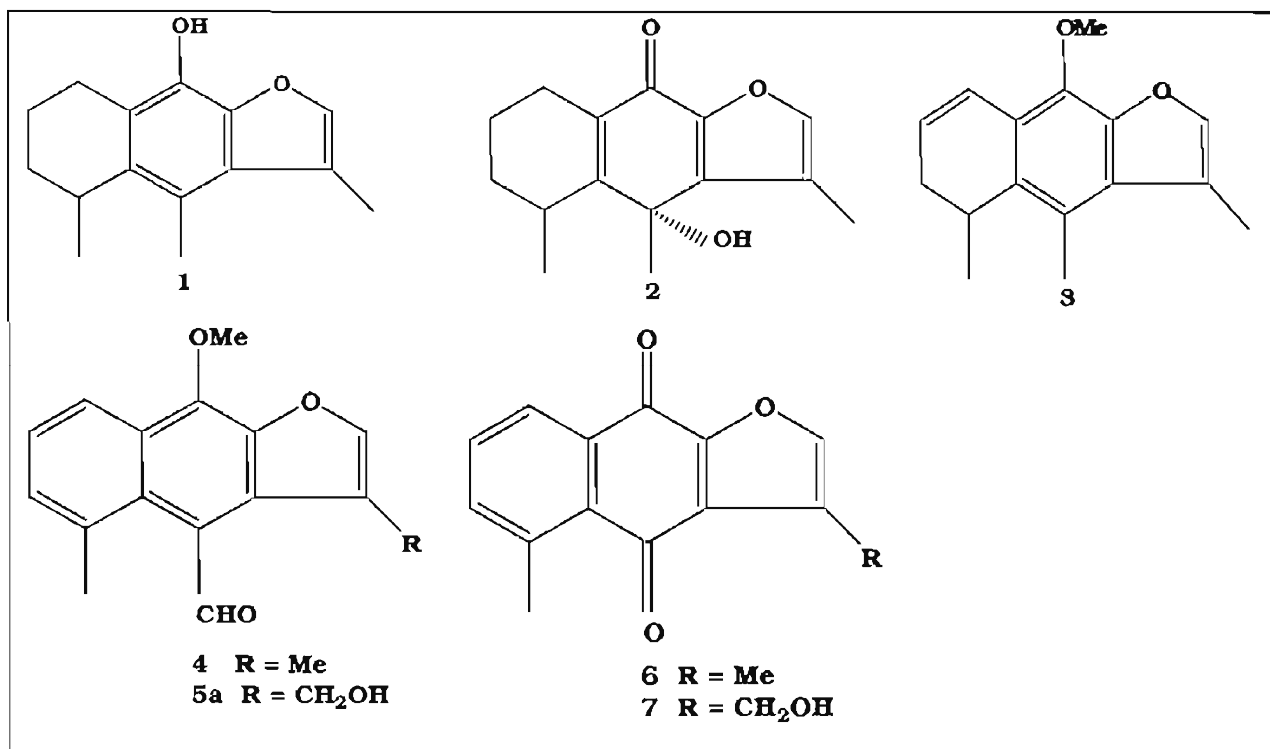


Figura 11. Principales metabolitos secundarios aislados de *Psacalium decompositum* (1-7) y de *Psacalium peltatum* (4-7).

El cacalol (1) es uno de los compuestos más estudiados porque presentó actividad antimicrobiana (Jiménez y col., 1992), inhibición de la germinación en la planta de *Amaranthus hypocondriacus* (Amaranthaceae) y de *Echinochloa crusgalli* (Poaceae), así como actividad contra algunos fitopatógenos (Anaya y col., 1996).

El estudio del efecto hipoglucemiante en ratones con la decocción de las raíces de *Psacalium decompositum*, *Psacalium peltatum* y *Acourtia thurberi*, demostró que no había relación con algunos de los compuestos mencionados (Alarcón-Aguilar, y col., 1997). Sin embargo, en ensayos de actividad antiinflamatoria con ratones se observó que el compuesto conocido como acetato

de maturina, aislado de *Psacalium peltatum* presentó actividad antiinflamatoria (Hernández-Tejeda, 1999).

En base a la importancia que tiene estos hallazgos, se planteó realizar el establecimiento de los cultivos de tejidos vegetales de *Psacalium peltatum* y evaluar la producción de sesquiterpenos mediante la adición de un elicitador, el homogenado fúngico de *Aspergillus niger*. La determinación y cuantificación de los compuestos presentes se realizó por medio de diferentes métodos cromatográficos y espectrométricos.

2. Justificación.

La investigación sobre los cultivos de tejidos vegetales de *Psacalium peltatum* será una contribución al conocimiento de los compuestos sesquiterpénicos que tiene la planta y a su producción mediante la adición de un elicitor, el homogenado fúngico de *Aspergillus niger*.

De la misma manera, la información obtenida, aportará evidencia científica necesaria en la medicina tradicional mexicana y contribuirá en las decisiones que se realicen para la conservación del recurso natural.

3. Hipótesis

La elicitación es una de las diferentes estrategias biotecnológicas que se utilizan para la producción de metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro* de plantas que son fuente de consumo y que se emplean como materia prima en diferentes industrias, como la industria farmacéutica. El mecanismo bioquímico de elicitación se establece mediante la interacción de los elicitores con receptores de la membrana plasmática que inducen la expresión de genes y la síntesis de compuestos secundarios en la planta en respuesta a su presencia. De esta manera, se plantea que la formación y acumulación de sesquiterpenos en los cultivos de células en suspensión de *Psacalium peltatum* aumentará debido a la adición del elicitor, el homogenado fúngico de *Aspergillus niger*.

4. Objetivo general.

Obtener cultivos de células en suspensión de *Psacalium peltatum* y analizar en ellos la producción de sesquiterpenos después de la adición del homogenado fúngico de *Aspergillus niger*.

4.1 Objetivos particulares.

1. Aislar, purificar e identificar los compuestos sesquiterpénicos de las raíces de *Psacalium peltatum*, mediante espectrometría de masas, métodos espectroscópicos (RMN, IR, UV) y propiedades físicas (punto de fusión y Rf), para ser utilizados como patrones de referencia.
2. Obtener los cultivos de callo y de células en suspensión de *Psacalium peltatum*.
3. Evaluar el crecimiento celular a través de la cinética de crecimiento y la inducción de sesquiterpenos por el homogenado fúngico de *Aspergillus niger* utilizando la cromatografía líquida de alta resolución en los cultivos de células en suspensión de *Psacalium peltatum*.
4. Comparar la producción de los sesquiterpenos de las raíces de la planta silvestre de *Psacalium peltatum* en los cultivos de callo y de células en suspensión.

5. Materiales y métodos.

Para el cumplimiento de los objetivos planteados la parte experimental se llevó a cabo en dos etapas. El estudio fitoquímico y el cultivo de tejidos vegetales. En cada etapa se llevaron a cabo procedimientos distintos (Figura 12).

RUTA EXPERIMENTAL

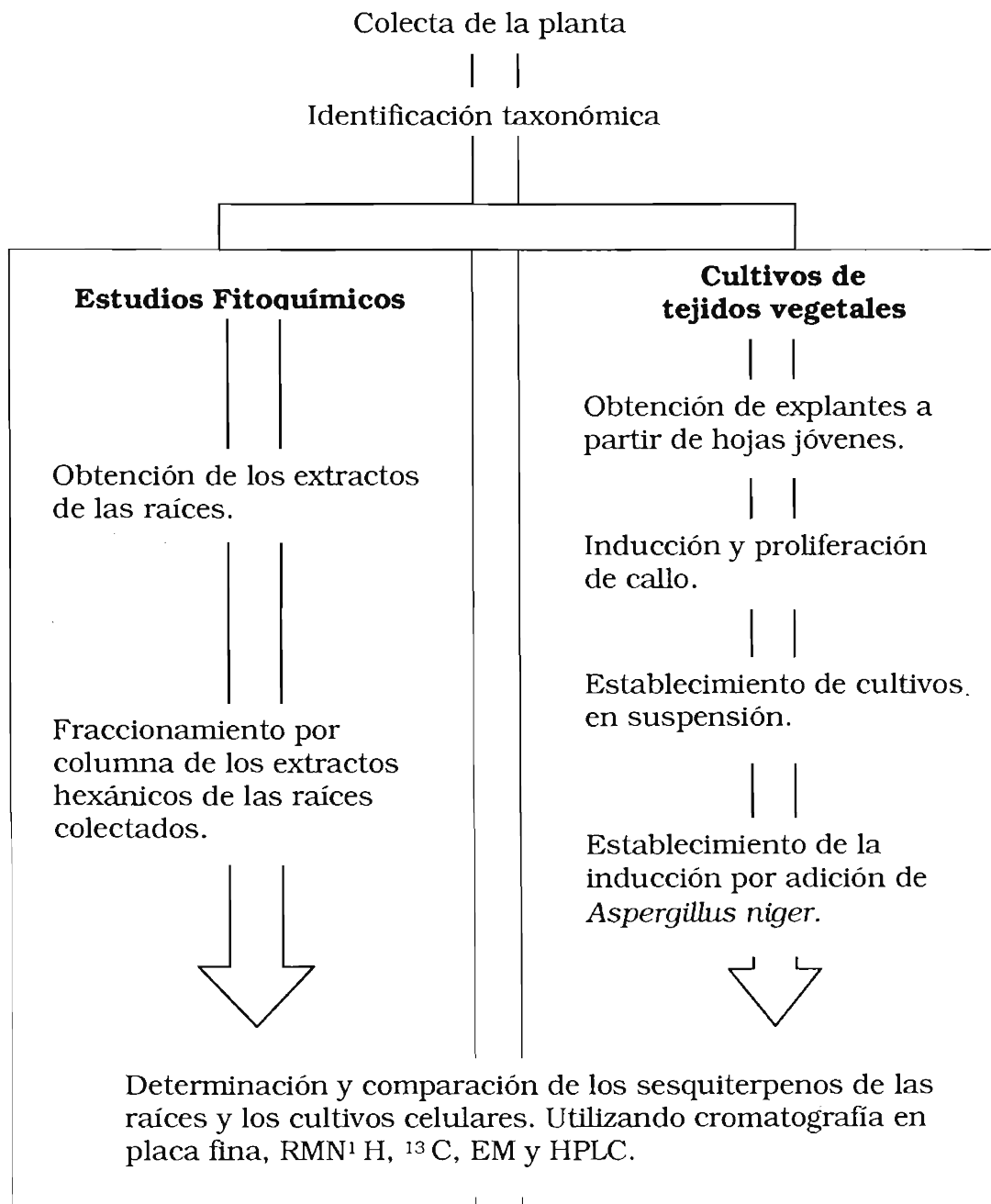


Figura 12. Representación diagramática de la ruta experimental para la inducción de sesquiterpenos en los cultivos *in vitro* de *Psacaliium peltatum* por homogenado de *Aspergillus niger*.

5.1. Colecta e identificación taxonómica del material biológico.

Organismos completos y raíces de *Psacalium peltatum* fueron colectados en junio y noviembre del 2001 en la comunidad de la Estanzuela del Municipio de Mineral del Chico, Hidalgo, México. La identificación taxonómica de la especie y de la vegetación asociada fue realizada por la técnica académica del Herbario Nacional, Gilda Ortiz Calderón. Un ejemplar de *Psacalium peltatum* var. *peltatum*, fue depositado en el Herbario MEXU del Instituto de Biología con número de registro 1138692.

5.2. Estudios fitoquímicos.

Fue necesario purificar e identificar los compuestos sesquiterpénicos mayoritarios de las raíces de la planta, los cuales fueron utilizados como patrones de referencia en los métodos analíticos. A continuación se menciona, la preparación del extracto y el procedimiento cromatográfico optimizado.

5.2.1. Extracción y fraccionamiento preliminar.

Las 1765 raíces de *Psacalium peltatum* obtenidas de las dos colectas con un peso fresco de 6.324 Kg se secaron a temperatura ambiente durante una semana, obteniendo un peso seco de 4.381 Kg. Entonces las raíces se cortaron en fracciones pequeñas de 1.5 cm de largo y se colocaron en un recipiente de vidrio de 4.5 litros de capacidad, añadiendo hexano hasta cubrir el total de raíces, realizando recambios de disolvente cada 24 horas durante 5 días. El extracto obtenido de cada recambio fue llevado a sequedad con presión reducida y a temperatura máxima de 60°C en un rotaevaporador.

El total del extracto hexánico de raíz obtenido fue de 15.69 g. Se fraccionaron 6 g del extracto hexánico, mediante cromatografía en columna abierta con gel de sílice como adsorbente (90 g de sílica gel G60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm); el proceso de elusión se llevó a cabo con un gradiente de

polaridad creciente con hexano, hexano: acetato de etilo y metanol en diferentes proporciones.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina de sílica gel, impregnadas con un indicador de fluorescencia 60 GF₂₅₄ Alugram. Los compuestos fueron visualizados por luz UV, revelados con una solución de sulfato cérico Ce (SO₄)₂ disuelto en ácido sulfúrico (H₂SO₄) y hielo picado. Para el desarrollo del color fue necesario calentar por 2 minutos aproximadamente a 110°C. Cuando se utilizó el sistema de elusión hexano: acetato de etilo (98:2), se combinaron aquellas fracciones que resultaron semejantes. También, se evaluó el comportamiento y purificación de los compuestos obtenidos del fraccionamiento por columna abierta, con fraccionamientos mediante cromatografía en placa preparativa con gel de sílice como adsorbente.

5.2.2. Caracterización espectroscópica, espectrométrica, punto de fusión y R_f de los compuestos obtenidos.

Los compuestos que se obtuvieron del extracto hexánico de raíz de *Psacalium peltatum* se enviaron para su análisis a los laboratorios de Resonancia Magnética, Espectrometría de Masas e Infrarrojo del Instituto de Química, UNAM.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN de ¹H) se realizaron por medio de espectrómetros analíticos Varian Gemini 200 (200 MHz), Varian UNITY-300 (300 MHz) y Varian Unity-500 (500 MHz), los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN de ¹³C) se realizaron por medio de espectrómetros analíticos de 125 MHz y HMBC (9MHz) en solución de cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros de Infrarrojo (IR), se determinaron en un espectro Nicolet Magna FT-IR SX en solución de cloroformo.

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher Scientific empleando cubreobjetos redondos, el valor se reportó en °C.

5.3. Cultivos de tejidos vegetales.

Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de sesquiterpenos en los cultivos celulares, fue necesario establecer los cultivos de callo a partir de los explantes de hoja y los cultivos celulares con la adición del elicitador fúngico. A continuación se mencionan la preparación de los medios de cultivo, la obtención de los explantes y los diferentes cultivos de tejidos vegetales.

5.3.1. Preparación de los diferentes medios de cultivo.

Los medios de cultivo de inducción de callo (MSC1), proliferación de callo (MSC2), incremento de biomasa en células en suspensión (MSB) y de producción de metabolitos secundarios (B5) se prepararon en base de los componentes de los medios de cultivo de Murashige y Skoog, 1962 (MS), y Gamborg, 1968 (B5), a través de soluciones concentradas 100 X (Tabla 2).

Tabla 2. Formulación de los medios de cultivo base de Murashige y Skoog, 1962 (MS), y Gamborg, 1968 (B5).

Compuesto	PM (g)	MS mgL ⁻¹ (mM)	B5 mgL ⁻¹ (mM)
Sol. I			
NH ₄ NO ₃	80.04	1650 (20.61)	-
KNO ₃	101.11	1900 (18.8)	2500 (24.8)
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.14	-	134 (1.0)
Sol. II			
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	370 (1.50)	250 (1.0)
MnSO ₄ .H ₂ O	169.00	16.9 (0.1)	10.0 (59)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	8.6 (0.030)	2.0 (7)
CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	0.025 (0.0001)	0.025 (0.0001)
Sol. III			
CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	440 (3)	150 (1.0)
KI	166.01	0.83 (0.005)	0.75 (5)
CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	0.025 (0.0001)	0.025 (0.0001)
Sol. IV			
KH ₂ PO ₄	136.09	170 (1.25)	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	138	-	130.5 (0.9)
H ₃ BO ₃	61.83	6.2 (0.100)	3.0 (49)
NaMoO ₄ .2H ₂ O	241.9	0.25 (0.001)	0.25 (0.001)
Sol. V			
FeSO ₄ .7H ₂ O	278	27.8 (0.1)	27.8 (0.1)
EDTA.2H ₂ O	372.2	37.3 (0.1)	37.3 (0.1)
Fuente de carbono:			
Sacarosa	342.31	30,000 (87.63)	30,000 (87.63)

*PM: peso molecular; mM: milimolar.

Todos los medios de cultivo fueron complementados con 30 gL⁻¹ de sacarosa, en cada cultivo se especifican las variaciones probadas así como las distintas concentraciones de vitaminas y reguladores de crecimiento (anexo 1.a y 1.b). Además, los medios se ajustaron a pH 5.7 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N y ácido clorhídrico (HCl) 1 N.

Los medios de cultivo de inducción (MSC1) y proliferación de callo (MSC2), se vaciaron a frascos de 15 y 25 mL de capacidad con gellan como agente gelificante al 0.25%. Para el cultivo de las células en suspensión se utilizaron matraces de 125 mL con 60 mL de medio de cultivo líquido MSB o B5.

Los medios de cultivo sólidos y líquidos se esterilizaron a 1.2 mm Hg/cm² de presión a una temperatura de 121° C durante 18 minutos.

El proceso de esterilización, así como de siembra de los callos y suspensiones se llevó a cabo en condiciones de asepsia total en una campana de flujo laminar.

5.3.2. Obtención y desinfección de los explantes.

Se colectaron 4 plantas silvestres de *Psacalium peltatum* y se transplantaron en macetas, con el fin de conservarlas y aclimatarlas en el invernadero del Conjunto E de la Facultad de Química.

Las plantas se fertilizaron cada 15 días durante 1 mes con una solución que contenía la mitad de la concentración de los componentes del medio MS, sin vitaminas y sacarosa, para la obtención de abundantes hojas.

Las hojas jóvenes que se obtuvieron de las plantas en maceta se colectaron en forma aleatoria. Se esterilizaron superficialmente mediante el siguiente procedimiento: lavado con agua jabonosa por 10 minutos, seguido de etanol al 70% por 1 minuto, posteriormente se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio comercial con el 6% de ingrediente activo al 10 % (v/v) por 7 minutos, con

agitación constante. Al término de este tiempo se removió la solución y se enjuagó exhaustivamente con abundante agua destilada estéril en condiciones de esterilidad. Para evitar la oxidación de las hojas se sumergieron en una solución al 0.1% de ácido ascórbico.

A cada lamina foliar se le realizaron cortes de 1 cm² en la parte central, cerca de las nervaduras principales. De 4 a 5 explantes obtenidos se depositaron en los frascos con medio de cultivo.

5.3.3. Cultivos de callo.

Los cultivos de callo fueron establecidos a partir de los explantes de hoja con 2 diferentes medios de cultivo: MSC1 y MSC2.

El medio de cultivo MSC2, a diferencia del medio de cultivo MSC1, estuvo modificado en relación a la concentración de las sales inorgánicas de la solución I de nitratos del medio MS (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de la solución I de nitratos/amonio para los medios de inducción (MSC1) y proliferación (MSC2) de callo en mgL⁻¹.

Solución I Compuesto	Medios de cultivo (mgL ⁻¹)		
	MS	MSC1	MSC2
NH ₄ NO ₃	1650.0	1650.0	825.0
KNO ₃	1900.0	1900.0	950.0

Ambos medios de cultivo estuvieron complementados con 2 mgL⁻¹ de 2,4 D, 0.3 mgL⁻¹ de BAP, 10 mL⁻¹ del cóctel de vitaminas (C20), 10 mgL⁻¹ de sulfato de adenina y 0.1 gL⁻¹ de ácido ascórbico como antioxidante (Anexo 1.a).

Los cultivos se incubaron bajo condiciones de obscuridad a una temperatura de 25 ± 2°C. El subcultivo se realizó a la tercera semana eliminando el tejido oxidado y evitando la deshidratación del medio de cultivo.

El crecimiento del callo se evaluó en los medios MSC1 y MSC2 con el peso seco después de 6 subcultivos, con 4 repeticiones por tratamiento, calculándose el promedio de las repeticiones, la desviación y error estándar, además del análisis de varianza, considerando la probabilidad de $p < 0.01$ como significativa.

El peso fresco y seco se inició al tiempo cero con la inoculación de 1 g de material vegetal de callo en 25 mL de medio, la respuesta se evaluó cada tercer día durante 25 días.

El peso fresco se determinó separando el callo del medio de cultivo, pesándolo en una balanza analítica en cajas Petri estériles en condiciones asépticas. El peso seco se determinó, después del secado del callo, en charolas de papel aluminio previamente pesadas, colocadas en el interior del cuarto de incubación con temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Con base en el peso fresco y seco se calculó el porcentaje de acumulación de líquido intracelular (L.I. %) mediante la diferencia de los valores del peso fresco y seco, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{L.I. \%} = 100 - (\text{peso seco} \times 100) / \text{peso fresco}.$$

En relación al peso seco se calcularon los siguientes parámetros de crecimiento: biomasa máxima, velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación.

La velocidad específica de crecimiento (μ), fue calculada mediante el modelo matemático de Monod cuya ecuación es: $\mu x = dx/dt$.

Donde dx es el incremento del número celular, dt es el incremento por unidad de tiempo y x es el número celular en el tiempo 0.

El valor de la velocidad específica de crecimiento se obtuvo al graficar el logaritmo natural de x contra el tiempo (correspondiente a la fase de crecimiento

exponencial) y por análisis de regresión, se obtuvo una línea recta, cuya pendiente se determinó como la velocidad específica de crecimiento. Este valor indicó la velocidad del incremento de la biomasa de la población celular por unidad de masa celular y se expresó en días⁻¹.

El tiempo de duplicación (td) fue calculado con el valor de μ . En base a la siguiente ecuación: $td = \ln 2 = 0.693/\mu$. Donde 0.693 es el logaritmo natural de 2. El tiempo de duplicación indicó el tiempo que tarda la masa celular en completar un ciclo de división celular completo.

5.3.4. Establecimiento de los cultivos de células en suspensión.

Los cultivos de células en suspensión de *Psacalium peltatum* se establecieron a partir de la transferencia de 4 g en peso fresco de callo a matraces Erlenmeyer de 125 mL con 60 mL de medio de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados fueron el medio MSC1, MSC2 y MSB. En diferentes intervalos de tiempo. El MSC1 a 7 días, el MSC2 a 12 días y el MSB a 12 y 23 días.

El medio de cultivo para incremento de biomasa (MSB) fue semejante al medio MSC2 en relación a la concentración de las sales inorgánicas de la solución I de nitratos sales inorgánicas. Además estuvo adicionado con 10 mL⁻¹ de cóctel de vitaminas R2, 1 mgL⁻¹ de AIA y 0.3 mgL⁻¹ de BAP a pH de 5.7 (Anexo 1.b).

Los matraces se mantuvieron en agitación de 120 rpm, en el cuarto de cultivo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, en la oscuridad.

Las variables fueron medidas con 2 repeticiones cada 72 horas durante 15 días, después de los siete primeros días de crecimiento en que se logró obtener cultivos homogéneos, se inició la determinación de la cinética de crecimiento.

La cinética de crecimiento se determinó con una alícuota de 1.5 mL por matraz, la cual se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min en una microcentrífuga (Eppendorf). Posteriormente el paquete celular obtenido se lavó con agua estéril y agitación constante para centrifugarse nuevamente y finalmente se colocó en papel filtro Wattman No.1, pesado previamente y por diferencia de peso se determinó el peso fresco.

Para el peso seco el papel filtro con el paquete celular, se colocó en el interior del cuarto de incubación a temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$; una vez seco se obtuvo el peso por diferencia de peso del papel filtro.

Los parámetros de crecimiento que se calcularon con base en el peso seco, fueron la biomasa máxima, la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación como en el cultivo de callos.

5.3.5. Elicitación de sesquiterpenos.

Para la elicitación de sesquiterpenos y como proceso de optimización se estableció la utilización del medio de cultivo B5, además de los medios de cultivo MSC2 y MSB. En diferentes intervalos de tiempo. El MSC2 a 5 y 14 días, el MSB y B5 a 14 días. Después del subcultivo a los 7 días con el medio MSB.

El medio de cultivo B5 estuvo complementado con 10 mL^{-1} de cóctel de vitaminas R2, 1 mgL^{-1} de 2,4 D, 0.5 mgL^{-1} de AIA, 0.5 mgL^{-1} de ANA, 0.3 mgL^{-1} de BAP a pH de 5.7 (Anexo 1.b).

El empleo de *Aspergillus niger* como elicitor se hizo por la facilidad que tiene este organismo de presentarse en cualquier ambiente, no requerir condiciones especiales para su crecimiento y cultivo, además que es utilizado como referencia en este tipo de ensayos (Godoy-Hernández y col., 1991; Fu y Lu, 1999; Zhao y col., 2000; Zhao y col., 2001).

La cepa axénica del hongo fue proporcionada por personal del Laboratorio de Micotoxinas del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. La forma en que se utilizó la cepa axénica de *Aspergillus niger* fue por medio del homogenado del micelio crudo del hongo, que se preparó en base al método descrito por Hahn y col., (1992) modificado de la siguiente manera:

La cepa axénica de *Aspergillus niger* se regeneró utilizando cultivos sólidos de medio Czapeck a 24°C durante 15 días. Posteriormente a los cultivos sólidos se les agregó agua estéril para disgregar las colonias esporuladas e inocular con 5 mL matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio líquido Czapeck a 24°C y en agitación constante. De esta manera se obtuvieron cultivos sumergidos en forma de pequeños agregados durante 7 días.

Los agregados celulares obtenidos se filtraron, se lavaron 3 veces con agua estéril y una solución 0.5 M de NaCl (29g L^{-1}). El micelio obtenido fue molido en proporción de 5 volúmenes (g de micelio/mL) con la solución de NaCl en un extractor de alimentos comercial. Después se colectó el homogenizado y se repitió la homogenización con una solución de 20 mM de Tris-HCl, pH 7.5, y 50 mM EDTA, exhaustivamente hasta examinar por microscopía en campo claro la hifa sin contenido celular. Enseguida se agitó el micelio por 3 horas con solución amortiguadora de Tris-EDTA en proporción de 15 volúmenes (g micelio/mL), después se colectó a través de un filtro Whatman No. 1 colocado sobre un embudo Buckner de porcelana y se aplicó una ligera succión para remover el exceso de solución amortiguadora.

En seguida se realizaron lavados continuos con 10 volúmenes de agua destilada fría, 5 volúmenes de acetona-metanol (1:1 v/v) y 5 volúmenes de acetona. El micelio se resuspendió en agua (1 ml/g de micelio), se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 min en una microcentrifuga (Eppendorf), se separó el sobrenadante y se peso 30 mg de homogenado en peso fresco por tubo de 1.5 mL, adicionando 0.5 mL de agua y se esterilizó durante 30 min en autoclave a 1.5 kg/cm² de presión.

El homogenado obtenido se adicionó a cada uno de los matraces con células en suspensión, en función a la cantidad de células (biomasa) por Kg de peso fresco, según lo establecido por Funk y col., 1987.

El análisis de la inducción e incremento de sesquiterpenos por la adición del homogenado de *Aspergillus niger* se realizó con 4 repeticiones, durante 5 y 14 días.

5.3.6. Determinación y cuantificación de sesquiterpenos en el paquete celular.

La determinación y cuantificación de sesquiterpenos del paquete celular de los diferentes cultivos con la adición del homogenado fúngico de *Aspergillus niger* fueron evaluada por cromatografía en capa fina y por cromatografía líquida de alta eficiencia.

La masa celular fue centrifugada a 3,000 rpm durante 15 min, el paquete celular obtenido fue lavado exhaustivamente con agua destilada y filtrado a través de un filtro Whatman No.1 colocado sobre un embudo Buckner de porcelana para aplicar una ligera succión y remover el exceso de agua destilada.

Para el análisis cromatográfico el paquete celular seco se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, extrayendo exhaustivamente con 50 mL de una mezcla de disolventes de acetato de etilo: cloruro de metileno: metanol (50:30:20) por maceración durante 24 h. Enseguida el extracto orgánico obtenido de la mezcla de disolventes se concentró mediante presión reducida a temperatura de 62°C, con un rotoevaporador.

Una muestra del extracto orgánico fue evaluado siguiente el mismo procedimiento que los compuestos que se utilizaron como patrones de referencia, de las raíces de las plantas *in vivo*.

Para la determinación y cuantificación por HPLC se utilizó una columna C18 en DP4K (15 x 4.6 mm, 5 μ m) con un sistema isocrático de acetonitrilo - agua (65:35), con un flujo de 1 mL/min, a temperatura ambiente y empleando el detector de índice de refracción. Del extracto orgánico, se tomó una muestra de 1 mg que se redisolvió con acetonitrilo (CH₃CN), grado analítico antes de ser analizada. Se inyectaron 20 μ l de la muestra redisuelta en el cromatógrafo.

La respuesta de la adición del homogenado fúngico en los cultivos en suspensión de *Psacalium peltatum* se determinó en cada intervalo de tiempo de crecimiento, considerando el promedio de tres repeticiones para cada uno.

Para comprobar que la proporción de sesquiterpenos presentes en los cultivos en suspensión con el homogenado no era igual que en los cultivos en suspensión de la planta sin el homogenado fúngico. Se utilizó la desviación estándar y el análisis de varianza (Ho: $s^2h = s^2c$ Ha: $s^2h \neq s^2c$), considerando la probabilidad de $p < 0.01$ como significativa.

6. Resultados y discusión.

Es importante mencionar que la mayoría de los experimentos con células en suspensión de tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios, cuentan con el establecimiento de células en suspensión durante varios años. Sin embargo con *Psacalium peltatum* debido a la falta de líneas celulares establecidas, se llevó a cabo desde la ubicación, identificación y colecta del organismo.

6.1. Colecta del material vegetal.

La vegetación asociada con *Psacalium peltatum*, consistió de árboles de juníperos (*Juniperus deppeana*) y de encinos (*Quercus rugosa*). En las dos colectas que se realizaron se observó que las raíces de los encinos estuvieron entrelazadas con las raíces de las plantas de *Psacalium peltatum*, lo que dificultó en ocasiones la obtención completa de las raíces.

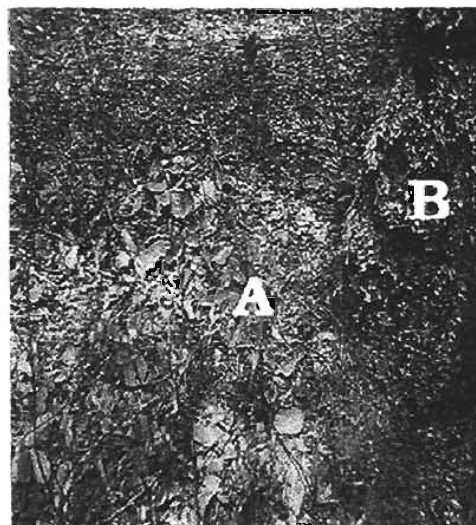


Figura 13. Vegetación asociada a *Psacalium peltatum* (A), encino *Quercus rugosa* (B).

El total de material colectado fue de raíces y rizomas, así como de organismos completos para realizar los establecimientos de los cultivos de tejidos vegetales.

El total de material colectado en peso seco de raíces y rizomas, fue de 6.519 kg, de los cuales 4.381 kg fueron de raíz y 2.138 kg de rizoma.

Para la determinación de sesquiterpenos se realizó únicamente con el extracto hexánico de las raíces colectadas, debido a las diferencias que se presentaron en los desplazamientos e intensidades entre las manchas por CCF del extracto hexánico de las raíces y del rizoma (Figura 14).

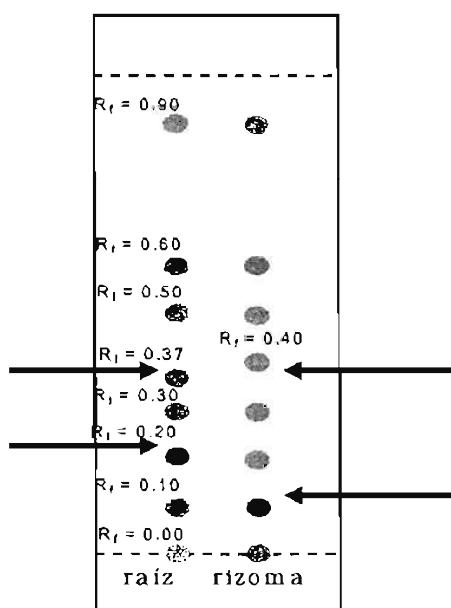
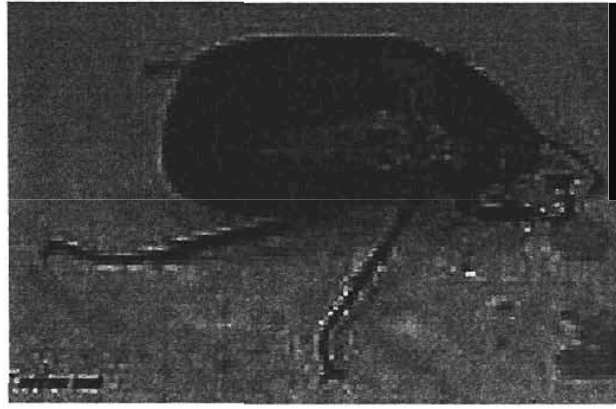


Figura 14. Diferencias observadas en el desplazamiento (R_f) e intensidad de las manchas de los extractos hexánicos de la raíz y el rizoma, eluidos con el sistema hexano: acetato de etilo (9:1).

Estas diferencias en el desplazamiento de las manchas son en parte atribuidas a las perforaciones ocasionadas en los rizomas por el escarabajo *Phyllophaga rugosa* (gallina ciega), el cual se alimenta del mismo (Figura 15). Algunos escarabajos del género *Phyllophaga*, han sido señalados como plaga subterránea (Morón 1986; Londoño 1995; Vallejo, 1997), en varios cultivos de importancia económica, destacando los de frijol, maíz, cebolla y hortalizas (Londoño, 1994).



A



B

Figura 15. Perforación del rizoma (A) por el escarabajo (gallina ciega) (B).

6.2. Fraccionamiento del extracto hexánico e identificación de los sesquiterpenos.

La cantidad obtenida de extracto hexánico de raíces fue de 15.69 g. Del fraccionamiento que se realizó con 6 g de muestra del extracto hexánico mediante cromatografía de absorción en una columna abierta de gel de sílice se obtuvo un total de 557 fracciones de 20, 50, 100 y 200 mL, con diferentes proporciones de disolvente (Anexo 2).

De la separación por cromatografía en columna abierta las fracciones 83, 296 y 350, mostraron por CCF ser compuestos únicos a los cuales se les determinó el punto de fusión y se les realizaron experimentos espectrométricos, espectroscópicos de infrarrojo, de resonancia magnética nuclear de protón y carbono para ser identificados y comparados con los datos ya descritos para *Psacalium decompositum*, sus estructuras están relacionadas con la maturinina y el acetato de maturina (Romo y Joseph-Nathan, 1964; Correa y Romo, 1966).

6.2.1. Fracción 83.

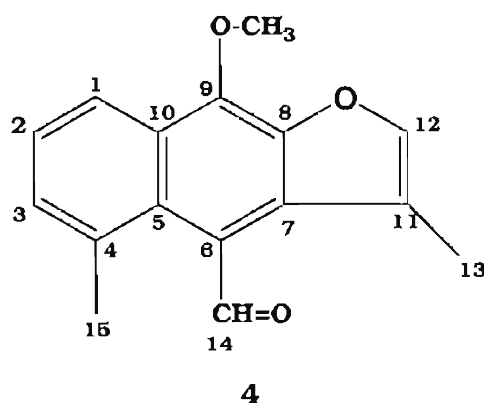
En la fracción 83, se obtuvo un sólido en forma de agujas de color amarillo pálido. Por CCF tuvo un R_f de 0.66 con el sistema de elusión hexano/acetato de etilo (9:1) y un punto de fusión de 84-87°C.

El espectro de IR (Anexo 3 espectro 1) presentó una banda a 1680 cm^{-1} correspondiente al grupo aldehído del carbonilo H1, otra banda a 1616 cm^{-1} que se asignó a los dobles enlace (C=C) así como, la banda a 1264 cm^{-1} que se asignó al anillo de furano.

El espectro de EM-IE⁺ (Anexo 3 espectro 2), mostró un pico en m/z 254 con una intensidad del 94%, que se asignó al ión molecular (M^+), que correspondió a la fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$; así como, una señal en m/z 237 con una intensidad del 100 % correspondiente al pico base.

El espectro de RMN de ^1H (Anexo 3 espectro 3) presentó una señal simple a 11.09 ppm, que integró para un protón de H-14 correspondiente al protón del aldehído; la señal triple centrada a 8.27 ppm integró para un protón de H-1 del anillo aromático, con un $J=7.62$ y $J=4.88$ Hz, que se acopla con el protón de H-2. En 7.55 ppm se observó un doblete que integró para un protón de H-12 del anillo furánico con un $J=1.34$; el doblete centrado en 7.40 ppm, con un $J=5.66$ Hz integró cada uno para un protón de H-2 y H-3; las señales simples a 4.29 y 2.68 ppm integraron cada una para tres protones del metoxilo en C-9 y del metilo en C-15, así como la señal doble a 2.33 ppm que integró para tres protones del metilo en C-13 en el anillo de furánico.

En función de los experimentos realizados, a este compuesto se le asignó la estructura de la maturinina (4), aislado de *Psacalium decompostum* y de *Psacalium beamanii* (Correa y Romo, 1966; Pérez-Castorena y col., 2004).



6.2.2. Fracción 296.

De la fracción 296, se cristalizó un sólido en forma de agujas de color amarillo intenso, con un punto de fusión de 85-87°C. En CCF tuvo un R_f de 0.20 con el sistema de elusión hexano/acetato de etilo (9:1).

El espectro de IR (Anexo 3, espectro 4) mostró una banda a 1741 cm^{-1} correspondiente al grupo acetilo, una banda a 1677 cm^{-1} correspondiente a un

grupo carbonilo del aldehído (H=O) y una banda a 1620 cm⁻¹ de los dobles enlace (C=C).

En el espectro de EM-IE⁺ (Anexo 3, espectro 5) se observó un un pico en m/z 312 que se asignó al ión molecular con una intensidad del 93%, que correspondió a la fórmula molecular C₁₈H₁₆O₅, además de la señal en m/z 226 del pico base con una intensidad del 100 %.

Su espectro de RMN de ¹H (Anexo 3, espectro 6) mostró una señal simple a 11.01 ppm, que integró 1H del protón aldehídico en C-14. El triplete centrado a 8.30 ppm integró 1H en C-3 del anillo aromático con un *J*=7.24 y *J*=2.74 Hz que acopló con H-2. En 7.83 ppm hay una señal simple que integró 1H del H-12 del anillo furánico; el multiplete centrado en 7.42 ppm integró 2H correspondientes a H-2 y H-1 (*J*=6.97 y *J*=0.74 Hz). En 5.33 ppm se observó un singulete, que integró para 2H correspondientes a los hidrógenos del metileno en C-13. Las señales simples en 4.44, 2.79 y 2.08 ppm integraron para tres protones cada uno correspondió al metoxilo en C-9 y a los metilos en C-15 y C-2'.

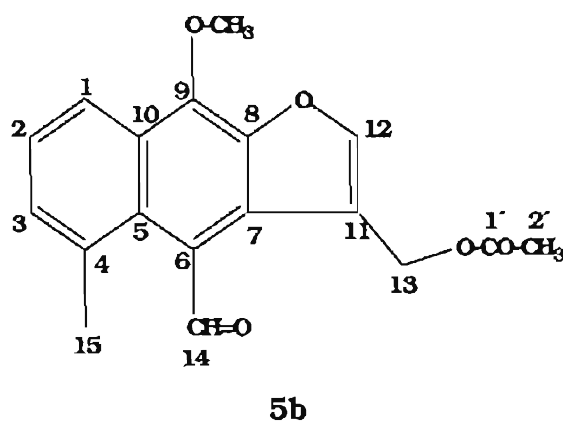
El experimento COSY (Anexo 3, espectro 7) mostró correlación de la señal de H-3 en 8.30 ppm con la señal de H-2 y H-1 en 7.42 ppm, así como, con el singulete en 2.79 ppm para uno de los protones del metilo en C-15. También se encontró correlación a larga distancia de la señal de H-12 en 7.83 ppm con la señal simple en 5.33 ppm para uno de los protones del metileno en C-13.

El experimento DEPT (Anexo 3, espectro 8) mostró señales para cuatro metinos (CH) en 148.94, 130.24, 124.77 y 121.05 ppm correspondientes a C-12, C-2, C-3 y C-1, un metileno (CH₂) en 58.48 ppm para el C-13 y tres metilos (CH₃) en 61.10, 26.62 y 21.00 ppm asignados al MeO de C-9, C-15 y C-2' respectivamente.

Las correlaciones observadas en el experimento HETCOR (Anexo 3, espectro 9^a y 9^b) de las señales en 148.94, 130.24, 124.77, 121.05, 61.10, 58.48, 26.62 y 21.00 ppm con las señales de H-12 en 7.83 ppm, H-1 en 7.43 ppm, H-2 en 7.39 ppm, H-3 en 8.30 ppm, 3H-(OMe)-9 en 4.44 ppm, 2H-13 en 5.33 ppm, 3H-15 en

2.79 ppm y 3H-2' en 2.08 ppm, fueron asignados de esta forma a C-12, C-1, C-2, C-3, C-9, C-13, C-15 y C-2'.

Este compuesto se identificó como acetato de maturina (**5b**) Correa y Romo (1966), y la estructura fue confirmada por las señales que presentó en los diferentes espectros de RMN y de los experimentos de correlación COSY, DEPT y HETCOR. Es conveniente aclarar que Correa y Romo (1966) obtuvieron el acetato de maturina (**5b**) de *Psacalium decompositum* por acetilación con anhídrido acético y piridina pero en *Psacalium peltatum* el compuesto se encontró en forma natural. Además el acetato de maturina (**5b**) ha sido aislado de *Psacalium beamanii* (Pérez-Castorena y col., 2004); así como de varias especies de *Senecio* de Sudáfrica, entre ellos a *Senecio digitalifolius*, *Senecio lydenburgensis*, y *Senecio affinis* (Bohlmann y Zdero 1978b; Bohlmann y col., 1979; Bohlmann y Bapuji 1982); además de *Roldana heterogama* (Bohlmann y Zdero 1978a); y de *Trichilia cuneata* (Doe y col., 2004). También se corroboró la actividad antiinflamatoria del compuesto en el modelo de edema inducido con un porcentaje del 95.41%.



6.2.3. Fracción 350.

La revisión de la literatura mostró que los datos espectrométricos y espectroscópicos de la fracción 350 no están descritos, por lo que su asignación se hizo en base a sus desplazamientos químicos y con la ayuda de los experimentos de correlación COSY y HETCOR.

La fracción 350, se presentó como un compuesto sólido de consistencia cerosa de color rojo intenso, al cual se le determinó el punto de fusión de 95-98°C, y un R_f de 0.10 con el sistema de elusión hexano/acetato de etilo (9:1).

El espectro de IR (Anexo 3, espectro 10) presentó una banda a 1711 cm^{-1} correspondiente a un grupo éster, una banda a 1667 cm^{-1} correspondiente al grupo aldehído y una banda a 1607 cm^{-1} de los dobles enlace (C=C).

El espectro de EM-IE⁺ (Anexo 3, espectro 11), tiene una señal en m/z 356 con una intensidad del 20% que se asignó al ión molecular (M^+), que correspondió a la fórmula molecular de $C_{21}H_{24}O_5$, así como la señal en m/z 57 con intensidad del 100 % que correspondió al pico base.

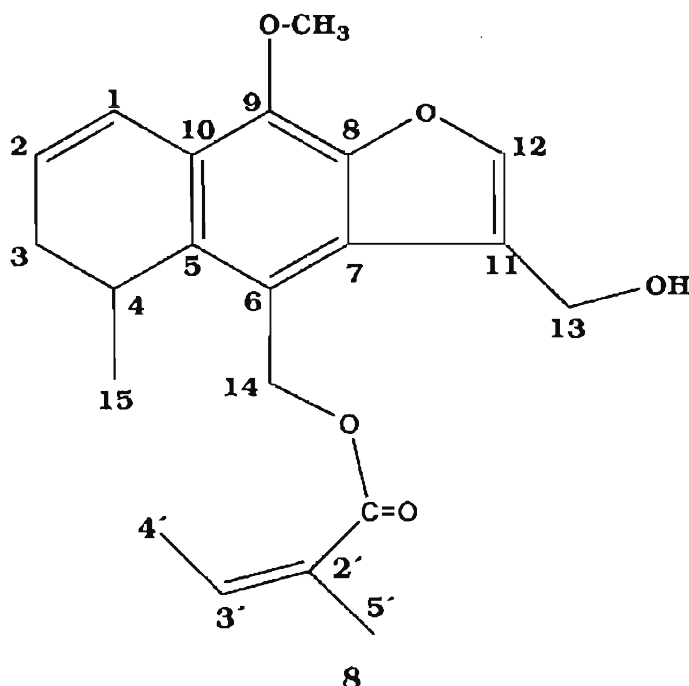
El espectro de RMN de ^1H (Anexo 3, espectro 12), mostró una señal simple a 7.59 ppm, que integró 1H de H-12, dos señales dobles centradas en 6.95 y 6.00 ppm que integraron para un protón de H-1 y H-3', así como el triplete centrado en 5.90 ppm que integró para un protón de H-2. En 5.56 ppm se encontró un doblete centrado que integró para dos protones de H-14, en 4.83 ppm se observó un singulete que integró para 2H de H-13. En 4.13 ppm se presentó una señal simple que integró para 3H del metoxilo (O-CH₃), en C-9, un triplete en 3.44 ppm que integró para 1H de H-4, un multiplete en 2.30 ppm que integró para 2H de H-3. En 1.95 ppm se observó una señal doble de dobles que integró para 3H del metilo en C-5' así como dos señales simples en 1.85 y 1.25 ppm que integraron para 3H de los metilos en C-4' y C-15.

El experimento DEPT (Anexo 3, espectro 13) mostró señales para cuatro metinos (CH) en 143.98, 138.44, 125.31, 121.01 y 27.99 ppm correspondientes a C12, C3', C2, C1 y C4, tres metilenos (CH₂) en 59.85, 56.06 y 29.67 ppm para el C-14, C-13 y C-3 así como cuatro metilos (CH₃) en 60.84, 20.59, 20.59 y 15.78 ppm asignados a (OCH₃) en C-9, C-15, C-4' y C-5'.

Por último las correlaciones observadas en el experimento HETCOR (Anexo 3, espectro 14) de las señales en 143.98, 138.44, 125.31, 121.01, 27.99, 59.85,

56.06, 29.67, 60.84, 20.59, 20.59 y 15.78 ppm con las señales de H-12 en 7.59 ppm, H-1 en 6.95 ppm, H-3' en 6.00 ppm, H-2 en 5.90 ppm, 2H-14 en 5.56 ppm, 2H-13 en 4.83 ppm, C-9 en 4.13 ppm, H-4 en 3.44 ppm, 2H-3 en 2.30 ppm, 3H-5' en 1.95 ppm, 3H-4' en 1.85 ppm y 3H-15 en 1.25 ppm, fueron asignados a C-12, C-3', C-2, C-1, C-9, C-14, C-13, C-3, C-4, C-4', C-15, y C-5'.

En base a los resultados obtenidos, a este compuesto se le asignó la estructura (8) denominada **Angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol**, no descrito hasta el momento, ni reportado su aislamiento como producto natural.



6.3. Cultivos de callo.

6.3.1. Explantes de hojas.

El mejor explante para la obtención del callo fue de hojas jóvenes con un diámetro inferior de 10 cm, sin daño foliar y completamente formadas. El tamaño y número de las hojas se logró mediante las fertilizaciones y las condiciones de invernadero durante 25 días (Figura 16). El resultado obtenido, coincide con lo mencionado por Smith (2000), respecto a la utilización de fertilización y condiciones de invernadero para los diferentes tejidos foliares, los cuales favorecen los procesos de desinfección y los establecimientos de los cultivos *in vitro*.



Figura 16. Plantas de *Psacallium peltatum* en condiciones de invernadero para la obtención de hojas jóvenes, que sirvieron de explantes para los cultivos de callo.

Las hojas con un diámetro superior a los 10 cm no fueron apropiadas para ser empleadas como explantes, debido a la rápida oxidación y bajo contenido de callo que presentaron. Torres (1988), refiere que las partes viejas de las plantas no son apropiadas para ser empleadas como explantes por un bajo o nulo contenido de células meristemáticas, a diferencia de las hojas o partes jóvenes.

6.3.2. Inducción del cultivo de callo.

El proceso de inducción para la formación de callo con el medio de cultivo MSC1, favoreció la formación de dos tipos de callo. El callo de color gris oscuro (negro), duro y poco friable y el callo de color verde claro (blanco) suave y friable que se obtuvo después de varios subcultivos (Figura 17).

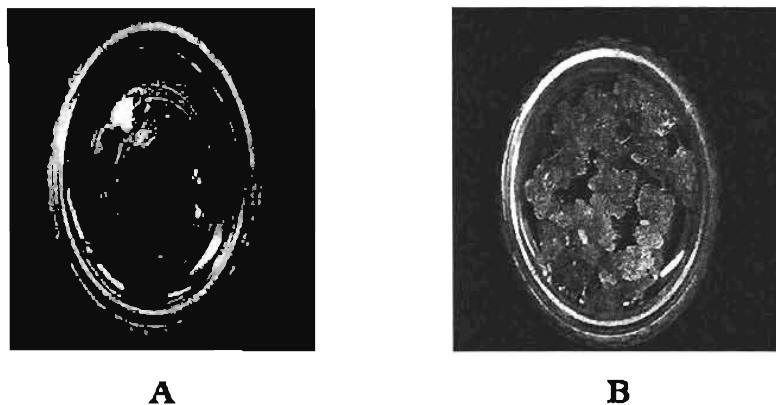


Figura 17. Cultivos de callo negro (A) y blanco (B) obtenidos del explante de hoja de *Psacallium peltatum* en medio de cultivo MSC1.

El crecimiento característico en los cultivos del callo negro y blanco mostró un máximo desarrollo a los 6 días sin observar la etapa de adaptación característica en la mayoría de los cultivos celulares, en la cual la biomasa no aumenta y presenta una disminución respecto a la cantidad inoculada, debido a que las células se preparan para entrar en mitosis, activando toda la maquinaria energética y enzimática para la multiplicación celular (Spencer y Rhodes, 1993). Por esta razón, en ambos cultivos se observó una rápida disminución del peso seco a los 12 días. En especial en el cultivo del callo negro con una cantidad de biomasa promedio superior en tres cifras a la cantidad inoculada. En el caso del callo blanco la recuperación de biomasa promedio fue semejante a la del sexto día. (Figura 18).

La biomasa máxima obtenida en peso seco del callo negro fue de 55 gL⁻¹ y de 42 gL⁻¹ para el callo blanco. Los tiempos de duplicación en que la biomasa completó un ciclo de división celular, fueron de 30 y 16 días respectivamente.

Además de presentar un porcentaje en acumulación de líquido intercelular (L.I. %) en el callo negro y blanco del 68 y 72 % (Tabla 4).

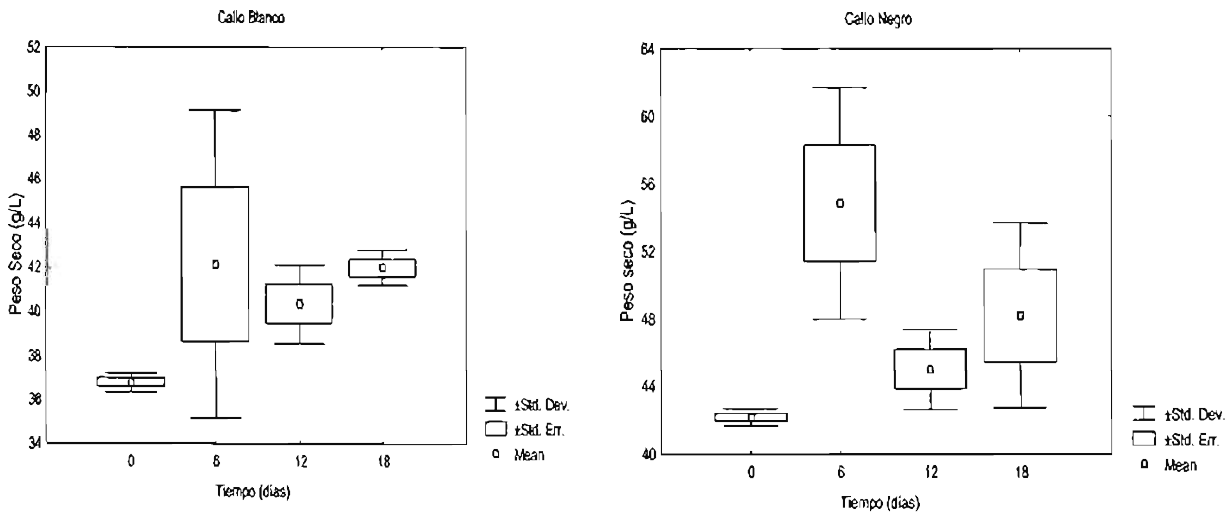


Figura 18. Cinéticas de crecimiento de los cultivos de callo negro y blanco en medio MSC1. (n=4) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.001$).

Tabla 4. Parámetros e índice de crecimiento de los cultivos de callo negro (CN) y blanco (CB).

Tipo de callo	Biomasa máxima en peso seco (gL^{-1})*	Velocidad específica de crecimiento. $\mu(\text{d}^{-1})$ **	Tiempo de duplicación (días).	L.I. %***
CN	55 ± 3.42	0.022	30	68
CB	42 ± 3.49	0.044	16	72

*Se muestra el valor promedio, con el error estandar; ** Valor obtenido de la regresión lineal de las cinéticas de crecimiento; *** Valor obtenido de la diferencia entre peso seco y fresco.

Estos resultados muestran en el callo negro incrementó la biomasa en un tiempo de duplicación más largo, sin la acumulación considerable de líquido intracelular que se observó en el cultivo del callo blanco. En el callo blanco se considera una variación en la disminución de biomasa e incremento en la acumulación de líquidos intracelulares, debido a un cambio osmótico en los

gradientes de difusión de algunas sales disueltas del medio de cultivo utilizado y el tejido vegetal obtenido (Pierik, 1997).

Además, sólo se obtuvo la biomasa necesaria del cultivo de callo negro para realizar únicamente el primer establecimiento de los cultivos de células en suspensión a diferencia de la biomasa obtenida del cultivo del callo blanco, que permitió obtener las cantidades de biomasa necesaria para realizar las demás evaluaciones.

6.3.3. Proliferación del cultivo de callo.

El cultivo de callo blanco presentó una oxidación constante en los diferentes subcultivos. Debido a eso, se realizó una modificación en el medio de cultivo con la disminución en la concentración de nitratos de 39 mM a 19.5 mM, que favoreció un rápido crecimiento y evitó la oxidación del cultivo. Park y col., (1999) refieren que el crecimiento celular en los cultivos para la obtención de berberina, se incrementó cuando disminuyó la cantidad de nitratos de 80 mM a 40 mM. El medio de cultivo obtenido fue el MSC2.

Además de la modificación en la concentración de nitratos del medio de cultivo, se incrementó el intervalo de tiempo de incubación durante 25 días.

Con este medio de cultivo modificado se obtuvo el incremento de biomasa en forma exponencial a diferencia del medio de cultivo MSC1 (Figura 19), el cual presentó una pérdida de biomasa para el día 15. El medio de cultivo MSC2 conservó un crecimiento constante y una proliferación del cultivo del callo blanco a través de los diferentes subcultivos. Sin embargo, en ambos medios de cultivo se observó un aumento en la acumulación de líquido intracelular del 68 y 72% a un 94%, en comparación con los cultivos en el intervalo de tiempo de 18 días (Tabla 4 y 5). Debido a esto, los cultivos de callo blanco en medio MSC1 y MSC2 mostraron un incremento para incorporar más líquidos que formación de biomasa.

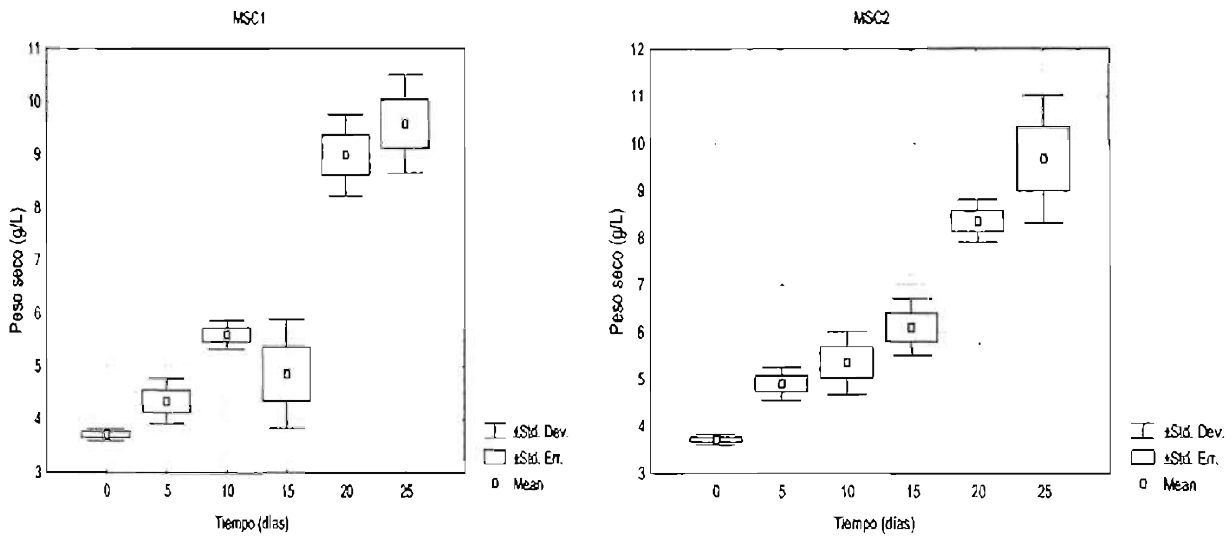


Figura 19. Curvas de crecimiento del callo blanco en medio MSC1 y MSC2. (n=4) ± desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) (p < 0.001).

Tabla 5. Parámetros e índice de crecimiento del cultivo de callo blanco (CB) en medio MSC1 y MSC2.

Tipo de callo	Biomasa máxima en peso seco (gL ⁻¹)*	Velocidad específica de crecimiento. μ(d ⁻¹)**	Tiempo de duplicación (días).	L.I. %***
MSC1	9.58	0.0410	17	94.3
MSC2	9.66	0.0372	18	94.2

*Se muestra el valor promedio; ** Valor obtenido de la regresión lineal de las cinéticas de crecimiento; *** Valor obtenido de la diferencia entre peso seco y fresco.

6.4. Cultivos de células en suspensión.

6.4.1. Primer establecimiento de los cultivos de células en suspensión.

El primer establecimiento de los cultivos de células en suspensión se realizó con los dos cultivos de callo, los callos de color negro y blanco al sexto día del subcultivo en medio MSC1. Los cultivos nodriza con medio líquido se inocularon con 4 g de callo por matraz. Después de una semana en agitación orbital se subcultivaron los cultivos nodriza con una alícuota de 10 mL por cada matraz de 125 mL.

El incremento de biomasa fue constante en el cultivo del callo negro, hasta el séptimo día, no así en el cultivo del callo blanco que disminuyó su biomasa a partir del tercer día (Figura 20).

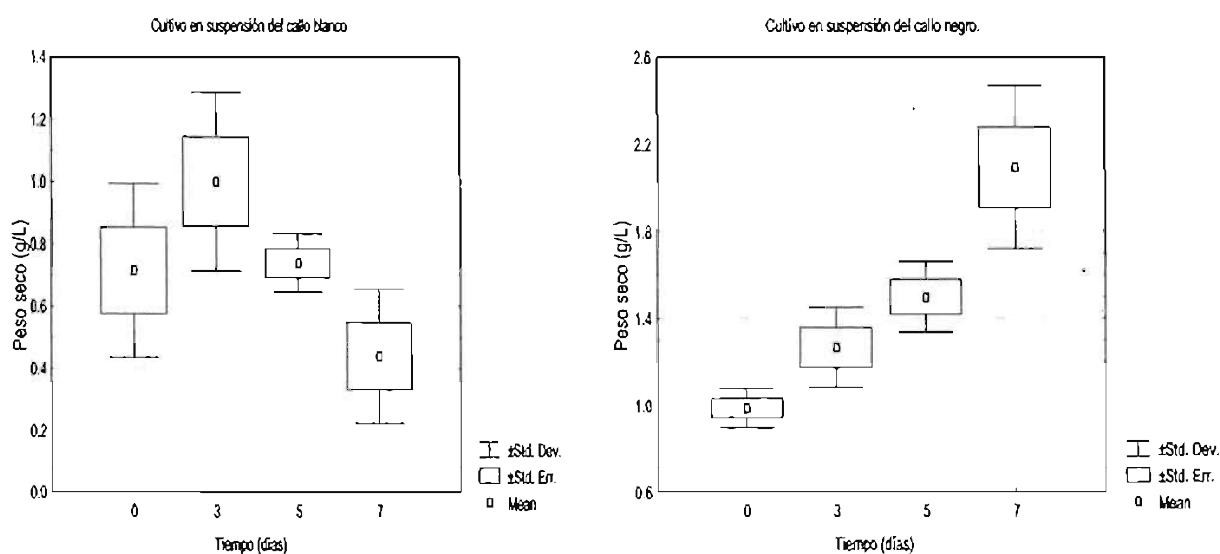


Figura 20. Cinética de crecimiento en peso seco de los cultivos en suspensión del callo blanco y negro en medio de cultivo MSC1. (n=4) \pm desviación, error estándar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.005$).

El comportamiento que presentó el cultivo de callo blanco, probablemente se debe a la sensibilidad del mismo al estrés generado por la agitación y aireación del matraz, a diferencia del comportamiento que se presentó en el cultivo sólido,

lo que aceleró su envejecimiento. Esto coincide con lo encontrado por Tanaka (1981) en un estudio similar. Esta diferencia no se observó en el cultivo del callo negro, el cual presentó un ciclo de duplicación más corto de 6 días en comparación del cultivo del callo blanco de 16 días (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros e índice de crecimiento de los cultivo en suspensión del callo blanco (CB) y negro (CN) en medio MSC1.

Cultivo	Biomasa máxima en peso seco (gL ⁻¹)*	Velocidad específica de crecimiento. $\mu(d^{-1})$ **	Tiempo de duplicación (días).
CB	0.89	0.0437	16
CN	2.59	0.1350	6.69

*Se muestra el valor promedio; ** Valor obtenido de la regresión lineal de las cinéticas de crecimiento.

6.4.2. Segundo establecimiento de los cultivos de células en suspensión.

La evaluación para el segundo establecimiento del cultivo de células en suspensión fue con el callo blanco, después del sexto día del subcultivo en medio sólido MSC2 y evaluando dos intervalos de tiempo, de 12 y 23 días. Utilizando los medios de cultivo líquidos MSC2 y MSB.

Se utilizó la misma composición química del medio de cultivo sólido MSC2 para el medio de cultivo líquido excepto por la adición del agente solidificante, considerando que el crecimiento fuera semejante.

El medio de cultivo MSB, se empleó en forma similar como lo realizó Dixon (1991) para el incremento de biomasa en los cultivos en suspensión de la planta *Catharanthus roseus*, con el aumento en la cantidad de sacarosa al medio de cultivo del 3 al 5 %, así como por la sustitución de la auxina 2,4 D por AIA.

La biomasa máxima obtenida en peso seco fue de 8.95 y 9.17 gL⁻¹ entre el séptimo y noveno día para cada uno de los medios de cultivo utilizados, con el mismo intervalo de tiempo (Figura 21, A y B).

Cuando en el medio de cultivo MSB se incrementó el intervalo de tiempo de 12 a 23 días, la biomasa acumulada disminuyó a 6.78 gL^{-1} , este valor fue inferior al obtenido cuando se evaluó el crecimiento celular durante 12 días y el tiempo de duplicación se incrementó a 5 días (Figura 21, B y C; Tabla 7).

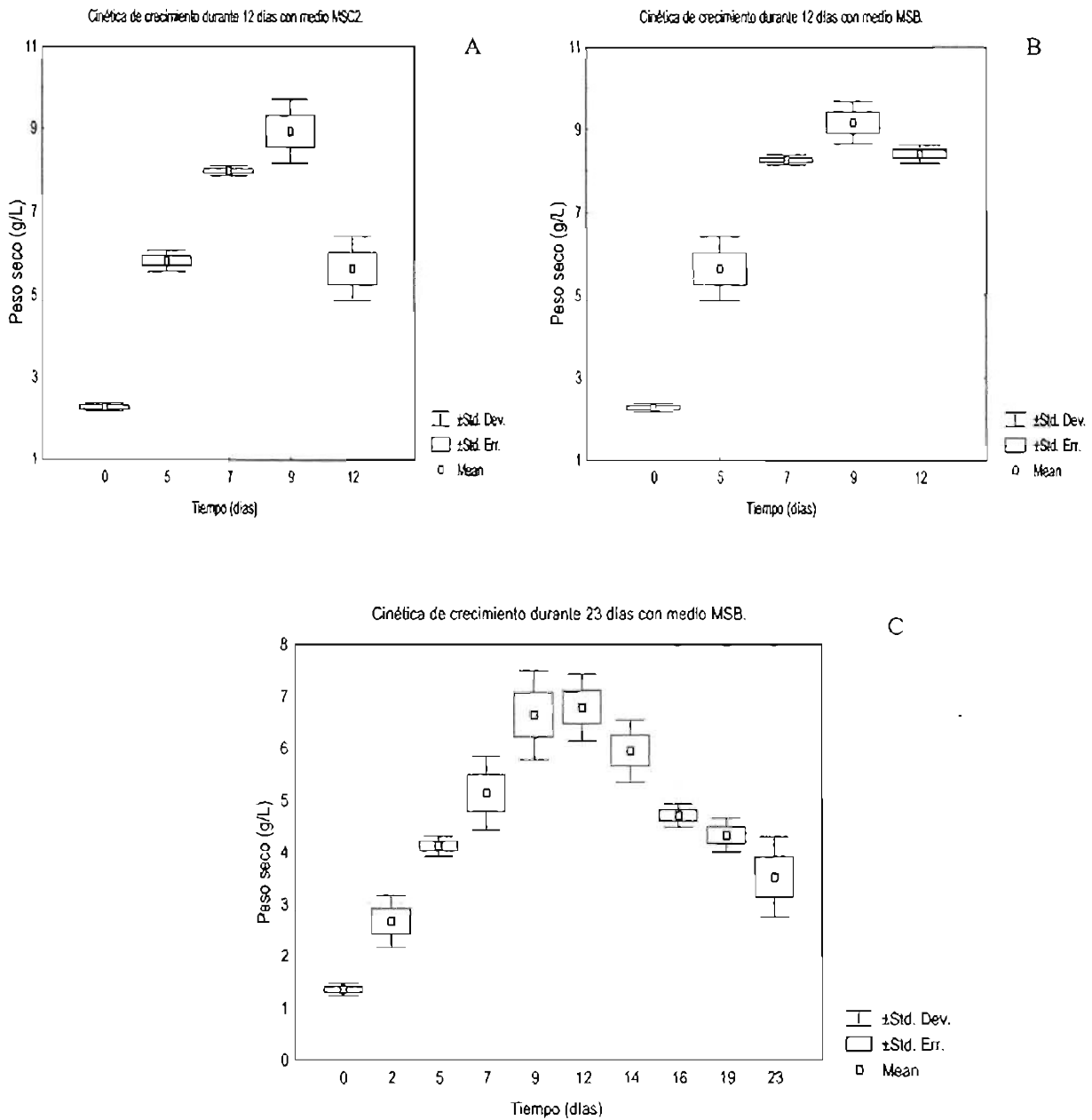


Figura 21. Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo MSC2 (A) y MSB (B,C). A 12 (B) y 23 (C) días con el medio de cultivo MSB. (n=4) \pm desviación, error estándar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.005$).

Tabla 7. Parámetros e índice de crecimiento del cultivo en suspensión de callo blanco (CB) en medio MSC2 y MSB.

Cultivo	Tiempo de crecimiento	Biomasa máxima en peso seco (gL ⁻¹)*	Velocidad específica de crecimiento. $\mu(d^{-1})$ **	Tiempo de duplicación (días).
MSC2	12	8.95	0.7634	0.90
MSB	12	9.17	0.7940	0.87
MSB	23	6.78	0.1315	5.27

*Valor promedio de 4 repeticiones. ** Valor obtenido de la regresión lineal de las cinéticas de crecimiento.

Estos resultados muestran que el medio de cultivo MSB con un tiempo de crecimiento de 12 días, favoreció el aumento de biomasa en los cultivos de células en suspensión a diferencia del medio de cultivo MSC2 utilizado para la proliferación de callo blanco así como el medio de cultivo MSB con un intervalo de crecimiento de 23 días.

Se considera que este incremento de biomasa fue atribuido por las modificaciones que se realizaron en el medio de cultivo con el incremento de sacarosa y la sustitución de la auxina 2,4 D, como lo realizó Dixon (1991) en los cultivos en suspensión de *Catharanthus roseus*.

También la sustitución de la auxina 2,4 D se realizó por considerarse fitotóxica en altas concentraciones, induciendo la muerte de los cultivos por la formación e incremento de fenoles (George y Sherrington, 1984), además de su capacidad inhibitoria para la producción de metabolitos secundarios (Dixon, 1991) y por las mutaciones que se presentan en la membrana del núcleo de las células durante el cultivo, las cuales generalmente se incrementan conforme aumenta la edad del cultivo (Burbidge y col., 1993).

6.5. Cinéticas de crecimiento por adición del homogenado.

Para la inducción de sesquiterpenos con la adición del homogenado se evaluaron los medios utilizados en el establecimiento de los cultivos en suspensión con dos intervalos de tiempo de 5 y 14 días. Asimismo se utilizó el medio de cultivo B5, utilizado en los cultivos celulares de *Thalictrum rugosum* y de *Catharanthus roseus* para la formación de berberina y serpentina (Funk y col., 1987; Dixon, 1991).

En el medio de cultivo MSC2 se realizó un muestreo diario y aleatorio durante 5 y 14 días. Los crecimientos de los cultivos en medio MSC2 durante 5 días, con y sin la adición del homogenado presentaron una disminución en biomasa durante las primeras 24 horas, posteriores a la inoculación. El incremento de biomasa se observó después del primer y segundo día respectivamente (Figura 22).

Debe considerarse que este periodo de disminución en biomasa para el cultivo en suspensión sin la adición del homogenado, se debió a la etapa de adecuación de las células al medio de cultivo utilizado, a diferencia del cultivo en suspensión con el homogenado, que presentó un rápido incremento de biomasa al tercer día, pero que no superó a la cantidad inoculada al principio de la cinética. Se presupone, que la capacidad de respuesta a nivel de la pared celular, por la presencia del elicitador, favoreció la oxidación y muerte celular del cultivo de células en suspensión. Lo cual demuestra que los factores de transcripción y traducción de genes para la producción de compuestos, como la enzimas quitinasas u otros metabolitos secundarios, no fueron estimulados suficientemente (Hahlbrock y col., 2003).

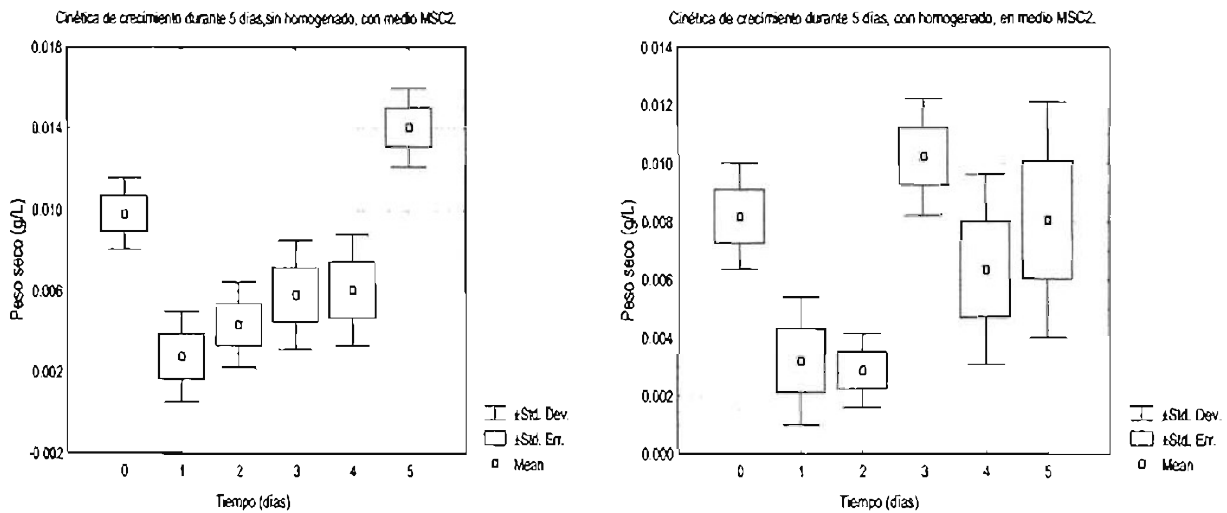


Figura 22. Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo MSC2, durante 5 días, sin y con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*. (n=4) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.005$).

En relación al muestreo aleatorio durante 14 días con el medio MSC2 se observó en el cultivo con el homogenado, una disminución de biomasa más rápida después del sexto día, a diferencia del cultivo sin el homogenado. Se considera que este cambio estuvo ocasionado por la presencia del homogenado lo cual contribuyó al incremento de biomasa hasta el día 14 (Figura 23).

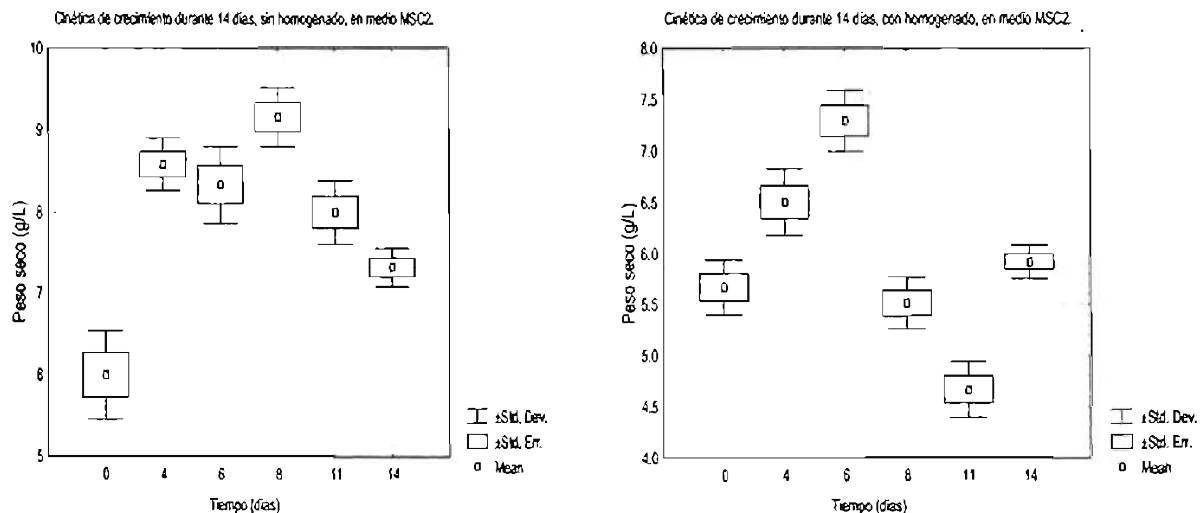


Figura 23. Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo MSC2, durante 14 días, sin y con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*. (n=4) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.005$).

En relación a los cultivos de células en suspensión con medio de cultivo MSB durante 14 días, la influencia del homogenado sobre el cultivo no se observó tan drástica como en los cultivo con el medio MSC2, además de presentar una etapa estacionaria muy amplia (Figura 24), que no fue observada en los anteriores cultivos, lo cual favorecería la producción y acumulación de los metabolitos secundarios (Shuler y Kargi, 1992; Spencer y Rhodes, 1993).

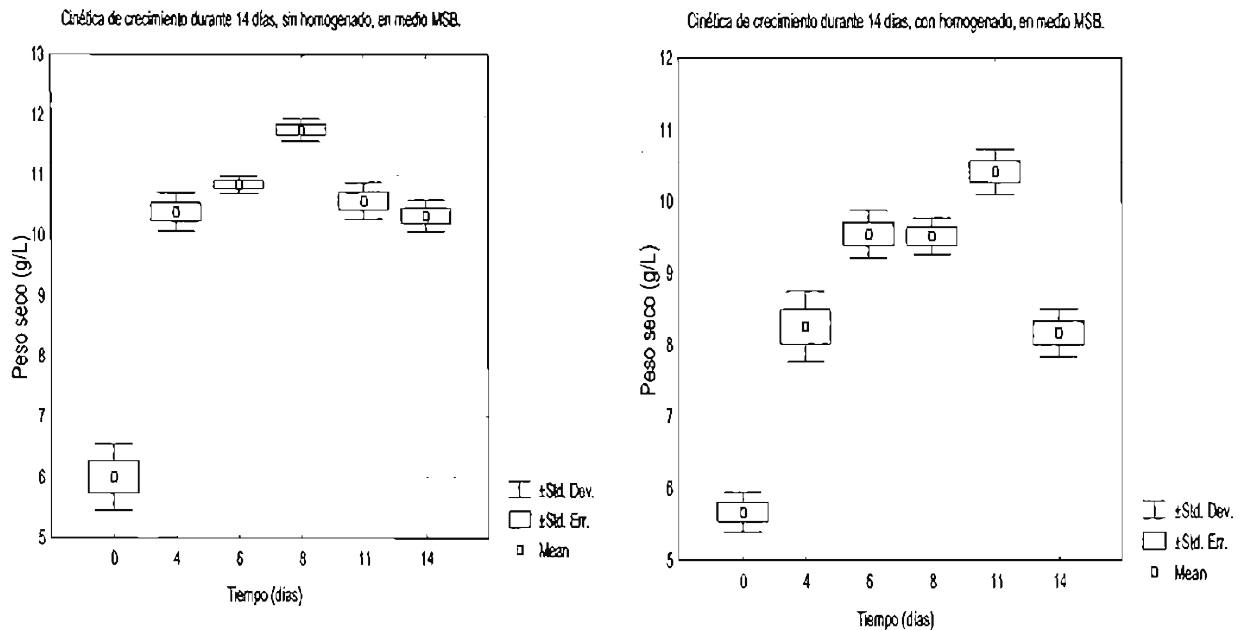


Figura 24. Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo MSB, durante 14 días, sin y con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*. (n=4) ± desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) (p < 0.005).

Finalmente, cuando se utilizó el medio de cultivo B5 con el homogenado, se observó una disminución en biomasa inferior a lo obtenido en los medios MSC2 y MSB, con un tiempo de duplicación muy rápido y un periodo continuo de adecuación de las células al medio de cultivo. Con el medio de cultivo B5 sin el homogenado, se observó un crecimiento exponencial en el cultivo, que contribuyó a un incremento de la biomasa superior a los cultivos MSC2 y MSB (Figura 25; Tabla 8). Este incremento de biomasa puede estar atribuido por el aumento en la concentración de vitaminas B2 y fitorreguladores (Anexo 1.b) que estimularon el crecimiento celular.

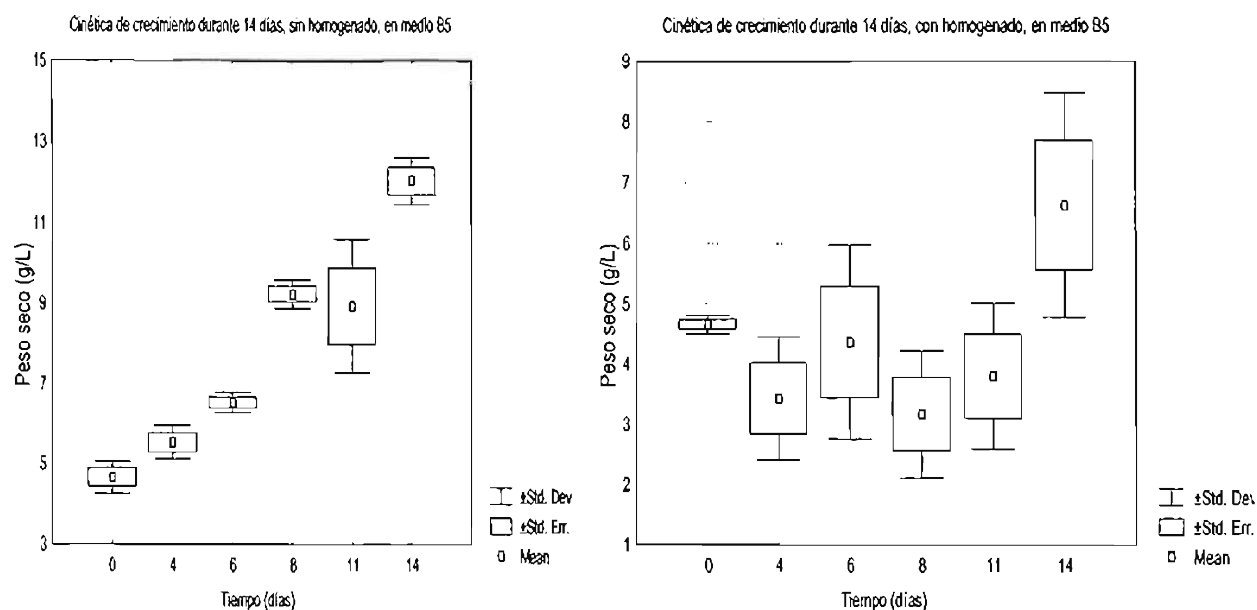


Figura 25. Cinética de crecimiento en peso seco del cultivo en suspensión del callo blanco en medio de cultivo B5, durante 14 días, sin y con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*. (n=4) \pm desviación, error estandar (SD, SE); promedio (M) ($p < 0.005$).

Tabla 8. Parámetros e índice de crecimiento del cultivo en suspensión de callo blanco (CB) en medio MSC2, MSB y B5 con y sin el homogenado.

		Sin Homogenado			Con Homogenado		
Medio	T.ind.*	Biomax.**	$\mu(d^{-1})$ ***	Td ****	Biomax.**	$\mu(d^{-1})$ ***	Td
MSC2	5	1.405	0.126	5.5	1.022	0.087	7.96
MSC2	14	9.16	0.0513	14	7.3	0.041	17
MSB	14	11.76	0.0849	9	10.41	0.0543	14
B5	14	12.7	0.07	9.9	6.63	0.010	6.93

T. ind: Tiempo de inducción; **Biomax: Biomasa máxima en peso seco (gL^{-1}); *** $\mu(d^{-1})$: Velocidad específica de crecimiento, valor obtenido de la regresión lineal de las cinéticas de crecimiento; **** Td: Tiempo de duplicación en días.

6.6. Determinación y cuantificación de sesquiterpenos.

La determinación de los compuestos sesquiterpénicos por CCF, se realizó en los cultivos de callo blanco y negro así como en los cultivos de células en suspensión con los medios de cultivo MSC1, MSC2 y MSB, no detectándose ningún compuesto de los analizados en el extracto hexánico de raíces. Sin embargo, en el medio de cultivo B5 con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*, sólo se observó el acetato de maturina (Figura 26).

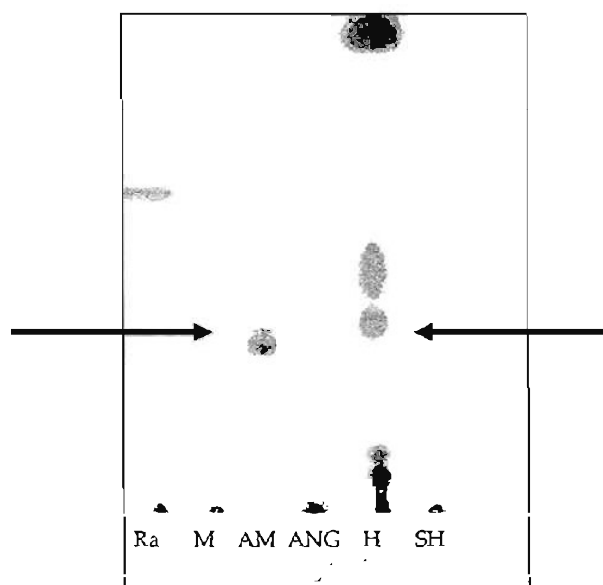


Figura. 26. Diferencias en R_f del sesquiterpeno identificado en el cultivo celular con el homogenado (H). Con un sistema de elución hexano: acetato de etilo (7:3). Maturinina (M), acetato de maturina (AM), angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol (ANG) y cultivo celular sin el homogenado (SH).

Por lo anterior, se realizó la determinación y cuantificación de sesquiterpenos en el material vegetal por HPLC en base a una curva de calibración para cada uno de los sesquiterpenos obtenidos. Los tiempos de retención para cada uno de los compuestos fueron de 5.642, 4.622 y 3.171 minutos (Figura 27).

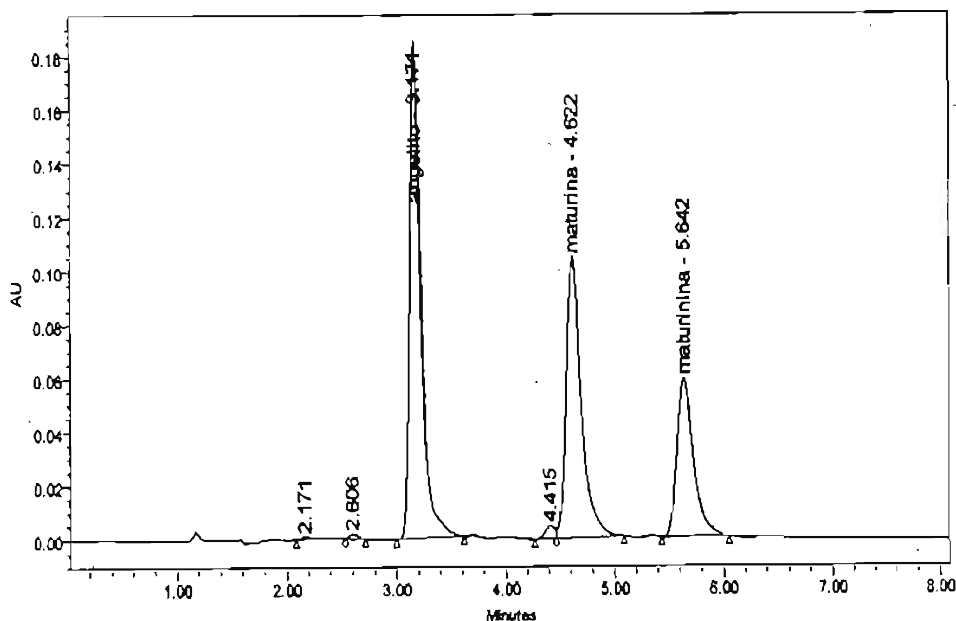


Figura 27. Perfil cromatográfico obtenido para la maturinina, el acetato de maturina (maturina) y el angelato de 3-4 dehidro 14-maturinol (angelito).

En los diferentes cultivos *in vitro*, los rendimientos para cada uno de los compuestos fueron de 0.0006 - 1.083 PS gL⁻¹ para la maturinina (**4**), 0.0008 - 0.85 PS gL⁻¹ para el acetato de maturina (**5b**) y de 0.0002 - 0.28 PS gL⁻¹ para el angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol (**8**).

Comparando el rendimiento obtenido del extracto hexánico del total de raíces colectadas (raíz *in vivo*) con el cultivo de callo blanco en medio MSC2 y de los cultivos de células en suspensión con y sin el homogenado se observó que la cantidad obtenida de la maturinina y el acetato de maturina fueron superiores a lo obtenido en la raíz *in vivo*. No obstante el rendimiento obtenido para el compuesto del angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol en el cultivo de callo blanco en medio MSC2 y en el de las células en suspensión con la adición del homogenado fueron inferior a lo obtenido del extracto hexánico de raíz, excepto por el rendimiento obtenido del cultivo de células en suspensión sin el homogenado (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimiento en peso seco de cada uno de los diferentes cultivos *in vitro* y de la raíz *in vivo*.

Cultivo / Compuesto	Raíz <i>in vivo</i> PS g	Callo blanco en medio MSC2 PS gL ⁻¹	Células en suspensión (B5) sin homogenado PS gL ⁻¹	Células en suspensión (B5) con homogenado PS* gL ⁻¹
Maturinina	0.0469	0.06	1.083	0.486
Acetato de maturina	0.0704	0.85	0.2407	0.810
Angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol	0.0352	0.002	0.288	0.016

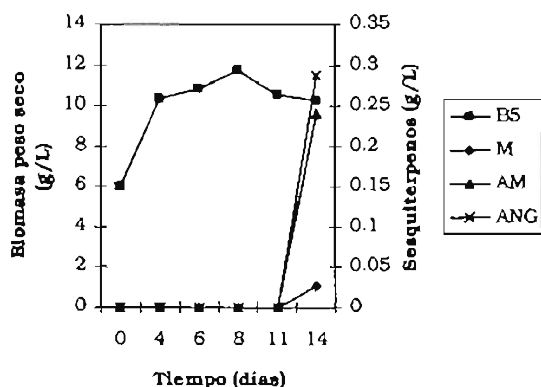
*PS: Peso seco.

En estudios con alcaloides como la N,N-dimetiltriptamina (DMT) obtenido de la corteza de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite) se observó que el porcentaje obtenido mediante cultivos *in vitro* de callo fue cercano a lo obtenido en la planta, demostrando la capacidad biosintética del cultivo para el compuesto (Villarreal y col., 1993).

En relación a la síntesis de metabolitos secundarios, se refiere que la síntesis de compuestos secundarios se observa en la etapa estacionaria y no en la de crecimiento exponencial (Quintero, 1990). Sin embargo, en los cultivos de células en suspensión con el medio B5 la acumulación de los diferentes compuestos se presentó después del máximo crecimiento, en una etapa de desaceleración. En especial del acetato de maturina, el cual se incrementó por la adición del homogenado, no así del angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol que se observó disminuida su concentración cuando fue adicionado el homogenado (Figura 28).

La relación teórica refiere que la síntesis de metabolitos secundarios se lleva a cabo en la etapa estacionaria (Payne y col., 1992; Shuler y Kargi, 1992; Spencer y Rhodes, 1993) no obstante, hay ocasiones que la síntesis se produce desde el inicio del crecimiento (Mantell y Smith, 1983; Park y Choi, 1999).

Sesquiterpenos obtenidos, sin la adición del homogenado (B5).



Sesquiterpenos obtenidos, con la adición del homogenado (B5H).

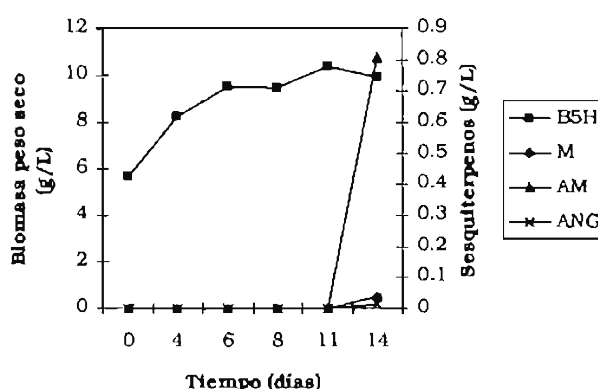


Figura 28. Cinética de crecimiento y acumulación de los sesquiterpenos, en los cultivos en suspensión sin el homogenado (B5) y con el homogenado (B5H), en medio de cultivo B5. Maturinina (M), acetato de matorina (AM) y angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol (ANG).

En esta investigación, la adición del homogenado favoreció la producción del acetato de matorina de 0.24 gL^{-1} a 0.81 gL^{-1} , no así de la maturinina y el angelato de 3-4 dehidro 14-maturinol.

Esto demuestra que la elicitación como una estrategia para la producción de compuestos secundarios es un proceso factible (Brooks y Watson, 1991; Reil y Berger, 1996; Sudha y Ravishankar, 2002; Hahlbrock y col. 2003). Además del empleo del homogenado en una concentración de 30 mg/L de cultivo celular, semejante concentración utilizada del homogenado en los experimentos de Reil y Berger (1996) con la planta de perejil (*Petroselinum crispum*).

7. Conclusiones.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

1. Purificación e identificación de los sesquiterpenos maturinina (4), acetato de maturina (5b) y angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol (8) del extracto hexánico de las raíces de *Psacalium peltatum*. Los sesquiterpenos maturinina y el acetato de maturina, estaban ya descritos para *Psacalium decompositum*.
2. El acetato de maturina presentó actividad antiinflamatoria con un porcentaje de inhibición del 95.41%.
3. El 3-4 dehidro-14-maturinol, se presentó como una nueva estructura química que no había sido descrita.
4. Obtención de dos cultivos de callo, el de color negro y blanco mediante el medio de cultivo MSC1, empleando como explante hojas jóvenes.
5. Proliferación del cultivo de callo blanco mediante el medio de cultivo MSC2, modificado en la concentración de nitratos de 39 mM a 19.5 mM.
6. Establecimiento y proliferación del cultivo de células en suspensión del callo blanco mediante el medio de cultivo MSB en un intervalo de crecimiento de 12 y 14 días.
7. Proliferación de los cultivos de células en suspensión del callo blanco con la adición del homogenado en medio MSB en un intervalo de crecimiento de 14 días.
8. No se identificó ningún sesquiterpeno mediante CCF en los cultivos de callo blanco y negro con medio MSC1 y en los cultivos de células en suspensión con los medios de cultivo MSC1, MSC2 y MSB adicionados con el homogenado de *Aspergillus niger*.
9. Identificación de los sesquiterpenos mediante HPLC en el cultivo de callo blanco con medio MSC2 y en el cultivo de células en suspensión en medio de cultivo B5 con y sin la adición del homogenado.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

-
10. Concentración obtenida del acetato de maturina y de la maturinina en los cultivos de callo blanco en medio MSC2 y en los cultivos de células en suspensión superior a lo obtenido de las raíces *in vivo*.
 11. Concentración obtenida del angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol de las raíces *in vivo* superior a lo obtenido en el cultivo de callo blanco en medio MSC2 y del cultivo de células en suspensión con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*.
 12. Incremento en la concentración del acetato de maturina de 0.2407 a 0.810 PS gL⁻¹ en los cultivos de células en suspensión con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*.
 13. Disminución en la concentración de la maturinina y del angelato de 3-4 dehidro-14-maturinol en los cultivos de células en suspensión con la adición del homogenado de *Aspergillus niger*.

8. Perspectivas.

Considerando que no existen reportes del establecimiento de los cultivos *in vitro* para la producción de sesquiterpenos de interés farmacológico en las especies que comprenden el complejo matarique, entonces las perspectivas que a futuro se plantean realizar en relación con el presente trabajo de investigación son:

En relación a *Psacalium peltatum*:

- a) Alcanzar incrementos mayores en la producción del sesquiterpeno de interés farmacológico obtenido de manera constante y en cantidad suficiente en los cultivos en suspensión de *Psacalium peltatum*, utilizando además del homogenado de *Aspergillus niger* otros homogenados fúngicos y la modificación en el tipo y concentración de fitorreguladores y componentes de los medios de cultivo seleccionados.
- b) Una vez optimizadas las condiciones de crecimiento y de producción de los sesquiterpenos en los cultivos de células en suspensión de *Psacalium peltatum*, entonces se podría considerar la posibilidad de escalar la producción empleando los bioreactores con capacidad de 1 ó 10 L.

En relación a las especies asociadas del complejo matarique:

- a) Realizar la identificación, purificación y evaluación del rendimiento del sesquiterpeno de interés farmacológico identificado en *Psacalium peltatum* con las especies asociadas del complejo matarique.
- b) Iniciar el establecimiento de los cultivos de callo y de células en suspensión de las especies asociadas del complejo matarique, analizando el contenido del sesquiterpeno de interés farmacológico mediante la adición de inductores bióticos como los homogenados de hongos.

9. Bibliografía.

- Abad M.J., Bermejo P., Valverde S. y Villar A. 1994. Antiinflammatory activity of hydroxyachillin, a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*. *Planta Medica* 60(3):228-231.
- Alarcón-Aguilar F.J., Román-Ramos R., Jiménez-Estrada M., Reyes-Chilpa R., González-Paredes B. y Flores-Saenz J.L. 1997. Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 55:171-177.
- Anaya A.L., Hernández-Bautista B. E., Torres-Barragán A., León-Cantero J. y Jiménez-Estrada M. 1996. Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the rotos of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. and Brettell (Asteraceae), Matarique or Maturin. *Journal of Chemical Ecology* 22 (3): 393-406.
- Asakawa Y., Takahashi H. y Toyota M. 1991. Biotransformation of germacrane_type sesquiterpenoids by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* 30(12): 3993-3997.
- Ascensao L. y Pals M.S. 1998. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: Histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany* 81:263-271.
- Balandrín M.F., Klocke J.A., Wurtele E.S. y Bollinger W. H. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228: 1154-1160.
- Banthorpe D.V. 1996. Terpenoids. En: Mann J., Davison R.S., Hobbs J.B., Banthorpe D.V. y Harbone J.B. (Eds.). *Natural Products their Chemistry and Biological Significance*. Addison Wesley Longman. U.K. p. 289-358.
- Bargabus R.L., Zidack N.K., Sherwood J.E. y Jacobsen B.J. 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic phyllosphere colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61:289-298.
- Barkley T. M., Clark B.L. y Funston A.M. 1996. The segregate genera of *Senectio sensu lato* and *Cacalia sensu lato* (Asteraceae: senecioneae) in Mexico and Central America. En: Hind, D.J.N. y Beentje, H.J. (Ed.). *Compositae: Systematics*. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew 1994. Royal Botanical Gardens, Kew 1:613-620.
- Barz W. y Mackenbrock U. 1994. Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpan in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38: 199-211.

-
- Bennett J. W. 1985. Molds, manufacturing and molecular genetics. En: *Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. Ed. Timberlake W. Alan R. Liss. New York. p. 345-365.
- Blechert S., Brodschelm W., Holder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Mueller M.J. Xia, Z.-Q. y Zenk. M.H.1995. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92: 4099-4105.
- Berglund T. y Ohlsson A. 1995. Defensive and secondary metabolism in plant tissue cultures, with special reference to nicotinamide, glutathione and oxidative stress. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 137-145.
- Bohlmann F. y Zdero C. 1978a. New cacalol derivatives from *Roldana heterogama*. *Phytochemistry* 17: 565-566.
- Bohlmann F. y Zdero C. 1978b. New Norsesquiterpenes from *Senecio digitalifolius*. *Phytochemistry* 17: 759-761.
- Bohlmann F., Zdero C., Berger D., Suwita A., Mahanta P. y Jeffrey C. 1979. Neue furanoeremophilane und weitere inhaltsstoffe aus Südafrikanischen *Senecio*-arten. *Phytochemistry* 18: 79-93.
- Bohlmann F. y Bapuji M. 1982. Cacalol derivatives from *Senecio Lydenburgensis*. *Phytochemistry* 21: 681-683.
- Bohlmann F., Dupré S. y Nordenstame B. 1990. Cacalol derivatives from Dominican *Senecio* species. *Phytochemistry* 29:3163-3165.
- Bohlmann J. y Ellert U. 1994. Elicitor induced secondary metabolism in *Ruta graveolens* L. Role of chorismate utilizing enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38:189-198.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. y Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
- Bork P.M., Schmitz M.L., Kuhnt M., Escher C. y Heinrich M. 1997. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitor of transcription factor NF-kappa B. *FEBS letters* 402(1):85-90.
- Bostock R. M., Laine R. y Kuc A. 1982. Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentaenoic and arachidonic acids in potato. *Plant Physiology* 70:1417-1424.
- Brooks C. J. W. y Watson D.G. 1991. Terpenoid phytoalexins. *Natural Product Report* 8:367-389.

-
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosy. Phytochemistry Medicinal Plants. Ed. Lavoisier, Paris. 1119 pp.
- Bruno M., Maggio A., Arnold N., Díaz J. y Herz, W. 1998. Sesquiterpene lactones from *Anthemis plutonia*. *Phytochemistry* 49(6): 1739-1740.
- Burbidge A, Fowler M.R., Hunter C.F., Rayns F.W. y Scragg A.H. 1993. *In Vitro* Cultivation of Plant Cells. Ed. Butterworth-Heinemann, Oxford. 200 pp.
- Bye R., Linares E. y Estrada. 1995. Biological diversity of medicinal plants in Mexico. En: J.T. Arnason et al. (Eds). *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press, New York. 65-82 pp.
- Cane D. E. 1999. Sesquiterpene Biosynthesis. En: S. D. Barton et al. (Eds.). *Comprehensive Natural Products Chemistry*. 156-197 pp.
- Conrath U., Domard A., Kauss, H. 1989. Chitosan-elicited synthesis of callose and coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Report* 8:367-389.
- Correa J. y Romo J. 1966. The constituents of *Cacalia decomposita* A. Gray. Structures of maturin, maturinin, maturone and maturinone. *Tetrahedron* 22: 685-691.
- Cosio E. G., Feger M. y Millar C.J. 1996. High affinity binding of fungal β -glucan to cell membranes of species of the plant family *Fabaceae*. *Planta* 92-99.
- Creelman R. y Mullet J. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92: 4114-4119.
- Dangl J. 1998. Plants just say no to pathogens. *Nature* 394:525-527.
- Delledonne M., Xila Y., Dixon R. y Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588.
- Demyttenaere J.C.R. y Willemsen H.M. 1998. Biotransformation of linalol to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* 47(6):1029-1036.
- Dewick M. P. 1998. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. John Wiley and Sons. (Eds.). U.K. 152-264 pp.
- DiCosmo F. y Misawa M. 1995. Plant Cell and Tissue Culture: Alternatives for Metabolite Production. *Biotechnology Advances* 13(3):425-453.

-
- Dixon R.A. 2001. Natural Products and Plant Disease Resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Dixon R. 1991. Plant Cell Culture. The practical approach. Series Oirl Press. Oxford, England. 15-20, 91-96, 127-164 pp.
- Dixon R.A., Harrison M.J. y Paiva N.L. 1995. The isoflavonoid pathway: from enzymes to genes to transcription factors. *Physiology Plant* 93:385-392.
- Doe M., Hirai Y., Kinoshita T., Shibata K., Haraguchi H. y Morimoto Y. 2004. Structure, synthesis, and biological activity of 14-methoxy-1,2-dehydrocactalol methyl ether, a new modified furanoeremophilane type sesquiterpene from *Trichilia cuneata*. *Chemistry Letters* 33(6):714-715.
- Dörnenburg H. y Knorr D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 17:674-684.
- Eilert U. 1987. Elicitation: Methodology and Aspects of Application. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol. 4. Academic Press, Inc. 154-196 pp.
- Eisner T. y Meinwald J. 1995. Chemical ecology. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92 (1):1.
- Eisenreich W., Menhard B., Hylands P. J., Zenk M. H., y Bacher A. 1996. The mevalonic acid pathway. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93: 6431.
- Facchini P. y Chapell J. 1992. Gene family for an elicitor- induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89:11088-11092.
- Fowler M.R. y Rayns F.W. 1993. The language and aims of plant cell and tissue culture (PTC) *in vitro*. En: Burbidge A., Fowler M.R., Hunter C.F., Rayns F.W. y Scragg A.H. (Eds.). *In vitro Cultivation of Plant Cells*. Butterworth-Heinemann Ltd. U.K. 1-17, 131-150 pp.
- Fraga B.M. 1998. Natural sesquiterpenoids. *Natural Products Reports* 15(1):73-92.
- Franceschi V.R. y Grimes H.D. 1991. Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 88:6745-6749.
- Fritig B., Heitz T. y Legrand M. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* 10:16-22.

-
- Fu X.-Q. y Lu D.-W. 1999. Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and *in situ* extraction in suspension cultures of *Arnebia euchroma*. *Enzyme and Microbial Technology* 24:243-246.
- Funk C., Gügler K. y Brodelius P. 1987. Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry* 26(2):401-405.
- Galiana E., Bonnet P., Conrod S., Keller H., Panabieres F., Pinchet A. y Ricci P. 1997. Rnase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiology* 115:1557-1567.
- Gamborg, O.L., Miller R.A. y K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Garduño-Ramírez M.L., Trejo A., Navarro V., Bye R., Linares E. y Delgado G. 2001. New modified eremophilanes from the roots of *Psacalium radulifolium*. *Journal of Natural Products* 64:432-435.
- George E.F. y Sherrington P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics Limited. England. 690 pp.
- Gerats M.G.A., Haring M., Huttinga H., Jacobebesen E., Koornneef M., Puit J., Stiekemena J.W., Struik C.P., Visser L., Vlak M.J. y Van Vloten-Doting L. 1991. Plant Tissue Culture. En: Butterworth-Heinemann (Ed.) *Biotechnological Innovations in Crop Improvement*. U.K. 66-114 pp.
- Gershenzon J. y Kreis W. 1999. Introduction: Biochemistry, Role and Biotechnology of Secondary Metabolites. *Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes, Sterols, Cardiac glycosides and Steroid Saponins*. En: Wink M. (Ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Review, Volume 2. CRC Press. U.K. 1-15, 222-299 pp.
- Goddijn O.J.M. y Pen J. 1995. Plants as bioreactors. *TIBTECH* 13:440-448.
- Godoy-Hernández G. y Loyola-Vargas V.M. 1991. Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 10:537-540.
- Hahlbrock K., Bednarek P., Ciolkowski I., Hamnerger B., Heise A., Liedgens H., Logemann E., Nürnberger T., Schmelzer E., Somssich I.E. y Tan J. 2003. Non-self recognition, transcriptional reprogramming and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 100(2):14569-14576.

-
- Hahlbrock K., Scheel D., Legermann E., Nürnberger T., Parniske M., Reinold S., Sacks W. y Schmelzer E. 1995. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92:4150-4157.
- Hahlbrock K. y Scheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:347-369.
- Hahn M. G., Darvill A., Albersheim P., Bergmann C., Cheong J.-J., Koller A. y Lò V.-M. 1992. Preparation and characterization of oligosaccharide elicitors of phytoalexin accumulation. En: Gurr S.J., McPherson M.J. y Bowles D.J. (Eds.). *Molecular Plant Pathology. A Practical Approach*. Vol. II. IRL Press. Oxford University. 103-158 pp.
- Hammond-Kosack K. y Jones J.D.G. 2000. Responses to plant pathogens. Chapter 21. En: Buchanan B.B., Gruissem W. y Jones R. L. *Biochemistry and molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. U.S.A. 1102-1156 pp.
- Harborne B.J. 1991. The Terpenoids. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall Publishers (Ed.). Hong Kong. 100-141 pp.
- Heldt H.W. 1997. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Institute of Oxford University Press (Ed.). Oxford. 360-377 pp.
- Hernández-Tejeda A. M. 1999. Inducción de un cultivo en suspensión y micropropagación de *Psacalium peltatum*, planta silvestre utilizada para el control de la diabetes. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- Herrera T. y Ulloa M. 1998. El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. Fondo de Cultura Económica. UNAM. 522 pp.
- Holden P. y Yeoman M. 1994. Variation in the growth and biosynthetic activity of cloned cell cultures of *Capsicum frutescens* and their response to an exogenously supplied elicitor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38:31-37.
- Inman, W.D., Luo J., Jolad S.D., King S.R. y Cooper R. 1996. Antihyperglycemic sesquiterpenes from *Psacalium decompositum*. *Journal of Natural Product* 62:1088-1092.
- Islam A.S. 1996. Production of secondary metabolites through tissue cultures and its prospects for commercial use. En: Islam A.S. (Ed.). *Plant Tissue Culture*. Science Publishers. U.S.A. 161-168 pp.
- Jiménez-Estrada M., Cruz R., Valdez J., Leon J., Alarcón G. y Svestarova B. 1992. Actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados. *Revista Latinoamericana de Química* 22:14-17.

-
- Kapadia G., Ramdass A. y Bada F. 1990. Pyrrolizidine alkaloids of *Senecio glabellus*. *International Journal of Crud Drug Research* 28:67-71.
- Komaralah P., Naga Amrutha R., Kawi Kishor P.B. y Ramakrishna S.V. 2002. Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 634-639.
- Kiran I. H.N. Yildirim., J.R. Hanson y P.B. Hitchcock. 2004. The antifungal activity and biotransformation of disliphorone by the fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79:1366-1370.
- Kolattukudy P., Rogers L., Li D., Hwang C. y Flaishman M. 1995. Surface signaling in pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92:4080-4087.
- Lawton M.A., Dixon R.A. Hahlbrock K. y Lamb C.J. 1983. Elicitor induction of mRNA activity: rapid effects of elicitor on phenylalanine ammonialyase and chalcone synthase mRNA activities in bean cells. *Europe Journal of Biochemistry* 131-139.
- Linares E. y Bye Jr. R.A. 1987. A study of four medicinal plant complexes of México and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*. 19:171-173.
- Linden J.C., Haigh J.R. Mirjalili N. y Phisalaphong M. 2001. Gas concentration effects on secondary metabolite production by plant cell cultures. *Advance of Biochemistry and Engineering Biotechnology* 72:28-62.
- Lindsey K. y Jones M.G. K. 1989. La biología de las células vegetales cultivadas. En: Lindsey K. y Jones M.G. K. (Eds.). *Biología Vegetal Agrícola*. Acriba (Ed.). 17-38 pp.
- Lichtenthaler H.K., Rohmer M. y Schwender J. 1997. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiología Plantarum* 101:643-652.
- Lichtenthaler H.K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:47-65.
- Londoño M. y Pérez M. 1994. Reconocimiento de los enemigos naturales de la chisa o mojoyoy (Coleoptera: *Scarabaeidae*) en el oriente Antioqueño. En: *Revista Colombiana de Entomología* Medellín, Colombia. 20 (3): 199-206.
- Londoño M. 1995. Estrategia para el manejo de las chisas (Col: *Scarabaeoidea*) en Antioquia. En: SIMPOSIO NACIONAL DEL CRISANTEMO (2:1995: Antioquia). Memorias II Simposio Nacional del Crisantemo. A SOCOLFLORES. 85 pp.

-
- Luckner M. 1984. Secondary metabolism in microorganisms, plant and animals. Springer-Verlag. (Ed.). 199-256 pp.
- Manitto P. 1981. Biosynthesis of natural products. John Wiley and Sons. (Eds.). U.S.A. 213-295 pp.
- Mantell, S. H. y Smith, H. 1983. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. En: S.H. Mantell and H. Smith (Eds). Plant Biotechnology. Cambridge Univ. Press. U.K. 75-108 pp.
- Marero L.M., Hyeong Jin J., Han Shin J., Jae Lee H., Sik Chung I. y Joo Lee H. 1997. Effect of fungal elicitation on indirubin production from a suspension culture of *Polygonum tinctorium*. *Enzyme and Microbial Technology* 21:97-101.
- Meinwald J. Huang Q., Herath K.B. Yang Z.C., Shroeder F., Attygalle A.B., Iyengar V.K., Morgan R.C. y Eisner T. 1998. Mirasorvone: a masked 20-ketopregnane from defensive secretion of a diving beetle (*Thermonectus marmoratus*). *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 17:95(6): 2733-2737.
- Morón M.A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología distribución y sistemática supraespecífica (Insecta Coleoptera). México D.F. Instituto de Ecología. 341 p. (publ. no. 20).
- Morris P., Scragg A. H., Smart N. J. y Stafford A. 1985. Secondary product formation by cell suspension cultures. En: R.A. Dixon (Ed.). Plant Cell Culture – A Practical Approach. IRL Press, Oxford. 127-167 pp.
- MuKundan U., Hjortso M.A. 1990. Effect of fungal elicitors on thiophene production in hairy root cultures of *Tagetes patula*. *Applied Microbiology Biotechnology* 33:145-147.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ni W., Fahrendorf T., Ballance G.M. Lamb C.J. y Dixon R.A. 1996. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XX. Transcriptional activation of phenylpropanoid pathway genes in elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology* 30:427-438.
- Park Y.G. y Choi M.S. 1999. XX *Phellodendron amurense* (Cork Tree) : *In vitro* culture, micropropagation, and the production of berberine. En: Medicinal and Aromatic Plants XI. Ed. By Y.P.S. Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 43:337-349.

-
- Payne E. G., Bringl V., Prince, C. L. y Schuler M.L. 1992. Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems. John Wiley and Sons (Eds), U.S.A. New York. 25-39, 147-163, 329-335 pp.
- Pedapudi S., Chhn C-K. y Pedersen H. 2000. Production and elicitation of benzalacetone and the raspberry ketone in cell suspension cultures of *Rubus idaeus*. *Biotechnology Progress* 16:346-349.
- Pérez-Castorena A.L., Arciniega A., Villaseñor J.L. y Romo de Vivar A. 2004. Furanoeremophilane derivatives from *Psacalium beamanii*. *Revista de la Sociedad de Química Mexicana* 48:21-23.
- Peters N. y Verma D. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3:4-8.
- Plaa G. 1991. Toxic responses of the liver. En: Amdur, M., Doull, J. and Kaassen, C. (Eds.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Pergamon Press, New York. 345 pp.
- Pierik R. L. M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers (Ed). The Netherlands. 21-30 pp.
- Pippen R.W. 1968. Mexican "cacalioid" genera allied to *Senecio* (Compositae). *Contribution from United State National Herbarium* 34:365-447.
- Prome J. 1996. Signalling events elicited in plants by defined oligosaccharide structures. *Current Opinion in Structural Biology* 6:671-678.
- Qian Z-G., Zhao Z-J., Tian W-h., Xu Y., Zhong J-J y Qian X. 2004. Novel synthetic jasmonates as highly efficient elicitors for taxoid production by suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 86(5):595-599.
- Ramos-Valdivia A., Heijden R. y Verpoorte R. 1997. Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. *Natural Product Report* 14(6):651-603.
- Ravishankar G.A. y Rao S.R. 2000. Biotechnological production of phytopharmaceuticals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology and Biophysics* 4:73-102.
- Ren Y. y West C. 1991. Elicitation of Diterpene Biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant of Physiology* 99:1169-1178.
- Reil G y Berger R. G. 1996. Elicitation of volatile compounds in photomixotrophic cell culture of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46:131-136.

-
- Rijhwani S.K. y Shanks J.V. 1998. Effect of elicitor dosage and exposure time of biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnology Progress* 14:442-449.
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutler B. y Sahn H. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemistry* 1 295:517-524.
- Roman-Ramos, R., flores-Saenz, J.L., Partida-Hernandez, G., Lara-Lemus, A., Alarcon-Aguilar, F. 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica* 22:87-93.
- Roman-Ramos, R., Lara, A., Alarcon-Aguilar, F., Flores, J.L. 1992. Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Archives of Medical Research* 23:105-109.
- Romo J. y Joseph-Nathan P. 1964. The constituents of *cacalea decomposita*. A. Gray. Structures of cacalol and cacalome. *Tetrahedron* 20:2331-2337.
- Robinson H. y Brettell R.D. 1973. Studies in the Senecioneae (Asteraceae). III. The Genus *Psacallum*. *Phytologia* 27(4): 254-264.
- Rzedowski J. y Rzedowski G. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol. II. Instituto Nacional de Ciencias Biológicas del IPN e Instituto de Biología de la UNAM. México. 596 pp.
- Saad I., Díaz E., Chávez I., Reyes-Chilpa R., Eubluo A y Jiménez-Estrada M. 2000. Antifungal monoterpene production in elicited cell suspension cultures of *Piqueria trinervia*. *Pytochemistry* 55: 51-57.
- Scragg H.A. 1994. Commercial and Technical Perspectives. En: Hunter F.C. (Ed.). *In Vitro Cultivation of Plant Cells*. Butterworth-Heinemann. U.K. 151-178 pp.
- Scragg H.A. 1995. The problems associated with high biomass levels in plant cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 163-170.
- Schmidt W.E. y Ebel J. 1987. Specific binding of a fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 84:4117-4121.
- Shuler L.M. y Hallsby G.A. 1985. Bioreactor considerations for chemical production from plant cell cultures. En: Zaitlin M, Hollaender A. (Eds.). *Biotechnology in Plant Science*. Academic Press. U.K. 191-206 pp.
- Shuler L.M. y Kargl F. 1992. *Bioprocess Engineering. Basic Concepts*. Amundson R.N. (Ed.). Prentice Hall (Ed.). U.S.A. 232-264 pp.
-

-
- Smith R.H. 2000. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. 2a. Ed. Academic Press (Ed.). U.S.A. 60-68 pp.
- Staniszewska I., Krölicka A., Malinski E., Lojkowska E. y Szafranek J. 2003. Elicitation of secondary metabolites in in vitro cultures of *Artemisia annua* L. *Enzyme and Microbial Technology* 33:565-568.
- Spencer A. Hamill D.J. y Rhodes C.J. 1993. In vitro biosynthesis of monoterpenes by *Agrobacterium* transformed shoot cultures of two *Mentha* species. *Phytochemistry* 32(4):911-919.
- Stowe M.K. Turling T.C., Loughrin J.H. Lewis W.J. y Tumlinson J.H. 1995. The chemistry of eavesdropping, alarm and deceit. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* Jan. 3 92(1): 23-28.
- Sudha G. y Ravishankar G. A. 2002. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 181-212.
- Sy L. y Brown G. 1999. Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisa annua* and *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* 50(5): 781-785.
- Tamari G., Borochoy A., Alzom R. y Weiss D. 1995. Methyl jasmonate induces pigmentation and flavonoid gene expression in petunia corollas: a possible role in wound response. *Physiologia Plantarum* 94:45-50.
- Tan R. X., Tang H.Q., Hu J. y Shuai B. 1998. Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisa sieversiana* and *Inula racemosa*. *Phytochemistry* 49(1):157-161.
- Tanaka, H. 1981. Technological problems in cultivation of plant cells at high density. *Biotechnology and Bioengineering*. 23:1203-1218.
- Talbot L. y Zeiger E. 2002. Chapter 13. Secondary Metabolites and Plant Defense. En: Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates. Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 285-308 pp.
- Torres C. 1988. Tissue culture techniques for horticultural crops. Van Nostrand Reinhold, N.Y. 27-51 pp.
- Turlings T.C. Loughrin J.H., McCall P.J., Rose W.S., Lewis W.J. y Tumlinson J.H. 1995. How the caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 9,92(10): 4169-4174.

-
- Turner Billie L. y Neson G. L. 1998. Biogeografía, diversidad y situación de peligro o amenaza de *Asteraceae* de México. En: T.P. Ramamoorthy., R. Bye., A. Lot y J. Fa (Compiladores), *Diversidad Biológica de México. Origen y distribución*. Instituto de Biología. UNAM. México. 545-561 pp.
- Tyler R.T., Ellert U., Rijnders C.O.M., Roewe I.A., McNabb C.K. y Kurz W. G. W. 1989. Studies on Benzophenanthridine alkaloid production in elicited cell cultures of *Papaver somniferum* L. En: Kurz W.G.W. (Ed.). *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Berlin: Springer-Verlag. 200-207 pp.
- Vasil, I. 1994. Automation of plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9: 105-108.
- Vallejo F. 1997. Contribución al conocimiento de las plagas subterráneas (chisas) (COLEOPTERA: *Scarabaeoidea: Melolonthidae*) del oriente de Antioquia. Colombia. Medellín. Tesis (M. Sc. En Entomología). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias y Ciencias Agropecuarias.
- Villarreal M.L., Rojas G, Meckes M, Nicasio P. 1993. Studies on *Mimosa tenuiflora* callus culture. Interaction of kinetin and 2,4 -dichlorophenoxyacetic acid in initiation and growth. *Biotechnology Letters* 15:721-726.
- Villaseñor J.L. 1993. La Familia *Asteraceae* en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* Vol. Esp. XLIV: 117-124.
- Waller G.R., Meow-Chang F. y Yoshiharu F. 2001. Análisis bioquímico de los metabolitos secundarios de plantas, microorganismos y suelo. En: Anaya A.L., Espinoza-García F. y Cruz-Ortega R. (Coord.). *Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Plaza y Valdes (Edit.) 163-230 pp.
- Walsh T.J. y Pizzo P.A. 1988. Nosocomial fungal infections: a classification for hospital acquired fungal infections and mycoses arising from endogenous flora or reactivation. *Annual Review of Microbiology* 42:517-545.
- Wink M. 1987. Physiology of the Accumulation of Secondary Metabolites with Special Referente to Alkaloids. En: Constabel F. y Vasil I. (Eds.). *Cell Culture and Somatic Cell genetics of Plants*. Academic Press. U.S.A. 17-42 pp.
- Wink M. 1990. Physiology of Secondary Product Formation in Plants. En: Charlwood B. y Rhodes E.J.M. (Eds.). *Secondary Products from Plant Tissue Culture*. Oxford Sc. Publishers. U. K. 23-42 pp.
- Yang Y. Shah J. y Klessig D. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes and Development* 11:1621-1639.

-
- Yoshikawa M., Hatakeyama S., Inoue I. y Yamahara J. 1993. Saussureamines A,B,C,D and E, new antiulcer principles from chinese *Saussureae radix*. *Chemistry of Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo). 41(1):214-216.
- Zenk M.H. 1991. Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cell culture as a pot of gold. *Phytochemistry* 30:3861-3863.
- Zhao J., Zhu W-H., y Hu Q. 2000. Enhanced ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment: from shake-flask to 20-l airlift bioreactor. *Biotechnology Letters* 22:509-514.
- Zhao J., Zhu W-H., y Hu Q. 2001. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 28:666-672.
- Zhang S., Zhao G., Li R., y Lin G. 1998. Eremophilane sesquiterpenes from *Cacalia roborowskii*. *Phytochemistry* 48(3):519-524.
- Zhu W., Asghari G y Lockwood. 2000. Factors affecting volatile terpene and non-terpene biotransformation products in plant cell cultures. *Fitoterapia* 71:501-506.

Medios de cultivo.

1.a. Medios de cultivo MSC1 y MSC2.

Constituidos por todos los macronutrientes y micronutrientes del medio MS, excepto los de la solución I de nitratos que se presentó a la mitad de la concentración para el MSC2.

Los fitorreguladores, vitaminas y el compuesto orgánico que se utilizaron se enlistan a continuación:

Fitorreguladores para MSC1 y MSC2:

Compuesto	PM	mgL ⁻¹	µM
2,4 D	221.04	2	9.04
BAP	225.3	0.3	1.3

Mezcla de aminoácidos y vitaminas denominado cóctel 20 (C20) para MSC1 y MSC2:

Compuesto	PM	mgL ⁻¹	µM
L-asparagina	150.1	10	66.62
L-arginina	174.2	10	57.40
L-aspártico	133.1	7.5	56.35
Glicina	75.07	23	306.38
Glutamina	146.1	60	410.67
Ac. Glutámico	147.1	7.5	51
Biotina	244.3	1	4.10
Ac. Fólico	441.4	1	2.26
Ac. Nicotínico	123.10	1.5	12.18
Piridoxina	205.60	1.5	7.30
Tiamina	337.30	3	8.90
Riboflavina	376.4	0.1	0.26
Myo-inositol	180.16	145	804.84
Urea	60.06	45	749.25

Compuesto orgánico para MSC1 y MSC2:

Compuesto	PM	mgL ⁻¹	µM
Sulfato de adenina	184.20	10	543.0

Para preparar 1L de medio de cultivo de MSC1 o MSC2, se disuelven 30 gL⁻¹ de sacarosa y se adicionan 10 mL de cada una de las soluciones 100 X de las sales del medio MS, así como de fitorreguladores, vitaminas y el compuesto

orgánico, se ajustó el pH a 5.7, se adiciona el gelificante, se clarifica el medio y se vierte en los frascos para ser esterilizados.

1.b. Medios de cultivo MSB y B5.

El medio de incremento de biomasa (MSB), fue semejante al medio MSC2, en relación a la concentración a la mitad de la solución I de nitratos, así como por la adición de diferentes fitorreguladores y vitaminas comparados con el medio B5 que se enlista a continuación:

Mezcla de vitaminas denominado R2:

Compuesto	PM	MSB mgL ⁻¹ (mM)	B5 mgL ⁻¹ (mM)
Tiamina	337.3	0.10 (0.3)	10.0 (30)
Piridoxina	205.6	0.50 (2.4)	0.1 (0.45)
Ac. Nicotínico	123.1	0.50 (4.1)	1.0 (8.2)
Myo-inositol	180.2	100.0 (554)	100.0 (554)
Glicina	75.07	2.0 (26.6)	-

Fitorreguladores:

Compuesto	PM	MSB mgL ⁻¹ (μM)	B5 mgL ⁻¹ (μM)
2,4 D	221.04	-	1(4.52)
ANA	186.2	-	0.5 (2.68)
AIA	175.2	1(5.70)	0.5 (2.85)
BAP	225.3	0.3 (1.33)	0.3 (1.33)

Para preparar 1L de medio de cultivo MSB o B5, se disolvieron 30 gL⁻¹ de sacarosa y se adicionaron 10 mL de cada una de las soluciones 100 X de las diferentes soluciones de las sales del medio de cultivo base MS y B5, así como de las mezclas de vitamina R2 y fitorreguladores, se ajustó el pH a 5.7 y se vertió 60 mL de medio a matraces Erlenmayer de 125 mL, tapándolos con tapones de algodón y papel aluminio. Después se esterilizó en autoclave durante 18 min.

Resumen del fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto hexánico de *Psacalium peltatum*.

1. Eluyente: Hexano
 Proporción: 100
 Volumen de fracción (mL): 20
 Fracciones: Combinadas (C) y Recogidas (R).

C	R
1-20	26
21-39	29
40-49	40

2. Eluyente: Hexano: Acetato de etilo
 Proporción: 98:2
 2.1 Volumen de fracción (mL): 20
 Fracciones: Combinadas (C) y Recogidas (R).

C	R	C	R	C	R	C	R
67-69	67	107-114	108	166-177	168	241-245	243
70-74	70	115-125	116	178-180	178	246-251	246
75-82	75	126-129	129	181-190	183	252-261	261
83-86	83 *	130-132	131	191-202	191	262-269	262
87-89	87	133-136	133	203-213	203	270-271	270
90-94	90	137-148	139	214-220	215	272-273	273
95-96	95	149-152	151	221-228	226	274-275	275
97	97	153-160	160	229-232	231	276-287	281
98-99	99	161-162	162	233	233	289-295	292
100-106	106	163-165	165	234-240	238		

2.2 Volumen de fracción (mL): 50
 Fracciones: Combinadas (C) y Recogidas (R).

C	R	C	R	C	R
296-297	296 *	312-316	312	339-340	340
298-301	298	317-322	319	341-365	350 *
302-304	302	324-325	324	366-379	371
305-308	305	326-333	326	380-381	381
309-311	309	334-338	334	382-387	383

3. Eluyente: Hexano: Acetato de etilo
 Proporción: 95:5
 Volumen de fracción (mL): 100
 Fracciones: Combinadas (C) y Recogidas (R).

C	R	C	R	C	R	C	R
1-4	1	7-8	7	18-21	18	27-30	27
5-6	5	9-17	9	22-26	22	31-39	31

4. Eluyente: Hexano: Acetato de etilo
 Proporción: 90:10
 Volumen de fracción (mL): 200
 Fracciones: Combinadas (C) y Recogidas (R).

C	R	C	R	C	R
1	1	7-8	7	26-30	26
2	2	9-10	10	31-35	31
3-4	3	11-15	11	36-40	40
5-6	6	16-24	16		

5. Eluyente: Hexano: Acetato de etilo
 Volumen de fracción (mL): 200
 Proporción:

80:20	70:30	50:50	30:70	20:80	10:90
-------	-------	-------	-------	-------	-------

Fracciones: Combinadas (C) y Recogidas (R).

C	R	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R
1-12	1-12	1-2	1	1-2	1	1-3	1-3	1-6	1	1	1
13-17	13	3	3	3-4	3	4-10	4	7-8	7-8	2-10	2
				5-10	5			9-10	9		

6. Eluyente:

Acetato de etilo	Acetato de etilo:Metanol	Metanol
------------------	--------------------------	---------

Volumen de fracción (mL): 200
 Proporción:

100	90:10	100
-----	-------	-----

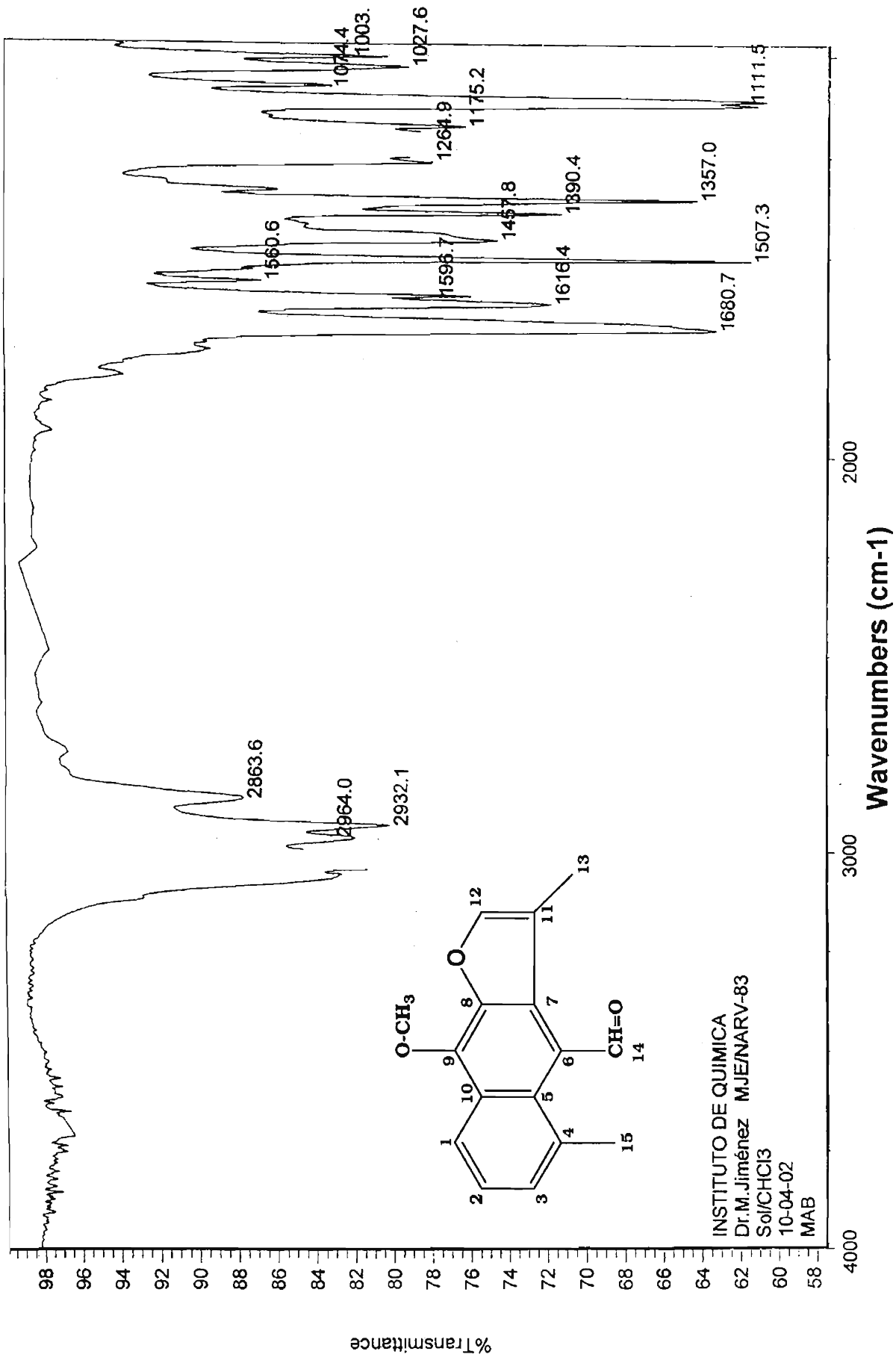
Fracciones: Combinadas (C) y Recogidas (R).

C	R	C	R	C	R
1	1	1-16	1	1-5	1
2-10	2				

Espectros.

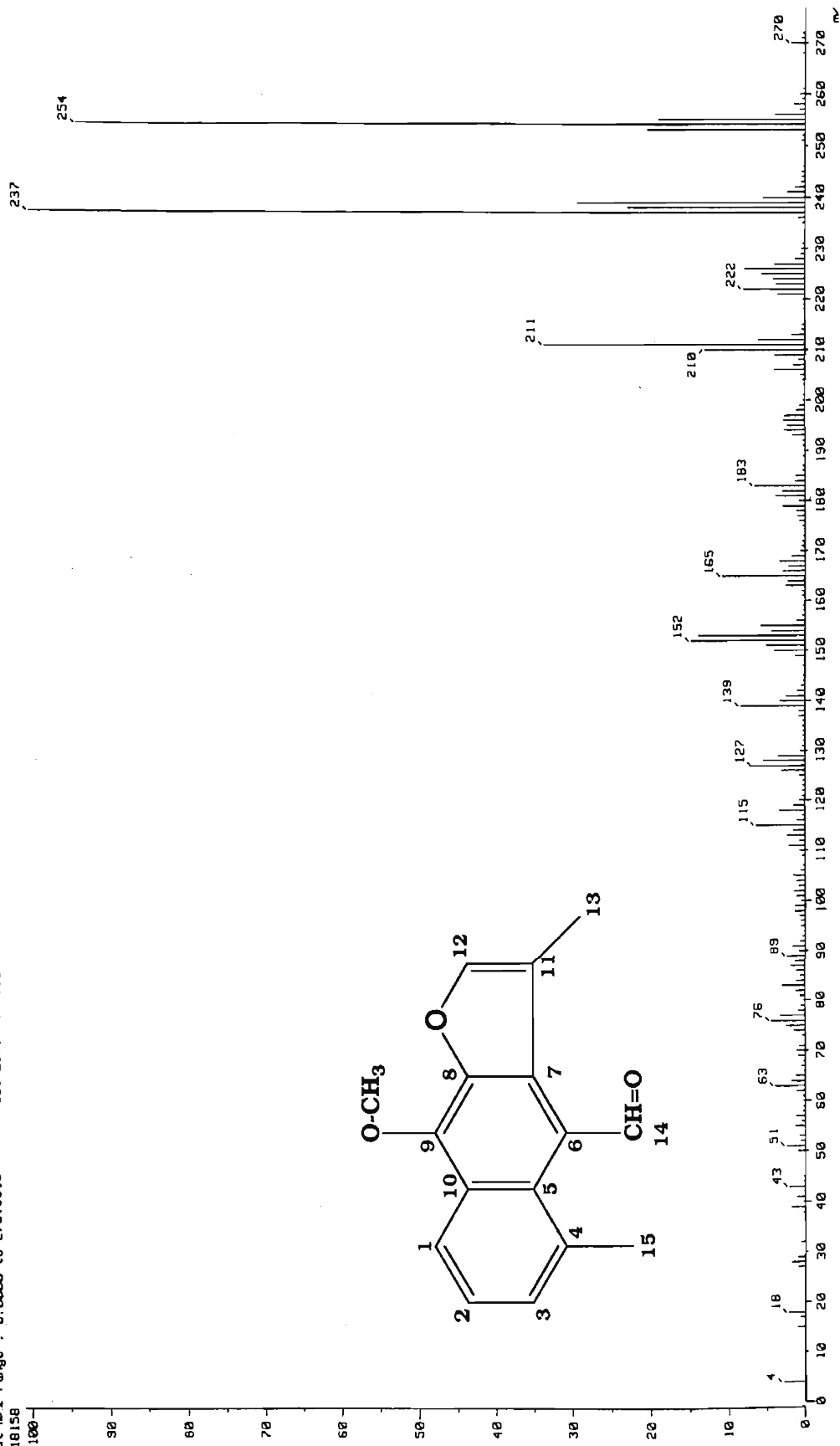
A continuación se muestran los diferentes espectros en el siguiente orden:

- Espectro de Infrarrojo (IR).
- Espectro de Masa (IM).
- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN de ^1H).
- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN de ^{13}C).
- Experimentos COSY, DEPT y HETCOR.

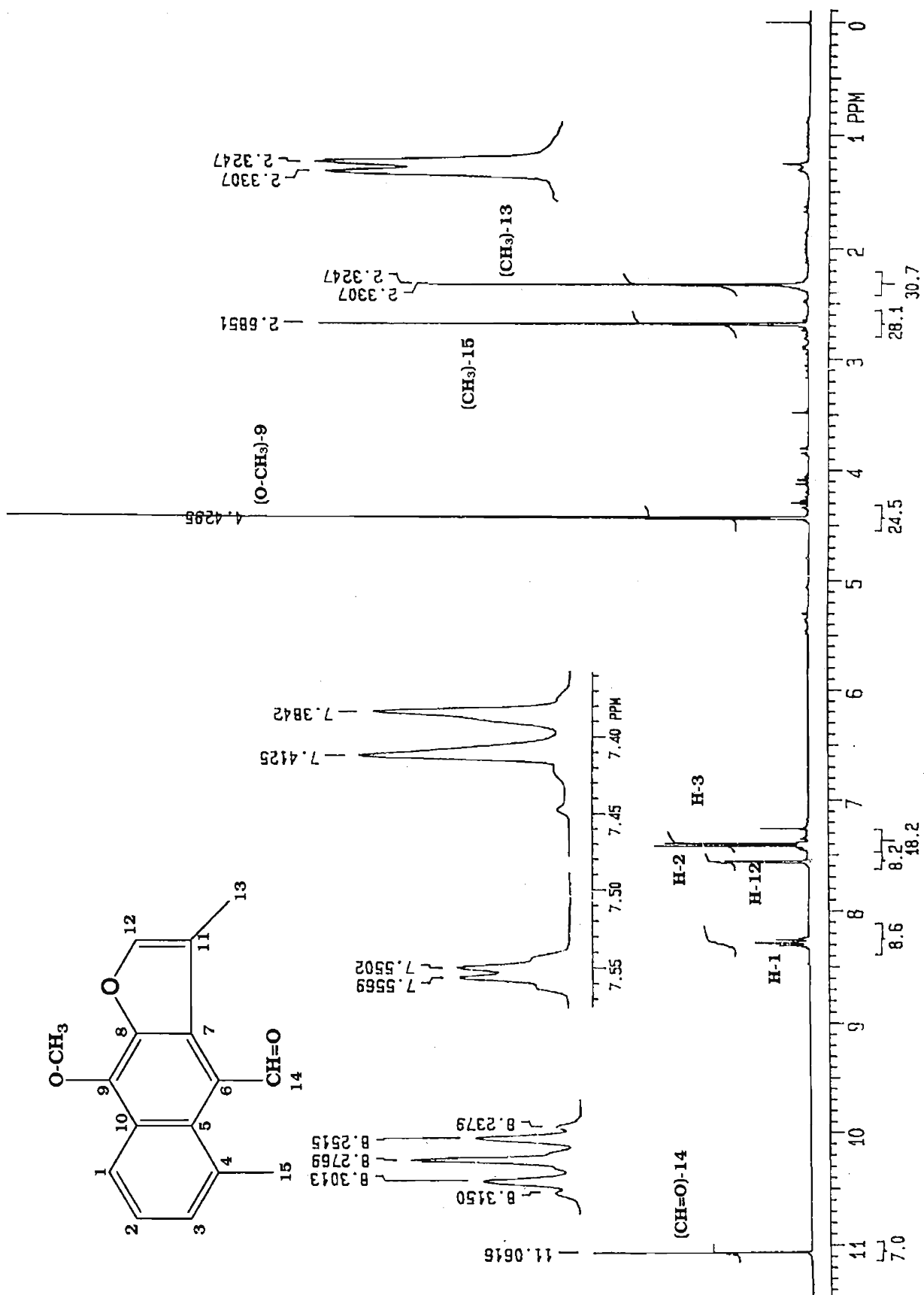


Espectro 1. Espectro de IR (CHCl₃) de la maturinina.

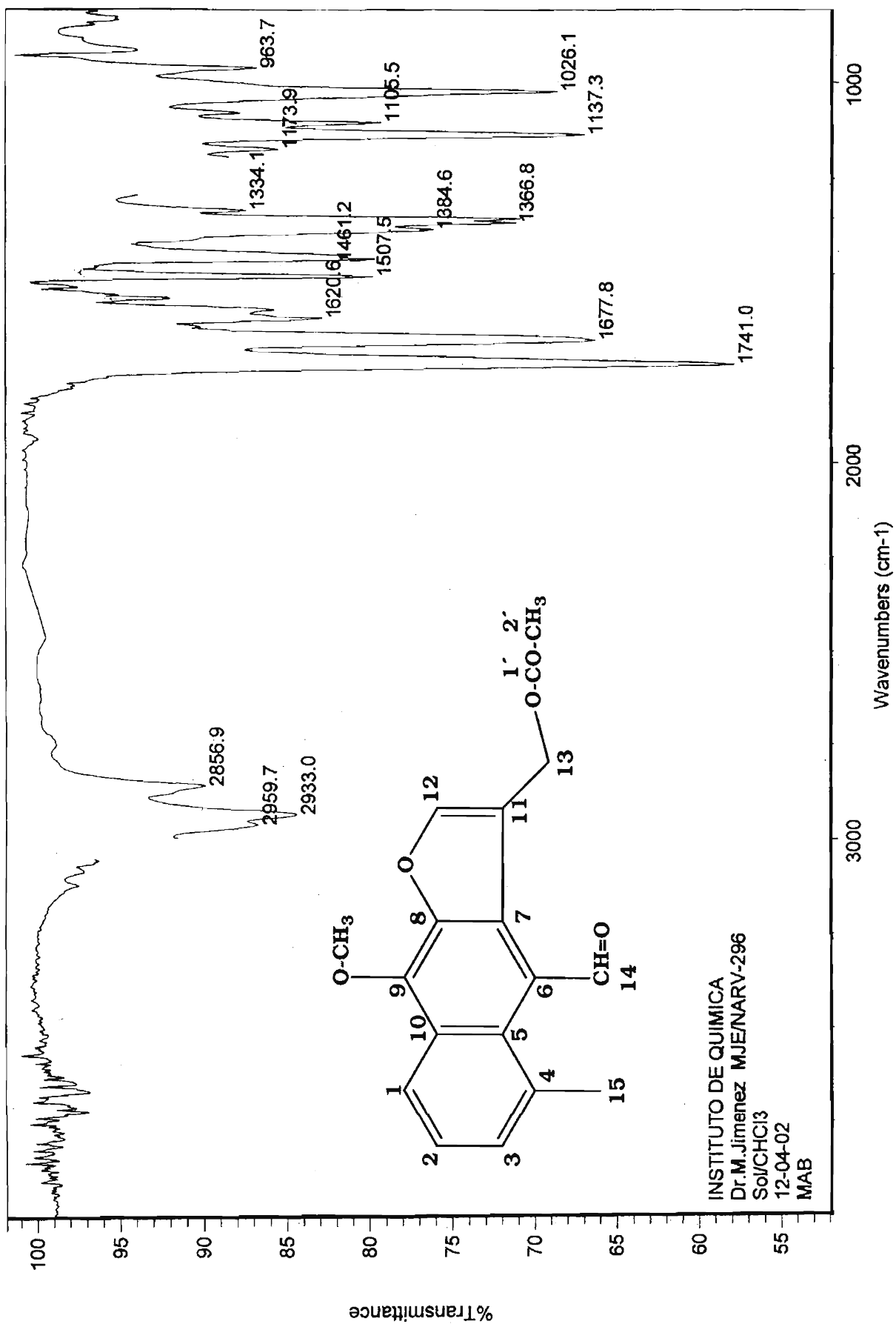
[Mass Spectrum]
 Date : 15-Jan-1982 16:18
 Sample: RUE-NRY-83
 Note : -
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)
 RT : 0.42 min Scan# : (10,20)-(17,21)
 BP : m/z 237.0000 Int. : 379.91
 Output m/z range : 0.0000 to 278.9318 Cut Level : 0.00 %
 4018158



Espectro 2. Espectro de masa (EI) de la maturinina.

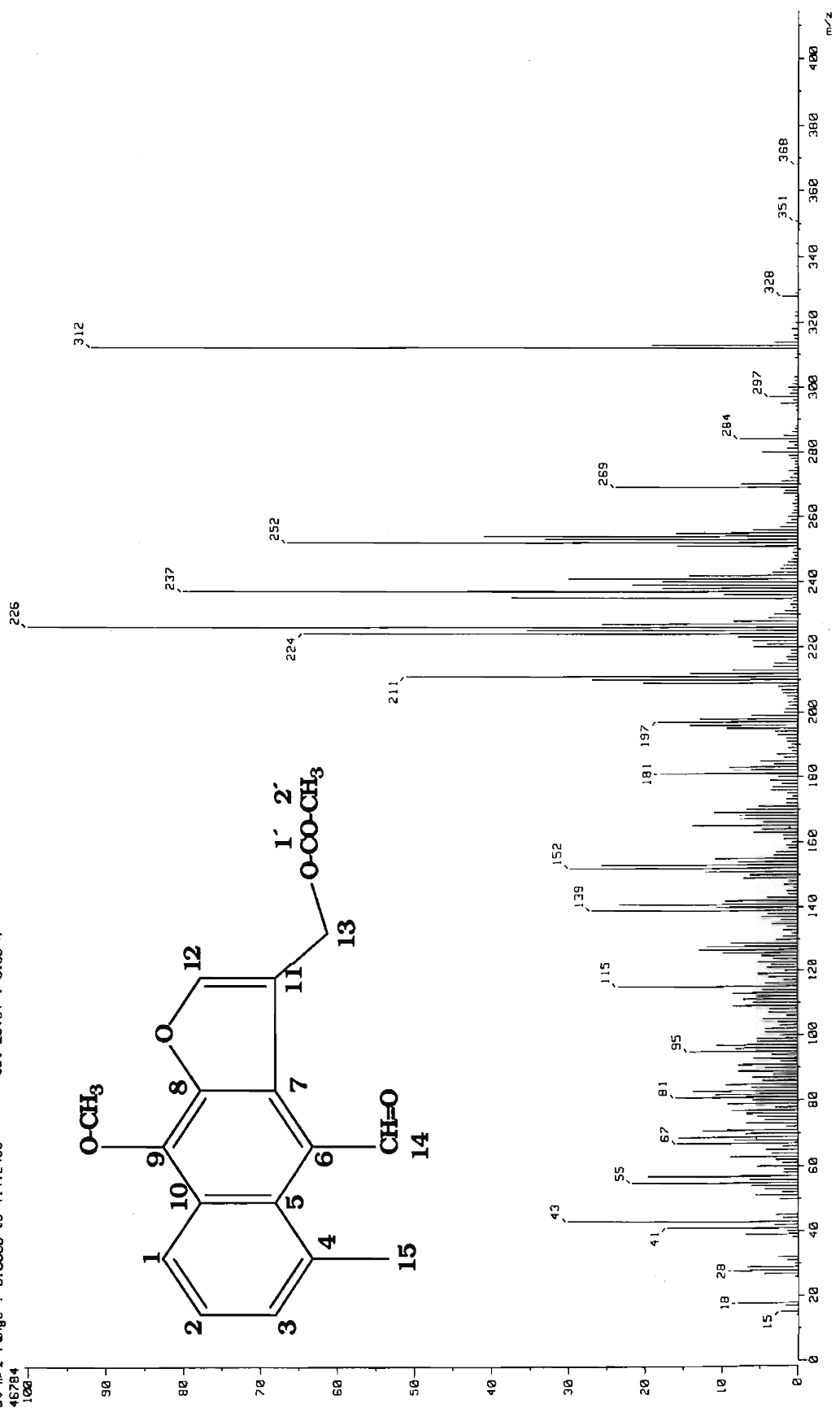
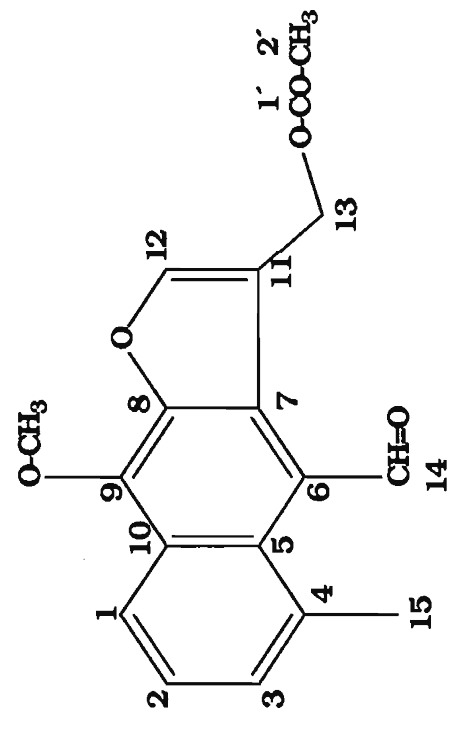


Espectro 3. Espectro de RMN de ¹H de la matorinina.



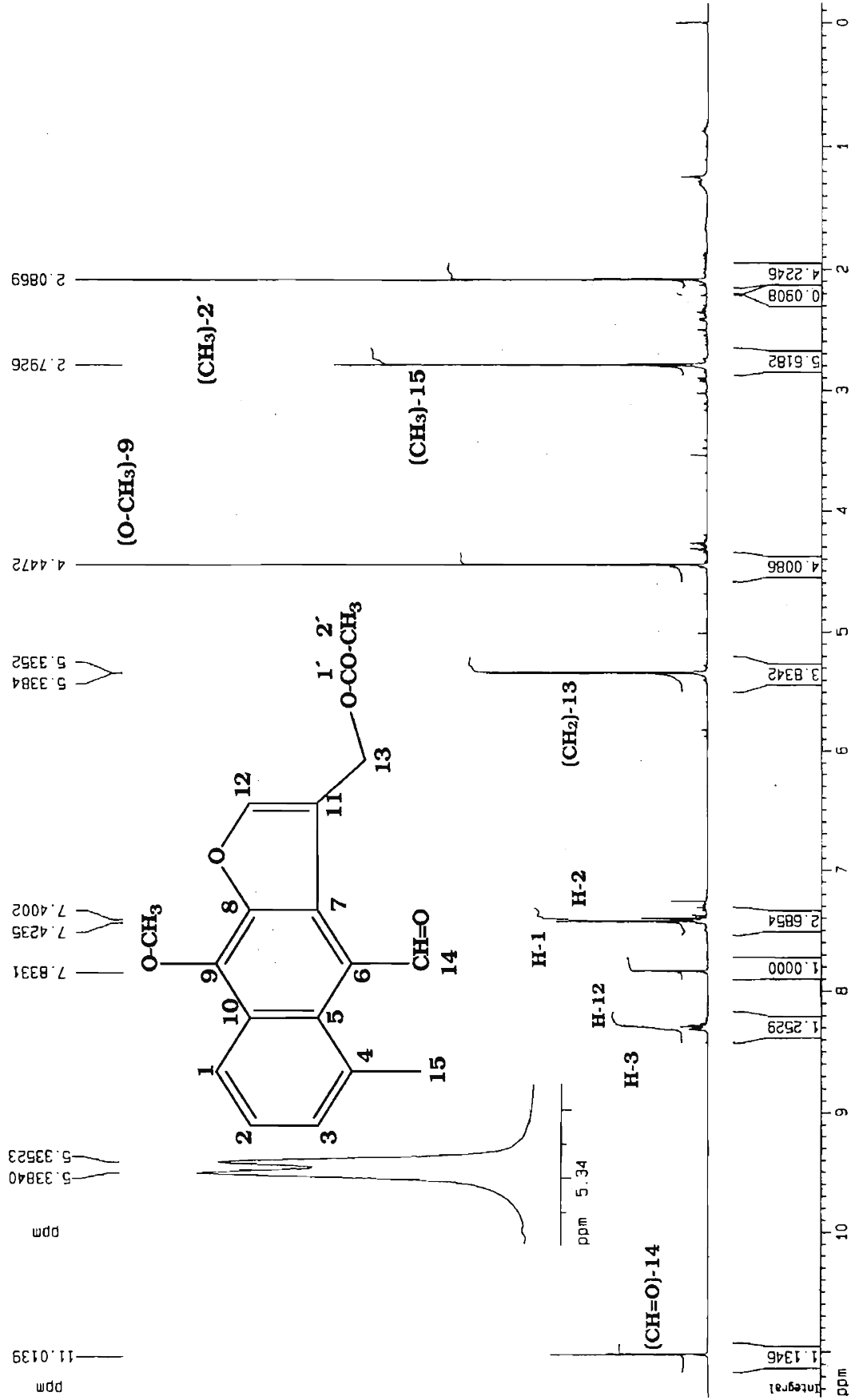
Espectro 4. Espectro de IR (CHCl₃) del acetato de matorina.

[Mass Spectrum]
 Date : 15-Jan-102 16:20
 Sample: MJE-MRV-296
 Note : -
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.61 min Scan# : (13,29)-(8,17) Temp : 120.9 deg.C
 BP : m/z 226.0000 Int. : 165.11
 Output m/z range : 0.0000 to 414.2433 Cut Level : 0.00 %
 1746784



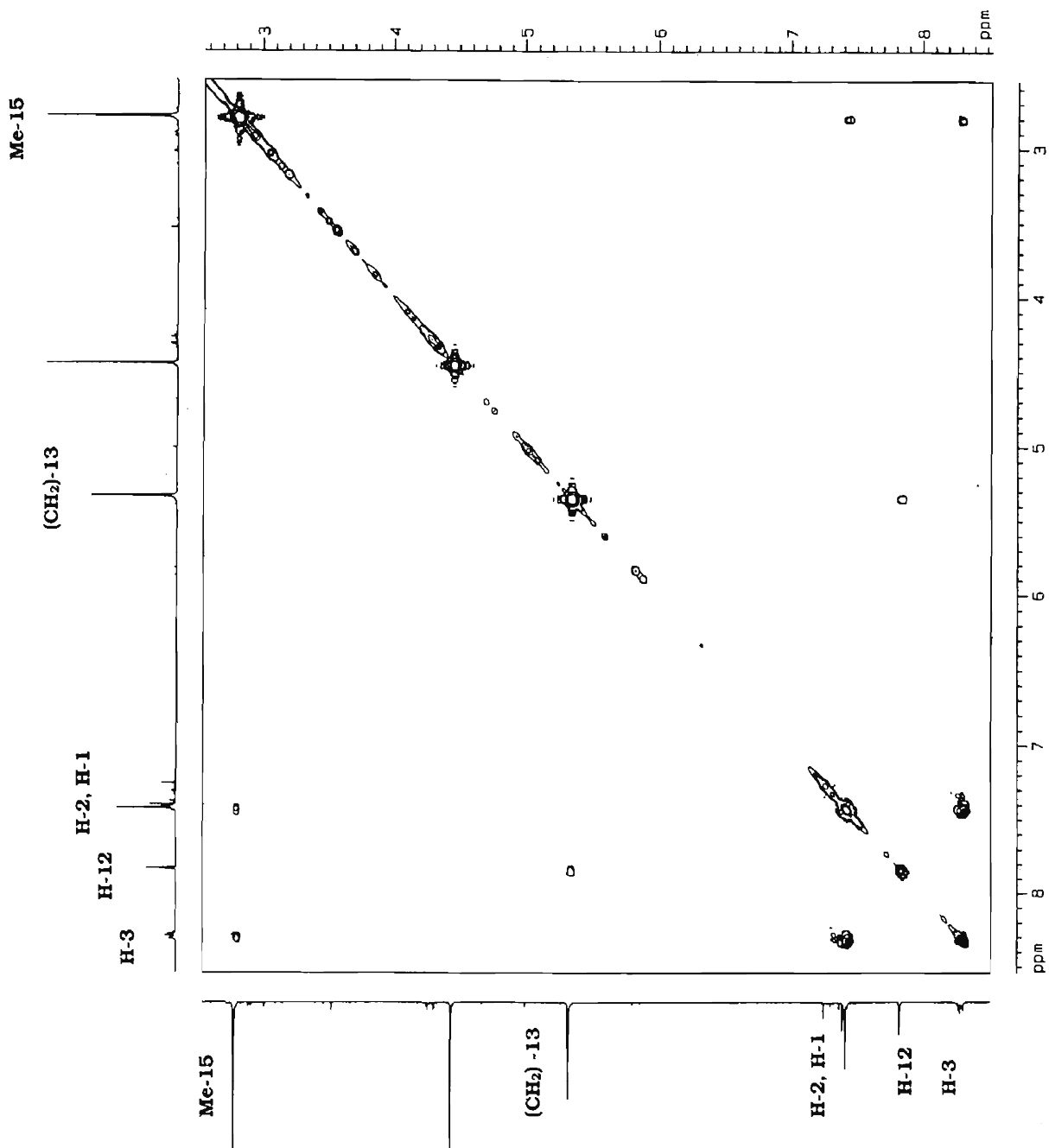
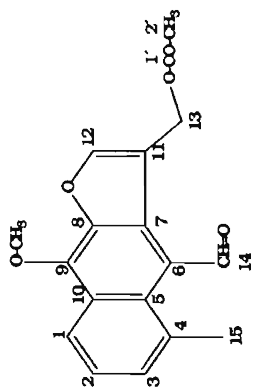
Espectro 5. Espectro de masa (EI) del acetato de maturaína.

Dr-M-Jimenez MJE/NARV-PP295 hr
 Experimento: H1
 Solvent: CDCL3
 Bruker-300-MHZ



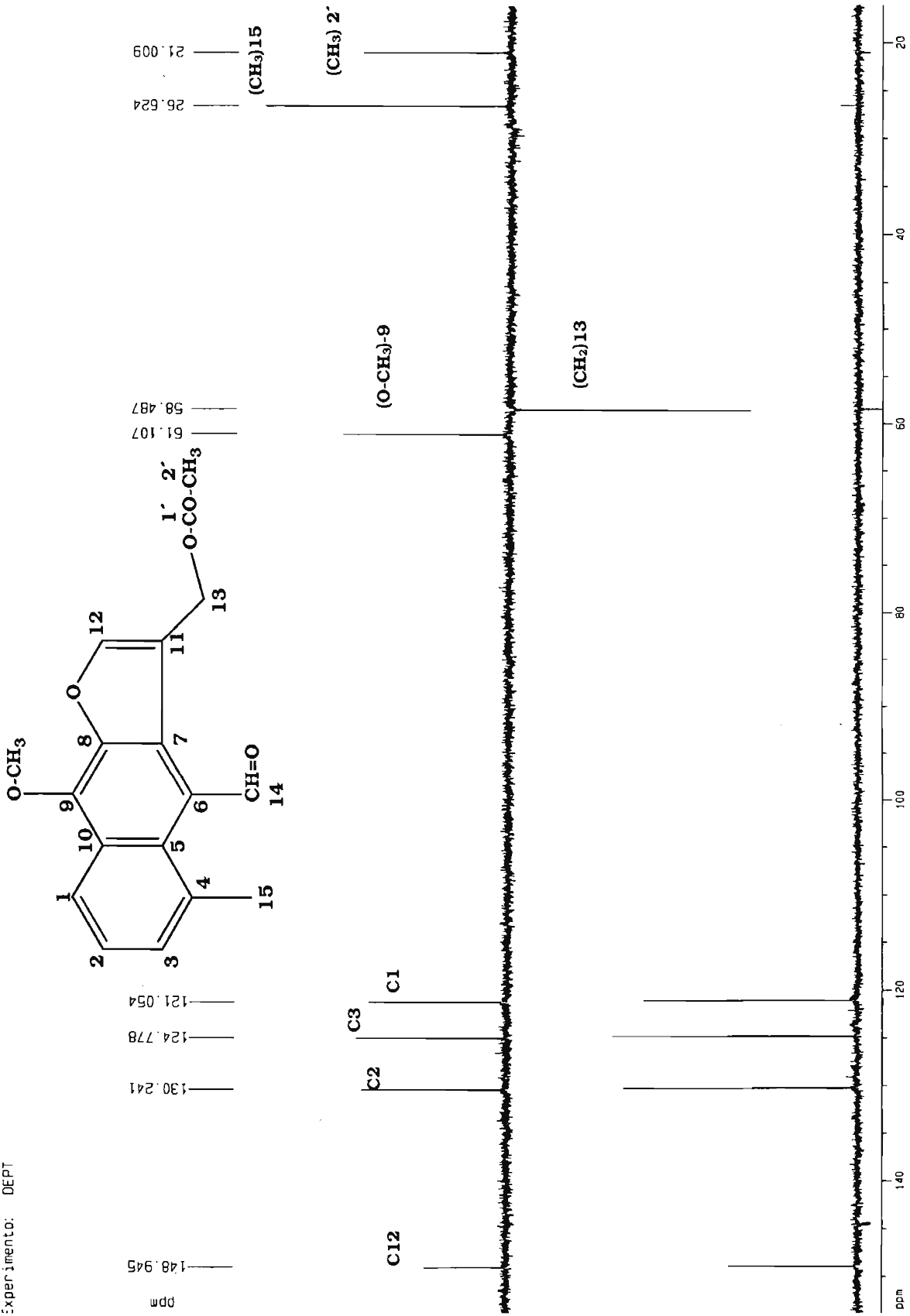
Espectro 6. Espectro de RMN de ¹H del acetato de matorina.

Dr-M-Jimenez MJE/NARY-PP295 hr
Experimental: COSY

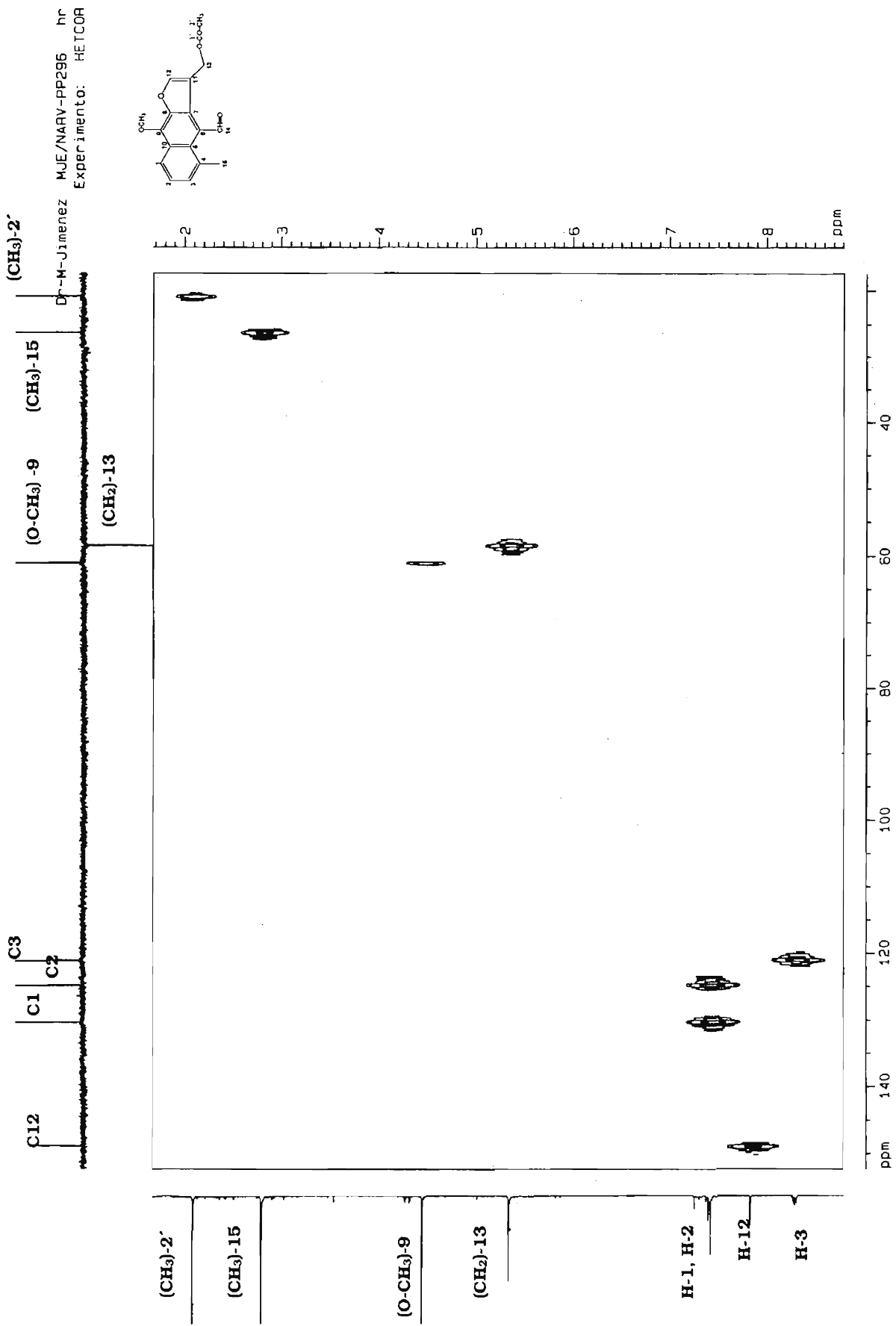


Espectro 7. Experimento COSY del acetato de maturina.

Jr-M-Jimenez MJE/NARY-PP296 hr
Experimento: DEPT

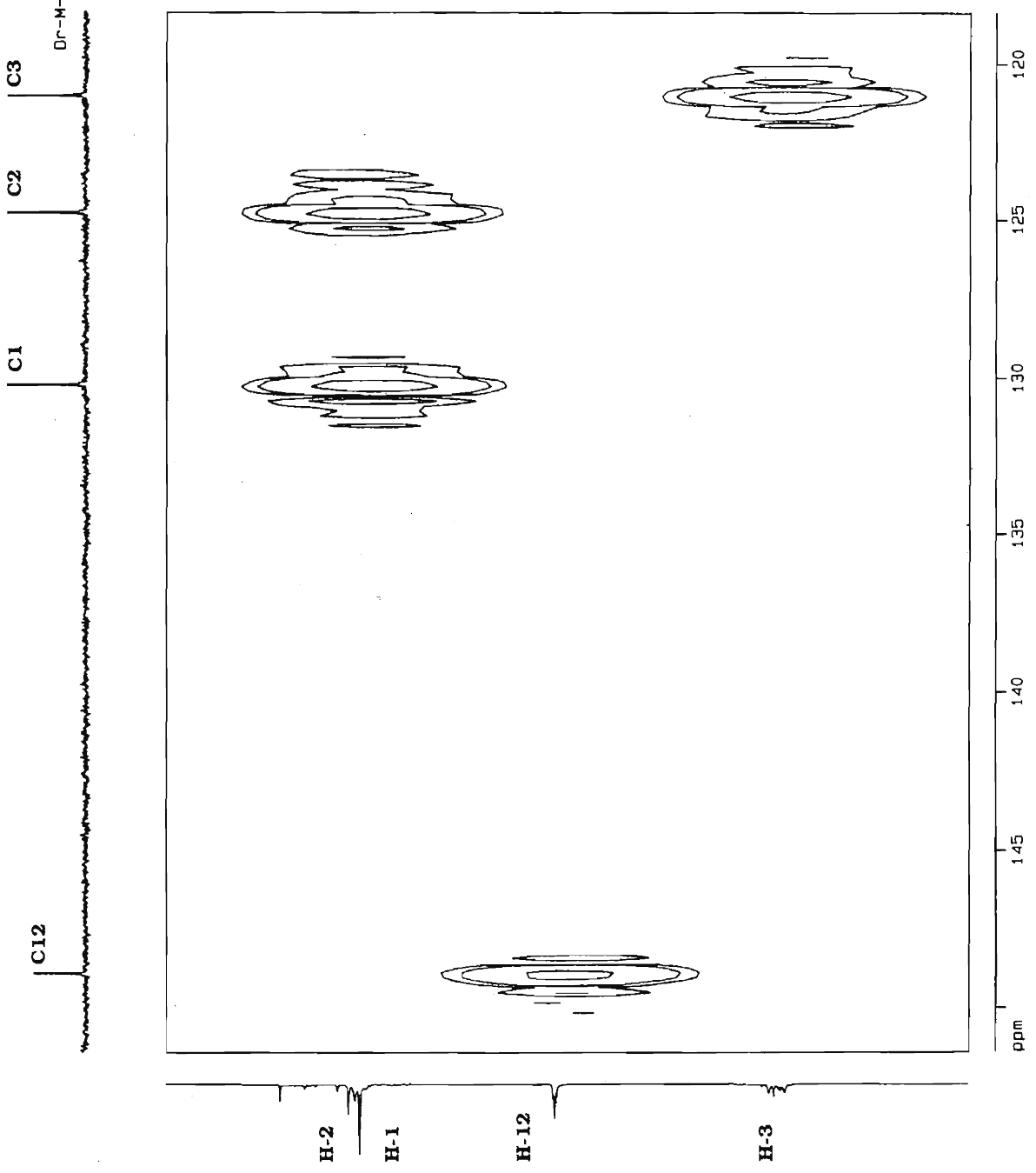
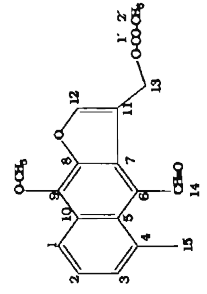


Espectro 8. Experimento DEPT del acetato de maturaína.

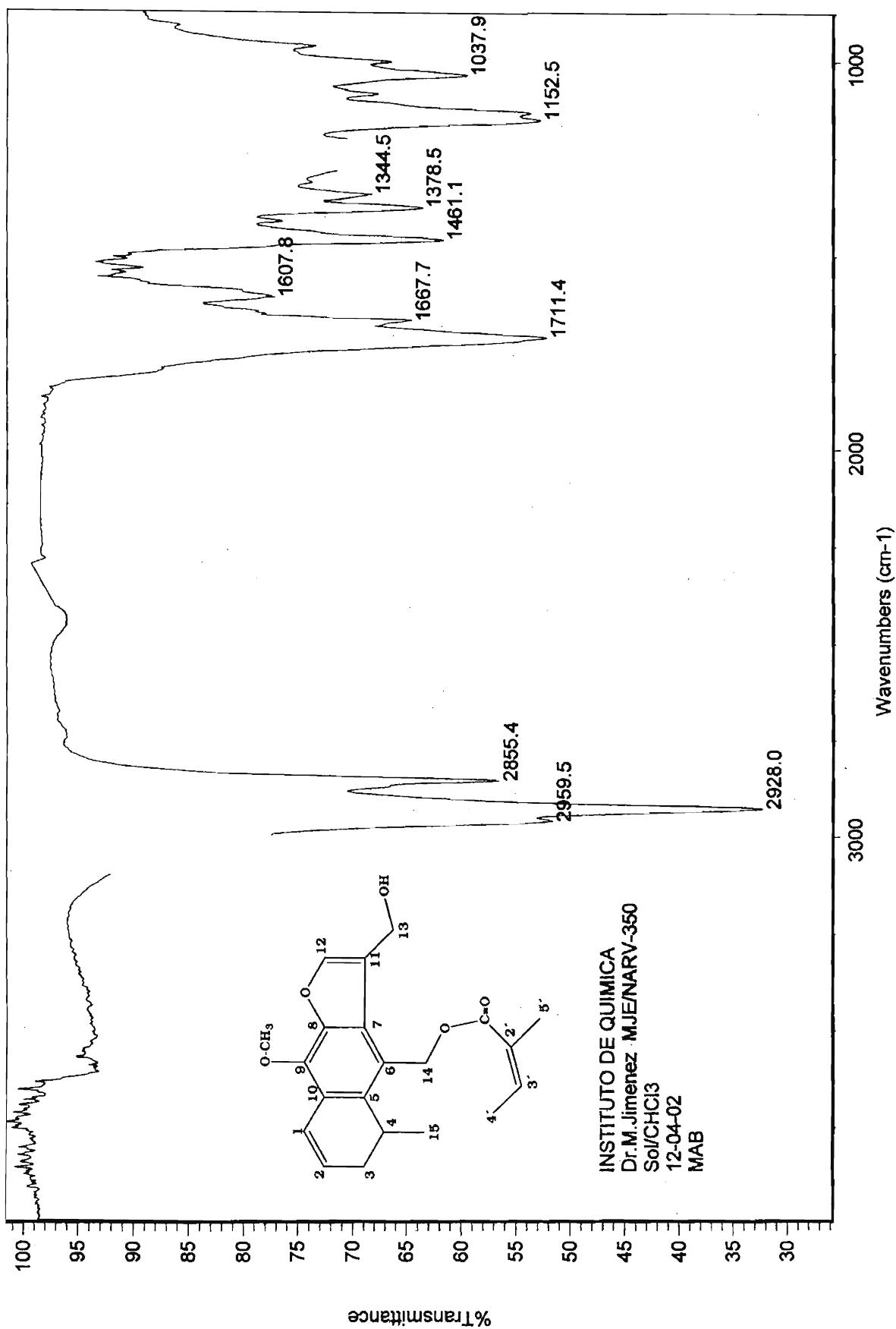


Espectro 9a. Experimento HETCOR del acetato de maturina.

Dr-M-Jimenez MJE/NARV-PP296 hr
Experimento: HETCOR

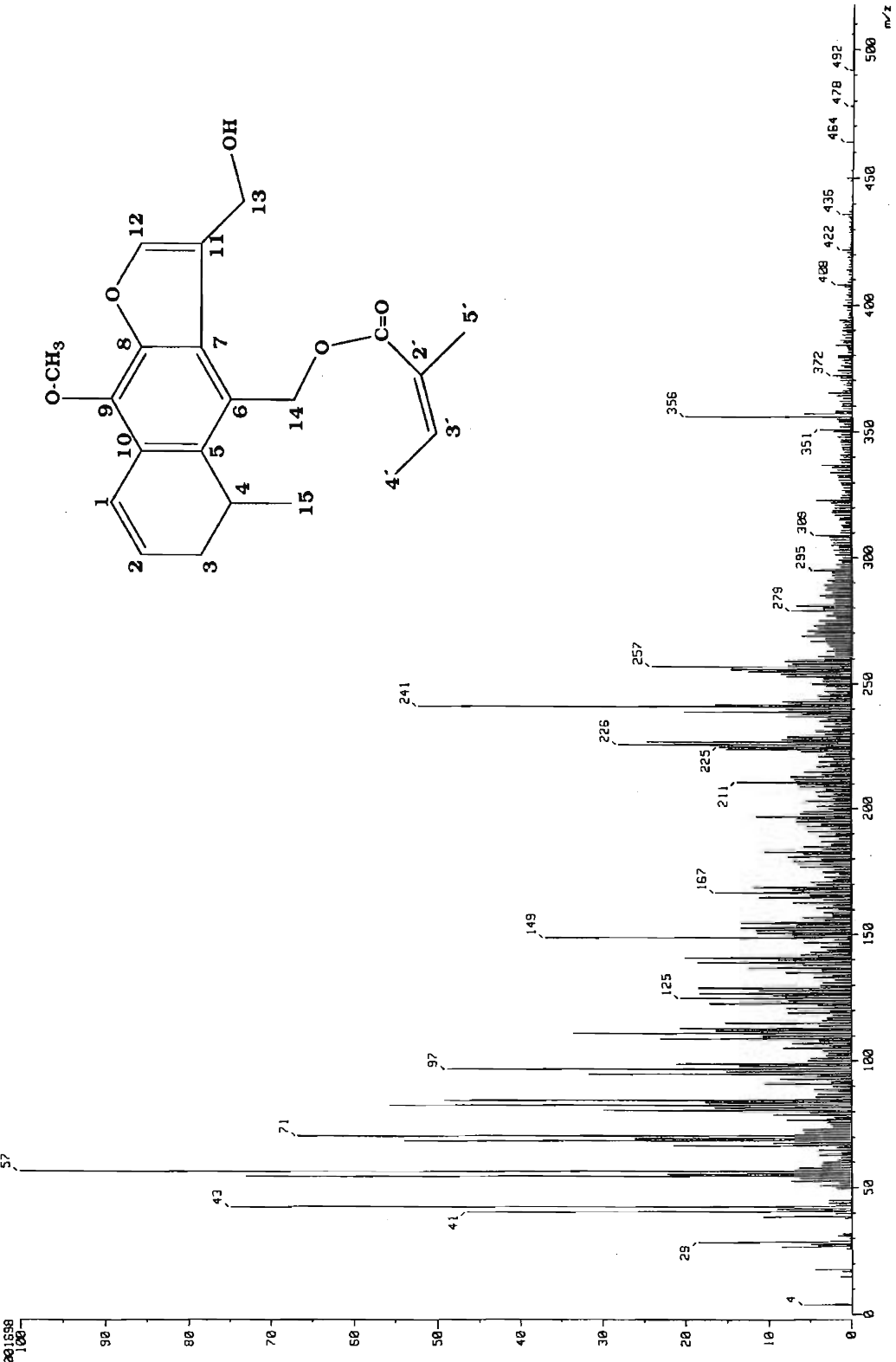


Espectro 9b. Experimento HETCOR (ampliado) del acetato de maturina.



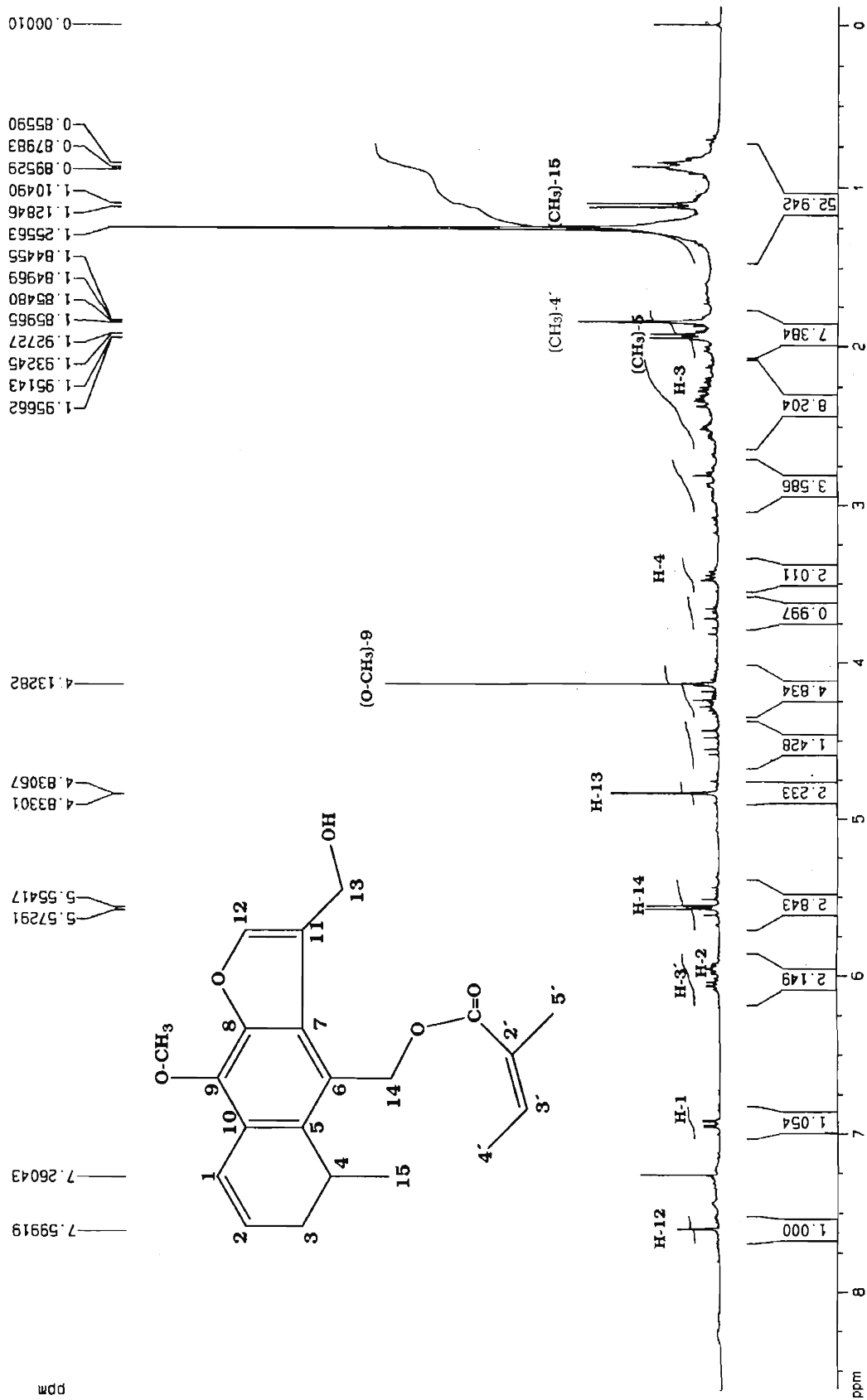
Espectro 10. Espectro de IR (CHCl₃) del angelato de 3-4-dehidro-14-maturinol.

[Mass Spectrum]
 Date : 15-Jan-102 16:23
 Sample: ME-MFRV-358
 Note : -
 Inlet : Direct
 Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-L-Linear]
 RT : 1.15 min
 Scan# : (14,65)
 BP : m/z 57.0000
 Int. : 198.90
 Output m/z range : 0.0000 to 517.5074
 Cut Level : 0.00 %



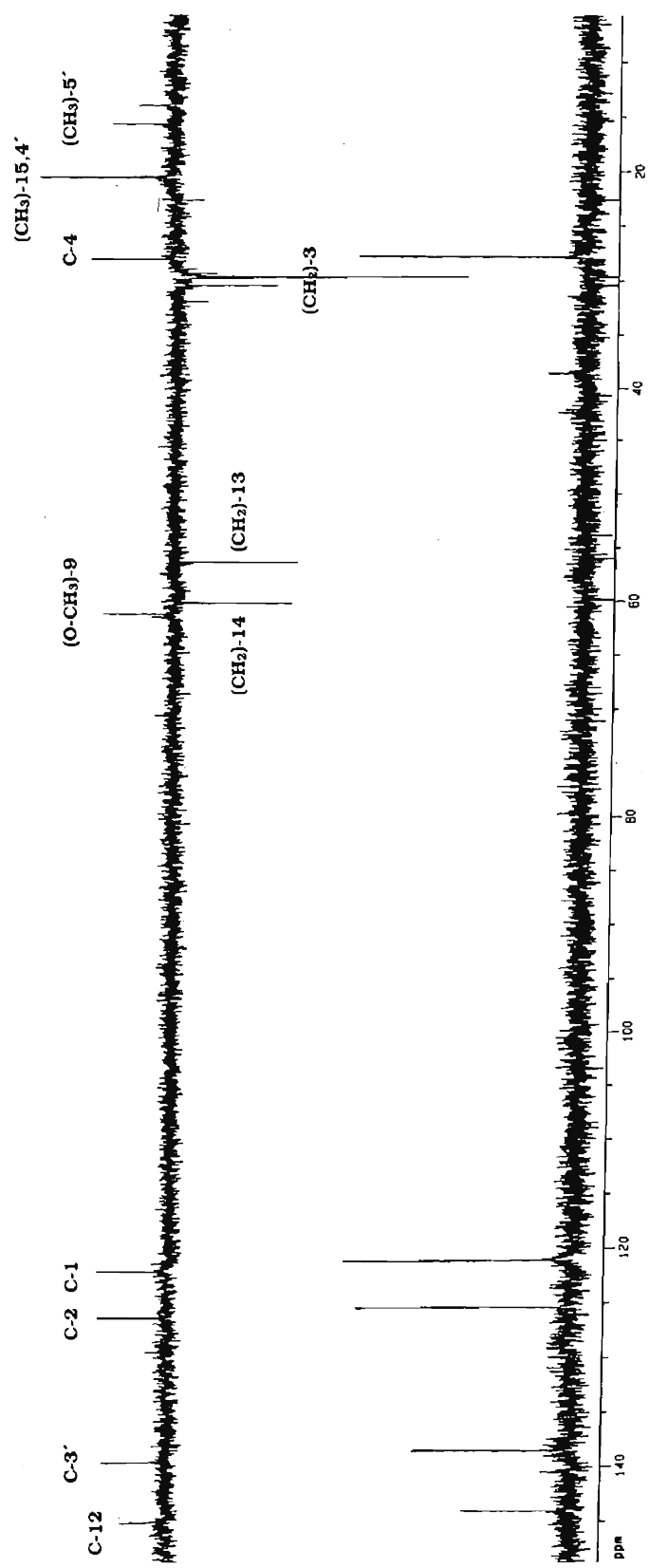
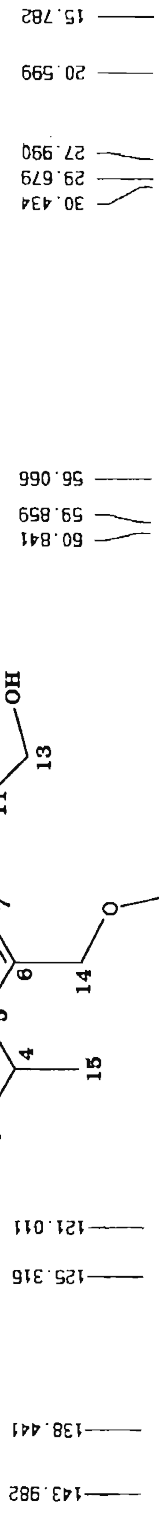
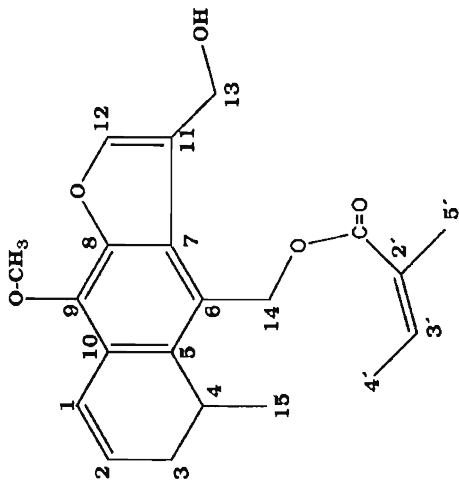
Espectro 11. Espectro de masa (EI) del angelato de 3-4-dehidro-14-maturinol.

Dr-M-Jimenez MJE/NARY-PP350 +020
 Experimento: H1
 Solvent: CDCl3
 Bruker-300-MHZ

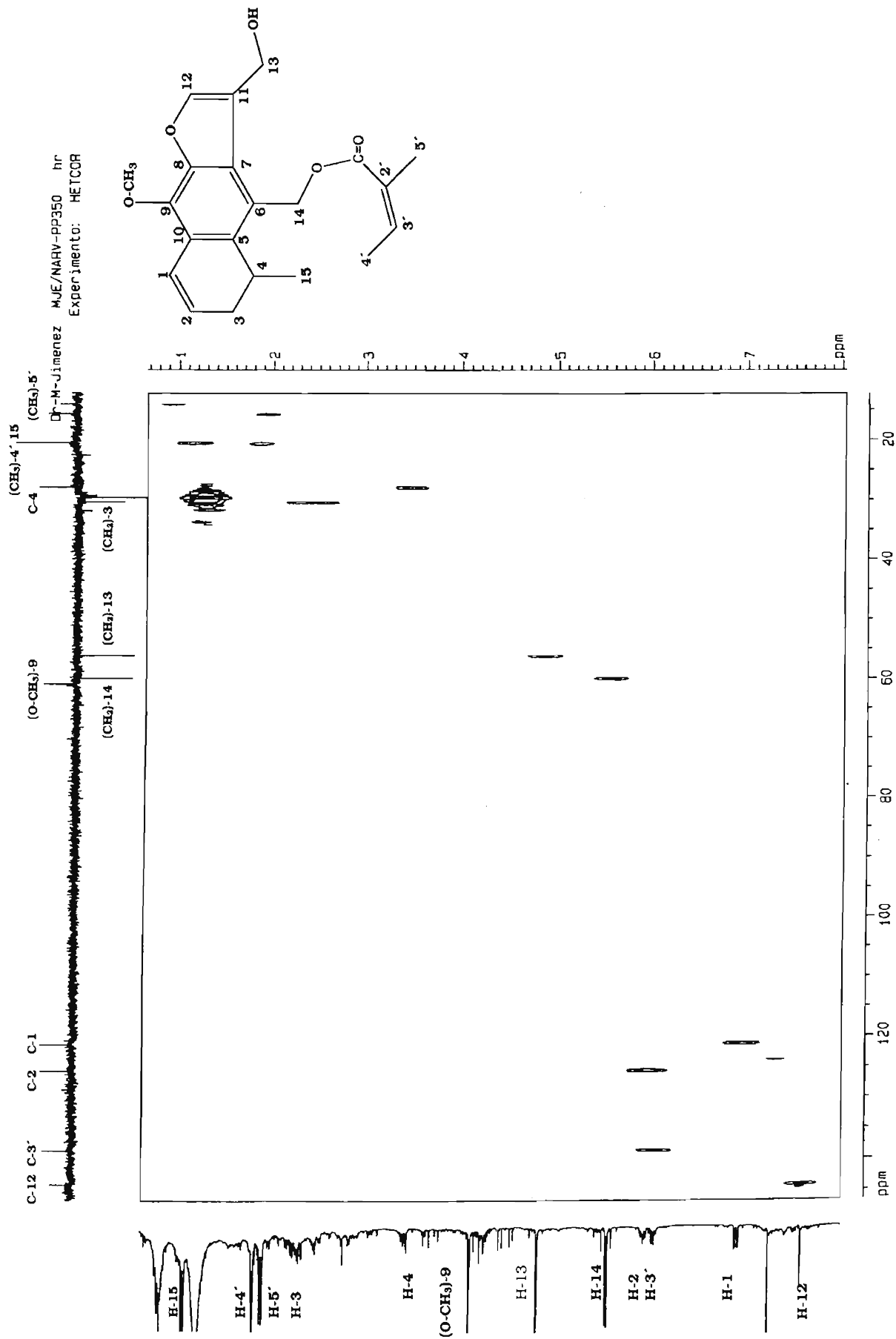


Espectro 12. Espectro de RMN de ¹H del angelato de 3-4-dehidro-14-maturinol.

M-Jimenez MJE/NARV-PP350 hr
 Experimento: DEPT



Espectro 13. Experimento DEPT del angelato de 3-4-dehidro-14-maturinol.



Espectro 14. Experimento HETCOR del angelato de 3-4-dehidro-14-maturinol.