

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**ESTUDIO DE LA BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES INDOL-MONOTERPÉNICOS  
Y SU TRANSFORMACIÓN A ALCALOIDES OXINDOL-MONOTERPÉNICOS EN  
CULTIVOS *in vitro* DE *Hamelia patens***

Tesis que presenta  
**David Paniagua Vega**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directora de tesis:

**Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia**

México, D. F.

Septiembre 2014

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería y en el Departamento de Química, ambos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia.

## DEDICATORIAS

A quienes se me adelantaron:

A mi madre Guadalupe Vega Robles<sup>(†)</sup> y mi padre David Paniagua Castor<sup>(†)</sup> por sus incansables esfuerzos para apoyarme.

A mi abuela María Inés Castor Gómez<sup>(†)</sup> por su ejemplo, su apoyo y sobre todo enseñarme que siempre hay esperanza.

A mi amiga LLendy Berenice Sánchez Rubio<sup>(†)</sup>.

A quienes aun me acompañan:

A mi amiga Ariana A. Huerta Heredia y familia.

A mi amiga Roxana Luque Rodríguez.

A mi pareja Víctor Hugo Romo Hernández.

A mis hermanos Emmanuel y Elvira Guadalupe Paniagua Vega

A Sara Meza, familia Sánchez Rubio y Georgina Hernández.

## RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto 105019, por otorgar los recursos para la realización del trabajo experimental de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo de tesis (registro 199699).

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) por el apoyo en infraestructura, económico para asistir a congresos y económico de beca terminal.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por el apoyo económico para escritura de tesis.

Al Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca (ITSTB) por el apoyo durante la escritura de tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia.

Al Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas.

A la Dra. María Luisa Villareal Ortega.

A la Dra. María Teresa Ponce Noyola

Al Dr. Fernando J. Esparza García.

A la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia.

A la Dra. Ileana Vera Reyes.

A la Ing. María Dolores Díaz Cervantes.

A la M. en C. Gabriela Luna Palencia.

A la Dra. Josefina Flores Sánchez.

A la Dra. Josefina Barrera Cortés.

A Nancy I. Sánchez Reyna y a Cristian Emanuel Caloch por su aporte técnico.

A María del Carmen Fontaine Sánchez, por su apoyo técnico y su buen ánimo.

**Y a todos los que voluntaria e involuntariamente contribuyeron en la realización de este proyecto.**

## CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I.1 <i>Hamelia patens</i>	1
I.2 Actividad biológica de los extractos crudos y de los alcaloides indol y oxindol-monoterpénicos de <i>H. patens</i>	3
I.3 Biosíntesis de alcaloides oxindol-monoterpénicos	5
I.4 Enzimas oxidativas del indol y de los alcaloides indol-monoterpénicos	8
I.4.1 Oxigenasas	8
I.4.1.1 Monoxigenasas citocromo p450	8
I.4.1.2 Dioxigenasa	10
I.4.2 Peroxidasas	10
I.4.3 Enzimas capaces de oxidar el indol	11
I.5 Respuesta antioxidante generada por factores de estrés	12
I.6 Metabolitos secundarios como agentes antioxidantes	13
I.7. Cultivos vegetales en condiciones controladas	15
I.7.1 Cultivos <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales	16
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>18</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>19</b>
IV.1. Objetivos específicos	19
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>20</b>
V.1 Material vegetal	20
V.1.1 Cultivo de plántulas micropropagadas de <i>H. patens</i>	20
V.1.2 Cultivo de raíces en suspensión de <i>H. patens</i>	21
V.1.3. Cultivo de callos de <i>H. patens</i>	21

V.1.4	Cultivo de células en suspensión _____	22
V.2	Viabilidad celular _____	24
V.3	Compuestos fenólicos totales _____	24
V.4	Crecimiento _____	24
V.5	Obtención de estándares de alcaloides indol y oxindol-monoterpénicos de <i>H. patens</i> _____	25
V.6	Análisis instrumental de los estándares de alcaloides de <i>H. patens</i> _____	26
V.6.1	Resonancia magnética nuclear _____	26
V.6.2	Espectrometría de masa de impacto electrónico e ionización química _____	27
V.6.3	Espectrometría de masa de electroespray _____	27
V.6.4	Espectroscopia y rotación óptica _____	27
V.7	Extracción y cuantificación de alcaloides y precursores _____	27
V.8	Adición de celulosa a cultivos <i>in vitro</i> de plántulas de <i>H. patens</i> _____	28
V.9	Adición de NaCl a cultivos <i>in vitro</i> de plántulas de <i>H. patens</i> _____	29
V.10	Diferentes regímenes de luz en plántulas de <i>H. patens</i> _____	29
V.11	Extracción enzimática de cultivo de raíces para los ensayos de la STR y SDG _____	30
V.12	Determinación de actividad de estrictosidina sintasa (STR) _____	30
V.13	Ensayo de la actividad de estrictosidina $\beta$ -glucosidasa (SGD) _____	31
V.14	Tratamientos en cultivo de raíces en suspensión de <i>H. patens</i> . _____	31
V.14.1	Adición del precursor secologanina en cultivo de raíces de <i>H. patens</i> bajo elicitación. _____	31
V.14.2	Disminución de la concentración de sacarosa, en el cultivo de raíces de <i>H. patens</i> _____	32
V.15	Cultivo de plántulas de <i>H. patens</i> sin sacarosa _____	32
V.16	Cromatografía en capa fina para los alcaloides de <i>H. patens</i> _____	33
V.17	Adición de triptófano a plántulas de <i>H. patens</i> _____	33
V.18	Incorporación de L-[3- <sup>14</sup> C]-triptófano en plántulas de <i>H. patens</i> bajo dos regímenes lumínicos _____	34
V.19	Extracción de alcaloides e intermediarios con L-[3- <sup>14</sup> C]-triptófano _____	35
V.20	Detección de la incorporación de la marca radiactiva _____	36
V.21	Adición de tetrahydroalstonina en plántulas de <i>H. patens</i> _____	37
V.22	Ensayo enzimático de tetrahydroaldostonina con peroxidasa de rábano _____	37
V.23	Ensayo enzimático de aricina con un extracto enzimático de plántulas de <i>H. patens</i> _____	37

V.24	Actividad antioxidante con DPPH de extractos crudos y alcaloides	38
V.25	Extracción y purificación de flavonoides	39
V.26	Cinética de crecimiento plantas y plántulas de <i>H. patens</i>	41
V.27	Determinación de clorofilas y flavonoides	41
v.28	Extracción de RNA total, primers y RT-PCR cuantitativo	42
VI	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
VI.1	Mantenimiento de cultivos <i>in vitro</i> de plántulas micropropagadas y de cultivos de raíces de <i>H. patens</i>	43
VI.2	Establecimiento de un cultivo de callos <i>in vitro</i> de <i>H. patens</i> (HpC1)	45
VI.2.1	Mejoramiento de la friabilidad del cultivo de callos de <i>H. patens</i> (HpC2)	48
VI.3	Establecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>H. patens</i> (HpCel1)	49
VI.4	Elucidación de la estructura y caracterización de los alcaloides oxindol monoterpénicos	52
VI.5	Perfil de producción de alcaloides en cultivo de plantas y plántulas micropropagadas de <i>H. patens</i>	57
VI.6	Identificación de tetrahidroalstonina en <i>H. patens</i>	62
VI.7	Producción de precursores triptamínicos en cultivos de raíces, callos y células en suspensión	63
VI.7.1	Raíces y cultivo de raíces	63
VI.7.2	Producción de alcaloides en el cultivo de callos de <i>H. patens</i>	64
VI.8	Elicitación de cultivos de raíces y plántulas de <i>H. patens</i>	65
VI.8.1	Efecto de la adición de celulosa a plántulas micropropagadas de <i>H. patens</i>	65
VI.8.2	Efecto de la adición de NaCl a plántulas micropropagadas de <i>H. patens</i>	72
VI.8.3	Efecto de dos regímenes lumínicos en plántulas de <i>H. patens</i>	75
VI.9	Estudio bioquímico de la producción de alcaloides en cultivo de raíces en suspensión de <i>H. patens</i>	78
VI.9.1	Actividad de estrictosidina sintasa (STR) en cultivo de raíces de <i>H. patens</i>	79
VI.9.2	Actividad de estrictosidina glucosidasa (SDG) en cultivo de raíces de <i>H. patens</i>	79
VI.9.3	Transcritos de enzimas involucradas en la biosíntesis de AIM en cultivo de raíces de <i>H. patens</i>	80
VI.9.4	Adicción del precursor secologanina en cultivo de raíces <i>in vitro</i> de <i>H. patens</i> bajo elicitación	81
VI.9.5	Efecto de la sacarosa en el cultivo de raíces de <i>H. patens</i>	82



VI.10	Producción de alcaloides en raíces de plántulas de <i>H. patens</i>	83
VI.11	Estudio de la biotransformación de precursores de los AOM en cultivos de plántulas de <i>H. patens</i>	84
VI.11.1	Establecimiento del sistema de TLC para los alcaloides de <i>H. patens</i>	84
VI.11.2	Efecto de la adición de triptófano en plántulas de <i>H. patens</i>	86
VI.11.3	Incorporación de L-[3- <sup>14</sup> C]-triptófano en AIM y AOM en plántulas de <i>H. patens</i> cultivadas en fotoperiodo y en luz continua	88
VI.11.4	Biotransformación de tetrahidroalstonina en plántulas de <i>H. patens</i>	92
VI.11.5	Ensayo enzimático de tetrahidroalstonina con peroxidasa de rábano	94
VI.12	Bioconversión <i>in vitro</i> de aricina en hamelina	95
VI.13	Actividad antioxidante de extractos y estándares de <i>H. patens</i> por el método del DPPH	96
VI.14	Identificación de flavonoides en hojas y flores de <i>H. patens</i>	98
VI.15	Comparación de la cinética de producción de plántulas <i>in vitro</i> y en su adaptación a tierra de <i>H. patens</i>	99
VII	CONCLUSIONES	102
VIII	RECOMENDACIONES	103
IX	REFERENCIAS	104
X	ANEXOS	121

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> <i>Hamelia patens</i> , <b>A)</b> inflorescencias, <b>B)</b> hojas, <b>C)</b> frutos y <b>D)</b> arbusto.	1
<b>Figura 2.</b> <i>Biosíntesis del AIM tetrahidroalstonina basada en experimentos enzimáticos (adaptada de Zenk, 1980).</i>	6
<b>Figura 3.</b> <i>Representación esquemática de la biosíntesis de AIM en C. roseus, las líneas solidas indican una sola conversión enzimática y las líneas discontinuas múltiples conversiones (Zhou, 2010).</i>	9
<b>Figura 4.</b> <i>La oxidación del indol en las plantas superiores. E1: Indol oxigenasa, E2: Indol oxidasa, E3: Indol 2, 3-dioxigenasa, E4: Indican sintasa, E5: Indoxyl-UDPG-glucosiltransferasa, E6: Formilasa, E7: aldehído oxidasa, S: reacción espontánea, P: Los tejidos vegetales y órganos, GT: ? Glucosiltransferasa, no identificado, GLU: ? glucosidasa, no identificada (Yuan et al. 2011).</i>	12
<b>Figura 5.</b> <i>Aporte del metabolismo primario a la biosíntesis del metabolismo secundario en plantas (adaptado de Ramos-Valdivia et al. 2012).</i>	14
<b>Figura 6.</b> <i>Esquema del sistema de cultivo utilizado durante la incubación de las plántulas de H. patens con L-[3-14C]-triptófano y distribución de las muestras para el análisis por cromatografía de TLC.</i>	35
<b>Figura 7.</b> <i>Purificación de flavonoides y antocianinas a partir del extracto crudo (Rodriguez-Saona y Wrolstad, 2001).</i>	40
<b>Figura 8.</b> <i>Cultivo de plántulas micropropagadas de H. patens, de un mes, a partir de explantes meristematicos, A) nodo apical y B) binodo axilar bajo fotoperiodo de 16/8 h luz-obscuridad a <math>13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math>.</i>	44
<b>Figura 9.</b> <i>Cultivo de raíces de H. patens en medio A) MS y B) B5 y incubados a 25 °C, agitación a 100 rpm y luz continua a <math>24.30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math>.</i>	45
<b>Figura 10.</b> <i>Inducción de callos a un mes en diferentes medios de cultivo: (A) medio 33, (B) medio 17, (C) medio 20, (D) medio 34.</i>	48
<b>Figura 11.</b> <i>Agregación y viabilidad con FDA de los callos cultivados en medio 34 e</i>	48

incubados (A) fotoperiodo de 16/8 h luz-oscuridad a  $33.75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B) luz continua a  $27.00 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

- Figura 12.** Callos *in vitro* de *H. patens* con 2 mg/L de picloram en fotoperiodo. 49
- Figura 13.** Agrupación y viabilidad con diacetato de fluoreceína (FDA) de un cultivo de células en suspensión de *H. patens* en diferentes medios de cultivo (Tabla 4), donde, **MS 2S**) Murashige y Skoog con 2% de sacarosa (p/v), **B5 2S**) Gamborg's B5 con 2% de sacarosa (p/v), **B5 P-P 1S**) B5 con PVP, picloram y 1% de sacarosa (p/v), **B5 N-P 1S**) B5 con NAA, picloram y 1% de sacarosa (p/v), **B5 P-P 2S**) B5 con PVP, Picloram y 2% de sacarosa (p/v), **B5 N-P 2S**) B5 con NAA, picloram y 2% de sacarosa (p/v). 50
- Figura 14.** Efecto del medio de cultivo, reguladores de crecimiento y sacarosa en el peso fresco. Durante el establecimiento de un cultivo de células de *H. patens*. Donde, **MS 2S**) Murashige y Skoog con 2% de sacarosa (p/v), **B5 2S**) Gamborg's B5 con 2% de sacarosa (p/v), **B5 P-P 1S**) B5 con PVP, picloram y 1% de sacarosa (p/v), **B5 N-P 1S**) B5 con NAA, picloram y 1% de sacarosa (p/v), **B5 P-P 2S**) B5 con PVP, picloram y 2% de sacarosa (p/v), **B5 N-P 2S**) B5 con NAA, picloram y 2% de sacarosa (p/v). 51
- Figura 15.** Estructura molecular del Picloram 52
- Figura 16.** Propuesta biogénica para los alcaloides indol y oxindol monoterpénicos de *H. patens*. 54
- Figura 17.** Estructuras de isómeros de pteropodina; especiofilina y uncarina F. 54
- Figura 18.** Modelo molecular y sus rotaciones ópticas experimentales de; A) pteropodina y B) hamelina. 56
- Figura 19.** Producción de AOM en plántulas de *H. patens* a los 2 meses de cultivo, micropropagadas a partir de explante de meristemo apical y de explante binodal. 60
- Figura 20.** Muestras de hojas de plantas silvestres de *H. patens*, donde la longitud se refiere al largo de la hoja. 61

- Figura 21.** *Distribución de AOM en las hojas de plantas silvestres de Hamelia patens de Mapastepec, Chiapas.* 61
- Figura 22.** *Identificación de tetrahydroalstonina por espectrometría de masas de un extracto de hojas de planta silvestre de H. patens: A) estándar de tetrahydroalstonina y B) extracto donde se observan las señales correspondientes a la tetrahydroalstonina.* 63
- Figura 23.** *Cromatograma del extracto de raíces en suspensión de H. patens en medio de cultivo completo MS más 2% de sacarosa.* 64
- Figura 24.** *Cromatogramas de extractos de callos de H. patens en dos medios de cultivo: A) medio 34 y B) medio 20.* 65
- Figura 25.** *Producción de AOM en A) hojas y B) tallos de plántulas de H. patens a un mes de cultivo, donde: SS = sin sacarosa en el medio de cultivo, CS = con sacarosa adicionada al medio de cultivo (20 g/L), Cel A = pulpa de celulosa amorfa y Cel C = pulpa de celulosa cristalina.* 66
- Figura 26.** *Producción de AIM en A) hojas y B) tallos de plántulas de H. patens a un mes de cultivo, donde: SS = sin sacarosa en el medio de cultivo, CS = con sacarosa adicionada al medio de cultivo (20 g/L), Cel A = pulpa de celulosa amorfa y Cel C = pulpa de celulosa cristalina.* 69
- Figura 27.** *Producción de AT en A) tallos y B) raíces de plántulas de H. patens a un mes de cultivo, donde: SS = sin sacarosa en el medio de cultivo, CS = con sacarosa adicionada al medio de cultivo (20 g/L), Cel A = pulpa de celulosa amorfa y Cel C = pulpa de celulosa cristalina.* 69
- Figura 28.** *Crecimiento de A) plántulas completas (hojas, tallo y raíces) y B) hojas de plántulas de H. patens a un mes de cultivo, donde: SS = sin sacarosa en el medio de cultivo, CS = con sacarosa adicionada al medio de cultivo (20 g/L), Cel A = pulpa de celulosa amorfa y Cel C = pulpa de celulosa cristalina.* 70
- Figura 29.** *Efecto morfológico de la adición de 3 concentraciones de NaCl, en explantes apicales de H. patens en medio NNm líquido a los 4 días de incubación.* 73

<b>Figura 30.</b>	<i>Producción de AOM en explantes apicales de plántulas de H. patens en medio NNm líquido a los 4 días de incubación.</i>	74
<b>Figura 31.</b>	<i>Plántulas de H. patens. a los dos meses de micropropagadas incubadas bajo dos regímenes lumínicos A) fotoperiodo de 18/6 h a 13.50 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> y B) luz continua a 27 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math>.</i>	76
<b>Figura 32.</b>	<i>Producción de AOM de plántulas de H. patens en dos regímenes lumínicos fotoperiodo de 18/6 h a 13.50 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> y luz continua a 27 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math>.</i>	77
<b>Figura 33.</b>	<i>Aparición del color amarillo característico de la reacción de la SDG en muestras de cultivo de raíces de H. patens a los 7 y 30 días, donde; BS es blanco de sustrato, BE es blanco de enzima y Rx es la reacción.</i>	79
<b>Figura 34.</b>	<i>Desaparición de la strictosidina con <math>R_f=0.37</math> después del ensayo para SDG, donde; BS es blanco de sustrato, BE es blanco de enzima y Rx es reacción.</i>	80
<b>Figura 35.</b>	<i>Transcritos de enzimas involucradas en la biosíntesis de AIM, donde; 18S control positivo, DXS deoxi-xilulosa sintasa, STR strictosidina sintasa, SGD strictosidina glucosidasa (Flores-Sánchez, comunicación personal).</i>	81
<b>Figura 36.</b>	<i>Efecto de la adición de sacarosa en el cultivo de raíces de H. patens.</i>	83
<b>Figura 37.</b>	<i>Comatograma de producción de AIM en raíces de plántulas de 4 meses de micropropagadas en medio NNm sin sacarosa.</i>	84
<b>Figura 38.</b>	<i>Separación por cromatografía en capa fina de alcaloides de plántulas de Hamelia patens. Placa de silicagel de 10x9 cm, fase móvil F13 y detección por UV a A) 254 nm y B) 366 nm. Donde se aplicaron las siguientes muestras: 1) hoja, 2) tallo, 3) y raíz de plántula, 4) mezcla de especiofilina, pteropodina, isopteropodina, 5) hamelina al 60% 6) palmirina, 7) pteropodina, 8) aricina al 80%, 9) triptamina, 10) isopteropodina, 11) tetrahidroalstonina.</i>	85
<b>Figura 39.</b>	<i>Plántulas de H. patens con adición de triptófano a los de 7 días de micropropagadas.</i>	86
<b>Figura 40.</b>	<i>Cromatogramas del perfil de producción de AOM con la adición de triptófano en medio líquido NNm. Donde A) control sin triptófano, B) triptófano 100 <math>\mu\text{M}</math> y</i>	88

**C)** triptófano 500  $\mu$ M. Especiofilina ( $R_f = 12.8$  en HPLC).

- Figura 41.** Separación por TLC de los AOM, AIM y triptamina con incorporación del L-[3-14C]-triptófano en extractos de hojas y tallos de plántulas de *H. patens*, obtenido por  $\beta$  escáner e identificados por su  $R_f$  (**Tabla 10**) y su señal al UV (**Fig. 38**). 89
- Figura 42.** Incorporación en tallo y hoja de L-[3-14C]-triptófano en plántulas de *H. patens*. 90
- Figura 43.** Porcentaje de incorporación de L-[3-14C]-triptófano en los alcaloides y un posible intermediario entre triptófano y los alcaloides de plántulas de *H. patens*, en unidades arbitrarias. 91
- Figura 44.** Diferencias morfológicas en plántulas de *H. patens* entre el **Control** y **Tetrahydroalstonina** a 150  $\mu$ M, a los 7 días la adición. 93
- Figura 45.** Producción de **A)** AOM y **B)** AIM en tallos y hojas de plántulas adicionadas con tetrahydroalstonina a 150  $\mu$ M. 94
- Figura 46.** Cromatogramas del ensayo enzimático de peroxidasa de rábano con tetrahydroalstonina (THA) donde; **A)** Blanco de sustrato y **B)** Reacción enzimática. Se observa la desaparición de THA y la aparición de un pico con tiempo de retención 11 min. 95
- Figura 47.** Espectro UV a 244 nm de la THA y la THA oxidada por la peroxidasa de rábano. 95
- Figura 48.** Purificación de extractos crudos, donde; **A)** extractos crudos y **B)** extractos purificados por columna en fase sólida C8. Desarrollado en el sistema de TLC con placa FS y fase móvil I. 98
- Figura 49.** Espectros de RMN de  $^1H$  a 300 MHz de flavonoides aislados de **A)** hojas y **B)** flores silvestres de *H. patens*. 99
- Figura 50.** Producción de antioxidantes en *H. patens*, donde; **A)** Producción de AOM en hojas y tallos en plántulas *in vitro*, **B)** Producción de AOM en hojas y tallos, y flavonoides en hojas de plántulas adaptadas a tierra. 100

	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	Pag.
<b>Tabla 1.</b>	<b>Tabla 1.</b> Metabolitos secundarios reportados en <i>H. patens</i> .	3
<b>Tabla 2.</b>	Composición de los medios de cultivo base Gamborg's B5 (Gamborg's <i>et al.</i> 1968), Murashige and Skoog MS (Murashige y Skoog, 1962) y MSA1.	22
<b>Tabla 3.</b>	Composición de los medios de cultivo para el establecimiento del cultivo de callos de <i>H. patens</i> .	23
<b>Tabla 4.</b>	Composición de los medios de cultivo para el establecimiento de un cultivo de células de <i>H. patens</i>	23
<b>Tabla 5.</b>	Peso fresco requerido de muestra de los cultivos de <i>H. patens</i> para la extracción y cuantificación de alcaloides y/o precursores en HPLC.	28
<b>Tabla 6.</b>	Desplazamientos químicos de RMN de <sup>1</sup> H representativos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de los alcaloides indol-monoterpénicos aricina y su <i>N</i> -óxido encontrados en plántulas de <i>Hamelia patens</i> <sup>a</sup> .	53
<b>Tabla 7.</b>	Datos de RMN de <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H de hamelina <sup>a</sup> .	55
<b>Tabla 8.</b>	<i>Alcaloides caracterizados en cultivos de plántulas y plantas H. patens.</i>	58
<b>Tabla 9.</b>	Contenido de los alcaloides oxindol-monoterpénicos en la parte aérea de <i>Hamelia patens</i> . Comparación entre las plantas silvestres y las plántulas micropropagadas.	59
<b>Tabla 10.</b>	Crecimiento de explantes apicales de <i>H. patens</i> en dos regímenes <i>lumínicos</i> .	77
<b>Tabla 11.</b>	R <sub>f</sub> de los estándares en las placas de silicagel con la fase móvil F13.	85
<b>Tabla 12.</b>	Efecto de la adición de triptófano sobre la producción de alcaloides indol y oxindol-monoterpenicos (AIM y AOM), analizados por HPLC, en hojas y tallos de plántulas de <i>H. patens</i> a los 7 días de micropropagadas.	87
<b>Tabla 13.</b>	Capacidad antioxidante por el método del DPPH de extractos crudos y alcaloides de <i>H. patens</i> .	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIM	=	Alcaloide indol-monoterpénico
AOM	=	Alcaloide oxindol-monoterpénico
B5	=	Medio de cultivo Gamborg´s B5
HPLC	=	Cromatografía líquida de alta resolución
Lux	=	Intensidad lumínica (1 lux = 0.0135 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
NNm	=	Medio de cultivo Nitsch y Nitsch modificado (Paniagua-Vega <i>et al.</i> 2012)
MS	=	Medio de cultivo Murashige y Skoog
msnm	=	Metros sobre el nivel del mar
P.F.	=	Peso fresco
P.S.	=	Peso seco
Rf	=	Factor de retención (TLC)
Rt	=	Tiempo de retención (HPLC)
RMN	=	Resonancia magnetica nuclear
TLC	=	Cromatografía de capa fina
°C	=	Grados centígrados



## RESUMEN

Los alcaloides oxindól-monoterpénicos (AOM) son metabolitos secundarios producidos por muy pocas especies vegetales, muchos de los cuales presentan actividad biológica. *Hamelia patens* es una *Rubiácea* distribuida en México, que presenta un alto contenido de AOM con alto grado de oxidación. La biosíntesis de estos alcaloides involucra la participación coordinada de diferentes tejidos, células y organelos.

En este trabajo se estudio la biosíntesis de los alcaloides oxindol-monoterpénicos y oxindol-monoterpénicos con mayor grado de oxidación, tomando como modelo la planta *H. patens*, a partir de la cual se utilizaron cultivos *in vitro* de células y tejidos vegetales como plantas silvestres, además de plántulas propagadas *in vitro* y adaptadas a tierra. Con el objetivo de proporcionar un acercamiento en la biosíntesis de alcaloides oxindol-monoterpénicos con alto grado de oxidación en *H. pates*, se siguió la incorporación de L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano en tallos y hojas de plántulas bajo dos regímenes lumínicos, fotoperiodo y luz continua. En los dos regímenes lumínicos los tallos de las plántulas presentaron 25% mas incorporación que las hojas, también se observo que las plántulas (tallos y hojas) crecidas en fotoperiodo presentaron 32% mas incorporación en AOM, alcaloides indol-monoterpénicos (AIM) y alcaloides triptamínicos (AT). Lo que sugiere que tanto los tallos como las hojas poseen la maquinaria biosintetica para producir AOM. Además, en un ensayo *in vitro* con un extracto enzimático de plántulas micropropagadas de *H. patens* se encontró un 6.8% de conversión del AIM aricina en el AOM hamelina.

Utilizando técnicas cromatograficas y espectroscópicas se aislaron y caracterizaron químicamente 6 AOM (pteropodina, isopteropodina, especiofilina, palmirina, rumberina y uncarina F) a partir de hojas de plantas silvestres y de plántulas micropropagadas *in*

*vitro* de *H. patens*. Además una nueva estructura de AOM a la que se le ha llamado hamelina. También fueron caracterizados 2 AIM la aricina y el *N*-óxido de aricina. Con estos se generó una biblioteca de estándares de alcaloides para futuros trabajos. Se comparó el perfil de alcaloides de la parte aérea de las plántulas cultivadas *in vitro* con el de las hojas de plantas silvestres de *H. patens*, el cual mostró un contenido similar de rumberina, palmirina y uncarina F, por otra parte pteropodina, isopteropodina, hamelina, y especiofilina incrementaron 2.99, 2.65, 1.62 y 2.30 veces en las plántulas cultivadas *in vitro*.

Se llevó a cabo un acercamiento a nivel bioquímico en el cultivo de raíces *in vitro*, donde se estudiaron las enzimas clave en la biosíntesis de los AOM a partir de los precursores indólicos y terpénicos, se encontró una actividad de strictosidina sintasa (STR) de  $68.21 \pm 8.24$  pkat/mg, así mismo, se observó la actividad de la strictosidina  $\beta$ -glucosidasa (SDG) y se obtuvieron los transcritos de ambas enzimas. Lo anterior nos indica que la restricción en la biosíntesis de AOM en el cultivo de raíces en suspensión de *H. patens* puede ocurrir a nivel del aporte de los precursores.

En plántulas micropropagadas *in vitro*, la adición de celulosa cristalina 0.5% (p/v) en medio NNm semisólido aumentó 2 veces el crecimiento. Las plántulas crecidas en luz continua incrementaron 2 veces la producción de AOM con respecto a las crecidas en fotoperiodo a los dos meses. También se encontró que la adición de NaCl a 50  $\mu$ M al medio de cultivo de las plántulas genera un aumento de 1.5 veces en la producción de AOM. Por otro lado, en ensayos de biotransformación, se encontró en hojas de plántulas que la adición de triptófano a 500  $\mu$ M al medio NNm líquido aumentó 1.6 veces la producción de AOM. Mientras que la adición de 150  $\mu$ M de tetrahidroalstonina presentó una disminución en la producción de AOM, en contraste el AIM tetrahidroalstonina aumentó 7 veces alcanzando los 0.5 mg/g P.S.

Se identificaron flavonoides por resonancia magnética nuclear (RMN) en inflorescencias y hojas de plantas silvestres de *H. patens*, además se encontró que las plántulas durante su adaptación a tierra inician la producción de flavonoides a partir del segundo mes alcanzando los 350 µg/g P.S. a los 3.5 meses.

## ABSTRAC

The monoterpene-oxindole alkaloids (MOA) are secondary metabolites produced by very few plant species, many of which have biological activity. *Hamelia patens* is a *Rubiacea* distributed throughout Mexico, which has a high content of MOA with high oxidation. The biosynthesis of these alkaloids involves the coordinated participation of different tissues, cells and organelles.

In this paper the biosynthesis of MOA and MOA with higher oxidation with *H. patens* plant as a case study, were used from which both in vitro cultures and wild plants, as well in vitro plantlets adapted to earth.

In order to provide an approach to the biosynthesis of MOA high oxidation level *H. pates*, incorporation of L-[3-<sup>14</sup>C] tryptophan in stems and leaves of plantlets under two lighting regimes (photoperiod and continuous light) was followed. Stems of the plantlets had 25% more incorporation than leaves on the two light patterns. Also it was observed that plantlets (stems and leaves) grown in photoperiod had 32% more incorporation into AOM, monoterpene indole alkaloids (MIA) and tryptamine alkaloids (TA). Thus suggesting that the stems and leaves have the biosynthetic machinery to produce AOM. Furthermore, in an *in vitro* assay with an enzyme extract of *H. patens* micropropagated plantlets 6.8% conversion was found of the AIM aricina in hameline AOM.

The known compounds were purified by HPLC and identified by NMR as tetrahydroalstonine, pteropodine, isopteropodine, rumberine, aricine, palmirine, speciophylline, and uncarine F. The chemical profiles in aerial parts of micropropagated plantlets and leaves of wild specimens have similar content of compounds rumberine, plamirine and uncarine F, while pteropodine, isopteropodine,

hameline, and speciophylline were 2.99, 2.65, 1.62, and 2.30 times higher in the *in vitro* plantlets than those found in the wild specimens.

Conducted an approach to biochemically *in vitro* cultivation roots where studied key enzymes in the biosynthesis of the MOA from precursors terpene and indole. Strictosidine synthase (STR) activity of  $68.21 \pm 8.24$  pkat/mg was found, also, the activity of  $\beta$ -strictosidine glucosidase (SDG) was observed and transcripts of both enzymes were obtained. This indicates that the restriction in the biosynthesis of MOA in suspension culture roots of *H. patens* can occur at the level of the contribution of precursors.

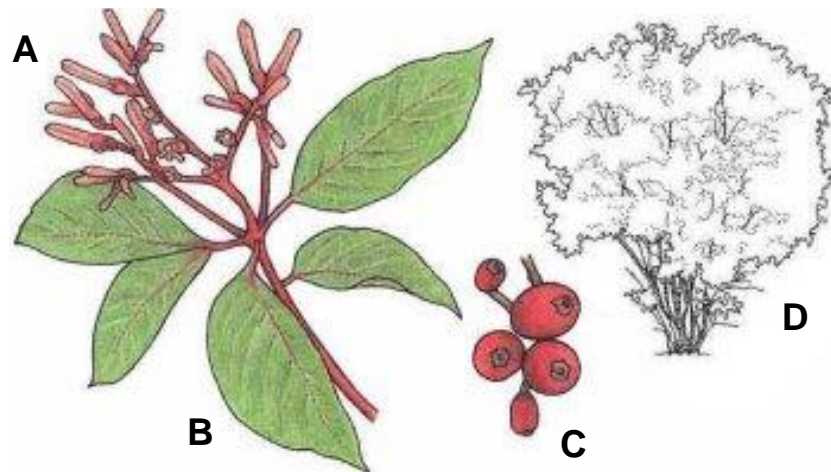
In micropropagated plantlets *in vitro* increased 2 times growth with addition of 0.5% crystalline cellulose (w/v) in semisolid medium NNm growth. Plantlets grown in continuous light increased 2 times MOA production regarding photoperiod cultured in two months. It was also found that the addition of 50 mM NaCl to the culture medium generates a 1.5-fold increase in the production of MOA in plantlets. On the other hand, in trials of biotransformation, was found in leaves of plantlets the addition of 500  $\mu$ M tryptophan to the medium NNm increased 1.6 times MOA production. While the addition of 150  $\mu$ M tetrahydroalstonine presented a decreased production of MOA. In contrast the MIA tetrahydroalstonine increased 7 times reaching 0.5 mg/g DW. Flavonoids were identified by nuclear magnetic resonance (NMR) in inflorescences and leaves of wild plants *H. patens*, also found that during the adaptation plantlets ashore flavonoid production starting from the second month reaching 350  $\mu$ g/g DW to 3.5 months.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 *Hamelia patens*

El arbusto *Hamelia patens* Jacq “chacloco o coralillo” de la familia *Rubiácea* es una planta medicinal nativa de México y distribuida en América. Éste arbusto fue descrito en 1760 y su nombre científico “*Hamelia patens*” honra a [Henri Louis du Hamel du Monceau](#) (1700-1781) médico, ingeniero naval y botánico francés. El género *Hamelia* está representado por unas 40 especies. El nombre específico “*patens*”, de la especie, significa extendido y hace referencia al porte de la planta.

*H. patens* es un arbusto de 2 a 3.5 m (**Fig. 1D**), que llega a alcanzar los 7 m de altura ([Elias, 1976](#)), y se caracteriza por tener una corteza delgada de color gris claro a café, con reticulado fino. Presenta hojas opuestas, comúnmente 3 o 4 y raramente 5, con una longitud de 5.5 a 18 cm y un ancho de 2.6 a 8 cm, con peciolo que van de glabros a densamente velludos (**Fig. 1B**) ([Croat, 1978](#)).



**Figura 1.** *Hamelia patens*, **A)** inflorescencias, **B)** hojas, **C)** frutos y **D)** arbusto.

Su fruto es elipsoide de hasta 1 cm de largo, carnoso, globoso, de color rojo y negro al madurar (**Fig. 1C**). Presenta semillas de 0.5-1 mm de largo, de forma lanceolada y margen entero, las semillas son numerosas y angulosas.

Sus flores son perfectas (ambos sexos en la misma flor) de color entre rojo, anaranjado y/o amarillo, el cáliz acampanado terminado en 5 dienteillos triangulares muy pequeños, la corola largamente tubular de 1.2 a 2 cm de largo y terminada en 5 lóbulos, a veces cubierta con pelillos erguidos o reclinados. Las inflorescencias son racimos terminales; sus ejes están arqueados generalmente se dividen en 2 y comúnmente las flores se presentan erguidas (**Fig. 1A**) (Thomas, 1976). Esta planta establece variadas interrelaciones en su ecosistema, ya que sirve de hospedera y alimento de un sin número de insectos como mariposas y hormigas. La corola resulta atractiva para diversos polinizadores entre los cuales encontramos a los colibríes de cola pinta (Valenzuela-Galván, 2006), y el fruto, además de tener como consumidores a las aves, también es comestible para los seres humanos.

El valor terapéutico de las plantas es usualmente atribuido a sus metabolitos secundarios. En *H. patens* los principales metabolitos secundarios encontrados pueden agruparse en dos categorías: alcaloides y flavonoides (**Tabla 1**). Estos compuestos generalmente juegan un papel muy importante en las interacciones de la planta con su ambiente, por ejemplo, para defender a la planta contra microorganismos o diversos predadores. Además, pueden actuar como mensajeros, atrayentes, repelentes o camuflaje. Los alcaloides representan una de las clases más abundantes de metabolitos secundarios, con un amplio espectro de actividad biológica y de gran interés económico donde destacan los alcaloides indol-monoterpenicos (AIM).

La planta *H. patens* es una de las pocas especies de plantas que han mostrado capacidad de producir AIM y alcaloides oxindol-monoterpenicos (AOM) (**Tabla 1**). A diferencia de otras plantas de la familia de las *Rubiaceas* que producen AIM y AOM pentacíclicos y tetracíclicos como *Uncaria tomentosa* y *Mitragyna parvifolia*, los alcaloides reportados en *H. patens* pertenecen únicamente al grupo de los AIM y AOM pentacíclicos, hecho que facilita su identificación y análisis.

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados en *H. patens*.

Compuesto	Grupo	Parte de la planta	Referencia
Tetrahidroalstonina	Alcaloide Indol-Monoterpénico	Parte aérea	Martínez <i>et al.</i> 1996
Aricina	Alcaloide Indol-Monoterpénico	Parte aérea	Martínez <i>et al.</i> 1996
Isomaruquina	Alcaloide oxindol-Monoterpénico	Hoja	Borges del Castillo <i>et al.</i> 1980.
Maruquina	Alcaloide oxindol-Monoterpénico	Hoja Parte aérea Hoja	Borges del Castillo <i>et al.</i> 1980, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1981, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1982.
Palmirina	Alcaloide oxindol-Monoterpénico	Parte aérea Hoja Parte aérea	Borges del Castillo <i>et al.</i> 1979, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1982, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1981.
Pteropodina	Alcaloide oxindol-Monoterpénico	Parte aérea Parte aérea Hoja	Arias-Adams <i>et al.</i> 1989, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1981, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1982.
Isopteropodina	Alcaloide oxindol-Monoterpénico	Parte aérea Hoja Parte aérea Hoja Hoja	Arias-Adams <i>et al.</i> 1989, Ripperger, 1977, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1981, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1982.
Rumberina	Alcaloide oxindol-Monoterpénico	Parte aérea Hoja Parte aera	Borges del Castillo <i>et al.</i> 1979, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1982, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1981.
Especiofilina	Alcaloide oxindol-Monoterpénico	Parte aérea Hoja	Borges del Castillo <i>et al.</i> 1981, Borges del Castillo <i>et al.</i> 1982.
Hamelina	Alcaloide oxindol-Monoterpénico	Parte aérea Hoja	Paniagua-Vega <i>et al.</i> 2012.
Efedrina	Alcaloide Isoquinolinico	Hojas y ramas	Chaudhuri y Thakur, 1991.
Flavanona, 2'-5-5'-7-tetrahidroxi: 7-o-rutinosido	Flavonoide	Hoja Parte aérea	Mahmood <i>et al.</i> 1993, Aquino <i>et al.</i> 1990
Narirutina	Flavonoide	Hoja	Mahmood <i>et al.</i> 1993
Narirutina, (2r)	Flavonoide	Parte aérea	Aquino <i>et al.</i> 1990.
Narirutina, (2s)	Flavonoide	Parte aérea	Aquino <i>et al.</i> 1990.
Rutina	Flavonoide	Flores	Tiwari <i>et al.</i> 1978.
Epicatequina	Flavonoide	Hoja	Suárez <i>et al.</i> 2008.
Kaempferol-3-o-rutinosido	Flavonoide	Hoja	Suárez <i>et al.</i> 2008.
Apigenin-7-o-beta-d-glucurónido	Flavonoide	Flores	Tiwari <i>et al.</i> 1978.
Acido rosmarinico	Fenilpropanoide	Parte aérea	Aquino <i>et al.</i> 1990.
Stigmast-4-en-3-6-diona	Esteroides	Hoja	Ripperger <i>et al.</i> 1978.

## 1.2 Actividad biológica de los extractos crudos y de los alcaloides indol y oxindol-monoterpénicos de *H. patens*

La planta *H. patens* ha sido utilizada en América desde tiempos prehispánicos para el tratamiento de diferentes afecciones. El nombre maya de esta planta es "Ix-canan" que



significa "guardián de la selva", los Mayas la han utilizado para el tratamiento de heridas, abscesos y enfermedades del útero y ovarios ([Mena-Rejon et al. 2009](#)). La medicina tradicional herbolaria juega un papel importante en el cuidado de la salud de los grupos indígenas, y este conocimiento es considerado parte su herencia cultural. La planta *H. patens* forma parte importante del acervo herbario de muchos grupos indígenas de América, y es utilizada principalmente para el tratamiento de problemas de la piel y digestivos ([Leonti et al. 2001](#)).

Con respecto a la actividad biológica del arbusto *H. patens*, se ha encontrado en diferentes extractos crudos; actividad antibacterial, antifúngica, analgésica, antiinflamatoria, citostática, diurética, e hipotérmica, entre otras ([Jiménez-Misas et al. 1979](#); [Lopez-Abraham et al. 1981](#); [Esposito-Avella et al. 1985](#); [Sosa et al. 2002](#); [Lopez-Abraham et al. 1979](#)). A este respecto, [Raskin et al. \(2002\)](#) plantean que estamos en una etapa de redescubrimiento de la relación entre las plantas y la salud, responsable del lanzamiento de una nueva generación de terapias botánicas que incluyen productos farmacéuticos derivados de plantas, medicamentos botánicos multicomponentes, suplementos alimenticios entre otras. Muchos de estos productos pronto complementaran a fármacos convencionales en el tratamiento, prevención y diagnóstico de diversas enfermedades. Sin embargo es necesario estudiar la farmacopea de los compuestos puros. Para lo cual, primero se realiza la búsqueda de estas actividades biológicas en fracciones de los extractos crudos con algún grado de purificación y posteriormente en sustancias puras como flavonoides y alcaloides obtenidos de esas fracciones.

Los alcaloides producidos por *H. patens* ([Tabla 1](#)), han mostrado tener diferentes actividades biológicas donde destacan; antileucémico, anticancerígeno, inmunoestimulante, antioxidante, regulación de la tensión arterial y antileishmaniasis ([Keplinger et al. 1999](#); [Lemaire et al. 1999](#); [Wagner et al. 1985](#); [Riva et al. 2001](#);

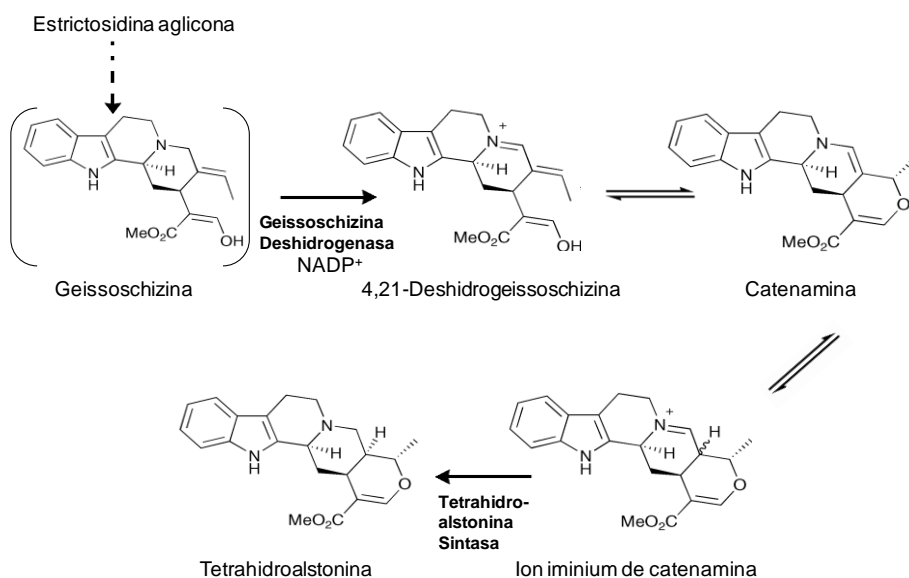
Paniagua-Pérez *et al.* 2005; Reyes-Chilpa *et al.* 2004; Suarez *et al.* 2008). Lo anterior ha provocado una demanda creciente de estos principios activos en el mercado (Aguilar *et al.* 2002) que no sólo aumentan el interés por probar la actividad contra diferentes enfermedades, si no que hacen necesario contar con información sobre la biosíntesis de estos compuestos que permita aplicar estrategias que potencialicen su adecuada producción.

### **I.3 Biosíntesis de alcaloides oxindol-monoterpénicos**

La biosíntesis y acumulación de alcaloides está altamente regulada en forma temporal y espacial en las células y los órganos de las plantas (Roytrakul y Verpoorte, 2007). Así como por factores del ambiente y del desarrollo, operados a través de una compleja red de pasos enzimáticos (Verma *et al.* 2012). Las rutas biosintéticas de muchos tipos de AIM se desconocen y en ciertos casos muchas de las enzimas que participan en su biosíntesis han sido clonadas y estudiadas mecanísticamente a nivel *in vitro*. En otros casos, las rutas biosintéticas propuestas han estado basadas en resultados de estudios de alimentación con sustratos o precursores marcados radiactivamente (O'Connor y Maresh, 2006).

En general para la biosíntesis de los AIM es necesario que dos rutas metabólicas convergentes aporten sus productos. La ruta del shikimato aporta la fracción indólica por medio del aminoácido L-triptófano, éste es convertido a triptamina mediante una reacción que cataliza la triptófano descarboxilasa. Por la otra parte, en plantas superiores la ruta citosólica del mevalonato (MEV) (Contin *et al.* 1998) y la ruta plastídica del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Rohmer, 1999) son las que aportan el isopentenil difosfato (IPP) (Burlat *et al.* 2004), el cual es precursor de la secologanina, un monoterpénoide glicosilado. La triptamina y la secologanina son condensados por la estrictosidina sintasa

(STR1) para dar origen a la 3 $\alpha$ (S)-estrictosidina. La estrictosidina es el intermediario a partir del cual se lleva a cabo la biosíntesis de los 2500 AIM conocidos (Yang y Stöckigt, 2010; Szabó, 2008). Por ejemplo, en estudios enzimáticos en cultivos de células en suspensión de *Catharanthus roseus* se ha propuesto que la 4,21-deshidrogeissoschizina, precursor de la catenamina, es el precursor clave en la biosíntesis del AIM tetrahidroalstonina (Fig. 2) y otros alcaloides de tipo corinante (Zenk, 1980).



**Figura 2.** Biosíntesis del AIM tetrahidroalstonina basada en experimentos enzimáticos (adaptada de Zenk, 1980).

La biosíntesis de los AOM se ha estudiado en algunas plantas de la familia de las *Rubiáceas*, así en *Mitragyna parvifolia* se postuló que los AOM se forman por oxidación de los AIM (Shellard *et al.* 1969, Shellard y Houghton, 1974). Mediante la biotransformación del precursor L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano se estudió la biosíntesis de los AOM en cultivos *in vitro* de *U. tomentosa*. En plántulas micropropagadas se propone que bajo condiciones de estrés existen pasos de oxidación que dan origen a los AOM a partir de los AIM (Luna-Palencia, 2006). Además, Ramos-Valdivia (2011) encontró que la incorporación del precursor triptófano marcado radiactivamente también se da en los AIM

glicosilados 3 $\alpha$ -dihidrocadambina (DHC) y dolicanósido producidos en cultivo de raíces de *U. tomentosa* (Comunicación personal). Un acercamiento más al estudio de la biosíntesis consistió en la incorporación del L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano a los cultivos de raíces, bajo diferentes condiciones que inducen o reducen el estrés oxidativo. En ellos se observó que con la adición de inhibidores de elementos generadores de ERO disminuía la incorporación en los AOM (Huerta-Heredia, 2010).

Trejo-Tapia (2007) demostró que en cultivos de células de *U. tomentosa* hay una correlación entre el aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la estimulación de la biosíntesis de AOM. Relacionando el estallamiento oxidativo provocado por el estrés hidrodinámico y el oxígeno disuelto en el biorreactor airlit, se encontró una relación positiva entre la concentración extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los AOM producidos.

Huerta-Heredia en 2010 evaluó la producción de alcaloides con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un intervalo de 50  $\mu$ M a 1 mM en un cultivo de raíces de *U. tomentosa*, encontrando un efecto positivo en la producción de AOM al aumentar la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que la DHC sólo presentó un incremento hasta 200  $\mu$ M. Por otro lado, Santos-Mendoza en 2010, encontró en cultivos de raíces de *U. tomentosa*, una relación positiva entre el incremento en la producción de alcaloides indol-terpénicos y la actividad de las enzimas estrictosidina sintasa (STR) y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS) bajo condiciones de estrés biótico con jasmonatos (JA). Además, Vera-Reyes (2013) reportó, una relación positiva entre el incremento en la actividad de STR y SDG, y sus transcritos con la inducción de la producción de AIM y AOM cuando estimuladores del estrés oxidativo como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la butionina sulfoximina (BSO), este último combinado con el JA, fueron adicionados a cultivos de raíces en suspensión de *U. tomentosa*.

## **I.4 Enzimas oxidativas del indol y de los alcaloides indol-monoterpénicos**

La biosíntesis de los alcaloides oxindol-monoterpénicos, los cuales son compuestos altamente oxidados en *H. patens*, involucra enzimas con una alta especificidad por el sustrato. Estas enzimas parecen haber evolucionado únicamente para el metabolismo secundario (Chou y Kutchan 1998). Se han reportado dos grupos de enzimas que podrían ser capaces de oxidar los AIM a AOM: oxigenasas y peroxidasas.

### **I.4.1 Oxigenasas**

Son enzimas que oxidan un sustrato por transferencia de oxígeno desde oxígeno molecular O<sub>2</sub>. Las oxigenasas son clasificadas como oxidoreductasas y su número es EC 1.13 o EC 1.14.

Hay dos tipos de oxigenasas

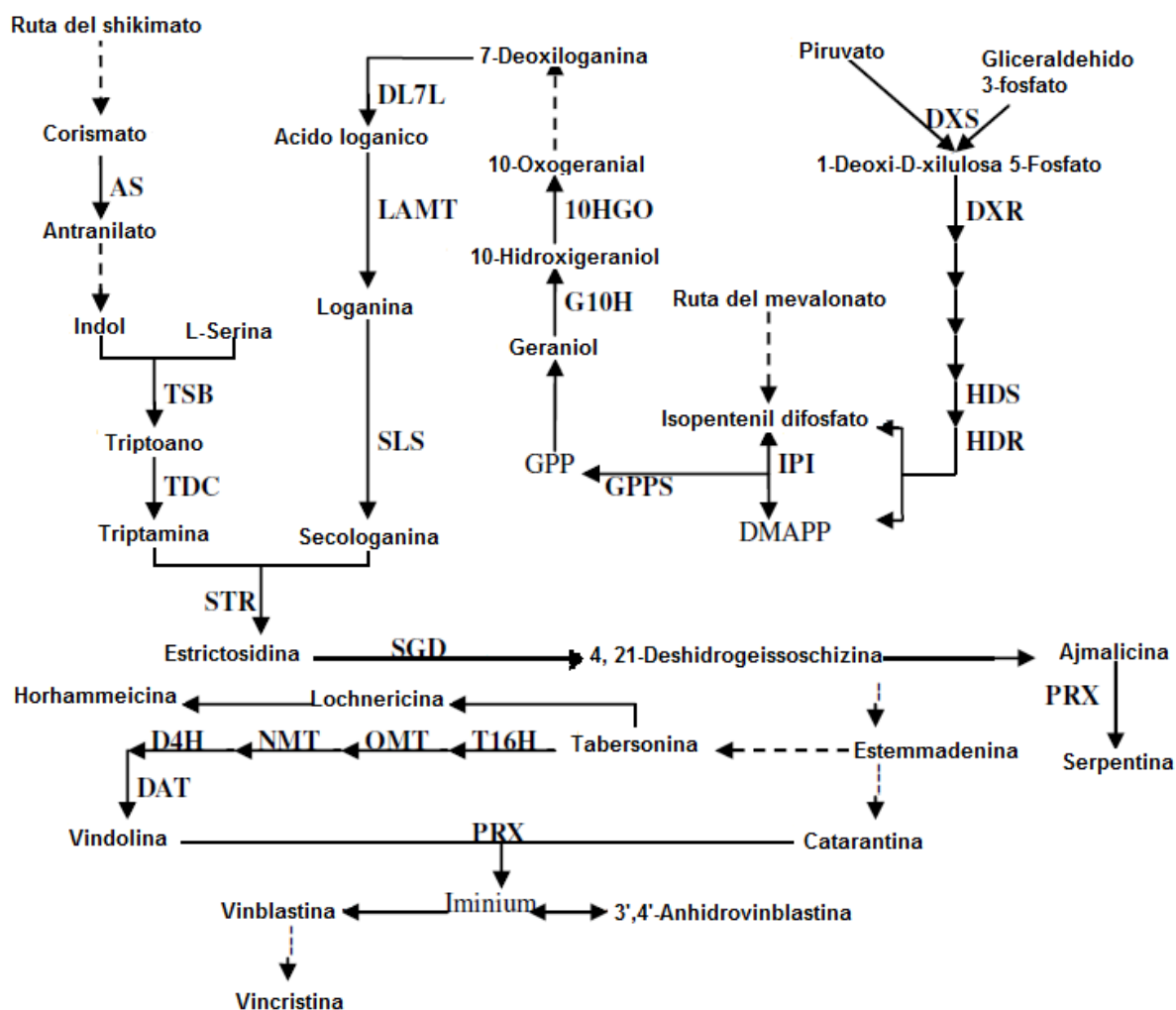
- Monoxigenasas, o mezcla de la función oxidasa, transfieren un átomo de oxígeno al sustrato y reducen otro átomo de oxígeno a agua.
- Dioxigenasas, realizan la transferencia de dos átomos de oxígeno molecular en el sustrato.

#### **I.4.1.1 Monoxigenasas citocromo p450**

En las plantas, estas enzimas participan en la desintoxicación de herbicidas y la biosíntesis de hormonas, así como de metabolitos secundarios entre los que encontramos flavonoides y alcaloides.

Las citocromo p450 juegan un papel muy importante en la biosíntesis de los alcaloides indol-monoterpénicos. Una de las primeras citocromo p450 que fue identificado en plantas fue la geraniol 10-hidroxilasa (GH10) en *C. roseus*, que lleva acabo la hidroxilación del geraniol convirtiéndolo en 10-hidroxigeraniol (Madyastha *et al.* 1976). La enzima secologanina sintasa SLS que cataliza la conversión de loganina a secologanina

es una citocromo P450 (CYP72A1) (Irmiler *et al.* 2000). La secologanina es el precursor que finalmente aporta la parte terpénica en la biosíntesis de la estrictosidina, precursor de los alcaloides indol-monoterpénicos. Además el alcaloide indol-monoterpénico tabersonina es transformado por la tabersonina 16-hidroxilasa (T16H) (St-Pierre y De Luca 1995) (Fig. 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de la biosíntesis de AIM en *C. roseus*, las líneas sólidas indican una sola conversión enzimática y las líneas discontinuas múltiples conversiones (Zhou, 2010).

#### **I.4.1.2 Dioxigenasa**

Tres de las seis transformaciones para convertir la tabersonina en vindolina en *C. roseus* son hidroxilaciones y la tercer hidroxilación es catalizada por la dioxigenasa 2-oxoglutarato-dependiente (DH4) que actúa en el C-4 de la deacetoxivindolina para formar deacetilvindolina (**Fig. 3**). Para la actividad de la enzima se requiere la adición del co-sustrato 2-oxoglutarato, ascorbato, ion ferroso y oxígeno molecular ([De Carolis y De Luca 1993](#)).

#### **I.4.2 Peroxidasas**

En las plantas las peroxidasas son enzimas que contienen el grupo hemo, las cuales catalizan la oxidación de muchos sustratos a expensas del  $H_2O_2$ . Las peroxidasas de las plantas pertenecientes a la clase III (Prxs) están involucradas en el metabolismo de auxinas, la formación de la lignina y la suberina, el entrecruzado de los componentes de la pared, la síntesis de fitoalexinas ([Gara, 2004](#)), el metabolismo de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) y la biosíntesis de alcaloides ([Almagro et al. 2008](#)). La oxidación del alcaloide indólico ajmalicina a serpentina ha sido atribuida a isoenzimas de peroxidasa básica de la vacuola de las células de *C. roseus*. Además, la biosíntesis del primer intermediario de los alcaloides diméricos la  $\alpha$ -3',4'-anhidrovinblastina es llevada a cabo por una peroxidasa (Crprx1) vacuolar en *C. roseus* (**Fig. 3**) ([Sottomayor et al. 2003](#)). La localización de la Prxs puede estar asociada a los microdominios de la membrana junto con las proteínas arabinogalactanas en secciones de lípidos, tanto en la membrana plasmática como en el tonoplasto y la orientación y localización específica de las Prxs en estas secciones determinará que compuestos pueden tomar como sustratos ([Sottomayor et al. 2008](#)).

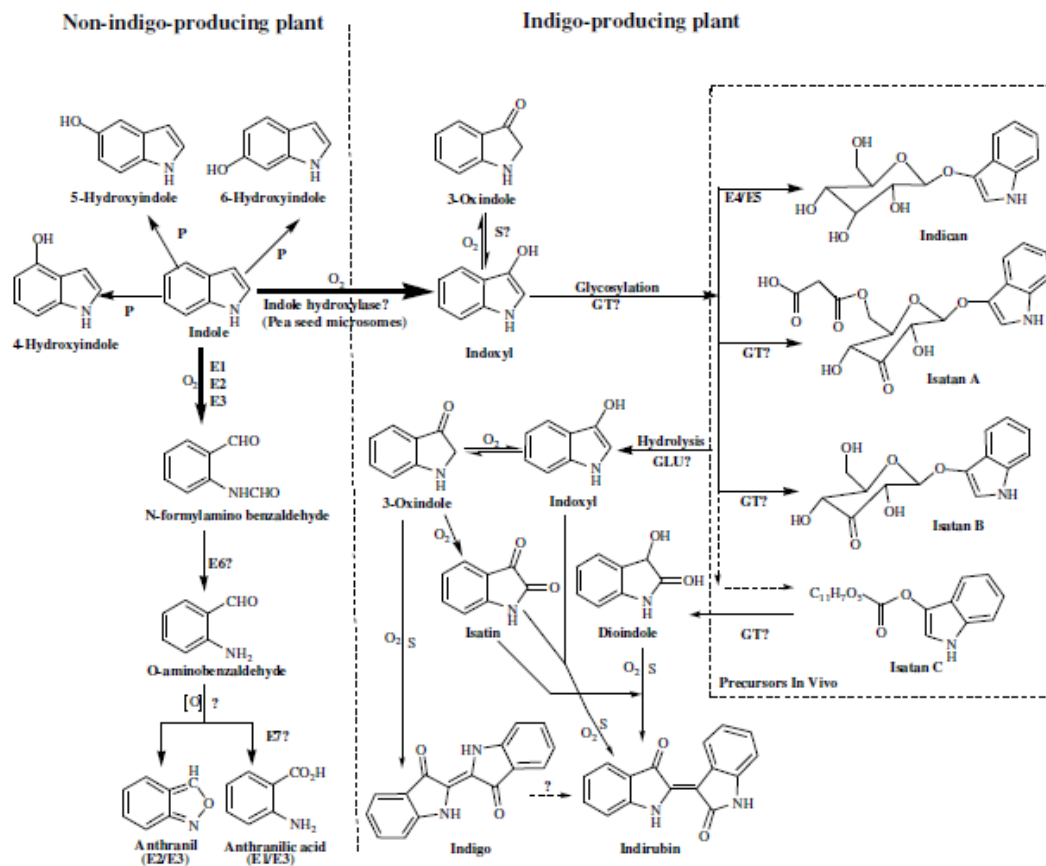
### I.4.3 Enzimas capaces de oxidar el indol

El indol es el grupo funcional de muchos compuestos y moléculas bioquímicas importantes tales como hormonas de plantas, ciertas proteínas, enzimas, indigoides y alcaloides (Yuan *et al.* 2011).

Corbett y Chipko en 1979 reportaron que la cloroperoxidasa es capaz de convertir el indol en oxindol en presencia de  $H_2O_2$ . Además, en ensayos con peroxidasa de rábano se encontró que cataliza la degradación del ácido indol-3-acético (IAA) resultando en la formación del indol-3-metanol (IM) en presencia de compuestos fenólicos o en la formación de 3-hydroximetiloxindol (HMOx) en ausencia de compuestos fenólicos. Por lo que se ha sugerido que la función de la “ruta oxindol” es para destoxificar el exceso de  $H_2O_2$  en ausencia de cosustratos fenólicos (Grambow y Langenbeck-Schwich 1983). Por otro lado, se reportó que la peroxidasa de rábano también cataliza la oxidación del indol y muchas moléculas derivadas de este en presencia de  $H_2O_2$  (Ximenes *et al.* 2001).

En las plantas superiores, la biosíntesis del indol es desde la vía del ácido shikímico, ya sea a través del triptófano o del indol-3 piruvato. Su oxidación tiene vías completamente diferentes en función de si la planta puede producir indigoides o no (Fig. 4). Las enzimas responsables de la oxidación del indol se pueden clasificar en tres categorías: monooxigenasas, dioxigenasas y peroxidadas (cloroperoxidasa). Pueden también ser clasificadas con base en la estructura de su centro activo, dentro de las oxigenasas que contienen los grupos hemo-cromo y las que contienen flavina. Las oxigenasas que contienen el grupo hemo requieren en general NADH o NADPH para la oxidación del indol, incluso algunas requieren otros cofactores, tales como ferredoxina para la transferencia de electrones. Mientras que para la oxidación del indol catalizada por oxigenasas que contienen flavina, la flavina reductasa podría estar involucrada (Yuan *et al.* 2011).





**Figura 4.** La oxidación del indol en las plantas superiores. E1: Indol oxigenasa, E2: Indol oxidasa, E3: Indol 2, 3-dioxigenasa, E4: Indican sintasa, E5: Indoxyl-UDPG-glucosiltransferasa, E6: Formilasa, E7: aldehído oxidasa, S: reacción espontánea, P: Los tejidos vegetales y órganos, GT?: Glucosiltransferasa, no identificada, GLU?: glucosidasa, no identificada (Yuan et al. 2011).

### I.5 Respuesta antioxidante generada por factores de estrés

En todos los ambientes naturales las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés que se clasifican en bióticos y abióticos. Los primeros son causados por organismos vivos como herbívoros, patógenos, bacterias y parásitos o productos derivados de su metabolismo. Mientras que el estrés abiótico, es causado por diversos factores ambientales, xenobióticos y nutrientes como el calor, el frío, la luz, los metales

pesados, el pH y los minerales. Como una de las primeras respuestas ante el estrés al que son sometidas las plantas, incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) dentro de las que encontramos al superóxido ( $O^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), siendo este último el más estable (Apel y Hirt, 2004). El desequilibrio producido es balanceado mediante un sistema de detoxificación que puede ser de dos tipos: enzimático y no enzimático. Las enzimas incluidas en el primer sistema son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (Ahmad *et al.* 2010). La mayoría de estas enzimas se localizan en citoplasma, cloroplasto, mitocondria y peroxisoma (Noctor *et al.* 1998). Por otro lado, el mecanismo no enzimático está compuesto por moléculas con capacidad de secuestrar ERO (actividad antioxidante), glutatión, ácido ascórbico y diversos metabolitos secundarios como flavonoides y alcaloides (Ramos-Valdivia *et al.* 2012).

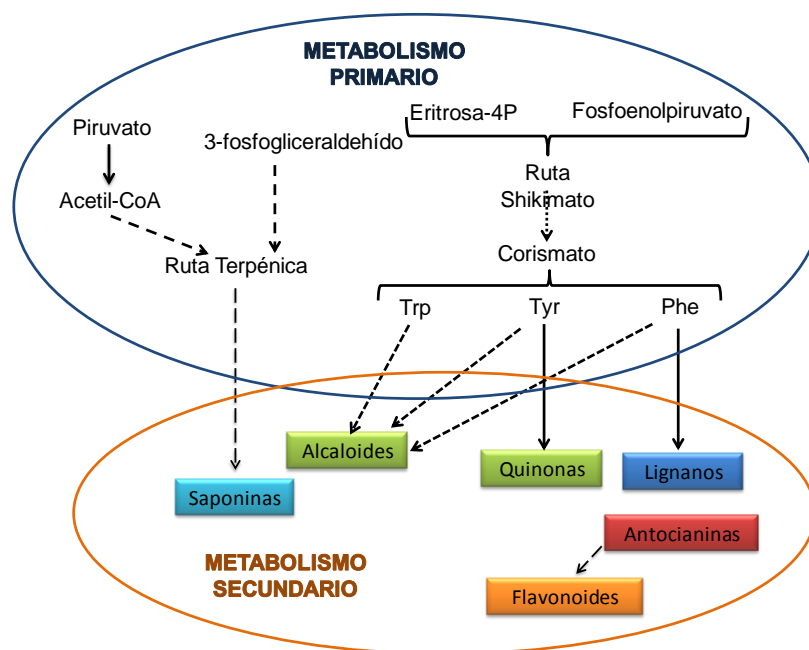
## **I.6 Metabolitos secundarios como agentes antioxidantes**

Un antioxidante es un compuesto que inhibe o retrasa la oxidación de sustancias. Uno de los posibles mecanismos de acción es atrapar o secuestrar a las ROS, evitando daños a la célula al interferir con la cascada de propagación de radicales libres. Los antioxidantes pueden ser reciclados o dañados irreversiblemente, sin embargo, sus productos de oxidación resultan menos nocivos o incluso, se pueden convertir en sustancias inocuas para las células (Matkowski, 2008).

Los metabolitos secundarios o productos naturales producidos por las plantas son compuestos que no son necesarios para asegurar la sobrevivencia, pero sí para competir o defenderse y su biosíntesis se desarrolla a partir del metabolismo primario (Fig. 5). Las plantas han diseñado miles de metabolitos secundarios donde encontramos aquellos libres de nitrógeno (terpenos, policétidos, fenólicos [ flavonoides], saponinas y

poliacetilenos) y los que contienen nitrógeno (alcaloides como los AOM, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos y alcamidas) (Wink, 2008).

Por un lado, los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, representan un gran grupo de alrededor de 6500 compuestos. Los flavonoides desempeñan un papel importante en varios estadios del crecimiento de la planta y en la respuesta al estrés ambiental; protegen a la planta de diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, actúan como un filtro UV, funcionan como moléculas señales, actúan como agente detoxificadores y pueden tener un papel funcional en la aclimatación al calor y en la tolerancia al frío de las plantas. Los flavonoides pueden secuestrar ROS foto- producidas en los cloroplastos. El radical súper oxido no puede difundirse fácilmente del cloroplasto a las vacuolas, donde están los flavonoides, pero el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede difundirse a través de la membrana (Yamasaki *et al.* 1997). Además, Se ha encontrado que los compuestos fenólicos presentan un alto secuestramiento de ROS, para reducir el estrés provocado por la radiación UV (Jasen *et al.* 2001).



**Figura 5.** Aporte del metabolismo primario a la biosíntesis del metabolismo secundario en plantas (adaptado de Ramos-Valdivia *et al.* 2012).

Por otra parte, los alcaloides son parte del arsenal químico diseñado para proteger a las plantas contra un entorno adverso. Por lo tanto, su síntesis y acumulación con frecuencia se induce en respuesta a ciertas condiciones ambientales y están mediadas por señales químicas, que se forman como las primeras respuestas a los estímulos externos (Miranda-Ham *et al.* 2007). En varios reportes se ha propuesto que el estallamiento oxidativo (aumento de ERO) tiene un efecto en el incremento de la producción de metabolitos secundarios como los alcaloides de tipo indólico. En plantas de *C. roseus* la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-200 µM) estimuló la producción de vindolina, catarantina y vinblastina; sugiriéndose que los alcaloides también pueden estar cumpliendo una función de protección a las plantas bajo condiciones de estrés (Tang *et al.* 2009). Además, en *C. roseus* tanto la transducción de señales ante el estrés abiótico como la transcripción de genes que regulan de biosíntesis y acumulación de los AIM ocurre con la participación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (Raina *et al.* 2012). En plantas, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría inducir una respuesta de estrés en general, pero no tiene la especificidad requerida para regular selectivamente los genes nucleares requeridos para hacer frente al estrés localizado. Con base en lo anterior, se ha propuesto que los péptidos derivados de la descomposición proteolítica de las proteínas dañadas oxidativamente, tienen esta especificidad y puedan así contribuir a la señalización retrógrada durante el estrés oxidativo (Moller y Sweetlove, 2010).

### **1.7. Cultivos vegetales en condiciones controladas**

Actualmente se ha incrementado la demanda de muchas plantas medicinales, pero la gran mayoría se obtienen sólo por recolección de las plantas silvestres, sin siquiera aplicar técnicas adecuadas de cosecha. Esta situación pone en peligro la sostenibilidad de este recurso forestal. Organismos internacionales como la Organización Mundial de

Salud y la World Wildlife Fund recomiendan cultivar plantas medicinales en vez de colectarlas y así contribuir a conservar la biodiversidad del entorno.

Los cultivos de plantas medicinales en condiciones controladas pueden permitir obtener mayor producción, ya que son mantenidos en condiciones específicas para su desarrollo y/o para la producción de los metabolitos secundarios que les confieren la actividad biológica buscada. En cultivos en tierra se pueden utilizar invernaderos sistematizados o cámaras de incubación, con las cuales se puede controlar muchas condiciones del ambiente como temperatura, humedad, intensidad y periodo lumínico. Sin embargo, resulta muy difícil controlar condiciones como la carga microbiana y el tipo de micro y macroorganismos presentes en la tierra, así como la dinámica de interacción con el cultivo. Además, los nutrientes minerales disponibles en la tierra para los cultivos de plantas se encuentran en función de muchos factores.

Una estrategia para obtener cultivos de plantas medicinales en condiciones controladas son los cultivos *in vitro* de células y tejidos vegetales. En los cultivos *in vitro* se utilizan medios de cultivo definidos en condiciones de esterilidad, que permiten controlar los nutrientes disponibles para el cultivo. Usualmente los cultivos son adicionados con reguladores de crecimiento. Estos representan una herramienta rápida, exitosa y sustentable para la propagación asexual de plantas medicinales con una adecuada producción de metabolitos secundarios.

### **1.7.1 Cultivos *in vitro* de células y tejidos vegetales**

La micropropagación o propagación clonal de plantas en condiciones *in vitro* es una herramienta biotecnológica que no necesariamente involucra la manipulación genética. Permite obtener plantas medicinales homogéneas libres de plagas en condiciones bióticas y abióticas controladas. Además, no compite por los terrenos agrícolas, puede acoplarse a otras estrategias para adaptar las plantas medicinales a tierra y así contribuir

a mantener la biodiversidad en el ambiente silvestre.

La propagación *in vitro* de plántulas, callos, raíces en suspensión y células en suspensión ha sido considerada una alternativa viable para la producción de metabolitos secundarios y un sistema modelo de investigación, ya que permite mantener el cultivo en condiciones controladas.

En el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Cinvestav-IPN se establecieron cultivos *in vitro* de plántulas micropropagadas de *H. patens*. En cultivo *in vitro* de plántulas de *Hamelia patens* se ha reportado una producción de AOM hasta cuatro veces mayor a la de las hojas de plantas silvestres. Además, bajo determinadas condiciones de cultivo y con el empleo de elicitors, se puede estimular la producción de AIM (Paniagua-Vega, 2007). Las plántulas se aclimataron en tierra con un 100% de sobrevivencia después de ser incubadas bajo fotoperiodo de 16 h a  $30 \pm 1$  °C a 3500 lux ( $47.25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y después de tres meses pueden ser llevadas al ambiente silvestre y al cabo de un año en condiciones silvestres empezaron a producir flores y frutos. Donde destaca el gran potencial de la planta para adaptarse a diferentes climas, ya que el material vegetal inicial se tomó en Mapastepec, Chiapas, de un clima que va del cálido húmedo al semicálido. Sin embargo, las plántulas de *H. patens* generadas *in vitro* se adaptaron a un clima predominantemente subhúmedo que va de templado a semifrío en el norte de la Ciudad de México, Distrito Federal.

## II. JUSTIFICACIÓN

Los alcaloides oxindol-monotérmicos (AOM) presentan gran demanda por su actividad farmacológica, lo que aumenta la necesidad de obtenerlos a mayor escala. Sin embargo, las fuentes naturales habituales de AOM como la planta *Uncaria tomentosa* nativa de la zona amazónica, han sufrido una grave sobreexplotación.

En el laboratorio de células vegetales del Departamento de Biotecnología del Cinvestav-IPN se buscan nuevas fuentes de AOM que brinden los beneficios de adaptarse a las condiciones locales. Además, se utilizan estrategias biotecnológicas, como los cultivos *in vitro* de células y tejidos vegetales, para el estudio de la biosíntesis de AOM y procedimientos que permitan aumentar su producción.

La planta *Hamelia patens* nativa de México, muestra la capacidad de producir AOM e incluso algunos con mayor grado de oxidación como son los metoxilados e hidroxilados. Cabe destacar que no se han reportado estudios sobre la biosíntesis de AOM de tipo hidroxilados y/o metoxilados.

Por lo anterior es importante estudiar la biosíntesis de los alcaloides AOM en cultivos *in vitro* de *H. patens*. Para ello se emplearán diversas estrategias, tales como, la caracterización química y análisis del perfil de alcaloides y de los precursores; la validación *in vivo* de la incorporación de un precursor marcado radiactivamente (L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano); la biotransformación *in vivo* de un alcaloide indol-monoterpénico y el análisis de los cambios en la producción de alcaloides bajo diferentes condiciones experimentales. Este trabajo permitirá un acercamiento para entender los procesos de biosíntesis de los alcaloides AOM en *H. patens*.

### **III. HIPÓTESIS**

Los alcaloides indol-monoterpénicos actuarán como precursores biosintéticos de los alcaloides oxindol-monoterpénicos, y la biosíntesis de ambos será estimulada por factores de estrés en *Hamelia patens*.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar los alcaloides indol y oxindol-monoterpénicos y estudiar su biosíntesis en respuesta al estrés, en cultivos de *Hamelia patens*.

#### **IV.1. Objetivos específicos**

- a) Comparar el perfil de producción de AIM, AOM y AT en cultivos *in vitro* de plántulas, raíces en suspensión, callos y células en suspensión de *H. patens*.
- b) Caracterizar los alcaloides AIM y AOM producidos por *H. patens*.
- c) Analizar la producción de alcaloides bajo estrés biótico (pulpa de celulosa) y abiótico (luz y NaCl) en *H. patens*.
- d) Estudiar la biosíntesis de los AOM de *H. patens* a partir de sus precursores.
- e) Investigar la producción de otros metabolitos secundarios antioxidantes durante el crecimiento de plántulas de *H. patens*.



## V. MATERIALES Y METODOS

### V.1 Material vegetal

Los cultivos vegetales *in vitro* se establecieron a partir de semillas de *Hamelia patens*, que se colectaron en Mapastepec, Chiapas, México (15° 26' 22" N, 92° 54' 07" O a 48 msnm) en agosto de 2009. Adicionalmente, se colectaron hojas con peciolo en Coatzintla, Veracruz, México (20° 28' 57" N, 97° 27' 36" O a 108 msnm) y partes de inflorescencias en Uxmal, Yucatán, México (20° 21' 34" N, 89° 46' 17" O a 48 msnm). Los ejemplares de *H. patens* fueron identificadas botánicamente por la especialista en la familia de las Rubiaceae Dra. Helga Ocheterena Booth del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM).

#### V.1.1 Cultivo de plántulas micropropagadas de *H. patens*

Las semillas de *H. patens* se desinfectaron durante 1 min en etanol al 90%, se embebieron en agua estéril por tres días y se germinaron en frascos de vidrio con medio de cultivo Nitsch y Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969) modificado (NNm) (Paniagua-Vega *et al.* 2012). Cada frasco contenía 25 ml del medio, suplementado con 20 g/L de sacarosa y 2 g/L de Gelrite a pH 6.3 antes de la esterilización. Los cultivos fueron incubados en un fotoperiodo de 16/8 h luz-oscuridad (luz blanca fría fluorescente a  $8.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . A partir de los germinados *in vitro* de *H. patens* se probó micropropagar por medio de tres tipos de explantes; los nodos apicales, los axilares binodales y las hojas con peciolo.

El mantenimiento se llevó a cabo subcultivando los cultivos cada dos meses e incubándolos en las mismas condiciones. Adicionalmente, se utilizó un fotoperiodo de 16/8 h luz-oscuridad a  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una condición de luz continua a  $33.75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , para evaluar crecimiento y producción de metabolitos secundarios.

La adaptación a tierra se llevó a cabo transfiriendo las plántulas micropropagadas de

aproximadamente dos meses a macetas con tierra negra y perlita expandida (2:1) en condiciones de cultivo controladas en una cámara climática Conviron modelo A1000 con un fotoperiodo de 16/8 h luz-oscuridad a  $47.25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **V.1.2 Cultivo de raíces en suspensión de *H. patens***

Los cultivos se iniciaron a partir de la raíz de plántulas de *H. patens* de dos meses micropropagadas (a partir de explantes nodales apicales y binodales axilares). Fueron incubadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 1/5 del volumen total de medio de cultivo, evaluando dos medios de cultivo completos: el Murashige y Skoog (MS) y Gamborg's B5 (B5) ([Tabla 2](#)) ambos suplementados con 20 g/L de sacarosa, se ajustó el pH de 7 previo a esterilizar. Los cultivos se mantuvieron bajo un régimen de luz continua con una intensidad lumínica de  $24.30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , una agitación orbital de 100 rpm y  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . En estas condiciones de cultivo se tomaron los inoculos al mes de subcultivados. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **V.1.3. Cultivo de callos de *H. patens***

Para el establecimiento del cultivo de callos se utilizaron explantes de hojas, tallos y raíces de plántulas *in vitro* de *H. patens* de un mes de micropropagadas. Se utilizaron frascos con 25 mL de medio de cultivo, probando los medios de cultivo base como se muestran en su composición en la [Tabla 2](#), a los cuales se le adicionaron reguladores de crecimiento en las combinaciones que se muestran en la [Tabla 3](#), 20 g/L de sacarosa, 2 g/L de Phytigel<sup>R</sup>, se ajustó el pH 6 previo a la esterilización. Los callos se incubaron bajo un fotoperiodo de 16/8 h con intensidad lumínica de  $33.75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , subcultivando cada 25 días. Para los experimentos de crecimiento y la producción de compuestos fenólicos en cultivos de callos se evaluó además de la incubación bajo régimen lumínico de fotoperiodo, el efecto de la luz continua a  $27.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los

experimentos se realizaron por triplicado.

#### V.1.4 Cultivo de células en suspensión

Para el establecimiento del cultivo de células se utilizaron callos friables de *H. patens* cultivados *in vitro* de aproximadamente un mes de micropropagados.

**Tabla 2.** Composición de los medios de cultivo base Gamborg's B5 (Gamborg's *et al.* 1968), Murashige and Skoog MS (Murashige y Skoog, 1962) y MSA1.

Compuesto	Gamborg's (B5) mg/L	Murashige & Skoog (MS) mg/L	Murashige & Skoog modificado (MSA1) mg/L
<b>Macronutrientes</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	—	1650.0	1000
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	134.0	—	—
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150.0	332.2	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250.0	370.0	0.36
KNO <sub>3</sub>	2500.0	1900.0	480
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	170.0	165
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	130.5	—	—
<b>Micronutrientes</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0	6.2	10
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.3	—
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	—	—	7.45
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	5.7
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10.0	16.9	—
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	—	—	25
KI	0.75	0.83	0.75
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.025
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.0	8.6	10
<b>Orgánicos</b>			
Mio-inositol	100	100	—
Glicina	—	2.0	—
Ácido nicotínico	1.0	0.5	0.5
Piridoxina - HCl	1.0	0.5	0.1
Tiamina	10	0.1	0.1
Riboflavina	—	—	0.05
Acido fólico	—	—	0.1
Biotina	—	—	0.005
Colina	—	—	0.1
Pantotenato de calcio	—	—	0.80
Acido P-Aminobenzoico	—	—	0.05
Acido ascórbico	—	—	3
L-Triptofano	—	—	5
L-Histidina	—	—	3
Adenina	—	—	5

Se probaron dos medios de cultivo completos MS y B5, suplementado con reguladores de crecimiento en las combinaciones que se muestran en la **Tabla 4**, 20 g/L de sacarosa a pH 7 antes de esterilizar. Se incubaron en luz continua con intensidad lumínica de  $24.30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y agitación orbital de 100 rpm a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tabla 3.** Composición de los medios de cultivo para el establecimiento del cultivo de callos de *H. patens*.

	Medio 33	Medio 17	Medio 20	Medio 34
<b>Medio base</b>	B5	MSA1*	MS	B5
<b>L-cisteína</b>	50 mg/L	—	—	—
<b>2,4-D</b> (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	2 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	—
<b>Cinetina</b>	0.2 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	—
<b>NAA</b> (ácido naftalénacetico)	—	0.2 mg/L	—	—
<b>PVP</b> (polivinilpirrolidona)	—	—	—	0.4%
<b>Picloram</b> (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico)	—	—	—	1 mg/L
<b>Gel rite</b>	2 g/L	2 g/L	2 g/L	—
<b>PhytigelR</b>	—	—	—	2 g/L
<b>Sacarosa</b>	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L

\*MSA1. Medio MS con adición de componentes orgánicos según la **Tabla 2**.

**Tabla 4.** Composición de los medios de cultivo para el establecimiento de un cultivo de células de *H. patens*

	MS 2S	B5 2S	B5 P-P 1S	B5 N-P 1S	B5 P-P 2S	B5 N-P 2S
<b>Medio base</b>	MS	B5	B5	B5	B5	B5
<b>NAA</b>	—	—	—	1.2 mg/L	—	1.2 mg/L
<b>PVP</b>	—	—	0.4%		0.4%	
<b>Picloram</b>	—	—	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L
<b>Sacarosa</b>	20 g/L	20 g/L	10 g/L	10 g/L	20 g/L	20 g/L

## **V.2 Viabilidad celular**

La viabilidad celular se determinó con diacetato de fluoreceína (FDA), se utilizó una solución madre de 5 mg/mL de FDA en acetona. De esta solución se tomó 0.1 mL para diluirlo a 5 mL en agua desionizada (Young-Kwon, 1999). Esta última solución se adicionó a la muestra (raíces, células o callos) para ser observada al microscopio Carl Zeiss D-7082 con un condensador de luz reflejada-fluorescencia IV FI, con lo cual se observó una fluorescencia verde debida a la ruptura de los enlaces éster del FDA para dar fluoresceína. Esto por acción de las esterasas presentes en las membranas celulares de las células viables.

## **V.3 Compuestos fenólicos totales**

La extracción se realizó a partir de 0.5 g (peso fresco) de muestra de callos, los cuales se dejaron en contacto con 0.5 mL de etanol al 50% por 3 h, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 0.25 mL y se mezcló con 0.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu previamente diluido en agua 1:1 (v/v), 0.5 mL de una solución saturada de carbonato de sodio (60 g/L) y 4 mL de agua desionizada. La mezcla se agitó fuertemente y se mantuvo a una temperatura ambiente durante 25 min, se centrifugó a 5000 rpm por 10 min (Pilarski *et al.* 2006). La absorbancia del sobrenadante se midió a 725 nm con un espectrofotómetro Genesys 10V (Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como equivalentes de D-catequina.

## **V.4 Crecimiento**

La biomasa de los cultivos de raíces y de células se separó del medio de cultivo por filtración al vacío, utilizando un embudo Buchner con un papel filtro y un matraz Kitasato. Posteriormente se registró el peso fresco de cada muestra. El peso fresco de los cultivos de callos y plántulas se pesó directamente. Para la determinación del peso seco la

biomasa húmeda se liofilizó o se llevó a estufa a 80 °C por 12 horas, hasta obtener el peso constante. El crecimiento se evaluó por la diferencia de pesos en el tiempo de cultivo.

El crecimiento del cultivo de plántulas en el tiempo también se evaluó midiendo el incremento de la altura de los explantes.

#### **V.5 Obtención de estándares de alcaloides indol y oxindol-monoterpénicos de *H. patens***

Después de 12 h de su recolección, entre 3 a 4 kg de hojas de plantas silvestres de *H. patens* de Coatzintla, Veracruz, México (20° 28' 57" N, 97° 27' 36" O a 108 msnm), fueron sometidas a una extracción por maceración en 8 L de metanol grado HPLC. El extracto fue filtrado y se concentró a presión reducida en un rotavapor Büchi 461 a 50 °C, así mismo, a las hojas se les realizó una segunda extracción con metanol por 1 d. El volumen de extracto concentrado fue reducido a 1 L. El extracto se burbujeó con N<sub>2</sub> (g) para eliminar posibles trazas de metanol, se extrajeron compuestos grasos utilizando ciclohexano (2:1), la fase acuosa se guardó en refrigeración. Posteriormente ésta se liofilizó en un equipo Sany-Dry 275 Granvillephillips. El residuo liofilizado se disolvió en metanol (Kim *et al.* 2006). Después, se ajustó el pH entre 8 y 9 con NH<sub>4</sub>OH concentrado (del 28 al 30%) y se llevó a cabo una extracción con cloroformo (1:2) grado HPLC. La fase orgánica se secó con NaSO<sub>4</sub> anhidro para eliminar cualquier resto de la fase acuosa, se filtró y se evaporó a 50 °C a presión reducida. Finalmente, el extracto se disolvió en metanol-amortiguador de fosfatos pH 6 (1:1) y se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45 µm.

El aislamiento de los alcaloides se realizó a partir del extracto concentrado el que se separó en un equipo de HPLC Varian ProStar modelo 330 con detector PDA y una

bomba Varian ProStar modelo 230. Los alcaloides fueron aislados por inyección manual de 500 µL, utilizando una columna semi-preparativa Waters Spherisorb S10 ODS2 (10 x 250 mm) eluyendo con acetonitrilo-amortiguador de fosfatos 0.01 M a pH 7 (4:6) como fase móvil a 3.0 mL/min.

Para seleccionar los picos a colectar se tomó en consideración sus espectros de UV y los tiempos de retención en comparación con los espectros característicos de la triptamina, y los alcaloides ajmalicina y pteropodina (Luna-Palencia *et al.* 2005). La colecta de cada uno de los picos se llevó a cabo en frío, aproximadamente a 4 °C, conservando las muestras en congelación a -20 °C para disminuir en lo posible la isomerización de los alcaloides (Keplinger *et al.* 1998, Laus *et al.* 1996). Posteriormente, a cada fracción se le ajustó el pH entre 8 y 9 con NH<sub>4</sub>OH concentrado y se efectuó una extracción con cloroformo grado HPLC. Cada fase clorofórmica se secó con NaSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se llevó a sequedad empleando una corriente de N<sub>2(g)</sub>. A cada fracción aislada se le realizaron análisis espectrométricos para formar una biblioteca estándares validados con alta pureza.

## **V.6 Análisis instrumental de los estándares de alcaloides de *H. patens***

### **V.6.1 Resonancia magnética nuclear**

Los análisis de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C y los análisis bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC se determinaron en un equipo Varian Mercury 300 operado a 300 MHz y utilizando soluciones de cloroformo deuterado y de metanol deuterado con tetrametilsilano como referencia interna.

Los análisis de RMN fueron realizados por el Dr. Carlos Cerda García Rojas del Departamento de Química del Cinvestav-IPN, unidad Zacatenco.

### **V.6.2 Espectrometría de masa de impacto electrónico e ionización química**

Los espectros de masa se determinaron en un espectrómetro Hewlett-Packard 5989A de impacto electrónico a 20 eV y en un espectrómetro Varian Saturn 2000 de trampa iónica por impacto electrónico a 70 eV y por ionización química con acetonitrilo.

### **V.6.3 Espectrometría de masa de electroespray**

Los espectros de masa se determinaron en un espectrómetro Agilent 1100 LC/MSD con sistema de trampa, utilizando una columna analítica RP-C18 Waters Spherisorb S50 ODS2 de 4.6 x 250 mm, con una fase móvil de (A) acetato de amonio 30 mM pH 5 y (B) metanol-acetonitrilo en relación 1:1, con un gradiente lineal 6:4 y con una velocidad de flujo de 0.7 mL/min. Se emplearon  $N_2$  (g) y  $He$  (g) como gases acarreadores.

### **V.6.4 Espectroscopia y rotación óptica**

La rotación óptica se midió con un polarímetro Perkin-Elmer 341 en  $CHCl_3$ . El espectro UV se midió en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 12 en EtOH. El espectro de IR se obtuvo en un espectrofotómetro Buck 500.

## **V.7 Extracción y cuantificación de alcaloides y precursores**

La cantidad de muestra dependió del tipo de cultivo ([Tabla 5](#)). Las muestras se pulverizaron en mortero con pistilo con  $N_2$  (liq.) y se extrajeron con una relación 1:1 (P. F. de la muestra / v de mezcla de extracción) con metanol – amortiguador de fosfato de potasio 90.5 mM a pH 6 (1:1), se sónicaron por 10 min y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. Para la cuantificación, se filtró el sobrenadante y se obtuvieron de 100 a 600  $\mu$ L de los cuales se inyectaron de 20 a 100  $\mu$ L en una columna analítica Merk Hibar (4 x 250 mm) en un equipo de HPLC Varian ProStar modelo 330 con detector PDA y una bomba Varian ProStar modelo 230 con inyector automático, eluyendo con una fase móvil de (A)



acetonitrilo–(B) amortiguador fosfatos 0.01 M a pH 7, en un gradiente lineal (4:6), a 0.7 mL/min.

Los AOM se identificaron en los cromatogramas por su espectro UV y su  $R_t$  en la columna analítica: rumberina 6.7; especiofilina 12.1; uncarina F 13.7; hamelina 15.5; pteropodina 16.8; palmirina 20.5; isopteropodina 25.7 min.

**Tabla 5.** Peso fresco requerido de muestra de los cultivos de *H. patens* para la extracción y cuantificación de alcaloides y/o precursores en HPLC.

Tipo de cultivo	Muestra g (P. F.)
Plántulas <i>in vitro</i>	0.5 – 0.20
Hojas de plántulas <i>in vitro</i> *	0.5 – 0.02
Tallos de plántulas <i>in vitro</i> *	0.5 – 0.02
Raíces de plántulas <i>in vitro</i> *	1.0 – 0.30
Raíces en suspensión <i>in vitro</i>	1.0 – 0.50
Callos <i>in vitro</i>	1.0 – 0.50
Células <i>in vitro</i>	1.0 – 0.50
Medios de cultivos <i>in vitro</i> ** (de raíces y células en suspensión)	40.0 – 5.00
Hojas de plantas silvestres	0.7 – 0.30
Otros tejidos de plantas silvestres	1.0 – 0.20

\* Tejidos del cultivo de plántulas *in vitro*.

\*\* Los medios de cultivo se liofilizan y después se extraen.

## V.8 Adición de celulosa a cultivos *in vitro* de plántulas de *H. patens*

El material vegetal se obtuvo de explantes apicales a partir de plántulas de 2 meses de micropropagación. Se utilizaron 18 explantes en total, cada explante se llevó a un frasco con medio de cultivo NNm semisólido con Phytigel<sup>R</sup> sin reguladores de crecimiento, al cual se les adicionó antes de esterilizar el medio, pulpa de celulosa amorfa (Cel A) o

cristalina (Cel C), ambas a 0.5% (p/v), en dos condiciones; con adición de sacarosa (20 g/L) y sin adición de sacarosa. Además, se realizaron cultivos controles a los cuales no se les adicionó celulosa en las mismas dos condiciones con 20 g/L sacarosa y sin sacarosa. Los cultivos fueron incubados en condiciones de fotoperiodo de 18/6 h de luz a una intensidad lumínica de  $8.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las plántulas fueron cosechadas al mes del cultivo, todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

#### **V.9 Adición de NaCl a cultivos *in vitro* de plántulas de *H. patens***

Se utilizaron explantes apicales de plántulas de 2 meses de micropropagadas. Se sembraron 4 explantes en 50 mL de medio de cultivo NNm líquido sin reguladores de crecimiento en cajas Magenta de 250 mL (Sigma). Se probaron tres concentraciones de NaCl (adicionado antes de esterilizar el medio) al 50, 100 y 150 mM y un control sin adición de NaCl. Los cultivos se incubaron en condiciones de fotoperiodo de 18/6 h de luz a una intensidad lumínica de  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las plántulas se cosecharon a los cuatro días de cultivo, cada caja con cuatro explantes fue tomada como única unidad experimental por tratamiento.

#### **V.10 Diferentes regímenes de luz en plántulas de *H. patens***

Se seleccionaron explantes apicales de plántulas de *H. patens* de dos meses de micropropagadas. Para cada régimen lumínico se utilizaron dos frascos de 230 mL (Sigma) con dos explantes cada uno, en 50 mL de medio de cultivo NNm líquido sin reguladores de crecimiento y se incubaron por un mes en condiciones de fotoperiodo de 18/6 h de luz a una intensidad lumínica de  $13.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, dos frascos continuaron en fotoperiodo y los otros dos frascos fueron llevados a un régimen lumínico de luz continua con una intensidad lumínica de  $27.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por un mes más. Las plántulas de ambos regímenes se cosecharon a los dos meses de

micropropagadas.

#### **V.11 Extracción enzimática de cultivo de raíces para los ensayos de la STR y SDG**

Aproximadamente para cada gramo de peso fresco de raíz se utilizó 1 mL de amortiguador de extracción que contenía amortiguador de fosfatos a pH 6.8, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 3 mM, ditioneitol (DTT) a 6 mM y PVPP del 2 al 3% (p/v). Después de disminuir el tamaño de partícula de las raíces con  $N_2$  (liq.) en un mortero con pistilo, se adicionó el amortiguador y se centrifugó a 4 °C a 14000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante. La determinación de la concentración de proteína del extracto se realizó según el método de [Peterson \(1977\)](#) utilizando una curva de calibración con albúmina de bovino como estándar de referencia.

#### **V.12 Determinación de actividad de estrictosidina sintasa (STR)**

La determinación de la actividad de la STR se realizó de acuerdo al método [Pennings et al. \(1982\)](#) modificado por [Vera-Reyes \(2013\)](#) para lo cual se incubaron 60 µg de proteína del extracto enzimático en el amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 6.8 que contenía además 2 mM de DTT, 0.8 mM de triptamina, 2 mM de secologanina y 100 mM de δ-D-gluconolactona, para inhibir la estrictosidina glucosidasa, alcanzando un volumen final de 200 µL de la mezcla de reacción, la cual fue incubada por 1 h a  $35 \pm 1$  °C. La reacción enzimática se detuvo al colocar los tubos a 0 °C y adicionar 35 µL de  $NH_4OH$  a 72 mM para llegar a un pH de 9 -10. Seguida de una extracción con acetato de etilo 1:2 (v/v), la fase orgánica se llevó a sequedad. Para cuantificar la muestra se suspendió en 220 µL de 90 mM amortiguador de fosfatos pH 6 - metanol grado HPLC en una relación 1:1 (v/v). Posteriormente las muestras se filtraron a través de una membrana de 0.25 mm de nylon, y un volumen de 100 µL fue inyectado en el HPLC. La cuantificación de estrictosidina fue calculada en base a la curva de calibración con el AIM ajmalicina.

### **V.13 Ensayo de la actividad de estrectosidina $\beta$ -glucosidasa (SGD)**

La actividad de la SGD se determinó de acuerdo al método de [Stevens \*et al.\* \(1992\)](#) modificado por [Vera-Reyes \(2013\)](#), para lo cual se incubó 25  $\mu$ g de proteína del extracto enzimático en una mezcla del amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 6.3 y estrectosidina en una concentración de 0.67 mM, volumen final de 50  $\mu$ L e incubando por 30 min a  $30 \pm 1$  °C. Durante la reacción, la aparición de un color amarillo se considera indicativo del consumo de la estrectosidina ([Geerlings \*et al.\* 2000](#)). La reacción enzimática se detuvo al colocar los tubos a 0 °C y adicionar 15  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 72 mM para llegar a un pH de 9-10. La extracción de productos del ensayo enzimático se realizó como anteriormente se describe en el ensayo de la STR. La desaparición del sustrato de este ensayo se observo por cromatografía de capa fina (TLC). Sé utilizó una mezcla cloroformo-metanol 4:1 como fase móvil. En este caso la estrectosidina se identifica por tener un Rf de 0.36 ([Walton \*et al.\* 1987](#)).

### **V.14 Aislamiento de ARN total, iniciadores y condiciones de RT-PCR semi-cuantitativa**

Para el aislamiento del ARN a partir de raíces en suspensión de *H. patens* se utilizo una solución de Trizol (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **V.14 Tratamientos en cultivo de raíces en suspensión de *H. patens*.**

##### **V.14.1 Adicción del precursor secologanina en cultivo de raíces de *H. patens* bajo elicitación.**

Se inocularon 1.5% (p/v) de peso fresco de raíces cultivadas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, 6 tubos falcón de 50 mL con 20 mL de medio de cultivo

completo MS con 20 g/L de sacarosa. Los tubos se cerraron con tapas de silicón que permiten la transferencia de gases.

A los 10 días de crecimiento se adicionó extracto de levadura (E-lev) a una concentración final de 0.2 mg/mL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0.2 mM. A los 15 días se adicionó la secologanina a una concentración final de 0.4 mM, tanto a las raíces elicidadas con E-lev como a las elicidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

Fue necesario adicionar medio de cultivo fresco, debido a la rápida evaporación del mismo y al crecimiento del cultivo de raíces. Se adicionaron 10 mL al día 10 y 5 mL más al día 18 del experimento. Las muestras fueron cosechadas a los 20 días.

#### **V.14.2 Disminución de la concentración de sacarosa, en el cultivo de raíces de *H. patens***

Para los experimentos del efecto de la disminución de la concentración de sacarosa, en el cultivo de raíces, estas fueron crecidas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente en cultivo de raíces, por lo que solo se redujo la concentración de sacarosa de 20 g/L a 10 g/L. Después de subcultivar tres veces en este medio, se comparo la producción de AT con respecto al control con 20 g/L de sacarosa a los 30 días de crecimiento, por duplicado.

#### **V.15 Cultivo de plántulas de *H. patens* sin sacarosa**

El material vegetal se obtuvo como se señala en la **sección V.1.1**. Las plántulas fueron micropropagas en medio NNm sin la adición de sacarosa con 2 g/L de gelrite en fotoperiodo 16/8 h. Las muestras analizadas correspondían a la tercera generación de

plántulas crecida en estas condiciones el perfil de producción de alcaloides por HPLC se determinó en las raíces de las plántulas a los 2 y 4 meses de cultivo.

#### **V.16 Cromatografía en capa fina para los alcaloides de *H. patens***

La separación e identificación de alcaloides (AIM Y AOM) e intermediarios producidos por cultivos *in vitro* de *Hamelia patens*, se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (TLC) con placas de silicagel de 20x20 cm y de 10x9 cm, con un espesor de capa de 0.25 mm con F254 (Merk). Como fase móvil se probaron diferentes sistemas de solventes usando placas de 10x9 cm:

- F1) Cloroformo-Acetona (5:4)
- F2) Acetato de etilo-Hexano (9:5)
- F3) Cloroformo-Acetona (5:4) con 1% de hidróxido de amonio
- F4) Cloroformo-Acetona (7:2) con 0.5% de hidróxido de amonio
- F5) Cloroformo-Acetona (5:4) con 0.5% de hidróxido de amonio
- F6) Cloroformo-Acetona (6:3) con 0.5% de hidróxido de amonio
- F7) Cloroformo-Metanol (8:1) con 1% de hidróxido de amonio
- F8) Cloroformo-Metanol (8:1)
- F9) Cloroformo-Metanol (9:1) con 1% de hidróxido de amonio
- F10) Cloroformo-Etanol (95:5)
- F11) Cloroformo-Etanol (95:5) con 1% de hidróxido de amonio
- F12) Éter diisopropílico-Metanol (85:15)
- F13) Éter diisopropílico-Metanol (85:15) con 1% de hidróxido de amonio

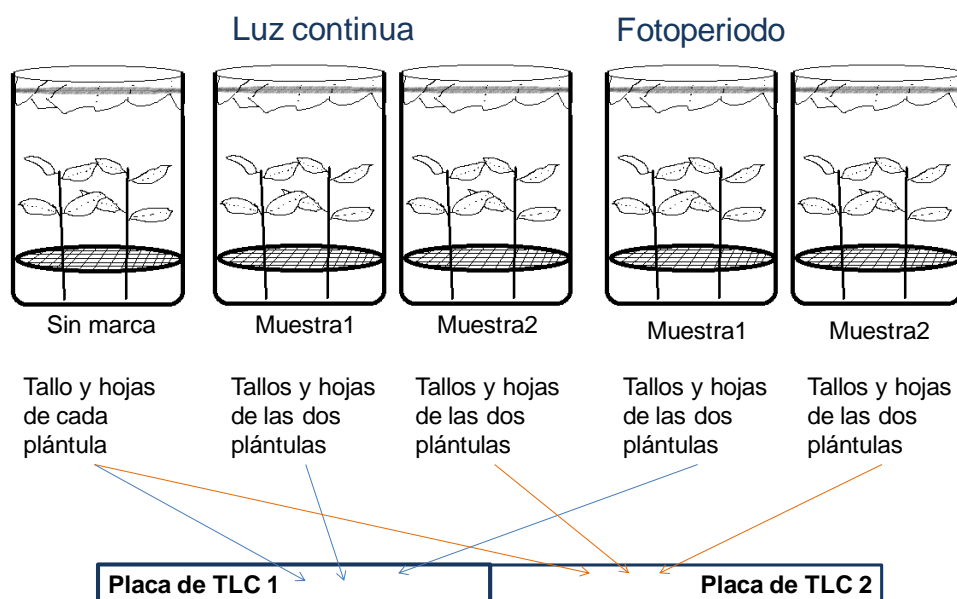
#### **V.17 Adición de triptófano a plántulas de *H. patens***

El material vegetal utilizado consistió en explantes meristemáticos apicales con dos pares de hojas de plántulas de *H. patens*, los cuales se obtuvieron de un cultivo de plántulas de dos meses de micropropagadas en medio NNm semisólido. Los explantes se subcultivaron en medio de cultivo líquido NNm con 20 g/L de sacarosa, para lo cual se utilizó un sistema de cultivo que consistió en cajas magenta con tapa de 380 mL (Vol.

total), que contenían una malla horizontal de plástico esterilizable (lo que dió soporte a los explantes). En cada caja se adicionaron 50 mL de medio de cultivo con una concentración final de 100 y 500  $\mu\text{M}$  de triptófano. En cada caja se colocaron 3 explantes meristemáticos apicales con dos pares de hojas, manteniéndose bajo fotoperiodo de 16/8 h a  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las unidades experimentales se cosecharon a los 7 días. Para el análisis por HPLC de alcaloides indol, oxindol-monoterpénicos e intermediarios, cada muestra consistió en la mezcla de las hojas ó de los tallos de las tres plántulas de cada tratamiento, que se extrajeron y cuantificaron como se menciona en la **sección V.7**.

#### **V.18 Incorporación de L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano en plántulas de *H. patens* bajo dos regímenes lumínicos**

El material vegetal consistió en explantes meristemáticos apicales con dos pares de hojas de plántulas obtenidas como se describe en la sección anterior. Los explantes se cultivaron en un sistema de cultivo que consistió en viales de vidrio de 26 mL de volumen total, tapados con papel aluminio, con 5 mL de medio de cultivo líquido NNm con 20 g/L de sacarosa, con una malla horizontal y tiras verticales de plástico esterilizable que dieron soporte a los explantes. En total, para el experimento de incorporación de las marcas radiactivas se utilizaron 4 viales con 2 explantes por vial, a cada vial se le adicionó 500  $\mu\text{M}$  de L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano (0.25  $\mu\text{Ci}$ ).



**Figura 6.** Esquema del sistema de cultivo utilizado durante la incubación de las plántulas de *H. patens* con L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano y distribución de las muestras para el análisis por cromatografía de TLC.

En cada régimen lumínico se colocaron dos viales dentro de una caja Magenta como medida de contención (muestra 1 y 2), manteniéndose una caja en fotoperiodo de 16/8 h a  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y otra en luz continua a  $41.85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 6). Las unidades experimentales se cosecharon a los 7 días.

### V.19 Extracción de alcaloides e intermediarios con L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano

Cada muestra con L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano adicionado al medio de cultivo consistió en los tallos y las hojas de dos plántulas (Fig. 6). En total 8 muestras. Se realizó la extracción de alcaloides de acuerdo a Paniagua-Vega *et al.* 2012 usando como solución de extracción metanol-amortiguador de fosfato (1:0.25). La solución amortiguadora se preparó con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a una concentración de 90.5 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, se ajustó el pH a 6 con NaOH 300 mM. Se redujo el tamaño de partícula de las muestras congeladas con  $\text{N}_2$  (liq.) triturando con pistilo en tubos Eppendorf<sup>R</sup> de 1.5 mL, se adicionó 400  $\mu\text{L}$  de solución de extracción (1:0.25) se mezcló por 1 min en mezclador de vórtice, se



centrifugó 5 min a 2000 rpm. Recuperando un volumen de 300  $\mu\text{L}$  de extracto a partir muestras de entre 0.05 a 0.10 g de P.F. Los extractos se llevaron a sequedad. Posteriormente, para verificar la incorporación de la marca radiactiva en las muestras se tomo 1/20 parte de la muestra (se suspendió en 100  $\mu\text{L}$  y se tomaron 5  $\mu\text{L}$ ), se mezcló con 3 mL del coctel liquido para centello y se llevaron las alícuotas al contador de centelleo . Los extractos de las muestras se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente las muestras se suspendieron en 30  $\mu\text{L}$  de metanol y se aplicó todo el volumen en las placas de silicagel de 20x20 cm, con un espesor de capa de 0.25 mm (Merk) y se llevó a cabo la corrida cromatografica con la fase móvil F13.

Para la identificación de los productos en el TLC se compararon los valores de Rf visualizados por UV 254 (AOM y AT) y 366 (AIM) (Svendsen y Verpoorte, 1983) (Tabla 1) de los de los estándares y de las manchas que mostraron incorporación de la marca. Los estándares fueron previamente obtenidos y caracterizados completamente a partir de plántulas y plantas de *Hamelia patens*: AIM; aricina y N-oxido de aricina, AOM; isopteropodina, pteropodina, especiofilina, palmirina (10-metoxiisopteropodina), rumberina (10-hidroxiisopteropodina), uncarina F, hamelina (10-metoxipteropodina) (Paniagua-Vega et al. 2012) y triptamina. Además, se utilizó como dato de localización el valor de Rf en el sistema de TLC seleccionado (F13) para los alcaloides de *H. patens*.

## V.20 Detección de la incorporación de la marca radiactiva

Luego de la separación por TLC se detectó la incorporación del [ $^{14}\text{C}$ ] en los AIM, AOM y AT, utilizando un equipo de barrido (radio escáner) para emisiones  $\beta$  (Biorad), con el que se rebeló la incorporación de la marca radiactiva en cada uno de los compuestos de interés. El análisis de las imágenes generadas por el escáner de emisiones  $\beta$  se realizó con el equipo Kodak Image Station 2200R, DU<sup>®</sup>730 equipado con un software de imagen molecular versión 1.4. El análisis se realizó utilizando unidades arbitrarias.

### **V.21 Adición de tetrahydroalstonina en plántulas de *H. patens***

Se utilizaron como inoculo explantes apicales con las primeras cuatro hojas de plántulas de 1 meses de micropropagadas. Se cultivaron dos plántulas por tratamiento en cajas Magenta con una tapa y malla esterilizable dentro, En la tapa se colocaron 20 mL de medio NNm liquido con 2% de sacarosa y se incubo en fotoperiodo de 18/6 h con una intensidad lumínica de 1500 lux, a  $25 \pm 2$  °C.

Los explantes tuvieron un periodo de adaptación al medio líquido de 3 días. Posteriormente, se adiciono tetrahydroalstonina (THA) para llegar a una concentración de 150 µM en 20 mL de medio de cultivo NNm líquido. Se tomaron muestras por duplicado al momento de la adición (t=0), blanco a los 7 días de la adición (Bco) y plántulas con THA a los 7 días. El análisis de producción de alcaloides se realizó por HPLC.

### **V.22 Ensayo enzimático de tetrahydroaldostonina con peroxidasa de rábano**

Tetrahydroalstonina 100 µM, peróxido de hidrógenos 200 µM, peroxidasa de rabano 20 µg y amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6 a un volumen final de 2 mL.

Para la extracción de productos del ensayo enzimático, se detiene la reacción con NH<sub>4</sub>OH hasta un pH de 9, posteriormente se realiza la extracción con cloroformo grado HPLC (3:1), se recupera la fase orgánica filtrando con sulfato de sodio anhidro, llevando a sequedad con N<sub>2</sub> (g). Para la identificación de productos de ensayo enzimático por HPLC, las muestras secas se suspenden en metanol-amortiguador de fosfatos (1:1) y se analizaron como se señala en la **sección V.7**.

### **V.23 Ensayo enzimático de aricina con un extracto enzimático de plántulas de *H. patens***

Las plántulas completas (hoja, tallo y raíces) de dos meses, se les redujo el tamaño de partícula en mortero con pistilo con N<sub>2</sub> (liq) y se extrajeron con la solución amortiguadora

en relación (1:0.7) [P.F.-volumen de la solución amortiguadora]. La solución amortiguadora de extracción consistió de tris a 50 mM a pH 7.5, 2 mM de EDTA, 0.5% (v/v) de tritón y 2-3% PVPP (p/v).

Se centrifugo dos veces a 5000 y 14000 rpm por 10 min cada una, se recuperaron los sobrenadantes. El extracto enzimático de desalo con columnas PD10. La proteína total se cuantificó utilizando el método de [Peterson \(1977\)](#), utilizando albumina de suero de bovino (BSA) como estándar.

Se incubó con 76  $\mu$ M de aricina, 50  $\mu$ g de proteína de extracto crudo enzimático de plántulas en amortiguador de tris a 50 mM a pH 7.5, en 2 mL a 30 °C durante 14 horas. Por triplicado.

#### **V.24 Actividad antioxidante con DPPH de extractos crudos y alcaloides**

Se prepararon soluciones etanólicas al 0.086 mM de 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de acuerdo a [Paniagua-Pérez et al. 2009](#) (cada vez que se realizaron los ensayos, las muestras fueron protegidas de la luz). La absorbancia de una solución control de DPPH negativo se registro a través del tiempo de análisis para comprobar la estabilidad del radical.

Los compuestos a evaluar se disolvieron en 50  $\mu$ L de metanol grado HPLC. La mezcla de reacción consistió en 0.086 mM de DPPH, con los extractos crudos y alcaloides disueltos en metanol en un volumen final de 2 mL. Se evaluaron mínimo tres concentraciones para cada ensayo. La reducción del DPPH se monitoreó mediante la disminución de la absorbancia a 517 nm hasta que la reacción alcanzo el equilibrio. La absorbancia inicial estuvo cerca de  $A = 0.940$  en todos los casos. La celda del blanco contenía etanol absoluto. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

Los extractos crudos se obtuvieron de una muestra de 38 g de peso fresco de hojas con peciolo de *Hamelia patens* colectadas en el mes de octubre en Coatzintla, Veracruz,

México, (almacenadas por un año a -20 °C) de plantas entre 3 y 5 años. La muestra fue bipartida para realizarse una extracción metanólica y otra acuosa; a) Extracción metanólica, se colocaron aproximadamente 16 g peso fresco de hoja con peciolo en 200 ml de metanol grado HPLC por 6 días ([Paniagua-Vega, 2007](#)), el extracto obtenido fue filtrado y concentrado a presión reducida y posteriormente secado con N<sub>2(g)</sub>. Se obtuvieron 1.20 g de peso seco que se resuspendieron en 20 mL de metanol y se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min. El sobrenadante se filtro por malla de 0.22 micras y se llevó a sequedad resultando 734.3 mg de peso seco. b) extracción acuosa, se colocaron aproximadamente 16 g peso fresco de hoja con peciolo en 150 mL de agua desionizada y se colocaron en decocción a 95°C durante 30 min. El extracto se filtro y liofilizo. El total del extracto acuoso liofilizado se recupero en etanol grado HPLC y se centrifugo a 2500 rpm por 15 min, el sobrenadante se filtro por malla de 0.22 micras y se llevó a sequedad resultando 33.7 mg de peso seco.

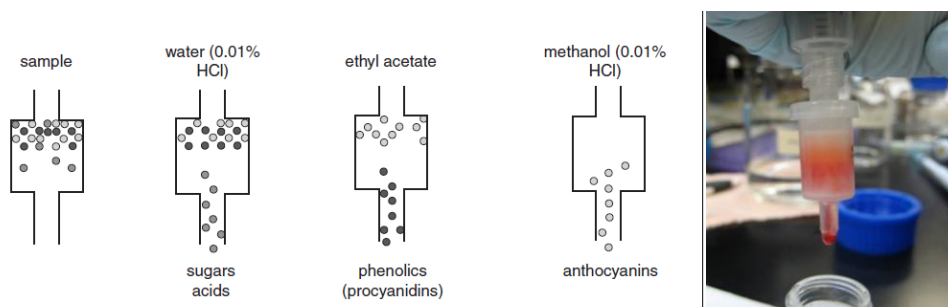
La actividad antioxidante de los extractos crudos y alcaloides aricina y rumberina sobre el barrido de radicales DPPH se calculó según la ecuación siguiente ([Paniagua-Pérez et al. 2009](#)):

$$\% \text{Inhibición} = \frac{\text{absorbancia (control)} - \text{absorbancia (muestra)}}{\text{absorbancia (control)}} \times 100$$

## V.25 Extracción y purificación de flavonoides

El material vegetal se seco y pulverizó con nitrógeno líquido, se macero en metanol al 0.05% HCl (1:3 p/v) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante por filtración y se concentró con nitrógeno gaseoso.

Los extractos crudos se purificaron mediante fase sólida, utilizando una columna C8 (Mini Sped-ed PlusCartridge de silica, Teknokroma). Primero, se acondicionó la columna con 2 volúmenes de metanol, después se removió el metanol con 3 volúmenes de agua acidificada (0.01% HCl) y se incorporo el extracto crudo a través de la columna. Para eliminar los compuestos como azúcares y ácidos no absorbidos se agregaron 2 volúmenes agua acidificada (0.01% HCl); posteriormente se removieron parte de los compuestos fenólicos lavando la columna con 2 volúmenes de acetato de etilo y finalmente se eluyeron los flavonoides con metanol acidificado (0.01% HCl) de acuerdo a la metodología de [Rodriguez-Saona y Wrolstad, 2001 \(Fig. 7\)](#).



**Figura 7.** Purificación de flavonoides y antocianinas a partir del extracto crudo ([Rodriguez-Saona y Wrolstad, 2001](#)).

La separación de antocianinas se hizo mediante TLC utilizando 3 fases estacionarias y 2 fases móviles, las cuales se describen a continuación:

A) Fases estacionarias utilizadas:

- DC-Fertigplatten Cellulose F (FEC)
- 25 TLC aluminium sheets 20 x 20 cm Silica gel 60 F254 (FS)
- HPTLC-Fertigplatten Nano Adamant 5 x 5 cm (FH)

B) Fases móviles utilizadas:

- I n-butanol- ácido acético glacial-agua (40:10:20) (BAC)
- II acetona- Acetato de etilo- ácido fórmico (10:11:4:2) (AEF)

## V.26 Cinética de crecimiento plantas y plántulas de *H. patens*

Se partió de explantes meristemáticos apicales obtenidos como se menciona en la **sección V.1.1**. Para la cinética de crecimiento de plántulas *in vitro* se utilizó medio de cultivo NNM semisólido incubadas a  $25 \pm 2$  °C bajo un fotoperiodo de 16/8 h luz-oscuridad a  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se obtuvieron muestras por triplicado a los 0.25, 0.75, 1, 1.5 y 2 meses.

Para la cinética de crecimiento de plántulas durante la adaptación a tierra se utilizó una mezcla de tierra negra de jardín y agrolita (2:1), incubadas bajo fotoperiodo de 16/8 h a  $30 \pm 1$  °C a  $47.25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en cajas transparentes de 30x20x15 cm. Se obtuvieron muestras por triplicado a los 0, 1, 2, 2.5 3 y 3.5 meses. Para ambas cinéticas las muestras de hojas para determinación de AOM, clorofilas y flavonoides se tomaron completamente al azar. En cuanto a los tallos; en plántulas *in vitro* se tomaron completos en cada muestra y en plántulas en adaptación a tierra se tomaron partes de estos.

## V.27 Determinación de clorofilas y flavonoides

La determinación de clorofilas se realizó de hojas de plántulas. Las clorofilas se extrajeron con acetona al 80% según Yang *et al.* 1998. Se midió la absorbancia a 663.6, 646.6 y 440.5 nm. Se calculó el contenido de pigmentos como; clorofila a, clorofila b, clorofilas totales y carotenoides con las ecuaciones siguientes (se llevaron a mg/g de P.F.):

$$\text{Chl a} = 12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6} (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Chl b} = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6} (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Chl a+b} = 17.76A_{646.6} + 7.34A_{663.6} (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Car} = 4.69A_{440.5} - 0.267\text{Chl a} + \text{b} (\mu\text{g/ml})$$

La determinación de flavonoides se realizó por HPLC con el equipo y columna mencionados en la **sección V.7**, a 1 mL/min, para la cuantificación se utilizó como referencia una curva de calibración con malvidina-3,5 diglucosido de 0.7 a 10.5 µg.

#### **v.27 Extracción de RNA total, primers y RT-PCR cuantitativo**

La extracción de RNA a partir de hoja se realizó utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Los pares de cebadores utilizados fueron los siguientes para DXS izquierdo fueron (5'-TGGCCCTGCACCCCCTGT-3') y derecho (5'-GCCACATCAAAGCAGCGTTCT-3'); para STS izquierdo (5'-TTGTGTGGGAGRRYATATGA-3') y derecho (GARGMMACCCAAAAATSTCC-3'); para SGD izquierdo (5'-AACTCTCTTCCACTGGGATSTTCCCAA-3') y derecho (5'-TGWACCATATGGCTGAATCYTTTGGRTATCT-3'); para 18SrRNA, izquierdo (5'-TCCGCTGGCACCTTATGAGAAATC-3') y derecho (5'-CGCGTGCGGCCAGAACAA-3'). La retrotranscripción se realizó usando una plantilla de RNA usando una transcriptasa reversa ThermoScript™. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: Desnaturalización por 2 min a 94 grados C, seguida por ciclos de desnaturalización, alineación y amplificación de 94 C por 40 s, la temperatura de alineación para cada par de primers durante 50s y 72 C por 2 min. Se incluyó el paso final de extensión de 72 C por 10 min. Las temperaturas de alineación fueron para DXS 65 C (30 ciclos), STS y SGD 50 C (35 ciclos) y para 18SrRNA 60 C (25 ciclos). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.5 % y analizados de acuerdo a la metodología utilizada por Vera-Reyes et al (2013) utilizando un equipo de imagen Kodak Image Station 2200R, DU® 730 equipado con software de Molecular Imaging 1.4.

## VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI.1 Mantenimiento de cultivos *in vitro* de plántulas micropropagadas y de cultivos de raíces de *H. patens*

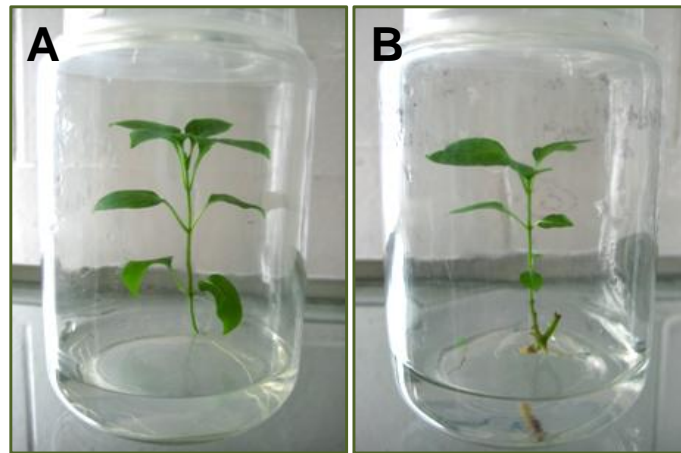
Las condiciones establecidas de un fotoperiodo de 16/8 h luz-obscuridad con una intensidad lumínica de  $8.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , sin adición de reguladores de crecimiento han permitido el mantenimiento del cultivo de plántulas micropropagadas de *H. patens* por siete años.

De los tres tipos de explantes meristematicos evaluados para la micropropagación, se seleccionaron los explantes de nodos apicales y los explantes axilares binodales, esto debido a que presentaron el 100% de capacidad de regenerar la plántula. Así en 2 meses se obtuvieron plántulas a partir de explantes de nodos apicales de aproximadamente 6 cm y de explantes axilares binodales de 4 cm de longitud. Los explantes de hoja con peciolo solo mostraron capacidad de crecimiento al incrementar el área de la misma hoja y desarrollando raíces, en un periodo de 5 meses más no regeneraron la plántula.

Se logro disminuir el tiempo de crecimiento del cultivo de plántulas micropropagadas a la mitad, al aumentar la intensidad lumínica del fotoperiodo de 16/8 h luz-obscuridad de  $8.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En solo un mes se alcanzó un crecimiento longitudinal de aproximadamente 7 cm para los explantes de nodos apicales y de 6 cm para los explantes axilares binodales (**Fig. 8**), es decir en la mitad del tiempo se logro un crecimiento similar al que se presenta a los dos meses bajo la intensidad lumínica de  $8.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Por lo tanto, se aumento la velocidad de crecimiento de los explantes

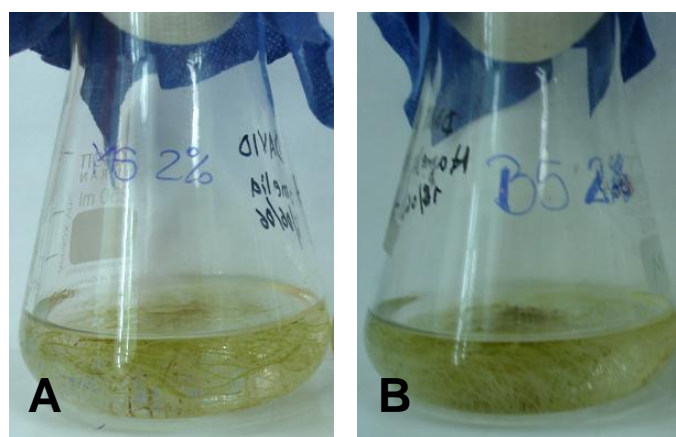


aproximadamente al doble.



**Figura 8.** Cultivo de plántulas micropropagadas de *H. patens*, de un mes, a partir de explantes meristematicos, A) nodo apical y B) binodo axilar bajo fotoperiodo de 16/8 h luz-obscuridad a  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Los cultivos de raíces en suspensión de *H. patens* se establecieron a partir de raíces de plántulas micropropagadas *in vitro*, en medios de cultivo completos B5 y MS con un régimen lumínico de luz continua a  $8.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sin la adición de reguladores de crecimiento. Subcultivándose cada mes por corte con bisturí (Paniagua-Vega, 2007). El cultivo de raíces crecido en medio MS permitió tener un buen sistema para el mantenimiento, con el que se ha conservado el cultivo por seis años. Sin embargo, el cultivo de raíces en medio B5 mostró una mayor tendencia a oscurecerse y formar un conglomerado al centro del matraz (Fig. 9).



**Figura 9.** Cultivo de raíces de *H. patens* en medio A) MS y B) B5 y incubados a 25 °C, agitación a 100 rpm y luz continua a  $24.30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Son pocas las plantas de la familia de las Rubiáceas a partir de las cuales se ha logrado obtener cultivos *in vitro*, debido a que requieren parámetros muy estrictos de adaptación, como condiciones físicas específicas, agentes antioxidantes y la adición de reguladores de crecimiento que estimulen y favorezcan el desarrollo (Roja *et al.* 2008; Henriques *et al.* 2004). Sin embargo, se encontró que los cultivos *in vitro* de plántulas y raíces de *H. patens* mostraron capacidad para poder establecerlos y mantenerlos, sin la adición de reguladores de crecimiento. Esto pone de manifiesto la gran capacidad que tendrían los tejidos de *H. patens* para generar los reguladores de crecimiento requeridos en los dos sistemas de cultivo. Además, al no adicionar reguladores de crecimiento se aumenta la inocuidad de los cultivos y por tanto su valor agregado para ser utilizados en el consumo humano, ya sea directamente en infusiones acuosas (té) o como fuente de moléculas con actividad farmacológica.

## **VI.2 Establecimiento de un cultivo de callos *in vitro* de *H. patens* (HpC1)**

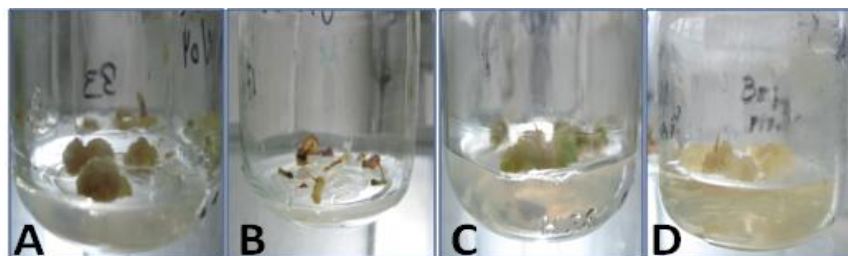
Se observó que el crecimiento y las características morfológicas de los callos están en función del medio de cultivo y no del tipo de explante de la plántula (hoja, tallo y raíz). Se

indujo callo primario en los 4 medios de cultivo probados ([Tabla 4](#)), el mayor crecimiento del callo se registró en el llamado Medio 34, que tiene como base el medio B5, suplementado con polivinilpirrolidona (PVP) 0.4% (p/v) más 1 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico también llamado ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram). Además, éstos presentaron las mejores características morfológicas de apariencia hidratada y friabilidad al momento de ser subcultivados ([Fig. 10 D](#)). Resultados similares se encontraron en el establecimiento de un cultivo de callos de *Centella asiatica* donde el picloram mostro mejores resultados en comparación con ácido indol 3-acético (IAA), ácido 3-indolbutirico (IBA) y ácido 3,6-dicloro-o-aniscico (Dicamba) ([Tan et al. 2010](#)).

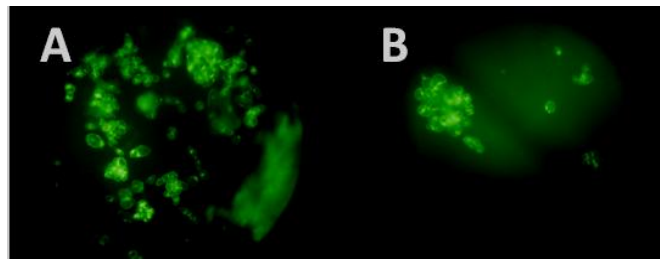
En la planta leñosa *Castanea sativa* (Castaño) se encontraron resultados similares al comparar los medios B5 y MS durante el establecimiento de callos. Reportando mayor crecimiento en medio B5, esto probalemente debido a una baja concentración de sales como el  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  entre otros, lo que limita la formación de compuestos fenólicos como los taninos ([Abenavoli y Pennisi 1998](#)). Sin embargo, en el cultivo de callos de *H. patens* fue necesario utilizar un agente antioxidante como el PVP que estaría reduciendo la producción de compuestos fenólicos desde el explante que podrían afectar la formación y mantenimiento de los callos *in vitro*, tal como se demostró en cultivos de *Aloe vera* ([Roy y Sarkar 1991](#)) y Castaño ([Abenavoli y Pennisi 1998](#)).

Al evaluar el régimen lumínico del cultivo de callos en fotoperiodo de 16/8 h luz-oscuridad a  $33.75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y en luz continua a  $27.00 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (ambos cultivados en medio 34), se encontró que los callos cultivados en fotoperiodo crecieron 3 veces más que los cultivados en luz continua, es conocido desde 1967 en estudios de la fisiología

de la división celular en el desarrollo de cultivos de callos de *Helianthus tuberosus*, que la luz puede tener un efecto inhibitor sobre la división celular (Fraser *et al.* 1967). Por otra parte, la producción de compuestos fenólicos del cultivo de callos en luz continua fue 14 veces mayor (alcanzando los 3.38 mg/g de peso seco (P.S.)) lo que podría explicar su lento crecimiento, ya que se ha reportado que en cultivos de tejidos o células los fenoles actúan como inhibidores del crecimiento (Ireland, 1984). Además, en un cultivo de callos de fresa se reportó que los compuestos fenólicos pueden actuar como moduladores de crecimiento mediante la regulación del catabolismo de ácido indol acético (Arnaldos *et al.* 2001). Sin embargo, los resultados de viabilidad celular por fluorescencia con diacetato de fluoreceina (FDA), que muestra la actividad de las esterasas presentes en la membrana celular y en el citoplasma, fue similar en las dos condiciones Fig. 11. Se observó al microscopio que los callos en luz continua forman agregados poco friables Fig. 11 B. Es reconocido que tanto las condiciones físicas (fotoperiodo) como químicas (reguladores vegetales) a las que se somete el tejido participan como estímulos fundamentales para la rediferenciación en diferentes especies, como el trigo.



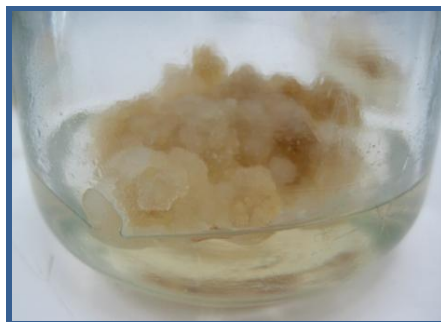
**Figura 10.** Inducción de callos a un mes en diferentes medios de cultivo: (A) medio 33, (B) medio 17, (C) medio 20, (D) medio 34.



**Figura 11.** Agregación y viabilidad con FDA de los callos cultivados en medio 34 e incubados (A) fotoperiodo de 16/8 h luz-oscuridad a  $33.75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B) luz continua a  $27.00 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### VI.2.1 Mejoramiento de la friabilidad del cultivo de callos de *H. patens* (HpC2)

Se logro establecer un nuevo cultivo de callos (HpC2) a partir de explantes (hoja, tallo y raíz) de plántulas de *H. patens*, en medio de cultivo completo B5 suplementado con polivinilpirrolidona (PVP) 0.4% (p/v) más 2 mg/L de picloram, sacarosa 2% (p/v), 2 g/L de Phytigel<sup>R</sup> a pH 6 (medio 35), en las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura. El cultivo con una concentración doble de Picloram ([Fig. 12](#)) mostró mayor grado de friabilidad (callo húmedo, disgregado y esponjoso) con respecto al cultivo HpC1. Estas características morfológicas ofrecen mejores posibilidades de éxito para el establecimiento de cultivos de células en suspensión a partir de callos. Estos resultados son similares a los reportados en *Centella asiatica* donde al aumentar el picloram de 1 mg/L a 2 mg/L se incremento 2 veces el crecimiento en peso fresco ([Tan et al. 2010](#)).

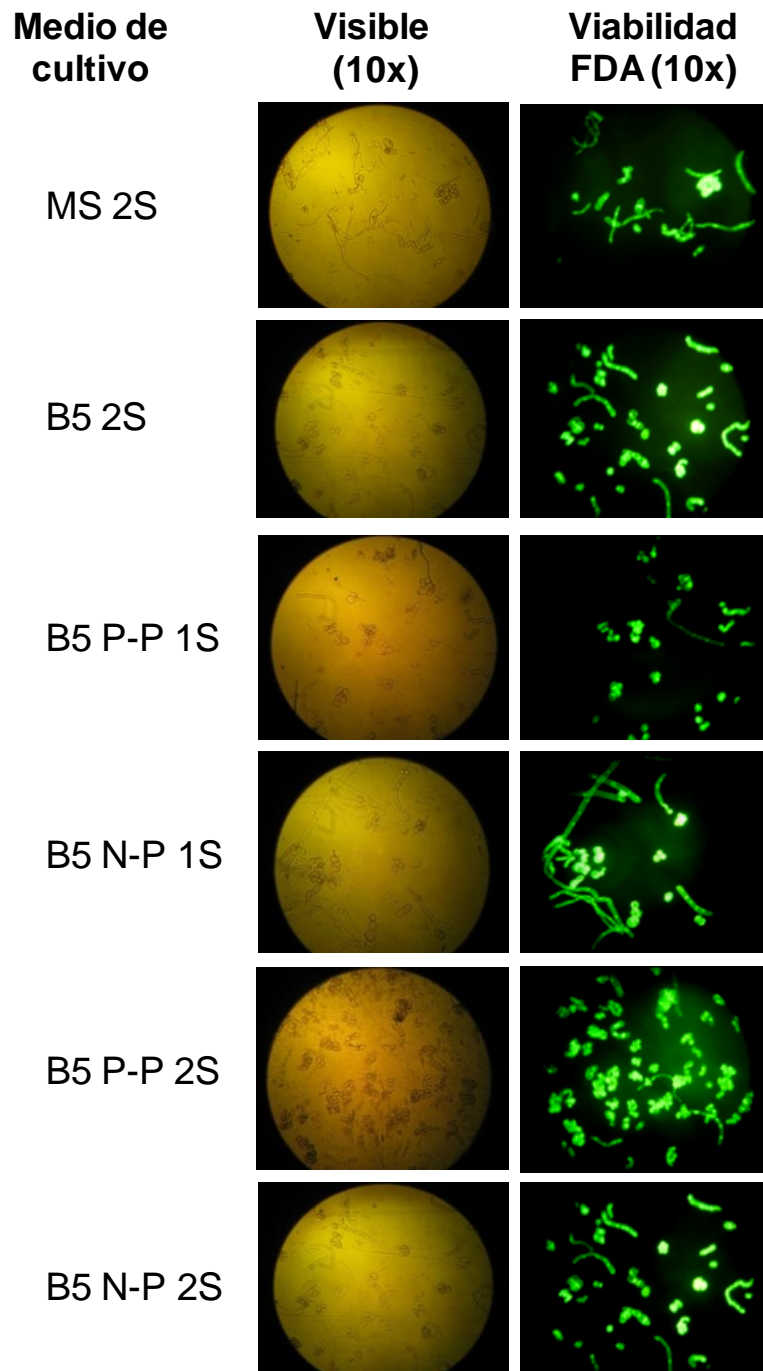


**Figura 12.** Callos *in vitro* de *H. patens* con 2 mg/L de picloram en fotoperiodo.

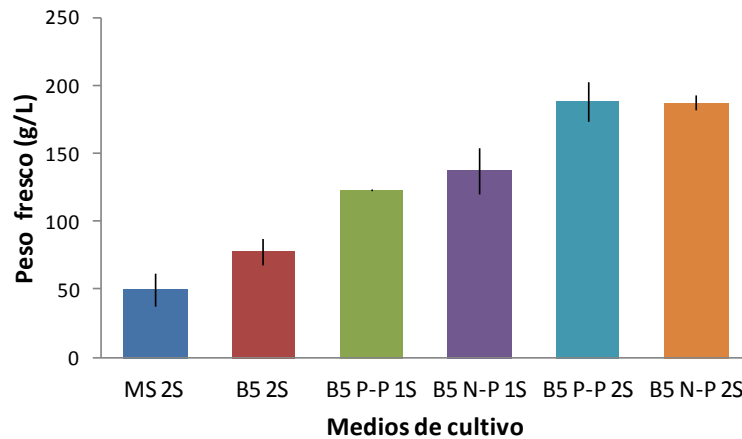
### VI.3 Establecimiento del cultivo de células en suspensión de *H. patens* (HpCel1)

El cultivo de células en suspensión (HpCel1) se estableció a partir del cultivo de callos HpC2. Primero se probaron los medios de cultivo líquidos B5 y MS completos adicionados con sacarosa al 2% (p/v) (MS 2S y B5 2S), sin hormonas, donde, en medio B5 se obtuvo mayor disgregabilidad (**Fig. 13**) y crecimiento (**Fig. 14**). La diferencia principal entre los medios B5 y MS es la menor concentración de nitratos (nitrógeno) y otras sales en el medio B5 (**Tabla 2**). Los medios de cultivo con baja concentración de sales han mostrado mejores resultados para cultivos celulares de especies leñosas como lo es *H. patens*.

Se evaluó el efecto de las fitohormonas NAA y picloram y el agente antioxidante PVP, junto con dos concentraciones de sacarosa al 1 y 2% (p/v) (**Fig. 13 y 14**). Se encontró que el aumento en la concentración de sacarosa tiene un efecto positivo en el crecimiento. La sustitución en el medio de cultivo de PVP por NAA no mostró diferencia significativa en peso fresco (**Fig. 14**). Se observó una alta viabilidad con FDA en todos los cultivos. Sin embargo, la asociación de las células de los cultivos adicionados con NAA-picloram al 1 y 2% de sacarosa (B5 N-P 1S y B5 N-P 2S) presentó mayor presencia de agregados en forma de cadenas (**Fig. 13**).



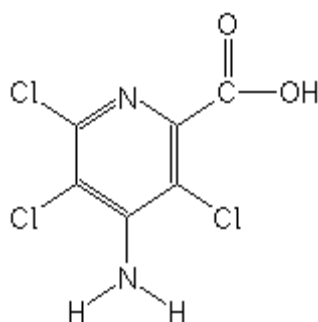
**Figura 13.** Agrupación y viabilidad con diacetato de fluoreceína (FDA) de un cultivo de células en suspensión de *H. patens* en diferentes medios de cultivo (Tabla 4), donde, **MS 2S**) Murashige y Skoog con 2% de sacarosa (p/v), **B5 2S**) Gamborg's B5 con 2% de sacarosa (p/v), **B5 P-P 1S**) B5 con PVP, picloram y 1% de sacarosa (p/v), **B5 N-P 1S**) B5 con NAA, picloram y 1% de sacarosa (p/v), **B5 P-P 2S**) B5 con PVP, Picloram y 2% de sacarosa (p/v), **B5 N-P 2S**) B5 con NAA, picloram y 2% de sacarosa (p/v).



**Figura 14.** Efecto del medio de cultivo, reguladores de crecimiento y sacarosa en el peso fresco. Durante el establecimiento de un cultivo de células de *H. patens*. Donde, **MS 2S**) Murashige y Skoog con 2% de sacarosa (p/v), **B5 2S**) Gamborg's B5 con 2% de sacarosa (p/v), **B5 P-P 1S**) B5 con PVP, picloram y 1% de sacarosa (p/v), **B5 N-P 1S**) B5 con NAA, picloram y 1% de sacarosa (p/v), **B5 P-P 2S**) B5 con PVP, picloram y 2% de sacarosa (p/v), **B5 N-P 2S**) B5 con NAA, picloram y 2% de sacarosa (p/v).

Los efectos de picloram como una auxina se observaron por primera vez por [Kefford y Caso en 1966](#). El picloram ([Fig. 15](#)) ha sido descrito como molécula activa en una variedad de bioensayos para auxinas, incluyendo la inducción de la división celular en la médula de explantes de tabaco, en concentraciones bajas. Posteriormente, [Chernova en 1975](#) descubrió que el picloram fue más eficaz que el 2,4-D en la generación de callo en explantes de trigo. Un estudio más fino realizado por [Collins en 1978](#) reveló que el picloram fue considerablemente superior al 2,4-D, NAA y al ácido indol acético (AIA), requiriendo una concentración mucho menor para la iniciación de callos de alfalfa.





**Figura 15.** Estructura molecular del Picloram

En maíz enano (*Zea mays L.*) se encontró que el picloram puede tener tanto la actividad promotora como inhibitoria del crecimiento, estando está en función de la concentración adicionada. Además, de acuerdo al comportamiento en cinéticas de crecimiento se fortaleció la propuesta que el picloram actúa como una auxina, de acuerdo al comportamiento en cinéticas de crecimiento (Chanc y Foy, 1983).

#### **VI.4 Elucidación de la estructura y caracterización de los alcaloides oxindol monoterpénicos**

El fraccionamiento de los extractos metanólicos de las hojas de *Hamelia patens* realizado en fase reversa por HPLC permitió el aislamiento de un alcaloide oxindólico no reportado anteriormente, al que se le llamó hamelina (Fig. 16). Asimismo, se caracterizaron ocho alcaloides de estructuras ya conocidas como los alcaloides indol monoterpénicos (AIM) tetrahydroalstonina, aricina y *N*-óxido de aricina (Tabla 6), y los alcaloides oxindólicos monoterpénicos pentacíclicos (AOM) pteropodina, isopteropodina, rumberina, palmirina, especiofilina y uncarina F (Ripperger, 1977; Borges del Castillo et al.1982; Martínez et al.1996) (Fig. 16 y 17).

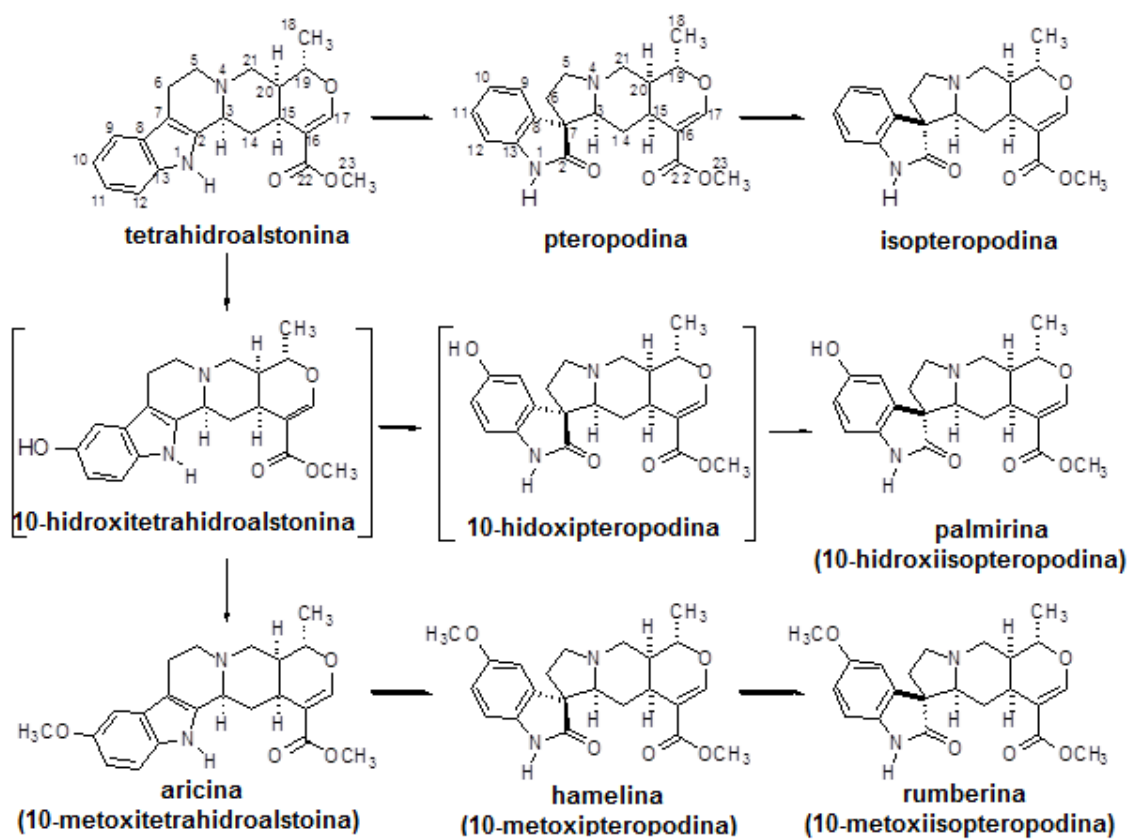
**Tabla 6.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  representativos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de los alcaloides indol-monoterpénicos aricina y su *N*-óxido encontrados en plántulas de *Hamelia patens*<sup>a</sup>.

Compuesto	Desplazamiento químico ( $\delta$ ), multiplicidad <sup>b</sup> y constantes de acoplamiento (Hz)
Aricina	7.41 (H-17, s), 7.39 (H-9, d, $J = 3.1$ ), 7.21 (H-12, d, $J = 8.6$ ), 7.14 (H-11, dd, $J = 8.6, 3.1$ ), 3.89 (H <sub>3</sub> -24, s), 3.69 (H <sub>3</sub> -23, s), 0.98 (H <sub>3</sub> -18, d, $J = 6.2$ )
<i>N</i> -Óxido de aricina	7.59 (H-17, s), 7.31 (H-12, d, $J = 8.8$ ), 6.98 (H-9, d, $J = 2.4$ ), 6.79 (H-11, dd, $J = 8.8, 2.4$ ), 3.85 (H <sub>3</sub> -24, s), 3.79 (H <sub>3</sub> -23, s), 1.33 (H <sub>3</sub> -18, d, $J = 6.6$ )

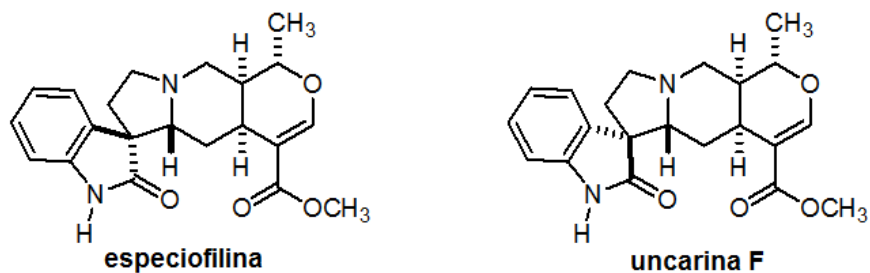
<sup>a</sup>Medidos en soluciones de  $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  en  $\text{D}_2\text{O}$  1:1, pH 6.0.

<sup>b</sup>s = señal simple, d = señal doble, dd = señal doble de dobles, brd = señal doble ancha, t = señal triple, td = señal triple de dobles, m = señal múltiple.

En base de las evidencias espectroscópicas y espectrométricas al compuesto 10-metoxipteropodina se le asignó la estructura y estereoquímica de (1'S,3R,4'aS,5'aS,10'aS)-1,2,5',5'a,7',8',10',10'a-octahidro-5-metoxi-1'-metil-2-oxo-spiro[3*H*-indol-3,6'(4'a*H*)-[1*H*]pirano[3,4-*f*]indolizina]-4'-carboxilato de metilo. Éste compuesto recibió el nombre trivial de hamelina, presenta un ion molecular  $[\text{M}]^+$  a  $m/z$  399.1914 por HRESI/APCIMS de acuerdo a la fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5 + \text{H}^+$ . Presentó así mismo una fuerte absorción IR a  $1712\text{ cm}^{-1}$  indicando la presencia de un grupo éster conjugado y un grupo  $\gamma$ -lactama, mientras que la frecuencia de vibración para los dobles enlaces conjugados aparecieron en a  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Su rotación óptica fue de  $[\alpha]_{\text{D}} = -101.2$ , en concordancia con el valor medido para el análogo estereoquímico relacionado, la pteropodina, el cual mostró también un valor de una rotación levógira de  $[\alpha]_{\text{D}} = -102.5$ . Los datos del espectro RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , se encuentran listados en la **Tabla 7**, estos confirman la presencia del núcleo oxindólico, así como del fragmento terpenoide.



**Figura 16.** Propuesta biogénica para los alcaloides indol y oxindol monoterpénicos de *H. patens*.

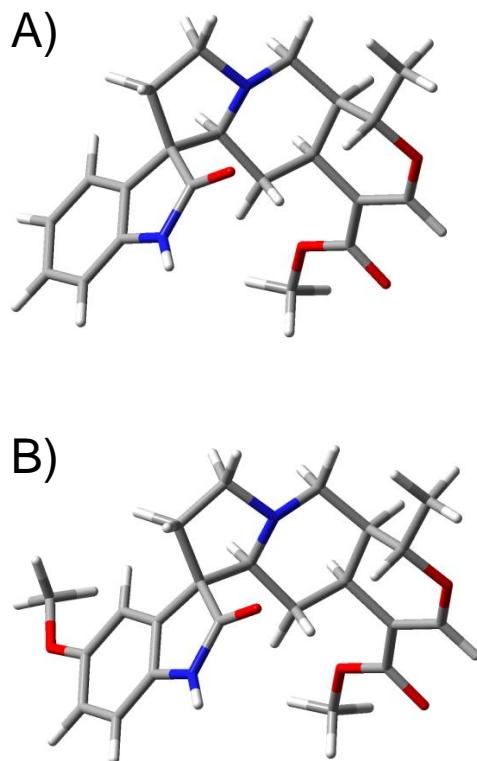


**Figura 17.** Estructuras de isómeros de pteropodina; especiofilina y uncarina F.

**Tabla 7.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  de hamelina<sup>a</sup>.

Átomo	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	–	7.29 (1H, br m)
2	180.5	–
3	74.7	2.32 (1H, dd, $J_{3,14\alpha} = 3.0$ Hz, $J_{3,14\beta} = 11.8$ Hz)
5	55.2	3.29 (1H, m, H-5 $\beta$ ); 2.37 (1H, m, H-5 $\alpha$ )
6	34.5	2.41 (1H, m, H-6 $\beta$ ); 1.98 (1H, m, H-6 $\alpha$ )
7	56.5	–
8	134.8	–
9	110.7	6.80 (1H, br t, $J = 1$ Hz)
10	156.0	–
11	109.5	6.72 (1H, m)
12	112.1	6.72 (1H, m)
13	133.9	–
14	29.6	1.71 (1H, m, H-14 $\alpha$ ); 1.48 (1H, m, H-14 $\beta$ )
15	30.9	2.44 (1H, m)
16	109.2	–
17	155.3	7.48 (1H, br s)
18	19.0	1.40 (3H, d, $J_{18,19} = 6.3$ Hz)
19	72.2	4.54 (1H, dq, $J_{18,19} = 6.3$ Hz, $J_{19,20} = 10.5$ Hz)
20	37.8	1.60 (1H, br m)
21	53.7	3.31 (1H, m, H-21 $\beta$ ); 2.32 (1H, m, H-21 $\alpha$ )
22	167.8	–
23	50.9	3.61 (3H, s)
24	55.8	3.82 (3H, s)

<sup>a</sup>Medidos a 300 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.4 MHz para  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  usando TMS como estándar interno.



**Figura 18.** Modelo molecular de; A) pteropodina y B) hamelina.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de hamelina mostró señales para tres átomos de hidrógeno aromáticos a  $\delta$  6.80, 6.72 and 6.72 característicos de un anillo bencénico trisustituido en -1,2,4 y una señal para un hidrógeno vinílico localizado en  $\delta$  7.48, el cual es desplazado a frecuencias altas debido a la influencia del grupo éster en C-16. Además, se realizó un experimento de correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC el cual fue muy útil, ya que permitió asignar la región  $sp^3$  correspondiente a los grupos metilo, metileno y metino donde se reconocieron señales para 3 grupos metilo, 4 metilenos y 4 metinos.

Los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento del fragmento terpénico fueron esencialmente similares a los encontrados en pteropodina, reflejando así que ambas sustancias poseen la misma estereoquímica y conformación como se aprecia en la [Fig. 18](#). La compleja estructura química de los alcaloides, los cuales tienen múltiples carbonos asimétricos, presenta algunos desafíos. Sin embargo el uso de la

espectroscopia de RMN bidimensional tal como el COSY, NOESY, HMQC y HMBC proveyeron ser excelentes herramientas para determinar claramente la estructura y las asignaciones espectroscópicas de este nuevo producto natural. Es interesante hacer notar que la hamelina es el epimérico en C7 de la palmirina, completando así la serie de cuatro compuestos formados por pteropodina, isopteropodina, hamelina y palmirina, los centros quirales considerando la numeración trivial (**Fig. 15**); quedan como se describe a continuación: para pteropodina, como (3*S*,7*R*,15*S*,19*S*,20*S*); para isopteropodina como (3*S*,7*S*,15*S*,19*S*,20*S*), para hamelina como (3*S*,7*R*,15*S*,19*S*,20*S*) y para palmirina como (3*S*,7*S*,15*S*,19*S*,20*S*). Todos los compuestos conocidos fueron identificados con base en la RMN de <sup>1</sup>H, UV y el espectro de masa. El aislamiento e identificación de los productos se llevó a cabo empleando sustancias puras como referencia, haciendo uso de un equipo HPLC-PAD, que permitió una adecuada cuantificación de cada componente presente en el extracto de las plántulas. Cabe destacar que éste es el primer reporte de la identificación y caracterización de uncarina F en plantas de *H. patens*. Esta sustancia y la especiofilina se isomerizan a pteropodina e isopteropodina (**Laus et al. 1996**), fenómeno que había evitado su aislamiento y la realización de pruebas biológicas de los compuestos puros, por lo que los 4 compuestos son considerados en muchos casos como un grupo inseparable, denominado alcaloides pteropodínicos. Por otra parte, se ha sugerido la importancia fisiológica de la N-oxidación de los alcaloides como una estrategia que ayuda al transporte y al almacenamiento de estos compuestos. Debido a que la N-oxidación convierte a los alcaloides de una base terciaria lipofílica débil a una molécula polar cargada (**Ehmke et al. 1998**).

## **VI.5 Perfil de producción de alcaloides en cultivo de plantas y plántulas micropropagadas de *H. patens***

De manera general el contenido de AOM en plántulas micropropagadas de dos meses,

fue 2 veces mayor que en las plantas silvestres de dos años recolectadas durante el mes de enero ([Tabla 9](#)). Este cambio en el nivel de producción de metabolitos secundarios cuando las plantas se propagan *in vitro* ha sido frecuentemente observado, posiblemente, como consecuencia del régimen nutritivo al que está sometido la planta además de que las condiciones ambientales se encuentran controladas. Tal ha sido el caso del aumento en la producción de AIM a partir de *Ophiorrhiza rugosa* (Rubiaceae), las cuales cuando son cultivadas *in vitro* presentan un alto incremento en el contenido de campotecina ([Roja, 2008](#)).

**Tabla 8.** Alcaloides caracterizados en cultivos de plántulas y plantas *H. patens*

Alcaloide	Fórmula	PM	Rt <sub>1</sub>	Rt <sub>2</sub>	Espectro UV ( $\lambda$ máx)	Referencia
<b>Alcaloides indol-monoterpenicos (AIM)</b>						
Aricina (quinovatine, cinchovatina o heterofilina)	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	382	51.0	33		Martínez <i>et al.</i> 1996
N-Óxido de aricina	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	398				Paniagua-Vega, 2007
<b>Alcaloides oxindol-monoterpenicos (AOM)</b>						
Isopteropodina	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	368	42.4	27.2		Borges <i>et al.</i> 1982
Pteropodina	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	368	26.1	16.2		Borges <i>et al.</i> 1982
Especiofilina	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	368	18.1	12.5		Borges <i>et al.</i> 1982
Uncarina F	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	368	19.8	14.3		Paniagua-Vega <i>et al.</i> 2012
Palmirina (10-metoxiisopteropodina)	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	398	34.2	21.6		Borges <i>et al.</i> 1982
Rumberina (10-hidroxiisopteropodina)	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	384	11.4	7.31		Borges <i>et al.</i> 1982
Hamelina (10-metoxipteropodina)	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	398	23.2	14.5		Paniagua-Vega <i>et al.</i> 2012

Rt<sub>1</sub> = Tiempo de retención (min) en columna semipreparativa con una velocidad de flujo de 3 mL/min  
 Rt<sub>2</sub> = Tiempo de retención (min) en columna analítica con una velocidad de flujo de 0.7 mL/min

Como se observa en la [Tabla 9](#) el perfil específico de AOM de las hojas de las plántulas

de *H. patens* micropropagadas así como el de las silvestres presentan un contenido similar en rumberina, palmirina y uncarina F; mientras pteropodina, isopteropodina, hamelina y especiofilina fueron 2.99, 2.65, 1.62 y 2.30 veces más altas en cultivos de plántulas *in vitro*, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, se ha postulado que la pteropodina puede equilibrar con sus estereoisómeros isopteropodina, especiofilina y uncarina F, por lo tanto el contenido total de los cuatro estereoisómeros puede ser considerado como un solo dato (Laus *et al.*1996). La suma de los cuatro estereoisómeros en las plantas y las plántulas de *H. patens* representa más del 70% de los AOM totales, estos datos están de acuerdo a los valores reportados en especímenes mexicanos de *H. patens* (Reyes-Chilpa *et al.* 2004).

**Tabla 9.** Contenido de los alcaloides oxindol-monoterpénicos en la parte aérea de *Hamelia patens*. Comparación entre las plantas silvestres y las plántulas micropropagadas.

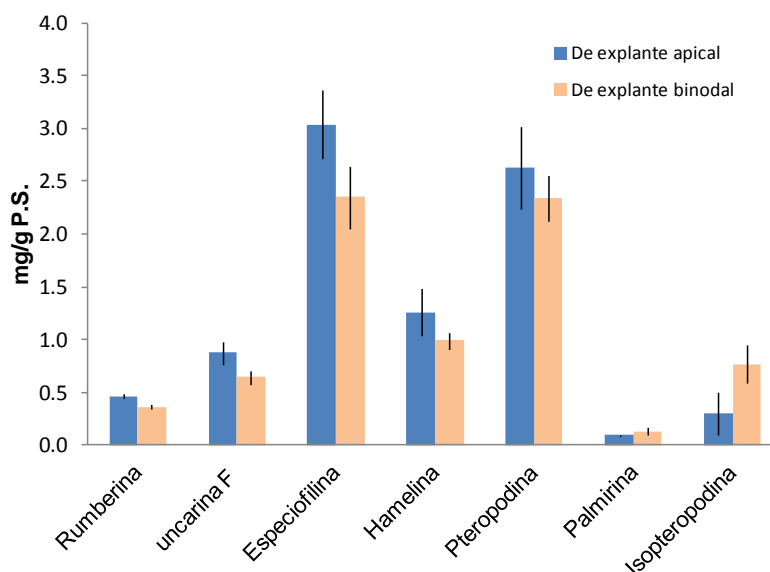
AOM	Plantas (mg/g P. S.) <sup>a</sup>	Plántulas (mg/g P.S.) <sup>b</sup>
Hamelina	0.69 ± 0.14	1.12 ± 0.21
Rumberina	0.42 ± 0.10	0.41 ± 0.03
Palmirina	0.10 ± 0.06	0.11 ± 0.03
Pteropodina	0.83 ± 0.21	2.48 ± 0.42
Isopteropodina	0.20 ± 0.13	0.53 ± 0.27
Especiofilina	1.17 ± 0.22	2.69 ± 0.43
Uncarina F	0.77 ± 0.17	0.76 ± 0.11
<b>Total</b>	<b>4.18 ± 1.03</b>	<b>8.10 ± 1.50</b>

<sup>a</sup> Las muestras fueron analizadas por triplicado a partir de plantas similares de 2 años.

<sup>b</sup> Las muestras fueron analizadas a partir de 5 plántulas similares de 2 meses (a partir de explante meristemático y binodal).

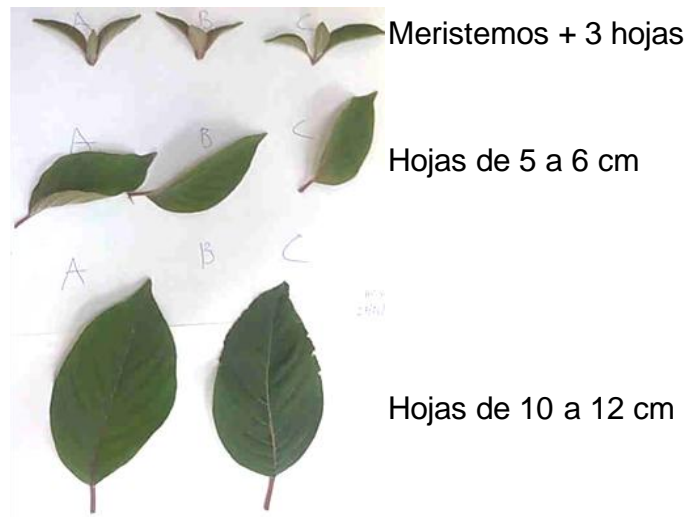


La producción de AOM en plántulas micropropagadas a partir de explante axilares binodales representa el 87.5% con respecto a la producción de las plántulas micropropagadas a partir de explantes apicales, a los dos meses de cultivo en fotoperiodo de 16/8 h a  $8.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Además, el perfil de producción de AOM de las plántulas obtenidas tanto de explantes meristemáticos apicales como de binodales es similar, excepto para la isopteropodina la cual se produce 2 veces más en plántulas obtenidas de explantes binodales (**Fig. 19**).

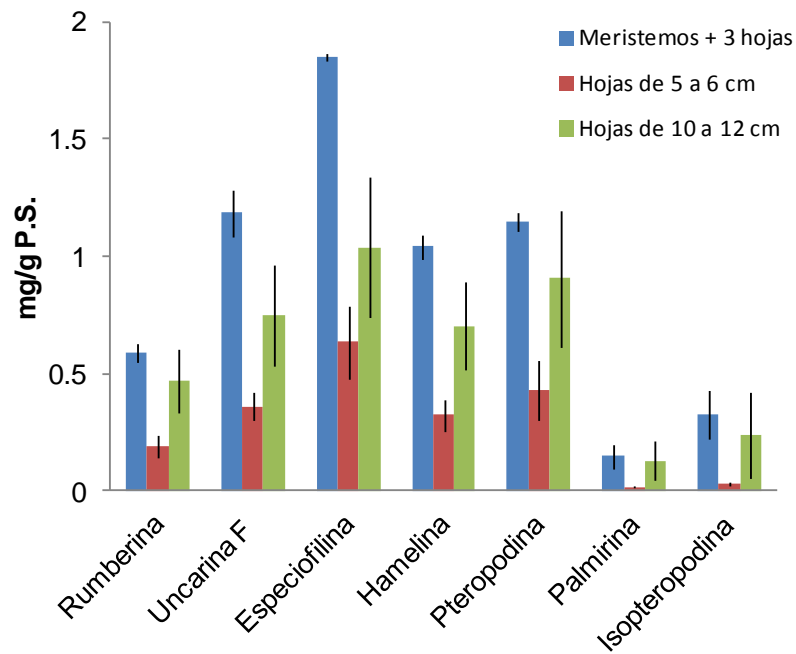


**Figura 19.** Producción de AOM en plántulas de *H. patens* a los 2 meses de cultivo, micropropagadas a partir de explante de meristemo apical y de explante binodal.

En hojas de arbustos silvestres de *H. patens* de 2 años se encontró un perfil conservado de AOM tanto en hojas viejas, medias y meristemos apicales con las primeras 3 hojas (**Fig. 20 y 21**). Las hojas más jóvenes (que incluyeron los meristemos) presentaron mayor producción de AOM de  $6.29 \pm 0.40$  mg/g P.S. Sin embargo, las hojas medias de 5 a 6 cm fueron las que presentaron la menor producción de AOM de  $1.98 \pm 0.36$  mg/g P.S. y las hojas viejas de entre 10 y 12 cm produjeron 2 veces más con respecto a las medias.



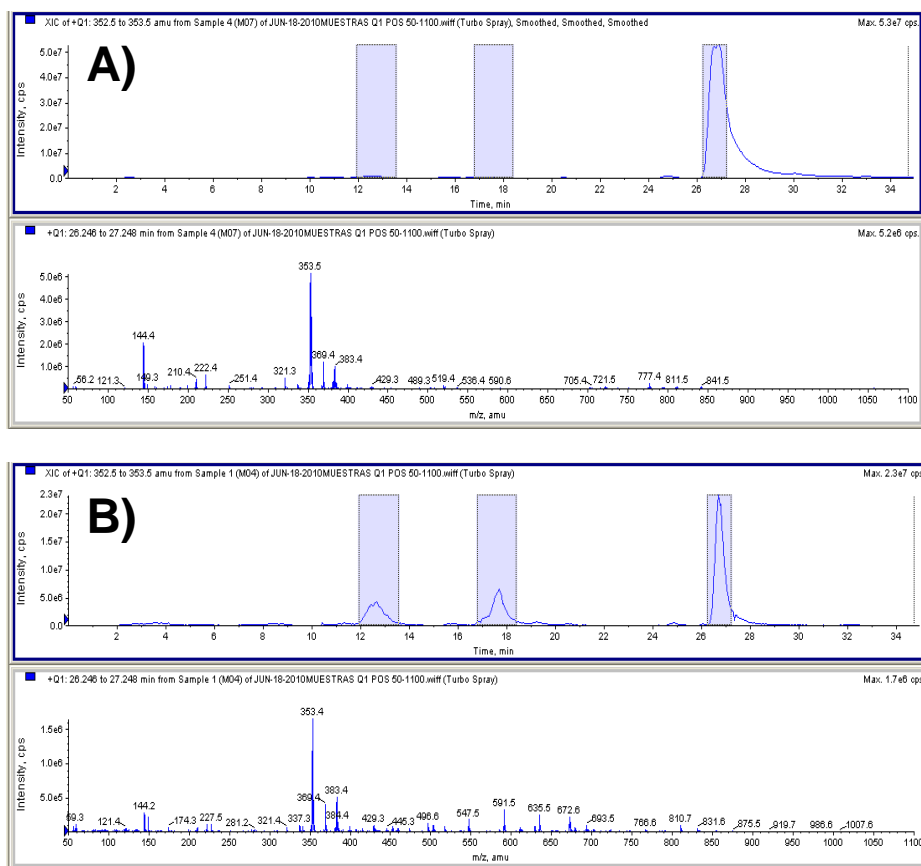
**Figura 20.** Muestras de hojas de plantas silvestres de *H. patens*, donde la longitud se refiere al largo de la hoja.



**Figura 21.** Distribución de AOM en las hojas de plantas silvestres de *Hamelia patens* de Mapastepec, Chiapas.

## VI.6 Identificación de tetrahydroalstonina en *H. patens*

Tanto en los extractos metanólicos de hojas y tallos de plántulas micropropagadas como el de las hojas silvestres de *H. patens*, se logró detectar el alcaloide indol-monoterpénico tetrahydroalstonina por medio de espectrometría de masas acoplada a HPLC, localizándose las señales correspondientes en comparación con el estándar (Fig. 22). El alcaloide tetrahydroalstonina no se había podido identificar en los análisis HPLC debido a la baja cantidad presente en los extractos analizados, cuando llegó a aparecer la señal correspondiente en el cromatograma, ésta se encontraba en el límite de detección del equipo. Martínez y colaboradores en 1996 reportaron la producción de tetrahydroalstonina en hojas de plantas silvestres de *H. patens*. Sin embargo, en este trabajo era muy importante confirmar que los cultivos *in vitro* y silvestres estaban produciendo este alcaloide, ya que la tetrahydroalstonina es el alcaloide que proponemos, como precursor biosintético para los alcaloides indol y oxindol-monoterpénicos que produce la planta *H. patens*.

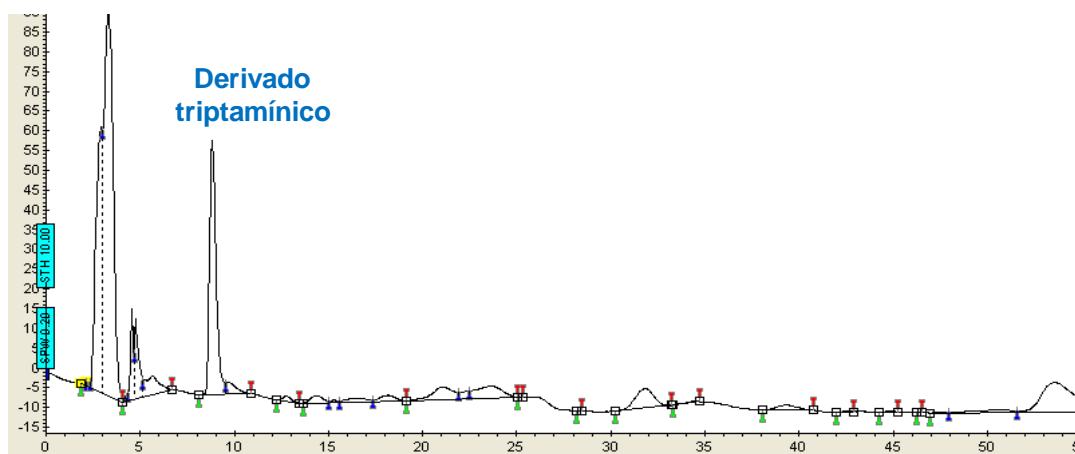


**Figura 22.** Identificación de tetrahidroalstonina por espectrometría de masas de un extracto de hojas de planta silvestre de *H. patens*: A) estándar de tetrahidroalstonina (con  $R_t = 27$  min en el cromatograma) y B) extracto donde se observan las señales correspondientes a la tetrahidroalstonina.

## VI.7 Producción de precursores triptamínicos en cultivos de raíces, callos y células en suspensión

### VI.7.1 Raíces y cultivo de raíces

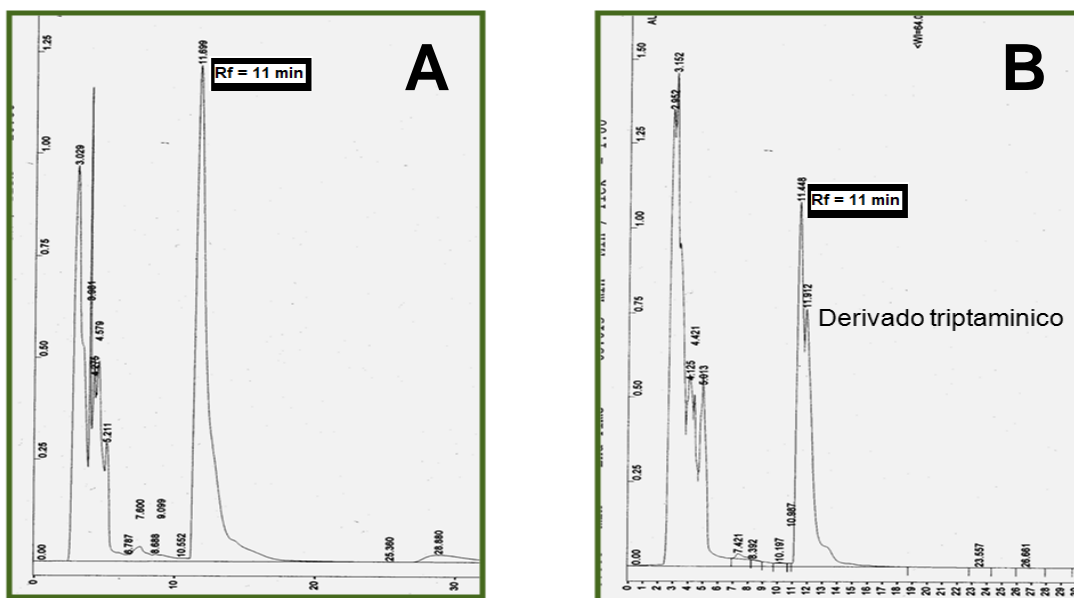
El cultivo de raíces en suspensión de *H. patens* ha mostrado capacidad de producción de 1 a tres alcaloides de tipo triptamínico con tiempos de retención 5, 6 y 9 (Fig. 22) de 1 a 2 mg/g P.S. Estos resultados muestran que el cultivo en suspensión ha mantenido su capacidad de producción de alcaloides triptamínicos, por siete años, debido a que cuando fue establecido presentaba el mismo rango de producción de alcaloides triptamínicos (Paniagua-Vega, 2007).



**Figura 23.** Cromatograma del extracto de raíces en suspensión de *H. patens* en medio de cultivo completo MS más 2% de sacarosa.

### VI.7.2 Producción de alcaloides en el cultivo de callos de *H. patens*

Los callos de *H. patens* en medios de cultivo 20 y 34 presentaron producción de un compuesto con un tiempo de retención de 11 min (**Fig. 24**), el cual no fue posible identificar debido a que su espectro UV no correspondió a ninguno de los estándares de los alcaloides (triptamínico, indol y/o oxindol-monoterpénicos) ni con el precursor terpénico, la loganina. Sin embargo, se encontró que el cultivo de callos crecido en medio de cultivo 20, produjo un alcaloide de tipo triptamínico con un tiempo de retención muy cercano a 11 min (**Fig. 24 B**). Estos resultados sugieren que se pueda estar produciendo también en el cultivo de callos en medio 34 el alcaloide triptamínico, en una menor cantidad en relación al compuesto que aparece en el cromatograma con un Rt de 11 min y este lo enmascara por presentar señales tan cercanas en el sistema cromatografico.



**Figura 24.** Cromatogramas de extractos de callos de *H. patens* en dos medios de cultivo: A) medio 34 y B) medio 20.

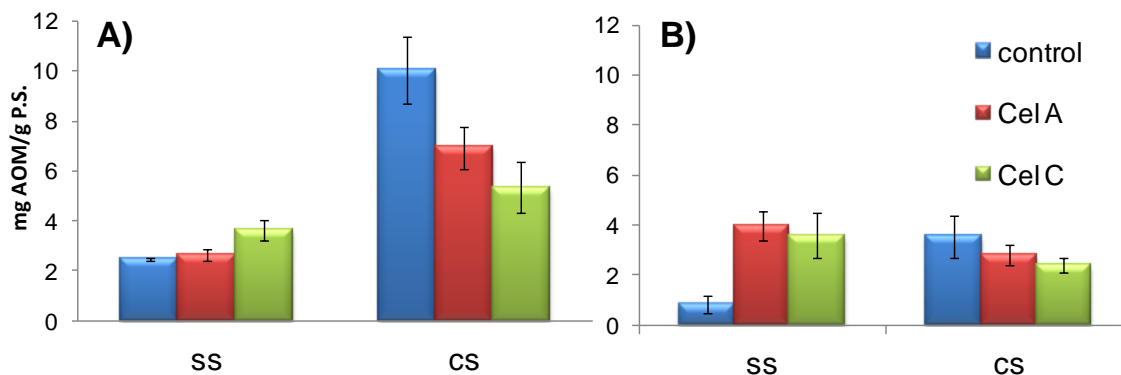
## VI.8 Elicitación de cultivos de raíces y plántulas de *H. patens*

Se presenta el efecto de diferentes agentes estimuladores sobre el crecimiento y la producción de alcaloides y derivados triptamínicos en cultivos *in vitro* de raíces en suspensión y plántulas de *H. patens*.

### VI.8.1 Efecto de la adición de celulosa a plántulas micropropagadas de *H. patens*

Diversos inductores naturales pueden ser utilizados para incrementar la producción de metabolitos secundarios, entre estos se incluyen los polisacáridos tales como la pectina y el quitosano (Hussain *et al.* 2012), además se ha demostrado que diversos tipos de oligosacáridos que forman parte de la pared celular vegetal pueden ser usados para sustituir de forma parcial o total a los reguladores del crecimiento de plantas tradicionales (Creelman y Mullet, 1997; Izquierdo, 2009). Con el fin de tener un acercamiento sobre efecto del polisacárido celulosa y del disacárido sacarosa en el crecimiento de la planta y

la producción organoespecífica de alcaloides de tipo indólico y oxindólico en plántulas micropropagadas *in vitro* de *H. patens*, se evaluó el retirar los 20 g/L sacarosa del medio de cultivo y el adicionar pulpas de celulosa al 0.5% (p/v) en el medio de cultivo semisólido.



**Figura 25.** Producción de AOM en **A)** hojas y **B)** tallos de plántulas de *H. patens* a un mes de cultivo, donde: **SS** = sin sacarosa en el medio de cultivo, **CS** = con sacarosa adicionada al medio de cultivo (20 g/L), **Cel A** = pulpa de celulosa amorfa y **Cel C** = pulpa de celulosa cristalina.

Sin embargo, el efecto de la adición de las pulpas de celulosa amorfa y cristalina sobre la producción de AOM en las hojas de las plántulas se presentó en función de la adición de sacarosa al medio de cultivo. En las hojas de plántulas micropropagadas sin la adición de sacarosa, se observó una producción de 2.4, 2.6 y 3.6 mg de AOM/g P.S. para el control (sscontrol), Celulosa Amorfa (ssCelA) y Celulosa Cristalina (ssCelC) respectivamente, donde destaca ssCelC con un aumento en la producción del 50% con respecto a sscontrol (**Fig. 25A**). Sin embargo, las hojas de las plántulas con sacarosa adicionada al medio de cultivo presentaron mayor producción de AOM tanto en los tratamientos como en el control; de 300% para el control, 160% para celulosa amorfa y 50% para celulosa cristalina, con respecto a la producción de los mismos tratamientos sin sacarosa (**Fig. 25A**). Se reportó que el aumento en la sacarosa de 20 a 50 g/L en el

medio de cultivo estimulo la producción de AOM en cultivos de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Luna-Palencia *et al.* 2005). Además, se encontró una respuesta similar en tejido diferenciado, al aumentar la sacarosa adicionada al medio de cultivo de 20 a 70 g/L en un cultivo de raíces en suspensión de *U. tomentosa* (Utr3) (Huerta-Heredia, 2006). La presencia de celulosa amorfa ó cristalina en los cultivos con 20 g/L de sacarosa disminuyo la producción de AOM en la hojas de plántulas con respecto al control con solo sacarosa (Fig. 25A). Sin embargo, en un reporte previo se encontró un efecto positivo en la producción de AOM de 1.5 veces en hojas de plántulas de *H. patens* al colocar filtros de celulosa (para pipetas) esterilizados por calor húmedo sobre el medio de cultivo semisólido (Paniagua-Vega, 2007).

En los tallos de las plántulas micropropagadas la adición de las pulpas de celulosa al medio de cultivo sin sacarosa, se presentó un aumento en la producción de AOM de 380% para el tratamiento con celulosa amorfa y 330% para el de celulosa cristalina, con respecto al control (sscontrol). Sin embargo, la adición de sacarosa con las pulpas de celulosa al medio de cultivo no presentó una diferencia significativa en la producción de AOM de aproximadamente 3 mg/g P.S. en los tallos de las plántulas micropropagadas (Fig. 25B). En síntesis el mayor efecto estimulador de la producción de AOM, tanto en hojas como en tallos de plántulas de *H. patens*, se encontró con la sola adición de 20 g/L de sacarosa al medio de cultivo.

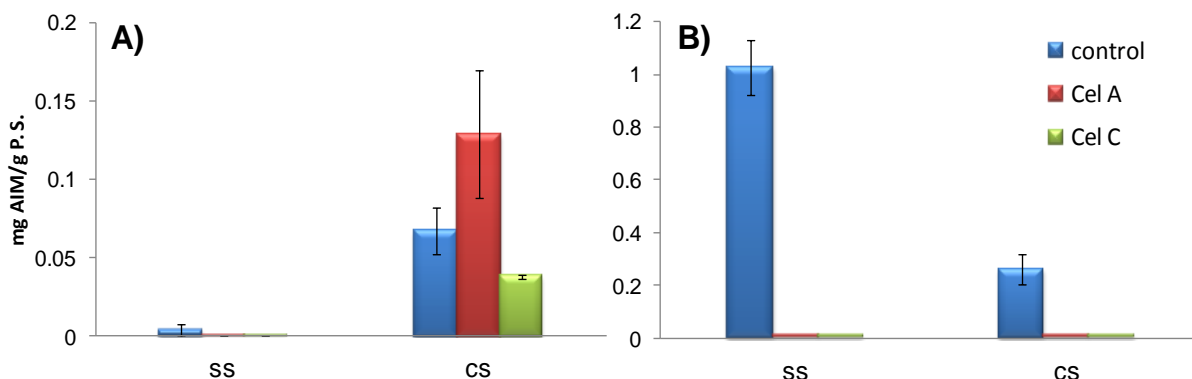
En trabajos sobre la degradación de la celulosa se reportó que a partir de celulosa cristalina sometida a reactor batch o monolith se puede obtener glucosa, oligosacaridos y otros componentes, incluso a pH cercano a la neutralidad (Schutt *et al.* 2004). Por otro lado, se reportó que la hidrólisis de celulosa en autoclave durante una hora presentó un rendimiento inferior en comparación con los sistemas que incorporan técnicas de oxidación en agua (Papadimitriou, 2009). En otras palabras, es posible que en un menor



tiempo de hidrólisis, en autoclave por calor húmedo por 18 min a pH de 6.3, durante el proceso de esterilización convencional se pudieran generar pequeñas cantidades de hidrolizados como oligosacaridos a partir de las pulpas de celulosa. [Hahn y colaboradores en 1981](#) reportaron que fragmentos de polisacárido de la pared celular vegetal eran capaces de inducir la producción de fitoalexinas en soya, a partir de este descubrimiento se ha sugerido que la complejidad estructural de los polisacáridos de la pared vegetal puede ser utilizada como inductores de respuesta de los mecanismos de defensa en las plantas. Cabe mencionar, que en plántulas de *Vitis vinifera* cultivadas *in vitro*, se encontró que con la adición de diferentes oligosacaridos, se indujo una mayor respuesta cuando se utilizaron oligosacáridos con menores grados de polimerización y esta ocurre por diferentes vías de señalización ([Aziz et al. 2007](#)).

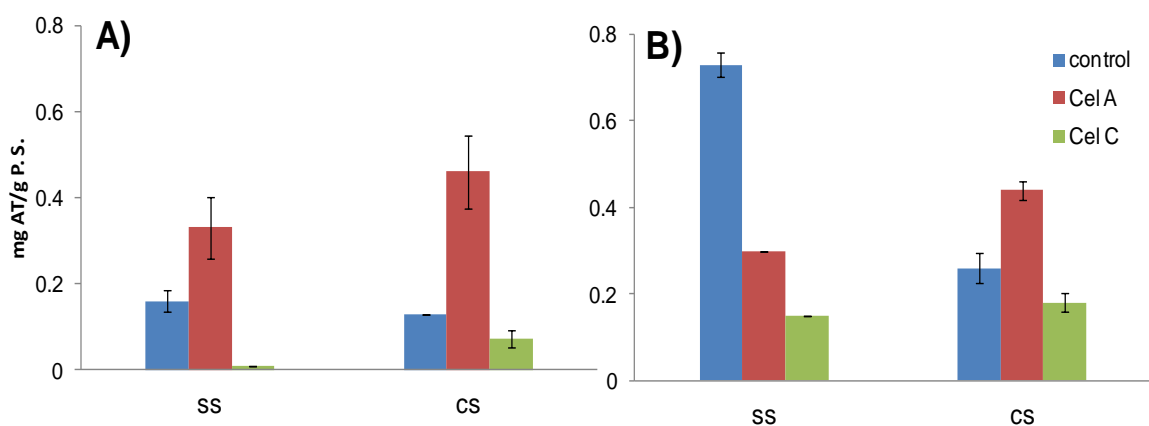
La producción de AIM en las hojas de las plántulas micropropagadas en los tratamientos sin sacarosa fue de solo trazas. De forma semejante, en los tratamientos con sacarosa en el medio de cultivo, la producción de AIM en hojas fue baja de aproximadamente 0.04 y 0.15 mg/g P.S. ([Fig. 26A](#)), sin embargo la celulosa amorfa incrementó al doble la producción de AIM. Los tallos con los tratamientos de las pulpas de celulosa presentaron un efecto negativo en la producción de AIM respecto a sus controles. Sin embargo, el control sin sacarosa de tallos de plántulas micropropagadas mostró un contenido 5 veces en la producción de AIM con respecto al control con sacarosa ([Fig. 26B](#)). El aumento en la producción de AIM de los tallos al no adicionar sacarosa, podría ser consecuencia de proceso de adaptación de las plántulas para pasar de un metabolismo heterotrófico a uno autotrófico, ya que se ha observado en el perfil de producción de alcaloides las hojas y tallos de plantas silvestres de *H. patens* tanto de Mapastepec, Chiapas, como de Coatzintla, Veracruz, una producción mayor de AIM que AOM ([Cromatogramas de anexos](#)). Además, se encontró en las hojas nuevas, medias y viejas de plantas silvestres de Coatzintla, Veracruz, que en los meses de junio a agosto la producción de AOM se

reduce hasta solo trazas. Estos meses se caracterizan por presentar mayores precipitaciones pluviales en la región y por tanto es el periodo de mayor crecimiento de la planta.



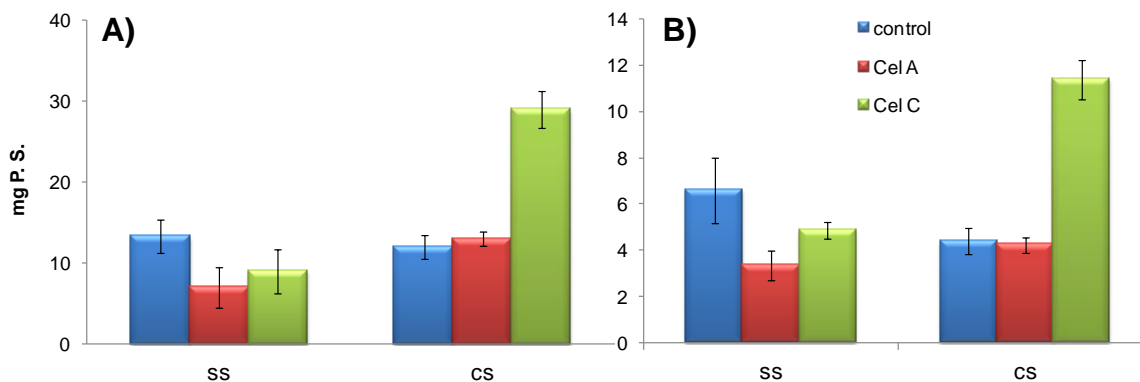
**Figura 26.** Producción de AIM en **A)** hojas y **B)** tallos de plántulas de *H. patens* a un mes de cultivo, donde: **SS** = sin sacarosa en el medio de cultivo, **CS** = con sacarosa adicionada al medio de cultivo (20 g/L), **Cel A** = pulpa de celulosa amorfa y **Cel C** = pulpa de celulosa cristalina.

La sacarosa no mostró un efecto positivo sobre la producción de alcaloides triptamínicos (AT) en tallos de plántulas micropropagadas. En ambos casos el tratamiento con pulpa de celulosa amorfa mostró un aumento de 2 veces en la producción de AT con respecto al tratamiento control (Fig. 27). Sin embargo, se observó efecto en el medio de cultivo sin sacarosa en la producción de AT en las raíces de las plántulas micropropagadas. Donde, el control produjo aproximadamente 0.8 mg/g P.S.



**Figura 27.** Producción de AT en **A)** tallos y **B)** raíces de plántulas de *H. patens* a un mes de cultivo,

donde: **SS** = sin sacarosa en el medio de cultivo, **CS** = con sacarosa adicionada al medio de cultivo (20 g/L), **Cel A** = pulpa de celulosa amorfa y **Cel C** = pulpa de celulosa cristalina.



**Figura 28.** Crecimiento de **A)** plántulas completas (hojas, tallo y raíces) y **B)** hojas de plántulas de *H. patens* a un mes de cultivo, donde: **SS** = sin sacarosa en el medio de cultivo, **CS** = con sacarosa adicionada al medio de cultivo (20 g/L), **Cel A** = pulpa de celulosa amorfa y **Cel C** = pulpa de celulosa cristalina.

La adición de pulpa de celulosa cristalina mostró un efecto positivo al aumentar 2 veces la biomasa de hojas y plántulas completas de *H. patens* con respecto a su control (Fig. 28). Se sabe que durante la expansión celular, la síntesis de celulosa es el mayor consumidor del carbono fijado. Por lo tanto cualquiera que sea el mecanismo de regulación de la celulosa, está en coordinación con otros aspectos del metabolismo primario del carbono (Somerville, 2006). Cabe destacar que a la mayor producción de biomasa de las hojas por acción de la celulosa cristalina en presencia de sacarosa le correspondió una disminución en la producción de AOM de cerca del 40% respecto a su control, sin embargo también se puede ver favorecer la producción de AOM porque al incrementar al doble la biomasa en el mismo tiempo, se mejora la productividad de sistema de cultivo. Las plantas han desarrollado mecanismos sensoriales para detectar el ataque de los patógenos y el desencadenamiento de las vías de señalización que inducen respuestas rápidas. Estos mecanismos incluyen no sólo la detección directa de inductores derivados de patógenos; por ejemplo, los patrones moleculares asociados a

la patogenicidad (PAMP) y los factores de avirulencia o efectores, sino también la detección indirecta de los patógenos en la planta huésped. La pared celular y la cutícula son de las primeras barreras a la entrada de patógenos de plantas. Aquellos patógenos que penetran en la pared celular vegetal para obtener acceso al agua y los nutrientes de los protoplastos de las plantas, lo hacen a través de pequeñas heridas en los sitios de penetración, creadas por ruptura enzimática o física de la pared celular vegetal. Algunos fragmentos de pared celular de plantas, en particular ácidos oligogalacturónicos, provocan respuestas similares de defensa en las plantas como inductores de PAMP no específicos; por ejemplo, la producción de especies reactivas del oxígeno y una elevada expresión de genes relacionados con la defensa (Hématy *et al.* 2009). Además diferentes oligosacáridos han presentado efecto como reguladores de crecimiento, Suzuki y col. en el 2001, reportaron un efecto positivo de los oligosacáridos en el crecimiento de germinados de *Celosia argentea* L. y *Lycopersicon esculentum* L. extraídos a partir de la hidrólisis ácida de residuos de jugo de tomate. En muchos casos, las preparaciones utilizadas de oligosacáridos suelen no ser químicamente homogéneas. El uso de preparaciones puras es esencial para determinar sin lugar a dudas el papel de los oligosacáridos como reguladores endógenos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Aun es necesaria mucha más información acerca de su biosíntesis, transporte, factores de unión, modo de acción, y fisiología en las plantas. Un ejemplo del efecto como regulador de crecimiento de oligosacáridos químicamente homogéneos es la incorporación en la pared celular de xiloglucanos, que aceleran la división y expansión celular en un cultivo de células en suspensión de tabaco (Kaida *et al.* 2010). Como polisacáridos completos, la quitina y el quitosano han mostrado efectos positivos sobre el crecimiento de plantas, la quitina puede favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas, porque incrementa la actividad enzimática, metabólica y acelera la germinación (Hirano, 1997). El quitosano aumentó el crecimiento de las raíces, los brotes y las hojas

de varias plantas, incluyendo las plantas de Gerbera (Wanichpongpan *et al.* 2001; Chibu y Shibayama, 2001).

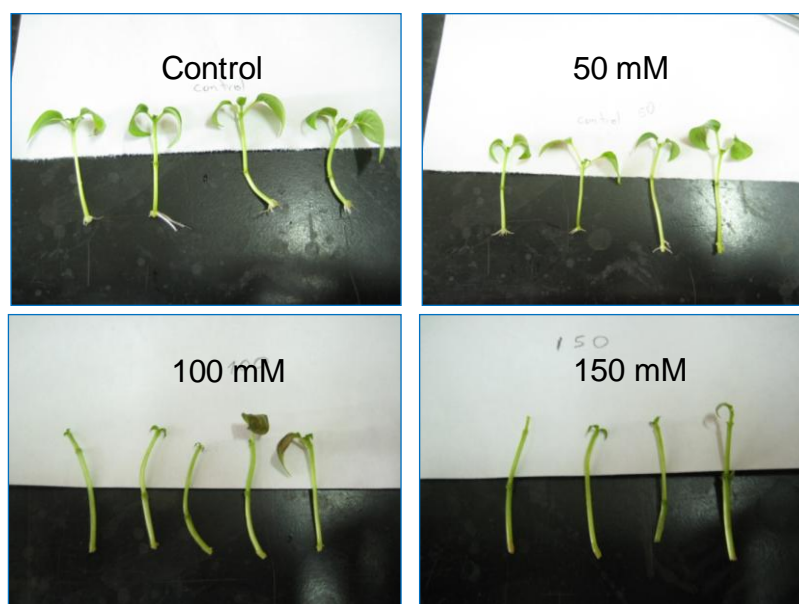
En los cultivos en los que no se adiciono sacarosa al medio de cultivo se presentó la mayor producción de AOM en hojas, de AIM en tallos y de AT en raíces, mientras que la adición de 20 g/L de sacarosa incrementó al triple el contenido de AOM en hojas y tallos, los AIM también se incrementaron en las hojas, sin embargo estos se vieron reducidos en un 80% en los tallos de las plántulas. Un análisis de la producción de alcaloides en las diferentes partes de la plántulas nos muestra que el sitio de mayor producción de AOM y AIM corresponden a las partes áreas y clorofílicas de la planta que incrementaron la producción de estos alcaloides en presencia de sacarosa. Además la adición de 0.5% de Cel C al medio de cultivo con 20 g/L de sacarosa aumento 2 veces la biomasa de la plántula y 2.5 veces la biomasa de las hojas, con respecto al control con sacarosa.

#### **VI.8.2 Efecto de la adición de NaCl a plántulas micropropagadas de *H. patens***

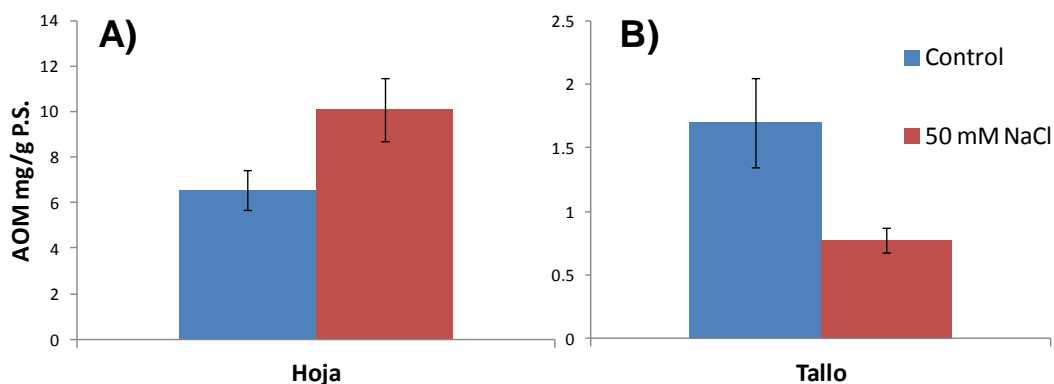
El medio de cultivo es la condición ambiental y nutrimental básica para cultivos de células y tejidos vegetales. La salinidad en el medio de cultivo afecta cada aspecto de la fisiología de la planta y su metabolismo. La alta concentración de sales ocasiona un desequilibrio iónico y estrés osmótico. Un fuerte estrés salino rompe la homeostasis del potencial hídrico y la distribución de iones. Es un factor importante que afectan a la acumulación de biomasa y la producción de metabolitos primarios y secundarios.

Con la finalidad de estudiar el efecto del estrés salino en la producción de AOM del cultivo *in vitro* de plántulas de *Hamelia patens*, se adicionaron tres concentraciones de NaCl al medio de cultivo. La adición de 50 mM de NaCl incrementó la producción de AOM. Por arriba de dicha concentración cuando se utilizaron concentraciones de 100 y 150 mM no hubo desarrollo de la raíz y que las hojas de las plántulas se desprendieron (Fig. 29), por lo cual no fueron consideradas para la cuantificación de alcaloides. Los

daños provocados por efecto de la salinidad están asociados a tres posibles mecanismos. El primero es causado por la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el citoplasma llevando a un desbalance iónico. El segundo es provocado porque el potencial de agua en el citosol baja para mantener un balance con el bajo potencial de agua externo. El ultimo, una alta concentración de  $\text{NaCl}$  incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el cual es considerado el principal evento bajo condiciones de estrés (Levinsh, 2006). Es reconocido que el aumento en la producción de ROS puede provocar un disturbio en el balance redox, aumentando diferentes procesos oxidativos como la peroxidación lipídica de las membranas, oxidación de proteínas, inhibición de proteínas y daño en el DNA y RNA (Asada, 2006).



**Figura 29.** Efecto morfológico de la adición de 3 concentraciones de  $\text{NaCl}$ , en explantes apicales de *H. patens* en medio NNm líquido a los 4 días de incubación.



**Figura 30.** Producción de AOM en explantes apicales de plántulas de *H. patens* en medio NNm líquido a los 4 días de incubación, donde; **A)** Hoja y **B)** Tallo.

La adición de NaCl a 50 mM al medio de cultivo mostró en hojas de plántulas micropropagadas un efecto positivo en la producción de AOM, con un incremento de 54% alcanzando los 10 mg/g P.S (Fig. 30). Estos resultados son similares a los encontrados en un cultivo de plántulas de *H. patens* de 2 meses, cultivadas en tierra, la adición de 100 mM de NaCl a los 1, 3 y 5 días incrementó la producción de AOM; observando que al día 3 de la adición de NaCl incrementó 1.08 veces con respecto a su control; sin embargo, el perfil de alcaloides se mantuvo constante (Huerta-Heredia, 2011 reporte posdoctoral, comunicación personal).

El efecto del estrés salino ha sido estudiado ampliamente, provocando la acumulación o disminución de algunos metabolitos secundarios en plantas (Mahajan y Tujeta, 2005). Como lo fue el estudio de Parida y Das en 2005 donde observaron un incremento en antocianinas en hojas de *B. parviflora*. Por otra parte, en cultivos *in vitro* de tomate, el estrés salino provocó la disminución de antocianinas, fenoles y flavonoides en *S. stoloniferum*, pero en el caso *Solanum acaule* no hubo cambio en dichos metabolitos (Daneshmand *et al.* 2010). En el caso de alcaloides, Brachet y Cosson en 1986 observaron un incremento en la producción de alcaloides totales en hojas jóvenes de *Datura innoxia* bajo estrés salino (153.8 mM de NaCl). También Sutković y

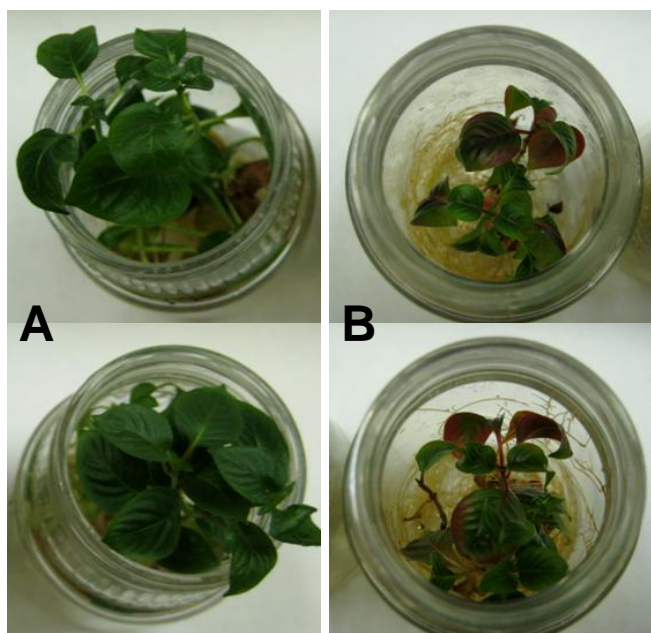
colaboradores en el 2011, reportaron que en cultivos *in vitro* de *Solanum nigrum* al adicionar 200 mM de NaCl se produjo un aumento la acumulación de solasodina. Además, Wang *et al* en 2008 agregaron de 50 a 250 mM de NaCl a germinados de *Catharanthus roseus* y observaron que la adición de 50 mM de NaCl mostró un incremento en la producción de vindolina, catarantina, vincristina y vinblastina de 4.61, 3.56, 1.19, y 2.95 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Otro estudio realizado en *C. roseus* mostró un aumento en la producción de alcaloides por encima del 50%, tanto de brotes como de raíces con la adición de 80 mM de NaCl (Jaleel *et al.* 2007), una respuesta similar fue observada con *Withania somnifera* bajo condiciones de estrés salino (Jaleel *et al.* 2008). El deterioro por salinidad ocurre debido a tres causas: a) el estrés osmótico, b) la interrupción de las actividades metabólicas por el desbalance y exceso de iones, y c) por la interferencia de los iones de la sal con el consumo de macro y micronutrientes esenciales (Abd El Samad y Shaddad 1997).

### **VI.8.3 Efecto de dos regímenes lumínicos en plántulas de *H. patens***

La luz es la fuente de energía de la fotosíntesis y presenta un efecto en el metabolismo primario y el secundario por medio de diferentes rutas. Las plantas tienen diferentes tipos de fotorreceptores para la percepción de la luz. Estos incluyen a los fitocromos fotorreceptores del rojo/rojo-lejano, los citocromos de absorción de luz azul/UV-A y uno o más fotorreceptores de absorción de luz UV-B que pueden controlar la expresión de genes (Thompson y White, 1991). Aunque la luz induce la acumulación de alcaloides, es difícil determinar cual es la vía por la que se induce esta respuesta, ya que podría ser consecuencia de un cambio en el metabolismo primario. Sin embargo, en cuanto a la biosíntesis de alcaloides indol monoterpénicos se sabe que la formación de tabersonina 16-hidroxilasa puede ser directamente regulada por luz en *C. roseus* (Schröder *et al.* 1999), además la producción de N,β-D-glucopiranosil vincosamida incrementó



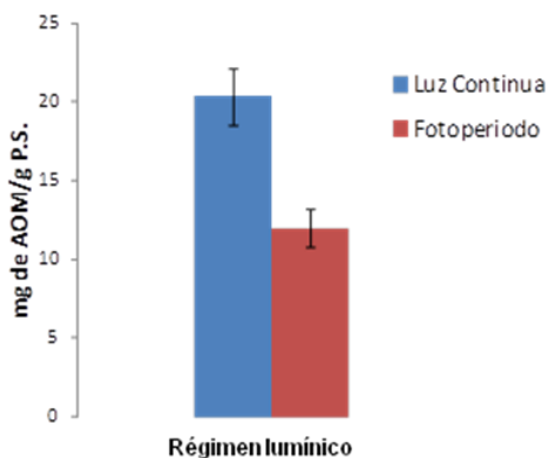
fuertemente con la exposición a la luz en germinados de *Psychotria leiocarpa* (Henriques *et al.* 2004). Con base en lo anterior, se planteó comparar el efecto del régimen lumínico de luz continua y el del fotoperiodo 18/6 h luz en la producción de alcaloides de un cultivo de plántulas micropropagadas de *H. patens*.



**Figura 31.** Plántulas de *H. patens*. a los dos meses de micropropagadas incubadas bajo dos regímenes lumínicos **A)** fotoperiodo de 18/6 h a  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y **B)** luz continua a  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

El fotoperiodo 18/6 h a  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mostró mejor crecimiento longitudinal de  $11.5 \pm 0.39$  y foliar desarrollando  $6.25 \pm 0.5$  segmentos binodales (Tabla 10). Por otra parte, en un régimen lumínico de luz continua las plántulas presentaron un menor desarrollo longitudinal, sin embargo se observó un aumento en el área de las hojas. En condiciones de alta intensidad de luz *H. patens* mostró una coloración roja en los bordes de las hojas, debida a la presencia de compuestos fenólicos (Fig. 31) que posteriormente se identificaron como flavonoides **sección VI.14**, en estas condiciones se encontró una producción de AOM de  $20.30 \text{ mg/g P.S.}$  un 70% más que en fotoperiodo (Fig. 32). Además se encontró que las plántulas en luz continua presentaron una isoforma más de la enzima antioxidante súper oxido dismutasa (SOD) con respecto a las cultivadas en

fotoperiodo (Huerta-Heredía, comunicación personal) lo que estaría evidenciando la capacidad del sistema antioxidante enzimático y por otro lado observamos el sistema antioxidante no enzimático con la producción de AOM (Fig. 31) y la presencia de flavonoides en plántulas micropropagadas de *H. patens*.



**Figura 32.** Producción de AOM de plántulas de *H. patens* en dos regímenes lumínicos; **fotoperiodo** de 18/6 h a  $13.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y **luz continua** a  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**Tabla 10.** Crecimiento de explantes apicales de *H. patens* en dos regímenes lumínicos.

	Longitud	No. De segmentos nodales
Fotoperiodo t=0	3.5±0.21	2±0
Luz continua t=0	3.3±0.28	2±0
Fotoperiodo t=2 meses	11.5±0.39	6.25±0.5
Luz continua t=2 meses	6.1±0.32	3.5±0.57

Henriques *et al.* (2004) menciona que la luz podría ser necesaria para la activación de enzimas o la transcripción de genes biosintéticos involucrados en el ensamblaje de alcaloides, en conjunto con la diferenciación de cloroplastos. Alternativamente, el metabolismo fotosintético del carbono puede estar relacionado con la alta acumulación de AOM de las plántulas de *H. patens* crecidas bajo luz continua.

De Luca y Laflamme en el 2001 informaron que la biosíntesis de alcaloides está regulada principalmente a nivel de la expresión génica. En cultivos células en suspensión de *C.*

*roseus* con un tratamiento de UV-B se incremento la producción de catarantina y vindolina en 3 y 12 veces respectivamente (Ramani y Jayabaskaran, 2008). En las hojas de germinados de *C. roseus* el tratamiento bajo la luz con una película plástica (que disminuye la energía radiante de la fuente emisora) aceleró la acumulación de vinblastina (VBL). Además, se correlacionó significativamente la acumulación de vindolina (VIN) con la expresión de genes de desacetoxivindolina-4-hidroxilasa (*D4h*) y deacetilvindolina-4-O-acetil transferasa (*DAT*), y la acumulación de catenamina (CAT) que fue significativamente correlacionado con la expresión génica de estrictosidina sintasa (*Str*) (Liu *et al.* 2011).

#### **VI.9 Estudio bioquímico de la producción de alcaloides en cultivo de raíces en suspensión de *H. patens***

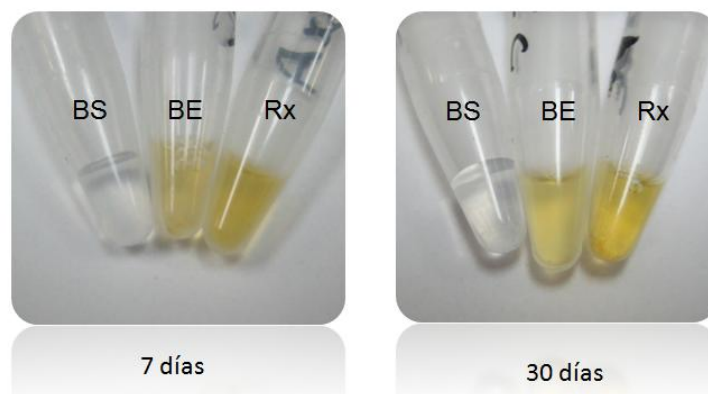
Se utilizaron diferentes tratamientos de elicitación en el cultivo de raíces de *H. patens* por ejemplo, con extracto de levadura y etanol se encontró estimulación en dos rutas, la formación de compuestos fenólicos y de AT (Paniagua-Vega, 2009). Sin embargo, a diferencia de las plántulas micropropagadas *in vitro* y de las plantas silvestres de *H. patens*, en el cultivo de raíces en suspensión no ha sido posible lograr la producción de alcaloides. Con la finalidad de tener un mayor acercamiento a la limitación biosintética del cultivo de raíces en suspensión de *H. patens*, se estudio la actividad enzimática y los niveles de expresión de los transcritos de las enzimas estrictosidina sintasa (STR) y estrictosidina  $\beta$ -glucosidasa (SDG), consideradas clave en la biosíntesis de AIM. Además, se realizó una estrategia combinada de elicitación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y E-lev y la adición del precursor terpénico secologanina.

### **VI.9.1 Actividad de estrictosidina sintasa (STR) en cultivo de raíces de *H. patens***

Los extractos crudos de raíces (HPr1) de 7 días de cultivo, mostraron una actividad específica de la enzima STR de  $68.21 \pm 8.24$  pkat/mg de proteína, además, se observó que esta actividad específica es constante con raíces de 30 días de propagadas. Estos resultados coinciden con los reportados en el cultivo de raíces de *Uncaria tomentosa* para extractos crudos con 51 pkat/mg (Palmeros-Parada, 2007) y 80 pkat/mg (Vera-Reyes, 2013). Sin embargo, el cultivo de raíces de *U. tomentosa* alcanza producciones de AIM y AOM de 1.0 y 9.06 mg/L respectivamente en condiciones de elicitación con  $H_2O_2$  y cultivadas en biorreactor airlift (Huerta-Heredia et al. 2009). De forma similar, tanto los cultivos de plántulas micropropagadas de *H. patens* como los de *U. tomentosa* han mostrado capacidad para producir altas concentraciones (de 5 a 15 mg/g P.S.) de AIM y AOM (Paniagua-Vega et al. 2012 y Luna-Palencia et al. 2013). Sin embargo, el cultivo de raíces en suspensión de *H. patens* no presenta producción de AIM o AOM, aún cuando presenta actividad enzimática de STR, una enzima clave en la biosíntesis de estos alcaloides.

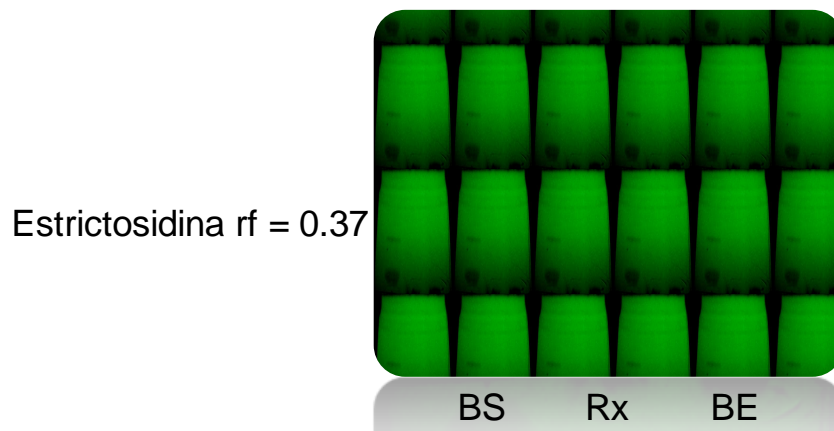
### **VI.9.2 Actividad de estrictosidina glucosidasa (SDG) en cultivo de raíces de *H. patens***

En extractos crudos de raíces (HPr1) de 7 y 30 días de cultivo se detecto cualitativamente la actividad de la SDG. Como resultado del ensayo enzimático se obtuvo el color amarillo característico del producto catenamina (Geerlings et al. 2000) convertida a partir de la estrictosidina por la SDG (Fig. 33)



**Figura 33.** Aparición del color amarillo característico de la reacción de la SDG en muestras de cultivo de raíces de *H. patens* a los 7 y 30 días, donde; BS es blanco de sustrato, BE es blanco de enzima y Rx es la reacción.

Mediante un análisis por TLC se confirmó la desaparición de estrictosidina en el producto de la reacción la reacción enzimática (Fig. 34).

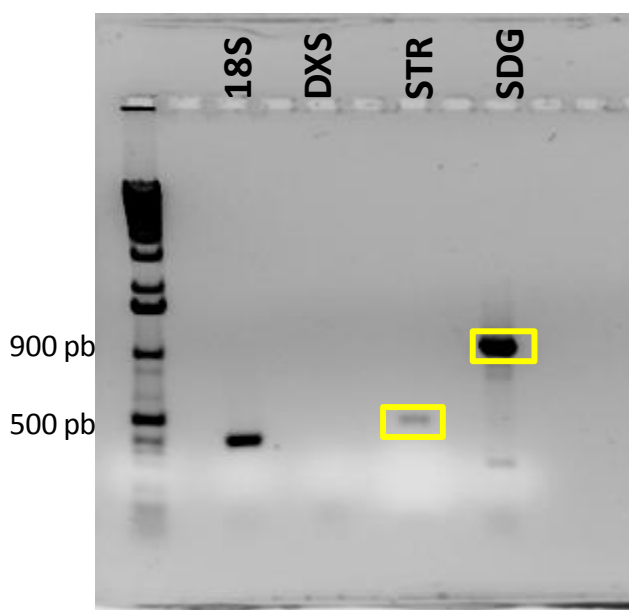


**Figura 34.** Desaparición de la estrictosidina con  $R_f=0.37$  después del ensayo para SDG, donde; BS es blanco de sustrato, BE es blanco de enzima y Rx es reacción.

### VI.9.3 Transcritos de enzimas involucradas en la biosíntesis de AIM en cultivo de raíces de *H. patens*

En colaboración con la Dra. Josefina Flores Sánchez se lograron obtener los transcritos de las enzimas STR y SDG en cultivo de raíces de *H. patens* de 30 días de crecimiento y

se observó una mayor síntesis para la SDG (Fig. 35). Sin embargo, no se localizó el transcrito correspondiente a la deoxi-xilulosa sintasa (DXS) lo cual podría indicar que existe limitación por parte del precursor terpénico, necesario para la biosíntesis de AIM en el cultivo de raíces HPr1.



**Figura 35.** Transcritos de enzimas involucradas en la biosíntesis de AIM, donde; 18S control positivo, DXS deoxi-xilulosa sintasa, STR estrictosidina sintasa, SGD estrictosidina glucosidasa (Flores-Sánchez, comunicación personal).

De acuerdo a los resultados anteriores en los pasos de biosíntesis clave de los AIM, se encontró que el cultivo de raíces HPr1 tiene la capacidad bioquímica de producir AIM. Sin embargo, es probable que la limitación este a nivel del precursor terpénico.

#### **VI.9.4 Adicción del precursor secologanina en cultivo de raíces *in vitro* de *H. patens* bajo elicitación**

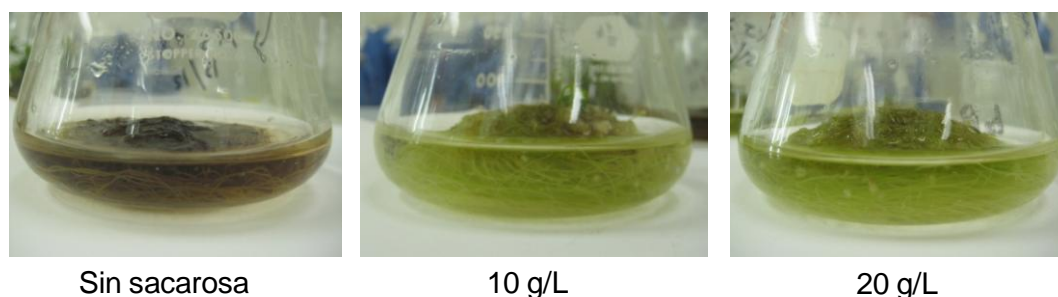
Cuando la producción de los metabolitos secundarios buscados está limitada, una causa puede ser la falta de los precursores biosintéticos. Se pueden implementar estrategias como la biotransformación usando un suministro exógeno del precursor o precursores de

los metabolitos de interés. Además, se puede buscar un efecto sinérgico al emplear compuestos inductores, que han mostrado desencadenar la formación de metabolitos secundarios, los cuales pueden ser de naturaleza biótica o abiótica.

La estrategia combinada de elicitar y adicionar el precursor terpénico secologanina en el cultivo de raíces HPr1 no fue capaz de estimular la producción de AIM. En los tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y E-lev no se observaron cambios en el perfil de producción con respecto a los controles. Todas las unidades experimentales únicamente fueron capaces de acumular AT al día 20. Sin embargo, se observó que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y secologanina disminuyó la producción de AT en un 25% con respecto al control, mientras que el tratamiento con E-lev más secologanina disminuyó los AT en un 6% con respecto al control. Estos resultados muestran un efecto inhibitorio en la producción de AT por la adición de 0.4 mM de secologanina, debido a que se reportó que la adición de E-lev en el cultivo de raíces HPr1 aumenta la producción de AT ([Paniagua-Vega, 2009](#)).

#### **VI.9.5 Efecto de la sacarosa en el cultivo de raíces de *H. patens***

Se estudió el efecto en la producción de alcaloides de la adición de 10 y 20 g/L de sacarosa en el medio de cultivo a los 1.5 meses. Con ninguno de los tratamientos se encontró producción de AIM o AOM, mientras que el perfil de producción de AT no presentó diferencias significativas entre los cultivos de raíces adicionados con 1 y 2% de sacarosa. De esta forma, se corroboró que el cultivo de raíces en suspensión se mantiene estable la producción de AT de acuerdo al análisis realizado 4 años atrás por [Paniagua-vega, 2007](#). Además, los cultivos con 10 g/L de sacarosa generaron brotes y en el control (sin sacarosa) se presentó oscurecimiento e inhibición del crecimiento ([Fig. 36](#)).

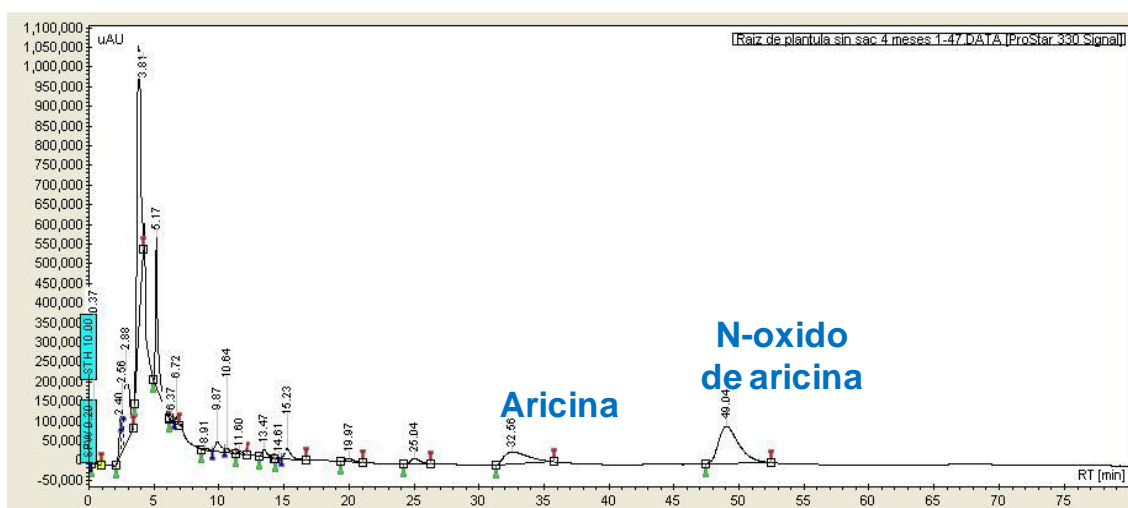


**Figura 36.** Efecto de la adición de sacarosa en el cultivo de raíces de *H. patens*.

#### **VI.10 Producción de alcaloides en raíces de plántulas de *H. patens***

Con la finalidad de estudiar el perfil de producción de alcaloides en raíces de plántulas micropropagas de *H. patens* en condiciones autotróficas *in vitro*, se evaluaron plántulas crecidas en medio de cultivo sin la adición de sacarosa a los 2 y 4 meses. Se encontró producción de 0.5 mg/g P.S. de AIM en raíces de 4 meses, cultivadas en medio NNm con 2 g/L de gel rite, sin sacarosa y en fotoperiodo de 16/8 h, los AIM producidos fueron aricina y *N*-óxido de aricina en relación (1:4) ([Fig. 37](#)). Además se observó que las raíces de las plántulas de dos meses presentaban producción de AIM, sin embargo la producción se presentó por debajo de límite de cuantificación en las condiciones analíticas en HPLC. Este resultado es el primer precedente de producción de alcaloides (AIM) en las raíces de las plántulas *in vitro* de *H. patens*, anteriormente la mayor respuesta que se había obtenido fue con la adición de metil jasmonato, que resulto en el aumento de 2 veces en la producción de AT alcanzando los 4.2 mg/g P.S. ([Paniagua-Vega, 2007](#)).





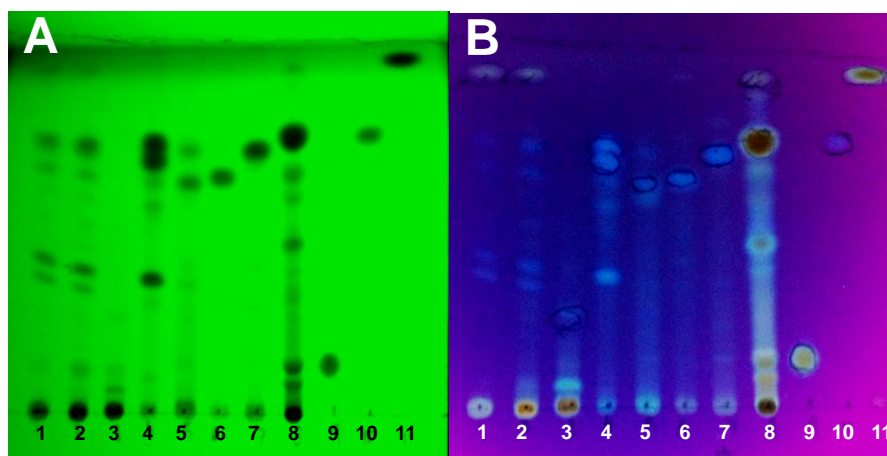
**Figura 37.** Comatograma de producción de AIM en raíces de plántulas de 4 meses de micropropagadas en medio NNm sin sacarosa.

## VI.11 Estudio de la biotransformación de precursores de los AOM en cultivos de plántulas de *H. patens*

### VI.11.1 Establecimiento del sistema de TLC para los alcaloides de *H. patens*

Con la finalidad de contar con un sistema de TLC capaz de separar los alcaloides AOM, AIM y AT que previamente fueron aislados y caracterizados a partir de cultivos de *H. patens*, se probaron 13 fases móviles.

Se seleccionó la fase móvil denominada F13 (diisopropileter-metanol [85:15] con 1% v/v de hidróxido de amonio) porque presentó la mejor separación entre los alcaloides producidos por *H. patens*, especialmente entre la hamelina, la palmirina, la pteropodina y la isopteropodina, Rf 0.61, 0.64, 0.71 y 0.77 respectivamente (**Tabla 11 y Fig. 38**). Ya que estos cuatro AOM presentaron valores de Rf muy cercanos o incluso iguales en el resto de las fases móviles evaluadas.



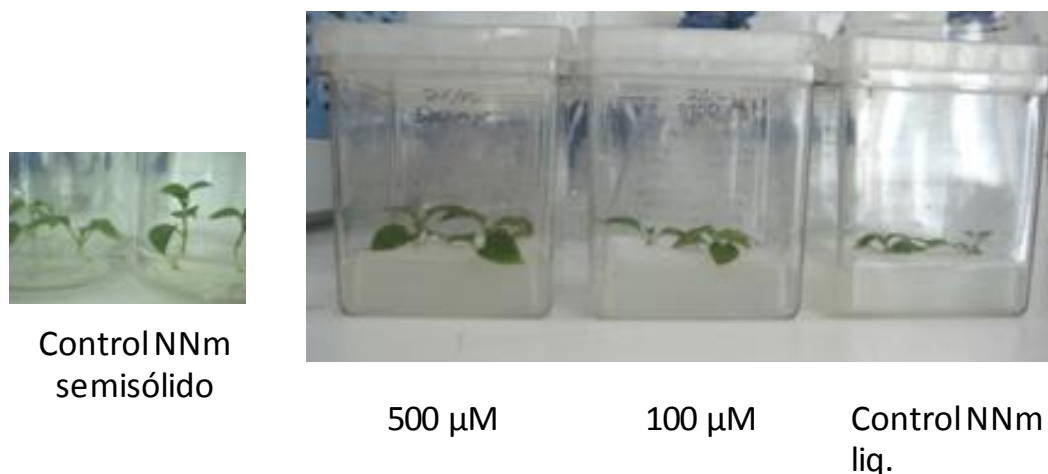
**Figura 38.** Separación por cromatografía en capa fina de alcaloides de plántulas de *Hamelia patens*. Placa de silicagel de 10x9 cm, fase móvil F13 y detección por UV a **A)** 254 nm y **B)** 366 nm. Donde se aplicaron las siguientes muestras: **1)** hoja, **2)** tallo, **3)** y raíz de plántula, **4)** mezcla de especiofilina, pteropodina, isopteropodina, **5)** hamelina al 60% **6)** palmirina, **7)** pteropodina, **8)** aricina al 80%, **9)** triptamina, **10)** isopteropodina, **11)** tetrahydroalstonina.

**Tabla 11.** Rf de los estándares en las placas de silicagel con la fase móvil F13.

Estándares	Rf
Triptamina	0.14
Especiofilina	0.33
Hamelina	0.61
Palmirina	0.64
Pteropodina	0.71
Isopteropodina	0.76
Aricina	0.77
N-oxido de aricina	0.80
Tetrahydroalstonina	0.84

### VI.11.2 Efecto de la adición de triptófano en plántulas de *H. patens*

Con la finalidad de seleccionar la concentración de triptófano que sin afectar negativamente el crecimiento de las plántulas micropropagadas de *H. patens* presente una mayor respuesta en la producción de alcaloides en las hojas y tallos, se adicionaron 100 y 500  $\mu\text{M}$  de triptófano (**Fig. 39**) al medio de cultivo líquido. Se encontró que las hojas de las plántulas presentaron un aumento de 1.6 veces en la producción de AOM con la adición de 500  $\mu\text{M}$  de triptófano (cold), (**Tabla 12**). Por otro lado, la adición de 100  $\mu\text{M}$  de triptófano no mostro aumento en la producción con respecto al control en medio NNm líquido. Una respuesta similar a la adición de triptófano se reporto en un cultivo de raíces en suspensión de *Cinchona ledgeriana* donde se aumento en 5 veces la producción de alcaloides de tipo quinolina con la adición de 500 mg/L de triptófano (**Hay et al. 1986**)



**Figura 39.** Plántulas de *H. patens* con adición de triptófano a los de 7 días de micropropagadas.

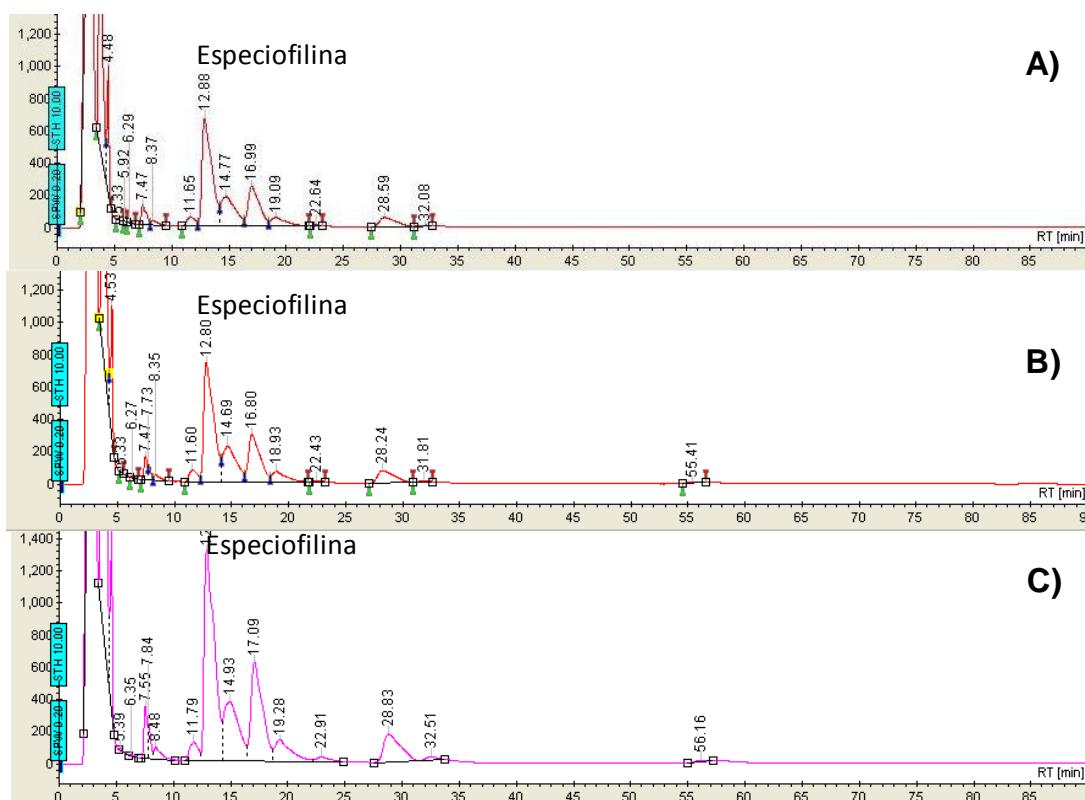
El perfil de producción de AOM en hojas de plántulas de *H. patens* con adición de triptófano (cold) se presentó definido, ya que se mantiene en la distribución y número de alcaloides, sin embargo, se encontró a la especiofilina como el AOM de mayor

producción en todos los casos, representando un 40% del total (Fig. 40). Además, en las hojas de las plántulas de *H. patens* con el tratamiento de 500  $\mu$ M de triptófano en medio líquido, la especiofilina presentó un aumento del 47%, de 10.9 mg/g P.S. en el control en medio líquido a 16 mg/g P.S. Este perfil presentó una gran ventaja para el análisis por TLC del experimento de adición de L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano, debido a que dio la posibilidad encontrar mayor incorporación en la especiofilina, que de acuerdo a la tabla 11 presenta un Rf de 0.33, en una zona de la placa de TLC que no presenta interferencia por cercanías en Rf con otros alcaloides producidos por las plántulas de *H. patens*. De esta forma la especiofilina puede ser fácilmente identificada frente a su estándar en la placa de TLC.

**Tabla 12.** Efecto de la adición de triptófano sobre la producción de alcaloides indol y oxindol-monoterpenicos (AIM y AOM), analizados por HPLC, en hojas y tallos de plántulas de *H. patens* a los 7 días de micropropagadas.

	AOM (mg/g P.S.)		AIM (mg/g P.S.)	
	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo
Control en medio semisólido <sup>+</sup>	31.75*	8.82*	16.21*	8.37*
Control en medio líquido	25.08*	11.72*	12.23*	30.13*
100 $\mu$ M de triptófano en medio líquido	19.19*	7.41*	8.73*	6.64*
500 $\mu$ M de triptófano en medio líquido	42.19*	6.45*	12.99*	15.02*

\*Las cuantificaciones representan la mezcla de las hojas o tallos de tres plántulas.

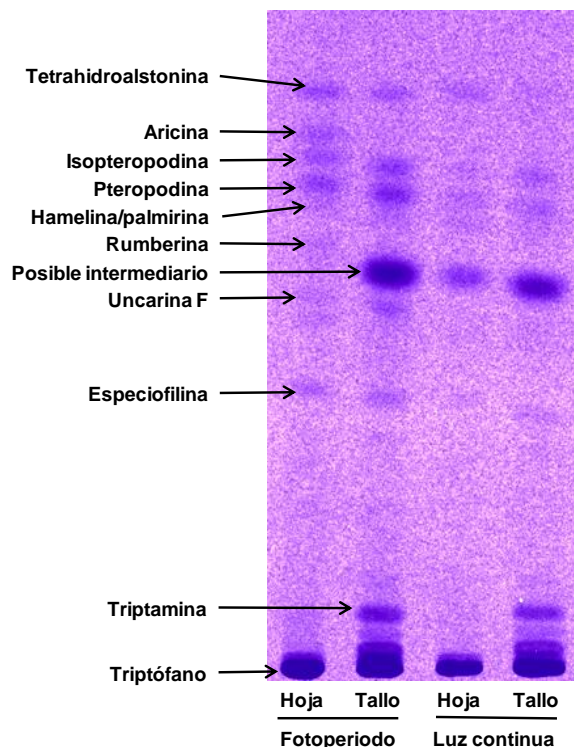


**Figura 40.** Cromatogramas del perfil de producción de AOM con la adición de triptófano en medio líquido NNm. Donde **A)** control sin triptófano, **B)** triptófano 100  $\mu\text{M}$  y **C)** triptófano 500  $\mu\text{M}$ . Especiofilina ( $T_r = 12.8$  en HPLC).

### VI.11.3 Incorporación de L-[3- $^{14}\text{C}$ ]-triptófano en AIM y AOM en plántulas de *H. patens* cultivadas en fotoperiodo y en luz continua

Con la finalidad de validar la biosíntesis de los AIM, AOM y AOM con mayor grado de oxidación a partir del precursor triptófano, se siguió la incorporación orgánica específica del precursor marcado radiactivamente en plántulas de *H. patens*. Se adicionó 500  $\mu\text{M}$  de triptófano, debido a que estimuló una mayor producción de AOM en las hojas (Tabla 12) y en especial una alta producción de especiofilina que presenta un  $R_f$  (0.33) (Tabla 11) en una región de la placa de TLC sin interferencias por la cercanía al  $R_f$  de otros alcaloides. Así mismo se utilizaron explantes meristematicos apicales sin raíces de plántulas micropropagadas, ya que se observó en un experimento previo muy poca incorporación al utilizar plántulas con raíces (Datos de anexos). Además, con el fin de

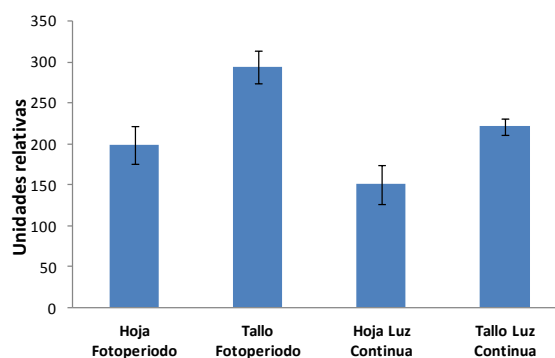
evaluar el efecto de la luz continua en la incorporación del precursor L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano, se utilizaron dos regímenes lumínicos; fotoperiodo y luz continua.



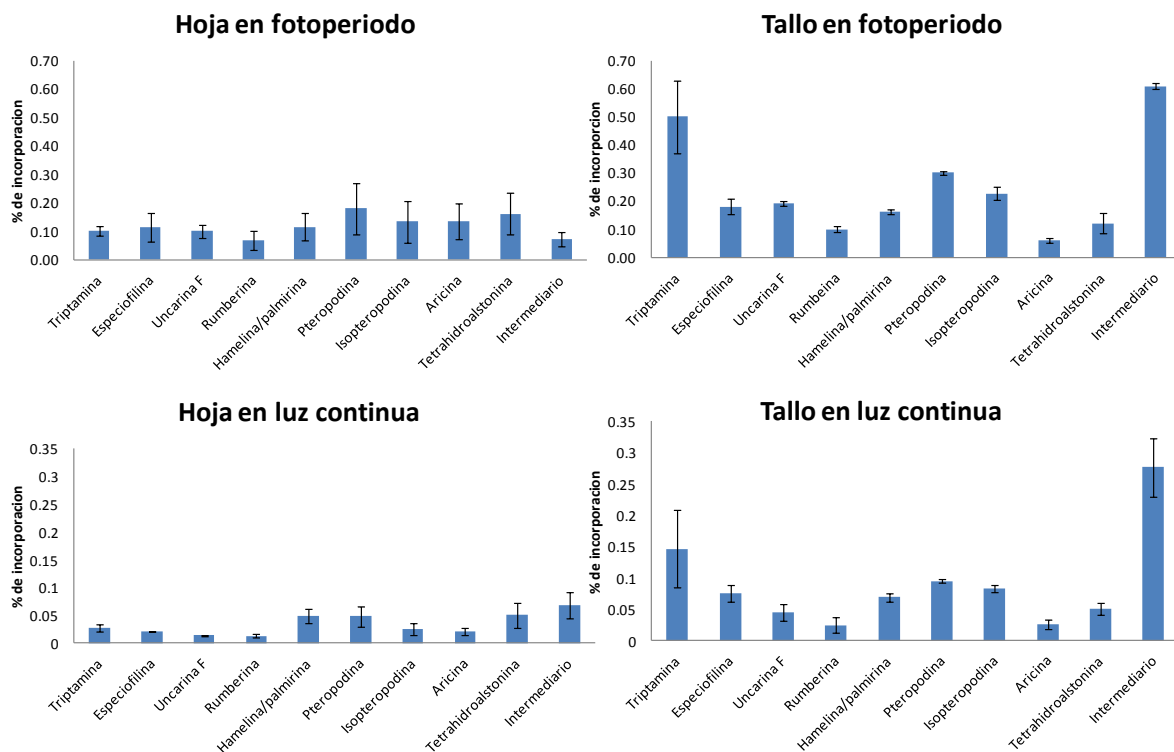
**Figura 41.** Separación por TLC de los AOM, AIM y triptamina con incorporación del L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano en extractos de hojas y tallos de plántulas de *H. patens*, obtenido por  $\beta$  escáner e identificados por su Rf ([Tabla 10](#)) y su señal al UV ([Fig. 38](#)).

En los tallos y en las hojas de plántulas *in vitro* de *H. patens* se validó la propuesta de que la biosíntesis de los AIM, de los AOM y los AOM más oxidados como la hamelina y la rumberina, se realiza a partir del precursor indólico triptófano, para lo cual se siguió la incorporación de la radiactividad del L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano en los AIM, AOM e intermediarios mostrados en la [Fig. 41](#) donde el triptófano queda en la línea base de la placa de TLC, mientras que los alcaloides son separados por la fase móvil F13 y quedan en sus correspondientes Rf ([Tabla 11](#)). Se encontró una mayor intensidad de incorporación del L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano en los tallos de las plántulas, tanto en fotoperiodo como en luz continua ([Fig. 42](#)). Además, con respecto al porcentaje de incorporación (en triptamina, intermediario, AIM y AOM), los tallos de las plántulas en fotoperiodo

presentaron 1.6 veces más incorporación que las hojas. Sin embargo, en luz continua fue semejante la incorporación de la marca radiactiva en AIM entre hojas y tallos. De la misma forma, se encontró que las partes aéreas de las plántulas (tallos y hojas) incubadas en fotoperiodo presentaron 32% más incorporación del precursor a los AOM, AIM y AT (Fig. 43). Las plántulas bajo la condición de fotoperiodo presentaron mayor incorporación en los AIM; aricina y tetrahydroalstonina de 4.1 y 2.8 veces más respectivamente con respecto a aquellas en luz continua (Fig. 43). De forma similar ocurrió con los AOM, por ejemplo el porcentaje de incorporación de la especiofilina en hoja y tallo en fotoperiodo fue 5.5 y 2.5 veces más que en luz continua (Fig. 43). Sin embargo, tanto en condiciones de fotoperiodo como de luz continua los tallos mostraron la mayor incorporación en los AOM; pteropodina, isopteropodina y especiofilina que en aquellos metoxilados o hidroxilados como hamelina, palmirina y rumberina. Los resultados sugieren que tanto los tallos como las hojas poseen la maquinaria biosintética para llegar hasta la biosíntesis de AOM.



**Figura 42.** Incorporación en tallo y hoja de L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano en plántulas de *H. patens*.



**Figura 43.** Porcentaje de incorporación de L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano en los alcaloides y un posible intermediario entre triptófano y los alcaloides de plántulas de *H. patens*, en unidades arbitrarias.

Se encontró incorporación en un compuesto con Rf=0.6 denominado "intermediario" el cual podría ser un compuesto cercano a triptamina ya que ambos presentaron porcentajes de incorporación similares principalmente en tallos (**Fig. 43**), además en un experimento previo también se encontró una fuerte incorporación en un compuesto que presentó el mismo Rf en hojas, tallos y raíces de las plántulas (**Datos anexos**), Cabe mencionar que en las raíces de las plántulas no se ha encontrado producción de AOM o AIM, en estas condiciones de cultivo, solo de AT. De manera similar se encontró una correspondencia entre el aumento en la incorporación en el intermediario y la triptamina con el aumento en la incorporación en alcaloides de tipo AIM y AOM.

La incorporación de la marca radiactiva tanto en AIM como en AOM ayuda a sustentar la propuesta de que la biosíntesis de los AOM en *H. patens*, se lleva a cabo a partir de los AIM, incluidos aquellos AOM con mayor grado de oxidación.

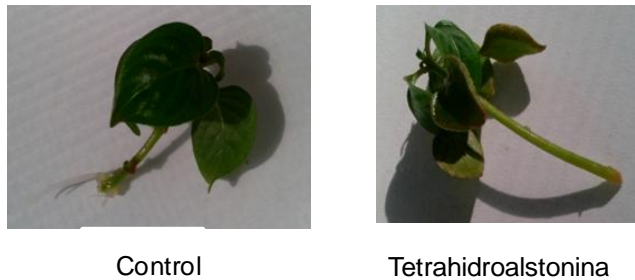


La luz es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero en alta intensidad, puede hacerse nociva. Si la energía lumínica absorbida que llega a los centros de reacción, excede la cantidad de energía que puede utilizarse, se pueden generar daños en el aparato fotosintético. En la fotoinhibición crónica, se pueden causar daños en los fotosistemas y esos daños conducen a un descenso tanto de la utilización de los quanta, como de la rata fotosintética. Este efecto permanece durante semanas (Casierra-Posada, 2007). En estas condiciones de fotoinhibición, se acentúa la competencia por el carbono, la asimilación de nitrato es inhibida y caen los niveles de aminoácidos. Así, en plantas silvestres de tabaco se encontró que la deficiencia de nitrógeno conduce a una disminución en el nivel de producción del alcaloide nicotina (que contiene nitrógeno), en contraste con un aumento de fenilpropanoides ricos en carbono (Fritz *et al.* 2006).

La menor incorporación de L-[3-<sup>14</sup>C]-triptófano en AOM y AIM en las hojas y tallos de plántulas bajo el régimen lumínico de luz continua a los 7 días de cultivo, podría ser un efecto temporal durante el proceso de adaptación del explante meristemático apical (del cual se partió) al régimen lumínico (de fotoperiodo a luz continua) y de intensidad lumínica ( $13.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $41.85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), debido a que en cultivos de 2 meses de plántulas *in vitro* de *H. patens* en luz continua (a  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se encontró un incremento de 2 veces en la producción de AOM en comparación con las crecidas en fotoperiodo (Fig. 32).

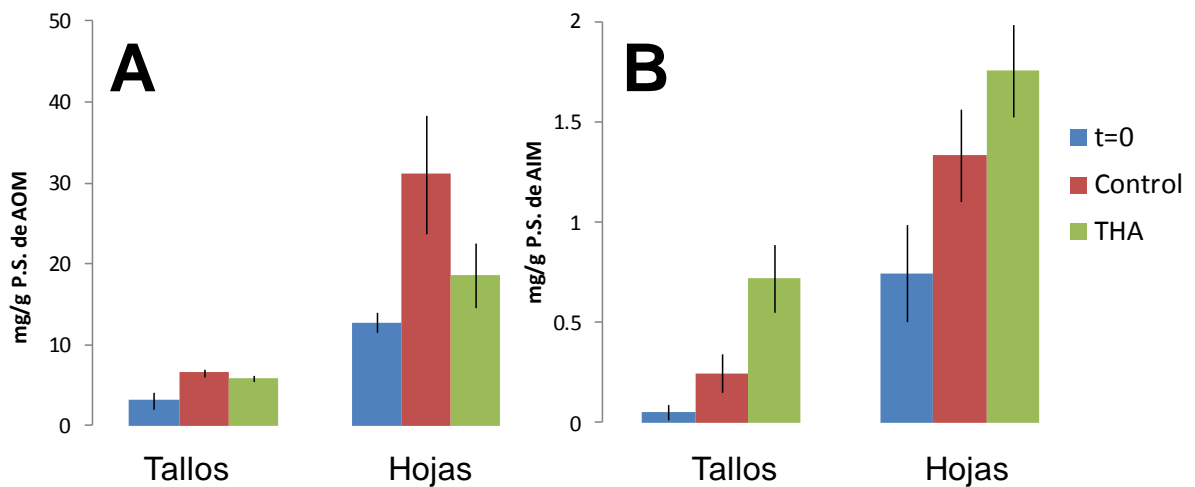
#### **VI.11.4 Biotransformación de tetrahydroalstonina en plántulas de *H. patens***

La adición de tetrahydroalstonina (THA) a  $150 \mu\text{M}$  al medio de cultivo NNm líquido resultó en la inhibición de la formación de raíces de los explantes de meristemas apicales (Fig. 44).



**Figura 44.** Diferencias morfológicas en plántulas de *H. patens* entre el **Control** y **Tetrahydroalstonina** a 150  $\mu$ M, a los 7 días la adición.

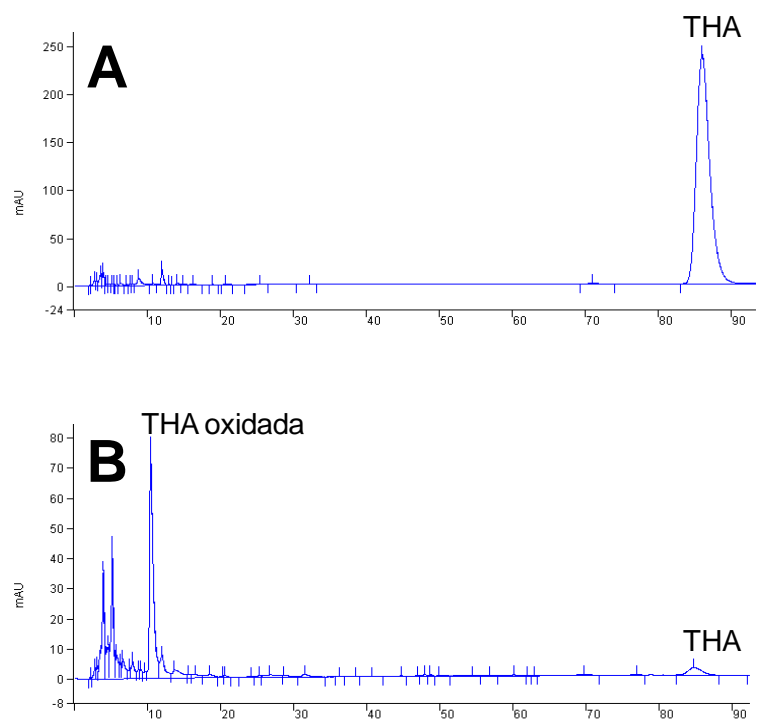
En la producción de AOM con el tratamiento de THA a 150  $\mu$ M se encontró una disminución, tanto en los tallos como en las hojas de las plántulas. Por otra parte, en los tallos de las plántulas se encontró un cambio en el perfil de producción de 2 AOM, la isopteropodina disminuyó de 32 a 18%, mientras que la hamelina aumentó de 11 a 20% del total de AOM, con respecto al control. Además, los AIM totales presentaron un aumento en los tallos de plántulas, sin embargo solo se produjeron 2 AIM, N-óxido de aricina y THA, donde el N-óxido de aricina no presentó un efecto en la producción de 0.2 mg/g P.S. y en contraste la THA aumentó de 7 veces con respecto al control, alcanzando los 0.5 mg/g P.S. (Fig. 45). Estos resultados muestran que parte de la tetrahydroalstonina adicionada fue capaz de incorporarse en el tallo de la plántula, pero aparentemente no logró biotransformarse eficientemente ni a AOM, ni a AIM debido a que no se observó un aumento en la producción total de estos compuestos, pero se presentó un cambio en el perfil de producción que incrementó la producción de un alcaloide con mayor grado de oxidación como lo es la hamelina, lo anterior puede estar generado como una respuesta al estrés producido por la concentración adicionada de THA, por lo que sería recomendable probar la adición de concentraciones menores de THA que además no inhiban la formación de raíces, para eliminar la posibilidad de daño fisiológico en los tejidos de la plántula.



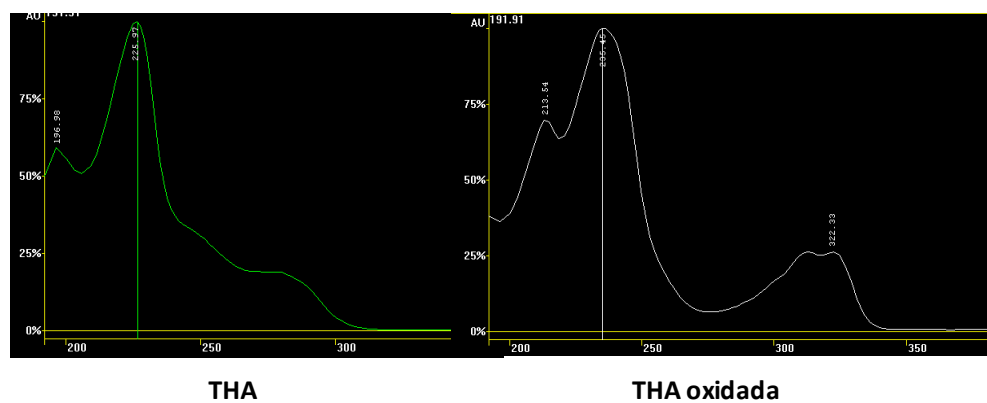
**Figura 45.** Producción de **A)** AOM y **B)** AIM en tallos y hojas de plántulas adicionadas con tetrahydroalstonina a 150 µM.

#### VI.11.5 Ensayo enzimático de tetrahydroalstonina con peroxidasa de rábano

Con la finalidad de tener un acercamiento a la acción de las peroxidasas en la oxidación de los AIM, se realizó un ensayo enzimático con tetrahydroalstonina y peroxidasa de rábano. Se encontró que la enzima peroxidasa de rábano fue capaz de oxidar un 95% de la THA adicionada como sustrato en el ensayo enzimático (Fig. 46), Sin embargo, el producto (THA oxidada) del ensayo enzimático presentó un espectro al UV que no correspondió al de los AOM (Fig. 47).



**Figura 46.** Cromatogramas del ensayo enzimático de peroxidasa de rábano con tetrahidroalstonina (THA) donde; **A)** Blanco de sustrato y **B)** Reacción enzimática. Se observa la desaparición de THA y la aparición de un pico con tiempo de retención 11 min.



**Figura 47.** Espectro UV a 244 nm de la THA y la THA oxidada por la peroxidasa de rábano.

## VI.12 Bioconversión *in vitro* de aricina en hamelina

Con el objeto de evaluar la biotransformación *in vitro* de un AIM por enzimas provenientes de las plántulas de *H. patens*, se realizó un ensayo enzimático donde se

utilizó el AIM metoxilado aricina como sustrato y un extracto crudo enzimático de plántulas completas de *H. patens*. Con este procedimiento se obtuvo un porcentaje de conversión de aricina en el AOM hamelina del 6.8%.

### **VI.13 Actividad antioxidante de extractos y estándares de *H. patens* por el método del DPPH**

Con la finalidad de conocer la actividad antioxidante de *H. patens*, se evaluaron extractos crudos de hojas silvestres y AIM (aricina) y AOM (rumberina) producidos por la planta.

Se obtuvieron los porcentajes de inhibición con respecto al DPPH para diferentes concentraciones del extracto metanólico, la fracción etanólica del extracto acuoso, la aricina y la rumberina (Tabla 13). El extracto metanólico a una concentración de 84.30 µg/mL presentó un porcentaje de inhibición del DPPH del 91.64% a los 19 min, el cual es comparable con el antioxidante ácido ascórbico que presentó el 54% a los 30 min con una concentración de 10 µg/mL (Ibarra *et al.* 2011). Se encontró que los extractos crudos presentaron una alta actividad antioxidante, esto puede deberse a la gran variedad de compuestos fenólicos que generalmente son arrastrados durante la preparación de los extractos crudos. En cuanto a los alcaloides puros se encontró que la rumberina a 153.6 µg/mL mostró un 88% de inhibición del radical DPPH a los 18 min, estos resultados son similares a los reportados en otro AOM, la pteropodina a 250 µg/mL con 90% de inhibición a los 10 min, a la misma concentración de DPPH (Paniagua-Pérez *et al.* 2009). Estos resultados dejan de manifestar la actividad antioxidante de los AOM con mayor grado de oxidación como el hidroxilado rumberina. Además, se encontró que el AIM aricina presentó menor actividad antioxidante que el AOM rumberina (Tabla 13).

Cuando las plantas son expuestas a algún factor de estrés que sobrepasa la respuesta basal de defensa antioxidante, se incrementa la formación de radicales libres en el organismo; a esto se denomina estrés oxidativo. Ante el estrés oxidativo, el organismo

debe responder con una defensa antioxidante extra, ya que el estrés oxidativo severo puede causar la muerte de la célula. El sistema antioxidante no enzimático está representado por compuestos fenólicos, alcaloides entre otros metabolitos secundarios, en cultivos *in vitro* de *U. tomentosa* se estableció que el aumento en la producción de AOM ocurre en respuesta al estallamiento oxidativo generado por mayores niveles de peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocado a su vez por el estrés hidrodinámico dentro del biorreactor (Trejo-Tapia *et al.*, 2007; Huerta-Heredia *et al.*, 2009).

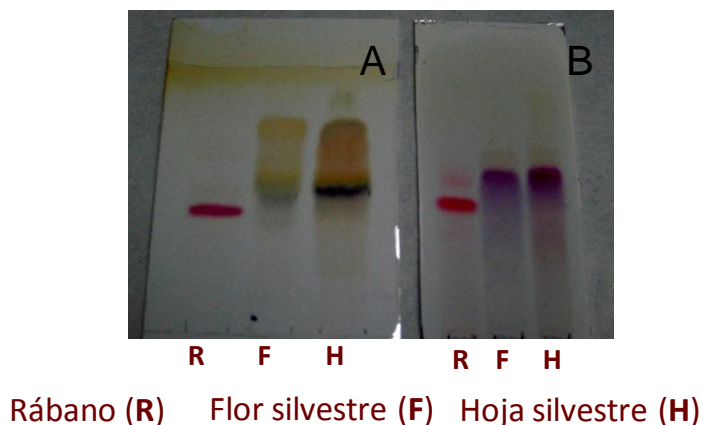
**Tabla 13.** Capacidad antioxidante por el método del DPPH de extractos crudos y alcaloides de *H. patens*.

Muestra	Tiempo (min)	Concentración (µg/mL)	% de inhibición
Extracto metanólico de hojas con peciolo de plantas de <i>H. patens</i>	57.0	16.80	47.73
	37.0	33.70	75.80
	19.0	84.30	91.64
Fracción etanólica del extracto acuoso de hojas con peciolo de <i>H. patens</i>	42.0	16.80	65.02
	38.0	23.00	75.68
	32.0	33.70	92.02
Aricina	37.0	191.2	61.2
	30.0	267.6	76.63
	24.0	458.8	81.68
Rumberina	22.0	76.8	83.9
	18.0	153.6	88.2
	9.5	460.8	91.2

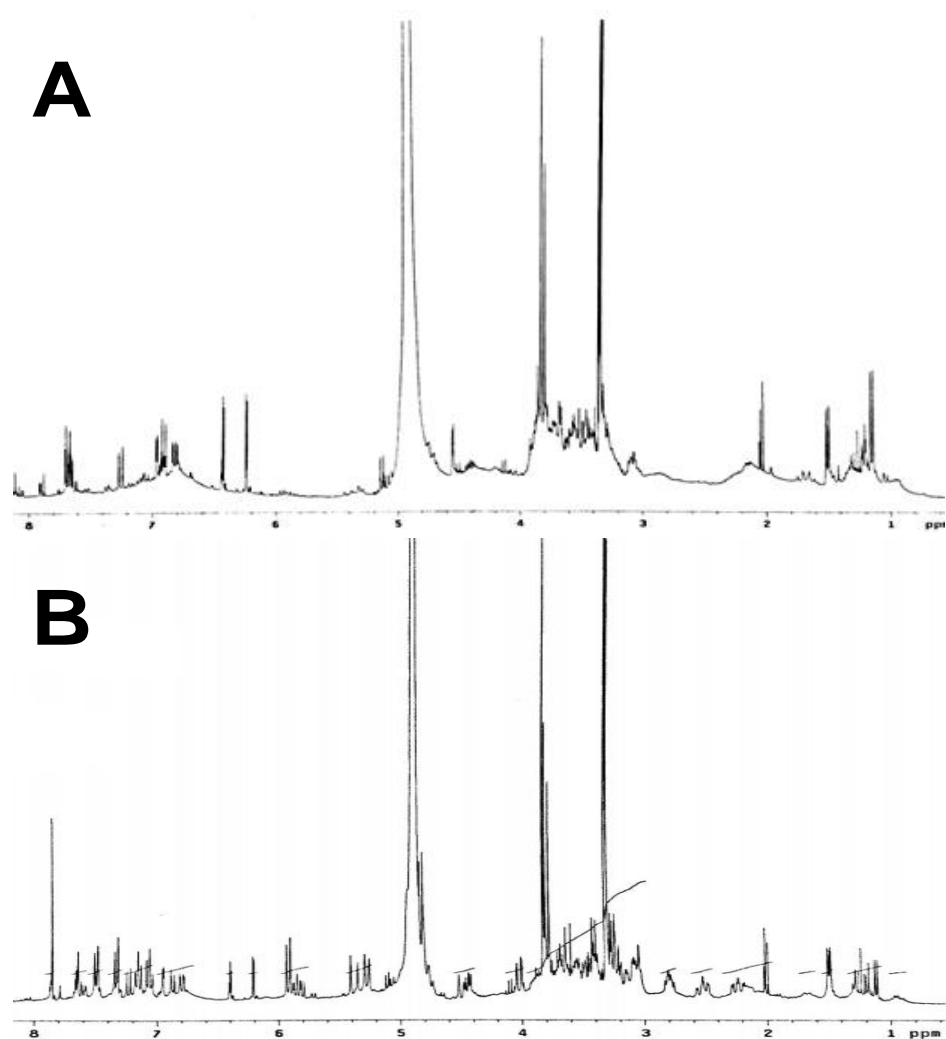
#### VI.14 Identificación de flavonoides en hojas y flores de *H. patens*

Con la finalidad de tener un acercamiento en la identificación de los compuestos responsables de la coloración roja de hojas y flores de *H. patens*. Se realizó un proceso de extracción dirigido a antocianinas, pero la gran cantidad de impurezas que se observan en cada uno de los extractos crudos hizo evidente la necesidad de utilizar un método de purificación.

El sistema de purificación en fase sólida C8 permitió separar, de los extractos crudos de hojas y flores, compuestos como azúcares y algunos compuestos fenólicos (Fig. 7). De esta forma se obtuvo la fracción de flavonoides de hojas y flores de *H. patens* con mayor grado de pureza, como se muestra en la Figura 48. Lo anterior permitió identificar por RMN las señales características de los flavonoides (Fig. 49).



**Figura 48.** Purificación de extractos crudos, donde; **A)** extractos crudos y **B)** extractos purificados por columna en fase sólida C8. Desarrollado en el sistema de TLC con placa FS y fase móvil I.



**Figura 49.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz de flavonoides aislados de **A)** hojas y **B)** flores silvestres de *H. patens*.

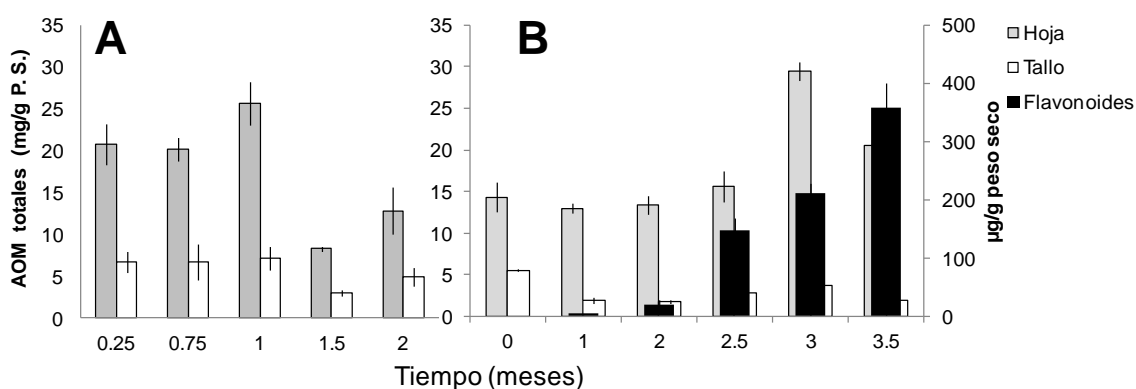
### **VI.15 Comparación de la cinética de producción de plántulas *in vitro* y en su adaptación a tierra de *H. patens***

Con la finalidad de conocer como se presenta la producción de AOM durante el crecimiento con respecto a otros metabolitos con actividad antioxidante en *H. patens*, se siguió la producción de flavonoides totales y carotenoides totales, además de clorofilas totales en plántulas micropropagadas *in vitro* durante 2 meses, seguida de su adaptación a tierra durante 3.5 meses. Así, se partió de explantes meristemáticos con dos pares de



hojas. La producción se evaluó en la parte aérea, en hojas (AOM, clorofilas, carotenoides y flavonoides) y en tallos (AOM) por separado.

La producción de AOM en los tallos de plántulas fue estable a lo largo de la cinética con aproximadamente 6 mg/g P.S. En el caso de las hojas se presentó un máximo de 25.6 mg/g P.S. al mes, seguido de una disminución hasta los 8.3 mg/g P.S. a los 1.5 meses (**Fig. 50**). Esto indica que la producción de AOM en *H. patens* tiene un máximo cuando el órgano es joven y posteriormente se tiende a una disminución en la producción cuando el tejido entra a otra etapa de crecimiento. Este comportamiento es similar al reportado en la cinética del cultivo de raíces de *Uncaria tomentosa*, donde la mayor producción de AOM se alcanzó a los 25 días, seguida de una disminución a los 30 días de cultivo ([Huerta-Heredia et al. 2009](#)). Además, en cultivo de plántulas micropropagadas de *U. tomentosa*, se encontró que la actividad máxima de la estrictosidina glucosidasa (segunda enzima clave en la biosíntesis de los AIM) se alcanza aproximadamente al primer mes de cultivo ([Vera-Reyes, 2013](#)).



**Figura 50.** Producción de antioxidantes en *H. patens*, donde; **A)** Producción de AOM en hojas y tallos en plántulas in vitro, **B)** Producción de AOM en hojas y tallos, y flavonoides en hojas de plántulas adaptadas a tierra.

Durante la adaptación de plántulas de dos meses a tierra se encontró que la producción de alcaloides AOM en tallos mostro una disminución con respecto a la producción del tallo en la plántula inoculo de 5 a 1.5 mg/g P.S. durante los 2 primeros meses. Por otro parte, la producción de de alcaloides AOM en hojas de plántulas durante la adaptación a tierra se mantuvo alrededor de los 15 mg/g P.S. hasta los 2.5 meses. Sin embargo, al tercer mes de crecimiento se observo un aumento de 2 veces en la producción de AOM, (**Fig. 50**). Además se encontró un aumento creciente en la producción de flavonoides a partir de primer mes, alcanzando su máximo a los 3.5 meses con 360 µg/g P.S. y en este punto aparentemente regresa el nivel de producción de AOM al nivel mostrado durante los primeros 2.5 meses (**Fig. 50**). Este comportamiento entre compuestos con el anillo indólico y fenolicos coincide con lo reportado por [Grambow y Langenbeck-Schwich en 1983](#), en ensayos con peroxidasa de rábano se encontró que con la presencia de compuestos fenólicos se cataliza la degradación del acido indol-3-acetico (IAA) resultando en la formación del indol-3-metanol (IM) o en la formación de 3-hydroximetiloxindol (HMOx) en ausencia de compuestos fenólicos, por lo que sugirieron que la función de la “ruta oxindol” puede actuar como detoxificante del exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ausencia de cosustratos fenólicos.

## VII CONCLUSIONES

En *H. patens* los alcaloides oxindol-monoterpenicos, incluidos los metoxilados e hidroxilados, son bisintetizados a partir de los alcaloides indol-monoterpenicos y su produccion es influida por factores de estrés biótico y abiotico.

La planta *Hamelia patens* presenta un balance en la produccion de antioxidantes no enzmaticos entre alcaloides oxindol-monoterpenicos y flavonoides.

## VIII RECOMENDACIONES

- Investigar propiedades farmacológicas de la hamelina (10-metoxipteropodina).
- Validar enzimáticamente la ruta biosintética propuesta en este trabajo.
- Estudiar la función de los *N*-óxidos de alcaloides en la planta.

## IX REFERENCIAS

Abenavoli, M.R., Pennisi, A.M. (1998) The effect of pvp on chestnut callus formation. *Acta Hort. (ISHS)* **457**: 17-20.

Abd El-Samad H.M., Shaddad M.A.K. (1997) Salt tolerance of soybean cultivars. *Biol Plant.* **39**: 263-269.

Aguilar J.L., Rojas P., Marcelo A., Plaza A., Bauer R., Reininger E., Klaas C.A., Merfort I. (2002) Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **81**: 271-276.

Ahmad P., Jaleel C. A., Salem M. A., Nabi G., Sharma S. (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol.* **30**: 161-75.

Almagro L., Ros L.V.G., Belchi-Navarro S., Bru R., Barceló A.R., Pedreño M.A. (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot.* **60**:377-390.

Apel K., Hirt H. Klaus (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373-399.

Aquino R., Ciavatta M.L., De Simone F., Pizza C. (1990) A flavanone glycoside from *Hamelia patens*. *Phytochemistry* **29**: 2359–2360.

Arnaldos T.L., Muñoz R., Ferrer M.A., Calderón A.A. (2001) Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria xananassa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiol Plant.* **113**:315-322.

Arias-Adams A., Lee E.F., Mabry T.J. (1989) HPLC Study of oxindole alkaloids from *Hamelia patens*. *Rev Latinoamer Quim.* **20**: 71-72.

Asada K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* **141**: 391-396.

Aziz A., Gauthier A., Bézier A., Poinssot B., Joubert J-M., Pugin A., Heyraud A., Baillieul F. (2007) Elicitor and resistance-inducing activities of  $\beta$ -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with  $\beta$ -1,3 glucans and  $\alpha$ -1,4 oligogalacturonides. *J Exp Bot.* **58**: 1463–1472.

Borges del Castillo J., Manresa-Ferrero M.T., Martin-Ramon J. L., Pascual C., Rumbero A. (1979) Two new oxindole alkaloids isolated from *Hamelia patens*. *Tetrahedron Lett.* **34**: 3197-3200.

Borges del Castillo J., Manresa-Ferrero M.T., Martin-Ramon J.L., Rodriguez-Luis F., Vazquez-Bueno P. (1980) Two new oxindole alkaloids from the *Hamelia patens* jacq. *An. Quim. Ser. C.* **76**: 294-295.

Borges del Castillo J., Manresa-Ferrero M.T., Rodriguez-Luis F. (1981) Oxindole alkaloids from *Hamelia patens* jacq. In: Atanasova B, ed. Proc. 1<sup>st</sup> Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod. **3**: 70-73.

Borges del Castillo J., Manresa-Ferrero M.T., Martin-Ramon J. L., Rodriguez-Luis F., Vazquez-Bueno P., Joseph-Nathan P. (1982) Study of oxindole alkaloids from *Hamelia patens* Jacq. by carbon-13 NMR. *An. Quim. Ser. C.* **78**: 126-128.

Brachet J., Cosson L. (1986) Changes in the total alkaloid content *Datura innoxia* Mill subjected to salt stress. *J Experental Bot.* **37**: 650-656.

Burlat V., Oudin A., Courtois M., Rideau M., St-Pierre B. (2004) Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant J.* **38**: 131-141.

De Carolis E., De Luca V. (1993) Purification, characterization, and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus*. J Biol Chem. **268**: 5504-5511.

Casierra-Posada, (2007) Fotoinhibición, respuesta fisiológica de los estres vegetales por exeso de luz. Rev Colomb Cienc Hort. **1**:114-123.

Chanc I.K., Foy C.L. (1983) Rapid growth responses of dwarf corn coleoptile sections to picloram. Pest Biochem Physiol. **19**: 203-209.

Chaudhuri P.K., Thakur R.S. (1991) *Hamelia patens*: A new source of ephedrine. Planta Med. **57**: 199.

Chibu H., Shibayama H. (2001) Effects of chitosan applications on the growth of several crops, En: Uragami T., Kurita K., Fukamizo T. (Eds.). Chitin and Chitosan in Life Science. Yamaguchi. pp. 235–239.

Chou W.M., Kutchan T.M. (1998) Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids. J. Plant. **15**: 289-300.

Contin, A., Van der Heijden R., Lefeber W.M., Verpoorte R. (1998). The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. FEBS Lett. **434**:413-418

Creelman R.A., Mullet J.E. (1997) Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, Ddevelopment, and gene expression. Plant Cell. **9**: 1211-1223.

Croat T.B. (1978) Flora of Barro Colorado Island. Standford University Press, Standford, pp 809.

Daneshmand F., Arvin M.J., Kalantari K.M. (2010) Acetylsalicylic acid (Aspirin) induces salinity and osmotic tolerance in *Solanum acaule* *in vitro*. Agrochimica. **50**: 79-93.

De Gara L. (2004) Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochem Rev.* **3**: 195-205.

De Luca V., Laflamme P. (2001) The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* **4**:225–233.

Ehmke A., von Borstel K., Hartmann, T. (1998) Alkaloid *N*-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta* **176**: 83-90.

Elias T.S. (1976) A monograph of the genus *Hamelia* (*Rubiaceae*). *Memoirs of the New York Botanical Garden* **26**: 81-144.

Esposito-Avella M., Brown P., Tejeira I., Buitrago R., Barrios L., Sanchez C: Gupta M.P., Cedeno J. (1985) Pharmacological screening of panamanian medicinal plants. part 1. *Int J Crude Drug Res.* **23**: 17-25.

Fraser R.S.S., Loening U.E., Yeoman M.M. (1967) Effect of Light on Cell Division in Plant Tissue Cultures, *Nature* **215**: 873.

Fritz C., Palacios-Rojas N., Feil R., Stitt M. (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **46**: 533–548.

Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**:151-158.



Geerlings A, Ibanez MM, Memelink J, van Der Heijden R, Verpoorte R. (2000). Molecular cloning and analysis of strictosidine beta-D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. J Biol Chem. **275**: 3051-3056.

Grambow H.J., Langenbeck-Schwich B. (1983) The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. Planta **157**: 131-137.

Hahn M.G., Darvill A.G., Albersheim P. (1981) Host-Pathogen Interactions, XIX The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. Plant Physiol. **68**: 1161-1169.

Hay C.A., Anderson L.A., Roberts M.F., Phillipson J.D. (1986) *In vitro* cultures of *Cinchona* species, Plant Cell Rep. **5**: 1-4.

Hématy K., Cherk C., Somerville S. (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. Curr Opin Plant Biol. **12**: 406-413.

Henriques A.T., Lopes S.O., Paranhos J.T., Gregianini T.S., Von Poser G.L., Fett-Neto A.G., Schripsema J. (2004) N, $\beta$ -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. Phytochemistry **65**: 449-454.

Hirano S.A. (1997) Applications of chitin and chitosan in the ecological and environmental fields. En: Goosen MFA. Ed. Technomic. Lancaster. pp.31-54.

Huerta-Heredia A., Palestino-Arellano S., Paniagua-Vega D., Ramos-Valdívía A. (2006) Influencia de la concentración de sacarosa en la producción de alcaloides oxindólicos en cultivo de raíces de *Uncaria tomentosa*. En el V Encuentro nacional de biotecnología. México D.F.

Huerta-Heredia A.A., Marin-Lopez R., Ponce-Noyola T., Cerda-Garcia-Rojas C.M., Trejo-Tapia G.,

Ramos-Valdivia A.C. (2009) Oxidative stress induces alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root and cell cultures in bioreactors. *Eng. Life Sci.* **9**: 211–218.

Huerta-Heredia A.A. (2010) Eventos bioquímicos del estallamiento oxidativo inducido por estrés y su relación con la producción de alcaloides indol terpénicos en cultivo de raíces de *U. tomentosa*. Tesis de doctorado. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Cinvestav-IPN. México D. F.

Hussain Md.S., Fareed S., Ansari S., Rahman Md.A., Ahmad I.Z., Saeed M. (2012) Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.* **4**: 10–20.

Ibarra E.M., Pacheco S.M., García M.R., San Miguel C.R., Ramírez V.G., Soto H.R.M. (2011) Antioxidant activity of *Erythrina americana* miller alkaloids. *Rev. Fitotec. Mex.* **34**: 241-246.

Ireland C.R. (1984) The level and distribution of phenolic plant grow inhibitors in yam tubers during dormancy. *New Phytol.* **97**: 233-242.

Irmeler L.S., Schroder L.G., St-Pierre B., Crouch N.P., Hotzel M., Schmidt J., Strack D., Matern U., Schroder J. (2000) Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identifications of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J.* **24**: 797-804.

Izquierdo O. H. (2009) Los oligogalacturónidos de origen péctico y su acción en las plantas. *Temas de Ciencia y Tecnología.* **13**: 31–40.

Jaleel C.A., Manivannan P., Sankar B., Kishorekumar A., Panneerselvam R. (2007) Calcium chloride effects on salinity-induced oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. *Pharmacol Toxicol.* **330**: 674–683.

Jaleel C.A., Gopi R., Manivannan P., Panneerselvam R. (2008) Exogenous application of triadimefon affects the antioxidant defense system of *Withania somnifera* Dunal. *Pestic Biochem Phys.* **91**: 170-174.

Jansen M.A.K., Van den Noort R.E., Tan M.Y., Prinsen E., Lagrimini L.M., Thorneley R.N. (2001) Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol.* **126**: 1012-1023.

Jimenez-Misas, C.A., Rojas-Hernandez, N.M., Lopez-Abraham A.M. (1979) Biological evaluation of Cuban plants VI. *Rev. Cubana Med Trop.* **31**: 45-51.

Kaida R., Sugawara S., Negoro K., Maki H., Hayashi T., Kaneko T.S. (2010) Acceleration of cell growth by xyloglucan oligosaccharides in suspension-cultured tobacco cells. *Molecular Plant* **3**: 549-554.

Keplinger K., Laus G., Wurm M., Dierich M.P., Teppner H. (1999) *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. – ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J. Ethnopharmacol.* **64**:23-24.

Keplinger D., Keplinger K., Laus G. Process for the production of specific isomer mixtures from oxindole alkaloids. U. S. Patent 5,723,625, Mar 3, 1998.

Kefford N.P., Caso O.H. (1966) A potent auxin with unique chemical structure -4-amino-3,5,6trichloropicolinic acid. *Bot Gaz.* **127**: 159-163.

Kim H.K., Choi Y. H., Verpoorte R. (2006) Metabolomic analysis of *Catharanthus roseus* using NMR and principal component analysis, In: Nagata T., Lörz H., Wildholm J. M. (eds.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 57. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, pp 243-260.

Laus G., Brössner D., Senn G., Wurst K. (1996) Analysis of the kinetics of isomerization of spiro oxindole alkaloids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2**: 1931-1936.

Lemaire I., Assinewe V., Cano P., Awang D.V., Arnason J.T. (1999) Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa*. J. Ethnopharmacol. **64**:109-115.

Leonti M., Ramirez R.F., Sticher O., Heinrich M. (2003) Medicinal flora of the popoluca, México: a botanical systematical perspective. Econ Bot. **57**: 218-230.

Levinsh G. (2006) Biological basis of biological diversity: physiological adaptations of plants to heterogeneous habitats along a sea coast. Acta Univ Latv. **710**: 53–79.

Liu Y., Zhao D-M., Zu Y-G., Tang Z-H, Zhang Z-H. ,Jiang Y., Shi D-Y. (2011) Effects of low light on terpenoid indole alkaloid accumulation and related biosynthetic pathway gene expression in leaves of *Catharanthus roseus* seedlings. Bot Stud. **52**: 191-196.

Lopez-Abraham A.M., Rojas-Hernandez N.M., Jimenez-Misas C.A., (1979) Plant extracts with cytostatic properties growing in Cuba II. Rev. Cubana Med. Trop. **21**: 105-11.

Lopez-Abraham A.M., Rojas-Hernandez N.M., Jimenez-Misas C.A., (1981) Potential antineoplastic activity of Cuban plants IV. Rev Cubana Farm. **15**: 71-77.

Luna-Palencia G.R., Cerda-García-Rojas C.M., Rodríguez-Monroy M., Ramos-Valdivia A.C. (2005). Influence of auxins and sucrose in monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* cell suspension cultures. Biotechnol Progr. **21**: 198-204.

Luna-Palencia G.R., Cerda García-Rojas C.M., Romo-Cruz Albarrán, J.G. Ramos-Valdivia A.C. (2006). Advances in the biosynthesis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* cultures. Inter. Symp. Chemistry, Pharmacology and Biosynthesis of Alkaloids, Phytochem. Soc. Europe. Antalya, Turkey.

Luna-Palencia G.R., Cerda García-Rojas C.M., Huerta-Heredia A.A., Ramos-Valdivia, A.C. (2013) Differential alkaloid profile in *Uncaria tomentosa* micropropagated plantlets and root cultures.

Biotechnol Lett. **35**:791–797.

Madyastha K.M., Meehan T. D., Cosci C.J. (1976) Characterization of a Cytochrome P-450 dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant *Vinca rosea*. *Biochemistry* **15**: 1097-1002.

Mahajan S., Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys.* **444**: 139-158.

Mahmood N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A., Hay A.J. (1993) Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antiviral Res.* **22**: 189-199.

Martínez J.A., Durand E., Viamontes A.J., Montero O., Forte A., Moya A.D. (1996) Alkaloids of *Hamelia patens* growing in Cuba. *Rev Cubana Quim.* **8**: 75-79.

Matkowski A. (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - a review. *Biotechnol Adv.* **26**:5485-60.

Mena-Rejon G., Caamal-Fuentes E., Cantillo-Ciau Z., Cedillo-Rivera R., Flores-Guido J., Mooc-Puc R. (2009) In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional. *J. Ethnopharmacol.* **121**: 462-465.

Miranda-Ham M. de L., Islas-Flores I., Vázquez-Flota F. (2007) Accumulation of monoterpenoid indole alkaloids in periwinkle seedlings (*Catharanthus roseus*) as a model for the study of plant–environment interactions. *BAMBED* **35**: 206-210.

Moller I.M, Sweetlove L.J. (2010) ROS signaling- specificity is required. *Trends Plant Sci.* **15**: 370-374.

Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

Nitsch J.P., Nitsch C. (1969). Haploids plants from pollen grains. *Science*. **163**: 85-87.

Noctor G., Arisi A-C. M., Jouanin L., Kunert K.J., Rennenberg H., Foyer C.H. (1988) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot*. **49**: 623–647.

O'Connor S.E. y Maresh J.J. (2006) Chemistry and biology of monoterene indole alkaloid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep*. **23**: 532-547.

Paniagua-Pérez R., Madrigal-Bujaidar E., Reyes-Cadena S., Molina-Jasso D. (2005) Genotoxic and cytotoxic studies of beta-sitosterol and pteropodine in mouse. *J. Biomed. Biotechnol*. **3**: 242-247.

Paniagua-Pérez R., Madrigal-Bujaidar E., Molina-Jasso D., Reyes-Cadena S., Álvarez-González I., Sánchez-Chapul L., Pérez-Gallaga J. (2009) Antigenotoxic, antioxidant and lymphocyte induction effects produced by pteropodine. *BCPT*. **104**, 222–227.

Paniagua-Vega D. (2007) Distribución y biosíntesis de alcaloides indólicos en plantas micro-propagadas y cultivo de raíces de *Hamelia patens*. Tesis de Maestría: Cinvestav-IPN. México D. F.

Paniagua-Vega D., Cerda-García-Rojas C.M., Ramos-Valdivia A.C. (2009) Elicitación biótica de un cultivo de raíces de *Hamelia patens*. XIII congreso nacional de biotecnología y bioingeniería. Acapulco México.

Paniagua-Vega D., Cerda-García-Rojas C.M., Ramos-Valdivia A.C. (2012) Establecimiento de cultivos *in vitro* de plántulas, raíces, callos y células de *Hamelia Patens*. X simposio internacional de Biotecnología Vegetal. Callo Santa María, Cuba.

Paniagua-Vega D., Cerda-García-Rojas C.M., Ponce-Noyola T., Ramos-Valdivia A.C.. (2012) A new monoterpenoid oxindole alkaloid from *Hamelia patens* micropropagated plantlets. *Nat Prod Commun.* **7**: 1441-1444.

Pennings E.J.M., Bosch R.A., vd Heijden R., Stevens L.H., Duine J.A., Verpoorte R. (1982). Assay of strictosidine synthase from plant cell cultures by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* **176**: 412-415.

Papadimitriou E.K. (2009) Hydrolysis of organic matter during autoclaving of commingled household waste. *Waste Manage.* **30**: 572–582.

Parida A.K., Das A.B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox Environ Safe.* **60**: 324–349.

Peterson G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356.

Pilarski R., Zielinski H., Ciesiołka D., Gulewicz K. (2006) Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J Ethnopharmacol.* **104**: 18–23.

Raina S.K., Wankhede D.P., Jaggi M., Singh P., Jalmi S.K., Raghuram B., Sheikh A.H., Sinha A.K. (2012) CrMPK3, a mitogen activated protein kinase from *Catharanthus roseus* and its possible role in stress induced biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids. *BMC Plant Biol.* **12**: 134-146.

Ramani S., Jayabaskaran C. (2008) Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *J Mol Signal.* **3**: 9.

Ramos-Valdivia A.C., Cerda García Rojas C. (2007) Interrelaciones metabólicas en la producción de alcaloides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* de la célula al biorreactor. XII Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular, 11-15 Noviembre, Boca del Río, Veracruz, México.

Ramos-Valdivia A.C., Huerta-Heredia A. Gabriela Trejo-Tapia Cerda-García R.C.M. (2012) Secondary metabolites as non-enzymatic plant protectors from oxidative stress (capítulo 14). En oxidative stress in plants causes, consequences and tolerance. Eds. Anjum N.A., Umar S., Ahmad A. Ed. I.K. International publishi House. New Delhi. pp 545.

Raskin I., Ribnicky D., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N. ET. AL. (2002) Plants and human health in the twenty-first century. Trends Biotechnol. **20**: 522-531.

Reyes-Chilpa R., Rivera J., Oropeza M., Mendoza P., Amekraz B., Jankowski C., Campos M. (2004) Methanol extracts of *Hamelia patens* containing oxindole alkaloids relax KCl-induced contraction in rat myometrium. Biol Pharm Bull. **27**: 1617-1620.

Ripperger H., 1977. Isolation of isopteropodin from *Hamelia patens*. Pharmazie **32**: 415–416.

Riva L., Coradini D., Di Fronzo G. (2001) The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. Anticancer Res. **21**:2457-2461.

Rohmer M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. Nat. Prod. Rep.**16**: 565–574.

Roja G. (2008) Micropropagation and production of camptothecin from *in vitro* plants of *Ophiorrhiza rugosa* var. *decumbens*. Natural Product Research, **22**: 1017-1023.

Roy S.C., Sarkar A. (1991) In vitro regeneration and micro propagation of *Aloe vera*, Scientia Horticulturae, **47**: 107-114.

Roytrakul S., Verpoorte R. (2007) Role of vacuolar transporter proteins in plant secondary metabolism: *Catharanthus roseus* cell culture. Phytochem Rev. **6**: 383-396.



Santos-Mendoza Y. (2010) Regulación de la biosíntesis de alcaloides indol-terpénicos por jasmonatos en cultivos de raíces de *Uncaria tomentosa*. Tesis de Maestría: Departamento de Biotecnología. Cinvestav-IPN, México, D. F.

Schröder G., Unterbusch E., Kaltenbach M., Schmidt J., Strack D., De Luca V., Schröder J. (1999) Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. FEBS Lett. **458**:97-102.

Schutt B.D., Abraham M.A. (2004) Evaluation of a monolith reactor for the catalytic wet oxidation of cellulose. Chem Eng J. **103**: 77–88.

Shellard E.J., Houghton P.J. (1974). The *Mitragyna* species of Asia. Part XXVI. Further “in vivo” studies using <sup>14</sup>C-alkaloids, in the alkaloidal pattern in young plants of *Mitragyna parvifolia* (Roxb.) Korth grown from seed obtained from Sri Lanka (Ceylon). Planta Med. **25**: 80-87.

Shellard E.J., Phillipson J.D., Gupta, D. (1969). The *Mitragyna* species of Asia. Part XXVI. The alkaloid from bark of *Mitragyna parvifolia* (Roxb.) Korth and possible biogenetic route for oxindole alkaloids. Planta Med. **17**: 146- 216.

Somerville C. (2006) Cellulose synthesis in higher plants. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **22**: 53–78.

Sosa S., Balick M.J., Arvigo R., Esposito R.G., Pizza C., Altieri G., Tubaro A. (2002) Screening of the topical anti-inflammatory activity of some central american plants. J Ethnopharmacol. **81**: 211-5.

Sottomayor M., Barceló R.A. (2003) Peroxidase from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and the biosynthesis of alpha-3',4'-anhydrovinblastine: a specific role for a multifunctional enzyme. Protoplasma **222**: 97-105.

Sottomayor M., Duarte P., Figueiredo R., Barceló A.R. (2008) A vacuolar class III peroxidase and the

metabolism of anticancer indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant Signal Behav.* **3**: 899-901.

St-Pierre B., De Luca V. (1995) A cytochrome P-450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **109**: 131-139.

Stevens LH, Schripsema J, Pennings EJM, Verpoorte R. (1992). Activities of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in suspension cultures of *Catharanthus*, *Cinchona* and *Tabernaemontana* species. *Plant Physiology Biochem.* **30**: 675–681.

Svendsen A.B, Verpoorte R. (1983) Chromatography of alkaloids Part A: Thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography Library*, Vol. 23, Part A, Ed. ELSEVIER. Amsterdam-Oxford-New York. pp 3-534.

Suárez A.I., Diaz B., Tillett S., Valdivieso B.E., Compagnone R.S. (2008) Leishmanicidal activity of alkaloids from *Hamelia patens*. *Ciencia* **16**: 148-155.

Šutković J., Ler D., Abdelgawwad M.R. (2011) In vitro production of solasodine alkaloid in *Solanum nigrum* under salinity stress. *J Phytol.* **3**: 43-49.

Szabó L.F. (2008) Rigorous biogenetic network for a group of indole alkaloids derived from strictosidine. *Molecules.* **13**: 1875-1896.

Tang Z., Yang L., Zu Y., Guo X. (2009) Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Growth Regul.* **57**:15-20.

Tan S.H., Musa R., Ariff A., Maziah M. (2010) Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga (*Centella asiatica* L. urban). *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **6**: 284-299.

Thomas S.E. (1976) A monograph of the genus *Hamelia* (*Rubiaceae*), New York Botanical Garden,

Memoirs of the New York Botanical Garden v. **26**, num. 4, pp 100-105.

Thompson W.F., White M.J. (1991) Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Annu Rev Plant Phys.* **42**: 423-466.

Tiwari K.P., Rathore Y.K.S., Tripathi R.D. (1978) Flavonoids from flowers of *Hamellia patensa*.

Trejo-Tapia G., Sepúlveda-Jiménez G., Trejo-Espino J.L., Cerda-García-Rojas C.M., de la Torre M., Rodríguez-Monroy M., Ramos-Valdivia A. C. (2007). Hydrodynamic stress induces monoterpene oxidole alkaloid accumulation by *Uncaria tomentosa* (Wild) D.C. Cell suspension cultures via oxidative burst. *Biotechnol Bioeng.* **98**: 230-238.

Valenzuela-Galván D., Mariano N.A., Osorio-Berinstain M., Urbina F. (2006) First record of the sparkling-tailed hummingbird (*Tilmatura du pontii*, Trochilidae) for Sierra de Huatla biosphere reserve, Morelos, Mexico. *HUITZIL* **7**: 15-17.

Vera-Reyes Ileana (2013) Caracterización de la estrictosidina  $\beta$ -glucosidasa y su papel en la biosíntesis de alcaloides indol-terpénicos en cultivos de *Uncaria tomentosa*. Tesis de Doctorado: Departamento de Biotecnología. Cinvestav-IPN, México, D. F.

Verma P., Mathur A. K., Srivastava A., Mathur A. (2012) Emerging trends in research on spatial and temporal organization of terpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*: a literature update. *Protoplasma* **249**: 255–268.

Wanichpongpan P., Suriyachan K., Chandkrachang S. (2001) Effects of chitosan on the growth of Gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*). En: T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Eds.), Chitin y Chitosan in Life Science. Yamaguchi. pp. 198–201.

Wagner H., Kreutzkamp B., Jurcic K. (1985) Alkaloids from *Uncaria tomentosa* and their phagocytosis enhancement effect. *Plant. Med.* **5**: 419:423.

Walton N.J., Skinner S.E., Robins R.J., Rhodes M.J. (1987) A spectrophotometric assay for strictosidine synthase. *Anal Biochem.* **163**: 482-488.

Wang J.Y., Liu Z.P., Liu L., Liu C. (2008) Effects of NaCl on the growth and alkaloid content of *Catharanthus roseus* seedlings. *J applied Ecol.* **19**: 2143-2148.

Wink M. (2008). Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Nat Prod Commun.* **3**: 1205-1216.

Ximenes V.F., Campa A., Catalani L.H. (2001) The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent. *Arch Biochem Biophys.* **387**: 173-179.

Yamasaki H., Sakihama Y., Ikehara N. (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* **115**:1405-1412.

Yang L., Stöckigt J. (2010) Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. *Nat Prod Rep.* **27**: 1469–1479.

Young-Kwon H. (1999) Estimation of viable cell count after fluorescein diacetate staining Using Phosphorimager Analysis. *BioTechniques* **27**: 685-688.

Yuan L-J., Liu J.-B., Xiao X.-G. (2011) Biooxidation of indole and characteristics of the responsible enzymes. *Afr J Biotechnol.* **10**: 19855-19863.

Zenk M.H. (1980) Enzymatic synthesis of ajmalicine and related indole alkaloids. *J Nat Products.* **43**: 438-451.

Zhou M-L., Hou H-L., Zhu X-M., Shao J-R., Wu Y-M., Tang Y-X. (2010) Molecular regulation of terpenoid indole alkaloids pathway in the medicinal plant, *Catharanthus roseus*. *J Med Plants Res.* **4**:

2760-2772.

Zhao J., Zhu W.H., Hu Q., (2001) Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. *Plant Growth Regul.* **33**:43-49.

Suzuki T., Tomita-Yokotani K., Tsubura H., Yoshida S., Kusakabe I., Yamada K., Miki Y., Hasegawa K. (2002) Plant growth-promoting oligosaccharides produced from tomato waste. *Bioresour Technol.* **81**:91-96.

## X ANEXOS

### Protocolo: Biotransformación *in vivo* de <sup>14</sup>C-triptófano en plántulas de *Hamelia patens* y su respuesta al estrés por luz.

#### Resumen

*Hamelia patens* es una planta superior capaz de producir alcaloides oxindol-monoterpenicos (AOM), compuestos altamente oxidados con especial interés farmacológico y biotecnológico. La biosíntesis de estos alcaloides es producto del metabolismo secundario, que se caracteriza por su elevada regulación a diferentes niveles y un gran desconocimiento de sus rutas biosintéticas. Para encontrar algunos pasos de la ruta de biosíntesis de los AOM producidos por *H. patens*, proponemos utilizar un cultivo *in vitro* de plántulas de *H. patens* e investigar la biotransformación *in vivo* desde un precursor marcado radiactivamente (<sup>14</sup>C-triptófano), hasta los AOM.

En un primer experimento de biotransformación de <sup>14</sup>C-triptófano con plántulas de *H. patens* y su respuesta a elicitación con metil jasmonato (Me-Ja), utilizando plántulas completas, se observó una baja incorporación de la marca radiactiva hacia los AOM, tanto en el tratamiento control como en el elicitado con Me-Ja. Con la finalidad de eliminar la interferencia de las raíces en la incorporación, se utilizaron explantes meristematicos (ahora sin raíces) de plántulas *in vitro* de *H. patens*. Se encontró al aumentar de 100 a 500 µM de triptófano (sin marca radiactiva [en frío]) un aumento de 1.6 veces en la producción de AOM. Por tanto, se propone realizar por segunda vez el experimento de incorporación de <sup>14</sup>C-triptófano, utilizando las nuevas condiciones del experimento en frío y estudiar la respuesta a estrés por luz continua en la biosíntesis de los AOM.

Palabras clave: *Hamelia patens*, alcaloides indol y oxindol-monoterpenicos, <sup>14</sup>C-triptófano y estrés por luz.

#### Marco teórico

##### Alcaloides indol-monoterpenicos

Los alcaloides son metabolitos secundarios de bajo peso molecular que contienen nitrógeno en su estructura y se encuentran en alrededor del 20% de las especies de plantas superiores. La función fisiológica de estos metabolitos secundarios en las plantas no es completamente conocida, pero se sabe que algunos tienen función de defensa, como protectores biológicos contra herbívoros, ataque de patógenos, estrés abiótico del medioambiente entre otros. Pueden ser potencialmente tóxicos para las células de las plantas, sin embargo, parecen ser inmunes a sus propios metabolitos. Además, los almacenan en sus formas menos tóxicas.

La biosíntesis y acumulación de alcaloides está altamente regulada en forma temporal y espacial en los órganos de las plantas. Los alcaloides indol-monoterpenicos (AIM) son un grupo integrado por alrededor de 2500 alcaloides (Szabó, 2008). Las rutas biosintéticas de muchos tipos de AIM se desconocen. En ciertos casos muchas de las enzimas que participan en su biosíntesis han sido clonadas y estudiadas mecanísticamente *in vitro*. En otros casos, las rutas biosintéticas propuestas han estado basadas en resultados de estudios de alimentación de sustratos o precursores marcados radiactivamente (O'Connor y Maresh, 2006).

### Biosíntesis de los alcaloides indol-monoterpenicos

Los AIM son derivados del triptófano y un iridoide terpenico, la secologanina. Por la parte indólica debe actuar la triptófano descarboxilasa (TDC), una enzima dependiente de piridoxal, que convierte el triptófano en triptamina y por la parte terpenica la conversión de geraniol a 10-hidroxigeraniol por la geraniol 10-hidroxilasa (G10H). Así mismo la G10H se sabe es un precursor de la loganina (Contin et al., 1998) y por acción de la enzima secologanina sintasa (SLS) y la citocromo P450 (CYP72A1) se obtiene la secologanina (Irmiler et al., 2000). Posteriormente la triptamina y la secologanina son utilizadas para el primer paso comprometido en la biosíntesis de los AIM, en este paso la enzima estrictosidina sintasa (STR) cataliza la condensación estereoselectiva entre la triptamina y la secologanina (Atta-ur-Rahman y Basha, 1983).

Los mecanismos y los procesos mediante los cuales la estrictosidina se reorganiza para dar origen a las diversas familias de productos de AIM, continúa siendo uno de los problemas más fascinantes de entender en el metabolismo secundario (O'Connor y Maresh, 2006).

Hasta el momento no se han descubierto los mecanismos por los cuales se controla la producción de AIM durante el crecimiento o desarrollo. Estudios recientes apuntan a que es posible que exista un mecanismo específico en tejidos o células que controle la producción. Uno de los ejemplos más conocidos de transporte a larga distancia es la nicotina en especies del género *Nicotiana*. La nicotina es un ejemplo de transporte ABC en plantas, su biosíntesis se lleva a cabo en la raíces donde puede ser incrementada específicamente por elicitación en respuesta a ataques por patógenos y herbívoros, la nicotina producida es translocada a la parte aérea para su acumulación (Shoji et al., 2000).

### Biosíntesis de los alcaloides oxindol-monoterpenicos

En plantas de la familia de las Rubiaceas se ha estudiado la biosíntesis de los AOM utilizando un precursor marcado radiactivamente. En *Mitragyna parvifolia* se postulo que los AOM se forman por oxidación de los AIM (Shellard et al., 1974). En cultivos in vitro de *Uncaria tomentosa*, mediante la biotransformación del precursor <sup>14</sup>C-triptófano se ha encontrado que la biosíntesis de los AIM es similar a la descripción anterior hasta la estrictosidina. Se confirmó que después de la condensación mediante la STR, le siguen pasos de oxidación que dan origen a los AOM a partir de los AIM (Luna-Palancia, 2006). Además, en cultivo de raíces in vitro de *U. tomentosa* se encontró la incorporación de <sup>14</sup>C-triptófano a los AIM glucosidados  $\alpha$ -dihidrocadambina y dolicanosido (Huerta-Heredia, 2010). Sin embargo, no se ha estudiado la biosíntesis de AOM hidroxilados y/o metoxilados.

### Estrés por luz

Los agentes estresantes pueden ser utilizados en cultivos de células vegetales no solo para mejorar la productividad biotecnológica de metabolitos secundarios como los alcaloides, si no también para estudiar las interacciones planta-factor de estrés. Los factores de estrés son clasificados como bióticos y abióticos.

La intensidad lumínica es un factor de estrés abiótico que resulta en una fotoinhibición, las características de esta dependen básicamente de la cantidad de luz a que las plantas están expuestas. Cuando el exceso de luz es moderado se conoce como fotoinhibición dinámica y se origina mediante la conversión en calor de la energía lumínica absorbida. Por otro lado, cuando el exceso de luz es extremo, se pueden causar daños en los fotosistemas, este efecto permanece durante un periodo relativamente prolongado (semanas o incluso meses) y se conoce como fotoinhibición crónica (Osmond, 1994).

Algunas de las respuestas de las plantas sometidas a estrés por luz son: El estrés oxidativo al incrementar el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) y La producción de metabolitos secundarios como flavonoides, antocianinas y alcaloides. Se ha reportado que estos compuestos presentan actividad antioxidante, por lo tanto, podrían estar ayudando a secuestrar las ROS generadas por el estrés por luz. En cultivo de células en suspensión de *C. roseus* se reporto la inducción por luz del AIM serpentina de 17.5 veces, de compuestos fenólicos de 5 veces y de antocianinas de 500 veces más que en oscuridad (Knobloch et al., 1982).

#### Antecedentes

Biotransformación de <sup>14</sup>C-triptófano en plántulas de *H. patens* y su respuesta a elicitación con metil jasmonato

Se estableció un sistema de cultivo para la biotransformación del precursor <sup>14</sup>C-triptófano en un cultivo de plántulas in vitro completas (con raíces) (Figura 1), se logro una buena separación por cromatografía en capa fina (TLC) de los alcaloides indol y oxindol-monoterpenicos producidos por *H. patens* con la adición de <sup>14</sup>C-triptófano (Figura 2).

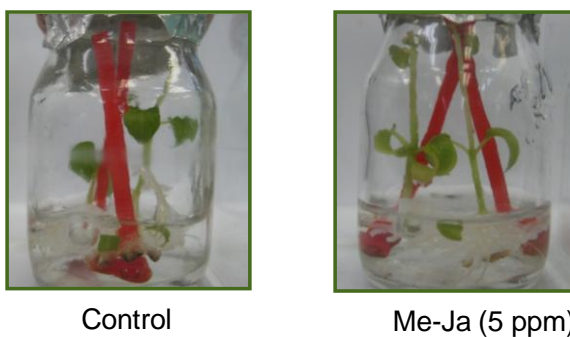
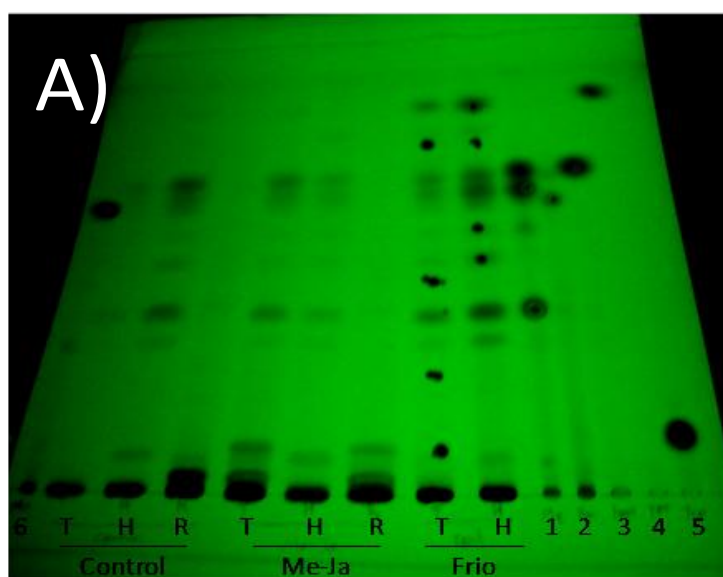


Figura 1. Sistema de cultivo con <sup>14</sup>C-triptófano adicionado al medio de cultivo líquido.





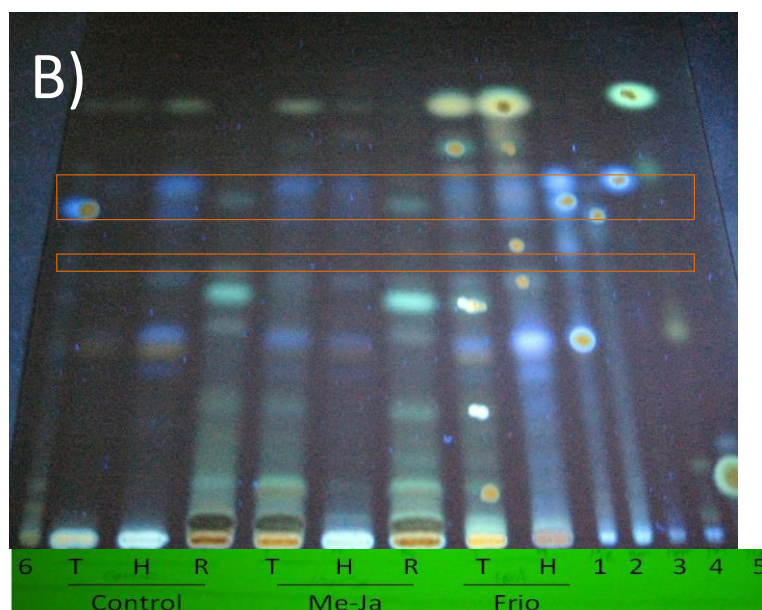


Figura 2: Placa de silica gel de 20 x 20 cm con longitud de corrida de aprox. 16 cm. A) 254 nm y B) 366 nm, donde T) tallos, H) hojas, R) raíces de las plántulas. Los tratamientos Control, Me-Ja (metil jasmonato) y Frío (sin marca radiactiva). Estándares [Rf]: 1) mezcla de especiofilina [0.35], pteropodina [0.71] e isopteropodina [0.75], 2) hamelina [0.61], 3) isopteropodina [0.75], 4) tetrahidroalstonina [0.95], 5) triptamina [0.13], 6) palmirina [0.67].

Se observó una baja incorporación del precursor  $^{14}\text{C}$ -triptófano en los diferentes órganos de las plántulas hacia los AOM, tanto en el tratamiento control como en el elicitado con Me-Ja (Figura 3). Los rectángulos de la Figura 3 muestran las zonas donde se observó incorporación que podrían corresponder a los alcaloides. Sin embargo, en la zona más amplia donde coinciden los alcaloides palmirina, hamelina, pteropodina e isopteropodina, se observó la mayor incorporación en las raíces de plántulas (control y Me-Ja), pero en este órgano no se ha encontrado producción de alcaloides. La otra zona de incorporación señalada en rectángulo (Figura 3) no coincide con los estándares de alcaloides que producen las plántulas de *H. patens*, además, no hubo señal a 254 y 366 nm para esa zona (Figura 2). Por lo que descartamos que sea algún alcaloide indol u oxindol-monoterpenico.

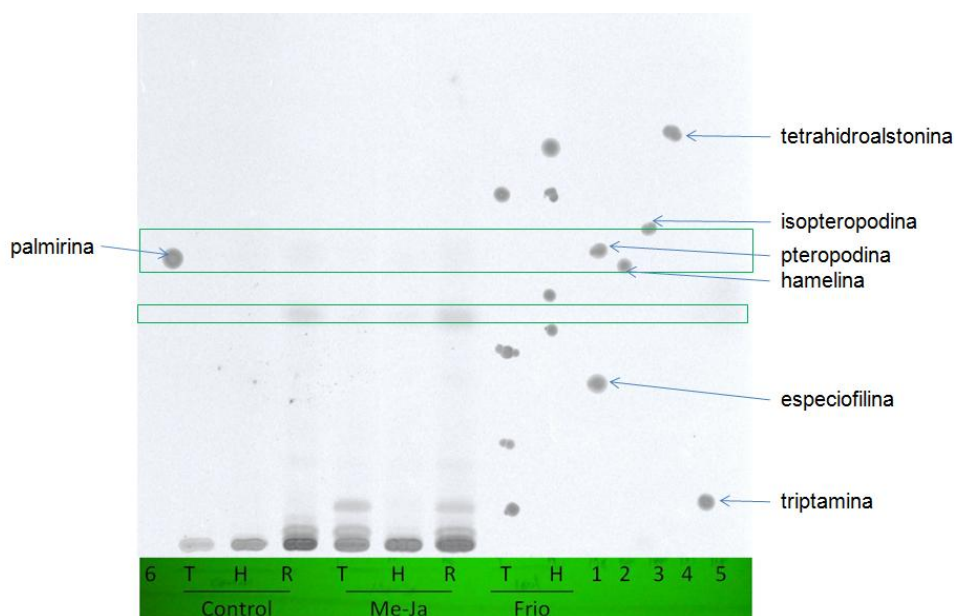


Figura 3: Incorporación del  $^{14}\text{C}$ -triptófano por emisiones  $\beta$  en escáner. Placa de silica gel de 20 x 20 cm con longitud de corrida de aprox. 16 cm. Donde T) tallos, H) hojas, R) raíces de las plántulas. Los tratamientos Control, Me-Ja (metil jasmonato) y Frío (sin marca radiactiva). Estandares [Rf]: 1) mezcla de especiofilina [0.35], pteropodina [0.71] e isopteropodina [0.75], 2) hamelina [0.61], 3) isopteropodina [0.75], 4) tetrahydroalstonina [0.95], 5) triptamina [0.13], 6) palmirina [0.67].

Adición de 100 y 500  $\mu\text{M}$  de triptófano a un cultivo de plántulas in vitro de *H. pates*. Al adicionar 500  $\mu\text{M}$  de triptófano en frío, se encontró en hojas un aumento de 1.6 veces en la producción de AOM (Tabla 1). Utilizando explantes meristematicos (sin raíces) de plántulas in vitro de *H. patens* (Figura 4). Por otro lado, la adición de 100  $\mu\text{M}$  de triptófano no mostro aumento en la producción con respecto al control.



Control NNm  
semisólido



500  $\mu\text{M}$

100  $\mu\text{M}$

Control NNm  
liq.

Figura 4. Dos concentraciones de triptófano en explantes meristematicos de plántulas de *H. patens* sin raíces en medio NNm líquido sin hormonas.

Tabla 1. Producción de alcaloides indol y oxindol-monoterpenicos (AIM y AOM) en el experimento de adición de triptófano

	A O M		A I M	
	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo
Control en NNM semisólido	31.75	8.82	16.21	8.37
Control	25.08	11.75	12.23	30.13
100 $\mu$ M triptófano	19.19	7.41	8.73	6.64
500 $\mu$ M triptófano	42.19	6.75	12.99	15.02

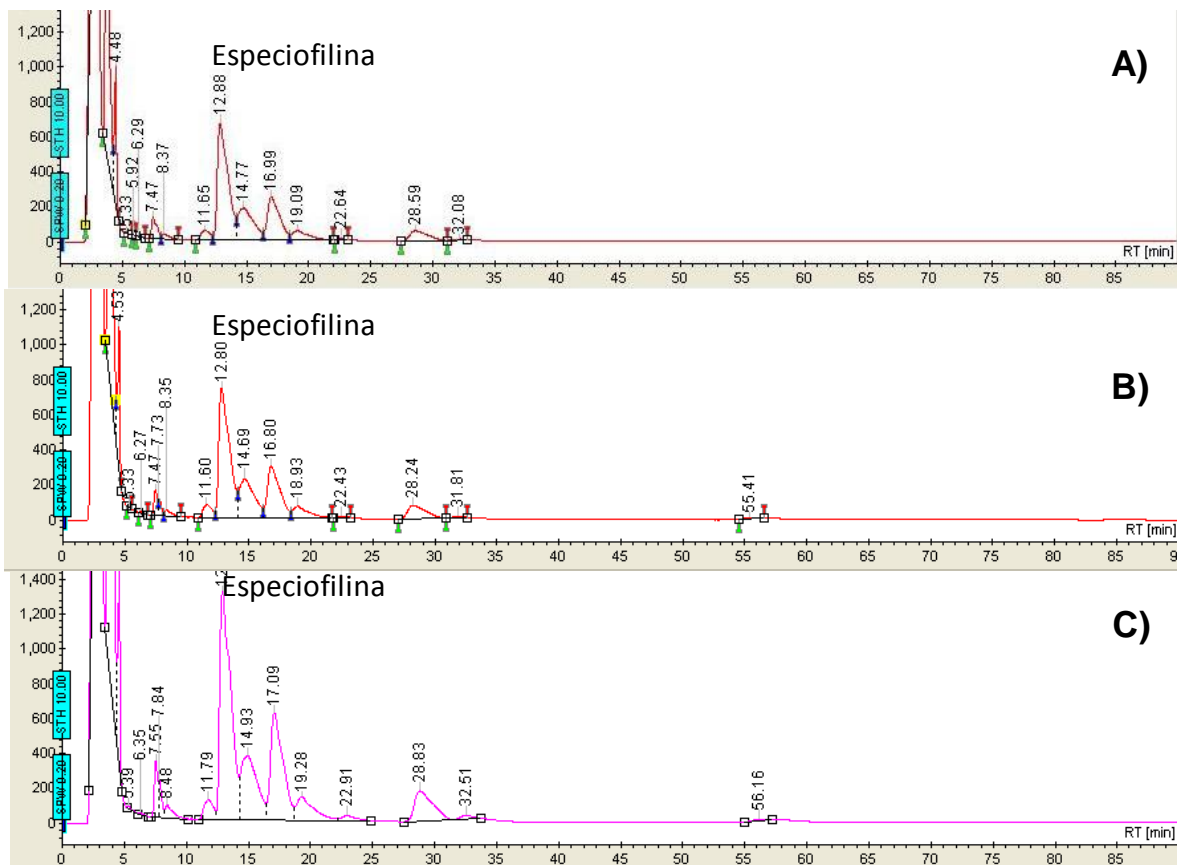


Figura 5. Perfil de producción de AOM con la adición de triptófano. Donde A) control sin triptófano, B) triptófano 100  $\mu$ M y C) triptófano 500  $\mu$ M. Especiofilina ( $R_f = 12.8$ ).

El perfil de producción de AOM en hojas de plántulas con adición de triptófano es constante. Sin embargo, se encontró a la especiofilina como el AOM de mayor producción en todos los casos (Figura 5).

#### Estrés por luz en *H. patens*

En cultivo de plántulas in vitro de *H. patens* de 2 meses sometidas a estrés lumínico, por luz continua con un intensidad lumínica de 2100 lux, se encontró un aumento en la producción de AOM de aproximadamente 2 veces y la aparición de antocianinas, en comparación con las crecidas bajo un fotoperiodo de 16 h con una intensidad lumínica de 1050 lux.

Durante la adaptación a tierra de plántulas de *H. patens* de 2 meses se observó un aumento creciente en la producción de antocianinas a partir de primer mes. Como una

respuesta al estrés lumínico generado por el fotoperiodo de 16h a 3800 lux. A los 3 meses se observó un aumento de 2 veces en la producción de AOM.

### **Justificación**

Debido a la importancia y complejidad biosintética de los AOM presentes en *Hamelia patens*, es indispensable estudiar su biosíntesis utilizando diversas estrategias, como la incorporación de un precursor marcado radiactivamente y elicitación abiótica. Para seguir la incorporación de la marca en plántulas micropropagadas in vitro de *Hamelia patens*, además de, aprovechar el cambio en el perfil metabólico de alcaloides provocado por el estrés por luz y obtener mayor información acerca de la ruta biosintética.

### **Hipótesis**

La utilización de un precursor biosintético marcado y el estrés por luz proporcionaran información de la ruta de biosíntesis de los AOM en *Hamelia patens*.

### **Objetivo**

Validar la biosíntesis de AOM a partir de triptófano en *H. patens*.

### **Metodología**

Preparación y selección de las plántulas in vitro de *H. patens*

Se realizara el cultivo de plántulas en medio NNm semisólido (Nitsch and Nitsch modificado por Feria, 1998) sin hormonas, con 2% de sacarosa y 2 g/L de gelrite, en condiciones de fotoperiodo de 16 horas de luz a una intensidad lumínica de 1050 lux. A partir de los cuales se seleccionan los segmentos de meristemas apicales con dos pares de hojas.

Incorporación de [14C]-triptófano bajo estrés por luz

Se subcultivaran las plántulas micropropagadas en medio NNm líquido, para lo cual se diseñó un sistema de cultivo que consiste en viales de 26 mL (Vol. total) que contiene una malla horizontal y tiras verticales de plástico esterilizable, que darán soporte a las plántulas.

Se utilizaran dos viales con este sistema, con un volumen de medio de cultivo Nm líquido de 5 mL donde se adicionara 500  $\mu$ M de 1-14C-triptófano, en cada uno se colocaran 4 plántulas, colocando los viales dentro de cajas magenta como contención de seguridad, manteniéndose un vial en fotoperiodo de 16 h de 1050 lux y otro en luz continua de 2100 lux.

Extracción de alcaloides e intermediarios

Extracción metanólica con metanol-buffer de fosfatos 1:0.25. La solución amortiguadora se preparo con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a una concentración de 90.5 mM en H<sub>2</sub>O ajustando el pH a 6 con NaOH (Kim et al., 2006). Se reduce el tamaño de partícula, se adiciona el metanol-buffer, se centrifuga. Recuperando un volumen total de 300 a 500  $\mu$ L, para después llevar a sequedad con un flujo de N<sub>2</sub>(g).

Separación y determinación de alcaloides (AIM Y AOM) e intermediarios

Se utilizaran placas de silica gel de 20X20 cm, con un espesor de capa de 0.25 mm (Merk). Con la siguiente fase móvil:

Isopropileter-metanol (55:15) con 1% de hidróxido de amonio

Para la identificación de los productos se compararan los valores de R<sub>f</sub> de los metabolitos a los que se les incorporo la marca con los de los estándares previamente obtenidos y caracterizados completamente a partir de plántulas y plantas de *Hamelia*

patens: AIM; aricina (% de pureza) e isómero de aricina (% de pureza), AOM; isopteropodina (% de pureza), pteropodina (% de pureza), especiofilina (% de pureza), palmirina (10-metoxiisopteropodina) (% de pureza), rumberina (10-hidroxiisopteropodina) (% de pureza), uncarina F (% de pureza), hamelina (10-metoxipteropodina) (% de pureza) y tripamina (% de pureza) (Paniagua-Vega et al., en revisión).

Detección de la incorporación de la marca radioactiva en AIM Y AOM

Luego de la separación por TLC se detectara la incorporación del [14C] en los AIM Y AOM, utilizando un equipo de barrido (radioescáner) para emisiones  $\beta$ , con el que se obtendrá la imagen de los compuestos que corresponderán a la incorporación de la marca radiactiva.

Expectativas del experimento

Se espera observar mayor incorporación desde el sustrato 14C-triptófano hasta los AOM en plántulas sin raíces. Para superar la dificultad de que la mayoría de los AOM se presentan en una región de Rf entre 0.61 y 0.75, misma región donde se presenta un producto de la incorporación diferente a los AOM no identificado (Figura 3). Se propone adicionar 500  $\mu$ M de triptófano ya que resulta en un perfil con alta producción de especiofilina Rf (0.35) (Figura 5) y de acuerdo a los antecedentes tendríamos incorporación en una región del TLC sin interferencias. Por lo tanto, sería contundente el resultado de incorporación en este AOM.

## Referencias

Atta-ur-Rahman, Basha A. (1983) Biosynthesis of Indole Alkaloids. Clarendon Press. Oxford University press. New York. pp. 270.

Collu G. Unver N. Peltenburg-Looman A.M.G., Van der Heijden R., Verpoorte R., Memelink J. (2001) Geraniol 10-hydroxylase, a Cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. FEBS Lett. 508:215-220.

Contin A., van der Heijden R., Lefeber A.W., Verpoorte R. (1998) The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. FEBS letters 434:413-6.

Feria I.A. (1998) Obtención de una línea celular de *Uncaria tomentosa* para la producción de flavonoides y/o isoprenoides. Tesis de Maestría: Departamento de Biotecnología. CINVESTAV-IPN, México, D. F.

Huerta Heredia A.A. (2010) Eventos bioquímicos del estallamiento oxidativo inducido por estrés y su relación con la producción de alcaloides indol terpénicos en cultivo de raíces de *U. tomentosa*. Tesis de Doctorado: Departamento de Biotecnología. CINVESTAV-IPN, México, D. F.

Irmeler S., Schröder G., St-Pierre B., Crouch N.P., Hotze M., Schmidt J., Strack D., Matern U. Schröder J. (2000) Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. Plant J. 24:797-804.

- Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. (2006) Metabolomic analysis of *Catharanthus roseus* using NMR and principal component analysis, In: Nagata T., Lörz H., Wildholm J. M. (eds.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 57. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, pp 243-260.
- Knobloch K.H., Bast G., Berlin J. (1982) Medium- and light-induced formation of serpentine and anthoyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 21:591-594.
- Luna-Palencia G.R., Cerda-García-Rojas C.M., Romo-Cruz I., Albarrán J.G., Ramos-Valdivia A.C. "Advances in the biosynthesis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* cultures", presentado en el International Symposium on the Chemistry, Pharmacology and Biosynthesis of Alkaloids, celebrado en Belek, Antalya, Turquía, del 25 al 29 de abril de 2006. Program & Abstracts, resumen OP 01, p. 48.
- Menke F.L.H., Parchmann S., Mueller M.J., Kijne J.W., Memelink J. (1999) Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 119:1289-1296.
- O'Connor S.E., Maresh J.J. (2006) Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 23:532-547.
- Osmond, C.B. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En: Baker, N.R. y J.R. Bowyer (eds.). *Photoinhibition of photosynthesis*. Oxford (BIOS Scientific). pp. 1-24
- Paniagua V.D. (2007) Distribucion y biosintesis de alcaloides indólicos en plantas micropropagadas y cultivos de raíces de *Hamelia patens*. Tesis de maestría: Departamento de Biotecnología. Cinvestav-IPN, México, D.F.
- Pauwels L., Inzé D., Goossens A. (2009) Jasmonate-inducible gene: what does it mean?. *Trends Plant Sci.* 30:1-5.
- Shellard E.J., Houghton P.J. (1974) The *Mitragyna* species of Asia. Part. XXVI. Further in vitro studies using [<sup>14</sup>C]-alkaloids, in the alkaloid pattern in young plants of *Mitragyna parvifolia* (ROXB.) KORTH grow from seed obtained from Sri Lanka (Ceylon). *Planta Med.* 25:80-87.
- Shoji T., Kakajima K., Hashimoto T. (2000) Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. *Plant cell physiol.* 41:1072-1076.
- Szabó L.F. (2008) Rigorous biogenetic network for a group of indole alkaloids derived from strictosidine. *Molecules.* 13:1875-1896.

Van der Fits L., Memelink J. (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*. 289:295-297.

