



TESIS EN OPCION AL TITULO ACADEMICO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL

*Perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos in vitro de Morinda royoc L., Psidium guajava L. var “EEA18-40” y Morus alba L. var “Criolla”*

**AUTOR:** Ing. Alina Teresa Capote Pérez.

**TUTOR:** Dr. Elio Antonio Jiménez González.

**CONSULTANTE:** MSc Naivy Lisbet Pérez Alonso.

Santa Clara, CUBA

2006

# Índice

## INDICE

1. Introducción-----	1
2. Revisión Bibliográfica-----	5
2.1. Metabolitos Secundarios. Generalidades-----	5
2.1.2. Importancia de los metabolitos secundarios-----	7
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> para la producción de metabolitos secundarios-----	11
2.2.1. Cultivo de células-----	13
2.2.2. Cultivo de órganos-----	16
2.3. Relación entre la producción de biomasa y la acumulación de metabolitos secundarios-----	17
2.4. Nuevos compuestos obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> -----	17
2.4.1. Métodos de análisis químico-----	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS-----	20
3.0 Procedimientos generales-----	20
3.1. Producción de biomasa en las especies en estudio ( <i>Morinda royoc</i> L, <i>Psidium guajava</i> var “EEA18-40”, <i>Morus alba</i> var “Criolla”) -----	21
<i>Morinda royoc</i> L Plantas en Invernadero.-----	21
Establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> -----	21
Inducción y formación de callos-----	22
Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares-----	23
<i>Psidium guajava</i> L var “EEA18-40”-----	24
Plantas en condiciones de campo -----	24
Establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> -----	24
<i>Morus alba</i> L var “Criolla” -----	25
Plantas en condiciones de campo -----	25
Establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> -----	26
3.2. Análisis del contenido de metabolitos de las especies en estudio -----	27
3.2.1. Preparación de las muestras y obtención de los extractos -----	27
3.2.2. Análisis de los perfiles de compuestos encontrados en las diferentes especies en estudio-----	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	29
4.1. Producción de biomasa en las especies vegetales en estudio	

( <i>Morinda royoc</i> L, <i>Psidium guajava</i> var "EEA18-40", <i>Morus alba</i> var "Criolla") -----	29
4.2. Análisis del contenido de metabolitos de las especies en estudio ----	33
4.2.1. Preparación de las muestras y obtención de los extractos-----	33
4.2.2. Análisis de los perfiles de compuestos encontrados en las diferentes especies en estudio -----	35
<i>Morinda royoc</i> L-----	35
<i>Psidium guajava</i> var "EEA18-40"-----	46
<i>Morus alba</i> var "Criolla" -----	51
5. CONCLUSIONES -----	55
6. RECOMENDACIONES -----	56
7. BIBLIOGRAFÍA -----	57

Síntesis

**RESUMEN**

El cultivo de células y tejidos *in vitro*, es una de las alternativas para la identificación de nuevos compuestos ó incrementar la producción de compuestos ya conocidos que sean de utilidad para la humanidad. El objetivo del trabajo fue producir biomasa de las especies *Morinda royoc* L, *Psidium guajava* L var "EEA18-40" y *Morus alba* L var "Criolla" empleando distintos sistemas de regeneración *in vitro* para determinar el perfil de producción de metabolitos en la biomasa producida *in vitro* y plantas en campo mediante la técnica combinada de cromatografía líquida-espectrofotometría de masa. Se pudo comprobar en todas las especies en estudio que el contenido de agua es mayor en el material vegetal obtenido en los sistemas de cultivo *in vitro* con relación a las muestras obtenidas de plantas cultivadas en campo o invernadero. En la especie *Morinda royoc* el cultivo de brotes es el sistema de cultivo *in vitro* más factible para la producción de biomasa con mayor contenido de materia seca comparado con el cultivo de callos y células. Los rendimientos de los extractos en todas las especies en estudio fueron siempre mayores en los sistemas de cultivo *in vitro* en comparación con los obtenidos en plantas en campo o invernadero y son mayores a medida que la diferenciación es menor (brotes, callos y suspensiones celulares). En la especie *Morinda royoc* se obtuvo el más amplio espectro de compuestos en el cultivo de callos y suspensiones celulares, en comparación con las muestras de hojas de plantas en invernadero y brotes multiplicados *in vitro*. En esta especie los perfiles de compuestos detectados en plantas de invernadero y brotes *in vitro* fueron similares, mientras que en *Psidium guajava* y *Morus alba* los perfiles de expresión entre muestras de hojas de campo y brotes *in vitro* fueron distintos, lo que demuestra que cada genotipo reacciona de forma distinta al cultivo *in vitro* y por tanto los compuestos que se sintetizan como respuesta a estas condiciones "anormales" de crecimiento es distinta. Se pudo demostrar que el cultivo *in vitro* es una fuente potencial para la identificación y producción de nuevos compuestos.

# Introducción

## 1. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios son compuestos biológicamente activos, los cuales juegan un papel minoritario en los procesos básicos de la vida de las plantas, pero a menudo tienen un rol ecológico como atrayentes de polinizadores, o son producidos como respuesta a estrés medioambiental así como a ataques contra microorganismos, insectos y contra depredadores superiores, incluso contra otras plantas (Gerth *et al.*, 2002).

La producción de metabolitos secundarios está estrechamente relacionada con el proceso de desarrollo de la planta, generalmente no está asociada al crecimiento, depende de condiciones determinadas de control hormonal, es paralela al desarrollo de tejidos especializados y órganos (raíces, tallos y hojas). La biosíntesis y acumulación suele estar fuertemente compartimentada a nivel intracelular, celular, de tejidos y de órganos y se produce ante situaciones de estrés o enfermedad (Harborne, 2000).

Los compuestos activos obtenidos de plantas son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y cada día es mayor el número de plantas y metabolitos de interés. No obstante, la calidad y la cantidad de los compuestos obtenidos a partir de plantas colectadas en ambientes naturales o en campo son muy variables y están influenciadas por condiciones ambientales tales como el clima, la época, el tiempo y el suelo. Adicionalmente, la infección por enfermedades o plagas y la aplicación de pesticidas reduce la calidad de los compuestos obtenidos (Bhojwani y Razdan, 1996).

Al utilizar el cultivo *in vitro* se independiza la producción de metabolitos de estos factores externos y permite disponer de condiciones controladas en el proceso de producción y extracción, además de posibilitar la obtención de nuevos compuestos no presentes en la planta madre (Massot *et al.*, 2000).

El cultivo *in vitro* de plantas para obtener productos naturales de alto valor puede resolver muchos de los problemas que se presentan a escala industrial durante la extracción de estos productos fitoquímicos a partir de plantas cultivadas en condiciones de campo o silvestres,

como es la calidad fitosanitaria del material, el requerimiento de grandes extensiones de tierra para la obtención de plantas completas, de las cuales sólo una parte es de interés farmacéutico (Dornenburg y Knorr, 1997; Gleba *et al.*, 1999).

Dos métodos fundamentales de cultivo de tejidos han sido utilizados para la producción de metabolitos secundarios de plantas, el cultivo de células y el cultivo de órganos (Bourgaud *et al.*, 2001).

Los cultivos celulares tienen la ventaja de que su manejo es similar al de microorganismos y el escalado de los procesos puede realizarse empleando biorreactores convencionales. Sin embargo, tienen un grupo de limitantes importantes como que no todos los compuestos son producidos por células indiferenciadas y son fisiológica y genéticamente inestables, por lo cual es muy común la reducción o pérdida de la capacidad de formación del producto (Steven, 1998; Haq, 2004).

El cultivo *in vitro* de células y tejidos no sólo es una herramienta para la síntesis de productos naturales, sino que permite además la bioconversión de componentes de bajo valor en productos de alto valor. Por otro lado, muchos de estos compuestos producidos durante el cultivo de células no se producen en las plantas intactas (Bhojwani y Razdan, 1996; Moreno-Valenzuela *et al.*, 1998; Tisserat y Vaughn, 2001).

Adicionalmente, los cultivos de órganos son genéticamente estables, siendo posible la producción de los compuestos deseados mediante cultivo de brotes y raíces. Tienen la limitante, comparados con el cultivo de células, que los coeficientes de multiplicación son bajos cuando se utilizan técnicas tradicionales de cultivo de tejidos y la dificultad en el escalado cuando se utilizan biorreactores estándares debido a la deficiente iluminación. Algunos de los compuestos medicinales, localizados en tejidos morfológicos especializados u órganos de plantas nativas pueden ser producidos en sistemas de cultivo no solo induciendo cultivos de

órganos especializados sino también por el cultivo de células indiferenciadas (Vanisree *et al.*, 2004).

La producción de metabolitos secundarios está bajo una estricta regulación en las células de las plantas por un coordinado control de factores de transcripción por genes biosintéticos (Endt *et al.*, 2002; Le Gall *et al.*, 2005). El rol y la caracterización de los factores de transcripción involucrados en el metabolismo secundario, han sido estudiado previamente (Mol *et al.*, 1998; Memelink *et al.*, 2001).

La deducción del contexto biológico en que una planta dada produce determinados compuestos a partir de datos obtenidos por la medición de las concentraciones de metabolitos, requiere que la identificación y cuantificación de los mismos se realice con gran fiabilidad. Las técnicas analíticas tales como la cromatografía han permitido el descubrimiento de más y más moléculas y han sido básicas para el establecimiento de la fitoquímica (Verpoorte y Alfermann, 2000). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es utilizada para la determinación de mezclas orgánicas complejas, esta técnica es desde hace muchos años la más aplicada para el estudio de compuestos naturales (Weekwerth *et al.*, 2004; Le Gall *et al.*, 2005).

El fenotipo bioquímico de una planta es el resultado de la interacción entre el genotipo y el entorno. Por tanto, se necesita identificar y cuantificar los metabolitos para estudiar la dinámica del metaboloma y analizar los flujos metabólicos para encontrar cambios en las cantidades de metabolitos que se puedan correlacionar con el estado fisiológico y de desarrollo de una célula, de un tejido o de un organismo. A través de la metabolómica se puede saber el perfil de los metabolitos obtenidos en concentraciones relativas, proporcionando una especie de "fotografía instantánea" del estado fisiológico de las células, las cuales se pueden determinar a través de técnicas de espectrofotometría de masa y la cromatografía de alta resolución (Ávila, 2005).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se propuso la siguiente hipótesis:

“El cultivo de células y tejidos *in vitro*, al ser un ambiente distinto al de campo abierto o invernadero y representar un nivel distinto de organización y diferenciación celular, puede variar el perfil de producción de metabolitos secundarios, lo cual permitiría la identificación de nuevos compuestos ó incrementar la producción de compuestos ya conocidos que sean de utilidad para la industria”.

**Objetivo general:**

Determinar el perfil de producción de metabolitos secundarios en distintos sistemas de cultivo *in vitro* y en plantas de campo mediante cromatografía líquida-espectrofotometría de masa en tres especies vegetales de distintos usos para el hombre.

**Objetivos específicos:**

1. Producir biomasa de las especies *Morinda royoc* L, *Psidium guajava* L var “EEA18-40” y *Morus alba* L var “Criolla” empleando distintos sistemas de cultivo *in vitro*.
2. Determinar el perfil de producción de metabolitos en la biomasa producida *in vitro* y plantas de campo mediante la técnica combinada de cromatografía líquida-espectrofotometría de masa.

# Revisión Bibliográfica

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Metabolitos secundarios. Generalidades

Hace 200 años la química y la biología describieron el rol de los metabolitos primarios en las funciones básicas de la vida como la división y crecimiento celular, respiración, almacenamiento y reproducción. En biología, el concepto de metabolito secundario es atribuido a Kossel (1891), quien fue el primero en definir que estos metabolitos tienen una actividad antagónica a los primarios.

Las plantas producen sustancias destinadas a su crecimiento, como polisacáridos (azúcares y proteínas), los cuales son considerados compuestos del metabolismo primario. Otros compuestos especiales también denominados metabolitos secundarios son sintetizados por diferentes rutas metabólicas produciendo una inmensa variedad de estructuras químicas tales como alcaloides, flavonoides, coumarinas, terpenoides. Son también fuentes de almacenamiento de carbono y nitrógeno que retornan al metabolismo primario cuando es requerido por la planta, un balance entre la actividad del metabolismo primario y secundario de las plantas es dinámico y puede ser considerablemente afectado por el crecimiento de la planta, diferenciación de los tejidos, fase vegetativa y estrés ambiental (Briskin, 2000).

Según Czapek (1921) estos productos pueden ser derivados del metabolismo del nitrógeno y llamados modificaciones secundarias. Comparado con las moléculas fundamentales encontradas en las plantas, los metabolitos secundarios pueden ser definidos por su baja concentración, frecuentemente menor que el 1% del carbono total o porque usualmente su almacenamiento ocurre en células especializadas u órganos (Bourgaud *et al.*, 2001).

Los metabolitos de las plantas son importantes para muchas de las respuestas de resistencia al ataque de patógenos, en condiciones de estrés y contribuyen al color, sabor y olor de flores y frutos. La enorme diversidad bioquímica que existe en las plantas hace que los metabolitos distintos que pueden encontrarse en plantas se estimen que sean más de 200 000. Esto hace que una aproximación en gran escala al estudio de los metabolitos presentes en las plantas sea

un tremendo reto, de ahí la necesidad de utilizar tecnologías diversas para caracterizar los metabolitos presentes en plantas (Ávila, 2005).

Los compuestos secundarios de plantas son clasificados de acuerdo a su vía biosintética. Tres grandes familias de moléculas son considerados de forma general: fenólicos, terpenos y esteroides y alcaloides. Un buen ejemplo de familia de metabolitos es la que está compuesta por fenoles, porque estas moléculas están involucradas en la síntesis de lignina, otros compuestos como los alcaloides son distribuidos en el reino de las plantas y mucho más específicos en géneros y especies de plantas definidos (Harborne, 1999).

Las sustancias secundarias poseen una gran diversidad estructural, a lo cual también no ocurren normales tipos de uniones como isocianida, grupos nitro y grupos aromáticos halogenados a los cuales anteriormente se consideraban compuestos puros (Steglich *et al.*, 1997). Antiguamente se aceptó que las sustancias secundarias se producían con funciones relativas inespecíficas, después se encontró que muchas de estas sustancias poseían altos rendimientos y que ellas tienen múltiples funciones en las plantas. Se plantea que algunos de todos los metabolitos de nivel molecular bajo, actúan como portadores de carbono y nitrógeno. Junto a la sobreproducción pueden en el cambio de material primario sintetizarse esas uniones y junto a las situaciones de escasez, nuevamente ser explotado y poner a disposición para puentes los cambios de los metabolitos primarios; por consiguiente la variación de los metabolitos primarios y secundarios está en una igualdad dinámica (Collin, 2001).

Existe un amplio grupo de productos naturales que pueden clasificarse según su aplicación (Fulzele *et al.*, 2002). Entre ellos se agrupan los productos farmacéuticos que incluyen alcaloides (vincristina, vinblastina, ajmalicina, atropina, berberina, codeína, reserpina, nicotina, (camptotecina), Cardenolidos (digitoxina, digoxina); Diterpenos (paclitaxel); saborizantes y flavonoides como el esteviósido, la quinina; productos utilizados como pigmentos y en la perfumería como los antocianinos, betalinos, el aceite de rosas y de jazmín y productos

utilizados con fines químicos y agroquímicos como proteasas, vitaminas, lípidos, aceites, látex (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002).

La mayoría de los productos secundarios se encuentran en baja concentración y se producen en órganos específicos y en estados específicos del desarrollo de la planta que deben coincidir con la época y región apropiada del cultivo (Hong y Yong, 1997; Verpoorte *et al.*, 2002; Hohe *et al.*, 2003).

La demanda de tales compuestos se ha incrementado en los últimos años dada la limitación de los procesos de obtención de medicamentos basados en la síntesis química. Adicionalmente, el costo de los biofarmacéuticos limita su disponibilidad en un amplio sector del mercado y no satisface las actuales necesidades de la población mundial (Gleba *et al.*, 1999).

#### **2.1.1. Importancia de los metabolitos secundarios**

Mundialmente existe un 44 % de nuevos medicamentos basados en productos naturales, en países desarrollados el 25 % de los medicamentos son derivados de plantas y 120 compuestos derivados de plantas son usados en la medicina moderna (Haq, 2004). Se conoce que en la producción de medicamentos según Hostettmann *et al.* (2000) el 11% representa productos naturales (extractos de plantas), 24% son productos de origen natural, es decir que para la síntesis de compuestos utilizan precursores de origen natural y el 9% son copias sintéticas de productos naturales.

Debido a su gran actividad biológica, los metabolitos secundarios de plantas han sido usados a través de siglos en la medicina tradicional y mas recientemente en la nutrición (Bourgaud *et al.*, 2001).

Dentro de las plantas de interés farmacéutico se conoce que las que pertenecen al género *Morinda* tienen múltiples usos desde la antigüedad. La corteza, raíz, tallo, hoja y fruto han sido usados tradicionalmente contra muchas enfermedades entre las que se incluyen la diabetes, hipertensión y cáncer (Sang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2001). Las antraquinonas extraídas de *M. elliptica* han mostrado actividad antibacterial, antifúngica, antimalárica, antitumoral y

antileucémica (Kamanyi *et al.*, 1994; Rath *et al.*, 1995; Ismail *et al.*, 1997; Hirazumi y Furusawa, 1999; Abdullahl *et al.*, 2000; Ajaiyeoba *et al.*, 2003). También se han reportado en *Morinda sp* y *M. citrifolia* propiedades anticongestivas, analgésicas, antiinflamatorias, sedativas y con actividad insecticida (Younos *et al.*, 1990; Dittmar, 1993; Legal y Plawecki, 1995; Rachel *et al.*, 2003). *M. lúcida* se ha reportado con propiedades antifúngicas, antiprotozoaria, antimalárica (Koumaglo *et al.*, 1992; Kamanyi *et al.*, 1994; Makinde *et at.*, 1994; Rath *et al.*, 1995). Se ha encontrado también que *M. parvifolia* tiene propiedades antitumoral y antileucémica (Chang *et al.*, 1982; Chang y Lee, 1985; Khanapure y Biehl, 1989).

En la industria farmacéutica los glicósidos de antraquinonas extraídos del género *Morinda* son usados para producir medicamentos que combaten la gingivitis, la estomatitis y las úlceras bucales; así como la inflamación de la mucosa bucal. Otros miembros del grupo de las antraquinonas son usados en la preparación de laxantes, para la constipación y para la evacuación de la cavidad abdominal para la realización de radiografías (DIMS, 1992; British National Formulary, 1994).

En Cuba la *Morinda royoc* se usa conjuntamente con otras plantas en la elaboración de bebidas refrescantes y digestivas. Tradicionalmente se ha recomendado para la impotencia, descontrolen menstruales, laxantes y cuadros ictericos (Roig, 1945). El extracto hidroalcohólico de sus raíces es un producto energizante útil en el tratamiento de la anorexia y el decaimiento (Rodríguez *et al.*, 1999).

Otra de las plantas utilizadas en la medicina por sus propiedades es la guayaba que ha sido empleada en la medicina natural. Sus hojas se utilizan en baños como astringente en la cura de llagas, el cocimiento de los leños en las diarreas y el cocimiento de los cogollos contra los resfriados. Además se incluye la guayaba entre los medicamentos hemostáticos, antialmorránicos y antisépticos. A causa del gran interés que ha despertado la guayaba por su contenido en vitamina C se exporta en grandes cantidades la pulpa y los pericarpios. En el fruto

completo fresco se ha encontrado hasta 871 mg de ácido ascórbico en 100 mL de jugo fresco. Los frutos maduros se emplean como refrescantes y laxantes (Roig, 1974).

La guayaba además de ser cultivada por el alto contenido nutritivo de sus frutos se le atribuye diversas propiedades medicinales, antibiótica, antidiarreico, astringente, desinflamante, expectorante, sedante y sudorífica; contiene valores extraordinarios de vitamina A, ácido ascórbico, azúcares, taninos, flavonoides, fibras (Laguado, 1968).

La vitamina C tiene múltiples funciones, entre ellas el fortalecimiento del sistema inmunológico (Suntornsuk, 2002). El extracto de frutas y ramas verdes son usadas para neutralizar el efecto de las diarreas, atribuyéndosele un efecto significativo en la disminución de las enfermedades gastrointestinales (Wei *et al.*, 2000). Las ramas tiernas debilitan el desarrollo bacteriano que altera el tracto intestinal (Arima, 2002; Martínez *et al.*, 1997). También, la guayaba tiene propiedades antisépticas para úlceras gástricas y laceraciones producidas por parásitos en los intestinos. Otra ventaja de los componentes de la guayaba es el fortalecimiento del sistema cardiovascular, el consumo de guayaba disminuye el riesgo de debilidades cardíacas, como la arritmia (Yamashiro *et al.*, 2003) Otro hecho conocido es el incremento de la hemoglobina por el consumo del jugo de la fruta, adicionalmente se reducen los niveles de colesterol perjudicial, y en contraparte aumenta la producción de colesterol benéfico. Por último, un estudio comprobó que *P. guajava* presenta gran cantidad de antioxidantes, por lo que disminuye el riesgo de tumores malignos (Jiménez, 2001).

La morera dependiendo del lugar, también es apreciada por su fruta (consumida fresca, en jugo o en conservas), y por las propiedades medicinales es utilizada en infusiones (té de morera), se usa tradicionalmente en la alimentación de rumiantes, en ciertas partes de India, China y Afganistán, pero fue solo en los ochenta que empezó el interés en su cultivo intensivo y su uso en la alimentación de animales domésticos, como ornamental y como forraje animal. Sus múltiples usos han sido reconocidos, las frutas del *Morus alba* son depurativas, contienen potasio, fósforo, calcio y vitamina C (Sánchez y Rosales, 2000).

El contenido de proteínas de las hojas y tallos tiernos, con un excelente perfil de aminoácidos esenciales, varía entre 17-28% dependiendo de la variedad (Benvides, 2000).

En análisis realizados mediante técnicas de cromatografía líquida a hojas de plantas de campo de Morera se encontraron alcaloides, esteroides (triterpenos, saponinas, flavonoides) (Gutiérrez y Roa, 2003).

Dentro de los compuestos del metabolismo de las plantas están los alcaloides los cuales forman una amplia y variada familia de metabolitos secundarios siendo de gran importancia farmacológica. La mayoría de los alcaloides provienen del metabolismo de los aminoácidos, principalmente tirosina, triptófano, arginina y lisina y aunque algunos alcaloides se encuentran en varios géneros la mayoría de las especies presentan un patrón único genéticamente determinado y su distribución está restringida a determinados órganos de la planta (Croteau *et al.*, 2000).

La biosíntesis y acumulación de alcaloides están bajo un estricto control del desarrollo celular y las condiciones ambientales (De Luca y St Pierre, 2000).

Otro de los productos secundarios de plantas son los flavonoides que son conocidos por las características rojas, azules y pigmentos antocianinos púrpura que le confieren a los tejidos de las plantas. Estos compuestos ejercen una función esencial en la reproducción por reclutamiento de polinizadores y semillas dispersas. Los flavonoides son notablemente un diverso grupo de productos secundarios, tienen funciones biológicas incluyendo roles en la protección de estrés. Los flavonoides están presentes en la célula de la epidermis de hojas y en tejidos que son susceptibles a la luz UV, como el polen y meristemo apical (Winkel, 2002). Estos flavonoides pueden utilizarse como suplemento nutricional, junto con vitaminas y minerales. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas (Formica y Regerson, 1995).

## **2.2. Cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios**

El cultivo de tejidos presenta aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas, tales como: mejoras genéticas, multiplicación vegetativa (micropropagación), obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, obtención de haploides y líneas isogénicas, conservación de germoplasma, críoconservación, cultivo de células y protoplastos (Pierik, 1990) y más reciente la utilización de las técnicas biotecnológicas para la producción de metabolitos secundarios (Gleba *et al.*, 1999; Smith, 2000).

El papel de la diferenciación morfológica y celular en la producción de metabolitos secundarios ha sido estudiado ampliamente. Existe una estrecha relación entre diferenciación y metabolismo secundario y ha sido ilustrada en muchos cultivos de planta, posiblemente porque el crecimiento sin diferenciación es incompatible con la expresión de los metabolitos secundarios (Moreno-Valenzuela *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001).

Es conocido que ciertos niveles de diferenciación de tejidos o células en el cultivo de plantas son importantes y esenciales para la síntesis y acumulación de los metabolitos secundarios, estas estructuras diferenciadas están conectadas con la biosíntesis, transporte y almacenamiento de metabolitos secundarios (Xie *et al.*, 1998).

Las condiciones de cultivo pueden acentuar o atenuar las vías biosintéticas, abriendo las posibilidades de producir nuevos tipos de compuestos cercanamente relacionados a la actividad biológica pero con propiedades mejoradas (Steven, 1998).

La selección de células productivas y las condiciones de cultivo resultan de interés para la acumulación de productos importantes los cuales aparecen en altos niveles en el cultivo de células. Con el objetivo de obtener altas concentraciones por la explotación comercial los esfuerzos están enfocados a la estimulación de actividades biosintéticas usando varios métodos para el cultivo de células (Dixon, 1999; Ramachandra, 2000).

Un número de factores físicos y químicos como los componentes del medio de cultivo, fitohormonas, ph, temperatura, aireación, agitación, luz, afectan la producción de metabolitos

secundarios los cuales han sido estudiados por varios autores (Lee y Shuler, 2000; Wang *et al.*, 2001; Goleniowski y Trippi, 1999).

Durante los últimos 50 años se han incrementado los estudios en metabolitos secundarios de plantas. Las técnicas de cultivo de células de plantas fueron introducidas a finales de los años 60 como una posible herramienta para el estudio y la producción de metabolitos secundarios (Bourgaud *et al.*, 2001).

El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* para la producción de sustancias activas se ha incrementado ampliamente (Verpoorte *et al.*, 2000; Springob y Saito, 2002). Varios ejemplos corroboran esta afirmación: alcaloides (Zhao *et al.*, 2000); antocianinos, carotenoides (Shibli *et al.*, 1997; Miyanaga *et al.*, 2000); flavonoides (Fang *et al.*, 1998; Bohm *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005); verbascósido (Nezbedova *et al.*, 1999); paclitaxel (Navia-Osorio *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001); coumarinas (Massot *et al.*, 2000); artemisiana (Xie *et al.*, 2000); ácido rosmarínico (Kim *et al.*, 2001).

La mayor ventaja del sistema de cultivo *in vitro* sobre el cultivo convencional es que se pueden obtener sustancias de gran utilidad (metabolitos secundarios) bajo condiciones controladas independientemente de cambios climáticos y condiciones de suelo, cultivo de células libres de patógenos, se puede multiplicar el rendimiento de metabolitos específicos, control automatizado del crecimiento celular y regulación racional del proceso reduciendo los costos y mejorando la productividad (Vanisree *et al.*, 2004).

Hancock *et al.* (2002) plantea que a diferencia del cultivo *in vitro*, las plantas en condiciones de campo están expuestas a factores ambientales bióticos (interacción con patógenos) y abióticos (sequía, contaminantes, luz ultravioleta y temperaturas extremas).

Además es posible reducir los costos e incrementar la productividad mediante el control automatizado del crecimiento celular y la regulación de los procesos metabólicos; contar con sistemas de producción definidos, calidad uniforme y rendimientos constantes del producto, así como la posibilidad de establecer sistemas estrictos de control de la calidad, para disponer de

un producto independiente de los cambios ambientales (Vanisree *et al.* 2004; Morgan *et al.*, 2000). El cultivo *in vitro* ofrece también la posibilidad de sintetizar proteínas foráneas en determinadas situaciones que incluyen proteínas terapéuticas, proteínas antigénicas.

A través del cultivo de células es posible inducir procesos morfogénicos que pueden dar lugar a la formación de un material específico (embriones, raíces, hojas), lo cual es muy ventajoso ya que algunos de estos productos secundarios solo se producen cuando las estructuras indiferenciadas son inducidas a la diferenciación, ya sea por vía organogénica o embriogénica y algunos de ellos se producen en mayor medida en órganos específicos (Misawa, 1994).

Debido a los factores anteriormente señalados se ha incrementado el interés por el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios de uso farmacéutico, Vanisree *et al.* (2004) describen las ventajas que estas ofrecen tales como:

- 1.- Producción en condiciones controladas, evitando los riesgos de la producción en campo debido a cambios en las condiciones ambientales.
- 2.- Sistemas de producción definidos.
- 3.- Calidad uniforme y rendimientos constantes del producto.
- 4.- Posibilidad de establecer sistemas estrictos de control de la calidad.
- 5.- Disponibilidad del producto independiente de los cambios ambientales.

### **2.2.1. Cultivo de células**

El empleo del cultivo de células y de tejidos de plantas para la biotransformación específica de compuestos naturales ha sido demostrado por varios autores (Krings y Berger, 1998; Ravishankar y Ramachandra Rao, 2000).

El cultivo de células de plantas representa una fuente potencial para la obtención de compuestos medicinales, fragancias, colorantes, nutrientes y cosméticos (Gleba *et al.*, 1999).

La producción de metabolitos secundarios en las suspensiones celulares ha impactado sustancial y ampliamente en la Biología y la tecnología de la formación de productos (Kurz *et al.*, 1998).

El cultivo de células no solo provee una herramienta para la síntesis de compuestos naturales, sino que permite además la bioconservación de componentes de bajo valor en productos de alto valor (Misawa, 1994).

Sin embargo, existen pocos ejemplos exitosos de la aplicación comercial de los procesos de cultivo de células para la obtención de metabolitos secundarios. Los principales problemas son la baja productividad, la inestabilidad de las líneas celulares y la dificultad para realizar el escalado de la producción (Zhong, 2001).

Como ha descrito Xu *et al.* (1999) los cultivos de suspensiones celulares de plantas muestran una tendencia a formar agregados celulares de gran tamaño durante el cultivo porque algunos polisacáridos secretados por las células de planta incrementan la viscosidad del sistema de cultivo en las últimas etapas, estos agregados están bien organizados y algunas estructuras diferenciadas se formaron en el cultivo. Estas estructuras funcionalmente transportan oxígeno y nutrientes entre el interior y el exterior de los agregados y están muy relacionados con el metabolismo secundario pues para la producción y el almacenamiento de muchos metabolitos secundarios es requerido un cierto nivel de diferenciación (Zhao *et al.*, 2001).

Cultivos indiferenciados o callos necesitan una capacidad biosintética para unir moléculas complejas o el grado de citodiferenciación requerido para separar estas moléculas una vez sintetizadas. Muchos metabolitos secundarios no se encuentran en cultivos de callos y en casos donde se ha detectado la concentración es usualmente mucho más baja que en plantas (Steven, 1998).

Zhao *et al.* (2000) encontraron alcaloides (serpentina, ajmalicina, catharanthina) en cultivo de suspensiones celulares de *Catharanthus rosseus*, Massot *et al.* (2000) furano-coumarina en el cultivo de brotes de *Ruta graveolens*; Pereira *et al.* (2000) y Kim *et al.* (2001) ácido rosmarínico en el cultivo de callos y suspensiones celulares de *Agastache rugosa*.

Hasta el momento la mayoría de las investigaciones relacionadas con la producción de metabolitos secundarios empleando cultivos *in vitro* de plantas han estado centradas en la

utilización de tejidos indiferenciados (callos, suspensiones celulares) para lo cual se han empleado las tecnologías desarrolladas anteriormente para la multiplicación de microorganismos basadas en el empleo de biorreactores (Gibson, 1993; Ketchum and Gibson, 1996; Dornenberg y Knorr, 1997; Havkin-Fenkel, 1997). Sin embargo se conoce que la producción de estos metabolitos no es uniforme en todas las partes de la planta y en la mayoría de los casos se produce en un órgano o tejido específico, de ahí la importancia de poder cultivar y producir biomasa de estos tejidos como fuente para la purificación de metabolitos de interés.

Según Dougall (1981) el cultivo de suspensiones celulares constituye un buen material biológico para el estudio de rutas biosintéticas y comparado con el cultivo de callos ha sido posible aislar moléculas a partir de una gran cantidad de células producidas.

Suspensiones celulares en sistemas con agitación de *M. elliptica* fueron establecidas para la producción de compuestos activos (Abdullah *et al.*, 2000) estudiaron los efectos de las diferentes estrategias del medio, aireación y modo de operación en biorreactores para la producción de antraquinonas. Stalman *et al.* (2003) encontraron que mediante el cultivo de suspensiones celulares de *M. citrifolia* es posible la obtención de compuestos activos como las antraquinonas, el cual fue 2,17 veces mayor que el que se obtiene a partir de la raíz de la planta.

Ishiguro *et al.* (1995) aislaron mediante el cultivo de callos en diferentes especies de *Paeonia*, seis triterpenos nuevos que no se encuentran en plantas en condiciones naturales, así como una nueva xantona a partir del cultivo de callos en *Hipericum patulum* (Ikuta *et al.*, 1995).

Ha sido descrita la producción de compuestos medicinales utilizando el cultivo de células en suspensión por lo que ha sido establecido este sistema de cultivo para la producción de taxol (alcaloide diterpeno) en *Taxus mairei*, imperatorin en *Angelica dahurica*, y diosgenin en *Dioscorea doryophora* (Lee *et al.*, 2004).

### 2.2.2. Cultivo de órganos

El cultivo de órganos representa una alternativa interesante para la producción de productos secundarios de plantas, dos tipos de órganos son considerados generales para estos objetivos: cultivo de brotes y raíces (Baiza *et al.*, 1999).

Diferentes estrategias empleando sistemas *in vitro* (cultivo de células indiferenciadas) han sido principalmente estudiadas pero un gran interés ha sido mostrado en el cultivo de raíces y otros órganos con el objetivo de mejorar la producción de compuestos secundarios de plantas (Bourgaud *et al.*, 2001).

Ketchum *et al.* (1999) y Wang *et al.* (2001) obtuvieron paclitaxel y otros taxoides a partir de diferentes sistemas de cultivo de tejidos, incluyendo callos, suspensiones celulares, brotes, raíces y cultivos embriogénicos en *Taxus sp.*

Varios reportes muestran que el cultivo de órganos puede ser una mejor fuente de obtención de metabolitos secundarios comparado con el cultivo de células. El cultivo de brotes (cultivos de tejidos de rápida proliferación) ha sido investigado como fuentes de aceites esenciales, alcaloides encontrados en hojas o tejido de tallos. Por ejemplo el cultivo de raíces y específicamente raíces transformadas muestran un buen crecimiento *in vitro* y producen metabolitos secundarios en cantidades equivalentes, a veces mayor que las producidas por la plantas enteras (Boitel- Conti *et al.*, 1995; Vanek *et al.*, 2005).

Gontier *et al.* (2005) desarrollaron un sistema de bajo costo para la producción de biomasa de brotes de *Ruta graveolens* y la obtención de furanocoumarinas, basados en la inmersión temporal. Se obtuvo 1.6g de masa seca por día y una productividad de 3.8mg de furanocoumarinas, valores superiores a los que se obtuvieron mediante el cultivo de brotes en agitación y en biorreactores clásicos.

Vanek *et al.* (2005) emplearon diferentes sistemas de cultivo a gran escala para la multiplicación de raíces adventicias de *Panax ginseng*. El mayor contenido de saponinas de

28.51 mg.g<sup>-1</sup> de la masa seca fue encontrado en las raíces adventicias cultivadas en los sistemas de inmersión temporal RITA.

### **2.3. Relación entre la producción de biomasa y la acumulación de metabolitos secundarios**

La mayoría de los metabolitos secundarios son producidos durante la fase estacionaria del cultivo. Durante las etapas tempranas cuando el crecimiento es muy activo las cadenas de carbono están principalmente distribuidas para el metabolismo primario (estructuras celulares y procesos respiratorios), por otra parte cuando se detiene el crecimiento las cadenas de carbono largas no son necesarias en grandes cantidades para el metabolismo primario y los compuestos secundarios son sintetizados activamente (Bourgaud *et al.*, 2001). Si los productos metabólicos son producidos al final de la etapa de crecimiento es lógico considerar un proceso que incluya dos etapas. Por otra parte cuando la producción del metabolito está asociada al crecimiento, una sola etapa es suficiente para el crecimiento celular y la acumulación de las moléculas.

Nuevas actividades enzimáticas ausentes durante la fase exponencial aparecen durante la fase estacionaria, por lo que varios autores hacen mención a una posible diferenciación bioquímica de las células cuando se detiene el crecimiento celular (Payne *et al.*, 1991). Sin embargo, se conoce que algunos productos secundarios como los carotenos están asociados a la etapa de crecimiento de células indiferenciadas (Bourgaud *et al.*, 2001).

En ocasiones la producción de estos productos secundarios no está relacionada con el crecimiento y división celular. Por tanto los mayores ritmos de producción se alcanzan durante los bajos ritmos de crecimiento, con frecuencia ocurre bajo condiciones significativas de estrés fisiológico o bioquímico de las células (Vanisree y Tsay, 2004).

### **2.4. Nuevos compuestos obtenidos a partir del cultivo *in vitro***

Las plantas son una fuente importante para el descubrimiento de nuevos productos de interés medicinal y terapéutico. En muchos casos, los compuestos ausentes en la planta madre son encontrados en los cultivos de células. Collin (2001) comprobó que el cultivo de callos de cacao

*Theobroma* contenía notablemente bajos los niveles de cierto polifenoles con relación a la planta madre, y la mayor parte de polifenoles encontrados en el cultivo de callos no fueron descubiertos en la planta. En el cultivo de callos y suspensiones celulares de *Andrographis paniculata* se produjeron tres nuevos sesquiterpenos (lactonas) pero no el andrografolidos (diterpenos) producidos por la planta intacta, atribuyendo este metabolismo anormal de terpenos a la carencia de tejidos organizados en estos cultivos de células.

Investigaciones realizadas en cultivo de suspensiones celulares de *M. elliptica* mostraron la posibilidad de producir compuestos que no han sido obtenidos a partir de la planta original (Jasril *et al.*, 2000).

Las células de zanahoria no sintetizan antocianinas cuando son cultivadas en un medio de cultivo con 2,4-D. Una vez transferidos sin 2,4-D la formación de antocianinas se induce. Se sugiere que existe una correlación entre diferenciación morfológica, síntesis de antocianinas y diferenciación metabólica porque se permite relacionar el efecto de la producción de metabolitos secundarios con la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Constabel y Kurz, 1999).

En el cultivo de suspensiones (Nasif *et al.*, 2000) encontraron como ingrediente activo la antraquinona en *Cassia acutifolia*, en especies de *Catharanthus roseus* (Zhao *et al.*, 2001) determinaron la catharanthina como ingrediente activo en cultivo de suspensiones (Taniguchi *et al.*, 2002) triterpenos en callos de *Eriobotrya japonica* (Orihara *et al.*, 2002) diterpenos en suspensiones celulares de *Torreya nucifera*.

#### **2.4.1. Métodos de análisis químico**

La metabolómica es la ciencia que estudia los metabolitos presentes en una muestra biológica (Le Gall *et al.*, 2005), numerosas técnicas han sido empleadas para este fin como la Cromatografía de gases (CG), Cromatografía líquida (CL), Espectrometría de masa (EM) (Yamazaki *et al.*, 2003) y la Resonancia magnética nuclear (RMN). Muchos métodos de genómica funcional no aceptan los análisis de los componentes bioactivos denominados

metabolitos (Vorst *et al.*, 2005). El análisis del complemento del metabolito de la célula no está realizado, se designa de forma general como metabolómica, algo que todavía no ha sido desarrollado (Fiehn, 2002; Sumner *et al.*, 2003; Weckwerth *et al.*, 2004; Bino *et al.*, 2004). Actualmente notables avances han sido obtenidos con la Cromatografía de gases-Espectrofotometría de masa (CG-EM) (Fiehn *et al.*, 2000; Roessner *et al.*, 2000, 2001; Wagner *et al.*, 2003) y en menor grado la cromatografía líquida-espectrofotometría de masa (LC-MS) (Huhman y Summer, 2002; Tolstikov *et al.*, 2003; Von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2004; Vorst *et al.*, 2005).

Sin embargo el uso de estas tecnologías es a menudo limitado, debido al tamaño de las muestras a analizar y la complejidad de las bases de datos obtenidos. Combinando los resultados obtenidos de varias muestras biológicas en un simple análisis diferencial se requiere un arduo trabajo para comparar los picos de las sustancias representados en los cromatogramas. Tienen como desventaja que una directa relación de los perfiles metabólicos basados en la identidad de los picos no es muy factible, pues muchos picos cromatográficos pueden ser solo identificados con un grado limitado de certeza (Vorst *et al.*, 2005).

Los análisis realizados mediante HPLC en callos de *Salvia miltiorrhiza* revelan bajas concentraciones de criptotanchinona, al analizar la concentración de este diterpeno en callos cultivados en omisión de auxinas los niveles fueron superiores (Wu *et al.*, 2003).

Análisis mediante HPLC y espectrofotometría de masa (LC/MS) permitieron determinar la presencia de paclitaxel y otros taxoides en extractos de plantas de *Taxus* cultivadas *in vitro* y en el cultivo de células. El método analítico es aplicado en la caracterización y el estudio de líneas celulares, proporcionando interesantes resultados concernientes a la biosíntesis de taxanes (Georgios *et al.*, 1999).

En el cultivo de callos de *Salvia miltiorrhiza* encontraron mediante análisis en HPLC que el contenido de criptotanshinona es significativamente mas alto que el crudo de droga (Wu *et al.*, 2003).

# Materiales y Métodos

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de Metabolitos Secundarios y Propagación Masiva de Plantas, del Instituto de Biotecnología de las Plantas en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y los análisis químicos se realizaron en la Compañía AnalytiCon en Postdam, (Alemania), durante el período comprendido entre Enero de 2004 y Noviembre de 2005.

#### **3.0. Procedimientos generales**

Para la producción de la biomasa *in vitro* de las especies seleccionadas (*Morinda royoc* L, *Psidium guajava* L var “EEA18-40”, *Morus alba* L var “Criolla”), se siguieron los protocolos propuestos en cada sistema de cultivo: multiplicación de brotes en medios de cultivo semisólidos, establecimiento y multiplicación de callos y suspensiones celulares según Reyes (2003), Caballero (2001), Salas (2004), los cuales son descritos a continuación en el acápite 3.1.

Los instrumentos utilizados para la manipulación aséptica del material vegetal tales como placas de Petri, Erlenmeyers, frascos de cultivo y mallas para filtrar, se esterilizaron en estufa a 180°C de temperatura durante dos horas y las pinzas y espátulas fueron esterilizados mediante una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% según la metodología propuesta por Agramonte *et al.* (1993).

La composición específica de los diferentes medios de cultivo tanto en estado semisólido como líquido se define en cada acápite según la metodología de cada especie en estudio, ajustándose siempre el pH a 5.8 previo a la esterilización.

Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave vertical a una temperatura de 121°C y una presión de 1.2 Kg cm<sup>-2</sup> durante 20 minutos. Los medios de cultivo en estado líquido para las suspensiones celulares se prepararon y esterilizaron en frascos de cristal de 500 mL de volumen total, a razón de 250 mL de medio de cultivo por frasco. Los medios de cultivo en

estado semisólido para la formación y la multiplicación de callos se dosificaron en frascos de cristal de 250 mL de capacidad, a razón de 30 mL de medio de cultivo por frascos.

Todas las operaciones de disección y transferencia se realizaron en cabinas de flujo laminar horizontal.

### **3.1. Producción de biomasa en las especies en estudio (*Morinda royoc* L, *Psidium guajava* var “EEA18-40”, *Morus alba* var “Criolla”)**

#### ***Morinda royoc* L**

##### **Plantas en Invernadero**

Se utilizaron para la toma de las muestras plantas de dos años de edad procedentes del Banco de donantes establecido en la Biofábrica de las Flores plantadas en bolsas de Polietileno con capacidad para 15 Kg de sustrato (Figura 1). El sustrato utilizado fue suelo pardo (60%), estiércol vacuno con 2 años de descomposición (30%) y zeolita (10%), el cual fue previamente desinfectado con vapor durante dos horas.



**Figura 1.** Plantas de *Morinda royoc* procedentes del banco de donantes en Invernadero.

##### **Establecimiento y multiplicación *in vitro***

El establecimiento *in vitro* se realizó según metodología descrita por Reyes (2003). Fueron utilizadas yemas apicales y axilares procedentes de plantas del banco de donantes de la Biofábrica de Flores. Cada yema tenía un par de hojas y un tamaño promedio de 1.0-1.5 cm.

Para la fase de establecimiento el medio de cultivo en estado líquido estuvo compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), el cual a partir de este momento se nombrará como medio de cultivo MS y suplementado con  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de Tiamina,  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de Mioinositol,  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y Sacarosa al 3.0 %. Para la multiplicación de los explantes se empleó el medio de cultivo compuesto por las sales MS suplementado con  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de Tiamina,  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de Mioinositol,  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BAP,  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de Ácido Indolacético (AIA), 3.0% de sacarosa y gelificado con Agar (SIGMA Chemical Co) a razón de  $7.0 \text{ g.L}^{-1}$ . Se colocaron siete explantes por frasco y los subcultivos fueron realizados cada 60 días según Reyes (2003). La figura 2 muestra las plantas en fase de multiplicación.



**Figura 2.** Brotes de *M. royoc* en fase de multiplicación *in vitro*, a los 60 días de cultivo.

Los explantes se colocaron en cámaras de crecimiento con luz natural con una intensidad luminosa de  $100\text{-}125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y una temperatura promedio de  $26\pm 2^\circ \text{C}$ .

### **Inducción y formación de callos**

Se emplearon como explantes iniciales secciones de hojas de brotes cultivados *in vitro* en fase de multiplicación, obtenidos según metodología descrita en el acápite anterior. Se tomaron segmentos foliares con un tamaño de  $1 \text{ cm}^2$  y se colocaron con la parte adaxial en contacto directo con el medio de cultivo. Se inocularon cuatro explantes por frasco de cultivo que contenían el medio de cultivo propuesto por Söndahl *et al.* (1991) para la inducción, formación y multiplicación de callos, el cual se basa en las sales MS suplementadas con  $4.0 \text{ mg.L}^{-1}$  Tiamina,

100 mg.L<sup>-1</sup> Mioinositol, 25 mg.L<sup>-1</sup> Cisteína, 2.15 mg.L<sup>-1</sup> Kinetina, 1.0 mg.L<sup>-1</sup> Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), 3.0 % Sacarosa y gelificado con 3.0 g.l<sup>-1</sup> Phytigel. Los subcultivos se realizaron cada 30 días. La figura 3 muestra los callos en fase de multiplicación.



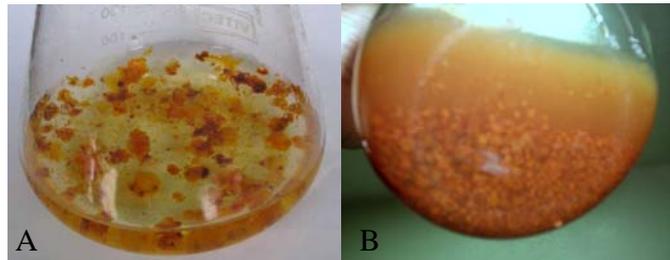
**Figura 3.** Callos de *Morinda royoc* en fase de multiplicación a los 30 días de cultivo.

Todo el proceso de formación y multiplicación de callos se realizó en condiciones de oscuridad y a una temperatura de  $28 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ .

### **Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares**

Para el establecimiento de las suspensiones celulares se tomaron los callos obtenidos según el acápite anterior y se colocaron en Erlenmeyers de 300 mL de capacidad con 50 mL del medio de cultivo propuesto por Abdullah *et al.* (1998) para *Morinda elliptica*, el cual estaba compuesto por las sales MS suplementadas con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de Ácido Naftalenacético (ANA), 0.5 mg.L<sup>-1</sup> Kinetina y 3.0 % Sacarosa.

Se inocularon los frascos con una densidad de 100 g de masa fresca por litro (gMF. L<sup>-1</sup>) y cada diez días se añadieron 10 mL de medio de cultivo. A medida que las suspensiones celulares se multiplicaron, se realizó un filtrado a través de una malla con un tamaño de poro de 450  $\mu\text{m}$  y fueron subcultivadas cada 21 días de cultivo.



**Figura 4.** Suspensiones celulares de *Morinda royoc* en fase de establecimiento (A) y en fase de multiplicación (B).

Los Erlenmeyers fueron colocados en un agitador orbital modelo Rotatest (Bioblock Scientific) a una velocidad de agitación de 100 r.p.m., con una temperatura de  $28 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$  y en condiciones de oscuridad.

#### ***Psidium guajava* L var “EEA18-40”**

##### **Plantas en condiciones de campo**

Las plantas seleccionadas para la toma de las muestras tenían seis años de edad (Figura 5) y proceden de la Estación Experimental “Pedro Lantigua” ubicada en el municipio de Remedios, perteneciente al Instituto de Biotecnología de las Plantas de Villa Clara, a las cuales se le realizaron atenciones culturales según instructivo técnico de la guayaba (MINAGRI, 1985).



**Figura 5.** Plantas de *Psidium guajava* cultivadas en campo.

##### **Establecimiento y multiplicación *in vitro***

El establecimiento y la multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* se desarrolló según la metodología propuesta por Caballero (2001), la cual emplea como explantes iniciales segmentos nodales de plantas seleccionadas en condiciones de casa de cultivo.

Para la fase de establecimiento se utilizó el medio de cultivo compuesto por las sales MS, suplementado con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de Tiamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de Mioinositol, 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y 3.0 % de Sacarosa. Para la multiplicación de los explantes se empleó el medio de cultivo compuesto por las sales MS suplementado con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de Tiamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de Mioinositol, 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), 3.0% de Sacarosa y gelificado con Agar (SIGMA Chemical Co) a razón de 7.0 g.L<sup>-1</sup>. Se colocaron 10 explantes por frasco, los subcultivos se realizaron cada 28 días (Figura 6).



**Figura 6.** Brotes de *Psidium guajava* en fase de multiplicación a los 28 días de cultivo.

El material vegetal en fase de establecimiento y multiplicación se colocó en cámaras de crecimiento con luz natural con una intensidad luminosa de 100-125  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y una temperatura promedio de  $26\pm 2^\circ\text{C}$ .

### ***Morus alba* L var “Criolla”**

#### **Plantas en condiciones de campo**

Las plantas utilizadas para la toma de las muestras proceden del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Álvaro Barba de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Esta plantación tenía cuatro años de edad (Figura 7).



**Figura 7.** Plantas de *Morus alba* cultivadas en campo.

### **Establecimiento y multiplicación *in vitro***

Para el establecimiento y multiplicación *in vitro* se utilizaron yemas apicales de plantas seleccionadas en campo y multiplicadas según la metodología propuesta por Salas (2004).

En la fase de establecimiento el medio de cultivo líquido estuvo compuesto por las sales MS, suplementado con 100 mg.L<sup>-1</sup> de Mioinositol, 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de Tiamina, 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y Sacarosa al 3.0 %. Para la multiplicación de los brotes se empleó el medio de cultivo compuesto por las sales MS suplementado con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de Ácido Naftalenacético (ANA), 3.0 % de Sacarosa gelificado con Agar (SIGMA Chemical Co) a razón de 7.0 g.L<sup>-1</sup>. Se colocaron cuatro brotes por frasco de cultivo, el tiempo de cultivo para la multiplicación fue de 28 días. Los brotes en fase de multiplicación se muestran en la figura 8.



**Figura 8.** Brotes *in vitro* de *Morus alba* a los 28 días de cultivo.

El material vegetal durante las fases de establecimiento y de multiplicación se colocó en cámaras de crecimiento con luz natural con una intensidad luminosa de 100-125  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y una temperatura promedio de 26±2° C.

### **3.2. Análisis del contenido de metabolitos de las especies en estudio**

#### **3.2.1. Preparación de las muestras y obtención de los extractos**

Plantas en campo o invernadero:

Se colectaron hojas de ramas jóvenes de plantas cultivadas en campo (*Psidium guajava*, *Morus alba*) o plantas de invernadero (*Morinda royoc*). Se pesaron 10 g de masa fresca foliar de cada una de las muestras y se secaron en una estufa a 40 °C durante 48 horas hasta lograr un peso constante.

Biomasa producida *in vitro*:

En todas las especies en estudio, las muestras de brotes fueron tomadas siempre del tercer o cuarto subcultivo de multiplicación, mientras que las muestras de callos se tomaron siempre en el segundo subcultivo de multiplicación.

Las suspensiones celulares (solo utilizadas en la especie *Morinda royoc*) fueron tomadas a los 21 días de cultivo. Los agregados celulares fueron colectados en filtros de 80 µm y se cosechó la biomasa producida.

Para cada una de las especies se determinó la masa fresca y la masa seca. Las muestras fueron pesadas en balanza digital para cuantificar la masa fresca y posteriormente fue secado en estufa a 40 °C durante 48 horas hasta que se mantuvo constante el peso y se determinó la masa seca.

A partir de estos datos fue calculado el contenido de agua en cada uno de los sistemas de cultivo y especies mediante la fórmula siguiente:

$$CA (\%) = \frac{MF-MS}{MF} \times 100$$

Donde:

CA- contenido de agua

MF- masa fresca

MS- masa seca

Las muestras fueron maceradas mediante el empleo de un mortero y posteriormente se empaquetaron en sobres de papel y se conservaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

### **3.2.2. Análisis de los perfiles de compuestos encontrados en las diferentes especies en estudio**

La determinación de metabolitos secundarios en las distintas muestras a analizar se realizó en la compañía AnalytiCon (Potsdam, Alemania), mediante técnicas de cromatografía líquida y espectrofotometría de masa (HPLC-ESI-MS).

El extracto se obtuvo a partir de 1.5 g de masa seca de cada una de las muestras a analizar, utilizando como buffer de extracción Éter metil terbutil/metanol (MTB-Ether/Metanol) y posteriormente 10mg/mL del extracto fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO).

Las muestras fueron inyectadas automáticamente y separadas utilizando una columna de fase reversa (C18, Phenomenex, USA) y gradiente 5 a 50 % de acetonitrilo. Los compuestos eluidos de la columna fueron detectados mediante un detector de diodo (Diode Array Detector) a 210-600 nm. La masa molecular se determinó por espectrofotometría de masa en modo de ionización por nebulización eléctrica (Electro spray ionization) en modo positivo.

La determinación de los compuestos es automatizada, se realiza la búsqueda de una masa molar relativa comparada con un banco de datos que contiene cerca de 12000 sustancias de plantas (MEGABOLITE ®). Posteriormente se determinaron los grupos químicos a los que pertenecen la mayoría de las sustancias encontradas.

# Resultados y Discusión

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

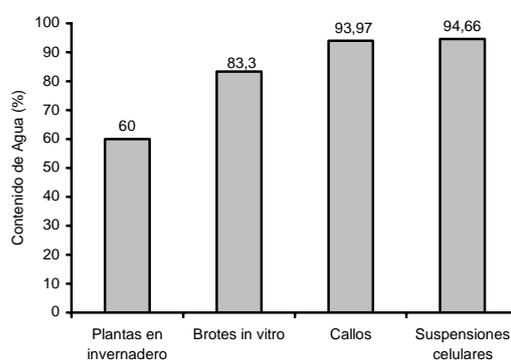
### 4.1. Producción de biomasa en las especies vegetales en estudio (*Morinda royoc* L, *Psidium guajava* var “EEA18-40”, *Morus alba* var “Criolla”)

En todas las especies en estudio se pudo comprobar que el contenido de agua es mayor en el material vegetal obtenido en los sistemas de cultivo *in vitro* con relación a las muestras obtenidas de plantas cultivadas en campo o invernadero (Figuras 9, 10 y 11).

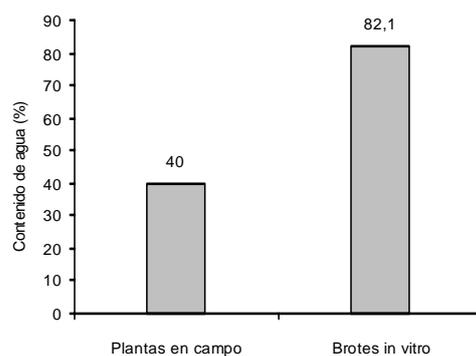
El ambiente *in vitro* difiere del ambiente *ex vitro* en el cual se desarrollan las plantas normalmente, es por eso que frecuentemente se observan cambios fisiológicos y morfológicos en las plantas (Ziv, 1999). El ambiente *in vitro* se caracteriza por presentar una alta humedad relativa (HR) que provoca la saturación de la atmósfera interna del frasco de cultivo y esto trae aparejado malformaciones a nivel de tejido como la carencia de la capa epicuticular de cera en la epidermis e incremento del contenido de agua en los tejidos.

Adicionalmente, la intensidad y calidad de la luz son diferentes (Miyashita *et al.*, 1996; Piqueras y Debergh, 1999), lo cual tiene una fuerte influencia en el desarrollo morfológico. La presencia de sales, reguladores del crecimiento y fuentes de carbono en el medio de cultivo condiciona el crecimiento heterotrófico o mixotrófico de los tejidos (Jeong *et al.*, 1993; Kozai *et al.*, 1997; Nguyen y Kozai, 1998; Kozai, 1999; Piqueras y Debergh 1999). Las concentraciones de CO<sub>2</sub> y etileno (Kitaya *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 1999; Pua, 1999; Zobayed *et al.*, 1999) y la ausencia de microorganismos (Gavidia *et al.*, 1997; Chen y Zic, 2001) también son factores que diferencian notablemente el ambiente *in vitro*.

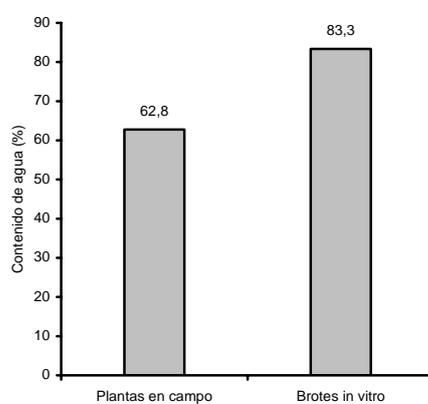
El etileno liberado es producto del metabolismo celular, la cantidad endógena producida junto a la acumulada en la atmósfera gaseosa del frasco de cultivo puede actuar como un estimulante del crecimiento y la diferenciación celular (Pua y Lee, 1995). Por otra parte un control efectivo del ambiente gaseoso puede ofrecer una vía para manipular el crecimiento y la diferenciación del cultivo, debido a que la acumulación de gases como el dióxido de carbono, oxígeno y etileno tiene efectos negativos o positivos en la producción de biomasa y metabolitos secundarios (Hohe *et al.*, 2003).



**Figura 9.** Contenido de agua en muestras de plantas en invernadero y de los diferentes sistemas de cultivo *in vitro* en *Morinda royoc*.



**Figura 10.** Contenido de agua en muestras de plantas en campo y brotes *in vitro* en *Psidium guajava*.



**Figura 11.** Contenido de agua en muestras de plantas en campo y brotes *in vitro* en *Morus alba*.

**Tabla 1.** Relación masa fresca-masa seca en diferentes sistemas de cultivo *in vitro* en la especie *Morinda royoc*.

Sistemas de cultivo	Masa fresca (g)	Masa seca (g)	Relación gMf/gMs
Plantas en invernadero	10	4.0	2.5
Brotos <i>in vitro</i>	12	2.0	6.0
Callos	41.5	2.5	16.6
Suspensiones celulares	15	0.8	18.75

En la tabla 1 se observa que a medida que los cultivos son menos diferenciados (brotos, callos, suspensiones celulares) la relación masa fresca - masa seca es mayor. En los sistemas de cultivo *in vitro* sólo en los brotes existe un alto nivel de diferenciación celular lo cual conduce a la formación y desarrollo de diferentes tejidos como los de sostén y conductivo. Además poseen tejidos de reserva en los que se produce la acumulación de sustancias ergásticas como almidón y reservas lipoprotéicas, así como otras sustancias propias de rutas anabólicas y catabólicas.

En los brotes el alto nivel celular conlleva a que se alcancen altos niveles de materia seca y por lo tanto, la relación masa fresca-masa seca es menor comparado con sistemas de cultivo en los cuales los niveles de diferenciación son bajos como son los callos y las suspensiones celulares.

En el cultivo de callos y suspensiones celulares la relación entre masa fresca y masa seca es mayor por tener una acumulación superior de agua las células, con relación a los brotes cultivados *in vitro*.

Estos sistemas de cultivo indiferenciados poseen un crecimiento desordenado de células favorecido por la presencia de auxinas en el medio de cultivo. Estas células que crecen de forma rápida y desordenada prácticamente no tienen pared y a medida que envejecen o se acercan a la citodiferenciación se produce un notable aumento del contenido vacuolar que le permite la acumulación de metabolitos, por otra parte las suspensiones celulares poseen gran

contenido de agua debido principalmente a las condiciones específicas en las que se desarrollan (TranThanh Van y Gendy, 1995; Constabel y Kurz, 1999).

Aunque varios autores han descrito la producción de metabolitos secundarios a partir de callos y suspensiones celulares en varias especies de *Taxus* (Fett-Neto *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2001; Ketchum y Gibson, 1996) y *Catharanthus roseus* (Moreno-Valenzuela *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000) este no ha sido un proceso reproducible y económicamente factible. Como se ha comprobado los contenidos de materia seca en el cultivo de células son menores que los obtenidos mediante el cultivo de órganos, siendo esta una de las limitantes biológicas a tener en cuenta para definir un sistema de cultivo para la producción de metabolitos a escala comercial, por lo que es necesario combinar el rápido crecimiento y la capacidad de producir altas concentraciones de biomasa con la capacidad inherente de células o tejidos diferenciados de producir metabolitos específicos (Steven, 1998; Moreno-Valenzuela *et al.*, 1998; Verpoorte *et al.*, 2002).

Se conoce que la producción de metabolitos secundarios no es uniforme en todas las partes de la planta y en la mayoría de los casos se produce en un órgano o tejido específico, de ahí la importancia de poder cultivar y producir biomasa de estos tejidos como fuente para la purificación de metabolitos de interés (Verpoorte y Alfermann, 2000).

De esta forma se demuestra que el cultivo de brotes *in vitro* es un método más factible para la producción de biomasa con mayor contenido de materia seca comparado con el cultivo de callos o células. El contenido de agua es muy elevado en el cultivo de callos y las suspensiones celulares, siendo estos, factores limitantes para la producción a escala comercial de compuestos con fines farmacéuticos.

## 4.2. Análisis del contenido de metabolitos de las especies en estudio

### 4.2.1. Preparación de las muestras y obtención de los extractos

Los rendimientos de los extractos en todas las especies en estudio fueron siempre mayores en los sistemas de cultivo *in vitro* en comparación con los obtenidos en plantas en campo o invernadero como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Rendimiento de los extractos obtenidos de cada una de las muestras de plantas en campo o invernadero y de la biomasa producida *in vitro*.

Especies	Sistemas de cultivo	Masa seca (g)	Extracto (mg)	Rendimiento (%)
<i>M. royoc</i>	Plantas en invernadero	1.4	240.59	17.2
	Brotes <i>in vitro</i>	1.3	310.27	23.9
	Callos	1.9	547.89	28.8
	Suspensiones celulares	0.8	347.43	43.4
<i>P. guajava</i>	Plantas en campo	1.7	202.53	11.9
	Brotes <i>in vitro</i>	1.1	248.51	22.6
<i>M. alba</i>	Plantas en campo	1.3	206.67	15.9
	Brotes <i>in vitro</i>	1.2	260.25	21.7

Los mayores rendimientos obtenidos en el proceso de extracción de la biomasa producida *in vitro* pudieran estar asociados a las condiciones controladas en que se desarrolla el proceso, lo cual trae consigo una mayor homogeneidad y calidad del material vegetal.

Una de las grandes ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo en campo es que se pueden obtener sustancias de gran utilidad (metabolitos secundarios) bajo condiciones controladas independientemente de cambios climáticos, condiciones de suelo y libres de patógenos. Hancock *et al.* (2002) plantean que las plantas en condiciones de campo están expuestas a factores ambientales bióticos (interacción con patógenos) y abióticos (sequía, contaminantes, luz ultravioleta y altas temperaturas). Además es posible reducir los costos e incrementar la

productividad mediante el control automatizado del crecimiento celular y la regulación de los procesos metabólicos; contar con sistemas de producción definidos, calidad uniforme y rendimientos constantes del producto, así como la posibilidad de establecer sistemas estrictos de control de la calidad, para disponer de un producto independiente de los cambios ambientales (Morgan *et al.*, 2000; Vanisree *et al.*, 2004).

El cultivo *in vitro* ofrece también la posibilidad de sintetizar proteínas foráneas en determinadas situaciones que incluyen proteínas terapéuticas, proteínas antigénicas (Doran, 2000).

Con el objetivo de mejorar la productividad del cultivo de células o tejidos de plantas, se pueden desarrollar nuevas estrategias tales como la optimización del medio de cultivo, la selección de líneas celulares, la adición de precursores, la transformación genética, inmovilización celular, elicitación y de esta manera diseñar protocolos que regulen la distribución, la cantidad y la calidad del producto seleccionado, así como la producción de nuevas moléculas con fines farmacéuticos, nutricionales y otras sustancias beneficiosas (Hansen y Wright, 1999; Verpoorte *et al.*, 2002; Abdullah *et al.*, 2000 y Chong *et al.*, 2004).

En la tabla 1 también se observa que en *Morinda royoc*, los rendimientos del extracto obtenidos en las suspensiones celulares (43.8 %) es mayor que en los callos (28.8 %) y en los brotes (23.9%).

Los cultivos de suspensiones celulares de plantas generalmente están formados por pequeños agregados en un medio líquido definido que contiene inductores (reguladores del crecimiento) que provocan un crecimiento más homogéneo en relación con las células en el cultivo de callos o brotes en medios semisólidos (Constabel y Kurz, 1999; Zhao, 2000).

También es conocido que en el cultivo de suspensiones celulares ocurre una difusión de metabolitos tóxicos al medio de cultivo, por lo que hay menos interferencia en la extracción y mayor calidad y pureza de los metabolitos. Según Brunakova *et al.* (2005) las suspensiones celulares en ocasiones han sido ambivalentes en la formación de productos, ya que ellas pueden o no mostrar grandes rendimientos cuando están en óptimas condiciones de cultivo.

Según Zhao *et al.* (2001) el cultivo de suspensiones celulares constituye un buen material biológico para el estudio de rutas biosintéticas y comparado con el cultivo de callos ha sido posible aislar moléculas a partir de una gran cantidad de células producidas.

El sistema de cultivo de suspensiones celulares puede ser usado para cultivar a gran escala células de plantas donde los metabolitos secundarios pueden ser extraídos, las ventajas de este método es que pueden producirse productos naturales continuos de origen seguro (Vanisree *et al.*, 2004).

A su vez el cultivo de callos mostró rendimientos superiores a los brotes, lo que se puede explicar por la menor diferenciación celular y homogeneidad de las células presentes en este tipo de estructuras en comparación con los brotes donde hay mayor especialización y presencia de tejido de sostén, empalizado, pared celular, lignificación y suberización, que interfiere en la eficiencia de la extracción.

Pudo constatar que los rendimientos de los extractos de las muestras obtenidas en los sistemas de cultivo *in vitro*, fueron superiores respecto a los rendimientos obtenidos en las muestras de campo. En la especie *Morinda royoc* donde se comparan diferentes sistemas de cultivo *in vitro* se comprobó que a medida que el nivel de diferenciación celular es menor (brotes, callos y suspensiones celulares) se incrementa el rendimiento y la calidad de los extractos.

#### **4.2.2. Análisis de los perfiles de compuestos encontrados en las diferentes especies en estudio**

##### ***Morinda royoc* L**

Los perfiles de los compuestos detectados en las muestras analizadas de la especie *Morinda royoc* se muestran en los cromatogramas contenidos en la Figura 12. A pesar de que hubo diferencias, al detectarse picos de sustancias diferenciales para todas las muestras, se encontró una mayor similitud en los perfiles entre las muestras de las hojas de plantas en campo y los brotes *in vitro*, así como similitud entre los callos y las suspensiones celulares en cuanto a los perfiles de expresión de metabolitos.

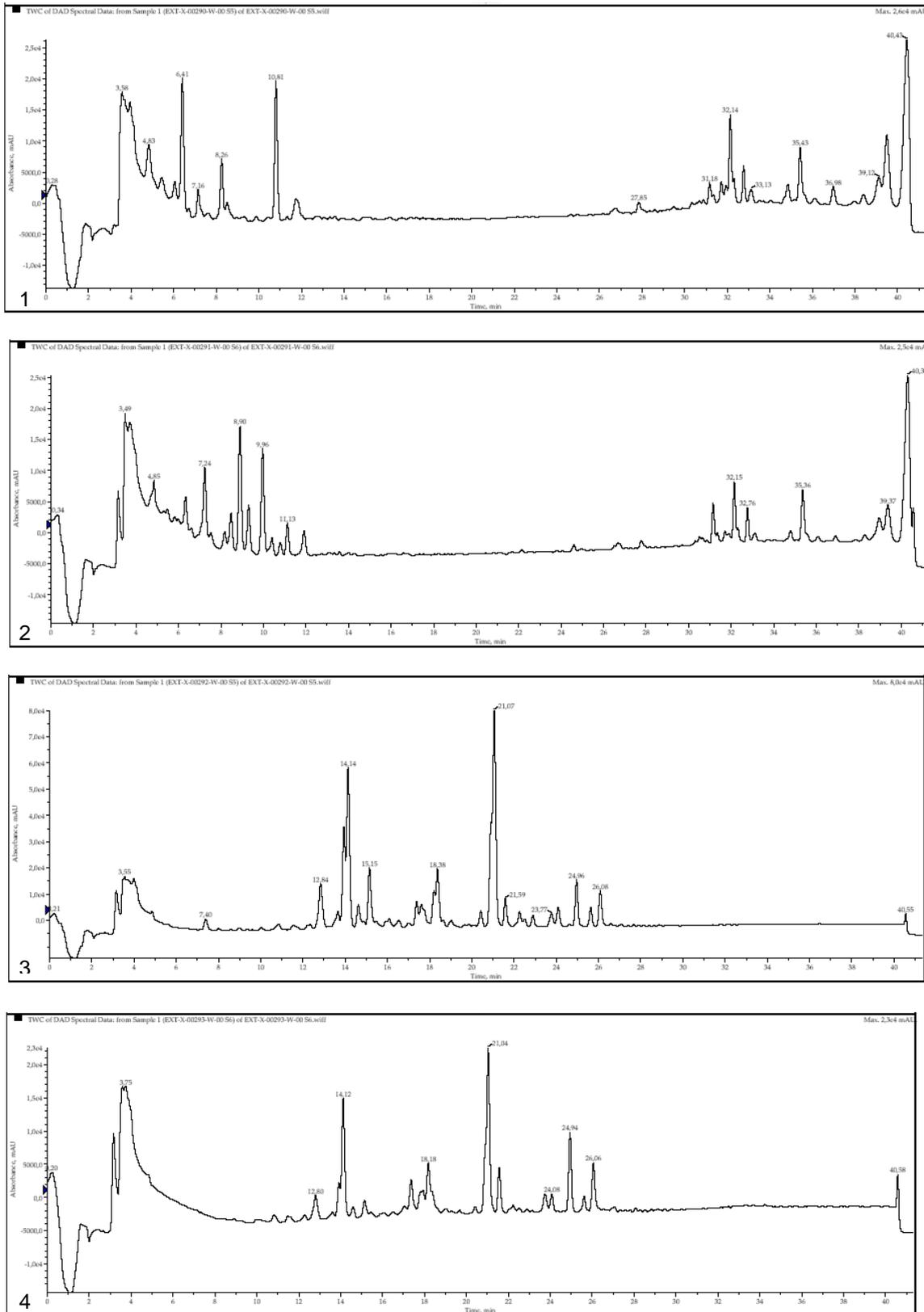
Las diferencias observadas en los perfiles entre hojas de campo-brotes *in vitro* y callos-suspensiones celulares puede explicarse por las distintas fases de desarrollo, organización de tejido y diferenciación celular entre estos tipos de muestras, lo que implica una regulación diferencial de la expresión génica y por consiguiente diferencias en los compuestos obtenidos en los distintos sistemas de cultivo.

Al realizar una comparación individual de cada uno de los compuestos detectados en estas muestras con la base de datos MEGABOLITE® se observaron diferencias en cuanto a la presencia y concentración de los compuestos identificados y no identificados. Los compuestos identificados son aquellos que, basados en los tiempos de retención y datos de masa molecular, mostraron similitud con compuestos en la base de datos. Los compuestos no identificados son aquellos donde no se encontró coincidencia con la base de datos y pueden constituir nuevos compuestos sin antecedentes para la ciencia.

En la tabla 3 se muestran los compuestos aislados en las hojas de las plantas en campo, se logró identificar iridoides (cuchilosido, osmantusido y 10 ácido escandosido) los cuales poseen la misma masa molecular y con una cantidad equimolar entre ellos, a excepción de asperulosido que aparece en mayor concentración (128.6mg/10g) con respecto a los anteriores.

En los brotes *in vitro* el único compuesto identificado fue asperulosido, este compuesto aparece en menor concentración (22.8mg/10g) que en las hojas de las plantas en campo como se muestra en la tabla 4. Se encontraron 19 compuestos no identificados en los brotes *in vitro* que no se encuentran en las hojas de plantas en campo, y los que coinciden con Masas moleculares (817, 820, 826, 936, 774, 914, 916) en ambas muestras la concentración es menor en los brotes *in vitro*.

En el cultivo de callos y suspensiones celulares fue donde se encontró el mayor número de compuestos identificados, los cuales no se aislaron en las hojas de las plantas en campo ni en los brotes *in vitro* (Tablas 5 y 6).



**Figura 12.** Cromatogramas de los análisis de HPLC de muestras de la especie *Morinda royoc*. Plantas en campo (1), Brotes *in vitro* (2), Callos (3), Suspensiones celulares (4).

En el cultivo de callos se encontraron compuestos como aminoácidos (fenilalanina y triptofano), sesquiterpenos (kessilglicol), glicósidos flavonoides (biochanina, cosmosina, negleteina, mateucinol, morindina), glicósidos cardiotónicos (cimarina), flavonas (tevetiaflavona).

Los cultivos de callos y de suspensiones celulares poseen un metabolismo muy activo debido a que en ellos hay constante división mitótica, de ahí que el espectro de compuestos producto del metabolismo primario y secundario sea más amplio.

En los cultivos de callos y suspensiones celulares hubo 33 y 26 ("nuevos") compuestos no identificados respectivamente, que no aparecen en las hojas de las plantas en campo ni en los brotes *in vitro*. Los compuestos comunes en ambos sistemas de cultivo con igual Masa molar (940, 254, 506, 270, 180, 314, 252, 284, 239, 578, 837) aparecen en menor concentración en las suspensiones celulares lo cual puede deberse a diferencias propias en la actividad metabólica en cada uno de ellos y posiblemente también por una mayor difusión hacia el medio de cultivo líquido en las suspensiones celulares.

Steven (1998) plantea que el cultivo de callos ha sido extensivamente investigado para la producción de metabolitos secundarios, por su fácil establecimiento, manipulación y rápido crecimiento. Con frecuencia para investigaciones *in vitro* los cultivos de callos con rápido crecimiento son más convenientes para producir grandes cantidades de tejidos requeridos para la detección de metabolitos secundarios que son encontrados en bajas concentraciones.

Autores como Xu *et al.* (1998) y Zhao *et al.* (2001a) han demostrado que a pesar del bajo grado de diferenciación de las células en el cultivo de callos y suspensiones celulares ha sido posible la producción de metabolitos secundarios de gran interés.

**Tabla 3.** Resumen de los compuestos aislados mediante HPLC-MS en las hojas de plantas en campo de la especie *Morinda royoc*. Rt- Tiempo de retención, MW- masa molecular estimada, Prognosis (mg/10 g) – concentración estimada en mg por cada 10 g de masa seca.

<i>Bioplanta-ID</i>	<i>Taxon</i>	<i>Cultivation</i>	
B-0013	Morinda royoc		

<i>unidentified compounds</i>				<i>identified compounds</i>					
<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Name</i>	<i>CAS</i>
5,07	436	116,7	1	7,34	432	32,4	6	Cuchiloside	123442-38-6
5,07	256	116,7	1	7,34	432	32,4	6	Osmanthuside H	149155-70-4
5,68	418	69,4	1	7,34	432	32,4	6	10Ac-Scandoside	25368-11-0
5,68	450	69,4	1	7,34	432	32,4	6		84553-71-9
6,23	450	54,6	1	8,44	414	128,6	4	Asperuloside	14259-45-1
6,59	817	260,9	2						
10,98	742	37,9	1						
28,40	0	4,0	9						
30,72	521	16,4	17						
31,61	952	12,7	23						
32,07	0	700,6	53						
32,80	816	23,7	83						
32,80	1098	23,7	32						
32,80	590	23,7	8						
32,93	816	28,1	97						
32,93	1098	28,1	34						
33,22	936	119,5	141						
33,67	774	61,9	74						
33,67	794	61,9	25						
33,67	820	61,9	9						
33,88	774	54,4	124						
34,23	914	121,4	91						
34,92	916	39,7	55						

**Tabla 4.** Resumen de los compuestos aislados mediante HPLC-MS en los brotes *in vitro* de la especie *Morinda royoc*. Rt- Tiempo de retención, MW- masa molecular estimada, Prognosis (mg/10 g) – concentración estimada en mg por cada 10 g de masa seca.

<i>Bioplanta-ID</i>	<i>Taxon</i>	<i>Cultivation</i>
B-0014	Morinda royoc	in vitro Sprosskulturen

*unidentified compounds*

<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>
5,03	0	78,7	44
5,67	516	47,5	1
6,51	817	60,6	2
7,42	801	117,3	3
8,65	222	42,1	3
8,65	256	42,1	1
8,65	820	42,1	1
9,08	222	236,1	1
9,08	804	236,1	1
9,48	801	50,6	2
10,14	785	153,1	4
11,31	222	31,6	1
11,31	804	31,6	1
12,10	785	16,4	1
12,10	605	16,4	2
30,68	521	101,7	17
31,60	0	30,6	70
32,11	606	152,7	93
32,27	606	193,1	115
32,51	606	14,6	101
32,51	840	14,6	37
32,92	816	21,8	98
32,92	842	21,8	24
32,92	550	21,8	10
33,19	936	33,5	148
33,19	612	33,5	20
33,32	936	30,2	155
33,66	774	23,7	87
33,85	774	29,9	125
34,20	914	57,6	93
34,85	916	30,2	55

*identified compounds*

<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Name</i>	<i>CAS</i>
8,36	414	22,8	4	Asperuloside	14259-45-1

**Tabla 5.** Resumen de los compuestos aislados mediante HPLC-MS en el cultivo de callos de la especie *Morinda royoc*. Rt- Tiempo de retención, MW- masa molecular estimada, Prognosis (mg/10 g) – concentración estimada en mg por cada 10 g de masa seca.

<i>Bioplanta-ID</i>	<i>Taxon</i>	<i>Cultivation</i>	
B-0015	Morinda royoc	Kallus	

<i>unidentified compounds</i>				<i>identified compounds</i>					
<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Name</i>	<i>CAS</i>
5,07	293	42,2	6	5,82	165	18,3	13	Phenylalanin	3617-44-5
5,82	187	18,3	7	5,82	165	18,3	13	Phenylalanine, Phe	3617-44-5
7,60	158	7,5	8	7,60	204	7,5	11	Tryptophan, Trp	54-12-6
7,60	187	7,5	18	13,84	254	10,8	1	Kessylglycol	6894-57-1
7,60	226	7,5	1	13,84	254	10,8	1		74094-54-5
13,04	284	35,0	2	13,84	284	10,8	1	Biochanin A	491-80-5
13,04	837	35,0	2	14,14	548	68,8	1	17a-Hydroxycalactin	not given
13,04	254	35,0	1	14,34	564	225,1	2		165073-98-3
13,04	239	35,0	1	14,34	564	225,1	2	Cosmosiin	165073-98-3
13,84	284	10,8	1	15,34	416	51,3	1		31008-18-1
14,14	548	68,8	1	17,59	284	11,2	2	Thevetiaflavone/Apige	29376-68-9/520-
14,83	240	23,2	1	17,79	548	18,8	1		26388-47-6
14,83	268	23,2	1	17,79	548	18,8	1	Cymarín, K-Strophanth	508-77-0
14,83	534	23,2	1	18,39	564	16,6	2	Morindin	60450-21-7
16,26	314	11,0	1	18,56	284	25,2	1		1890-99-9
16,26	223	11,0	1	21,77	284	6,4	2		119321-97-0
16,26	253	11,0	1	21,77	284	6,4	2	Negletein	29550-13-8
16,26	269	11,0	1	21,77	284	6,4	2		36052-66-1
17,59	284	11,2	2	25,15	314	14,1	3	Matteucinol	489-38-3
17,59	578	11,2	2						
17,79	548	18,8	1						
18,39	270	16,6	2						
21,26	252	196,7	3						
21,26	239	196,7	2						
21,77	284	6,4	2						
25,15	314	14,1	3						
26,27	506	7,3	2						
31,62	238	9,8	1						
32,26	606	111,7	113						
33,37	818	7,2	27						
33,37	844	7,2	18						
33,88	0	11,0	25						
34,37	940	5,4	21						

**Tabla 6.** Resumen de los compuestos aislados mediante HPLC-MS en suspensiones celulares de la especie *Morinda royoc*. Rt- Tiempo de retención, MW- masa molecular estimada, Prognosis (mg/10 g) – concentración estimada en mg por cada 10 g de masa seca.

<i>Bioplanta-ID</i>	<i>Taxon</i>	<i>Cultivation</i>	
B-0016	Morinda royoc	Zellsuspension	

<i>unidentified compounds</i>				<i>identified compounds</i>					
<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Name</i>	<i>CAS</i>
5,03	0	9,2	44	14,30	564	28,8	2		165073-98-3
12,99	284	3,4	2	14,30	564	28,8	2	Cosmosiin	165073-98-3
12,99	837	3,4	2	17,54	284	3,1	2	Thevetiaflavone/Apige	29376-68-9/520-
15,33	252	1,2	1	18,36	564	11,0	2	Morindin	60450-21-7
17,54	284	3,1	2	21,75	284	2,6	2		119321-97-0
17,54	429	3,1	1	21,75	284	2,6	2	Negletein	29550-13-8
17,54	578	3,1	2	21,75	284	2,6	2		36052-66-1
21,22	239	24,5	2	21,75	284	2,6	2		n. g.
21,22	252	24,5	3	23,94	314	1,0	2	Agrimonolide	21499-24-1
21,75	284	2,6	2	23,94	282	1,0	2		87095-75-8
23,94	314	1,0	2	23,94	282	1,0	2	Chrysin-dimethylether	21392-57-4
23,94	282	1,0	2	23,94	314	1,0	2		140158-59-4
24,26	252	0,9	1	23,94	314	1,0	2	4',5,7-Trimethoxyflava	38302-15-7
25,12	314	7,8	3	23,94	314	1,0	2		520-12-7
25,81	180	0,6	1	23,94	314	1,0	2		59917-40-7
26,23	270	2,9	3	23,94	314	1,0	2		74284-42-7
26,23	506	2,9	2	23,94	314	1,0	2	Anisocoumarin H	123237-86-5
31,59	0	0,8	70	23,94	282	1,0	2	Artemisinin	63968-64-9
31,90	254	0,2	1	24,26	298	0,9	1	Pterocarpin	524-97-0
31,90	266	0,2	1	25,12	314	7,8	3	Matteucinol	489-38-3
32,23	0	19,5	58	26,23	270	2,9	3	Isoimperatorin	482-45-1
32,49	0	0,6	43	26,23	270	2,9	3	1,3,8-Trihydroxy-6-met	518-82-1
33,32	834	2,6	20	33,32	390	2,6	6	Erythrasinate C	ng
33,83	0	0,4	25						
34,30	940	1,6	21						
34,30	310	1,6	2						

Los cultivos indiferenciados necesitan una capacidad biosintética para unir moléculas complejas o requieren un grado de citodiferenciación para separar estas moléculas una vez sintetizadas. El resultado ha sido que muchos metabolitos secundarios no se encuentran en cultivo de callos y en casos donde se ha detectado la concentración es mucho mas baja que en plantas (Steven, 1998).

En el cultivo de suspensiones celulares se encontraron flavonoides de actividad cardiotónica, antraquinonas y otras sustancias como la artemisinina de gran interés farmacéutico que no son producidas en los restantes sistemas de cultivo.

En ambos sistemas de cultivo aparecen compuestos identificados comunes (cosmosina, thevetiaflavona, morindina, mateucinol, negleteina) pero en menor concentración en las suspensiones celulares. La morindina es un compuesto específico del genero *Morinda* y se identificó en el cultivo de callos (16.6mg/10g) y en suspensiones celulares (11.1mg/10g). En el cultivo de callos y suspensiones celulares, generalmente el sitio de almacenaje de flavonoides, alcaloides y glicósidos son las vacuolas, esta acumulación de metabolitos en el cultivo de callos es más frecuente a medida que ellos envejecen y en las suspensiones celulares al final del crecimiento. Según Bourgaud *et al.* (2001), los metabolitos secundarios que son producidos en las suspensiones celulares generalmente se encuentran durante la fase estacionaria. Durante las etapas tempranas cuando el crecimiento es muy activo las cadenas de carbono están principalmente distribuidas para el metabolismo primario (estructuras celulares y procesos respiratorios), cuando se detiene el crecimiento las cadenas de carbono largas no son necesarias en grandes cantidades para el metabolismo primario y los compuestos secundarios son sintetizados activamente. Frecuentemente se observa que muchas de las nuevas actividades enzimáticas ausentes durante la fase exponencial aparecen durante la fase estacionaria, por lo que varios autores hacen mención a una posible diferenciación bioquímica de las células cuando se detiene el crecimiento celular (Payne *et al.*, 1991). Resultados similares a estos se encontraron en callos y suspensiones celulares de la especie *Morinda*

*elliptica* donde se indican altos niveles de antraquinonas en la fase estacionaria coincidiendo con el cese del crecimiento celular (Chong *et al.*, 2004).

La diferencia en la producción de compuestos entre el cultivo de callos y suspensiones celulares con relación a las plantas en condiciones naturales puede ser el resultado de la carencia de diferenciación y organización en los sistemas de cultivo de células, la diferenciación morfológica y celular es necesaria para la expresión de metabolitos secundarios de muchas plantas (Sasse *et al.*, 1998; Constabel *et al.*, 1999).

Stalman *et al.* (2003) encontraron que mediante el cultivo de suspensiones celulares de *M. citrifolia* es posible la obtención de compuestos activos como las antraquinonas, el cual fue 2,17 veces mayor que el que se obtiene a partir de la raíz de la planta.

Rech *et al.* (1998) al realizar estudios con *Rawolfia sellowii* mostraron que en el cultivo de células en suspensión se acumularon al final del estado de crecimiento algunos alcaloides que son encontrados en plantas intactas, siendo la sellowina el compuesto mayoritario encontrado en las células cultivadas *in vitro*.

Milesi *et al.* (2001) en el cultivo de suspensiones celulares de *Ruta graveolens* aislaron compuestos no encontrados en plantas en campo y caracterizaron dos nuevas chalconas en el cultivo de callos. También aislaron nuevos alcaloides tropánicos y antraquinonas en el cultivo de suspensiones celulares de la especie *Belladonna*.

Sato *et al.* (2001) encontraron que en el cultivo de callos y suspensiones celulares de *Andrographis paniculata* se produjeron nuevos sesquiterpenos, pero no el diterpeno producido por la planta intacta, atribuyendo este metabolismo anormal de terpenos a la carencia de tejido organizado en estos cultivos de células.

Wilken *et al.* (2005) establecieron cultivos de órganos y de células en las especies *Lavandula officinalis*, *Hypericum perforatum*, *Cymbopogon citratus* y *Fabiana imbricata* para determinar la producción de compuestos bioactivos comparado con plantas cultivadas en condiciones de campo. Solo en la especie *Lavandula officinalis*, el mayor contenido del compuesto de interés

fue encontrado en el cultivo de células. En las otras tres especies estudiadas el contenido del compuesto fue siempre menor en el cultivo *in vitro* comparado con las plantas en condiciones de campo.

Abdullah *et al.* (1998); Hirazumi y Furusawa (1999); Abdullah *et al.* (2000); Ajaiyeoba *et al.* (2003) emplearon en sus estudios cultivo de células de la especie *Morinda elliptica* que produce antraquinonas con actividad bactericida, fungicida y anti-leucémica.

La fenilalanina es un aminoácido aromático, la cual es efectiva como tratamiento para el dolor de espalda baja, dolores menstruales, migrañas, dolores musculares, de artritis reumatoide y de osteoartritis. También se ha utilizado para el tratamiento del dolor severo de huesos, en pacientes con cáncer prostático metastático (Croteau *et al.*, 2000).

Los iridoides son monoterpenos que son encontrados como constituyente natural en un gran número de familias de plantas, usualmente como glucósidos y juegan un papel importante en las actividades biológicas, tienen actividad cardiovascular, antitumoral, antiviral e inmunomodulador. Presentan distintas propiedades farmacológicas como sedantes y favorecedores del sueño por su acción a nivel del sistema nervioso central, también son importantes sus propiedades antiinflamatorias, y analgésicas (Ghisalberti, 1998).

El osmantosido es uno de los constituyentes de una tableta antioxidante denominada (Pau D' Arco) con propiedades anticancerígeno, antibacterial, antiinflamatoria (Ray, 2004).

Los flavonoides son sustancias fenólicas de actividad antioxidante siendo esa actividad biológica la de mayor interés (Pietta, 2000), poseen además propiedades antiinflamatorias; antitrombóticas; antimicrobianas; antialérgicas; antitumorales; antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa. Se han descrito efectos protectores en patologías tales como la diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, úlcera estomacal y duodenal e inflamaciones, tiene acciones antivirales y antialérgicas, así como propiedades antitrombótica y antiinflamatoria (Flórez *et al.*, 2002).

Se ha reportado en las raíces de la especie *Morinda citrifolia* antraquinonas de actividad carcinogénicas (Duke *et al.*, 1992), laxantes y litolíticos (Pizzorno J and Murray T 1985), asperulosido con actividad antiinflamatoria (Leung Y and Foster S 1995), hipotensivo List H *et al.*, 1979), laxativo (Williamson *et al.*, 1998).

Este informe constituye el primero realizado sobre la detección de morindina en la especie *Morinda royoc*, pues solo había sido descrita con anterioridad en raíces en la especie *Morinda citrifolia* sin actividad biológica reportada (Duke 1992).

Se comprobó que en los cultivos de callos y suspensiones celulares se obtiene un amplio espectro de sustancias, superior a los obtenidos en las muestras de hojas de plantas en campo y brotes *in vitro*, es decir en tejidos menos especializados la gama de compuestos producidos fue superior. Además fue posible detectar compuestos no identificados hasta el momento, en brotes, callos y suspensiones celulares.

#### ***Psidium guajava* var “EEA18-40”**

En los cromatogramas de la Figura 13 se muestran los perfiles de compuestos detectados en las muestras de hojas de plantas en campo y brotes multiplicados *in vitro*. A diferencia de lo observado en la especie *Morinda royoc* donde hubo gran similitud entre los perfiles de compuestos detectados en las hojas de plantas en invernadero y los brotes *in vitro*, en el caso de *Psidium guajava* las muestras de hojas de plantas en campo y los brotes multiplicados *in vitro* presentaron perfiles de expresión completamente distintos.

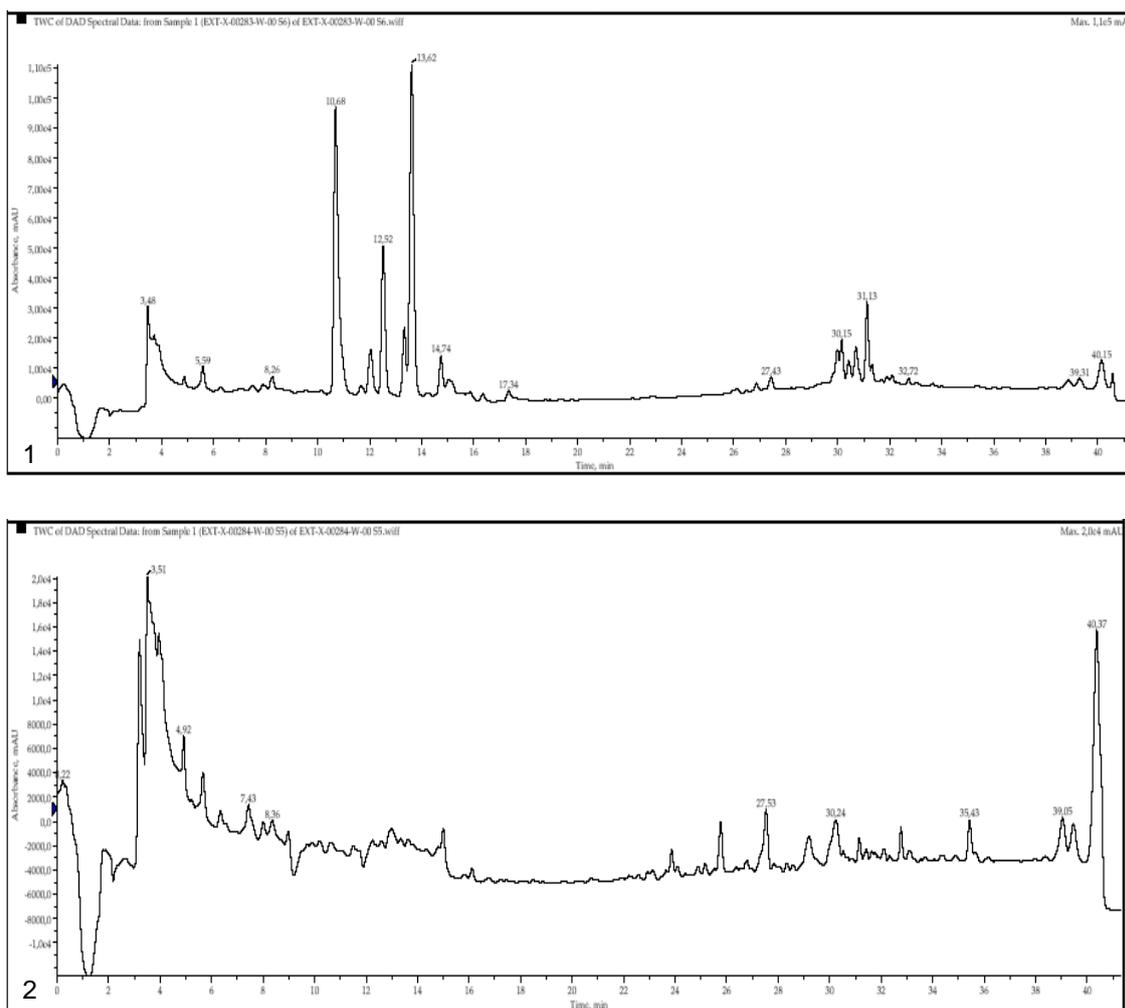
En las muestras de hojas de plantas en campo (Tabla 7), se encontraron entre los compuestos identificados la myricitrina que es una sustancia propia de la familia *Myrtaceae* y que no fue detectada en los brotes *in vitro*. Se encontraron flavonas como catequina y prunina, esta última es de todo este grupo la que se encuentra en mayor concentración (348.6mg/10g). Otros compuestos encontrados en las hojas de plantas de campo fueron esteposido y pircantosido con equidad en la masa molar y en la concentración, los mismos aparecen en menor concentración que las flavonas. Se observó que varios de los compuestos no identificados son

isómeros de los compuestos identificados (catechina, esteposido, piracantosido, myricitrina, prurina).

El número de compuestos detectados (identificados y no identificados) en las muestras de las hojas de plantas en campo fue superior al de los brotes *in vitro*. En los brotes *in vitro* los compuestos identificados pertenecen al grupo de los triterpenos, saponinas y ácidos (Tabla 8). Al analizar los compuestos no identificados se observó que se aislaron 23 compuestos que no se encontraron en las hojas de plantas en campo y que aparecen con una concentración menor. La mayoría de los compuestos identificados en ambas muestras son sustancias antioxidantes y pudieran tener un efecto en el fortalecimiento del sistema inmunológico y disminuir el riesgo de tumores malignos (Jiménez, 2001; Suntornsuk, 2002). El extracto de ramas verdes de *Psidium guajava* ha sido usado en la medicina tradicional para neutralizar el efecto de las diarreas, atribuyéndosele un efecto significativo en la disminución de las enfermedades gastrointestinales (Wei, 2000).

Dicosmo y Misawa (1995) demostraron que en brotes *in vitro* de las especies *Catharanthus roseus*, *Papaver somnifera* y *Ruta graveolus* aislaron sustancias que no fueron encontradas en plantas de campo, ellas son el resultado de alteraciones en la parte funcional de genes que ocurren debido a la exposición de estímulos químicos y físicos, por lo que el cultivo de tejidos de plantas producen compuestos que no son encontrados en plantas intactas, lo que representa una alternativa para investigar nuevos compuestos.

Estos resultados se corresponden con los obtenidos en *Morinda royoc* y reafirman la hipótesis de que el cultivo *in vitro* es una fuente potencial para la identificación y producción de nuevos compuestos.



**Figura 13.** Cromatogramas de los análisis de HPLC de muestras de la especie *Psidium guajava*. Plantas en campo (1), Brotes *in vitro* (2).

**Tabla 7.** Resumen de los compuestos aislados mediante HPLC-MS en las hojas de plantas en campo de la especie *Psidium guajava*. Rt- Tiempo de retención, MW- masa molecular estimada, Prognosis (mg/10 g) – concentración estimada en mg por cada 10 g de masa seca.

<i>Bioplanta-ID</i>	<i>Taxon</i>	<i>Cultivation</i>	
B-0006	<i>Psidium guajava</i>		

<i>unidentified compounds</i>				<i>identified compounds</i>					
<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Name</i>	<i>CAS</i>
5,06	166	14,9	1	5,77	784	15,0	1		73683-70-2
5,77	276	15,0	2	8,44	290	30,4	1	Catechin	154-23-4
8,44	290	30,4	1	8,44	290	30,4	1		967-27-1
10,88	382	258,5	1	10,88	382	258,5	1		188785-44-6
12,23	450	19,5	1	10,88	382	258,5	1		97736-73-7
12,71	464	101,1	9	12,23	450	19,5	1	Stepposide	102849-44-5
13,52	434	22,5	2	12,23	450	19,5	1		20194-60-9
13,81	434	348,6	2	12,23	450	19,5	1		31049-08-8
27,61	0	16,3	6	12,23	450	19,5	1	Pyracanthoside	38965-51-4
29,69	473	94,2	2	12,71	464	101,1	9		17912-87-7
30,32	495	58,5	1	12,71	464	101,1	9	Myricitrin	17912-87-7
30,65	0	35,1	44	13,81	434	348,6	2	Prunin	529-55-5
30,87	0	33,6	39	13,81	434	348,6	2		81202-36-2
31,30	473	40,4	1	30,15	618	49,6	2		35482-91-8
31,48	570	18,0	2						
32,07	790	103,5	4						
32,22	589	32,1	40						
32,22	606	32,1	113						
32,22	611	32,1	28						
32,72	816	20,0	80						
32,72	1098	20,0	32						
32,91	696	8,1	3						
32,91	832	8,1	9						
33,15	334	84,0	16						
33,15	936	84,0	137						
33,61	794	10,9	22						
33,61	820	10,9	9						
33,82	774	213,1	121						
34,15	914	69,2	84						
34,97	0	16,5	5						

**Tabla 8.** Resumen de los compuestos aislados mediante HPLC-MS en brotes *in vitro* de la especie *Psidium guajava*. Rt- Tiempo de retención, MW- masa molecular estimada, Prognosis (mg/10 g) – concentración estimada en mg por cada 10 g de masa seca.

<i>Bioplanta-ID</i>	<i>Taxon</i>	<i>Cultivation</i>	
B-0007	Psidium guajava	in vitro Sprosskulturen	

<i>unidentified compounds</i>				<i>identified compounds</i>					
<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Name</i>	<i>CAS</i>
5,10	0	30,4	44	23,31	504	96,7	1	Bridgesigenin A	144425-17-2
5,86	0	6,9	27	23,31	504	96,7	1		18449-41-7
15,19	584	5,9	1	23,31	504	96,7	1	Brevicuspisaponin 2	287716-32-9
22,10	502	13,5	1	23,31	504	96,7	1	Terminolic acid	564-13-6
23,31	504	96,7	1	25,67	488	41,4	6	2-Epitormentic acid	119725-19-8
25,67	488	41,4	6	25,67	488	41,4	6		130289-31-5
25,67	998	41,4	1	25,67	488	41,4	6	Tormentic acid	13850-16-3
25,94	680	6,4	1	25,67	488	41,4	6		464-92-6
27,70	664	12,9	2	25,67	488	41,4	6	Euscaphic acid	53155-25-2
27,70	665	12,9	1						
29,37	182	7,8	1						
29,72	0	7,7	16						
30,40	270	12,0	1						
30,70	521	34,5	17						
31,61	0	16,3	70						
32,10	489	3,8	2						
32,26	489	138,8	2						
32,52	0	3,7	45						
32,95	816	8,5	98						
33,22	936	9,9	141						
33,35	844	33,6	16						
33,35	936	33,6	156						
33,88	774	33,0	125						
34,36	0	21,7	35						
34,95	0	4,5	5						

***Morus alba* var “Criolla”**

Al igual que en *Psidium guajava* y contrario a lo observado en *Morinda royoc*, en *Morus alba* los perfiles de compuestos detectados en las muestras de hojas de plantas de campo y brotes multiplicados *in vitro* son diferentes (Figura 14). Estas observaciones conducen a la hipótesis de que cada genotipo reacciona de forma distinta al cultivo *in vitro*, que su capacidad de adaptación o respuesta a las condiciones del ambiente *in vitro* es diferente y por tanto los compuestos que se sintetizan como respuesta a estas condiciones “anormales” de crecimiento es distinta para cada genotipo.

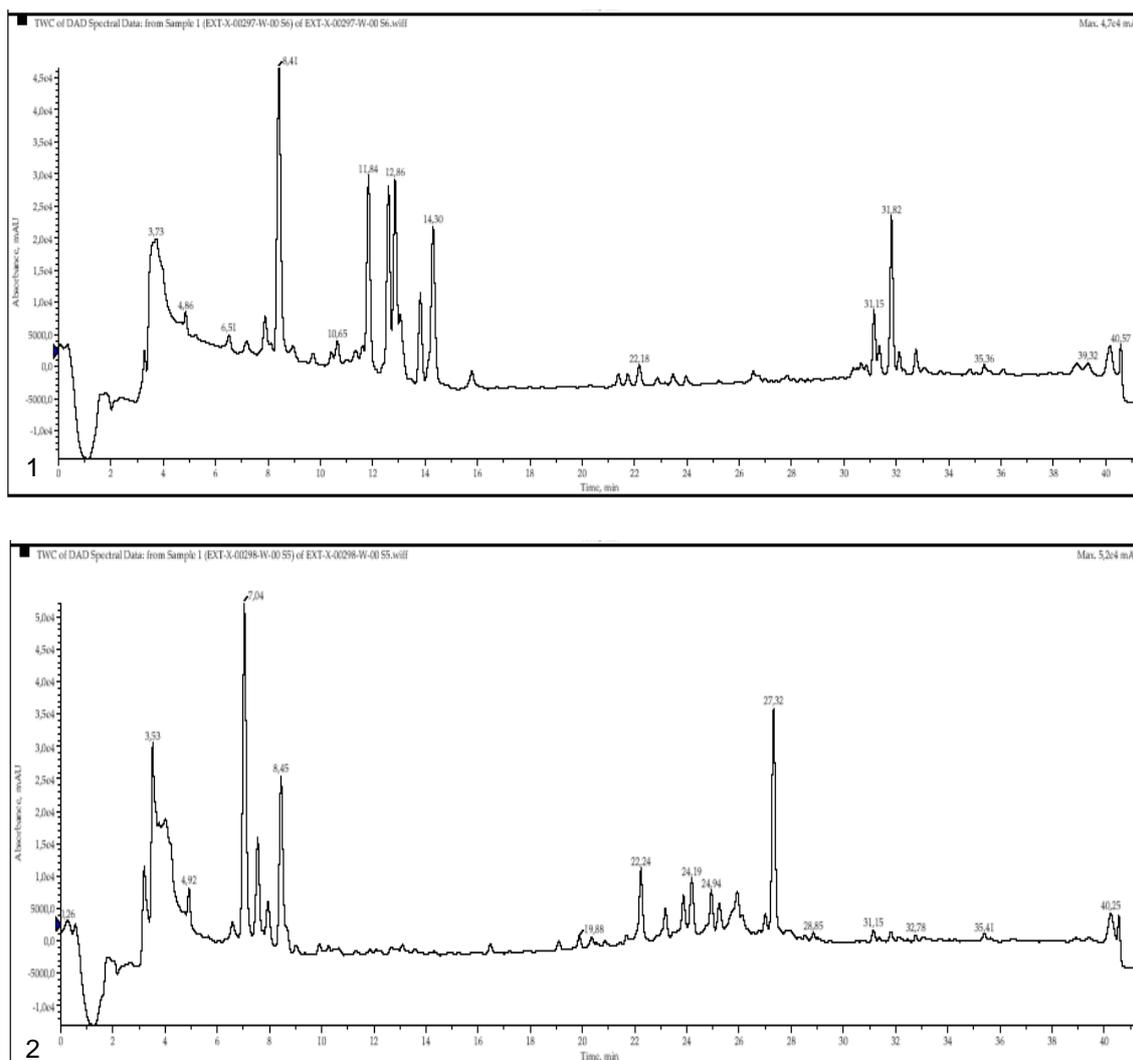
La tabla 9, muestra la diversidad de compuestos identificados y no identificados en las muestras de hojas provenientes de las plantas en campo, siendo superior que la gama de compuestos encontrados en los brotes *in vitro*. En esta especie fueron encontrados varios tipos de flavonas, como la magnoliosida, myricitrina, escopolina.

En los brotes *in vitro* se identificaron compuestos aromáticos típicos del género *Morus* que no fueron encontrados en las hojas de las plantas en campo analizadas anteriormente, según se muestra en la tabla 12. Se encontraron 24 nuevos compuestos no identificados que no aparecen en las hojas de las plantas en campo. No obstante, los compuestos comunes (con masas moleculares de 534, 589, 606, 611, 774, 936) presentan una menor concentración en los brotes *in vitro* que en las hojas de plantas de campo.

Dentro de las sustancias encontradas en esta especie se ha reportado el uso de la escopolina que posee propiedades broncorelajantes, antialérgicas, antibacterianas, anticancerígeno Duke, (2005) antigingivitis, antiinflamatorias, y antiespasmódicas (Williamson M. *et al*, 1998). La myricitrina que se reporta como una sustancia de actividad antioxidante (Duke, 2005).

En todas las especies en estudio fue posible mediante el cultivo *in vitro* la identificación de compuestos que no se expresan en muestras de hojas de plantas en campo o invernadero y a la vez fue detectada una amplia gama de compuestos nuevos, que no fue posible identificar y que constituyen una fuente importante de nuevas moléculas con posible función biológica. Este

segundo grupo de compuestos deben constituir un tema de trabajo para futuras investigaciones con el objetivo de purificar y determinar con exactitud la estructura química de aquellos que por la predicción basada en los datos de masa molecular y tiempos de retención sean de mayor interés para aplicaciones en la industria farmacéutica.



**Figura 14.** Cromatogramas de los análisis de HPLC de muestras de la especie *Morus alba*. Plantas en campo (1), Brotes *in vitro* (2).

**Tabla 9.** Resumen de los compuestos aislados mediante HPLC-MS en plantas en campo de la especie *Morus alba*. Rt- Tiempo de retención, MW- masa molecular estimada, Prognosis (mg/10 g) – concentración estimada en mg por cada 10 g de masa seca.

<i>Bioplanta-ID</i>	<i>Taxon</i>	<i>Cultivation</i>							
B-0020	Morus alba								
<i>unidentified compounds</i>				<i>identified compounds</i>					
<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Name</i>	<i>CAS</i>
5,05	0	26,7	44	8,61	354	86,0	27	Scopolin	531-44-2
6,79	682	8,2	1	8,61	354	86,0	27	4-O-Caffeoylquinic aci	905-99-7
8,61	354	86,0	27	8,61	354	86,0	27	Magnolioside	20186-29-2
9,22	0	6,9	4	8,61	354	86,0	27		327-97-9
12,03	610	53,3	10	12,03	610	53,3	10		117611-67-3
12,79	464	33,6	9	12,03	610	53,3	10		22149-35-5
13,05	302	66,5	1	12,03	610	53,3	10	Kaempferol 3-(4-O-glu	82867-05-8
13,05	550	66,5	1	12,03	610	53,3	10	4',7-Digalloylgallocatec	n.g.
14,01	448	10,5	4	12,79	464	33,6	9		17912-87-7
14,50	285	36,0	1	12,79	464	33,6	9	Myricitrin	17912-87-7
14,50	534	36,0	1	12,79	464	33,6	9	Protogenkwanin	78983-46-7
26,86	246	6,3	1	13,05	302	66,5	1	4,6,3',4',5'-Pentahydro	3260-50-2
26,86	482	6,3	1	13,05	550	66,5	1		74639-14-8
27,79	517	3,6	1	13,05	550	66,5	1	Eucommin A	99633-12-2
30,68	0	118,6	44	14,01	448	10,5	4	Cimicifugic acid B	n.g.
31,33	570	6,8	2	14,01	448	10,5	4	Cimicifugia acid A	not given
31,60	548	25,0	2	14,01	448	10,5	4	Ducheside A	176665-78-4
31,99	534	23,8	5	14,01	448	10,5	4	Oroboside	20486-33-3
32,23	589	393,8	40	14,01	448	10,5	4		5373-11-5
32,23	606	393,8	113	14,01	448	10,5	4		64847-00-3
32,23	611	393,8	29						
32,76	1098	7,1	32						
32,95	548	21,4	2						
32,95	612	21,4	12						
33,19	936	109,0	150						
33,32	844	96,5	16						
33,32	936	96,5	155						
33,84	774	137,0	125						
34,18	914	17,7	91						
34,32	914	19,3	97						
34,98	0	6,9	4						

**Tabla 10.** Resumen de los compuestos aislados mediante HPLC-MS en brotes *in vitro* de la especie *Morus alba*. Rt- Tiempo de retención, MW- masa molecular estimada, Prognosis (mg/10 g) – concentración estimada en mg por cada 10 g de masa seca.

<i>Bioplanta-ID</i>	<i>Taxon</i>	<i>Cultivation</i>			
B-0021	Morus alba	in vitro Sprosskulturen			

<i>unidentified compounds</i>				<i>identified compounds</i>					
<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Rt (min)</i>	<i>MW [g/Mol]</i>	<i>Prognosis [mg/10g]</i>	<i>Frequency</i>	<i>Name</i>	<i>CAS</i>
5,68	0	368,2	27	7,74	466	31,7	1		106400-39-9
5,68	0	74,3	27	24,05	308	4,6	1	Bisdemethoxycurcumi	22608-12-4
7,23	568	112,1	1	24,05	308	4,6	1	Albocycline	25129-91-3
7,74	162	31,7	1	24,36	340	7,5	1	Furoguaiacin	10035-27-5
8,14	376	6,4	4						
8,63	404	42,9	1						
8,63	566	42,9	1						
22,42	255	10,4	1						
22,42	563	10,4	1						
24,05	308	4,6	1						
24,36	204	7,5	1						
25,11	220	3,7	1						
25,42	308	7,2	1						
26,11	650	9,5	1						
27,49	182	76,8	1						
27,49	648	76,8	1						
30,68	521	10,3	17						
31,61	0	15,7	70						
31,99	534	18,5	5						
31,99	838	18,5	24						
32,26	795	184,1	1						
32,26	840	184,1	23						
32,26	611	184,1	29						
32,26	606	184,1	113						
32,26	589	184,1	40						
32,98	550	6,4	10						
33,21	334	19,2	16						
33,21	936	19,2	148						
33,35	936	30,7	155						
33,86	774	40,5	125						
34,34	0	23,8	35						
34,92	916	6,5	55						

Conclusiones

## 5. CONCLUSIONES

1. En todas las especies en estudio (*Morinda royoc* L, *Psidium guajava* L var “EEA18-40”, *Morus alba* L var “Criolla”) se pudo comprobar que el contenido de agua es mayor en el material vegetal obtenido en los sistemas de cultivo *in vitro* con relación a las muestras obtenidas de plantas cultivadas en campo o invernadero.
2. En la especie *Morinda royoc* el cultivo de brotes es el sistema de cultivo *in vitro* más factible para la producción de biomasa con mayor contenido de materia seca comparado con el cultivo de callos y células.
3. Los rendimientos de los extractos en todas las especies en estudio fueron siempre mayores en los sistemas de cultivo *in vitro* en comparación con los obtenidos en plantas en campo o invernadero, estos son mayores a medida que la diferenciación es menor (brotes, callos y suspensiones celulares).
4. En la especie *Morinda royoc* se obtuvo el más amplio espectro de compuestos en el cultivo de callos y suspensiones celulares, en comparación con las muestras de hojas de plantas en invernadero y brotes multiplicados *in vitro*.
5. Los perfiles de compuestos detectados en plantas de invernadero y brotes *in vitro* en *M royoc* fueron similares, mientras que en *Psidium guajava* y *Morus alba* los perfiles de expresión entre muestras de hojas de plantas en campo y brotes *in vitro* fueron distintos, lo que demuestra que cada genotipo reacciona de forma distinta al cultivo *in vitro* y por tanto los compuestos que se sintetizan como respuesta a estas condiciones “anormales” de crecimiento es distinta para cada genotipo.
6. En todas las especies en estudio fue posible, mediante el cultivo *in vitro*, la identificación de compuestos que no se expresan en muestras de hojas de plantas en campo o invernadero y a la vez fue detectada una amplia gama de compuestos nuevos, que no fue posible identificar y que constituyen una fuente importante de nuevas moléculas con posible función biológica de aplicación en la industria farmacéutica.

# Recomendaciones

## 6. RECOMENDACIONES

1. Purificar y determinar con exactitud la estructura química de aquellos compuestos detectados en las muestras de cultivo *in vitro*, que por la predicción basada en los datos de masa molecular y tiempos de retención sean de mayor interés para aplicaciones en la industria farmacéutica, tales como los iridoides encontrados en brotes, callos y suspensiones celulares de *Morinda royoc*.
2. Evaluar el efecto de la aplicación de elicitores sobre el perfil de metabolitos producidos en diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (brotes, callos, suspensiones celulares) como una vía para ampliar la gama de compuestos o incrementar la concentración de compuestos específicos.
3. Estudiar en otras especies vegetales de interés farmacéutico diferentes sistemas de cultivo *in vitro* para la producción de biomasa y determinación de metabolitos secundarios.

# Bibliografía

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah MA, Ali AM, Marziah M, Lajis NH y Ariff AB (1998) Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54(3): 173-182.
- Abdullah MA, Ariff AB, Marziah M, Ali AM y Lajis NH (2000) Growth and Anthraquinone Production of *Morinda elliptica* Cell Suspension Cultures in a Stirred-Tank. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(9): 4432-4438.
- Agramonte D, Pérez J, Pérez M, Pérez A (1993) Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCl) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. *Centro Agrícola*.88-89.
- Ajaiyeoba EO, Oladepo O, Fawole OI, Balaji OM, Alinboye DO (2003) Cultural categorization of febrile illnesses in correlation with herbal remedies used for treatment in Southwestern Nigeria. *J Ethnopharmacology* 85 (2-3): 179-185.
- Arima H (2002) Isolation of antimicrobial compounds from guava (*P. guajava* L.) and their structural elucidation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(8): 1727-30.
- Ávila C (2005) Tendencias de las ómicas de las plantas. *Encuentro Especial en la Biología* n. 11. Año XIII. N 100.
- Baiza A, Quiz-Moreno A, Ruiz J, Loyola-Vargas V (1999) Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 59:9-17.
- Benvides J E (2000) La morera un forraje de alto valor nutricional para la alimentación animal en el trópico. *Pastos y Forrajes. Revista de la Estación de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"*. 23: 1-14.
- Bino R, May R, Fichn O (2004) potencial of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci.*9. 418-425.
- Boitel-Conti, Alberche JC, Gontier E y Sangwan N (1995) Culture de racines transformées de *Datura innoxia* Mill. En bioreacteur: comparaison de 3 types de procedes. *C.R Acad. Sci. Paris* 318:539-598.
- Bhojwani SS y Razdan MK (1996) *Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition.* Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo.

- Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B y Krok A (1998) Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrungswiss* 2:147-63.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S y Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
- Brevoort P (1998) The blooming U.S. botanical market. A new overview. *HerbalGram* 44: 33–46.
- Briskin D (2000) Medicinal Plant and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology* 124: 507-514.
- British National Formulary (1994) British Medical Association and The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain 28: 45-47, 418.
- Brunakova K, Babincova Z y Cellarova E (2003) Production of taxanes in callus and suspension cultures of *Taxus baccata* L En: T. Hvos- Elf y W. Preil (eds). Liquid systems for *in vitro* mass propagation of plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Caballero I (2001) Propagación *in vitro* por organogénesis de la guayaba (*Psidium guajava*) var enana roja cubana EEA18-40. Tesis para optar por el grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Collin HA (2001) Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 34: 119-134.
- Constabel F y Kurz W (1999) Cell differentiation and secondary metabolite production. En Woong-Young y Sant S Bhojwan (eds) Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers. 16:463-491.
- Croteau R, Kutchan T y Lewis N (2000). Natural products (Secondary metabolites). En : Buchanan B, Grisseem y Jones R (eds) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. pp 1250-1318.
- Czapek F (1921) Spezielle Biochemie. *Biochemie der Pflanzen* 3, p.369.
- Chang P y Lee KH (1985) Antitumour agents, Synthesis of cytotoxic anthraquinones digiferrubiginol and morindaparvin-B. *J. Nat. Prod.* 48: 948–951.

- Chang P, Kuo-Hsiung L, Shingu T, Hirayama T y Hall IH (1982) Antitumour agents, 50. Morinda parvin-A, a new antileukemic anthraquinone, and alizarin-1 methyl ether from *Morinda parvifolia*, and the antileukemic activity of the related derivatives. *J. Nat. Prod.* 45: 206–210.
- Chen J y Ziv M (2001) The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured *Narcissus*. *Plant Cell Rep.* 20 : 22-27.
- Chong T, Abdullah A, Fadzillah N, Lai O, Lajis N (2004) Anthraquinones production, hydrogen peroxide level and antioxidant vitamins in *Morinda elliptica* cell suspension cultures from intermediary and production medium strategies. *Plant Cell Rep* 22 : 951-958.
- De Luca V y St Pierre B (2000) The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci* 5: 168-173.
- Dicosmo F y Misawa M (1995) Plant Cell and Tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology advances* 13 (3): 425-453.
- DIMS (Drug Information for Malaysia and Singapore) (1992). MIMS (Medical Information for Malaysia and Singapore) 21:204-182.
- Dittmar A (1993) *Morinda citrifolia* L. use in indigenous Samoan medicine. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 1: 77–92.
- Dixon RA (1999) Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 192-197.
- Dornenberg H y Knorr D (1997) Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. *Foodtechnology* 51(11): 47-54.
- Doran P M (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:199-204.
- Duke J A (1992) Handbook of biologically active phytochemicals and their activities. Boca Raton, FL. CRC Press.
- Duke JA (2005) Dr. Duke's Phytochemical and ethnobotanical Databases. <http://www.ars-grin.gov/duke>
- Endt D, Kijne J y Memelink J (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* 61: 107–114.

- 
- Fett-Neto AG, Melanson SJ, Nicholson S, Pennington J y DiCosmo F (1994) Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering* 44(8): 966-971.
  - Fiehn O (2002) Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol.Biol.*48, 155-171.
  - Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey R y Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol.*18, 1157-1161.
  - Formica J V y Regelson W (1995) Review of the biology of querce tin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33: 1061-1080.
  - Florez M, González G, Culebras M, Tuñón J (2002) Los flavonoides: propiedades y su acción antioxidante *Nutri Hosp* 6: 271-278.
  - Fukuda H. 1992. Tracheary element formation as a model system of cell differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 136: 289-332.
  - Fulzele D, Stadive R y Pol B (2002) Untransformed root cultures of *Nothapodytes foetida* and production of camptothecin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 285-288.
  - Gavidia I, Zaragoza C, Segura J y Pérez-Bermudez (1997) Plant regeneration from juvenile and adult *Anthyllis cytosoides*, a multipurpose leguminous shrub. *J. Plant Physiol* 150: 714-718.
  - Georgio T, Laskaris G y Verpoorte R (1999) HPLC analysis of taxoids in plants cell tissue cultures.
  - Gerth A, Jiménez E, Gómez R y Wilken D (2002) Production of active substances applying innovative plant biotechnology. 10th IAPTC Congress, Orlando, Florida, USA., p 71.
  - Ghisalberti EL (1998) Productos farmacéuticos de en el uso de la medicina. *Phytomedicine* 5, 147.
  - Gibson G (1993) Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific Yew). *Plant Cell Reports* 12:479-482.
  - Gleba D, Borisjuk N, Borisjuk L, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya S, Logendra S, Gleba Y y Raskin I (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5973-5977.
  - Goleniowski M y Trippi VS (1999) Effect of growth medium composition on psilostachyionolides and altamisine production. *Plant cell tissue and organ culture* 56: 215-218.

- González Y, Scull I, Bada A, González B, Fuentes D, Arteaga M, Santana E y Hernández O (2003) Ensayo de toxicidad a dosis repetidas del extracto acuoso de *Morinda royoc* L. en ratas Cerp: SPRD. [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8\\_2\\_03/pla05203.htm#cargo](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8_2_03/pla05203.htm#cargo) (consulta: 27 Noviembre 2003).
- Gontier E, Piutti S, Gravot A, Milesi S, Grabner A, Massot B, Lievre K, Tran M, Goergen J y Bourgaud F (2005) Development and validation of an efficient low cost bioreactor for furanocoumarin production with *Ruta graveolens* shoot cultures. In: Liquid systems for in vitro mass propagation of plants. Ed by T. Hvos- Elf and W. Preil. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Gutiérrez R y Roa ML (2003) Determinación de algunos compuestos químicos en plantas arbóreas forrajeras, Rev. Col. Cienc. Pec.16:2.
- Hansen G y Wright M S (1999) Recent advances in the transformation of plants. Trends Plant Sci. 4:226-231.
- Hancock JT, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Neill SJ (2002) Cell signalling following plant-pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. Plant Physiol Biochem 40 :611-617.
- Haq N (2004) *In vitro* production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plants [en línea] En: <http://www.telmedpak.com> [consulta: 12 octubre 2004].
- Harborne JB (2000) Class and functions of secondary products. En: Walton NJ, Brown DE (eds.) Chemicals from Plants, Perspectives on Secondary Plant Products. Imperial College Press 1-25.
- Harborne JB y Baxter H (1983) Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Taylor & Frost, London. 791 pp.
- Havkin-Frenkel (1997) Plant tissue culture for production of secondary metabolites. Foodtechnology 51(11):56-59.
- Heo J y Kozai T (1999) Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth and development of sweetpotato plantlets. Environment Control in Biology. 37 (1): 83-92.
- Hirazumi A y Furusawa E (1999) An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumor activity. Phytotherapy Research 13(5): 380-387.

- 
- Hohe A, Gerth A, Jiménez E, Jordan M, Gomez R, Schmeda G y Wilken D (2003) Production of Active Substances Applying Temporary Immersion Systems. En: T Hvos-Elf and W Preil (eds) Liquid systems for *in vitro* mass propagation of plants, Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
  - Hong X y Yong G (1997) Studies on the production of anthraquinone by plant cell suspension culture. Institute of Biotechnology, South China University of Technology, Canton, Peop. Rep. China. Huanan Ligong Daxue Xuebao, Ziran Kexueban 25(2): 62-67.
  - Hostettmann K, Marston N, Ndjuko K y Wolfender JL (2000) The potential of african plants as a source of drugs. Curr. Org. Chem. 4: 973-1010.
  - Huhman DV y Sumner LW (2002) Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion- trap mas spectrometer. Phytochemistry 59: 347-360.
  - Instructivo técnico del cultivo de la guayaba. (1985) Ministerio de la Agricultura Dirección de cítricos y otros frutales (ed) Ciudad de la Habana, Cuba.
  - Ishiguro K, Nakajima M y Isoi K (1995) Co-occurrence of prenylated xanthenes and their cyclization products in cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. Phytochemistry. 38:867-869.
  - Ikuta A, Kamiya K, Sakate T y Saiki Y (1995) Triterpenoids from callus cultures of *Paeonia species*. Phytochemistry. 38: 1203-1207.
  - Ismail NH, Ali AM, Aimi N, Kitajima M, Takayama H y Lajis NH (1997) Anthraquinones from *Morinda elliptica*. Phytochemistry 45: 1723–1725.
  - Jasril L, Mooi L, Abdullah M, Sukari M, Ali M (2003) Antitumor promoting and antioxidant activities of anthraquinones isolated from the cell suspension culture of *Morinda elliptica*. Asia Pac J Mol Biol Biotechnol 11: 3-7.
  - Jaziri et al. 1996. *Taxus sp* cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 59-75.
  - Jeong, R; Fujiwara K; y Kozai T (1993) Carbon dioxide enrichment in autotrophic micropropagation: Methods and Advantages. Hort Technology 3 (3): 332-334.
  - Jiménez A (2001) Guava fruit (*P. guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. J. Agric. Food Chem. 49(11): 5489-93.

- 
- Kamanyi A, Njamen D y Nkeh B (1994) Hypoglycaemic properties of aqueous root extract of *M. lucida* (Benth) Rubiaceae studies in the mouse. *Phytotherapy Res.* 8: 369–371.
  - Ketchum R y Gibson D (1996) Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 9-16.
  - Ketchum, R, Gibson D, Croteau R ,Shuler ML (1999) The kinetics of taxoid accumulation in suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotech Bioeng* 62: 97-105.
  - Khanam N, Khoo C and Khan A G. 2000. Effect of cytokinin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 125-133.
  - Khanapure S y Biehl E (1989) Synthesis of Morindaparvin-A an antitumour agent, and related anthraquinones. *J. Nat. Prod.* 52:357–1359.
  - Kietzka, J. W. 1991. Vegetative propagation. ICFR Annual Research Report. pp.11-14.
  - Kim H, Oh S-R, Lee H, Huh H (2001) Benzothiadiazel enhances the elicitation of rosmarinic acid production in a suspension culture of *Agastache rugosa* O. Kuntze. *Biotechnol. Lett.* 23:55-60.
  - Kim MJ, Kim DH, Na H, Oh T, Shi C y Surh P (2005) Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces apoptosis in human gastric cancer cells. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 24(4): 261-269.
  - Kitaya Y, Niu G, Ohashi M y Kozai T (1998) Effects of photosynthetic photon flux, photoperiod and CO<sub>2</sub> enrichment on the growth and morphogenesis of Lettuce plug transplants. *HortScience.* 32(3):542.
  - Kossel A (1891) Über die Chemische Zusammensetzung der Zelle, *Archiv für Physiologie.* 181-186.
  - Koumaglo K, Gbeassor M, Nikabu O, Souza C y Werner W (1992) Effects of three compounds extracted from *M. lucida* on *Plasmodium falciparum*, *Planta Medica* 58: 533–534.
  - Kozai T y Jeong B (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 51: 49-56.
  - Kozai T (1999) Environmental control and its effects in transplant production under artificial light. *J.Kor. Soc. Hort. Cont. Sci.* 114(2): 12-16.

- 
- Krings U, y Berger R (1998) Biotechnological production of fragrances Appl. Microb. Biotechnol.49:1-8.
  - Kurz W, y Constabel F (1998) Production of secondary metabolites. In: Altman A (ed) Agricultural Biotechnologies. Marcel Dekker Inc., New York.
  - Laguado N, Marín M, Arenas L y Castro C (1998) Relationship among ripen indexes of guava (*Psidium guajava* L.) var. Dominicana Roja fruits, Rev. Fac. Agron. (LUZ) 15: 422-428.
  - Le Gall G, Metzdorff S, Pedersen J, Bennett R y Colquhoun (2005) Metabolite profiling of *Arabidopsis thaliana* (L.) plants transformed with an antisense chalcone synthase gene. Metabolomics 1(2):181-198.
  - Lee C, Vanisree M, Lin Chien y Tsay S (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant cultures. Bot. Bull. Acad. Sin. 45:1-22.
  - Lee CW y Shuler ML (2000) The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. Biotechnology Bioengineering 67: 61-71.
  - Leeuwenberg A (1987) Medicinal and Poisonous Plants of the Tropics, Wageningen.
  - Legal L y Plawecki M (1995) Comparative sensitivity of various insects to toxic compounds from *M. Citrifolia*. Entomological Problems 26: 155–159.
  - Leung A y Foster S (1995) Encyclopedia of Common Natural Ingredients 2nd Ed. John Wiley y Sons, New York. 649 .
  - List PH y Horhammer L (1969-1979) Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Vols. 2-6, Springer-Verlag, Berlin.
  - Liu G, Bode A, Ma W, Sang Sh, Ho Ch y Dong Z (2001) Two Novel Glycosides from the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) Inhibit AP-1 Transactivation and Cell Transformation in the Mouse Epidermal JB6 Cell Line1. Cancer research 61: 5749–5756.
  - Makinde JM, Awe SO y Salako LA (1994) Seasonal variation in antimicrobial activity of *M lucida* on plasmodium beghei in mice, Fitoterapia 65: 124-130.
  - Martínez M, Molina N y Boucourt E (1997) Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava*. <http://www.bvs.sld.cu/revistas>.

- 
- Massot B, Milesi S, Gontier E, Bourgaud F y Guckert A (2000) Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62: 11-19.
  - Memelink J, Verpoorte R y Kijne JW (2001). ORCAnisation of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.* 6: 212–219.
  - MEGABOLITE@ Base de Datos Compañía Analyticon Alemania.
  - Milesi S, Massot B, Gontier E, Bourgaud F y Guckert A (2001) *Ruta graveolens* L a promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Science* 161: 189-199.
  - Misawa M (1994) *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites*. FAO Agriculture Services Bull, Rome:57.
  - Miyanaga K, Seki M, Furusaki S (2000) Analysis of pigmentation in individual cultured plant cells using an image processing system. *Biotechnol. Lett.* 22:977-981.
  - Miyashita Y, Kitaya Y, Kubota C y Kozai T (1996) Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explant leaf area, fresh weight and stem length. *Scientia Horticulturae* 65: 199-202.
  - Mol J, Grotewold E y Koes R (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* 3: 212–217.
  - Moreno-Valenzuela OA, Galaz-Avalos RM, Minero-García Y y Loyola-Vargas VM (1998) Effect of differentiation on regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root. *Plant Cell Rep* 18: 99-104.
  - Morgan J y Shanks J V (2000) Determination of metabolic rate-limitations by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *J.Biotechnol.*79:137-145.
  - Murashige, T y F. Skoog (1962) A revised médium for rapad growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479
  - Nazif N, Rady M y and Seif M (2000) Stimulation of antraquinone production in suspension cultures of *Cassia acutifolia* by salt stress. *Fitoterapia*, 71:34-40.
  - Nezbedová L, Hesse M, Werner C (1999) Chemical potencial of *Aphelandra sp* cell cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 58:133-140.

- 
- Navia-Osorio A, Garden H, Cusidó R, Palazón J, Alfermann A y Piñol M (2002) Production of paclitaxel and baccatin III in a 20L airlift bioreactor by cell suspension of *Taxus wallichiana*. *Planta Medica* 68: 336-340.
  - Niessen, W. M. A., 1999. *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York.
  - Nigg HN y Seigler DS (1992) *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture*. Plenum Press, New York. 445 pp.
  - Northcote DH (1995) Aspects of vascular differentiation in plants: Parameters that may be used to monitor the process. *Int. J. Plant Sci.* 156: 245-256.
  - Nguyen Q, y Kosai T (1998) Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environ: Control. Biol.* 36 (2):59-75.
  - Ohnishi M, Morishita H, Iwahashi H, Toda S, Shirataki Y, Kimura M y Kido R (1994) Inhibitory Effects of Chlorogenic Acids on Linoleic Acid Peroxidation and Haemolysis. *Phytochemistry*, 36(3): 579-583.
  - Park E, Hyuncheol O, Kang I, Sohn D y Kim Y (2004) An isocoumarin with hepatoprotective activity in hep G2 and primary hepatocytes from *Agrimonia pilosa*. *Arch. Pharm. Res.* 27(9): 944-946.
  - Payne GF, Bringi V, Prince C y Shuler M L (1991) *Immobilized plant cells (eds.) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Hanser, pp. 179–223.
  - Pereira A, Bertori B, Camara F, Queiroz M, Leite E, Moraes R, Carvalho D, Franca S (2000) Co-cultivation of plant cells as a technique for elicitation of secondary metabolite production. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 60:165-166
  - Pierik A (1990) *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Edición mundi-prensa. Madrid. España. 326 p.
  - Pietta P (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63: 1035-1042.
  - Piqueras A y Debergh P (1999) Morphogenesis in micropropagation En Woong-Young y Sant S Bhojwan (eds) *Morphogenesis in plant tissue cultures*. Kluwer Academic Publishers. 15:443-462.
  - Pizzorno JE y Murray MT (1985) *A Textbook of Natural Medicine*. John Bastyr College Publications, Seattle, Washington (Looseleaf).

- 
- Pua EC y Lee JEE (1995) Enhanced de novo shoot morphogenesis *in vitro* by expresion of antisense 1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase gene in transgenic mustard plants. *Planta* 196: 69-76.
  - Pua EC (1999) Enhanced de novo shoot morphogenesis *in vitro* in transgenic mustard plants. *Planta* 153: 89-94.
  - Rachamandra Rao S (2000) Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals. *Journal of Biochemistry Molecular Biology Biophysics* 4: 73-102.
  - Rachel W, Myers SP, Leach DN, Lin GD y Leach G (2003) A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. *Journal of ethnopharmacology* 85(1): 25-32.
  - Ramachandra Rao S y Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Bio-technology Advances* 20: 101-153.
  - Rath G, Ndonzao M y Hoztettmann K (1995) Antifungal anthraquinones from *M. Lucida*. *Int. Journal of Pharmacognosy* 33: 107–114.
  - Ray M (2004) Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa* (Pau D'ARCO). *Phytochemistry* 65(13): 2003-11.
  - Rech SB, Batista C, Schripsema J, Verpoorte R y Henriques AT (1998) Cell culture of *Rauwolfia sellowii*: Groth and alkaloid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 61-63.
  - Reyes C (2003) Regeneración vía organogénesis de *Morinda royoc* L. Tesis para optar por el grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba.
  - Rodríguez J, Vegas R, Penichet M, Guerra I y Núñez R (1999) Caracterización de extractos de *M. royoc* L. para posible uso como materia prima en la elaboración de suplementos dietéticos. *Revista Alimentaria de tecnología e Higiene de los Alimentos* 302: 47-52. Cuba.
  - Roig J y Mesa T (1974) Plantas medicinales, aromáticas o venenosas. Instituto del libro, La habana, Cuba pp. 949.
  - Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey R y Willmitzer L (2000) Technical advance: simultaneous análisis of metabolitos in potato tuber by gas chromatography-mas spectrometry. *Plant J.* 23, 131-142.

- 
- Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C (2000) Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol* 16:91-8.
  - Sasset F, Knobloch K, Berlin J (1998) Induction of secondary metabolism in cell suspension culture of *Catharanthus rosues*, *Nicotiana tabacum* and *Peganum harmala* En: Fijiwara A (eds) Proceedings of the 5 International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Tokyo 343-4.
  - Sato F, Hashimoto A, Hachiya K I, Tamura K B, Choi C, Morishige T (2001) Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis Proceedings of the National Academy Science USA 98:367-372.
  - Salas E, Agramonte D, Barbón R, Jiménez F, Collado R, Gutiérrez O y Ramírez D (2004) Establecimiento *in vitro* de *Morus alba*. *Biotechnología Vegetal* 4(1): 15-19.
  - Sánchez MD y Rosales M (2000) Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica. Memorias de la conferencia electrónica. FAO. Roma.
  - Sang S, Wang M, Kan H, Guangming L, Zigang D, Badmaev V, Zheng Q Y, G Geetha, Rosen R T y Ho C T (2002) Chemical components in noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L). New Brunswick, NJ, USA. ACS Symposium Series 803 (Quality Management of Nutraceuticals), 134-150.
  - Smith T (2002) An approach to investigate medicinal chemical synthesis by three herbal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 105–111.
  - Shibli R, Smith M, Kuskad M (1997) Headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in *Vaccinium pahalae* cell culture. *Plant Growth Regul.* 23:201-205.
  - Springob K y Saito K (2002) Metabolic engineering of plant secondary metabolism: a promising approach to the production of pharmaceuticals. *Sci .Cult.* 68: 75-85.
  - Stalman M, Koskamp A, Luderer R, Vernooij J, Wind J, Wullems G y Croes AF (2003) Regulation of anthraquinone biosynthesis in cell cultures of *Morinda citrifolia*. *Journal of Plant Physiology* 160(6), 607-614.
  - Steglich W, Fugmann B y Lang-Fugmann S (1997) *Rompp Lexikon Naturstoffe*. Georg Thieme Verlag.
  - Steven R (1998) Method for production of plant biological products in precocious neomorphic embryoids. US Patent 5850032.

- 
- Söndahl MR, Nakamura T y Sharp W (1991) Propagación *in vitro* del café. En: Roca WM y Mroginski L (eds) Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali. Colombia. CIAT, 621-642.
  - Sumner L, Mendes P y Dixon R (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62, 817-836.
  - Suntornsuk L (2002). "Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration." *J. Pharm. Biomed.* 28(5): 849-55.
  - Taniguchi S, Imayoshi, Kobayashi E, Takamatsu Y, Hatano T, Sakagami H, Tokuda H, Nishino H, Sugita D, Shimura S y Yoshida T (2002) Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phyto-chemistry*, 59: 315-323.
  - Tisserat B y Vaughn SF (2001) Essential oils enhanced by ultra-high carbon dioxide levels from Lamiaceae species grown in vitro and in vivo, *Plant Cell Rep.* 20: 361-368.
  - Tolstikov V, Lommen A, Nakanishi K, Tanaka N y Fiehn O (2003) Monolithic silica-based capillary liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics. *Anal. Chem.* 75: 6737-6740.
  - Tran Thanh Van K y Gendy C (1995) Thin Cell Layer method to programme morphogenetic differentiation. En: *Plant Tissue Culture Handbook*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
  - Vanek T, Langhansová L y Marsik P (2005) Cultivation of cultures of *Panax ginseng* in different bioreactors and in temporary immersion-Comparison of growth and saponin production. In: *Liquid systems for in vitro mass propagation of plants*. Ed by T. Hvos- Elf and W. Preil. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
  - Vanisree M, Lee Sh, Nalawade S, Lin Ch y Tsay H (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 1-22.
  - Vanisree M y Tsay S (2004) Plant Cell Cultures- An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 2,1:29-48.
  - Verpoorte R y Alfermann A W (2000) *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Luwer Academic. 286 pp.
  - Verpoorte R, Coutin A y Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews* 1: 13-25.

- 
- Vinson JA. Flavonoids in food as in vitro and in vivo antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 1998;439:151-64.
  - Von Roepenack- Lahaye E, Degenkolb T, Zerjeski M (2004) Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Plant Physiol.*134:548-559.
  - Vorst O, Vos C, Lommen, Staps, Visser R, Bino R y Hall R (2005) A non-directed approach to the differential analysis of multiple LC-MS-derived metabolic profiles. *Metabolomics* 1 (2): April. 169-180.
  - Wagner C, Sefkow M y Kopka J (2003) Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. *Phytochemistry* 62,887-990.
  - Wang Ch, Jianyong W y Xingguo M (2001) Enhancement of Taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Springer-Verlag.
  - Weekwerth W, Wenzel K y Fiehn O (2004) Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics* 4: 78-83.
  - Wei L (2000) Clinical study on treatment of infantile rotaviral enteritis with *P. guajava* L *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 20(12): 893-5.
  - Wilken D, Jiménez E, Hohe A, Jordan M, Gómez R, Schmeda G y Gerth A (2003) Production of plant active compounds applying temporary immersion systems. En: T. Hvos- Elf y W. Preil (eds). *Liquid systems for in vitro* mass propagation of plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
  - Williamson E M y Evans F (1998) *Potter's New Cyclopaedia of Botanical Drugs and Preparations*, Essex UK, 362 pp.
  - Winkel B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology* 5: 218-223.
  - World Health Organization (WHO) 1999. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*, Vol. 1. WHO, Geneva.
  - Wu T, Vanisree M, Satish N, Chen L y Yang F (2003) Isolation and quantitative analysis of cryptotanshinone, an active quinoid diterpene formed in the callus of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 6: 845-848.

- 
- Xie J, Han AM, Feng PS, Su ZG (1998) Kinetic and technical studies on large-scale culture of *Rhodiola sachalinensis* compact callus aggregates with air-lift reactors, *J Chem Technol Biotechnol* 72: 227-234.
  - Yamashiro S, Noguchi K, Matsuzaki T, Miyagi K, Nakasone J, Sakanashi M, Sakanashi M, Kukita I, Aniya Y y Sakanashi M (2003) Cardioprotective effects of extracts from *Psidium guajava* L and *Limonium wrightii*, Okinawan medicinal plants, against ischemia-reperfusion injury in perfused rat hearts. *Pharmacology* 67(3):128-35.
  - Yamazaki Y, Urano A, Sudo H, Kitajima M, Takayama H, Yamazaki M, Aimi N, Saito K (2003) Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants. *Phytochemistry* 62: 461-470.
  - Younos C, Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC, Misslin R y Mortier F (1990) Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica* 56: 430–434.
  - Zhao J, Zhu W, Hu Q y He X (2000) Improved alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnology Letters* 22: 1221-1226.
  - Zhao J, Zhu W y Hu Q (2001a) Effects of stress factors, bioregulators and synthetic precursor on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 55: 693-698.
  - Zhong, JJ (2001) Biochemical engineering of the production of plant- specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 72: 21-26.
  - Ziv M (1999) Developmental and structural patterns of *in vitro* plants. En: Woong Y y Sant B (eds) *Morphogenesis in plant tissue cultures*. pp. 235-253.
  - Zobayed S, Zobayed A, Kubota C y Kozai T (1999) Large-scale photoautotrophic micropropagation of *Eucalyptus* plantlets under forced ventilation. *Abstr. The congress on in vitro Biology*.