

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA**

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD**

**POSGRADO EN BIOTECNOLOGIA**

**OBTENCION DE PRODUCTOS NATURALES EN CULTIVOS DE CALLO DE**  
*Artemisa absinthium L.*

**Informe final del trabajo de investigación**

**Que presenta:**

**Q.F.I. ARTURO MUÑOZ FLORES**

**Para obtener el Grado Académico de**  
**ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA**  
**(Cultivo de Tejidos Vegetales)**

**México, D.F.**

**1993**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fitocquímica (S-153) del Departamento de Biotecnología de la UAM- Iztapalapa, bajo la asesoría de los profesores Francisco Cruz Sosa y José Angel Lechuga Córchado a quienes agradezco su gran apoyo y paciencia para llevar a cabo este trabajo de investigación.

## Agradecimientos

A las autoridades de la Dirección General De Educación Tecnológica Industrial:

Ing. Raul González Apaulaza  
Director general de la D.G.E.T.I.

C. Ing. Raúl Ficachi Solano  
Cordinador Estatal del Estado de México

A la comisión Central de la D.G.E.T.I. del Año Sabático

C. Ing. José L. Ramírez Paulo  
Director del CBETIS 202.

Por su autorización del Año Sabático.

A las autoridades de la UAMI:

M.C. Rosaura Grether González  
Directora de la división de CBS.

M.C. Clara Pelayo Zaldivar  
Jefe del Departamento de Biotecnología

Dr. Oscar Monroy Hermosillo  
Cordinador de Posgrado

Por su apoyo para realizar el trabajo en las instalaciones de la UAMI.

A mis asesores Dr. Francisco Cruz Sosa y al Biólogo José Angel Lechuga Corchado por la dirección técnica del trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Salvador Meráz V., Juan C. Peña A., Juan Orozco V., Dimas Mejía S., Eduardo De Valdemar O., José F. Miranda Z., María Contreras M. y Olga Nava V. por su apoyo en el trabajo experimental y de computación.

## CONTENIDO

I	INTRODUCCION
I.1	HISTORIA DE LA BIOTECNOLOGIA VEGETAL
I.2	MEDIOS DE CULTIVO
I.3	REGULADORES
I.4	CULTIVO DE TEJIDOS
II	ANTECEDENTES
II.1	<i>Artemisia absinthium</i> L. (Ajenjo)
III	OBJETIVOS Y METAS
III.1	Objetivos generales
III.2	Objetivos particulares
III.3	Metas
IV	HIPOTESIS
V	METODOLOGIA
V.1	Métodos de cultivo
V.2	Métodos de extracción y purificación
VI	PARTE EXPERIMENTAL
VII	RESULTADOS
VIII	CONCLUSIONES
IX	BIBLIOGRAFIA
X	ANEXOS
X.1	FIGURAS Y TABLAS
X.2	PRODUCTOS DEL TRABAJO
X.3	ESPECTRO DE RMN

## INTRODUCCION

### I.1 Historia de la Biotecnología Vegetal:

El cultivo de células de plantas y de tejidos vegetales en los últimos quince años ha tenido una evolución favorable, lo que ha conducido algunas veces a su explotación comercial. Las técnicas del cultivo de células se han desarrollado en muchas áreas en las que interviene la biotecnología, como son: la agricultura, la silvicultura, la horticultura y en la industria farmacéutica.

A continuación se da un cronograma histórico de las técnicas del cultivo de células (Schmauder y Doebel, 1990):

<b>Especie</b>	<b>Resultado</b>
<i>Tradescantia</i>	Primeros experimentos de cultivo con aislamiento de células de plantas, 1902.
<i>Zea</i>	Cultivo de raíz <i>in vitro</i> obtenida de cultivos permanentes, 1922.
<i>Lycopersicon</i>	1eros cultivos permanentes de raíces, 1934.
<i>Daucus</i>	1eros cultivos de callos permanentes, 1937.
<i>Daucus, Picea y Phaseolus</i>	Primeros cultivos en suspensión de célula simples ó agregados celulares, 1954.
<i>Daucus</i>	Cultivos de cuerpos embrionarios en tejidos, 1958.  Obtención de células clonadas en cultivos simples en agar, 1960.
<i>Lycopersicon</i>	Métodos para obtener un gran número de protoplastos de tejidos de plantas, 1960.  Primeros cultivos en masa de células de plantas en suspensión, 1959 y 1960.
<i>Cymbidium</i>	Multiplicación clonal de plantas para horticultura en cultivos de tejidos, 1963.
<i>Nicotian y Datura</i>	Producción <i>in vitro</i> de plantas haploides de polen inmaduro en cultivo de anteras, 1967.
<i>Nicotiana</i>	Aislamiento de mutantes auxotróficas de de cultivo de células, 1970.
<i>Nicotiana</i>	Regeneración de plantas de cultivo de protoplastos, 1971.
<i>Nicotiana</i>	1er. cuerpo híbrido interespecífico de plantas fusionando protoplastos, 1972.
<i>Solanum tuberosum y Lycopersicon esculentum.</i>	1er. cuerpo somático híbrido intergenético de plantas por fusión de protoplastos, 1978.

*Lithospermum* -

1era producción industrial de metabolitos secundarios de plantas (derivados de la Shikonina), 1982.

Para mayor información de la historia de la Biotecnología ver anexo.

Establecimiento de Cultivos de Tejidos y de Células de Plantas.

El cultivo de tejidos y células de plantas se inicia seleccionando el material vegetal para dar inicio a la formación de callos, tomando además el origen genético del material vegetal (diferencias en el número de cromosomas). El material vegetal y la formación de callos *in vitro* son generalmente cultivados en superficies de agar. Los callos son obtenidos de tejidos diferenciados mediante una proliferación acelerada, continua y desordenada dando origen a una masa amorfa de tejido. Tienen una apariencia compacta, dura y esponjosa; el color que presentan es verde, amarillo, rojo, café y sin color. Los estudios microscópicos indican una gran diversidad celular debido al origen de las células, edad de los cultivos y la composición de los medios. La característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células ya que con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y hasta formar plantas completas. Aunque éstas pueden llegar a presentar diferencias morfológicas con la planta de la misma especie. Para obtener un buen cultivo de callos se emplean plantas jóvenes con gran actividad de crecimiento siendo el inóculo (de 5.0 a 10.0 mm por lado). Generalmente se lleva de tres a ocho semanas para alcanzar el tamaño suficiente y poder transferirlo (50 a 150 mg) a un medio nuevo y sin que este contaminado. El cultivo de callos se divide en las etapas siguientes:

**Inducción:** comienzan las células su crecimiento tanto en número como en tamaño.

**Proliferación:** el tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.

**Inducción de la diferenciación:** se obtienen meristemas tanto apicales y radiculares a partir de la masa del callo.

**Envejecimiento:** es la pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado. (Hurtado y Merino, 1987).

1.2 y 1.3 Medios de Cultivo y Reguladores:

Se deben controlar las condiciones de los medios de cultivo, para que los datos y observaciones sean más comparables. El cultivo de células está regido por el origen del material vegetal y el medio de cultivo. En general los tejidos de raíces ó brotes ofrecen los mejores materiales para la producción de callos. En cuanto al medio de cultivo su composición es un factor importante y determinante en el crecimiento, así White (1963), empleó con éxito un medio con los nutrientes requeridos para el cultivo de células de plantas y de raíces, sin embargo, no le resultó para el crecimiento de callos y células en suspensión. Debido a que no se puede sostener el crecimiento con las cantidades de potasio y nitrógeno que se utilizó, ésta se compensó usando extractos de levadura, proteínas hidrolizadas, aminoácidos etc. Hoy se encuentran medios más adecuados que ofrecen mejores condiciones experimentales y sin la adición de sustancias complejas como el de Murashige y Skoog (1962). Este presenta una proporción de nutrientes bien

balanceada, con contenidos altos de nitratos, potasio y amonio. Además se puede agregar vitaminas, hormonas y otros suplementos (Gamborg *et al.*, 1976).

En los estudios de cultivo de tejidos de *Vicia faba* L., los callos se presentan principalmente en el tejido provascular, aquí las células se expanden mostrando núcleos largos y actividad meristemática la cual resulta en la formación de callos. Estos alcanzan su crecimiento máximo a los 45 días, por lo que se tienen que resembrar en medios frescos. Después de seis meses el callo se desorganiza internamente, ennegreciéndose los tejidos. Se determinó que el efecto más sobresaliente sobre el crecimiento fué cuando se usó extracto de levadura y cuando se resiembró por periodos largos, produciendo una gran actividad en los tejidos de callos Venketeswaran, (1962). Para regular el crecimiento se debe tomar en cuenta la acción biológica y fisiológica de las sustancias en el crecimiento y formación de órganos, especialmente en la formación de brotes en tejidos de plantas cultivadas *in vitro*. Las auxinas se han usado para acelerar el desarrollo de las células y como reguladores en la división celular, por eso se les han llamado cinetinas. Por otro lado, inhiben el elongamiento de la raíz y el desarrollo de brotes. De los estudios llevados por Miller (1956) se dedujo que el crecimiento de tallos en medios que lleven auxinas, sales y nutrientes en solución, éstos muestran un incremento en la formación de la raíz; pero un decremento en la formación de brotes laterales. Si se emplean soluciones con cinetina, estas favorecen el desarrollo de brotes pero retardan el desarrollo de la raíz. Skoog y Miller (1956).

Por ello, el medio nutriente que se necesita debe ser específico. Algunos de ellos son: Murashige-Skoog, (1962), Schenk-Hildebrandt, (1972), Gamborg *et al.*, (1976), Linsmaier y Skoog (1975). El medio de cultivo de una manera general contiene:

- 1 Macronutrientes ejem.:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $PO_4^{-3}$ ,  $NO_2^-$ ,  $SO_4^{-2}$ ,  $NH_3$
- 2 Micronutrientes ejem.:  $Co^{+2}$ ,  $B^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ , etc.
- 3 Una fuente de carbono, ejem: sacarosa, glucosa.
- 4 Reguladores de crecimiento ejem.: Auxinas, Kinetinas, Acido giberélico.

Para más información ver anexo de reguladores y medios de cultivo.

El cultivo de callos aumenta las poblaciones de células que son usadas para seleccionar variantes genéticas, experimentos de regeneración, manipulaciones genéticas diversas y para la síntesis de productos metabólicos.

El medio de Murashige y Skoog es adecuado para muchas especies y diferentes partes de la planta por tener gran cantidad de macronutrientes y altas concentraciones de nitrógeno en forma de nitrato de amonio y de potasio.

Para preparar un litro de medio, se emplea:

- 4.4 g de medio (Murashige-Skoog)
- 30 g de sacarosa
- 1 mg de cinetina
- 8 g de agar

0.4 mg de 2,4-D  
Agua desionizada c.b.p. 1 litro. (Hurtado y Merino, 1987).

#### 1.4 Cultivo de Tejidos:

La aplicación de células de plantas y sus cultivos de tejidos se a aplicado en dos áreas de la biotecnología:

1. Propagación de plantas *in vitro* y reproducción *in vitro*.
2. Producción *in vitro* de productos secundarios de plantas.

#### Propagación de Plantas *in vitro* y Reproducción de Plantas *in vitro* :

La biotecnología en la agricultura tiene un gran interés económico debido a la propagación *in vitro* de especies de plantas superiores que rápidamente aumentan su biomasa bajo condiciones controladas. Así son usadas las técnicas de propagación *in vitro* para aplicarlas en horticultura por ejemplo: la producción comercial de orquídeas, especies de bulbos y en la reforestación. La reforestación se puede hacer de cualquier parte de la planta como: tallos, hojas y raíces. Los tejidos de callos también pueden surgir de las estructuras meristemáticas profundas semejantes a los embriones. Estos cuerpos son las semillas capaces de desarrollar plantas completamente normales, el más reciente desarrollo en este campo es la producción artificial de semillas que son cuerpos embrionarios encápsulados en una gel y colocados directamente dentro del terreno. La producción *in vitro* de plantas maneja técnicas para manipulaciones genéticas.

#### Producción *in vitro* de Productos Secundarios de Plantas:

El cultivo de células de plantas se aplica para desarrollar las técnicas para una mejor explotación de sus recursos naturales y se apliquen como: aditivos en alimentos, excipientes en los cosméticos, excipientes y fármacos en la industria farmacéutica y como conservadores, colorantes etc., en la industria química.

Una de las áreas que actualmente se le da énfasis al cultivo de callos es la síntesis y extracción de productos naturales (Hurtado y Merino, 1987).

A continuación se da una tabla de los productos secundarios de plantas producidos de los cultivos de células (Schmauder y Doebel, 1990):

Componente	Célula	Contenido (% en peso)	(g/l)
Saponinas	<i>Panax ginseng</i>	27	
Shikoninas	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> L	12-20	1.4-3.7
Antraquinonas	<i>Morinda citrifolia</i> L. <i>Galium molugo</i> L.	15-18	2.0-2.5
Verbascosidos	<i>Syringa vulgaris</i> L	16	1.4

Acido rosmarínico	<i>Coleus blumei</i> L	25	5,6
Bencilisoquinolei- na	<i>Coptis japonica</i> L <i>Berbers stolonifera</i> L	7-15	0.9-2.7
Alcaloides	<i>Macleaya microcarpa</i> L	3.8	
Cinamoilputresci- nas	<i>Nicotiana tabacum</i> L	2.1	0.1
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i> L	7.2	0.23
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	2.1	0.1
Benzofenantre- dinas	<i>Eschscholtzia californica</i> L	1.7	0.15
Alcaloides indólicos	<i>Catharanthus roseaus</i> L	1.4	
Ubiquinina	<i>Nicotiana tabacum</i>	0.5	0.05

### Selección de Estrategias

Una de ellas es la disposición genética, por ejemplo los productos coloreados se pueden usar por su facilidad de cuantificación y detección. Así las shikoninas son rojas y amarillas las cuáles muestran una selección visual en las líneas de las células. Otra selección para conocer los componentes son las propiedades de fluorescencia, cuando se irradia luz UV. (ejemplo alcaloides indólicos). Para los demás productos secundarios son usadas las técnicas de cromatografía en capa fina y en líquidos. Para tener líneas con mayor producción de metabolitos se deben seleccionar continuamente éstas líneas a través de períodos de subcultivos.

### Producción de Metabolitos Secundarios:

Por muchos años la producción de metabolitos secundarios tomó la dirección de alcaloides, pigmentos y compuestos aromáticos. Desafortunadamente la producción ha bajado por: la baja estabilidad de los cultivos de células, la tendencia a formar otros componentes y la diferenciación de las células. De alguna manera se han controlado con iluminación específica, concentraciones diferentes de fitohormonas y la regulación de gases en las fases. Esto se muestra con la producción de shikoninas y sus derivados por las Industrias Petroquímicas Mitsui LTD. Primero emplearon nitrógeno amoniacal para que las células se desarrollen hasta el noveno día, después cambian a nitrato y se producen los metabolitos de shikonina.

### Inmovilización de Células de Plantas:

El cultivo de células habilita la producción secundaria de productos o la transformación de diferentes componentes y también el transporte de sustratos y productos entre el medio y la célula y éstas células muestran suficiente estabilidad por largo tiempo. Para la inmovilización depende de las propiedades específicas de las células siendo necesario en cada caso probar un método

específico. Debido a que los agentes requeridos para inmovilizar pueden dañar alguna función metabólica y las células deben colocarse en medios que contengan: alginatos, carragenatos y agaros. Estos sistemas se continúan con técnicas de recirculaciones continuas y en lote. Hasta ahora la inmovilización a sido ejecutada con células intactas, agregados celulares, células permeables y protoplastos.

#### Aislamiento y Purificación de Productos:

La localización de los productos dentro de las células ofrece el problema de sus altos costos y además la purificación es un camino largo y complicado.

En la siguiente tabla se dan algunos ejemplos de aislamiento:

Procedimientos específicos para el aislamiento de productos de las fermentaciones en suspensión (Schmauder y Doebel, 1990):

Técnica	Acido Rosmarínico (g)	Producción (%)	Pureza (%)
Fermentación de 32 l de medio, centrifugación y obtención de productos de las células.	152.3	100	20
Calentamiento de células con agua a pH 3 y 80 grados, centrifugación y concentración de la capa de agua.	146.2	96	30.1
Cromatografía de intercambio iónico (XAD-2) agua-metanol 40 % V/V.	117.8	77	85.5
Concentración a vacío, cristalización con agua, lavado y liofilización.	103.7	65	97

#### Aspectos Económicos y el Rumbo Futuro de la Explotación:

La aplicación de cultivos en el campo de la medicina quedan aún sin resolver y el cultivo de plantas con aceites esenciales tiene grandes perspectivas económicas, sin embargo sus altos costos hacen que los métodos biotecnológicos con terpenoides aún no se apliquen. Las técnicas de cultivo *in vitro* es posible aplicar a cultivos con crecimiento pequeño y que no necesiten gran demanda de componentes.

Las siguientes líneas de células serán en un futuro el centro de investigación y desarrollo :

Producción de productos naturales, farmacéuticos, aceites esenciales y colorantes, a través de síntesis nuevas, biotransformación, técnicas de inmovilización, etc.

Además usando la tecnología de cultivo de células en la producción al servicio de la agricultura y la horticultura. La producción económica es posible: si el costo de los productos esta en el rango de \$1000/Kg y si la producción es de 10g/l de suspensión de cultivo. Un cambio en la tecnología puede ser causado por: Trabajar con altas densidades de células y disminuyendo costos.

## ANTECEDENTES

### II.1 *Artemisia absinthium* L.

La malaria es una enfermedad tropical la cual provoca una alta mortalidad, principalmente infantil, causando un desequilibrio económico sobretodo en los pueblos africanos. En China se usó desde hace mucho tiempo una planta con actividad para bajar la fiebre, hierba a la que llamaron Qinghao (*Artemisia annua* L.). De ella se aisló una droga natural a la que se llamó artemisina ó quinghasou (QHS) con actividad antimalarial, de rápida acción y efectiva contra el parásito malarial, pertenece al grupo de las sesquiterpenlactonas. Sin embargo, el contenido bajo de artemisina en *Artemisia annua* ha sido un factor limitante para su uso clínico, además la síntesis de la molécula no es económicamente factible. La aplicación de la biotecnología por medio del cultivo de células y tejidos puede proporcionar una mayor cantidad potencial de metabolitos secundarios y además que éstos tengan aplicación en la industria farmacéutica por lo que su investigación se ha intensificado. Esto se ha aplicado en la producción de artemisina de plántulas derivadas de hojas ó del cultivo de callos (Tawfiq y col., 1989).

*Artemisia douglasiana* L crece en Cuyo, Argentina y es utilizada por la gente como agente antiulcerante de ahí su importancia en Fitoquímica y en Farmacología. En un análisis fitoquímico se identificó la dihidroleucodina (DHL) y en estudios recientes de farmacología se investigó el efecto citoprotectivo contra la ulcera péptica inducida químicamente en ratas. En este trabajo, su objetivo fue la selección de (DHL) producida en las líneas de *Artemisia douglasiana* a partir de callos germinados en diferentes medios, la (DHL) se extrajo con metanol, separado por CC y analizada por HPLC (Pestchanker *et al.*, 1989). En una investigación subsecuente con *Artemisia douglasiana*, los mismos autores describieron la distribución de DHL en diferentes partes de la planta. Esta distribución de la producción de DHL se determinó en material fresco y seco, de raíces, tallos, flores y hojas de especímenes adultos (fig. 1). (Pestchanker *et al.*, 1990).

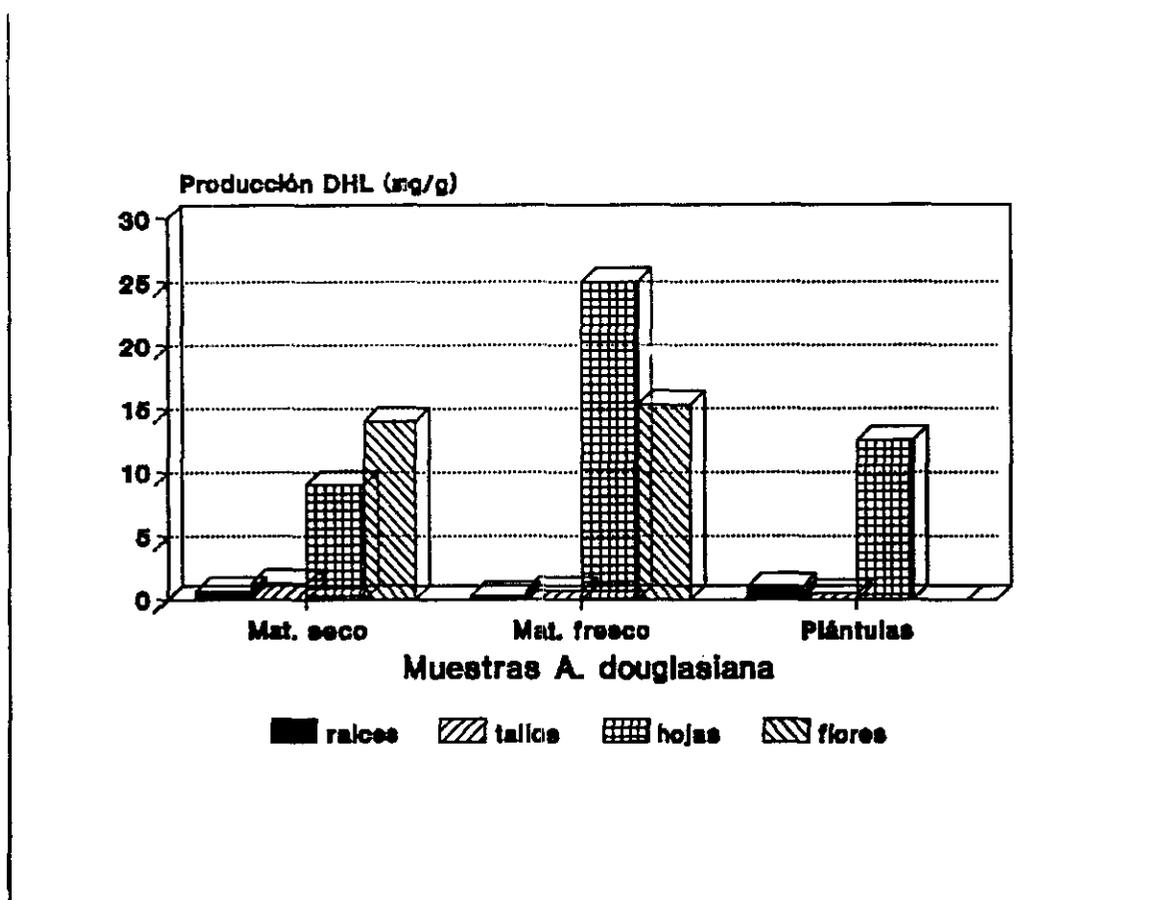


Fig. 1. Producción de DHL en *Artemisia douglasiana*

En el cultivo de plántulas de *Artemisia annua* L en un biorreactor usando carbono simple y nitrógeno como fuente energética, se produce una variedad de plantas desarrolladas en el laboratorio y un método rápido para uniformizar la propagación en el campo. Para ello se ha desarrollado la recombinación de DNA, en la tecnología del cultivo de plantas. Esto es un paso en la producción de la ingeniería genética de las plantas, obteniendo plantas resistentes a insecticidas y a heladas. Una misma variedad de plantas es desarrollada en el laboratorio y de esta manera se uniformiza la propagación y es llevada como testigo al campo. Así la micropropagación es controlada y facilita el desarrollo para transferir las plantas del laboratorio hacia el campo. De esta forma queda establecida la micropropagación de un número de especies de plantas para la producción por medio de técnicas de cultivo. (Park *et al.*, 1989).

En el estudio de micropropagación de *Artemisia granatensis* L originaria de la Sierra Nevada de Granada, España también llamada manzanilla real, esta especie está catalogada en peligro de extinción con muy poca probabilidad de supervivencia en la naturaleza. Por eso se aplicó en ella, la técnica de micropropagación. La propagación ocurre por semillas (Clemente *et al.*, 1991).

La acumulación de poliacetilenos representa características biogénicas típicas dentro de las Asteraceae (compuestas). Estos componentes abundan en las tribus Hellianteae, Cynareae, Anthemideae. Para ello se analizó la presencia de diferentes tipos de acetilenos en un gran número de especies del género *Artemisia* lo que dió como resultado que esta distribución proporciona el género

*Artemisia* un significado químico taxonómico especial. Basándose en los datos disponibles de *Artemisia vulgaris* L. se pone en evidencia que existe una relación muy estrecha de ésta con respecto a las demás especies del grupo Vulgares provenientes del este de Asia y de Norteamérica, presentando una abundante cantidad de poliacetilenos y en ocasiones una gran acumulación. Esto es por que hay deformación de fenotipos en muchos miembros del grupo Vulgares mostrando una amplia diversidad morfológica. Una investigación comparativa reciente sobre las características de los poliacetilenos representativos, del grupo Vulgares muestra como los poliacetilenos pueden agruparse de una manera natural (Wallnofer *et al.*, 1989).

*Tanacetum parthenium* L es reconocida en la medicina popular como un remedio eficaz contra la migraña y dolores relacionados. El principal principio activo es la sesquiterpenlactona pathernolida. Se establecieron líneas de cultivo de células para producir éste componente en mayor proporción a los otros metabolitos producidos en el órgano floral. Se establecieron líneas de callos entre dos miembros de la tribu Anthemidae de las compuestas, estas dos son *Tanacetum vulgare* L. y *Artemisia vulgaris* L para fines comparativos, estas dos últimas especies son conocidas por producir monoterpenos con una variedad de esqueletos típicos. Se establecieron sus líneas de callos, junto con las investigaciones de metabolitos secundarios de *T. vulgare* (Banthorpe y Brown., 1989). Sin embargo, en el cultivo de estos géneros no se obtienen los productos característicos de sus congéneres y las líneas de callos de todos estos géneros producen repentinamente derivados coumarínicos (Banthorpe y Brown, 1989).

El extenso género *Artemisia* L. es conocido por la aplicación medicinal de muchas de sus especies. *A. caerulescens* L. subsp. *gargantae* Valles-Xirau et Seoane-Camba, es una especie que se describió recientemente y que puede ser localizada en ciertas áreas del norte de España. Se colectó en la vecindad de Alcarrás, Lerida, España. La planta se secó y molió, después se sometió a extracción, desengrasado y purificación; de la que se obtuvo por cristalización algunos compuestos, de los cuales se llegó a determinar la estructura de dos sesquiterpenlactonas: Gargantólida y 1-epigargantólida (Sanz y Marco, 1989).

Las sesquiterpenlactonas son los metabolitos secundarios más característicos de muchas especies del extenso género *Artemisia* (compuestas, tribu Anthemidae). *Artemisia herba-alba* Assu. Subsp. *Valentina* Lam. muestra primeramente que contiene lactonas con esqueleto tipo eudesmano. En esta investigación se trabajaron con dos quimiotipos de estas especies que crecen en Villena, Alicante, España (tipo 1), y en los alrededores de las provincias de Valencia y Teruel España (tipo 2). Ambas plantas fueron sujetas a los mismos tratamientos de sus partes aéreas: secadas, molidas, maceradas, desengrasadas, separadas por CC y purificadas por HPLC y TLC preparativa. Para obtener 11 nuevos eudesmanólidos oxigenados y dos nuevas sesquiterpenlactonas. (Marco, *et al.*, 1990).

Posteriormente, estos mismos autores indicaron una corrección en las estructuras de la torrentina y 11-epitorrentina aisladas de *Artemisia herba-alba* Also subsp. *Valentina* Lam. (Asteraceae), tomando en cuenta los resultados de los espectros de  $^1\text{H}$  nmr y los análisis cristalográficos de rayos X (Marco y Sanz, 1992).

Recientemente, se reportó el aislamiento de grasas, aceites esenciales y sesquiterpenlactonas de *Artemisia herba-alba* Assu Subsp. *Valentina* Lam. Un estudio posterior sobre los especímenes de la misma planta colectada en la

vecindad de Villena (Alicante España), indica la presencia de nuevos terpenoides. El material vegetal es secado, molido, extraído, desengrasado, purificado por CC, HPLC y TLC preparativa. Aislado nuevas sesquiterpenlactonas, eudesmanolidos, triterpenos como ergosterol, beta-sitosterol y otros componentes (Sanz *et al.*, 1989).

*Artemisia herba-alba* Asso. Subsp. Valentina Lam. es una de las dos subespecies de *Artemisia herba-alba*. Durante once años se han venido investigando un quimiotipo de la planta, donde se han determinado grasas, aceites esenciales, tres sesquiterpenlactonas con esqueleto tipo eudesmano; así como el establecimiento de la estructura de la torrentina. Otro quimiotipo de la misma subespecie se ha investigado y de esta forma se han aislado siete nuevas sesquiterpenlactonas con esqueleto tipo eudesmano y germacrano y un nuevo éster eudesmano. Así se establecen los resultados de tres quimiotipos de *A. herba-alba* subespecie valentina, de la que se aislaron cuatro nuevos eudesmanólidos, un ácido eudesmanólido, torrentina y sus epímeros, artesina, taurina y sus epímeros. Para ello la planta se colectó en los alrededores de las provincias de Valencia y Teruel, España. La planta es secada, molida, extraída, desengrasada, fraccionada y finalmente purificada por CCD preparativa. (Sanz *et al.*, 1990).

A partir de los estudios anteriores de inducción y crecimiento de callos sobre fragmentos de hoja de *Artemisia absinthium* con diferentes reguladores de crecimiento vegetal y sacarosa. Se determinó usar para éste trabajo el medio de cultivo denominado MS-3. El que contiene 0.4 mg de 2,4-D, 1 mg. de cinetina y 30 g de sacarosa. Por obtener una mejor inducción de callos en explantes de hojas, un mayor peso fresco debido a la inducción del 100 % de callos y por qué al sustituir la fuente de carbono por glucosa, se obtienen resultados semejantes al usar el MS-3, Lechuga y Col. (1992).

Se continuó con la revisión bibliográfica del género *Artemisia*, siendo la mayoría de los artículos consultados referentes a estudios fitoquímicos y a síntesis de metabolitos.

La investigación del principio amargo de *Artemisia absinthium* L se basó en un estudio sistemático de los precursores del Chamazuleno, ya que se conoce que en la familia de las compuestas estas substancias dan esta propiedad a este grupo de plantas. La Absintina y la Anabsintina son dos lactonas sesquiterpénicas que son típicas de *A. absinthium*, la primera se encuentra presente como tal en la planta, y la segunda parece ser que se forma durante su aislamiento a partir de otro componente con la misma propiedad amarga; que puede ser la Absintina. Por lo tanto la Anabsintina se puede considerar como un artefacto de extracción y ésta se aisló en forma cristalina a partir de extractos de éter de petróleo y de etanol, los cristales obtenidos de metanol ó etanol son de color naranja. Al realizar la cristalización se obtienen cristales solvatados. Los resultados claramente muestran la composición de 15 carbonos con 5 moléculas de agua de solvatación obteniéndose con solventes de punto de ebullición alto y la sustancia con punto de fusión elevado, por sus constantes físicas se concluye que se trata de Anabsintina. Estructuralmente la Absintina es diferente a la Anabsintina ya que esta es un proazuleno natural (Sorm y Col., 1955).

Los azulenos son compuestos de tipo acetilénico y se considera que se caracterizan porque en un destilado de manzanilla dan coloración azul. En la

familia de las compuestas se tienen dos subgrupos, en el Tubliflorae se encuentran los azulenos.

Los géneros *Artemisia* y *Tanacetum* pertenecen al subgrupo Tubliflorae, en donde se han encontrado muchas lactonas sesquiterpénicas de varios tipos: Eudesmanólidos (Santonina), Germacranólidos y Pseudoguayanólidos (Trease y Evans, 1987).

*Artemisia judaica* L, cuyo nombre en Arabe es *Shih-Balady* se extiende ampliamente en Egipto en la zonas costeras, en el desierto, cerca de los ríos y en la península del Sinai. Esta especie se ha usado durante mucho tiempo como hierba medicinal y esta siendo estudiada por varios grupos, los que han enriquecido la química del género al adicionar una serie de eudesmanólidos, monoterpenos y compuestos aromáticos. Una reinvestigación de las partes polares del extracto de *A. judaica* L, trabajando únicamente sus partes aéreas, ha aportado nuevas sesquiterpenlactonas, eudesmanólidos y glaucólidos. Las partes aéreas de ésta planta fueron colectadas en Egipto, se secaron a temperatura ambiente y fueron extraídas con etanol al 95%. El extracto se concentró con vacío y se adicionó ácido acético para dejarse tres horas a la obscuridad. Se formó un depósito verde el cual se separó de la solución, ésta se extrajo con éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol. Las fracciones amargas de los tres primeros disolventes se juntaron y se concentran hasta dejar un residuo que pesó 33 g. El residuo se aplicó a una columna cromatográfica, la que se eluyó con disolventes y de las fracciones que salieron con tetracloruro de carbono y cloroformo se obtuvieron 2.5 g de judaicina (Khafagy y col., 1988).

*Artemisia afro* L, es una de las especies de éste género que solo se ha encontrado en el sur de Africa, contiene un aceite esencial y se conoce poco de los componentes no volátiles. Las raíces contienen acetilenos típicos, presentes en otras especies de *Artemisia*. La planta crece en la estación experimental de la Universidad de For Hase. El material es secado al aire para ser extraído con metanol-éter-éter de petróleo. Se obtiene un extracto de las raíces con un peso de 230 g, el que es purificado por cromatografía en columna y en capa fina obteniéndose acetilenos, humuleno, beta-farneseno y escualeno. De las fracciones más polares se obtiene isofraxidina, entre otros compuestos. El extracto de las partes aéreas también es purificado por cromatografía en columna y después por cromatografía en capa fina obteniendo alfa y beta-thujona, ascaridol y alcanfor (Jakupovik y col., 1988).

La estructura propuesta para una flavona aislada de *Artemisia lanata* L, es revisada al compararla con los datos espectrales obtenidos para otra flavona similar. La estructura del producto natural aislado denominado Artementina, difiere de la otra flavona que es sintética, por sus datos espectrales (Tukunaro y col., 1989).

Continuando con los estudios de sesquiterpenlactonas de las especies de *Artemisia*, se investigaron las partes aéreas de *Artemisia montana* L., de donde dos nuevas sesquiterpenlactonas del tipo Guayanólido: la Neoezoguainina y la Ezoyomoginina son aisladas junto con otras cinco ya conocidas. Sus estructuras son determinadas por <sup>1</sup>HNMR, e identificando los componentes ya conocidos por comparación con muestras auténticas. Las partes aéreas de la planta son extraídas con cloroformo, para separar los componentes se aplica cromatografía en columna y en capa fina para posteriormente cristalizarse algunas fracciones con éter etílico y acetato de etilo y a otras se aplica de nuevo la columna (Masahiko y col., 1989).

El vasto género *Artemisia* perteneciente a la tribu *Anthemidae*, contiene gran cantidad de sesquiterpenlactonas de tipo eudesmanólido. Al parecer los estudios químicos de éste género se seccionan, dando resultados insuficientes pero con una clara imagen. *Artemisia krasch* es una especie que se localiza en Iran. La planta se colectó a 60 Km al norte de Teheran y se depositó un espécimen en el herbario del Departamento de Botánica de la Shalid Beheshty Universidad de Teheran. Esta es secada, molida y extraída con éter-metanol-petróleo. El extracto desengrasado con metanol es separado por cromatografía en columna, obteniendo varias fracciones. De la fracción No. 1 por capa fina se obtiene: fluoroacetofenona, cicloartenona y pinocarveol, las demás fracciones fueron separadas por HPLC (Rustaigan y col., 1989).

*Artemisia herba-alba* var. *asso*, es una planta muy usada en la medicina popular, esta especie se distribuye en una diversidad de quimiotipos en España. En esta investigación se realizó una comparación de los constituyentes fitoquímicos con las especies de Israel. Así las especies de España contienen grandes cantidades de los aceites cineolo y bornano a diferencia de la Israelí y Marroquí que no los tienen. En cambio éstas contienen monoterpenos que son característicos de las de Israel y la davanona ó acetato de cisrisantenil de las Marroquíes. La potencia antibacterial de los aceites Españoles, fue investigada junto con las de Israel y es notable para ambas la inhibición del crecimiento de *Shigella sunnei*, pero no hubo inhibición en *Escherichia coli*. El aceite es extraído de la planta por destilación con arrastre de vapor (Feuerstein y col., 1988).

*Artemisia hispanica* Lam. non Weber ex. Stechm. es un arbusto de hojas gris parduzco y marcadamente aromático, con ligero olor acre. Se encuentran sus poblaciones dispersas por las zonas áridas de España y es conocida con el sinónimo de *Artemisia reptans* c. Sm, ex. Linkin. Busch. Las partes aéreas de *A. hispanica* son secadas y molidas, para ser extraídas con metanol al 80% y al 50%. Se juntan los extractos y se concentran, para después extraerse con una mezcla de hexano-éter y acetato de etilo. El de hexano no se trabajó, a diferencia de los otros extractos a los que se aplicó en cromatografías en columna y en capa fina para aislar los flavonoides (Marco y col. 1988).

*Artemisia arborescens* L, fue una planta usada por los antiguos Griegos y Arabes para propósitos anticoncéptivos. Como ya es sabido el género contiene gran cantidad de sesquiterpenlactonas y en ésta investigación de las partes aéreas de la planta se encontró una nueva sesquiterpen-lactona.

Para ello se percoló una cantidad de planta seca y molida con acetona, obteniéndose un extracto que se disolvió con metanol y agua, la solución es lavada con hexano y después con cloroformo. La clorofórmica es separada por columna y una de sus fracciones se volvió a someter a la cromatografía en columna para separar la sesquiterpenlactona (Grandulini y col., 1988).

La Artemisina (Quinghaousu), única sesquiterpenlactona con una función endoperóxido aislada de *Artemisia annua* L (compuestas). Es una planta medicinal que en China se utiliza como antimalárico, en ésta investigación se ha preparado la dihidroartemisina (mezcla diastereoisomérica), con mayor actividad antimalárica. (Vishwakarma, 1990).

En otro estudio, *Artemisia annua* L (Asteraceae), es cosechada en los Estados Unidos para la producción de la droga antimalaria artemisina. Sin embargo su baja concentración en las plantas cultivadas en el Nuevo Mundo y en Europa, ha sido un factor limitante para el aislamiento de la sustancia a gran escala y la

síntesis de la molécula no es económicamente factible. Acton y col. 1985 utilizaron la técnica de HPLC y la detección electroquímica, un método que utiliza EDTA en la fase móvil y electrodos de plata y mercurio, muy selectivo para artemisina, por ser el único constituyente del extracto que da un pico significativo en el cromatograma. Para este estudio se reporta el método de Acton con una alternativa, usando un electrodo de carbon-vidrio sin EDTA en la fase móvil y así se encontró una relativa distribución de artemisina en la planta. Para ello se trabajó con plantas enteras cultivadas de 8 a 13 semanas, la planta se dividió en tres partes: la parte superior, de 50 cm; la de en medio, de 50 cm y la inferior, de 50 cm. Todas las partes son secadas y molidas, para ser extraídas en soxhlet usando éter de petróleo durante 48 horas a 45°C. Se concluyó que la distribución de artemisina esta en mayor cantidad en las hojas que estan en la parte superior arriba de 50 cm, le siguen las que estan en medio a 50 cm y por último las que estan abajo de 50 cm. En tallos y raíces no se encontró y las semillas tienen un bajo contenido (Denys y col., 1990).

*Artemisia monosperma* L.(tribu Anthemideae), fue investigada anteriormente encontrando flavonoides, acetilenos, coumarinas y otros. Recientemente se reportó un componente acetilénico con actividad insecticida y dos nuevos derivados del ácido para-coumárico. La planta colectada entre El Cairo y Alejandria fue secada, molida y extraída con éter de petróleo, éter etílico y metanol. El extracto es desengrasado y se obtienen 10 g de residuo, el que es purificado por cromatografía en columna y capa fina para obtener flavonoides, derivados para-coumarínicos, dos componentes acetilénicos y derivados de la para-hidróxiacetofenona (Abdel-Mogib y col., 1990).

Cinco flavonoides y un derivado de acetofenona son aislados de *Artemisia campestris* subsp. *maritima*, incluyendo una nueva flavona. Para ello las partes aéreas que crecen en forma silvestre en las arenas de la Bahía cerca de Cabo Espichel, son secadas, molidas y se extrajeron con cloroformo. El extracto es purificado por cromatografía en columna y capa fina preparativa (Rauter y col., 1989).

Derivados sustituidos de alcoholes cinnámicos, especialmente coniferyl y sinapyl se encuentran extensamente distribuidos en el reino de las plantas. Juegan un importante papel en la biosíntesis de lignina. Se ha observado que la liberación de estos alcoholes y fenoles monoméricos durante los procesos digestivos ó durante el fumar, tiene implicaciones y molestias en humanos por despolimerización de la lignina. Tres años después se aislo un nuevo fenil propanoide de las raíces de *Artemisia assoana* Wilk. Basándose en los datos espectroscópicos de NMR, se asignó al producto la estructura del alcohol diisovalerato de sinapyl. El aislamiento de los derivados del alcohol cinnámico como isovaleroyl ó residuos de ácidos de diversas plantas de las compuestas son buenos predecesores para la síntesis del alcohol diisovalerato de sinapyl por acilación (Sanz y col., 1990).

*Artemisia sacrorum* Ledeb (compuestas), se le encuentra distribuida en el distrito noroeste de China, se conoce que en la medicina tradicional de este país, se utiliza para el tratamiento de hepatitis. Como un resultado de las investigaciones realizadas con esta planta, se logró aislar tres componentes diterpénicos, incluyendo tres glicósidos. Las partes aéreas fueron secadas, molidas y se extrajeron con ocho litros de agua a ebullición. La capa acuosa se concentró a vacío hasta tener un residuo de tres litros. Se adicionaron nueve litros de etanol, obteniendo un precipitado que es separado. El líquido se vuelve a concentrar a

vacio hasta tener otra vez tres litros. Se extrajo sucesivamente con éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y con n-butanol. El extracto clorofórmico es fraccionado por cromatografía en columna, obteniendo uno de los componentes diterpenos. El extracto de acetato de etilo se le aplica de nuevo cromatografía en columna para obtener otro de los diterpenos. Al extracto butanólico también se pasa por otra cromatografía en columna separándose el glicósido (Xian y col., 1990).

Durante todo este tiempo, numerosos estudios fitoquímicos del género *Artemisia* se han publicado, pero pocas de las sustancias aisladas presentan actividad biológica. Continuando con los que presentan actividad biológica de los productos naturales de *Asteraceae*, ahora se investiga *Artemisia borealis* Pallas (Syn. *A. campestris* L. subsp. *borealis* Pallas M.H. Hall et. Clements). Se han descrito en estudios de *A. campestris* y sus subespecies *marítima* y *glutinosa*, flavonoides, fenoles, coumarinas etc. Sin embargo no hay trabajos fitoquímicos de *A. borealis* acontecidos en las regiones árticas y alpinas del hemisferio norte. El ensayo biológico preliminar del extracto de diclorometano de *A. borealis*, muestra una actividad antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* L, una planta patógena. También muestra toxicidad contra el camarón de agua salada y contra la larva del mosquito que produce la fiebre amarilla. Las partes aereas secadas y molidas son extraídas con diclorometano formando un extracto que es separado por cromatografía en columna. En la fracción 10 se obtiene un poliacetileno (Wang y col., 1990).

*Artemisia pallens* Walls ex. D.C., planta que crece al sur de la India en las cercanías de los bosques de Sándalo. La planta es de 60 cm con hojas de color azul-verdoso y de flores poco notables. La Davanona es adquirida para dar una fragancia de olor a fruta, es el principal componente en las guirnaldas y en los ramos de flores. En la India se cultiva para la producción de aceite, pero no ha alcanzado gran popularidad por su alto costo. No obstante en los Estados Unidos, Europa y Japón se tiene un incremento en el uso del aceite como condimento de alimentos, en tabacos y en bebidas. La Davanona es el principal componente del aceite, sin embargo los que imparten el aroma estan en menor cantidad ya que la davanona pura no tiene olor. De acuerdo a este estudio, se aislaron y purificaron del aceite esencial de *A. pallens* ocho nuevos compuestos, responsables del aroma (Laxmi y col., 1991).

En la siguiente tabla se resumen los estudios del género *Artemisia*:

<i>A. annua</i> . L	Artemisina	Cultivo de células y de callos.	Tawfic et al., 1989.
<i>A. douglasiana</i> L.	DHL	Cultivo de callos.	Pestchanker et al., 1989.
<i>A. douglasiana</i>	DHL	Cultivo de callos.	Pestchanker et al., 1990.
<i>A. annua</i> L.		Cultivo en biorreactor.	Jong et al., 1989.
<i>A. granatensis</i> L.		Micropropagación de callos.	Clemente et al., 1991.
<i>A. vulgaris</i> L	Poliacetilenos	Análisis fitoquímico.	Wallnofer et al., 1989.

<i>A. vulgaris</i>	Escopoletina isofraxidina estigmasterol sitosterol.	Cultivo de callos.	Banthorpe et al., 1989.
<i>A. caerulescens</i> L.	Gargantolida 1-epigargantolida.	Extracción y separación.	Sanz y Marco. 1989.
<i>A. herba-alba</i> L.	Eudesmanolidos y Sesquiterpen- lactonas.	Extracción y separación.	Marco et al., 1990.
<i>A. herba-alba</i>	Torrentina y 11-epitorrentina.	Corrección de estructura.	Marco y Sanz 1992.
<i>A. herba-alba</i>	Nuevos terpe- noides y ses- quiterpenlac- tonas.	Extracción y separación.	Sanz et al., 1989.
<i>A. herba-alba</i>	Nuevos quimio- tipos y aisla- miento de ses- quiterpenlac- tonas.	Extracción separación.	y Sanz et al., 1990.
<i>A. absinthium</i> L.	Absintina y Anabsintina.	Extracción y separación.	Sorm et al., 1955.
<i>A. judaica</i> L.	Eudesmanolidos glaucolidos y sesquiterpen- lactonas.	Extracción y separación.	Khafagy et al., 1988.
<i>A. afra</i> L.	Acetilenos, humulenos, betafarneseno, escualeno, iso- fraxidina, alfa y beta thujona.	Extracción separación.	y Jakupovik et al., 1988.
<i>A. lanata</i> L.	Artementina	Revisión espectral.	Tukunaro et al., 1989.
<i>A. montana</i> L.	Neoezuguanina y ezuyomogina.	Extracción separación.	y Masahiko et al., 1989.
<i>A. krash</i> L.	Fluoroacetofe- nona, ciclo- artenona y pi- nocarveol.	Extracción separación.	y Rustaigan et al., 1989.
<i>A. herba-alba</i>	Cineolo, bor- nano y davanona.	Pruebas antibacteria- les.	Feuerverstein et al., 1988.
<i>A. hispanica</i> L.	Flavonoides.	Extracción separación.	y Marco et al., 1988.
<i>A. arbuscens</i> L.	Sesquiterpen- lactonas.	Extracción separación.	y Grandulini et al., 1988.

<i>A. annua</i>	Dihidroartemisinina.	Preparación de una mezcla diastereoisomérica.	Vishwakarma, 1990.
<i>A. annua</i>	Artemisinina.	Detección electroquímica y con HPLC en extractos de plantas cultivadas.	Denys et al., 1990.
<i>A. monosperma</i> L.	Acetileno y derivados del ac.p-coumárico.	Extracción y separación.	Abdel-Mogib et al., 1990.
<i>A. campestris</i> L.	Flavonoides y acetofenona.	Extracción y aislamiento.	Rauter et al., 1989.
<i>A. sacrorum</i> L.	Diterpenos y glicosidos.	Extracción y aislamiento.	Xian et al., 1990.
<i>A. borealis</i> L.	Poliacetilenos.	Extracción y aislamiento.	Wang et al., 1990.
<i>A. pallens</i> L.	Ocho componentes del aceite esencial davanona se aislaron.	Extracción y separación.	Laxmi et al., 1991.

## OBJETIVOS

### III.1 Objetivos generales:

Aplicar las técnicas de la biotecnología vegetal para la obtención de metabolitos secundarios de origen vegetal.

### III.2 Objetivos particulares:

Obtención de cultivo de callos de rápido crecimiento y con capacidad biosintética mediante el medio mineral de Murashige Skoog (1962), al cual se agregan otros componentes.

El aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios provenientes de los cultivos de callos; empleando las técnicas cromatográficas.

Determinación de la estructura molecular de los compuestos aislados, mediante técnicas espectroscópicas.

### III.3 Metas

Obtener el diploma de Especialización en Biotecnología.

Presentar los resultados en un congreso internacional.

Publicar los resultados en una revista de investigación especializada.

## HIPOTESIS

*Artemisia absinthium* L biosintetiza metabolitos secundarios *in vivo*, bajo las condiciones *in vitro* es posible que la planta manifieste esta propiedad e incluso bajo condiciones controladas incrementa su productividad.

## METODOLOGIA

Técnicas empleadas durante el cultivo:

- Desinfección
- Preparación de medios de cultivo (MS, B5)
- Esterilización del medio de cultivo y del material vegetal
- Colocación en el medio de cultivo
- Incubación
- Resiembra

Técnicas de aislamiento:

- Extracción con disolventes
- Purificación
- Separación por técnicas cromatográficas

Técnicas para determinar la estructura:

- Identificación de los metabolitos obtenidos por métodos espectroscópicos.

### V.1 Métodos de cultivo

Técnicas para la preparación del cultivo de callos de *Artemisia absinthium* L. *in vitro*

Se emplean plantas jóvenes de *Artemisia absinthium* (ajenjo), las hojas de la planta se cortan para ser desinfectadas superficialmente; primeramente con etanol absoluto durante 20 segundos y posteriormente se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio diluido al 10% durante 10 minutos. Para eliminar el desinfectante se lavan cuatro veces con agua destilada esterilizada. Los fragmentos de hojas se pasan en condiciones asépticas al medio de cultivo previamente preparado y esterilizado en autoclave; se ajusta el pH del medio basal de (Murashige-Skoog, 1962), el cuál se modificó en su composición de reguladores de crecimiento y suplementado con 3 % de sacarosa y 0.8 % de agar bacteriológico. Los cultivos se incuban en la obscuridad y con iluminación a una temperatura de 25 grados centígrados. Se van resembrando de 4 a 6 semanas, hasta obtener 4 generaciones ó más (Ver cuadro A).

### V.2 Métodos de extracción y purificación

Técnicas de separación y purificación aplicadas a los metabolitos del cultivo de callos de *Artemisia absinthium*:

Los callos de la primera a la cuarta generación son secados al medio ambiente, molidos y extraídos con metanol. Posteriormente se concentra a vacío el disolvente y se extrae con una mezcla de hexano-agua. Se separan las fracciones y a la acuosa se extrae con cloroformo. Las dos fracciones orgánicas son concentradas a vacío y la acuosa se seca a alto vacío (Ver cuadro 1A y 1B).

La purificación se comienza con cromatografía en columna, usando como soporte sílica gel Merk F<sub>254</sub> y la elución es llevada a cabo con disolventes de menor a mayor polaridad (hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol). Las fracciones son analizadas por cromatografía en capa fina, para que de esta manera se junten las fracciones equivalentes y posteriormente trabajarlas nuevamente en cromatografía en columna o en cromatografía preparativa (Ver cuadro 2).

### III PARTE EXPERIMENTAL

En el siguiente cuadro se resume el trabajo correspondiente a las técnicas de cultivo vegetal:

Preparación del explante	Preparación del medio de cultivo
1. Lavado con agua y jabón a las hojas	1. Pesar el medio de cultivo
2. En área limpia desinfección con etanol	2. Disolver en agua desionizada
3. Desinfección con cloralex	3. Agregar auxina, citocinina y sacarosa
4. Lavado con agua esterilizada	4. Aforar, agregar agar y disolver
5. Siembra en iluminación y oscuridad.	5. Vaciar a los frascos de cultivo
6. 1er. subcultivo (1a. generación de callos)	6. Esterilizar en autoclave
7. 2o. subcultivo ( 2a. generación de callos)	7. Pasarlos al área limpia para la siembra
8. 3o. subcultivo ( 3a. generación de callos)	

Los pasos en la preparación del explante como en la preparación del medio, se llevaron a cabo cada vez que se preparaba un lote nuevo. Además los frascos que se contaminaron ó que el explante se seco y no formo callo fueron separados y esterilizados.

En el siguiente cuadro se resume el proceso fitoquímico aplicado a los callos:

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. Se fueron guardando los callos de la 1a. generación y subsecuente</li><li>2. Fueron secados al ambiente</li><li>3. Fueron molidos los callos</li><li>4. Los callos molidos se extrajeron con metanol a temperatura ambiente hasta ser agotados</li><li>5. Fueron filtrados los extractos etanólicos y se concentraron a vacío en rotavapor</li><li>6. De esta manera se va obteniendo un residuo metanólico</li><li>7. Fué aplicado al residuo alcohólico pruebas preliminares fitoquímicas para el ensayo de terpenos, alcaloides, flavonoides etc. Además se aplicó una cromatografía en capa delgada.</li><li>8. Se pesó el residuo</li></ol> |
|---|

La extracción se aplicó con dos litros de metanol dejándose tres días macerándose con el polvo de los callos, llevándose hasta siete extracciones. Para llevar a cabo las pruebas preliminares se prepararon los reactivos de Wagner, Hager, Dragendorff, Fehling A y B, solución de ácido clorhídrico y de Guinard.

En el siguiente cuadro se resume el proceso de separación y purificación aplicado al residuo metanólico:

- | Residuo metanólico   |
|--|
| 1. Fué separado por cromatografía en columna usando silica gel para capa fina como adsorbente.     |
| 2. Se comenzó a eluir con hexano 100 %   |
| 3. Se siguió la elución con la mezclas hexano-acetato de etilo 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 y 2.5: 7.5. |
| 4. Se continuo la elución con acetato de etilo 100 %   |
| 5. Finalmente se eluyó con metanol 100%  |
| 6. Para cada fracción obtenida se aplicó cromatografías en capa delgada                            |
| 7. Se cristalizó la fracción 15 a 18 obteniendo un componente                                      |

La columna fué empacada en seco, agregándose primero el extracto y eluyéndose con solventes de menor a mayor polaridad. Se obtienen de dos a tres fracciones de 200 a 300 mililitros por día, conforme salían se concentraban en rotavapor y por cada seis se aplicó cromatografías en capa fina. De esta forma se juntó las fracciones similares, para realizarles pruebas preliminares y a los cristales obtenidos en la fracción quince a dieciocho se purificarón con hexano.

Finalmente a los cristales se les realizaron cromatografía en capa delgada con dos sistemas de solventes diferentes, para checar su pureza y se les determinó el punto de fusión. Los cristales se llevaron a estudios de análisis espectrales en el Instituto de Química de la UNAM (Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas).

## RESULTADOS

En la siguiente tabla se dan los resultados de los cultivos de callo colocados en la iluminación en el trimestre septiembre a noviembre de 1992:

Lote	Fecha	Cantidad comenzada	Cantidad contaminada	Cantidad obtenida
1	28 de sep.	40	40	0
2	29 de sep.	46	10	36
Primera resiembra	23 de oct.	36	23	13
Segunda resiembra	17 de nov.	13	6	7*
3	2 de oct.	38	10	28
Primera resiembra	26 de oct.	28	16	12
Segunda resiembra	24 de nov.	12		12*
4	5 de oct.	40	23	17
Primera resiembra	9 de nov.	17	17	0&
Primera siembra	29 de oct.	17	3	14*
Primera siembra	3 de nov.	20	11	9*
Primera siembra	11 de nov.	18	7	11*

\* cantidad obtenida de frascos con callo hasta el 25 de noviembre de 1992.

& se agrego cloro a los callos antes de resembrarlos, pero los resultados no fueron satisfactorios ya que los callos se secaron.

Resultados de los cultivos de callo en oscuridad durante el trimestre septiembre a noviembre de 1992

Lote	Fecha	Cantidad comenzada	Cantidad contaminada	cantidad obtenida
5	7 de oct.	40	25	15
Primera resiembra	11 de nov.	15	6	9*
6	29 de sep.	20	4	16
primera resiembra	26 de oct.	16		16*
Segunda resiembra	24 de nov.	16	0	16*
7	2 de oct.	28	21	7
Primera resimbra	26 de oct.	7	3	4
Segunda resiembra	24 de nov.	7		7*
8	25 de oct.	20	14	6
Primera resiembra	24 de nov.	8		8*
Primera siembra	29 de oct.	17	3	14*
Primera siembra	3 de nov.	20	8	12*
Primera siembra	11 de nov.	18	10	8*

\*cantidad obtenida de frascos con callo, hasta el 25 de noviembre de 1992.

Resultados del lote 9 al 17 en iluminación y oscuridad

\*cantidad obtenida de frascos con callo.

Lote	Fecha/Sem b.	No.frascos	No.contam.	Cant.obt. de callo	Lugar
9	29-sep-92	17	3	14	Iluminación
9a	1-nov-92	25	18*	7	Iluminación
9b	21-dic-92	7	0	7*	Iluminación
10	3-nov-92	20	16	4	Iluminación
10a	1-dic-92	4	0	4*	Iluminación
11	3-nov-92	20	9	11	Obscuridad
11a	2-dic-92	11	6*	5	Obscuridad
11b	21-dic-92	5	1*	4*	Obscuridad
12	5-nov-92	17	3	14	Obscuridad
12a	2-nov-92	14	8*	6	Obscuridad

12b	29-dic-92	6	0	6*	Obscuridad
13	11-nov-92	18	10	8	Iluminación
13a	14-dic-92	8	0	8	Iluminación
13b	29-dic-92	8	1*	7*	Iluminación
14	14-dic-92	27	19	8	Iluminación
14a	12-ene-93	8	1*	7*	Iluminación
15	15-dic-92	19	10	9	Obscuridad
15a	13-ene-93	9	4*	5*	Obscuridad
16	7-ene-93	22	21	1	Iluminación
16a	29-ene-93	1	0	1*	Iluminación
17	7-ene-93	22	18	4	Obscuridad
17a	29-ene-93	4	0	4*	Obscuridad

Los siguientes lotes se manejaron con el mismo número tanto los de iluminación como los de oscuridad:

Lote	En cultivo	Cantidad obtenida con callo				Lugar
		1a.resiembra	2a.resiembra	3a.resiembra	4a.resiembra	
18	15	8	1			Iluminación
18	14	14				Obscuridad
19	17	11	2	1		Iluminación
19	12	21	8	10		Obscuridad
20	21	21	8	10		Iluminación
20	23	21	6	6	4	Obscuridad
21	18	22	1	1		Iluminación
21	21	21	7	7	4	Obscuridad
22	1	1				Iluminación
22	4	4				Obscuridad
23	8	7				Iluminación

23	14	11	1	1		Obscurid ad
24	12	7	10	8	7	Iluminaci ón
24	20	16	6	3		Obscurid ad
25	9	8				Iluminaci ón
25	15	9				Obscurid ad
26	20	20	17	7		Iluminaci ón
26	20	9	8			Obscurid ad
27	19	9	8			Iluminaci ón
27	20	11	17	11		Obscurid ad
28	24	9	10			Iluminaci ón
28	23	7	11			Obscurid ad
29	18	16	14			Iluminaci ón
29	18	16	17			Obscurid ad
30	10	5				Iluminaci ón
30	8	8				Obscurid ad
31	9	9	7			Iluminaci ón
31	10	10	10			Obscurid ad
32	0					Iluminaci ón
32	0					Obscurid ad
33	8	8				Iluminaci ón
33	3					Obscurid ad
34	17	15				Iluminaci ón

34	15	9			Obscurid ad
35	19	20			Iluminaci ón
35	18	18			Obscurid ad
36	0				Iluminaci ón
36	0				Obscurid ad
37	0				Iluminaci ón
37	0				Obscurid ad
38	3				Iluminaci ón
38	4				Obscurid ad

Resultados de los ensayos preliminares para los residuos en oscuridad:

#### ALCALOIDES

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Hager	no hay precipitado, solución amarilla
Mayer	Solución naranja turbia
Wagner	Solución naranja-café más turbia

#### SAPONINAS

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Formación de espuma.	No hubo

#### TRITERPENOS

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Liebermann-Burchard	Anillo de color rojo en la interfase

#### TANINOS

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Cloruro férrico	negativo

#### FLAVONOIDES

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Shinoda	Ligero color naranja
Vapores de amoníaco	En el papel se observa color amarillo.

#### AZUCARES

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Benedict	No hay reducción
Fehling	No hay reducción

Se adicionó ácido sulfúrico y se volvió a calentar los tubos, resultando sólo positiva la de Fehling.

Resultados de los ensayos preliminares de los residuos en iluminación:

#### ALCALOIDES

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Hager	no hay precipitado, solución amarilla
Mayer	Ligeramente turbio la solución amarilla
Wagner	Muy turbio la solución naranja-café

#### SAPONINAS

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Formación de espuma	no hubo

#### TRITERPENOS

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Liebermann-Buchard	Anillo oscuro en la interfase

#### TANINOS

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Cloruro férrico	negativo

#### FLAVONOIDES

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Shinoda	Ligero color amarillo-naranja
Vapores de amoníaco	Ligera coloración amarilla del papel.

## AZUCARES

<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Benedict	no hay reducción
Fehling	no hay reducción

Al agregar ácido sulfúrico a los tubos y volver a calentarlos sólo se redujo el reactivo de Fehling.

Peso de los callos:

El peso de los callos obtenido de sep. a nov. en iluminación es de 3.6 g.

El peso de los callos obtenido de sep. a nov. en oscuridad es de 6.15 g.

El peso de los callos obtenido de enero a mayo en iluminación es de 49.9 g.

El peso de los callos obtenido de enero a mayo en oscuridad es de 41.7 g.

El peso del residuo en oscuridad de enero es de 4.5 g.

El peso del residuo en iluminación de enero es de 2 g.

**Cromatograma 1 obtenido para los residuos metanólicos de callos de**  
*Artemisia absinthium*.

**Cromatograma 2 obtenido para los residuos metanólicos de callos de**  
*Artemisia absinthium*.

- **Muestra 1:** residuo metanólico de los callos obtenidos en oscuridad de septiembre-enero.
- **Muestra 2:** residuo metanólico de los callos obtenidos en iluminación de septiembre-enero.
- **Muestra 3:** residuo metanólico de los callos obtenidos en oscuridad de febrero-mayo.
- **Muestra 4:** residuo metanólico de los callos obtenidos en iluminación de febrero-mayo.

### COEFICIENTES DE REPARTO ( $R_f$ )

#### A) Calculos de $R_f$ para el cromatograma 1:

Frente de disolvente= 9 cm.

Sistema de disolventes: 9.25 ml cloroformo-0.75 ml acetato de etilo (Tawfiq,1989).

#### Muestra 1:

- Componente 1:  $R_f = 0.11$
- Componente 2:  $R_f = 0.24$
- Componente 3:  $R_f = 0.32$
- Componente 4:  $R_f = 0.45$

#### Muestra 2:

- Componente 1:  $R_f = 0.14$
- Componente 2:  $R_f = 0.23$

#### Muestra 3:

- Componente 1:  $R_f = 0.13$
- Componente 2:  $R_f = 0.25$
- Componente 3:  $R_f = 0.44$

#### Muestra 4:

- Componente 1:  $R_f = 0.13$
- Componente 2:  $R_f = 0.25$
- Componente 3:  $R_f = 0.45$

B) Cálculos de  $R_f$  para el cromatograma 2:

Frente de disolvente 9.2 cm.

Sistema de disolventes empleados como eluyentes: cloroformo 8 ml- acetato de etilo 2 ml (Tawfiq, 1989).

**Muestra 1:**

- Componente 1:  $R_f = 0.14$
- Componente 2:  $R_f = 0.41$
- Componente 3:  $R_f = 0.57$
- Componente 4:  $R_f = 0.92$

**Muestra 2:**

- Componente 1:  $R_f = 0.14$
- Componente 2:  $R_f = 0.36$
- Componente 3:  $R_f = 0.54$
- Componente 4:  $R_f = 0.92$

**Muestra 3:**

- Componente 1:  $R_f = 0.14$
- Componente 2:  $R_f = 0.35$
- Componente 3:  $R_f = 0.63$

**Muestra 4:**

- Componente 1:  $R_f = 0.14$
- Componente 2:  $R_f = 0.21$
- Componente 3:  $R_f = 0.35$
- Componente 4:  $R_f = 0.45$
- Componente 5:  $R_f = 0.57$
- Componente 6:  $R_f = 0.93$

### Separación del residuo metanólico

El residuo fue separado por cromatografía en columna usando como soporte 200 g de de silica gel 60 HF<sub>254</sub> para cromatografía en capa fina, de esta manera se obtuvieron las siguientes fracciones con los eluyentes:

Fracciones	Eluyentes
1 al 8	Hexano 100 %
9 al 19	Hexano-Acetato de Etilo 9:1
20 al 29	Hexano-Acetato de Etilo 8:2
30 al 34	Hexano-Acetato de Etilo 7:3
35 al 45	Hexano-Acetato de Etilo 6:4
46 al 47	Hexano-Acetato de Etilo 5:5
48 al 49	Hexano-Acetato de Etilo 7.5:2.5
50 al 51	Acetato de Etilo 100 %
52 al 53	Metanol 100%

Se aplicaron cromatografías en capa fina usando cromatofolios Al de silica gel 60 F<sub>254</sub> con espesor de 0.2 mm a cada fracción y de esta manera se juntaron:

Fracción	Número
Aa-1	1-6
Aa-2	7-10
Aa-3	11-14
Aa-4	15-18
Aa-5	19-23
Aa-6	24-29
Aa-7	30-31
Aa-8	32-35
Aa-9	36-39
Aa-10	40-42
Aa-11	43-46
Aa-12	47-52

Las cromatoplasas se corrieron con la mezcla de disolventes: cloroformo-acetato de etilo 8:2, observandose en cada una gran cantidad de manchas al ser reveladas con lámparas de luz ultravioleta de onda corta y onda larga. Para ello se empleo una cámara de luz ultravioleta CROMATO-VUE® model CC-20G.

De la fracción Aa 15-18 eluida con hexano-acetato de etilo 9:1 se obtuvieron unos cristales incoloros (5.7 mg) los cuales se filtraron y se lavaron con hexano,

teniendo un punto de fusión de 155-156°C. Para ello se empleo un Fisher-Johns Melting Point.

Las demás fracciones necesitan purificaciones adicionales por cromatografía en columna y/o en placa fina preparativa. La determinación de la estructura molecular del compuesto aislado se hará por medio de técnicas espectroscópicas, como son: <sup>1</sup>H-rmn y E.M.

A los cristales junto con una muestra de esteroides se les aplicó cromatografía en capa fina, usando como sistemas de solventes hexano-acetato de etilo 8:2 y hexano-diclorometano 1:1 y 2:8. Al revelarse con luz ultravioleta de onda corta y con una solución de sulfato cérico se observo una mancha de color morado tanto en los cristales como en la muestra y además a la misma distancia.

A las fracciones se les aplicó pruebas para triterpenos, alcaloides y flavonoides:

#### TRITERPENOS:

Fracciones	Resultado
1 a 6	Anillo naranja en la interfase (+)
7 a 10	No hay cambio (-)
11 a 14	Anillo naranja obscuro (+)
15 a 18	Anillo rojo obscuro (+)
19 a 23	Anillo rojo obscuro (+)
24 a 29	Anillo café obscuro (+)
30 a 31	No hay cambio (-)
32 a 35	Anillo naranja (+)
36 a 39	Anillo rojo obscuro (+)
40 a 42	Anillo rojo obscuro (+)
43 a 46	No hay cambio
47 a 52	No hay cambio

Las pruebas de alcaloides con los reactivos de Hager, Mayer y Dragendorff en todas las fracciones da resultado negativo.

FLAVONOIDES:

Fracción	Resultado
1 a 6	No hay cambio (-)
7 a 10	No hay cambio (-)
11 a 14	No hay cambio (-)
15 a 18	No hay cambio (-)
19 a 23	No hay cambio (-)
24 a 29	No hay cambio (-)
30 a 31	Color rojo naranja (+)
32 a 35	Color naranja (+)
36 a 39	Color naranja (+)
40 a 42	Color rojo-naranja (+)
43 a 46	Color rojo-naranja (+)
47 a 52	Color naranja (+)

## CONCLUSIONES

Los resultados de los primeros lotes sembrados a luz y oscuridad nos aportan pequeñas cantidades de frascos con crecimiento de callo. Debido a la poca experiencia en la manipulación de las técnicas de cultivo de explantes. Englobando desde la limpieza de las hojas con agua y jabón, del área de trabajo, de los tiempos de contacto de los explantes con etanol y la solución de cloralex y de la manipulación del explante en el momento de sembrado. El medio de cultivo de Murashige-Skoog es adecuado para la inducción de callos, debido a la formación de abultamientos en las hojas y posteriormente pequeñas masas de color verde para los sembrados en iluminación y de color amarillo claro para los sembrados en oscuridad.

Se llegó a obtener en los lotes del 18 al 31 resiembras, aunque no mantenían en una forma adecuada el crecimiento de los callos.

De los ensayos preliminares del residuo metanólico de callos se obtienen pruebas positivas para triterpenos esteroidales y flavonoides y probablemente para alcaloides y azúcares no reductores. El residuo metanólico tiene una gran mezcla de componentes y hasta el momento sólo se logró aislar un compuesto cristalino con p.f. 155-56°C, sus espectros de resonancia magnética nuclear protónica a 200 MHz reveló que se trata de una mezcla de esteroides:  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol; el espectro de masas también corrobora la presencia de estos dos esteroides. El trabajo llevado a cabo aporta una experiencia en el campo de las técnicas de cultivos vegetales y que fué de menos a más. Todo lo obtenido se debe a la experiencia, consejos y apoyo de parte de mis asesores; para que los objetivos se cumplieran.

## BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Mogib, M., Dawidar, A.M., Metwally, M.A. y Abou-Elzanab, M., (1990). *Phytochemistry*, 29, 2728-2729.
- Banthorpe, D.V. y Brown, G.D., (1979). *Phytochemistry*, 28, 3003-3007.
- Catalán, C.A.N., Cuenca, M.Del R., Verghese, J., Joy, M.T., Gutiérrez, A.B. y Herz, W., (1990). *Phytochemistry*, 29, 2702-2703.
- Clemente, M., Contreras, P., Susín, J., y Pliego-Alfaro, F., (1991). *Hortscience*. 26, 420.
- Denys, J. Ch. y James, E.S., (1990). *Journal of Natural Products*, 53, 157-160.
- Feurstein, I., Danin, A. y Segal, R., (1988). *Phytochemistry*, 27, 433-438.
- Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A., y Vasil, I.K., (1976). *In Vitro*, 12, 473-477.
- Grandolini, G., Casinovi, C.G., Betto, P., Fardella, G., Menichini, F., Gabriele, R., Barbetti, P., Kajtár-Peregy, M. y Radics, L., (1988). *Phytochemistry*, 27, 3670-3672.
- Horie, T., Kawamura, Y. y Yamada, T., (1989). 28, 2869-2871.
- Hurtado, M.D. y Merino, M.M., (1987). **Cultivo de Tejidos Vegetales**, Editorial trillas, Méx.
- Jakupovic, J., Klemeyer, H., Bohlman, F. y Graven, E. H., (1988). *Phytochemistry*, 27, 1129-1133.
- Khafagy, S.M., Seif El-din, A.A., Jakupovic, J., Zdero, C. y Bohlmann, F., (1988). *Phytochemistry*, 27, 1125-1128.
- Laxmi, N.M., Amitabh, Ch. y Raghunath, S.T., (1991). *Phytochemistry*, 30, 549-552.
- Marco, J.A., Barberá, O., Rodríguez, S., Domingo, C. y Adell, J., (1988). *Phytochemistry*, 27, 3455-3459.
- Marco, J.A., y Sanz, J.F., (1992). *Journal of Natural Products*. 55, 476-481.
- Marco, J.A., Sanz, J.F., y Falco, E., (1990). *Tetrahedron*. 46, 7941-7950.
- Nagaki, M. y Matsueda, S., (1989). *Phytochemistry*, 28, 2731-2733.
- Park, J.M., Hu Wei Shou. y Staba, E.J., (1989). *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 1209-1213.
- Pestchanker, L.J., Giulietti, A.M., Pestchanker, M.J., Guerreiro, E. y Giordano, O.S., (1990). *Phytochemistry*, 29, 1853-1854.

- Pestchanker, L.J., Kurina, M., Giulieti, A.M., y Giordano, O.S., (1989). *Biotechnology Letters* **11**, 803-806.
- Rauter, A. P., Branco, I., Tostáo, Z., Pais, M.S., González, A.G. y Bermejós, J.B., (1989). *Phytochemistry*, **28**, 2173-2175.
- Rustaigan, A., Sigari, H., Jakupovic, J. y Grenz, M., (1989). *Phytochemistry*, **28**, 2723-2725.
- Sanz, J.F. y Marco, A., (1990). *Journal of Natural Products*, **53**, 1034-1035.
- Sanz, J.F., Castellano, G., y Marco, J.A., (1989). *Phytochemistry*, **29**, 541-545.
- Sanz, J.F., Falcó, E., y Marco, J.A., (1990). *Journal of Natural Products*, **53**, 940-945.
- Sanz, J.F., y Marco, J.A., (1990). *Planta medica* **56**, 236-237.
- Schmauder, H.P. y Doebel, P., (1990). *Acta Biotechnol.* **10**, 501-516
- Skoog, F., y Miller, C.O., (1957). *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**, 118-131.
- Sorm, F., Nothy, L. y Herout, V., (1955). *Chemistry and Industry*, **24**, 569.
- Tawfiq, N.K., Anderson, L.A., Roberts, M.F., Phillipson, J.D., Bray, D.H. y Warhurst, D.C., (1989). *Plant Cell Reports*, **8**, 425-428.
- Venkateswaran, S., (1962). *Phytomorphology*, **12**, 300-306.
- Wallnofer, B., Hofer, O. y Greger, H., (1989). *Phytochemistry*, **28**, 2687-2691.
- Wang, Y., Toyota, M., Krause, F., Hamburger, M. y Hustettmann, K., (1990). *Phytochemistry*, **29**, 3101-3105.
- Xian, L., Dezhi, Z. y Masayuki, O., (1990). *Journal of Natural Products* **53**, 657-661.

ANEXOS

Composición de Algunos Medios Nutritivos Para Cultivo de Tejidos Vegetales

Constituyente	Heller (1953)	Nitsch and Nitsch (1956)	White (1963)	Hildebrandt et al. (1962)	Murashige and Skoog (1962)	Gautheret (1942)	White (1943)	Gamborg et al. (1968)
<b>Macronutriente</b>								
KCl	750.0	1500.0	65.0	65.0			65.0	
NaNO <sub>3</sub>	600.0							
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250.0	250.0	720.0	180.0	370.0	125.0	360.0	250.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	125.0	250.0	16.5	33.0			16.5	150.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	75.0				440.0			150.0
KNO <sub>3</sub>		2000.0	80.0	80.0	1900.0	125.0	80.0	2500.0
CaCl <sub>2</sub>		25.0						
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			200.0	800.0			88.0	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>								134.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>					1650.0			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>					170.0	125.0		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O			300.0	400.0		500.0	200.0	
<b>Micronutriente</b>								
NiSO <sub>4</sub>						0.0500		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O					27.8100	0.0500		27.8100
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O								10.0000
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0100	3.0000	7.0000	4.5000	22.3000	3.0000		
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O							4.5000	
KI	0.0100		0.7500	3.0000	0.8300	0.5000	0.7500	0.7500
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0300							
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O					0.0250			0.0250
Ti(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>						0.2000		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0000	0.5000	3.0000	6.0000	8.6000	0.1800	1.5000	2.0000
Zn <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> EDTA								
Na <sub>2</sub> EDTA					37.3100			
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0300	0.0250			0.0250	0.0500	0.0130	0.0250
BeSO <sub>4</sub>						0.1000		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.0000	0.5000	1.5000	0.3800	6.2000	0.0500	1.5000	3.0000
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>						1.0000		
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0000						2.5000	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0.0250			0.2500			0.2500
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>							0.0017	
AlCl <sub>3</sub>	0.0300							
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>			2.5000					
Tartrato férrico				40.0000				
<b>Constituyentes Orgánicos</b>								
Sacarosa	20.00	34.00	20.00	20.00	30.00	30.00	20.00	20.00
Glicina			3.00	3.00	2.00	3.00	3.00	
AIA					100.00		100.00	100.00
mio-inositol		0.18			1.0-30.0		2.00	
Cisteína			1.00			10.00		
Vitamina B1	1.00		0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	10.00
Vitamina B6			0.10		0.50	0.10	0.10	0.10
Ac. nicotínico			0.50		0.40	0.50	0.50	
Ac. pantoténico			1.00					
2,4-D			6.00					0.10
ANA								
Cinetina					0.04-10.00			0.10

Concentración expresada en mg l<sup>-1</sup>, excepto ara sacarosa la cual se expresa en g L<sup>-1</sup>.

Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991

Reguladores del Crecimiento Vegetal Comumente Usados en Medios Nutritivos

Regulador	M <sub>r</sub>	Concentración (μM)	Preparación de solución stock	Comentarios
<b>Auxinas</b>				
Acido <i>p</i> -cloroacético (pCPA)	186.6	0.1-10.0	Las auxinas son usualmente disueltas en una solución de NaOH	El AIA puede ser oxidado por las células vegetales, Rara vez se usa como única auxina en el medio.
Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	221.0	0.1-10.0		
Acido indol-3-acético (AIA)	175.2	0.1-10.0		
Acido indol-3-butírico (AIB)	203.2	0.1-10.0		
Acido 1-naftalenacético (ANA)	186.2	0.1-10.0		
Acido β-naftoxiacético (NOA)	202.2	0.1-10.0		
<b>Citocininas</b>				
6-Bencilaminopurina (BAP)	225.2	0.1-10.0	Las citocininas se disuelven usualmente en una solución de NaOH o en EtOH acuoso	La zeatina es termolábil y por lo tanto no debe ser autoclaveada
<i>n</i> -Isopentenilaminopurina (2iP)	203.2	0.1-10.0		
6-Furfurilaminopurina (Cinetina, K)	215.2	0.1-10.0		
Zeatina (Zea)	219.2	0.1-10.0		
<b>Giberelinas</b>				
Acido giberélico (GA <sub>3</sub> )	346.4	0.1-5.0	Soluble en H <sub>2</sub> O	GA <sub>3</sub> es termolábil, no debe ser autoclaveado. Raramente es necesario para la iniciación o mantenimiento de cultivos de callos o células en suspensión. En ocasiones es necesario para la regeneración de plántulas

Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991

## Historia de la Biotecnología Vegetal

Año	Descubrimiento
1892	Se establece la habilidad de las plantas para sintetizar sustancias formadoras de órganos, que tienen una distribución polar.
1902	Primer intento para cultivar tejidos vegetales.
1904	Primer intento para cultivar embriones de crucíferas.
1909	Fusión de protoplastos vegetales (infructuoso).
1922	Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de orquídeas. Cultivo <i>in vitro</i> de ápices radiculares.
1925	Cultivo de embriones aplicado a cruces interespecíficas de <i>Linum</i> .
1929	Cultivo de embriones de <i>Linum</i> para evitar incompatibilidad en el cruzamiento.
1934	Intentos fallidos para cultivar <i>in vitro</i> tejido cambial de algunos árboles y arbustos (fallaron debido a la carencia de auxina, la cual aún no había sido descubierta). Cultivo exitoso de raíces de <i>Lycopersicon sculentum</i> .
1936	Cultivo exitoso de varias gimnospermas.
1939	Cultivos de callo de crecimiento continuo.
1940	Cultivo <i>in vitro</i> de tejido cambial de <i>Ulmus</i> para el estudio de la formación de brotes adventicios.
1941	Uso de agua de coco para cultivar embriones de <i>Datura</i> . Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos de la agalla de la corona.
1944	Cultivo <i>in vitro</i> de tabaco usado para el estudio de la formación de brotes adventicios.
1945	Cultivo <i>in vitro</i> de ápices del tallo de <i>Asparagus</i> .
1946	Primeras plantas de <i>Lupinus</i> y <i>Trapaolum</i> obtenidas por cultivo del brote apical.
1948	Formación de brotes y raíces adventicias de <i>Nicotiana tabacum</i> determinada por la relación auxina/adenina.
1950	Regeneración de órganos a partir de callos de <i>Sequoia sempervirens</i> .
1952	Dalias libres de virus obtenidas por cultivo de meristemos. Primera aplicación de los microinjertos.
1953	Callos haploides de <i>Ginkgo biloba</i> producidos a partir de polen.
1954	Monitoreo de cambios en cariología y comportamiento cromosómico de cultivos de endospermo de <i>Zea mays</i> . Primera planta cultivada a partir de una sola célula.
1955	Descubrimiento de la cinetina.
1956	Crecimiento exitoso de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios.
1957	Regulación de la formación de órganos (raíces y brotes) por el cambio en la relación citocinina/auxina.
1958	Regeneración <i>in vitro</i> de embriones somáticos a partir de la nucela de óvulos de <i>Citrus</i> .
1960	Éxito en la fertilización <i>in vitro</i> de <i>Papaver rhoeas</i> . Degradación enzimática de paredes celulares para obtener grandes cantidades de protoplastos. Propagación vegetativa de orquídeas por cultivo de meristemos. Filtración de suspensiones celulares y aislamiento de células individuales por plaqueo.
1962	Desarrollo del medio de Murashige y Skoog.
1964	Plantas haploides de <i>Datura</i> producidas por granos de polen. Regeneración de raíces y brotes sobre callos de <i>Populus tremuloides</i> .
1965	Inducción de la floración en cultivos <i>in vitro</i> de <i>Nicotiana tabacum</i> . Diferenciación de plantas a partir de células aisladas en microcultivo.
1967	Inducción floral en <i>Lunaria annua</i> por vernalización <i>in vitro</i> .
1969	Análisis cariológico de plantas regeneradas a partir de cultivos de callo de <i>N. tabacum</i> . Aislamiento de protoplastos a partir de cultivos en suspensión de <i>Haplopappus gracilis</i> . Selección de mutantes bioquímicos <i>in vitro</i> . Cultivo de embriones utilizado en la producción de monoploides en centeno. Fusión de protoplastos.
1971	Regeneración de plantas a partir de protoplastos.
1972	Hibridación interespecífica a través de fusión de protoplastos entre dos especies de <i>Nicotiana</i> .
1973	Rompimiento de la latencia por citocininas en explantes de capítulo de <i>Gerbera</i> .
1974	Inducción de ramificación axilar por citocininas en brotes apicales aislados de <i>Gerbera</i> . Plantas haploides de <i>Petunia hybrida</i> regeneradas a partir de protoplastos. Híbridos obtenidos por fusión de protoplastos haploides. Establecimiento del plásmido Ti como el agente inductor de tumores por <i>Agrobacterium</i> .
1975	Selección positiva de cultivos de callo de <i>Zea mays</i> resistentes a <i>Helminthosporium maydis</i> .
1976	Iniciación de brotes a partir de ápices criopreservados de <i>Dianthus caryophyllus</i> . Hibridación vegetal interespecífica por fusión de protoplastos entre <i>Petunia hybrida</i> y <i>P. parodii</i> . Se establece que la síntesis y degradación de opinas es controlada por el plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
1977	Integración del ADN del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
1978	Hibridación somática entre <i>Lycopersicon sculentum</i> y <i>Solanum tuberosum</i> .
1979	Cocultivo para transformación genética de protoplastos vegetales con <i>Agrobacterium</i> .
1980	Inmovilización de células usadas para la biotransformación de digitoxina en digoxina.
1981	Se introduce el término "variación somaclonal". Aislamiento de células auxótrofas por tamizado a gran escala de colonias celulares derivadas de protoplastos haploides de <i>Nicotiana glauca</i> tratados con mutágenos.
1982	Incorporación de ADN en protoplastos, lo que conduce a transformación genética con ADN aislado.
1983	Hibridación citoplásmica intergenérica entre <i>Raphanus sativus</i> y <i>Brassica napus</i> .
1984	Transformación de células vegetales con ADN plasmídico.
1985	Discos de hoja infectados y transformados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y la regeneración subsecuente de plantas transformadas.

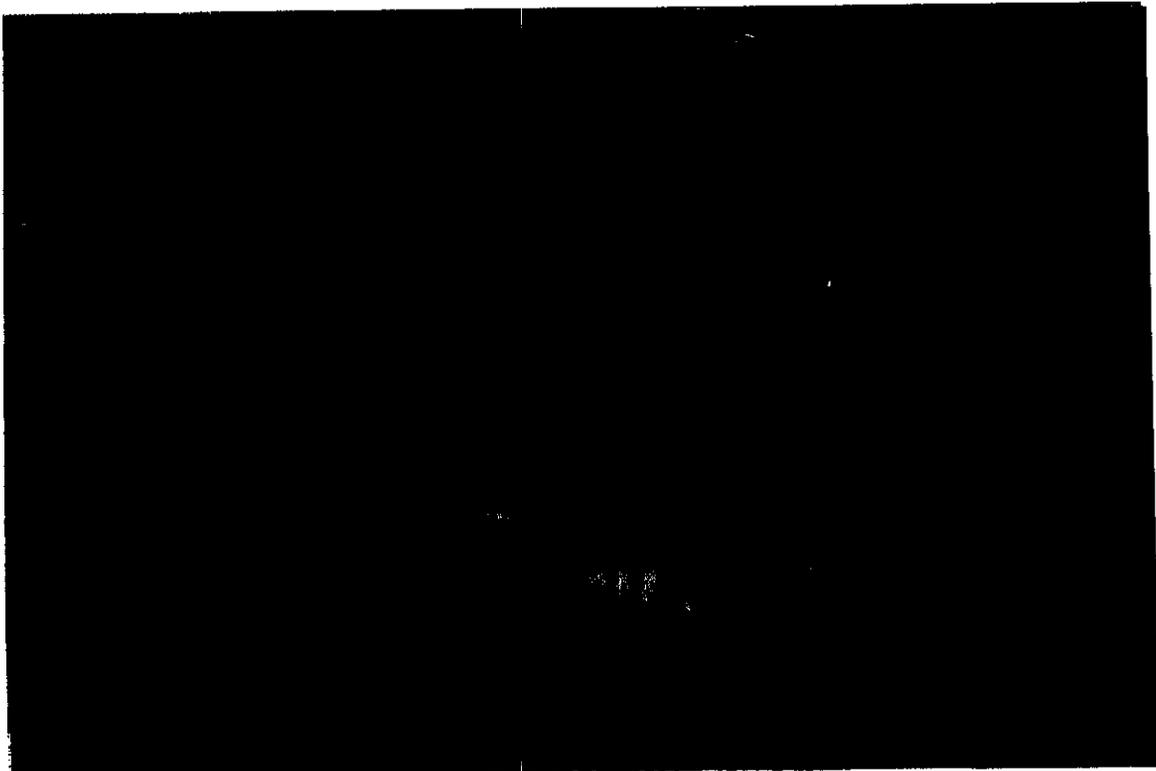
Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991

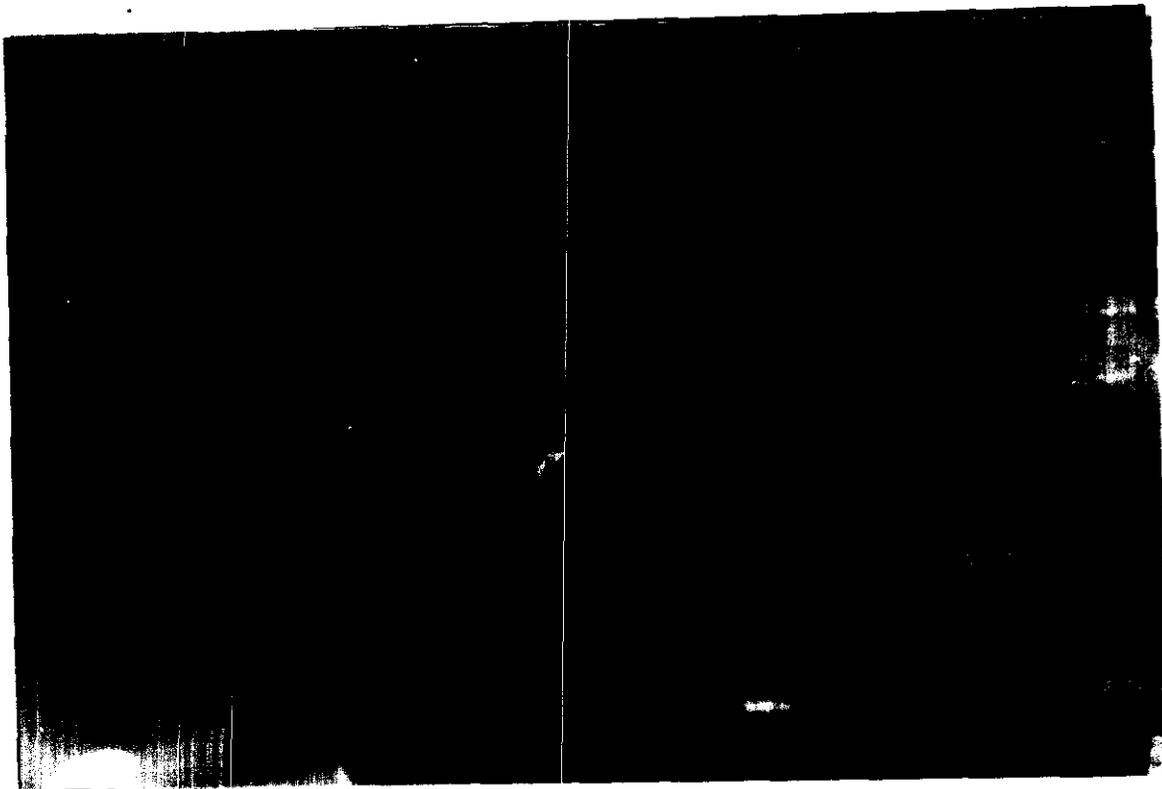
## X.1 FIGURAS Y TABLAS

Fig.1 Cultivo de callos de explantes de *A. absinthium* en condiciones de iluminación (16 horas por día), dentro de cajas de acrílico.

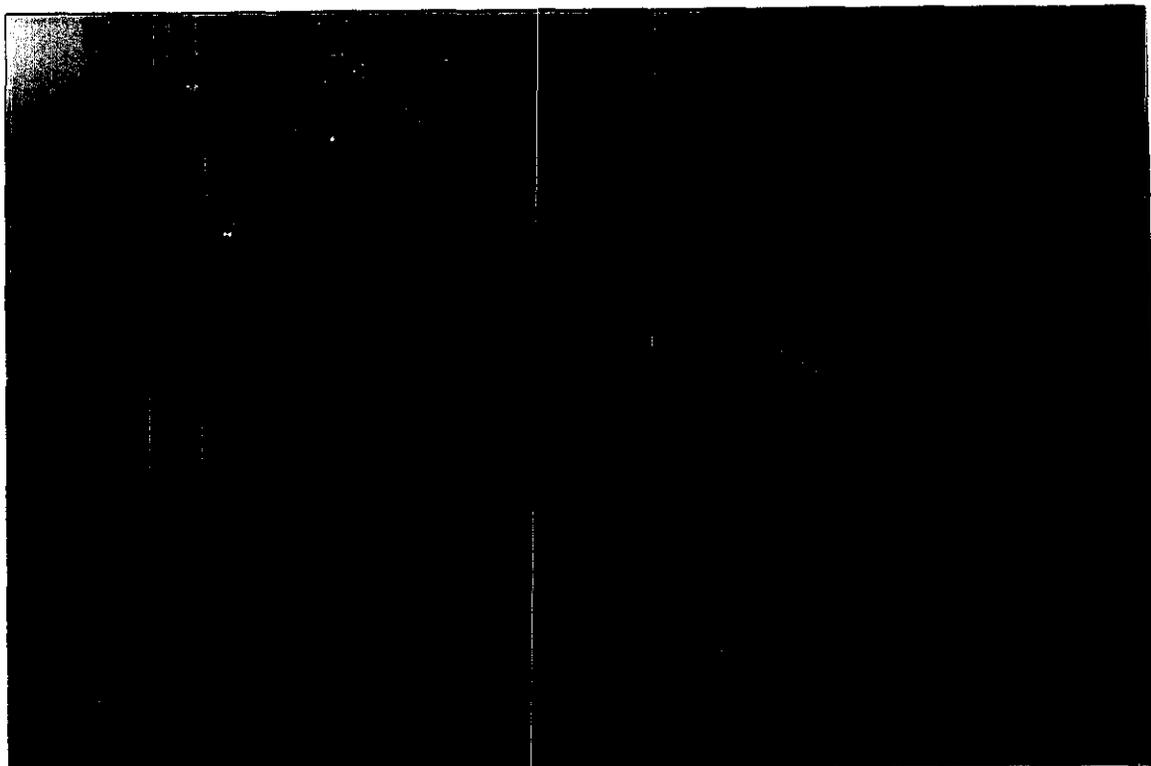


Fig. 2 Vista del invernadero.





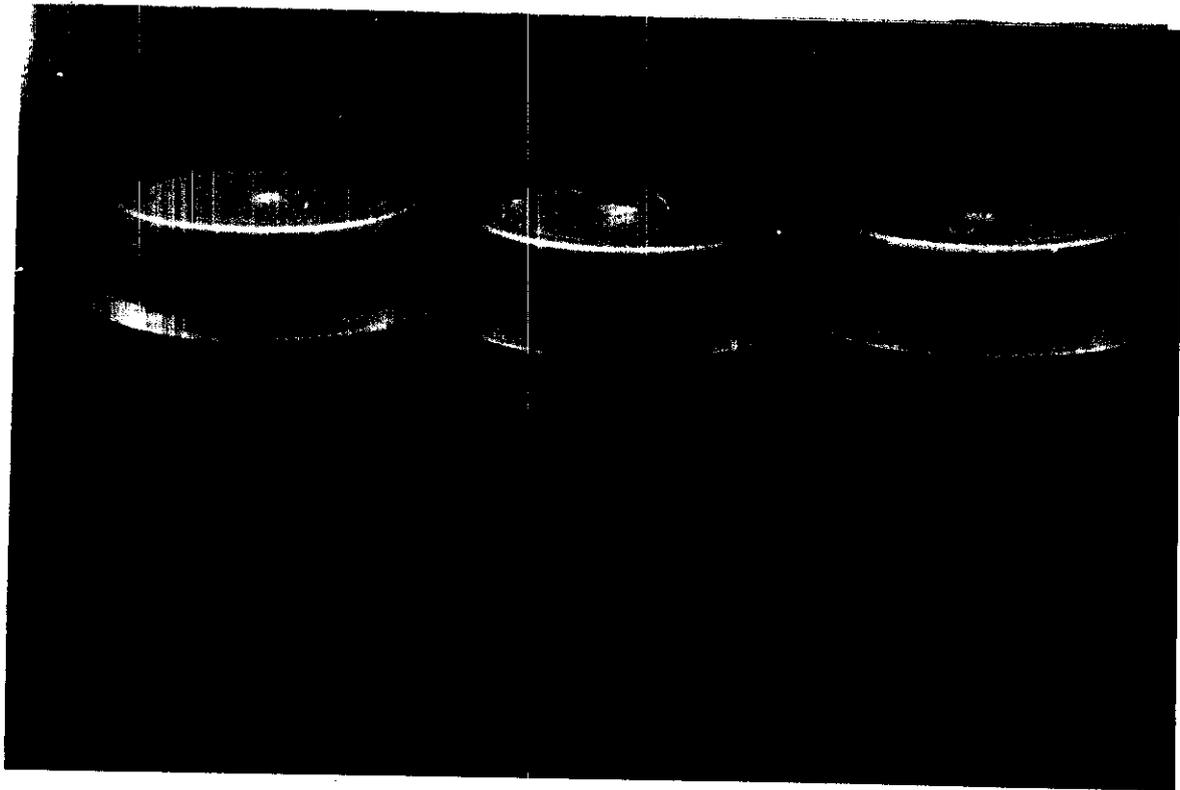
Figs. 3 y 4 cortes de *A. absinthium* a los 21 días, en donde se observan la inducción de callos en condiciones de iluminación.



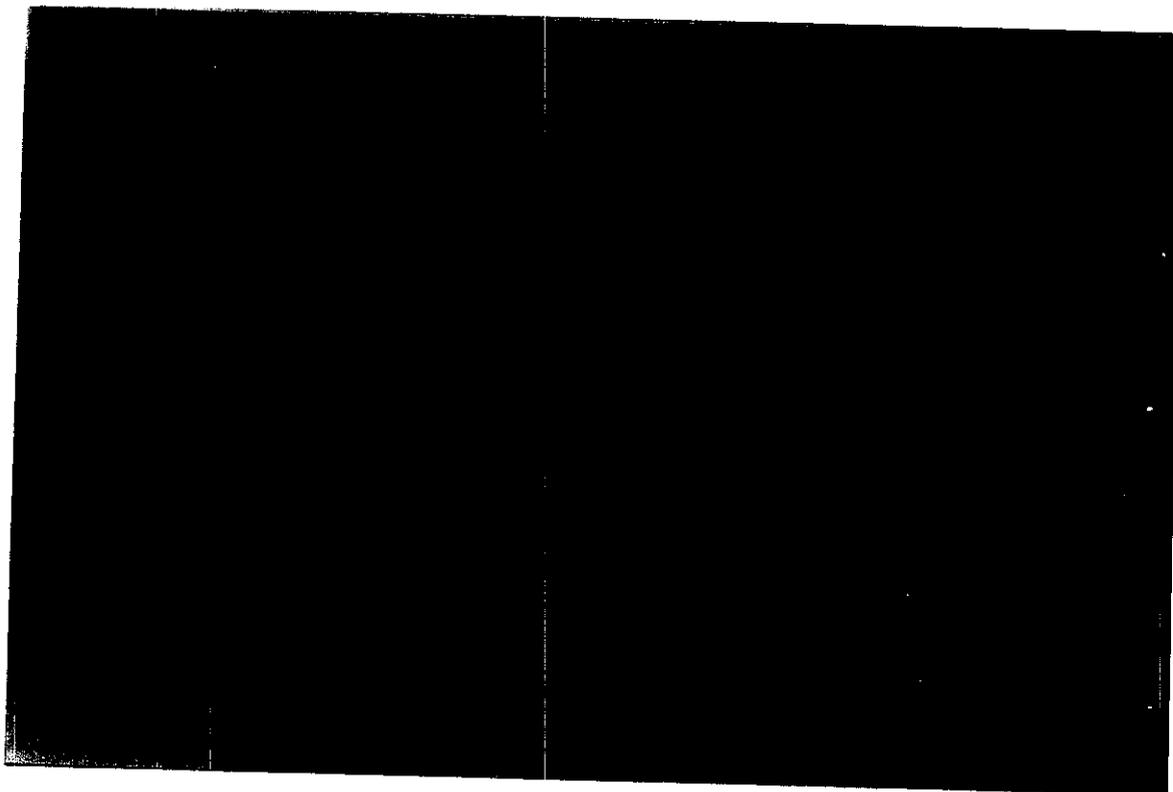


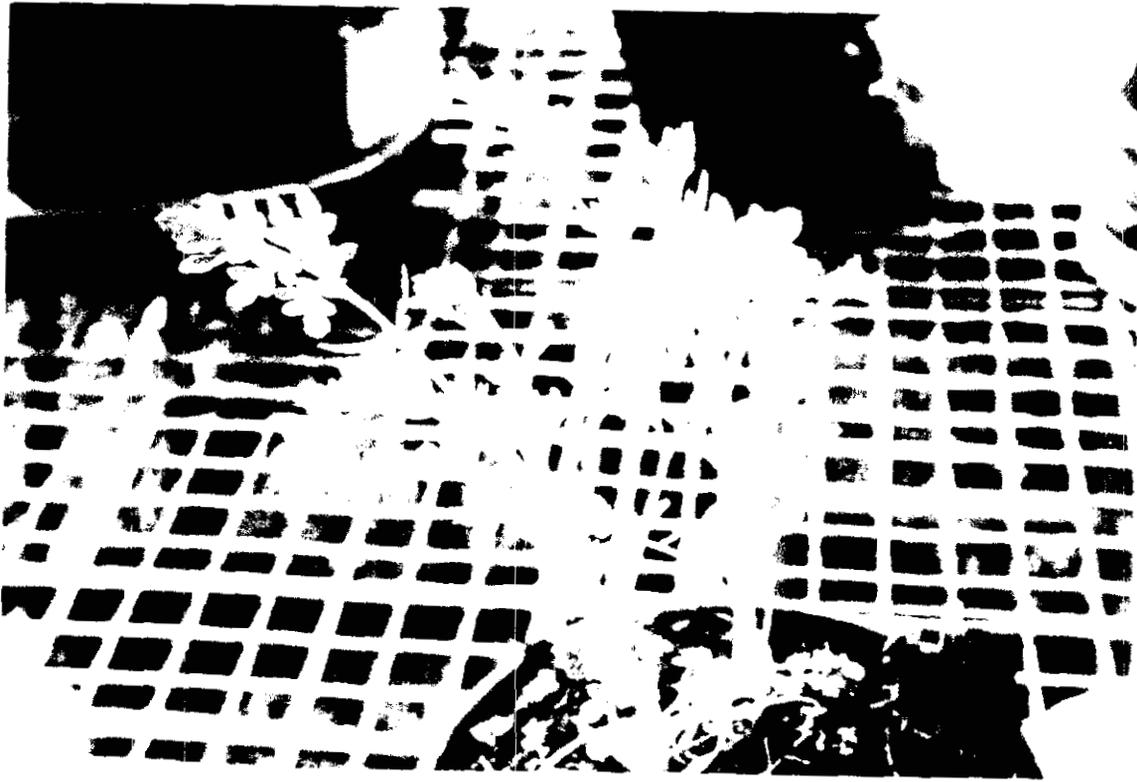
Figs. 5 y 6 de callos en un período de resembrado, después de 35 días.





Figs. 7 y 8 cortes de hojas de *A. absinthium* a 21 días, en donde se observa la inducción de callos en condiciones de oscuridad.



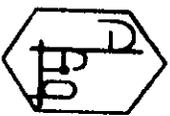


Figs. 9 y 10 interior del invernadero en el que se encuentran las plantas de ajeno en condiciones controladas



## X.II PRODUCTOS DEL TRABAJO

- X.II.1 J. A. Lechuga Corchado, Muñoz Flores, A., Meráz Vázquez, S., De Valdemar Osnaya, E., García Suárez, M.D. y Cruz Sosa, F., 1993. **Cultivo de Células y Tejidos Vegetales como Fuente de Productos Naturales.** *VII Jornadas de Biotecnología*, UAM-Iztapalapa.
- X.II.2 J. A. Lechuga Corchado, Muñoz Flores, A., Meráz Vázquez, S., De Valdemar Osnaya, E., García Suárez, M.D. y Cruz Sosa, F., 1993. **Aplicación del Cultivo de Tejidos Vegetales al Estudio de las Plantas Medicinales.** *3er. Congreso Latinoamericano de Fitoquímica*. Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, Gto. 10-15 de octubre.



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA**  
**ACADEMIA LATINOAMERICANA DE FITOQUÍMICA**



otorgan el presente

**Constancia**

a:

ARTURO MUÑOZ FLORES

Por su participación en la exposición del trabajo titulado

APLICACION DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES AL ESTUDIO DE LAS PLANTAS MEDICINALES durante el

**III CONGRESO LATINOAMERICANO DE FITOQUÍMICA Y**  
**V JORNADA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

Celaya, Gto., octubre de 1993

Dr. Juan Sillero Pérez

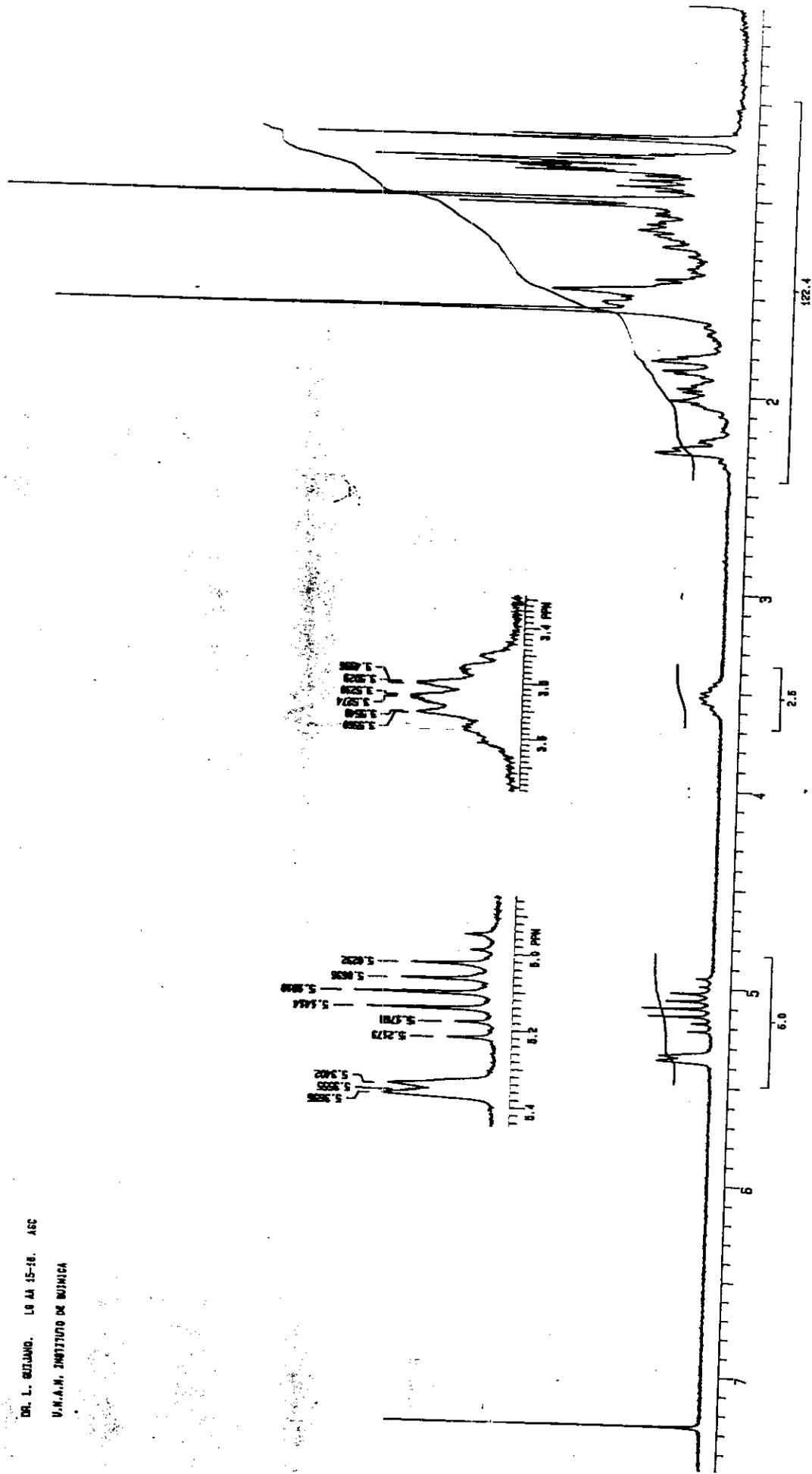
Director del Instituto Tecnológico de Celaya

Dr. Leovigildo Quijano

Presidente de la Academia Latinoamericana  
de Fitoquímica (Grupo México)

### X.III ESPECTROS

DR. L. GILJANO. LO AA 15-16. ASC  
U.N.A.M. INSTITUTO DE QUIMICA



Page 10

DR. L. QUIJANO. LO AA 15-18.  
SPECTRAL LINES FOR TH= 13.43  
RFL= 429.1 RFP= 0

INDEX	FREQ	PPM	INTENSITY
01	457.39	2.287	19.935
02	455.13	2.276	13.532
03	453.22	2.266	15.083
04	404.57	2.023	15.952
05	392.46	1.963	14.372
06	377.26	1.887	15.023
07	374.51	1.873	18.355
08	365.03	1.825	21.570
09	363.56	1.818	19.525
10	360.23	1.801	14.361

DR. L. QUIJANO. LO AA 15-18.  
SPECTRAL LINES FOR TH= 35.99  
RFL= 429.1 RFP= 0

INDEX	FREQ	PPM	INTENSITY
01	315.50	1.578	186.994
02	306.61	1.533	36.509
03	294.85	1.474	49.841
04	207.49	1.038	76.260
05	202.00	1.010	201.387
06	172.33	0.862	61.171
07	170.32	0.852	52.237
08	167.98	0.840	60.735
09	165.92	0.830	89.367
10	163.54	0.818	54.308
11	162.22	0.811	72.828
12	160.61	0.803	101.744
13	159.14	0.796	51.554
14	155.71	0.779	52.044
15	139.55	0.698	117.373
16	135.89	0.680	55.351