

**Centro de Bioplasmas  
Universidad de Ciego de Ávila**

**Antraquinonas a partir del cultivo *in vitro* de raíces de  
*Morinda royoc* L. Identificación y actividad antimicrobiana.**

**Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas.**

**Autora: Ing. Janetsy Borroto Blanco. MSc.**

**Ciego de Ávila, Cuba**

**2010**

**Centro de Bioplasmas  
Universidad de Ciego de Ávila**

**Antraquinonas a partir del cultivo *in vitro* de raíces de  
*Morinda royoc* L. Identificación y actividad antimicrobiana.**

**Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas.**

**Autora: Ing. Janetsy Borroto Blanco. MSc.**

**Tutores: Prof. Tit. Lic. Reinaldo Trujillo Sánchez. DrC.**

**Prof. Tit. Ing. Martha Hernández de la Torre. DrC.**

**Ciego de Ávila, Cuba**

**2010**

*A mis dos tesoros Osvaldo Javier y Carlos Manuel, por darle sentido  
a este camino.*

*A Osvaldo, por la alegría de las batallas que libramos juntos,  
por su amor.*

*A mis padres, abuela y hermano, por ser mi ejemplo y creer en mí.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la dirección del Centro de Bioplantas por conferirme este proyecto y creer que sí era posible.*

*A mi tutora Dra. Martha Hernández; porque sus manos ayudaron a empujar los límites, por tanta vulnerabilidad y una extraordinaria profundidad.*

*A mi tutor Dr. Reinaldo Trujillo; por permitirme entrar en uno de sus sueños recurrentes "Antraquinonas de Morinda royoc L." Por calmar mis ansiedades en medio de la tormenta.*

*A la Dra. Maritza Escalona; por su apoyo permanente, por construir peldaños firmes para continuar el andar.*

*Al Dr. Orlando Borrás y al Dr. José Carlos Lorenzo; por ayudar a apoderarme del reto y disolver las resistencias.*

*Al Dr. Josep Coll y al Dr. Ricardo Salazar; por dar luz a este camino.*

*Al Dr. Marcos Edel Martínez y la Dra. María Caridad (Tere); por sus excelentes sugerencias cuando apenas comenzaba.*

*Al Dr. Elio Jiménez, Dr. Bernardo Dibut y al Dr. Lidcay Herrera; por mirar con juicio sabio el documento y permitir que tomara una dirección firme y fertilizada.*

*Al Dr. Ramón Santos y la Dra. Bárbara Companioni; por rectificar oportunamente mis errores.*

*A Carlos Aragón y Oscarín; por involucrarse de manera especial y hacer más fácil la marcha.*

*Al Dr. Rolando Morán y al Dr. Osmany Chacón; por no haber perdido la conexión.*

*A Justo, Adelaida, Hipólito; porque en este enorme reto me han dado sus fuerzas.*

*Al Lab. de Célula y Tejidos por dejar siempre las puertas abiertas ante mi llamado.*

*A Maribel y Yemeys, por ser fieles escuderas y compartir el día a día.*

*A Janet, Yanelis, Carol, Leyanis, Aurora y Mayelín por el aliento....*

*A mi amiga Lourdes; por recordarme una sabia línea del I Ching: "La perseverancia es favorable".*

*A mi amiga Ermis, por su sinceridad, por estar siempre.*

*A Tere, Yordanca, Robertico, Patry y Manoli, porque siempre estuvieron cuando más los necesité.*

*A Cary; porque tengo la tranquilidad de confiarle mis grandes tesoros....Eres un regalo para nosotros....*

*A Sixley; porque moviéndonos sobre las mareas del tiempo aprendimos a ser hermanas.*

*A mis tíos y primas, cuyo amor me ha nutrido y sustentado por más tiempo del que puedo recordar.....*

*.....y a todos los que hicieron posible que hoy llegara hasta aquí....*

**....Muchas gracias....**

## ABREVIATURAS

**2,4-D:** 2,4 diclorofenoxiacético.

**AIA:** ácido indolacético.

**AIB:** ácido indolbutírico.

**ANA:** ácido naftalenacético.

**B5:** medio de cultivo, formulación de Gamborg *et al.* (1960).

**Biojas<sup>®</sup>:** ácido jasmónico producido por el ICIDCA.

**CCF:** cromatografía en capa fina.

**CMI:** concentración mínima inhibitoria.

**DHAQ:** dihidroxi antraquinona.

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**DO:** densidad óptica.

**HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución.

**HPLC-DAD:** cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo.

**ICIDCA:** Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar.

**MEP:** 2-C-metil-D eritritol-4-fosfato.

**MF:** masa fresca.

**MS:** medio de cultivo, formulación Murashige y Skoog (1962).

**MVA:** ácido mevalónico.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**ppm:** partes por millón.

**RMN:** resonancia magnética nuclear.

**RMN-H<sup>1</sup>:** resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

**ROS:** especies reactivas del oxígeno.

**RPMI:** formulación de Moore *et al.* (1967) del *Roswell Park Memorial Institute*.

**SDS:** dodecil sulfato de sodio

**tm:** tiempo muerto.

**UA:** unidades de absorbancia.

**UFC:** unidades formadores de colonia.

**UV vis:** espectros ultravioleta-visible.

**UV:** ultravioleta.

**δ:** desplazamiento químico.

## RESUMEN

El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas es una alternativa novedosa para la producción de moléculas bioactivas. Las antraquinonas son un grupo importante de metabolitos secundarios que presentan varias actividades biológicas. El presente estudio se desarrolló con los objetivos de establecer condiciones de cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. que permitan la mayor obtención de antraquinonas por unidad de masa fresca, identificar las antraquinonas presentes y determinar la actividad inhibitoria de extractos antraquinónicos sobre el crecimiento de patógenos que afectan al hombre y a las plantas. Se demostró que el contenido de antraquinonas por unidad de masa fresca en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. se favoreció en presencia de  $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA,  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, en la oscuridad a los 30 días de cultivo. A partir de estas condiciones se logró el mayor rendimiento específico de antraquinonas ( $6.07 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF), 15 días posteriores a la elicitación con ácido jasmónico (**Biojas**<sup>®</sup>) ( $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), que es comparable con el que se obtiene para raíces de plantas en ambiente natural. A partir de estas condiciones se identificaron ocho antraquinonas. La alizarina se identificó por coincidencia con el patrón correspondiente, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Las antraquinonas damnacantal, nordamnacantal, morindona, rubiadina, soranjidiol, lucidina y rubiadina-1-metiléter se identificaron por resonancia magnética nuclear (RMN- $^1\text{H}$ ). Los extractos crudos de raíces *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. inhibieron el crecimiento de patógenos que afectan al hombre al ser activos frente a siete cepas de *Candida spp.* y a cuatro bacterias. De las antraquinonas puras que se aislaron a partir de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*, sólo la morindona mostró actividad antimicrobiana. En experimentos *in vitro* los extractos antraquinónicos de raíces inhibieron el crecimiento de los patógenos: *Verticillium dahliae*, *Alternaria solani*, *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli* que afectan a las plantas. En experimentos *in vivo* los extractos de raíces de *M. royoc* L. tuvieron efecto protector en semilleros de tabaco sobre *Phytophthora parasitica*, *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani* y sobre *Alternaria solani* en plantas de tomate. Los resultados obtenidos permiten sugerir que el uso del cultivo *in vitro* de *M. royoc* L. es una estrategia válida para obtener metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, sin provocar los daños que implica la recolección directa de raíces de plantas que habitan en ecosistemas frágiles.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. ....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Taxonomía, Origen e Importancia de la planta <i>M. royoc</i> L .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 El cultivo <i>in vitro</i> como una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios de plantas.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Estrategias para aumentar el contenido de metabolitos secundarios en el cultivo <i>in vitro</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Obtención de metabolitos en el cultivo <i>in vitro</i> de plantas del género <i>Morinda</i>. ....</b>	<b>15</b>
<b>2.5 Aislamiento y purificación de antraquinonas.....</b>	<b>18</b>
<b>2.6 Actividad antimicrobiana de extractos antraquinónicos.....</b>	<b>20</b>
2.6.1 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan al hombre. ....	20
2.6.2 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan a las plantas. ....	22
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.0 Procedimientos generales. ....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>M. royoc</i> L. para la obtención de antraquinonas.....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Efecto de las condiciones de luz y oscuridad.....	28
3.1.2 Efecto de la concentración de ácido indolacético. ....	28
3.1.3 Efecto del tipo de auxina.....	29
3.1.4 Efecto de la frecuencia de renovación del medio de cultivo.....	29
3.1.5 Efecto del tiempo de cultivo de raíces. ....	30
3.1.6 Efecto de la concentración de sacarosa.....	30
3.1.7 Efecto de los elicitores ácido jasmónico y extracto de levadura.....	30
<b>3.2 Identificación de las antraquinonas presentes en el cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>M. royoc</i> L.....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Aislamiento de las antraquinonas.....	31
3.2.2 Purificación de las antraquinonas por cromatografía en columna de gel de sílice y cromatografía preparativa en capa fina (CCF preparativa).....	33
3.2.3 Caracterización estructural de las antraquinonas por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- $H^1$ ). ....	34
<b>3.3 Actividad antimicrobiana de extractos antraquinónicos de raíces de <i>M. royoc</i> L. ....</b>	<b>35</b>
3.3.1 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan al hombre. ....	35
3.3.2 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan a las plantas.....	37

---

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>M. royoc</i> L. para la obtención de antraquinonas.....</b>	<b>40</b>
4.1.1 Efecto de las condiciones de luz y oscuridad.....	40
4.1.2 Efecto de la concentración de ácido indolacético.....	43
4.1.3 Efecto del tipo de auxina.....	45
4.1.4 Efecto de la frecuencia de renovación del medio de cultivo.....	49
4.1.5 Efecto del tiempo de cultivo de raíces.....	53
4.1.6 Efecto de la concentración de sacarosa.....	58
4.1.7 Efecto de los elicitores ácido jasmónico y extracto de levadura.....	60
<b>4.2 Identificación de las antraquinonas presentes en el cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>M. royoc</i> L.....</b>	<b>67</b>
4.2.1 Aislamiento de las antraquinonas.....	67
4.2.2 Purificación de las antraquinonas por cromatografía en columna de gel de sílice y cromatografía preparativa en capa fina (CCF preparativa).....	71
4.2.3 Caracterización estructural de las antraquinonas por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- $H^1$ ).....	73
<b>4.3 Actividad antimicrobiana de extractos antraquinónicos de raíces de <i>M. royoc</i> L. ....</b>	<b>78</b>
4.3.1 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan al hombre.....	78
4.3.2 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan a las plantas.....	87
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>102</b>

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas constituyen una fuente importante de diversidad natural por la gran cantidad de compuestos que sintetizan, muchos de los cuales son útiles en la agricultura, la medicina humana, en la preservación de alimentos, y en el control de enfermedades (Kolewe *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2006; McChesney *et al.*, 2007; Mdee *et al.*, 2009). Varios de estos químicos son metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento pero tienen funciones importantes en la interacción de las plantas con otros organismos, como atrayentes de insectos polinizadores, en la defensa al ataque por patógenos, y con fines medicinales (Zárate *et al.*, 2008; Bednarek y Osbourn, 2009).

La población mundial se incrementa rápidamente lo que provoca una extrema presión por la disponibilidad de la tierra cultivable para producir alimentos y satisfacer las necesidades. Es por esto, que cuando se pretende utilizar las plantas para producir fármacos y productos químicos, se hace necesario desarrollar tecnologías que no compitan con las producciones en el campo (Ramachandra y Ravishankar, 2002).

El cultivo de células y tejidos es una alternativa biotecnológica para la producción de metabolitos secundarios independiente de las condiciones ambientales (Matkowski, 2008). En los últimos años se ha incrementado el uso de estas técnicas para la obtención de compuestos naturales de plantas y existen diferentes estrategias para su producción a partir del cultivo de células (callos y suspensiones celulares) (Mishchenko *et al.*, 2007; Shinde *et al.*, 2010), y el cultivo de órganos (brotes y raíces transformadas y no transformadas) (Giridhar *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Reppert *et al.*, 2008; Ludwig-Muller *et al.*, 2008; Park y Lee, 2009).

Existen diferentes factores que afectan el cultivo *in vitro* de células y órganos para la obtención de metabolitos secundarios; entre los que se encuentran: el genotipo, tipo de explante, reguladores del crecimiento, composición del medio de cultivo y las condiciones del ambiente físico así como el empleo de elicitores. Estos factores deben ser evaluados para la producción de cada metabolito en específico (López-Laredo *et al.*, 2009; Kuzma *et al.*, 2009).

Las antraquinonas son metabolitos secundarios presentes en un gran número de familias de plantas que incluye *Rubiaceae*, *Poligonaceae*, *Leguminosaceae* y *Rutaceae* (Farzami-Sepehr y Ghorbanli, 2002; Mishchenko *et al.*, 2007). El cultivo de células y tejidos de plantas de la familia *Rubiaceae* produce gran cantidad de antraquinonas, especialmente las raíces y en algunos casos el contenido excede al de la planta madre (Han *et al.*, 2001; Nakanishi *et al.*, 2005). Las antraquinonas que se obtienen a partir de especies de *Morinda* se usan tradicionalmente desde la antigüedad como tintes (Melo, 2009). Los extractos antraquinónicos a partir de plantas presentan actividad antimicrobiana sobre patógenos que afectan a las plantas y al hombre (Ali *et al.*, 2000; Kanokmedhakul *et al.*, 2005; Kuete *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2008; Godard *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2010; Pandey y Mishra, 2010), actividades anticancerígena (Son *et al.*, 2008; Kamiya *et al.*, 2010), antimalarial (Hou *et al.*, 2009), antioxidante (Galindo *et al.*, 2008), y antiinflamatoria (He *et al.*, 2009).

Strange y Scott, (2005) informaron que más de 800 millones de personas en países en vías de desarrollo no presentan un adecuado suplemento nutricional y al menos el 10% de los alimentos se pierde debido a enfermedades de las plantas. Las aplicaciones de los fungicidas químicos es un método convencional para el control de enfermedades causadas por patógenos fúngicos (Sharma y Kumar, 2009). Sin embargo, varios agentes fúngicos son tóxicos, presentan efectos no deseables sobre otros organismos y el ambiente, y se ha informado el desarrollo de resistencia (Mdee *et al.*, 2009). El uso de productos naturales para el control de enfermedades de las plantas es un método alternativo para el control de las mismas (Kim *et al.*, 2004) dado a sus bajos impactos sobre el ambiente (Sharma y Kumar, 2009). Los extractos de plantas, además de su bioactividad sobre un amplio número de patógenos de plantas, son productos biodegradables, no tóxicos y están disponibles potencialmente para su uso en programas de manejo de plagas y enfermedades (Yang *et al.*, 2009).

Los productos naturales de plantas también pueden mostrar su efectividad frente a enfermedades infecciosas. En el año 2008, la Organización Mundial de Salud (OMS) informó cerca de diez millones de muertes en el mundo por esta causa (WHO, 2008). Muchos de los fármacos disponibles

actualmente tienen efectos secundarios indeseables, son ineficaces sobre patógenos nuevos o re-emergentes, o conducen al rápido desarrollo de la resistencia (Marie y White, 2009).

Teniendo en cuenta las limitaciones de los fungicidas y medicamentos, la lucha contra la resistencia y el hecho de que las plantas contienen miles de constituyentes que son una importante fuente de moléculas biológicamente activas, se abren posibilidades para el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos a partir de plantas.

La especie *Morinda royoc* L. perteneciente a la familia *Rubiaceae* es una planta silvestre de manigua costera que está distribuida en todo el archipiélago cubano. Esta planta presenta propiedades medicinales informadas por varios autores (Roig, 1965, 1974; Rodríguez *et al.*, 1999; Scull *et al.*, 2000; Beyra *et al.*, 2004; Hernández y Volpato, 2004). Las raíces de esta planta son la principal fuente de antraquinonas (Park, 1977; Rivas *et al.*, 2006) por lo que la extracción de los metabolitos a partir de plantas en ambiente natural significa la destrucción de poblaciones naturales. De allí la necesidad de utilizar las técnicas de cultivo *in vitro*, así como aislar y elucidar las estructuras de estos metabolitos presentes en las raíces de *M. royoc* L. y evaluar su potencial de aplicación. La propagación *in vitro* de *M. royoc* L. se ha desarrollado a partir de yemas apicales, axilares y semillas (Jiménez *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2005).

En Cuba existe un programa de Biotecnología Vegetal que tiene entre sus vertientes la obtención de productos naturales de alto valor económico y social sin que se afecten los recursos naturales (Cuesta-Rubio *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2003; Kutney y Pérez, 2004; Quiala *et al.*, 2006, Capote *et al.*, 2008; Pérez-Alonso *et al.*, 2009). La búsqueda de métodos que permitan la obtención de metabolitos secundarios con actividades biológicas importantes constituye una estrategia útil. Hasta la fecha no se han publicado trabajos con relación a la obtención de antraquinonas en el cultivo *in vitro* de *M. royoc* L. Sin embargo, existen múltiples estudios de este metabolito a partir del cultivo de células y órganos *in vitro* de otras plantas de la familia *Rubiaceae* (Han *et al.*, 2001; Komaraiah *et al.*, 2005; Chiang y Abdullah, 2007; Quevedo *et al.*, 2010).

Por lo anteriormente expuesto se realiza la presente investigación a partir de la hipótesis: “Es posible la obtención de antraquinonas a partir del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. con efecto inhibitorio sobre el crecimiento de patógenos que afectan al hombre y a las plantas mediante el manejo de las condiciones de cultivo”.

Para dar cumplimiento a esta hipótesis se trazaron los siguientes objetivos:

- Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. que permitan la mayor obtención de antraquinonas por unidad de masa fresca.
- Identificar las antraquinonas que se obtienen a partir del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L.
- Determinar la actividad inhibitoria de extractos antraquinónicos sobre el crecimiento de patógenos que afectan al hombre y a las plantas.

#### **NOVEDAD CIENTIFICA**

Se informa por primera vez el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L., para la obtención de compuestos naturales, específicamente antraquinonas. Por primera vez se realizó el aislamiento e identificación de antraquinonas a partir de raíces *in vitro* de *M. royoc* L. La presencia de dos de estos compuestos se informa por vez primera en la especie en estudio. Se demostró que los extractos crudos de raíces *in vitro*, raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. y la morindona mostraron actividad antimicrobiana.

#### **VALOR PRÁCTICO**

Se demostró que es posible la obtención de antraquinonas mediante el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. Se comprobó que esta constituye una estrategia válida para evitar daños severos al tratar de obtener estos productos a partir de la recolección directa de raíces de plantas que habitan en ecosistemas frágiles. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer el potencial de los extractos de antraquinonas como inhibidores del crecimiento de patógenos que afectan a las plantas y al hombre. Estos elementos crean una importante base experimental y tecnológica para la futura producción de nuevos pesticidas y medicamentos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1 Taxonomía, Origen e Importancia de la planta *M. royoc* L.

La familia *Rubiaceae* (Orden *Rubiales*, Subclase *Asterida*) comprende cerca de 450 géneros y 6 500 especies e incluye árboles, arbustos y herbáceas (Han *et al.*, 2001). La especie *M. royoc* L. perteneciente a la familia *Rubiaceae* está distribuida en todo el archipiélago cubano y además se conoce que crece en las Bahamas, Florida, Jamaica, Santo Domingo, América Central, hasta Venezuela y Curazao. Se ha informado que en Cuba abundan además las especies *Morinda citrifolia* L. y *Morinda moamensis* (Roig, 1965). Las mismas son arbustos de 1-1.5 m con ramas alargadas, débiles y a veces trepadores sobre otros arbustos o árboles, ramas pálidas, estriadas, estípulas de 2 mm y base ancha. Presentan hojas linear-lanceoladas, lanceoladas o lanceo-oblongas, u oblongas a oblanceoladas o elípticas, agudas o acuminadas en el ápice, estrechadas hacia el pecíolo, de 5-10 por 1.5 cm y membranosas. Presentan cabezuelas de 1 cm de diámetro, pedúnculo de hasta 2 mm, plurifloras, tubo del cáliz ovoide de 3 mm, limbo truncado, corola blanca o rosada, glabra o pubérula, tubo de 5 mm, lóbulos oblongos, obtusos de 3 mm, sincarpio de 8-25 mm y pirenos crustáceos, de 5 mm (Alain, 1964).

*M. royoc* L. presenta propiedades medicinales reconocidas desde la antigüedad y demostradas científicamente en los últimos años por varios investigadores cubanos (Rodríguez *et al.*, 1999; Scull *et al.*, 2000; Beyra *et al.*, 2004; Hernández y Volpato, 2004). Esta planta se utiliza en la elaboración de bebidas refrescantes y digestivas, es uno de los ingredientes del Prú oriental, además se emplea como bebidas depurativas y afrodisíaco (Alain, 1964). En Cuba las raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. se usan para la elaboración de un producto a partir de extracto hidroalcohólico que se comercializa como PV-2, se emplea como suplemento dietético y tiene acción estimulante, revitalizadora, antiestrés e incrementa la libido (Scull *et al.*, 2000).

Esta planta presenta dificultades para la reproducción natural debido a que sus semillas son poco viables y su hábitat es de manigua costera, de allí que no se cultive de forma extensiva en condiciones de campo, lo que limita la disponibilidad de materia prima (Jiménez *et al.*, 2005). En Cuba, se informa la sobreexplotación de algunas especies silvestres utilizadas con fines medicinales,

rituales y afrodisíacos, que han amenazado o destruido poblaciones naturales entre las que se encuentran las especies *M. royoc* L. y *M. citrifolia* L. (CITMA, 2009). Es por esto que diferentes grupos de investigadores cubanos (Jiménez *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2005) desarrollaron procedimientos para la propagación *in vitro* de *M. royoc* L.

Entre los metabolitos principales informados para *M. royoc* L. se encuentran las antraquinonas (Park, 1977; Scull *et al.*, 2000; Rivas *et al.*, 2006), las cuales presentan alta actividad antimicrobiana sobre patógenos que afectan a las plantas o al hombre (Konstandinidou-Doltsinis *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2010; Pandey y Mishra, 2010; Godard *et al.*, 2009).

## **2.2 El cultivo *in vitro* como una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios de plantas.**

El metabolismo secundario en las plantas se define como la biosíntesis de productos naturales que no son considerados esenciales para los procesos básicos de la vida, tales como el crecimiento o la replicación (Kolewe *et al.*, 2008). Los metabolitos secundarios son de gran importancia para la interacción de las plantas con el ambiente debido a su función como atrayentes de insectos polinizadores, en la simbiosis y en la defensa al ataque por microorganismos y otras plantas o animales. Además, éstos son importantes para el hombre desde el punto de vista económico pues constituyen fuente de fármacos, saborizantes, fragancias, insecticidas y aditivos de alimentos (Zárate *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayoría de los metabolitos secundarios están presentes en las plantas en cantidades extremadamente bajas, a menudo menos que el 1% del carbono total (Bourgaud *et al.*, 2001), lo que dificulta su producción a partir de fuentes naturales, especialmente en el caso de aquellas especies de crecimiento lento (Kolewe *et al.*, 2008).

La síntesis química de los productos naturales es comercialmente factible para aquellos metabolitos con una estructura simple tales como la aspirina (derivada del ácido salicílico) y la efedrina (Wink *et al.*, 2005). Sin embargo, existen productos que se utilizan en el tratamiento del cáncer (paclitaxel, vinblastina, camptotecina), los cuales tienen una estructura compleja, con múltiples anillos y centros quirales que dificulta y hace muy costoso el proceso de síntesis (Kolewe *et al.*, 2008).

Además de la vía de la síntesis química, la producción de metabolitos secundarios se lleva a cabo fundamentalmente a través del cultivo de plantas medicinales en el campo. Sin embargo, en muchos casos el metabolito está en baja concentración y su síntesis depende del estado de desarrollo y fisiología de la planta (Mishchenko *et al.*, 2007; Zárate *et al.*, 2008). La mayoría de las veces la extracción de metabolitos secundarios a partir de plantas de campo requiere de largos períodos de tiempo (Kim *et al.*, 2002). La obtención de Taxol®, compuesto de alta demanda por su actividad citotóxica, y la del alcaloide vinblastina, potente antileucémico, son ejemplos de fármacos que se extraen de plantas cuya demanda es difícil de abastecer. La preparación de una única dosis de 300 mg de paclitaxel, potente anticancerígeno, requiere la tala de un árbol de 100 años de edad (Tabata, 2004). Asimismo, para obtener 1 g de vinblastina, se necesitan 500 kg de hojas secas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Sottomayor *et al.*, 2004).

La acumulación de metabolitos secundarios en las plantas es baja y lenta ya que está regulada espacial y temporalmente, es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés (Verpoorte *et al.*, 2002). Además el cultivo en el campo puede perderse debido a los desastres naturales (Wilken *et al.*, 2005). En el caso de plantas silvestres, su explotación comercial está basada en la recolección de material en su hábitat natural, frecuentemente incluye la raíz, lo que provoca que muchas estén amenazadas o en peligro de extinción (Trejo y Rodríguez, 2007).

Varios de los metabolitos secundarios se producen por células y cultivos de órganos en concentraciones comparables a la planta madre (Verpoorte *et al.*, 2002). Wilken *et al.* (2005) informaron que algunos metabolitos pueden estar presentes en mayor concentración en el material *in vitro* comparado con material de campo o viceversa.

El empleo del cultivo *in vitro* para la obtención de metabolitos secundarios presentan ventajas sobre la producción agrícola convencional. Estas son: la síntesis de metabolitos secundarios tiene lugar en un ambiente controlado, independiente de las condiciones del clima y del suelo; se eliminan las influencias biológicas negativas tales como microorganismos e insectos; es posible seleccionar

variedades élites con la mayor producción eficiente de metabolitos secundarios y disminuir los precios e incrementar la producción con la automatización del proceso (Mulabagal y Tsay, 2004).

Otra de las ventajas de estas técnicas radica en ser una alternativa viable cuando existe una combinación de bajos rendimientos de los productos naturales y lento crecimiento de las plantas, ya que la mayoría de las plantas pueden cultivarse *in vitro* a partir de un cultivo diferenciado o indiferenciado (Kolewe *et al.*, 2008). Las células de las plantas son totipotentes biosintéticamente lo que significa que cada célula en cultivo mantiene la información genética completa y por esto es capaz de producir los compuestos químicos que se encuentran en las plantas madres (Ramachandra y Ravishankar, 2002).

En los últimos años se ha incrementado el uso de las técnicas del cultivo *in vitro* para la obtención de productos naturales. Algunos provienen del metabolismo primario (Pérez *et al.*, 2003; Barth *et al.*, 2005) y otros del metabolismo secundario como: flavonoides (Antognoni *et al.*, 2007), isoflavonas (Lee *et al.*, 2007; Shinde *et al.*, 2009), taxoides (Qiu *et al.*, 2009), diterpenoides (Kuzma *et al.*, 2009) y antraquinonas (Park *et al.*, 2009).

Existen diferentes estrategias para la obtención de metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro* de plantas: a partir de cultivo de tejidos desorganizados (callos y suspensiones celulares) y a partir de estructuras organizadas (brotes y raíces transformadas y no transformadas) (Verpoorte *et al.*, 2002).

En el cultivo de callos se ha evaluado la producción de varios metabolitos tales como: antraquinonas a partir de callos de *Rheum ribes* y *Rubia cordifolia* (Farzami-Sepehr y Ghorbanli, 2002, Mishchenko *et al.*, 2007), ácido gálico y catequina a partir de callos de *Tecoma stans* L. (López-Laredo *et al.*, 2009) e isoflavona en el cultivo de callos de *Psoralea corylifolia* (Shinde *et al.*, 2010).

Las suspensiones celulares también han sido muy utilizadas para la obtención de metabolitos secundarios. La mayor ventaja de esta técnica es que mediante su empleo se puede proporcionar una continúa y segura fuente de productos naturales (Mulabagal y Tsay, 2004). Entre los ejemplos de metabolitos secundarios que se han obtenido en el cultivo de suspensiones celulares se encuentran: antraquinonas a partir de *R. cordifolia*, *Cinchona robusta*, *Morinda elliptica*, *M. citrifolia* L., *Rudgea jasminoides* y *Rubia tinctorum* (Susuki *et al.*, 1985; Ramos-Valdivia *et al.*, 1997a; Chong *et*

*al.*, 2005b; Komaraiah *et al.*, 2005; Oliveira *et al.* 2007; Perassolo *et al.*, 2007; Orbán *et al.*, 2008), saponinas a partir de *Panax ginseng* (Lu *et al.*, 2001), azadiractina a partir de *Azadirachta indica* (Prakash y Srivastava, 2008) y fitoestrógenos a partir de *P. corylifolia* (Shinde *et al.*, 2009).

Los cultivos de células no diferenciadas presentan velocidades de crecimiento mayores a los de células diferenciadas u órganos (raíces y brotes). Además, los procesos de transferencia de masa son más eficientes y pueden lograrse cultivos con densidades celulares más elevadas, ventajosos para el desarrollo, control y manipulación de procesos a escala industrial (Trejo y Rodríguez, 2007). Sin embargo, los rendimientos de metabolitos secundarios a partir de callos y suspensiones celulares con frecuencia son inestables y disminuyen a través del tiempo (Wilken *et al.*, 2005) y la falta de diferenciación celular en estos cultivos puede ocasionar que la concentración del metabolito sea menor que en la planta (Trejo y Rodríguez, 2007). Se ha informado que la no acumulación del metabolito en células desdiferenciadas se debe a una falta de acoplamiento con la maquinaria enzimática, insuficiente expresión de genes del desarrollo o una pérdida del estímulo ambiental (Matkowski, 2008).

La producción de metabolitos secundarios es generalmente mayor en cultivos diferenciados que en cultivos indiferenciados, por lo que varias investigaciones se enfocan al cultivo de embriones, brotes y raíces para la obtención de compuestos secundarios (Ramachandra y Ravishankar, 2002). Los metabolitos secundarios son por definición un producto de la diferenciación, los cultivos de órganos producen metabolitos secundarios comparados a la planta madre (Verpoorte *et al.*, 2002). Varios metabolitos se han obtenido a partir de cultivo de brotes *in vitro* como por ejemplo: hipericina y ácido cafeico a partir de brotes de *Hypericum perforatum* L. (Pavliak *et al.*, 2007) y *Echinacea angustifolia* (Lucchesini *et al.*, 2009) respectivamente.

El cultivo de raíces transformadas y no transformada se ha utilizado ampliamente en la obtención de metabolitos secundarios como por ejemplo para obtener antraquinonas a partir de *R. tinctorum* (Sato *et al.*, 1997) y de *Rubia akane* (Nakanishi *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2009), 2-hidroxi 4-metoxi benzaldehído a partir de *Hemidesmus indicus* (Sreekumar *et al.*, 1998), antocianinas a partir de *Raphanus sativus* L. (Betsui *et al.*, 2004), isoflavonas a partir de *Albizia kalkora* (Park *et al.*, 2006),

alcaloides a partir *Datura stramonium* (Amdoun *et al.*, 2009), y ginsenosides (saponinas) a partir de *P. ginseng* (Dewir *et al.*, 2010).

Aunque desde el punto de vista tecnológico el cultivo de órganos a gran escala es más complejo y costoso (Verpoorte *et al.*, 2002) se están desarrollando diferentes sistemas para la producción a gran escala de metabolitos secundarios a partir de estructuras organizadas como son el empleo de los sistemas semi-automatizados (Wilken *et al.*, 2005; Pérez-Alonso *et al.*, 2009).

Las antraquinonas se han obtenido a partir del cultivo *in vitro* de varias plantas de la familia *Rubiaceae* (Han *et al.*, 2001). Para incrementar la acumulación de este metabolito se han desarrollado estrategias como: optimización del medio de cultivo (Chong *et al.*, 2004), elicitación (Perassolo *et al.*, 2007) y manipulación genética (Quevedo *et al.*, 2010). Sin embargo, no existen estudios relacionados con la obtención de antraquinonas a partir del cultivo *in vitro* de *M. royoc* L.

### **2.3 Estrategias para aumentar el contenido de metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro*.**

La obtención de productos activos a partir del cultivo de células y tejidos tiene un potencial alto para la producción a gran escala y por largos períodos de tiempo bajo condiciones controladas (Bourgaud *et al.*, 2001). Sin embargo, en ocasiones el rendimiento de los productos es demasiado bajo lo que limita su viabilidad (Antognoni *et al.*, 2007; Dewir *et al.*, 2010) y por ello se desarrollan alternativas para incrementar el rendimiento de los metabolitos en el cultivo *in vitro* de plantas. Entre ellas se encuentran: la selección de líneas de plantas altamente productoras (Mulabagal y Tsay, 2004), la optimización de condiciones de cultivo (Ramachandra y Ravishankar, 2002), el uso de biorreactores (Wilken *et al.*, 2005) y la elicitación (Krolicka *et al.*, 2008; Prakash y Srivastava, 2008).

Los constituyentes del medio de cultivo celular son determinantes para el crecimiento y la acumulación de metabolitos secundarios. La expresión de varias vías de síntesis de metabolitos secundarios se altera fácilmente por factores externos tales como: luz, reguladores del crecimiento, fuente de carbono, niveles de nutrientes y factores de estrés (Ramachandra y Ravishankar, 2002).

La presencia o ausencia de luz es un factor importante para estimular la acumulación de metabolitos secundarios *in vitro*. La luz generalmente reduce la concentración de antraquinonas en el cultivo *in vitro* (Han *et al.*, 2001). En cultivos celulares de *Cinchona ledgeriana* el mayor rendimiento de

antraquinonas se obtuvo en cultivos celulares en la oscuridad (Harkes *et al.*, 1985). En cultivos celulares de *R. cordifolia* la formación de antraquinonas se reprimió por irradiación de luz roja o azul (Susuki *et al.*, 1985).

Los cultivos de raíces transformadas de *Solanum aviculare* acumularon 4.2 veces más solasodina cuando crecieron a la oscuridad comparados con las condiciones de luz (Argolo *et al.*, 2000). De la misma forma, los cultivos de raíces transformadas de *Physalis minima* acumularon más fisalinas en la oscuridad (Azlan *et al.*, 2002). En cultivos celulares de *H. perforatum* se obtuvo el máximo contenido de hipericina en condiciones de oscuridad. Según los autores los cultivos celulares que crecen a la oscuridad pueden estar estresados, lo cual activa rutas para la síntesis de metabolitos secundarios (Bais *et al.*, 2002).

La luz incrementa el contenido de otros metabolitos en el cultivo *in vitro*. La luz no afectó el crecimiento de raíces adventicias de *R. sativus* L. e incrementó la concentración de antocianinas (Betsui *et al.*, 2004). La luz incrementó la concentración de ginsenoside en raíces transformadas de *P. ginseng*, mientras que la oscuridad fue más favorable para el crecimiento de las raíces (Sivakumar *et al.*, 2005b; Yu *et al.*, 2005). En el cultivo de embriones somáticos de *Eleutherococcus senticosus* la luz incrementó la concentración de fenoles totales, flavonoides y ácido clorogénico (Shohael *et al.*, 2006). En presencia de luz los callos de *T. stans* acumularon los mayores contenidos de ácido gálico ( $86.6 \pm 0.01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  y catequina ( $339.6 \pm 0.06 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) (López-Laredo *et al.*, 2009).

Los reguladores del crecimiento también juegan un papel determinantes en la acumulación de metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro*. El tipo y la concentración de auxinas o citoquininas o su relación, alteran el crecimiento y la formación de productos en el cultivo de células de plantas. En cultivos celulares de *R. cordifolia* el 2,4-D no inhibió la formación de antraquinonas y el uso de ANA a concentraciones de 0 a 3.22  $\mu\text{M}$  fueron favorables para la multiplicación de las células y la acumulación de antraquinonas. Mientras que en suspensiones celulares de *C. ledgeriana* el 2,4-D indujo la síntesis de antraquinonas mientras que el ANA casi la suprimió completamente (Suzuki *et al.*, 1984). En cultivos celulares de *Cinchona succirubra* un incremento de ANA de 6.71 a 67.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  o AIA de 12-123  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  incrementó tanto la multiplicación de las células como la

acumulación de antraquinonas, mientras que un incremento en la concentración de 2,4-D de 1.13 a 11.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  provocó un efecto contrario (Khouri *et al.*, 1986).

Betsui *et al.* (2004) evaluaron la influencia de reguladores auxínicos: ANA y ácido indolbutírico (AIB) sobre el crecimiento del cultivo de raíces adventicias de *R. sativus* L. y la formación de antocianinas. La formación de pigmentos fue mayor cuando las raíces se cultivaron en la luz en presencia de 2.46  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB. En cultivos celulares de *D. carota* se obtuvo la máxima acumulación de antocianinas cuando el medio de cultivo se suplementó con 14.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA (Narayan *et al.*, 2005).

La concentración máxima de 2-hidroxi 4-metoxi benzaldehído en raíces de *H. indicus* se obtuvo en el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1960) suplementado con 9.84  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB en la oscuridad (Sreekumar *et al.*, 1998). Sin embargo, en el cultivo de raíces de *Decalepis hamiltonii* se produjo la máxima obtención de biomasa y el máximo contenido de este metabolito en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 5.37  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA a los 45 días de crecimiento (Giridhar *et al.*, 2005).

El medio de cultivo con 2,4-D fue óptimo para la acumulación de isoflavona en cultivo de callos de *Pueraria lobata* y *Psoralea* sp. (Bouque *et al.*, 1998; Matkowski, 2004). Shinde *et al.* (2010) evaluaron la influencia de diferentes reguladores del crecimiento en la obtención de isoflavona en callos de *P. corylifolia* y obtuvieron la mayor acumulación en presencia de 2,4-D y AIA.

La síntesis de metabolitos secundarios se asocia a un cese del crecimiento debido a que durante esta etapa el carbono está dirigido al metabolismo primario (formación de estructuras celulares y respiración). Cuando ocurre un cese del crecimiento, el carbono se hace menos necesario para el metabolismo primario y los compuestos secundarios se sintetizan activamente (Bourgaud *et al.*, 2001).

Sakuta y Komamine (1987) propusieron dos patrones de producción de metabolitos secundarios *in vitro*: 1) producción de metabolitos secundarios durante la fase estacionaria del crecimiento de la suspensión, la cual está asociada a la diferenciación celular y 2) producción de metabolitos secundarios durante la fase logarítmica del crecimiento de la suspensión, asociada a la división

celular indiferenciada. Los patrones anteriores tienen gran importancia para determinar el momento óptimo para la extracción de los metabolitos.

Farzami-Sepehr y Ghorbanli (2002), evaluaron diferentes factores en el crecimiento y formación de callos de *R. ribes* e informaron que los tratamientos que lograron un máximo crecimiento tenían un menor contenido de antraquinonas. Otros estudios realizados por Santos-Gomes *et al.* (2003) y Yesil-Celiktas *et al.* (2007) informan esta relación entre el crecimiento y la acumulación de metabolitos en los callos de *Rosmarinus officinalis*. Santos-Gomes *et al.* (2003) señalaron que la alta producción de biomasa disminuyó la concentración de ácido rosmarínico a consecuencia de la alta demanda de carbono y energía que favoreció el flujo de los metabolitos hacia productos biosintéticos necesarios para el incremento de la biomasa.

En otros estudios se asocia la producción de metabolitos secundarios al crecimiento de biomasa. Perassolo *et al.* (2007) informaron una relación directa entre el aumento de la concentración de antraquinonas y el crecimiento de suspensiones celulares de *R. tinctorum*. Gevrenova *et al.* (2010), informaron una alta producción de biomasa relacionada con un alto contenido de saponinas en raíces de *Gypsophila paniculata*. En este contexto, Cui *et al.* (2010) informaron que el AIB incrementó la masa fresca y el contenido de fenoles en el cultivo de raíces adventicias de *H. perforatum* L.

Las fuentes de carbono y las concentraciones salinas en el medio de cultivo son otros de los factores que también influyen en la acumulación de metabolitos. La sacarosa favorece la síntesis de antraquinonas (Abdullah *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2001; Farzami-Sepehr y Ghorbanli, 2002). En suspensiones celulares de *M. elliptica* el óptimo de antraquinonas se obtuvo con 7-8% de sacarosa (Abdullah *et al.*, 1998). Sin embargo, en callos de *R. ribes* el máximo contenido de antraquinonas se obtuvo con 6% (m:v) de sacarosa (Farzami-Sepehr y Ghorbanli, 2002). El tipo de azúcar y su concentración influyen en la producción de productos naturales en el cultivo *in vitro* de plantas y depende de la especie en cuestión (Han *et al.*, 2001).

La mayor parte de las plantas cultivadas *in vitro* responden de forma positiva en el medio de cultivo MS, de ahí que se utilice en la mayoría de los cultivos (Giridhar *et al.*, 2005; Jacob y Malpathak, 2005). Jacob y Malpathak (2005), en un estudio de comparación de medios de cultivos en raíces

transformadas de *Solanum khasianum* observaron que en el medio MS se obtenía el mayor incremento en masa fresca, mientras que en el B5 el máximo contenido de solasodina.

En el cultivo *in vitro*, el contenido de metabolitos secundarios también puede incrementarse mediante la elicitación (Namdeo, 2007). En la naturaleza, las plantas producen metabolitos secundarios como un mecanismo de defensa al ataque por patógenos. Esta misma respuesta se logra cuando se le añaden compuestos de origen patogénicos (elicitors). Los elicitors son compuestos capaces de inducir la acumulación de fitoalexinas, inducen el proceso oxidativo, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), procesos de lignificación y la expresión de proteínas relacionados con la patogenicidad (Angelova *et al.*, 2006).

La adición de elicitors es una de las estrategias más notables para mejorar el rendimiento de los metabolitos secundarios que tienen baja o ninguna concentración en el cultivo *in vitro* al compararse con plantas de campo (Antognoni *et al.*, 2007; Kolewe *et al.*, 2008; Amdoun *et al.*, 2009). Entre los elicitors se incluyen: nutrientes (Park *et al.*, 2006), compuestos derivados de los hongos (Prasad *et al.*, 2006) y hormonas naturales (Krolicka *et al.*, 2008; Amdoun *et al.*, 2009).

En el cultivo de raíces transformadas de *R. tinctorum*, la adición de metil jasmonato incrementó de cinco a ocho veces la concentración de antraquinonas, con respecto al testigo (Mantrova *et al.*, 1999). La adición de cloruro de cobre en el cultivo de raíces adventicias de *R. tinctorum* indujo fitoquelatinas y afectó la producción de pigmentos de antraquinonas, mientras que la adición de glutatión provocó un marcado incremento en el contenido de antraquinonas, como es el caso de lucidin-3-O-primeverosida (Sato *et al.*, 1997). Aunque el metil jasmonato es un fuerte elicitor de varios metabolitos secundarios frecuentemente inhibe el crecimiento de las raíces (Yu *et al.*, 2000).

Schulte *et al.* (1984) señalaron que la composición del medio de cultivo para la obtención de metabolitos secundarios debe ser específica para cada especie de planta y probablemente también para subespecies y variedades dentro de una misma especie. De ahí la importancia de su evaluación en la obtención de metabolitos en el cultivo de células y tejidos.

## 2.4 Obtención de metabolitos en el cultivo *in vitro* de plantas del género *Morinda*.

El metabolito más estudiado en el cultivo *in vitro* de plantas del género *Morinda* son las antraquinonas. Los primeros trabajos de acumulación de este compuesto se realizaron en suspensiones celulares de *M. citrifolia* L. (Leistner, 1973; Zenk *et al.*, 1975, Inoue *et al.*, 1981). En estos estudios no se modificaron las condiciones de cultivo para incrementar la producción del metabolito, se realizaron sólo para la identificación de las antraquinonas presentes.

En la década de los noventa comenzaron los estudios de modificaciones de varios factores para el incremento del contenido de antraquinonas en el cultivo *in vitro*. La adición de polisacáridos a suspensiones celulares de *M. citrifolia* L. indujo la producción de antraquinonas en las suspensiones hasta 5.6 veces mayor que el control y sin afectar el crecimiento celular (Dornenburg y Knorr, 1994). Hagendoorn *et al.* (1994), estudiaron la acumulación de antraquinonas en suspensiones celulares de *M. citrifolia* L. y evaluaron el 2,4-D y el ANA en la acumulación del metabolito. Ambas hormonas favorecieron el crecimiento pero solamente en presencia de ANA se observó la acumulación de antraquinonas. Los autores sugieren que el ANA es capaz de actuar en la expresión de genes que codifican para enzimas necesarias en la producción de antraquinonas.

Van der Plas *et al.* (1995) plantean que en cultivos celulares de *M. citrifolia* L. hay dos estados de desarrollo: un estado con una rápida división celular (no productor de antraquinonas) y un estado con la división celular inhibida (productor de antraquinonas). La adición de 2,4-D provocó un rápido cambio de un estado productor de antraquinonas a un estado no productor, las antraquinonas se produjeron solamente cuando el ANA se incluyó en el medio basal.

En suspensiones celulares de *M. elliptica* se estudiaron varias formulaciones de medios sobre el crecimiento y acumulación de antraquinonas y el medio MS fue capaz de promover el crecimiento de las células y la concentración de antraquinonas. El máximo rendimiento de antraquinonas bajo iluminación y oscuridad fue de 2.9 y 4.5 g·L<sup>-1</sup> respectivamente. El 2,4-D inhibió la concentración de antraquinonas en estos cultivos. Según los autores, el uso de este regulador del crecimiento pudo provocar la represión o inhibición de enzimas relacionadas con la síntesis de antraquinonas, así como la carencia de esqueletos carbonados. El máximo valor de masa seca y antraquinonas en las

suspensiones celulares de *M. elliptica* se obtuvo con 5-6% (m:v) y 7-8% (m:v) de sacarosa respectivamente (Abdullah *et al.*, 1998).

La biosíntesis de antraquinonas en suspensiones celulares de *M. citrifolia* L. puede inducirse en un medio con  $1.86 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y la elicitación con *Phytophthora cinnamomi*. La acumulación de antraquinonas estuvo acompañada con una inducción de la enzima isopentenil difosfato isomerasa (Ramos-Valdivia *et al.*, 1998). Van Tegelen *et al.* (1999) demostraron que la inhibición de la biosíntesis de antraquinonas en *M. citrifolia* L. ocurre debido a la represión del gen *ics* por el 2,4-D.

En los últimos diez años se ha incrementado los estudios para la producción de antraquinonas en el cultivo *in vitro* de plantas del género *Morinda*. En el cultivo de suspensiones de *M. elliptica* en biorreactores el medio de producción promovió el crecimiento celular ( $18.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y la formación de antraquinonas ( $9.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa seca) sin necesidad de adicionar antiespumante (Abdullah *et al.*, 2000a; 2000b). En cultivos celulares de raíces de *Morinda angustifolia* se identificó la morindona como principal antraquinonas presente. Sin embargo, no se evaluaron factores para incrementar su acumulación (Aobchey *et al.*, 2002).

La regulación de la biosíntesis de antraquinonas en suspensiones celulares de *M. citrifolia* L. también se estudió por Stalman *et al.* (2003). El 2,4-D y el ANA inhibieron la síntesis de antraquinonas en las suspensiones celulares pero el 2,4-D fue aproximadamente 30 veces más inhibitorio. Ambas hormonas inhibieron la actividad de la enzima isocorismato sintasa lo que tuvo una relación directa con la reducción de la concentración de antraquinonas.

La elicitación con ácido jasmónico en suspensiones celulares de *M. elliptica* puede inducir la concentración de antraquinonas con una reducción de la masa seca, altos niveles de estrés oxidativo e incrementos de la actividad antioxidante. El tratamiento prolongado con elicitores y la alta concentración pueden dar lugar a un menor crecimiento de la suspensión, pero con un aumento en los niveles de antraquinonas (Chong *et al.*, 2005a; 2005b).

El aumento en la acumulación de antraquinonas en suspensiones celulares de *M. citrifolia* L. se llevó a cabo mediante el tratamiento con elicitores (ácido linoleico,  $\alpha$ -ácido linolénico, metil jasmonato, ácido salicílico y óxido nítrico), ultrasonicación y la adición controlada de sacarosa al medio de

cultivo. El mayor rendimiento específico ( $16.74 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa seca) se obtuvo al añadir 2% (m:v) de sacarosa y  $150 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de metil jasmonato. La máxima acumulación de antraquinonas se logró en la etapa tardía de la fase exponencial y en la fase estacionaria (Komaraiah *et al.*, 2005).

En cultivos celulares de *M. elliptica* se evaluaron la adición de polímeros adsorbentes para coleccionar las antraquinonas del medio del cultivo y aumentar la concentración neta del producto evitando que altos niveles del metabolito sean tóxicos para las células. Los cultivos mostraron de 2 a 7 veces más antraquinonas en el medio de cultivo que el control sin adsorbentes (Chiang y Abdullah, 2007).

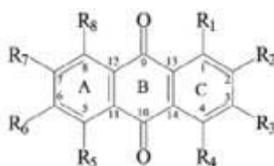
En el cultivo de suspensiones celulares de *M. citrifolia* L. en biorreactores, la aireación incrementó el crecimiento celular lo que estuvo relacionado con una disminución del contenido de antraquinonas. Las condiciones de oscuridad suprimieron el crecimiento de las suspensiones mientras que alta intensidad de la luz ( $45 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) inhibieron la síntesis de antraquinonas, flavonoides y fenoles (Ahmed *et al.*, 2008). También en suspensiones celulares de *M. citrifolia* L. pero en este caso mediante manipulación genética se incrementó la biosíntesis de antraquinonas. Se obtuvieron líneas celulares transformadas que sobreexpresa el gen que codifica para 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa. El contenido de antraquinonas y la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa fue superior en líneas transgénicas que en el control (Quevedo *et al.*, 2010).

La obtención de metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro* de especies del género *Morinda* se lleva a cabo principalmente mediante el cultivo de suspensiones celulares (Han *et al.*, 2001; Quevedo *et al.*, 2010). El cultivo de raíces es una vía muy poco estudiada para la acumulación de metabolitos secundarios. Recientemente, Baque *et al.* (2010a) evaluaron la inducción de raíces de *M. citrifolia* L. a partir de hojas con la utilización de AIB y ANA. Los autores informaron que  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  AIB fue la mejor hormona para la formación de raíces. El contenido de antraquinona, fenoles y flavonoides se incrementó en presencia de luz rojo lejano, azul y fluorescente. En otro artículo, estos autores evaluaron la concentración de estos metabolitos durante el crecimiento de raíces adventicias de *M. citrifolia* L. en zaranda orbital. El ANA disminuyó el contenido de metabolitos en el cultivo de raíces comparados con el AIB. La adición de citoquininas (kinetina ó TDZ) en combinación con AIB disminuyeron la masa fresca y seca de las raíces e incrementaron el contenido de metabolitos secundarios y de enzimas antioxidativas (Baque *et al.*, 2010b).

## 2.5 Aislamiento y purificación de antraquinonas.

Los compuestos secundarios en las plantas usualmente se clasifican por sus rutas biosintéticas en tres grandes grupos: terpenos y esteroides, fenoles y alcaloides (Bourgaud *et al.*, 2001). Las quinonas son fenoles muy abundantes en la naturaleza y se encuentran tanto en vegetales superiores como en hongos y bacterias. Dependiendo del grado de complejidad de su estructura química pueden clasificarse en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas si son estructuras monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas (Carretero, 2000; Cai *et al.*, 2004).

Las antraquinonas son derivadas del antraceno con dos grupos ceto en las posiciones C9 y C10 (Han *et al.*, 2001) (Figura 1). El componente basal antraquinona (9,10-dioxoantraceno) se sustituye de varias formas y resulta en una amplia variedad de estructuras (Wijnsma y Verpoorte, 1986). La tabla 1 muestra las antraquinonas obtenidas a partir de raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. (Park, 1997).



**Figura 1.** Estructura química basal de las antraquinonas.

**Tabla 1.** Antraquinonas de raíces de plantas de *M. royoc* L. en ambiente natural (Park, 1977).

Nombre	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
2 formil-3-hidroxiantraquinona	H	CHO	OH	H	H	H	H	H
Copareolatina-6-metiléter	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	CH <sub>3</sub> O	OH	H
Copareolatina-1 (ó 5), 6 dimetiléter	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	OH (OCH <sub>3</sub> )	OCH <sub>3</sub>	OH (OCH <sub>3</sub> )	H
Damnacantal	OCH <sub>3</sub>	CHO	OH	H	H	H	H	H
Lucidina	OH	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	H	H	H	H
Morindona	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	OH	H	H
Morindona-5-metiléter	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
Nordamnacantal	OH	CHO	OH	H	H	H	H	H
Rubiadina-1-metiléter	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	H	H	H
Soranjidiol	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	H
Soranjidiol-1-metiléter	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	OH	H	H
Tectoquinona	H	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	H

Las antraquinonas constituyen el grupo más grande de quinonas (Carretero, 2000). En las plantas pueden encontrarse como derivados de azúcares (glucósidas) o agliconas (Izhaki, 2002). Entre las agliconas más comunes se encuentran la emodina, reina, crisofanol, aloe-emodina y la fisciona.

Las dos principales rutas biosintéticas que conducen a la síntesis de antraquinonas en las plantas superiores son: la ruta de los policétidos y la del corismato/ácido-*o*-succinilbenzoico. Esta última ruta es la que está presente en las Rubiáceas donde se demostró que el anillo C de las antraquinonas proviene a partir de la ruta del 2-C-metil-D eritritol-4-fosfato o de la ruta del ácido mevalónico (Han *et al.*, 2001) (Figura 2).

La acumulación de metabolitos secundarios en las plantas es el resultado de un equilibrio dinámico entre la formación del producto, la transportación, el almacenamiento y la degradación (Vanisree y Tsay, 2004). La compartimentación subcelular de las rutas constituye un papel central en la regulación de la biosíntesis de los metabolitos secundarios. La vía 2-C-metil-D eritritol-4-fosfato es operativa en los plastidios, mientras que la ruta del ácido mevalónico se localiza en el citoplasma (Lichtenthaler, 1999). El proceso exacto de síntesis de antraquinonas dentro de las células no se conoce. Sin embargo, se sabe que la biosíntesis de antraquinonas en las plantas de la familia *Rubiaceae* requiere al menos de cuatro compartimentos: los plastidios para la formación de la mitad isopreno, el retículo endoplasmático, el citosol para los demás pasos y finalmente la vacuola para el almacenaje de las antraquinonas (Han *et al.*, 2001).

Los solventes orgánicos más utilizados para la extracción de antraquinonas son: diclorometano (Ismail *et al.*, 1997; Aobchey *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2009), metanol (Kaur *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009), hexano (Hazra *et al.*, 2004), etanol (Mishchenko *et al.*, 2007), cloroformo (Kamiya *et al.*, 2010) entre otros. La separación e identificación de las antraquinonas se lleva a cabo con técnicas analíticas como la cromatografía en capa fina (CCF) (Oliveira *et al.*, 2007), cromatografía de columna (Ismail *et al.*, 1997; Kamiya *et al.*, 2010), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Mishchenko *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2009; Kiathevest *et al.*, 2009), entre otras.

La elucidación química de las antraquinonas se realiza por técnicas de espectros infrarrojos (Mishchenko *et al.*, 2007; Siddiqui *et al.*, 2007; Kamiya *et al.*, 2010), espectrometría de masa (Nuñez *et al.*, 2005; Mishchenko *et al.*, 2007) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Siddiqui *et al.*, 2007; Kamiya *et al.*, 2010). Las técnicas modernas de separación, métodos de ensayos y nuevos avances en espectrometría de masa y RMN pueden mejorar la generación eficiente de librerías de productos naturales de alta calidad y la temprana caracterización de los compuestos (Koehn, 2008).

## **2.6 Actividad antimicrobiana de extractos antraquinónicos.**

Los agentes antimicrobianos son sustancias capaces de eliminar o inhibir el desarrollo de microorganismos (Ogundare y Onifade, 2009). Aligiannis *et al.* (2001), propusieron una clasificación para los extractos de plantas basados en los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el control de los microorganismos. Valores de CMI hasta  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  representaron inhibidores fuertes del crecimiento, los inhibidores moderados presentaron valores de CMI entre  $600$  y  $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y los inhibidores débiles por encima de  $1600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Según Carmeli *et al.* (1999) valores de CMI por debajo de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  deben aceptarse como extractos con fuerte potencial antifúngico y según Ríos y Recio (2005), la presencia de actividad a concentraciones por debajo de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  son extractos con gran interés farmacológico.

Los extractos antraquinónicos o antraquinonas aislados de plantas presentan múltiples actividades biológicas entre ellas actividad antimicrobiana (Kuethe *et al.*, 2007), antioxidante (Galindo *et al.*, 2008) y anticancerígeno (Kamiya *et al.*, 2010). Sin embargo, el mayor número de trabajos abarcan las actividades antimicrobianas sobre patógenos que afectan al hombre y a las plantas.

### **2.6.1 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan al hombre.**

Aunque existen múltiples estudios en la literatura acerca de la actividad antimicrobiana de antraquinonas o extractos obtenidos de plantas, sólo aparece un informe de actividad antimicrobiana de antraquinonas de raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. (Park, 1977). El autor obtuvo actividad antibacteriana de las antraquinonas damnacantal, nordamnacantal, 2-formil-3-hidroxi-antraquinona y lucidina frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium smegmatis* con valores de CMI entre  $12.5$  y  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

En un estudio con extractos antraquinónicos de *Vismia laurentii*, Kuete *et al.* (2007) informaron valores de CMI de 78.12 y 2.44  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  sobre las cepas de *Candida albicans* y *Candida glabrata* para los extractos crudos y compuestos puros, respectivamente. De igual forma Mishra *et al.* (2010) encontraron alta actividad antifúngica en antraquinonas aisladas de las semillas de *Aegle marmelos* Correa sobre *C. albicans* con un valor de CMI de 31.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Agarwal *et al.* (2000) informaron actividad antifúngica del extracto metanólico de las raíces de *Rheum emodi* frente a *C. albicans* con valores de CMI de 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Sin embargo, las antraquinonas presentes en el extracto: reina, fisiona, aloe-emodina y crisofanol mostraron valores de CMI de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Las antraquinonas nordamnacantal y damnacantal aisladas a partir de la planta *M. elliptica* mostraron una fuerte actividad antifúngica sobre los hongos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Candida lipolytica* con valores entre 10 y 20  $\mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$ , mientras que la morindona solo fue efectiva sobre *C. lipolytica* con valores de 20  $\mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$  (Ali *et al.*, 2000). El nordamnacantal y el damnacantal aislados de *Prismatomeris fragrans* fueron activos sobre un aislado de *C. albicans* a concentraciones de 6 y 22.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente (Kanokmedhakul *et al.*, 2005). Xiang *et al.* (2008) evaluaron la actividad antimicrobiana de seis antraquinonas aisladas de raíces de *M. angustifolia* mediante el método de difusión en agar y el compuesto 1,8-dihidroxi-2-metil-3,7-dimetoxiantraquinona mostró mayor actividad antifúngica sobre *C. albicans* y *Saccharomyces sake*.

El análisis fitoquímico de raíces, tallos y hojas de *Bersama engleriana* (*Melanthaceae*) reveló la presencia de flavonoides, fenoles, triterpenos y antraquinonas (Kuete *et al.*, 2008). Los extractos fueron activos sobre nueve cepas de bacterias Gram-negativas, cinco Gram-positivas, dos cepas de hongos y *Mycobacterium tuberculosis*. Los menores valores de CMI fueron de 9.76  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para bacterias y hongos y 39.06  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para *Mycobacterium*. Dos antraquinonas aisladas de *R. cordifolia* mostraron alta actividad sobre las bacterias Gram-positivas *B. subtilis*, *Streptococcus faecalis* y *Bacillus cereus* a 20  $\mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$  (Li *et al.*, 2009). Ogundare y Onifade (2009) informaron la presencia de saponinas, taninos, antraquinonas y alcaloides en el extracto metanólico de hojas de *Morinda lucida* el cuál inhibió el crecimiento de *E. coli*. Extractos antraquinónicos diclorometánicos y hexánicos de raíces y tallos de *P. fragrans* mostraron fuerte actividad antituberculosis con valores de CMI en el rango de 25–100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Kanokmedhakul *et al.*, 2005).

### 2.6.2 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan a las plantas.

En la literatura existen pocas referencias de uso de las antraquinonas con actividad sobre hongos y bacterias que afecten las plantas. Se conoce que algunas antraquinonas como la emodina, fisiona y crisofanol tienen actividad antifúngica (Izhaki, 2002, Kim *et al.*, 2004; Godard *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). La producción de antraquinonas en suspensiones celulares de *Cinchona* se induce por la adición de elicitores fúngicos tales como homogenados de *P. cinnamomi* (Ramos-Valdivia *et al.*, 1997b; Han *et al.*, 2002a).

Las antraquinonas 1,8 dihidroxiantraquinona y la emodina mostraron actividad fungicida sobre *Colletotrichum fragariae* mientras que las antraquinonas 1,4 dihidroxiantraquinona y la alizarina no presentaron actividad evaluada por el método de bioautografía sobre placas de TLC (Meazza *et al.*, 2003). La evaluación de la actividad antifúngica *in vivo* de diferentes extractos aislados de las semillas de *Cassia tora* L. evidenció que la fracción clorofórmica presentó la mayor actividad frente a *Botrytis cinerea*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani* (Kim *et al.*, 2004). A partir de esta fracción se aislaron las antraquinonas emodina, fisiona y reina. Las plantas se asperjaron con las antraquinonas a diferentes concentraciones un día antes de la inoculación con los hongos. Las antraquinonas mostraron fuerte actividad sobre *B. cinerea*, *P. infestans* y *R. solani*.

Diferentes antraquinonas sintéticas se evaluaron sobre el crecimiento del hongo *B. cinerea* (Mendoza *et al.*, 2005). Los autores informan dosis letal media entre 35.5 y 70.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Sin embargo, el crecimiento micelial no se inhibió completamente lo que pudo estar dado por la capacidad de *B. cinerea* de biotransformar los compuestos a menos activo. La vía principal de reacción involucra la hidroxilación de varias posiciones, así como la condensación de metabolitos secundarios del hongo (Bustillo *et al.*, 2003).

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Aloe vera* se ensayó sobre el crecimiento micelial de *Botrytis gladiolorum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, *Heterosporium pruneti* y *Penicillium gladioli* (Rosca-Casian *et al.*, 2007). La concentración mínima fungicida varió entre 80 y 100  $\mu\text{l}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El ingrediente activo mayoritario del extracto fue la antraquinona aloina.

Godard *et al.* (2009), evaluaron la actividad de extractos antraquinónicos de raíces de *Rheum palmatum* y de *Frangula alnus* sobre *Plasmopara viticola*, agente casual de una de las enfermedades

más destructivas del vino. La movilidad de las zoosporas de *P. viticola* se redujo 10 veces y 20 veces utilizando el extracto de *F. alnus* y *R. palmatum* respectivamente, sin embargo, la antraquinona emodina y las fracciones fueron menos fungitóxicos. Seis antraquinonas puras aisladas de *Trichoderma harzianum* mostraron acción inhibitoria sobre el crecimiento de los hongos *R. solani* y *B.cinerea*. Los autores plantean que existe una relación directa entre la actividad antifúngica y el grado de oxidación del compuesto (Liu *et al.*, 2009).

La formulación líquida de *Rheum officinale* que se utiliza para el control del mildio polvoriento causado por el hongo *Pseudoperonospora cubensis* en el pepino es un extracto etanólico de las raíces de esta planta que contiene las antraquinonas fisiona, emodina, reina, crisofanol y aloe-emodina (Yang *et al.*, 2009).

El extracto metabólico de hojas de *Reynoutria sachalinensi* (F. Schmidt) Nakai el cual contiene la antraquinona fisiona como uno de sus ingredientes activos se comercializa como Milsana<sup>®</sup> y fue registrado como un protector de plantas en Alemania (Ma *et al.*, 2010). En diferentes cultivos el producto tuvo resultados satisfactorios en tratamientos preventivos sobre el mildio polvoriento (Wurms *et al.*, 1999; Konstandinidou-Doltsinis *et al.*, 2007).

El modo de acción de las antraquinonas frente a patógenos que afectan a las plantas o al hombre se ha investigado por varios autores. Stern *et al.* (1996) informaron que las xantonas y las antraquinonas forman un complejo irreversible con aminoácidos nucleofílicos en las proteínas, lo que a menudo conduce a la inactivación de las proteínas y la pérdida de sus funciones. Los efectos farmacológicos de las antraquinonas están relacionados con su capacidad para modular las propiedades físicas de las membranas (Alves *et al.*, 2004). Pandey y Mishra (2010) informaron que las antraquinonas inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas al bloquear el ribosoma A por lo que las bacterias no pueden crecer en el medio que contiene el extracto activo.

Existen varios estudios los cuales investigan el modo de acción de Milsana<sup>®</sup>. Según Wurms *et al.* (1999) la aplicación de Milsana<sup>®</sup> en plantas de pepino reduce significativamente la incidencia del mildio polvoriento por inducción de resistencia localizada y por el colapso de la mayoría de los haustorios después del tratamiento. Sin embargo, en previos experimentos, fisiona redujo la longitud del haustorio primario y el número de haustorios secundarios sin el colapso de las mismas (Yang *et*

*al.*, 2008). Las reacciones de hipersensibilidad no han sido encontrado en plantas tratadas con fisona sola o como producto comercial Milsana<sup>®</sup> (Kowalewski *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2008). Los experimentos de inducción demostraron que fisona fue efectiva sobre mildio polvoriento de cebada por una respuesta defensiva inducida local (Ma *et al.*, 2010).

La resistencia inducida por patógenos está relacionada en la mayoría de los casos con incrementos de actividad de las enzimas incluyendo  $\beta$ -1.3-glucanasa, quitinasa, fenilalanina-amonio-liasas, lipoxigenasa y catalasa (Lebeda *et al.*, 2001). Milsana<sup>®</sup> induce resistencia de las plantas debido a los incrementos en los niveles de clorofilas y actividad de la enzima  $\beta$ -1.3-glucanasa y etileno así como la acumulación de peróxido de hidrógeno en la papila (Schmitt, 2006) y al aumento del contenido de fenoles (Daayf *et al.*, 1997). Aunque la actividad de Milsana<sup>®</sup> está relacionada principalmente con fisona, la emodina puede generar especies reactivas del oxígeno en presencia de luz solar. Es por esto que el estrés oxidativo dependiente de emodina puede inducir resistencia adquirida sistémica (Dayan *et al.*, 2009). La antraquinona fisona cambia la expresión de genes relacionados con la defensa y especialmente la expresión del gen específico para la tiorina (péptidos ricos en cisteínas con propiedades antimicrobianas) (Ma *et al.*, 2010).

En resumen, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales constituyen una poderosa herramienta que puede ser aplicada con éxito para la producción de antraquinonas, con importantes actividades biológicas. Hasta la fecha no existen trabajos relacionados con el cultivo *in vitro* de *M. royoc* L. para obtener metabolitos secundarios. Sería de gran interés lograr la producción de antraquinonas a partir del cultivo *in vitro*, así como incrementar su contenido mediante el manejo adecuado de algunas condiciones de cultivo y demostrar la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.0 Procedimientos generales.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica y en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos del Centro de Bioplasmas, Ciego de Ávila, Cuba; así como en el Laboratorio de Genómica Funcional de Plantas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de la Habana, Cuba, en el Departamento de Química Orgánica, Instituto de Química Avanzada de Cataluña, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, España, y en el Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Los experimentos se llevaron a cabo durante los meses Septiembre/2004 a Diciembre/2009.

El instrumental quirúrgico que se utilizó se esterilizó en estufa (MLW-WSU200) a 180 °C durante 150 min. Las operaciones de inoculación y transferencia de los explantes en los medios de cultivo se realizaron en flujo laminar horizontal ICEM-A7 (RETOMED®). La asepsia del instrumental se alcanzó con inmersiones en etanol 90% (v/v) y flameo con mechero de gas licuado. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.8 antes de la esterilización por vapor en autoclave a 121°C y 1.2 kg·cm<sup>-2</sup>. En el caso de los medios sólidos, el pH se ajustó previo a la adición de *gelrite* (DUCHEFA) (2.5 g·L<sup>-1</sup>).

#### **Material vegetal y condiciones de cultivo para el establecimiento del cultivo *in vitro* de raíces:**

Como material vegetal se utilizaron raíces de plantas germinadas *in vitro* procedentes de semillas a partir de frutos maduros de *M. royoc* L. Los frutos se colectaron a partir de plantas de *M. royoc* L. en condiciones de ambiente natural en la costa norte de la provincia de Ciego de Avila. Las plantas fueron autenticadas por el Ing. Julian Acuña y depositadas en el Jardín Botánico de la Universidad de Camaguey con el número de *voucher* 10462.

Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio, 2% (v:v) durante 10 minutos y se enjuaron con abundante agua destilada estéril. Para su germinación, las mismas se colocaron en tubos de ensayo (140 x 22 mm) que contenían 10 mL de medio semi-sólido constituido por las sales del medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementadas con sacarosa (30 g·L<sup>-1</sup>), mio-inositol

( $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), tiamina-HCL ( $0.001 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y *gelrite* ( $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (DUCHEFA) durante 30 días. Las plantas obtenidas de la germinación de las semillas se subcultivaron cada 30 días en frascos de cultivo que contenían 25 mL del mismo medio de germinación, enriquecido con AIA (SIGMA) ( $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Trujillo *et al.*, 2005). Los frascos de cultivo consistieron en pomos de vidrio de 250 mL de capacidad con tapa plásticas y metálicas de cierre *twig-soft*. Las raíces de siete plantas provenientes del cuarto subcultivo se transfirieron a frascos de cultivo que contenían 25 mL de medio de cultivo líquido de igual composición a la descrita anteriormente durante 30 días. Este cultivo estático de raíces aisladas constituye el material inicial para los experimentos de cultivo *in vitro* de raíces en zaranda orbital (RETOMED®).

Las plantas *in vitro* y el cultivo estático de raíces aisladas crecieron bajo lámparas blancas fluorescentes (Sylvania, F40T12/D 40 W) que proporcionaron un flujo de fotones fotosintéticos de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . El fotoperíodo correspondió a 16 horas luz y ocho horas de oscuridad.

Los solventes que se emplearon en las extracciones, así como en la separación y caracterización estructural, fueron de grado analítico HPLC (Merck, Alemania). El agua destilada que se utilizó como fase móvil para el análisis en HPLC-DAD fue del tipo Milli Q (Millipore®).

### **Variables cuantificadas.**

Las raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro* en zaranda orbital se colocaron durante 1 min en papel de filtro para eliminar el exceso de medio de cultivo. La masa fresca se determinó mediante pesada directa en balanza analítica (SARTORIUS<sup>R</sup> TE64). Se cuantificó la variable masa fresca de raíces final y se calculó el incremento de este indicador como la diferencia resultante de restar la masa fresca de las raíces en el momento de la evaluación menos la masa fresca del inicio del experimento.

La concentración de antraquinonas se determinó a extractos que se obtuvieron de las raíces *in vitro* y en algunos experimentos se detectó la excreción de este metabolito al medio de cultivo.

### **Concentración de antraquinonas en las raíces.**

Para realizar la extracción de antraquinonas se siguió el protocolo establecido por Han *et al.* (2002b). Un gramo de raíces se maceró en nitrógeno líquido y se adicionaron 2 mL de etanol al 80%

a 60°C. Los extractos se centrifugaron a 3030 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se enrazó a 10 mL con etanol al 80%. Luego se realizó la lectura de la absorbancia a 430 nm en un espectrofotómetro Cary 1 Bio UV-Vis y se calculó la concentración de antraquinonas. Para ello se utilizó el coeficiente de extinción molar de 5.5 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> referente a la alizarina, de acuerdo al protocolo descrito por Schulte *et al.* (1984). Las antraquinonas se expresaron en miligramos por gramo de masa fresca (mg·g<sup>-1</sup> MF). El mejor tratamiento de cada experimento desde el punto de vista del contenido de antraquinonas por unidad de masa fresca (mg·g<sup>-1</sup> MF) se tomó como premisa del siguiente.

#### ***Concentración de antraquinonas en el medio de cultivo.***

La determinación de antraquinonas en el medio de cultivo se realizó según lo descrito por Chong *et al.* (2005b). El volumen de medio de cultivo líquido se concentró en un Rotadex (Heidolph 94 200) hasta un volumen final de 5 mL a temperatura controlada de 60°C y se acidificó con 1 mL de ácido sulfúrico (2 mol·L<sup>-1</sup>) seguido por la adición de 2 mL de cloroformo. La mezcla se homogeneizó en un *vortex* (Snijders) durante un minuto y se dejó en reposo por 90 minutos en un cuarto de temperatura a 23°C. La fase que contenía cloroformo se recuperó y a la fase acuosa se le hicieron tres extracciones repetidas con este mismo solvente. Todas las fases clorofórmicas se concentraron a 60°C en un rotoevaporador (Rotadex, Heidolph 94200) y el residuo se re-disolvió en 5 mL de etanol al 80%. Luego se realizó la lectura de la absorbancia a 430 nm en un espectrofotómetro Cary 1 Bio UV-Vis. La concentración de antraquinonas se calculó y se expresó como se describió anteriormente. La concentración de antraquinonas totales (por unidad de masa fresca) resultó de la suma de las antraquinonas en las raíces y las antraquinonas excretadas al medio de cultivo y se expresó en miligramos por gramo de masa fresca (mg·g<sup>-1</sup> MF).

#### **Análisis estadístico.**

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó con el utilitario *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) (versión 12 para *Windows*, SPSS Inc.). Se realizaron pruebas paramétricas (prueba t de datos independientes (t-test), ANOVA de un factor, ANOVA bifactorial; p= 0.05). Se aplicaron pruebas de Tukey HSD en los casos en los cuales los ANOVA presentaron diferencias

significativas. Previamente se demostró que los datos de cada tratamiento cumplían los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, según las pruebas Kolmogorov-Smirnov (5%) y Levene (5%), respectivamente. En algunos casos fue necesaria la transformación de datos para lograr el cumplimiento de los supuestos. Los detalles del tratamiento estadístico aparecen en cada figura o tabla de resultados y discusión.

### **3.1 Establecimiento del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. para la obtención de antraquinonas.**

#### **3.1.1 Efecto de las condiciones de luz y oscuridad.**

Este experimento se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la luz y la oscuridad en el crecimiento vegetal, así como en la concentración de antraquinonas en las raíces y en el medio de cultivo. Un gramo de raíces aisladas se colocaron en Erlenmeyers (250 mL, POBEL<sup>®</sup>) que contenían 30 mL de medio de cultivo líquido compuesto por sales MS suplementado con sacarosa (30 g·L<sup>-1</sup>), mio-inositol (0.1 g·L<sup>-1</sup>), tiamina-HCL (0.001 g·L<sup>-1</sup>) y AIA (5.7 μmol·L<sup>-1</sup>) según las mejores condiciones propuestas por Trujillo *et al.* (2005) para la propagación *in vitro* de *M. royoc* L. El cultivo se desarrolló en una zaranda orbital a 120 rpm a una temperatura de incubación de 25 ± 2°C. Para lograr la oscuridad, los Erlenmeyers se cubrieron con polietileno negro. Se procesaron tres Erlenmeyers en cada tratamiento, considerado cada uno como una réplica. Se realizaron tres determinaciones por réplica. A los 15 días se evaluó el incremento de la masa fresca y la concentración de antraquinonas.

#### **3.1.2 Efecto de la concentración de ácido indolacético.**

Las condiciones experimentales fueron las mismas que se describieron en el Epígrafe anterior. En este experimento se evaluó la influencia de diferentes concentraciones de AIA (0, 5.7, 11.4, 17.1, 22.8 μmol·L<sup>-1</sup>) en el crecimiento vegetal y la concentración de antraquinonas en las raíces y en el medio de cultivo. Los cultivos se colocaron en zaranda orbital en la oscuridad a 25 ± 2°C. A los 15 días se evaluó el incremento de la masa fresca y la concentración de antraquinonas. Las concentraciones de AIA se definieron teniendo en cuenta la mejor hormona y su concentración, previamente informada por Trujillo *et al.* (2005) para el enraizamiento de plantas *in vitro* de

*M. royoc* L. Se procesaron tres Erlenmeyers en cada tratamiento, considerado cada uno como una réplica. Se realizaron tres determinaciones por réplica.

### **3.1.3 Efecto del tipo de auxina.**

Este experimento se efectuó con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de otras auxinas (ANA y AIB) a un medio de cultivo con AIA en el crecimiento vegetal y en la concentración de antraquinonas en las raíces y en el medio cultivo. Un gramo de raíces aisladas se colocaron en Erlenmeyers (250 mL, POBEL<sup>®</sup>) que contenían 30 mL de medio de cultivo líquido constituido de acuerdo al mejor resultado del experimento anterior (Epígrafe 3.1.2). Al medio se le adicionó  $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA o  $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB. En experimentos previos (resultados no mostrados) se demostró que el uso de ANA y AIB de manera independiente no influyeron en la concentración de antraquinonas en las raíces. Los cultivos se colocaron en zaranda orbital en la oscuridad a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Se procesaron tres Erlenmeyers en cada tratamiento, considerado cada uno como una réplica. Se realizaron tres determinaciones por réplica. A los 15 días se evaluó el incremento de la masa fresca y la concentración de antraquinonas.

### **3.1.4 Efecto de la frecuencia de renovación del medio de cultivo.**

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar el efecto que tiene la renovación del medio de cultivo en el crecimiento vegetal y en la concentración de antraquinonas en las raíces y en el medio de cultivo. Un gramo de raíces aisladas se colocaron en Erlenmeyers (250 mL, POBEL<sup>®</sup>) que contenían 30 mL de medio de cultivo líquido constituido de acuerdo al mejor resultado del experimento anterior (Epígrafe 3.1.2). El cultivo se colocó en zaranda orbital en la oscuridad. El medio de cultivo (30 mL), con la misma composición, se cambió cada 15 días y los controles (sin renovación) permanecieron durante 15 y 75 días con el mismo medio de cultivo. Para evaluar el efecto de esta variable, las determinaciones de la masa fresca, la concentración de antraquinonas en las raíces y las excretadas al medio se realizaron 15 días después de la renovación del medio de cultivo. En total se realizaron cuatro cambios de medio de cultivo durante 75 días de cultivo. Se procesaron tres Erlenmeyers en cada tratamiento, considerado cada uno como una réplica. Se realizaron tres determinaciones por réplica.

### **3.1.5 Efecto del tiempo de cultivo de raíces.**

Este experimento se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto del tiempo de cultivo en el crecimiento de las raíces y la concentración de antraquinonas en las raíces y en el medio de cultivo. Un gramo de raíces aisladas se colocaron en Erlenmeyers (250 mL, POBEL<sup>®</sup>) que contenían 30 mL de medio de cultivo líquido constituido de acuerdo al mejor resultado del experimento del Epígrafe 3.1.2. El cultivo se colocó en zaranda orbital en la oscuridad. El incremento de la masa fresca y la concentración de antraquinonas en las raíces y en el medio de cultivo ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF) se determinaron cada 15 días durante los 75 días de cultivo. Se procesaron tres Erlenmeyers en cada tratamiento, considerado cada uno como una réplica. Se realizaron tres determinaciones por réplica.

### **3.1.6 Efecto de la concentración de sacarosa.**

Este experimento tuvo como objetivo determinar el efecto de la concentración de sacarosa en el crecimiento vegetal, la concentración de antraquinonas en las raíces y las excretadas al medio de cultivo. Un gramo de raíces se cultivaron en el medio basal MS como se describió en el Epígrafe 3.1.2. Las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo que se ensayaron fueron: 0, 10, 30, 50, 70 y 90  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . El cultivo se colocó en zaranda orbital en la oscuridad. Se determinó el incremento de la masa fresca y la concentración de antraquinonas ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF). Se procesaron tres Erlenmeyers en cada tratamiento, considerado cada uno como una réplica. Se realizaron tres determinaciones por réplica.

### **3.1.7 Efecto de los elicitores ácido jasmónico y extracto de levadura.**

Con el objetivo de estimular la concentración de antraquinonas por las raíces durante el cultivo *in vitro*, se evaluó el efecto de dos elicitores: el ácido jasmónico y el extracto de levadura. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se describieron en el Epígrafe 3.1.1. Un gramo de raíces aisladas se colocaron en Erlenmeyers (250 mL, POBEL<sup>®</sup>) que contenían 30 mL de medio de cultivo líquido constituido de acuerdo al mejor resultado del experimento del Epígrafe 3.1.6. A los 30 días de iniciado el cultivo se adicionaron los elicitores. Se empleó el ácido jasmónico Biojas<sup>®</sup> ( $450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) producido por el Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), La Habana, Cuba. El extracto de levadura (BioCen) se preparó a una

concentración de  $180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en agua destilada según Chong *et al.* (2005b). Las concentraciones de los elicitores que se ensayaron fueron: ácido jasmónico: 0, 25, 50 y  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Prakash y Srivastava, 2008) y extracto de levadura: 0, 1, 2 y  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Chong *et al.*, 2005b). Previo a la adición al medio de cultivo, las soluciones de elicitores se esterilizaron en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  durante 20 min. A los 15 días de la aplicación de los elicitores (45 días de cultivo) se determinó el incremento en la masa fresca y la concentración de antraquinonas en las raíces y en el medio de cultivo ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF). Se procesaron tres Erlenmeyers en cada tratamiento, considerado cada uno como una réplica. Se realizaron tres determinaciones por réplica.

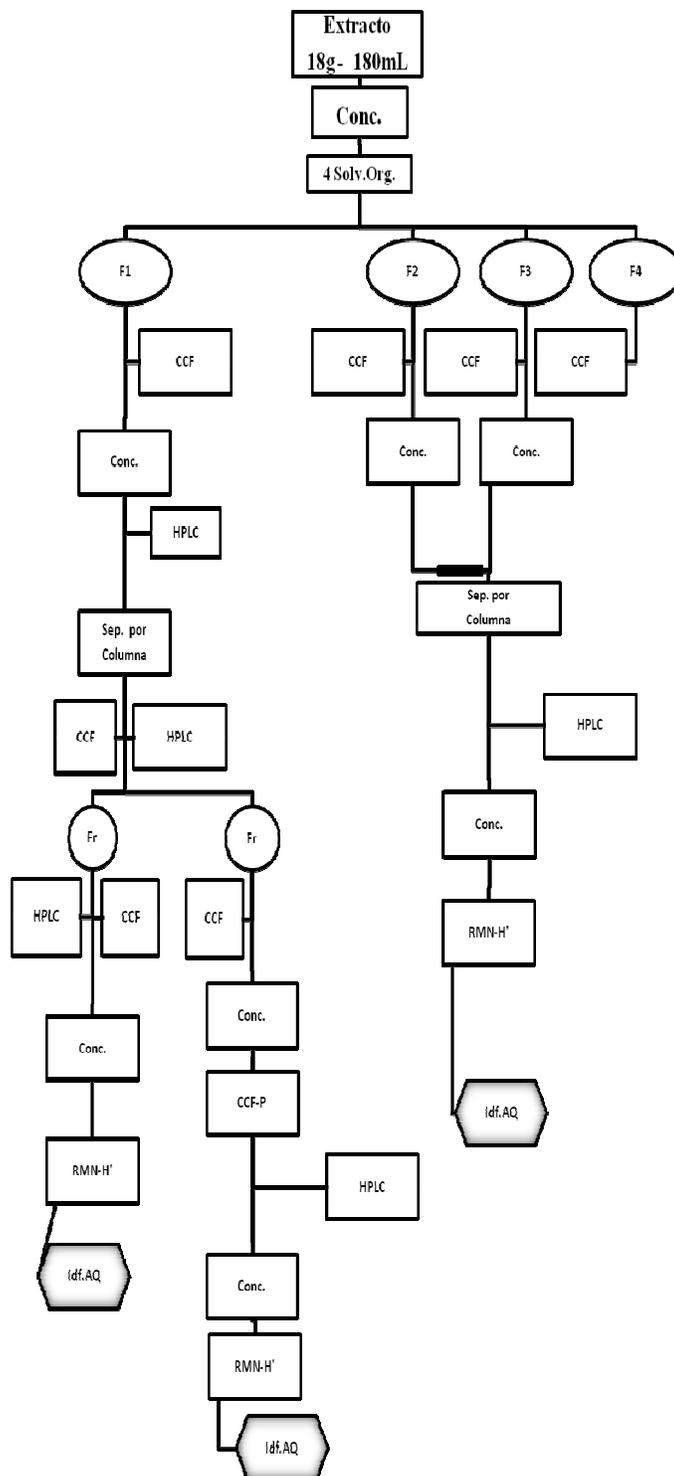
### **3.2 Identificación de las antraquinonas presentes en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L.**

#### **3.2.1 Aislamiento de las antraquinonas.**

Las principales antraquinonas presentes en raíces cultivadas *in vitro* de *M. royoc* L. se identificaron a partir de las mejores condiciones de cultivo que se obtuvieron como resultados de la experimentación en el Epígrafe 3.1. El procedimiento para la extracción, purificación e identificación de las antraquinonas se muestra en el Esquema 1. Los extractos se analizaron acorde al procedimiento descrito por Ismail *et al.* (1997) con algunas modificaciones que se describen a continuación.

#### ***Extracción de antraquinonas con solventes orgánicos.***

Para el aislamiento y purificación de las antraquinonas se utilizaron 18 g de masa fresca de raíces cultivadas *in vitro* y se extrajeron con diclorometano (180 mL) durante 72 horas en la oscuridad a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . El extracto se filtró con papel de filtro Whatman No.1 de 10 cm de diámetro, y se concentró a sequedad en un rotoevaporador (Rotadex, Heidolph 94200) a una temperatura controlada de  $60^\circ\text{C}$ . Al residuo se le realizaron cuatro extracciones sucesivas con 5 mL de metanol, diclorometano y dos mezclas que contienen, hexano: cloroformo: metanol (9:9:1) y agua: acetonitrilo (1:2) respectivamente. Se obtuvieron cuatro Filtrados que posteriormente se analizaron por cromatografía en capa fina para visualizar la presencia de los compuestos (Esquema 1).



**Esquema 1.** Procedimiento para la extracción, purificación e identificación de las antraquinonas presentes en el cultivo *in vitro* de raíces de plantas de *M. royoc* L. **CCF.** Cromatografía en placa fina; **Conc.:** Concentración por evaporación; **F:** Filtrados producto del fraccionamiento con solventes orgánicos; **Fr:** Fracciones recogidas después de la separación en columna de gel de sílice; **HPLC-DAD:** Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo; **Sep. por Columna:** Separación por columna de gel de sílice; **Solv. Org.:** Solventes orgánicos; **RMN-H<sup>1</sup>:** Resonancia Magnética Nuclear.

***Cromatografía en capa fina (CCF).***

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck) de 4 x 6 cm. Las placas se activaron previamente con ácido oxálico al 1% (m:v) disuelto en metanol. La aplicación de las muestras se realizó con capilares (75 mm / 75 µL diámetro externo 1.5-1.6 mm) sobre cada carril y a una distancia de 0.5 cm entre cada muestra y de los bordes.

Como fase móvil se utilizaron diferentes solventes orgánicos: diclorometano (100%), cloroformo (100%) y una mezcla cloroformo: metanol en las proporciones 99:1 ó 98:2 de acuerdo a la polaridad de las fracciones que se obtuvieron previamente. Las placas de gel de sílice se secaron en estufa a 60°C por 1 min y se visualizaron con una lámpara UV (Vilber Lourmat, modelo VL-4LC) a las longitudes de onda de 254 y 366 nm. El revelado se realizó con KOH (5%) (m:v). Una vez secas las placas, se realizó la determinación de los valores del factor de retención (Rf) el que se calculó como el cociente entre la distancia recorrida por el compuesto desde el origen y la distancia recorrida por el frente del disolvente.

Los Filtrados que se obtuvieron por la extracción sucesiva con solventes orgánicos se unieron según los valores de Rf de los compuestos presentes en cromatografía en capa fina y se concentraron hasta sequedad en un rotoevaporador (Rotadex, Heidolph 94200). Los residuos sólidos de tres de los Filtrados se aplicaron a columnas de gel de sílice. Un mg del residuo del primer Filtrado (F1) se disolvió en un mL de una mezcla agua: acetonitrilo (2:1.5) (v:v) y se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo (HPLC-DAD) la cual permitió visualizar previamente la presencia de los compuestos, los que se compararon con patrones informados en la literatura (Esquema 1).

***Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo (HPLC-DAD).***

La cromatografía se desarrolló con el empleo de un módulo de separación con sistema cuaternario de solventes *Alliance 2695*, con un detector UV-DAD de batería de diodos 996, ambos de *Waters*. La columna que se utilizó fue una *Tracer analítica® extrasil ODS-2*, de 5 µm (15 x 0.4), de fase reversa (C18).

La fase móvil contenía como solvente A: agua-ácido trifluoracético (0.1%) (v:v) y como solvente B: acetonitrilo-ácido trifluoracético (0.1%) (v:v). Se utilizó el siguiente sistema de gradiente: 0 min 90% A: 10% B; 15 min 60% A: 40% B; 40 min 35% A: 65% B; 45 min 90% A: 10% B; 50 min 90% A: 10% B. Los análisis se realizaron a una temperatura de 28°C. El espectro UV-VIS se monitoreó entre 200 y 500 nm. El cromatograma se muestra en la longitud de onda 254 nm. Para el análisis de los resultados se utilizó un software cromatográfico (*Shimadzu CLASS-VP™*).

Con el objetivo de identificar los compuestos en la muestra mediante la comparación del tiempo del retención y el espectro UV de los mismos con respecto a patrones de referencias en la literatura, se realizó la corrida de 10 patrones de antraquinonas en las condiciones cromatográficas anteriormente descritas. Todos los patrones se prepararon a una concentración de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y el volumen de inyección fue de 25  $\mu\text{L}$  de cada uno de ellos por separados. Los compuestos patrones que se utilizaron se seleccionaron sobre la base de su estructura, diferencia de polaridad y presencia frecuente en plantas de la familia *Rubiaceae* (Wijnsma y Verpoorte, 1986). Los mismos fueron: ácido antraflávic (2,6DHAQ) (Aldrich), alizarina (1,2DHAQ) (Sigma/Aldrich), aloe-emodina (Extrasynthese), antrarufina (1,5-DHAQ) (Aldrich), crisofanol (Extrasynthese), dantrona (1,8DHAQ) (Aldrich), emodina (Extrasynthese), fisciona (Extrasynthese), quinizarina (1,4DHAQ) (Sigma/Aldrich), reina (Extrasynthese).

### **3.2.2 Purificación de las antraquinonas por cromatografía en columna de gel de sílice y cromatografía preparativa en capa fina (CCF preparativa).**

La cromatografía en columna de gel de sílice y la CCF-preparativa se realizaron con el objetivo de separar las antraquinonas cuya identificación no fue posible por HPLC-DAD. Los compuestos separados mediante estas técnicas se utilizaron para la caracterización de las estructuras por Resonancia Magnética Nuclear (RMN-  $\text{H}^1$ ) (Esquema 1).

#### ***Cromatografía en columna de gel de sílice.***

Para la cromatografía se utilizó una columna (2 cm x 10 cm) empacada con gel de sílice 60. Previamente el gel de sílice 60 se activó con una solución de ácido oxálico (4%) en 25 mL de metanol (m:v) durante 30 min y se secó a 90°C en estufa (ZPA,HS 62 A). Para las corridas

cromatográficas siempre se aplicó una masa de 40 mg de residuo sólido producto de la rotoevaporación de los Filtrados. La columna se eluyó con mezclas de solventes de polaridad creciente (diclorometano→ cloroformo: metanol (99:1) (v:v)→ cloroformo: metanol (98:2) (v:v)→ cloroformo: metanol (95:5) (v:v)→ cloroformo: metanol (85:15) (v:v)→ metanol). La elución se desarrolló por gravedad. Se obtuvieron fracciones de 2 mL, las cuales se unieron según su perfil en cromatografía en capa fina y análisis de HPLC-DAD (Epígrafe 3.2.1).

Varias de las fracciones que se unieron presentaron la pureza necesaria para el análisis por RMN- $H^1$ . La presencia de un único compuesto mayoritario en estas fracciones se determinó por HPLC-DAD (Epígrafe 3.2.1). En todos los casos se aplicó 25  $\mu$ L de volumen de inyección de cada una de las fracciones. Los resultados de tiempo de retención y máximos de absorción (nm) se compararon con los que se obtuvieron para los patrones (Epígrafe 3.2.1). Estas fracciones se secaron con corriente de nitrógeno líquido durante 30 min a temperatura ambiente y se utilizaron para el análisis de la estructura del compuesto presente. A las fracciones con compuestos de interés que no se separaron por cromatografía de columna de gel de sílice se les realizó una cromatografía preparativa en capa fina para su separación (Esquema 1).

#### ***Cromatografía preparativa en capa fina (CCF preparativa).***

Para la cromatografía preparativa en capa fina se utilizaron placas de gel de sílice 60 (Merck) de 20 cm x 20 cm y 0.25 mm de espesor. Se utilizó 5 mg (en 250  $\mu$ L cloroformo: metanol 98:2 (v:v)) de una de las fracciones procedentes de la purificación por columna de gel de sílice. La placa se corrió dos veces sucesivas con cloroformo: metanol (98:2). Las bandas se visualizaron mediante la iluminación con lámpara UV a 254 nm. Las mismas se cortaron y se extrajeron del gel de sílice con una mezcla cloroformo: metanol (4:1) durante 20 min. La solución se filtró y los compuestos presentes en la mezcla se secaron con corriente de nitrógeno líquido durante 30 min a temperatura ambiente y se utilizaron para el análisis de la estructura del compuesto presente.

#### **3.2.3 Caracterización estructural de las antraquinonas por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- $H^1$ ).**

El espectro de RMN- $H^1$  se obtuvo con el objetivo de determinar la estructura de los compuestos puros aislados a partir de raíces cultivadas *in vitro* de *M. royoc* L. (Esquema 1). Las fracciones puras

se resuspendieron en 300  $\mu\text{L}$  de cloroformo o piridina-cloroformo en dependencia de la solubilidad de los compuestos a analizar.

Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  se registraron en un equipo Varian Unity 500. Se utilizaron tubos de volumen reducido CMS-005TB, Shigemi, Inc. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) así como los anchos de banda ( $w_{1/2}$ ) están informados en Hertz. Como referencia interna se utilizó la señal residual en el disolvente deuterado que se empleó (cloroformo o piridina-cloroformo) de 7.26 ppm para el cloroformo y 8.57 (primera señal) para la piridina. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se informan en partes por millón (ppm).

### **3.3 Actividad antimicrobiana de extractos antraquinónicos de raíces de *M. royoc* L.**

Los experimentos correspondientes a este Epígrafe se realizaron con el objetivo de demostrar la actividad antimicrobiana de los extractos antraquinónicos (diclorometánicos) que se obtienen a partir de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron: (1) extractos antraquinónicos a partir de raíces cultivadas *in vitro*, (2) extractos antraquinónicos de raíces de plantas en ambiente natural, y (3) antraquinonas purificadas a partir de raíces cultivadas *in vitro* (sólo para evaluar la actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan al hombre).

La colecta de raíces de plantas en ambiente natural se realizó en la costa norte de la provincia de Ciego de Ávila, Cuba (Epígrafe 3.0). Se seleccionaron diez plantas al azar, y se separaron las raíces primarias. Las raíces se lavaron con abundante agua corriente, se secaron en papel de filtro durante 1 minuto, y se utilizaron para la extracción.

Para preparar los extractos antraquinónicos de las raíces se utilizó el procedimiento descrito en el Epígrafe 3.2.1. Los extractos secos se colocaron en frascos ámbar y se mantuvieron en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ) hasta su uso.

#### **3.3.1 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan al hombre.**

La actividad antifúngica y antibacteriana se evaluó por el método de microdilución en placa descrito por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (Wayne, 2002a; 2002b).

Los extractos crudos de raíces se prepararon a una concentración de  $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y las antraquinonas puras a una concentración de  $60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se utilizaron como solventes el medio de cultivo RPMI-

1640 (Moore *et al.*, 1967) (Sigma/Aldrich) y Agar Müeller Hinton (*BDC*) para levaduras y bacterias, respectivamente. Para lograr la disolución de las antraquinonas en los medios descritos se añadió previamente 50  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO).

Todas las cepas, tanto de levaduras como de bacterias, las proporcionó el Centro Regional para enfermedades infecciosas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México. Se utilizaron siete aislados clínicos de las levaduras: *Candida albicans* No. 501, *Candida albicans* No. 53, *Candida albicans* No. 498, *Candida tropicalis* No. 166, *Candida glabrata* No. 84, *Candida krusei* No. 168, y *Candida parapsilosis* No. 96. Además se utilizaron siete cepas de bacterias: *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Enterococcus faecales*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

Para la preparación de los inóculos se obtuvieron cultivos frescos de cada cepa en medio sólido Agar Müeller Hinton (*BDC*) para bacterias y medio sólido Agar Sabouroud dextrosa (*BDC*) para levaduras. Se tomó una colonia aislada de cada cultivo de bacterias y levaduras conservado en placas en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y se sembraron por agotamiento por estrías en placas de Petri con 20 mL de medio de cultivo sólido. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h en una incubadora (*SHEL LAB*).

Para el ensayo se preparó una suspensión de cada una de las cepas de levadura al 0.5 de la escala de McFarland ( $1 \text{ a } 5 \times 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (UFC: Unidades Formadoras de Colonia) y se realizaron diluciones 1:100 y 1:20 en medio RPMI-1640 ( $5 \text{ a } 25 \times 10^{-2} \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Para las bacterias se preparó una suspensión de cada cepa al 0.5 de la escala de McFarland ( $1 \times 10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se realizó una dilución 1:50 con medio líquido Müeller Hinton ( $2 \times 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Para la realización del ensayo de microdilución se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos. Se evaluó la actividad de los extractos y las antraquinonas purificadas, para ello, en cada uno de los pocillos se colocaron inicialmente 100  $\mu\text{L}$  del medio RPMI-1640 (para levaduras) y Müeller Hinton (para bacterias). Posteriormente en el primer pocillo de cada compuesto se añadieron 100  $\mu\text{L}$  y a partir de éste se realizaron diluciones seriadas para evaluar concentraciones desde 1000 a  $0.975 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para los extractos crudos y de 15 a  $0.975 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para las antraquinonas. Por último

se agregó 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de las cepas de levaduras y bacterias que se obtuvieron previamente. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

En todos los ensayos se colocaron los siguientes controles: **1)** control de esterilidad de medio (300  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo), **2)** control de crecimiento de cada cepa (200  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y 100  $\mu\text{L}$  de la cepa), **3)** control de solvente (DMSO) (200  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla DMSO y medio de cultivo en relación 1:20), y **4)** controles positivos de antibióticos conocidos. Para el ensayo de la actividad antifúngica se utilizó como control positivo el Fluconazol (Pfizer,  $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y para el ensayo de la actividad antibacteriana se utilizó la Cefalotina (Keflin Lilly, solución inyectable, 1 g). Las concentraciones de los controles positivos fueron de 250 a  $0.244\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las actividades antimicrobianas (antibacterianas y antifúngica) se definió como la concentración más baja de extracto que es capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo. La evaluación se realizó de forma visual mediante la comparación de la turbidez del medio en cada pocillo con los controles que se utilizaron. Cada tratamiento se replicó tres veces.

### **3.3.2 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan a las plantas.**

Estos experimentos se realizaron con el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana de los extractos antraquinónicos mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos que se evaluaron. Cada experimento se desarrolló en placas de ELISA de 96 pocillos. Los extractos crudos de raíces se prepararon a una concentración de  $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se utilizó como solvente para hongos el medio de cultivo caldo papa dextrosa (CPD) (Difco, MD, USA), y para bacterias el medio de cultivo LB (Bertani, 1951). Previamente se añadió 50  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO). Los patógenos se aislaron y clasificaron en el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Ciudad de la Habana, Cuba. Los patógenos son: *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) ( $2 \times 10^6$  conidios $\cdot\text{mL}^{-1}$ ), *Phytophthora parasitica* (Breda de Haan) ( $3 \times 10^4$  esporangio $\cdot\text{mL}^{-1}$ ), *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) ( $2500$  esporangio $\cdot\text{mL}^{-1}$ ), *Rhizoctonia solani* (suspensión de micelio), *Verticillium dahliae* ( $2 \times 10^4$  esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$ ), *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*

(40000 esporas·mL<sup>-1</sup>), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (6 x 10<sup>3</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>) y *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli* (6 x 10<sup>3</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>).

En cada pocillo de la placa se colocaron 100 µL del medio de cultivo. Luego, se añadió 100 µL de la solución del extracto y a partir de éste se realizaron diluciones seriadas desde 1000 a 15.63 µg·mL<sup>-1</sup> de los extractos crudos. Por último, se agregó 100 µL de la suspensión con la concentración señalada de los diferentes patógenos que se evaluaron. Las placas de ELISA se incubaron a 28°C (hongos y omicetes) y 37°C (bacterias) durante 48 horas. En todos los ensayos se colocaron los siguientes controles **1)** control de esterilidad de medio (300 µL de medio de cultivo), **2)** control de crecimiento de cada patógeno (200 µL de medio de cultivo y 100 µL de la suspensión del patógeno), **3)** control de solvente (DMSO) (200 µL de medio de cultivo y 100 µL de una mezcla DMSO y medio de cultivo en relación 1:20) y **4)** control de color del extracto (200 µL de medio de cultivo y 100 µL del extracto antraquinónico en todas las concentraciones).

La cuantificación del crecimiento del patógeno se determinó por análisis de espectrofotometría mediante la lectura de la densidad óptica a 595 nm (DO<sub>595 nm</sub>) en un lector de placas de ELISA (Broekaert *et al.*, 1990). Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) según lo informado anteriormente (Terras *et al.*, 1992), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PIC} = \frac{\text{DO}_{595 \text{ nm}} \text{ control} - \text{DO}_{595 \text{ nm}} \text{ tratamiento}}{\text{DO}_{595 \text{ nm}} \text{ control}}$$

En la fórmula la DO<sub>595 nm</sub> control corresponde al valor de la resta de la densidad óptica del control de crecimiento de cada patógeno menos la del control de esterilidad de medio. La DO<sub>595 nm</sub> tratamiento corresponde al valor de la resta de la densidad óptica de cada tratamiento menos la del control de color del extracto. Los datos se procesaron como ocho experimentos independientes correspondientes a cada patógeno con tres réplicas en cada caso.

### **3.3.2.1 Efecto de la acción protectora de extractos antraquinónicos en la fase de semillero en el cultivo del tabaco.**

Este experimento tuvo como objetivo determinar el efecto de los extractos antraquinónicos en la protección de las semillas de tabaco. El experimento se desarrolló en macetas (15 x 14 cm) en condiciones controladas de luz (60 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> de flujo de fotones fotosintéticos) y temperatura (25

$\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Se utilizó como sustrato turba + zeolita en una relación 5:1 y como material vegetal semillas de tabaco de la variedad "Sumatra". Previamente se realizó una caracterización del suelo mediante el método descrito por Alef, (1995). Se determinó que el sustrato estaba en condiciones de infección natural y presentaba los siguientes patógenos: *Phytophthora parasitica*, *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani* los cuales constituyen los principales causantes de las pérdidas en fase de semillero.

Los tratamientos que se evaluaron fueron: (1) semillas de tabaco sumergidas en extracto antraquinónico de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro* ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y (2) semillas de tabaco sumergidas en extracto antraquinónico de raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), y (3) semillas sumergidas en agua destilada estéril (control). El tratamiento a las semillas se realizó durante 5 min. En cada tratamiento se utilizaron 300 semillas y tres réplicas por tratamiento. Después de 15 días de la siembra de las semillas se realizó la evaluación del número de semillas germinadas. El porcentaje de germinación se calculó como el cociente entre el número de semillas germinadas y el número de semillas sembradas multiplicado por 100.

### **3.3.2.2 Efecto de la acción protectora de extractos antraquinónicos en plantas de tomate inoculadas con *Alternaria solani*.**

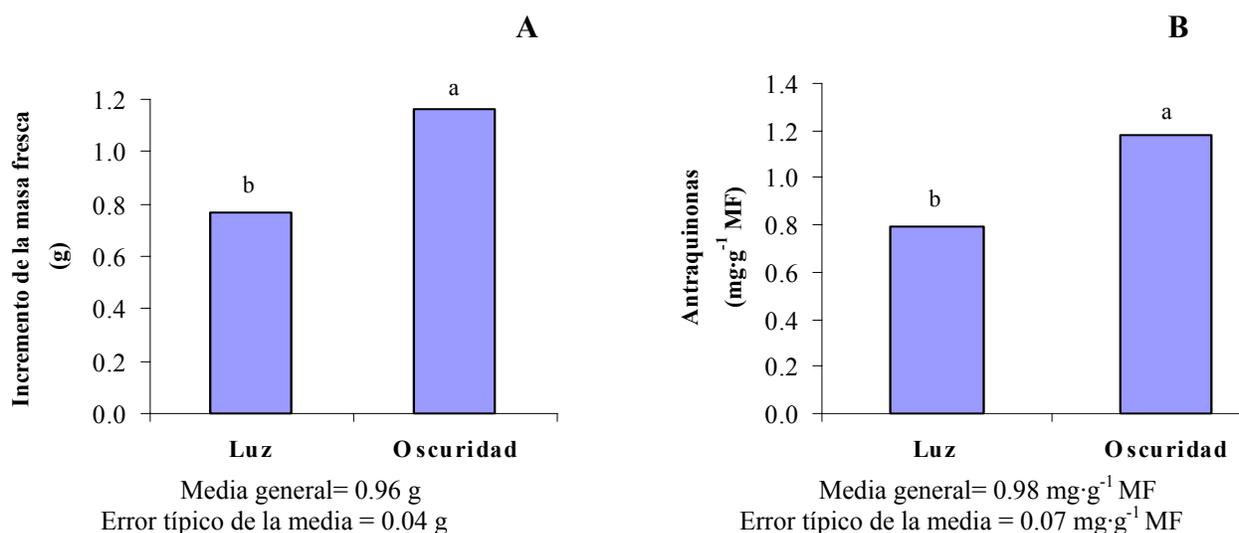
Se determinó el efecto de la acción protectora de los extractos antraquinónicos en plantas de tomate inoculadas con *A. solani*. El experimento se realizó en condiciones controladas descritas en el experimento anterior. Se utilizaron macetas de 15 x 14 cm, con sustrato estéril (turba + zeolita) (5:1). Se seleccionaron plantas de tomate de la variedad Campbell 28 de 10 a 15 cm de altura. Se realizaron cuatro tratamientos, cada uno constó de 50 plantas (cinco réplicas de 10 plantas cada una). Los tratamientos que se evaluaron fueron: (1) plantas asperjadas con extracto antraquinónico de raíces *in vitro* ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.5 % (m:v)), (2) plantas asperjadas con extracto antraquinónico de raíces de plantas en ambiente natural ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en SDS 0.5 % (m:v)), (3) plantas asperjadas con SDS (0.5 % (m:v)) (control), y (4) plantas asperjadas con agua destilada estéril (control). A los tres días después de la aplicación de los diferentes tratamientos, las plantas se asperjaron con una suspensión de  $10^3$  conidios $\cdot\text{mL}^{-1}$  de *A. solani*. La evaluación del experimento se realizó a los 10 días después de la inoculación del patógeno. Se determinó el porcentaje de plantas con síntomas de la enfermedad causada por *A. solani*.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1 Establecimiento del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. para la obtención de antraquinonas.

#### 4.1.1 Efecto de las condiciones de luz y oscuridad.

La Figura 3 muestra el efecto de la luz y la oscuridad en el incremento de la masa fresca (Figura 3A) y en la concentración de antraquinonas (Figura 3B) en el cultivo *in vitro* de raíces aisladas de *M. royoc* L. El cultivo en la oscuridad incrementó la masa fresca de las raíces de forma significativa, mientras que la concentración de antraquinonas en las raíces alcanzó valores de  $1.18 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF. No se detectaron antraquinonas excretadas al medio de cultivo.



**Figura 3.** Efecto de las condiciones de luz y oscuridad en el incremento de la masa fresca (A) y la concentración de antraquinonas en las raíces (B). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (Prueba-t-Student,  $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ ).

En el cultivo *in vitro*, la luz es un factor importante que afecta el crecimiento, la morfogénesis y la formación de productos de plantas tanto del metabolismo primario como del secundario. El efecto estimulador de la luz sobre el crecimiento y concentración de artemisinina se estudió en el cultivo de raíces aisladas de *Artemisia annua* L. La iluminación de 3000 Lux con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 oscuridad aumentó la masa seca y la concentración de este metabolito a  $13.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $244.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente (Liu *et al.*, 2002).

El contenido de antocianinas en el cultivo de raíces adventicias de *Raphanus sativus* L. también se estimuló por la presencia de la luz cuando el fotoperíodo fue de 14 horas (Betsui *et al.*, 2004). Similarmente, la luz provocó una mayor acumulación de ginsenoside en raíces transformadas de *P. ginseng* (Yu *et al.*, 2005).

En el cultivo de callos la luz es un factor que generalmente favorece la obtención de metabolitos secundarios. Por ejemplo, en cultivo de callos de *T. stans* L. la concentración de fenoles totales y en particular los flavonoides fue dos veces mayor en los callos que crecieron bajo iluminación (López-Laredo *et al.*, 2009). De igual forma, la luz provocó una mayor acumulación de isoflavona en callos de *P. corylifolia* (Shinde *et al.*, 2010).

Como se observa en la figura 4 las raíces de *M. royoc* L. cultivadas en condiciones de luz comenzaron el desarrollo de brotes lo cual pudiera justificar la menor masa fresca final de las raíces bajo estas condiciones. Los tejidos vegetales a la luz se diferencian a tejidos fotosintéticamente activos. En esta etapa inicial los brotes juveniles llevan a cabo este crecimiento a expensas de las reservas de carbohidratos que hay en las raíces por lo que en condiciones de luz hay menor incremento de la masa fresca de las raíces. Resultados diferentes encontraron Liu *et al.* (2002) quienes informaron que los cultivos de raíces transformadas de *Artemisia annua* cultivados en la oscuridad presentaron menor crecimiento que los cultivados a la luz, lo que evidencia que la respuesta de las raíces a este factor ambiental puede estar asociado al genotipo de las plantas.



**Figura 4.** Presencia de brotes en las raíces de *M. royoc* L. expuestas a la luz.

El efecto inhibitorio de la luz en la acumulación de metabolitos secundarios está bien documentado en el cultivo de callos y suspensiones celulares. Por ejemplo, en cultivos de suspensiones celulares de *M. elliptica* la oscuridad promovió el contenido de antraquinonas en el medio de cultivo en comparación con cultivos iluminados. El máximo rendimiento de antraquinonas bajo iluminación y oscuridad fue de 2.9 y 4.5 g·L<sup>-1</sup>, respectivamente (Abdullah *et al.*, 1998). La luz también inhibió la concentración de antraquinonas en cultivos de suspensiones celulares de *C. ledgeriana* (Harkes *et al.*, 1985) y *R. cordifolia* (Susuki *et al.*, 1985). Por otro lado, en el cultivo *in vitro* de plantas la oscuridad inhibió la producción de otros metabolitos como la solasodina (Argolo *et al.*, 2000), la fisalina (Azlan *et al.*, 2002) y hipericina (Bais *et al.*, 2002).

Al analizar las causas que pueden incidir en la estimulación de la acumulación de metabolitos en presencia de luz, algunos autores refieren que esto puede estar asociado a un aumento de la velocidad de asimilación de nutrientes y acumulación de carbohidratos por las raíces al incrementar el fotoperíodo (Liu *et al.*, 2002). Por ejemplo, en el cultivo de raíces a la luz de *C. roseus* se encontraron raíces mucho más finas con pigmentación verdosa en la región central que las expuestas a oscuridad. También en la luz, se detectó una asimilación mayor de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, P, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y azúcares por las raíces (Bhadra *et al.*, 1998). Otros autores refieren que los cultivos que crecen en ausencia de luz pueden estar estresados, y se puede activar la síntesis de metabolitos secundarios (Bais *et al.*, 2002).

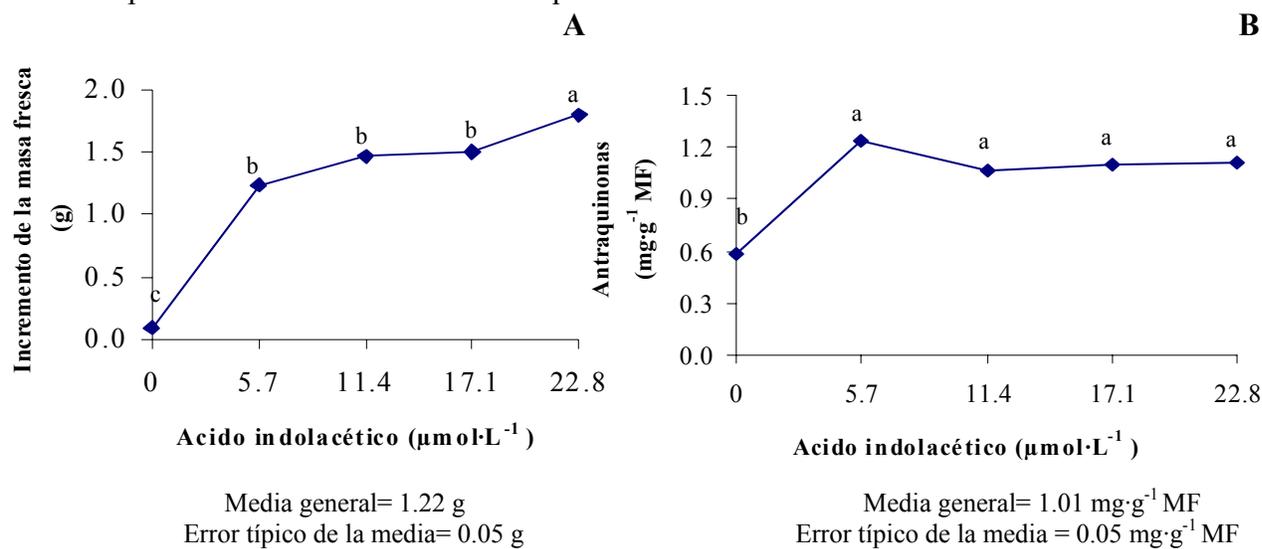
En el cultivo de raíces aisladas de *M. royoc* L., la luz tuvo un efecto inhibitorio tanto en la obtención de antraquinonas como en el crecimiento de las raíces. Esto pudiera estar asociado a una mayor concentración de AIA en las raíces como consecuencia de una menor pérdida de este compuesto por la oxidación a la luz. En el cultivo *in vitro* el AIA puede ser oxidado no enzimáticamente por la presencia de la luz (Taiz y Zeiger, 2002). También en la oscuridad se favorecen la desviación de productos del metabolismo primario que pueden participar como precursores en la síntesis de compuestos del metabolismo secundario.

Como se pudo demostrar en este experimento las condiciones de oscuridad favorecieron la obtención de antraquinonas (por unidad de masa fresca) en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L., por lo que los experimentos siguientes se realizaron en la oscuridad.

#### 4.1.2 Efecto de la concentración de ácido indolacético.

La concentración de AIA tuvo un marcado efecto en el incremento de la masa fresca de las raíces (Figura 5A). Nótese como a partir de  $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  este indicador aumentó y alcanzó el máximo incremento (1.8 g) a la concentración de  $22.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Al analizar la concentración de antraquinonas en las raíces (por unidad de masa fresca) se puede observar, que a partir de  $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA se logra un aumento de este metabolito ( $1.23 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF), sin diferencias significativas con las restantes concentraciones de AIA y sí con el tratamiento control (Figura 5B).

En este experimento no se detectaron antraquinonas excretadas al medio de cultivo.



**Figura 5.** Efecto de la concentración de ácido indolacético en el incremento de la masa fresca (A) y la concentración de antraquinonas en las raíces (B). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey HSD,  $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ ).

Los reguladores del crecimiento están considerados como uno de los factores del ambiente *in vitro* que juegan un papel importante en la inducción y represión de vías biosintéticas relacionadas con la acumulación de metabolitos secundarios (Vanisree y Tsay, 2004). En la obtención de metabolitos secundarios a partir del cultivo de raíces, la optimización del medio de cultivo juega un papel importante tanto en el crecimiento como en la acumulación de metabolitos. Se conoce bien que las auxinas son reguladores relacionados con la promoción del crecimiento (George *et al.*, 2008). En condiciones *in vitro*, el mantenimiento de cultivos en medio libre de auxinas puede conducir a una reducción del crecimiento, muerte de las células y como consecuencia una disminución en la

obtención de antraquinonas. De allí la importancia de la incorporación de este regulador en el medio para acentuar el contenido de antraquinonas (Van der Plas *et al.*, 1995; Abdullah *et al.*, 1998).

En cultivos celulares de *C. succirubra* el aumento de las concentraciones de AIA (12-123  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) incrementaron el crecimiento celular y la acumulación de antraquinonas. El máximo contenido de antraquinonas se logró con 123  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA (Khouri *et al.*, 1986). Al evaluar el efecto de diferentes tipos de auxinas (2,4-D, AIA y ANA) en la acumulación de biomasa y la concentración de antocianinas en cultivos celulares de *Daucus carota*, la máxima concentración del metabolito se obtuvo cuando el medio se suplementó con 14.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA (Narayan *et al.* 2005).

En este experimento se comprobó que las células de las raíces de *M. royoc* L. poseen un potencial de producción de antraquinona de aproximadamente 1.2  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF ya que independientemente del incremento de la concentración del AIA se mantiene ese umbral (Figura 5B). Sin embargo, a la mayor concentración ensayada se obtiene el máximo crecimiento de las raíces y por ende la mayor producción neta total del metabolito. A esta concentración (22.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA) se obtiene un incremento de masa fresca de 0.56 g más que los obtenidos con la menor dosis de AIA evaluada (Figura 5A), pero no hubo diferencias significativas en el contenido de antraquinonas (por unidad de masa fresca) a partir de la adición de 5.7  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA (Figura 5B).

En el cultivo *in vitro* de raíces de *R. tinctorum*, el AIA (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) resultó ser la hormona que logró el máximo crecimiento y la mayor obtención de antraquinonas (Sato *et al.*, 1991). Sin embargo, en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. a pesar que hubo una relación directa entre el incremento de la concentración de AIA y la masa fresca (Figura 5A), las concentraciones mayores de 5.7  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA no incrementaron el contenido de antraquinonas ( $\text{mg g}^{-1}$  MF) (Figura 5B).

Uno de los grandes problemas para la comercialización de metabolitos que se obtienen a partir del cultivo *in vitro* de plantas, es el incremento de los costos; debido a la baja productividad de las células de las plantas cultivadas en estas condiciones. Con el objetivo de disminuir costos, es necesario incrementar la eficiencia celular de producción del metabolito, lo que significa obtener la mayor cantidad de productos por célula, en el menor tiempo posible (Misawa, 1994). En este contexto, las células diferenciadas de los cultivos de órganos son capaces de producir los mismos

compuestos que las plantas intactas, pero la producción a gran escala todavía es un obstáculo para la economía de tal producción (Veerpoorte et al., 2002).

La producción de metabolitos secundarios es mayor, generalmente, en los brotes y raíces *in vitro* que son tejidos diferenciados y relativamente más estables (Ramachandra y Ravishankar, 2002). La planta *M. royoc* L. en ambiente natural presenta altos contenidos de antraquinonas en las raíces, con valores de rendimiento específico de este metabolito de  $5.6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa fresca (Rivas et al., 2006). Es por esto, que el objetivo del presente trabajo estuvo encaminado a obtener la máxima eficiencia metabólica de producción de antraquinonas en las raíces cultivadas *in vitro* e igualarla con el contenido de estos metabolitos en plantas en ambiente natural.

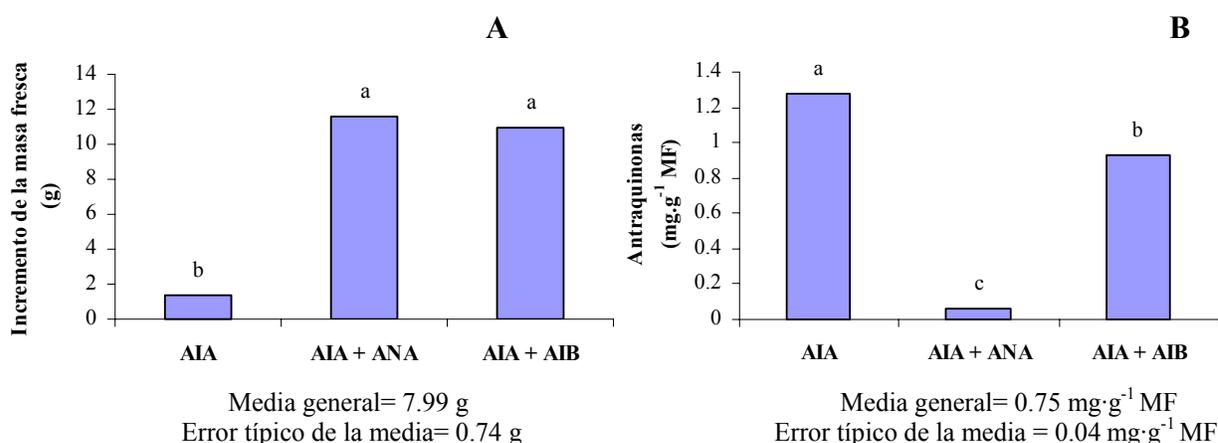
Teniendo en cuenta que la presente investigación se realiza con el propósito de maximizar el contenido de antraquinonas en las células, con los menores gastos posibles, se propone utilizar  $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA como la concentración efectiva para continuar con la evaluación de otros factores. La evaluación del efecto de otros tipos de auxinas sobre los indicadores antes señalados fue el objetivo principal del próximo experimento.

#### **4.1.3 Efecto del tipo de auxina.**

En la figura 6 aparece el efecto del tipo de auxina en el incremento de la masa fresca de las raíces y en la concentración de antraquinonas en las raíces. Con la aplicación de ANA y AIB se lograron valores significativos de incremento de la masa fresca, alcanzándose valores de alrededor de 12 g (Figura 6A). Nótese el efecto menos marcado del AIA sobre este indicador. Con relación al contenido de antraquinonas por unidad de masa fresca, con el AIA se lograron incrementos de este metabolito ( $1.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF), mientras que su conjugación con ANA o con AIB redujo significativamente los contenidos de antraquinonas en las raíces ( $0.05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF), siendo más notable con el primero (Figura 6B). No se detectaron antraquinonas excretadas al medio.

En el cultivo *in vitro*, el efecto de las auxinas en la producción de metabolitos secundarios depende del tipo (clorinadas e indólicas) y las concentraciones a las que se utilicen. Específicamente, en la síntesis de antraquinonas se informa el papel regulador que tiene el tipo y la concentración de auxinas, en comparación con otros reguladores y en particular las citoquininas (Han et al. 2001). Sin

embargo, altas concentraciones de hormona también pueden afectar la acumulación de metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro* de plantas (Chan *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2010).



**Figura 6.** Efecto del tipo de auxina en el incremento de la masa fresca (A) y la concentración de antraquinonas en las raíces (B). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey HSD,  $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ ).

En los cultivos celulares de *Morinda*, *Galium* y *Cinchona* el 2,4-D suprimió la acumulación de antraquinonas, mientras que el ANA la promovió (Leistner, 1995). La baja concentración de antraquinonas en presencia de 2,4-D puede ser debido a una pérdida de la inducción y/o represión e inhibición de las enzimas de la síntesis de antraquinonas y también debido a la pérdida de suficientes esqueletos carbonados del metabolismo secundario necesarios para la síntesis de estos metabolitos (Abdullah *et al.*, 1998).

En el presente estudio la adición de AIB o ANA a un medio con AIA como única hormona, provocó un incremento de la masa fresca de raíces de *M. royoc* L estadísticamente significativo, lo que da lugar a un incremento en los rendimientos netos de antraquinonas (masa por concentración). Sin embargo, el aumento de masa para los procesos de extracción y caracterización de metabolitos significa un aumento de contaminantes y en muchos casos disminución de la calidad del producto (Misawa, 1994). Es por eso, que en esta investigación lograr que las raíces de *M. royoc* L. presenten la mayor concentración del metabolito·g<sup>-1</sup> de masa fresca, con el menor costo posible, facilitaría el proceso de aislamiento y caracterización de antraquinonas a partir del material vegetal. Estos resultados servirán de base para los siguientes protocolos de obtención de masa. La adición de AIB

debe ser uno de los factores que se estudien para los procesos de escalado por su influencia en el incremento de masa en este trabajo.

En esta investigación el uso de ANA o AIB provocó un aumento significativo de los incrementos de masa fresca con relación al AIA. Sin embargo, Cui *et al.* (2010) informan que en el cultivo de raíces adventicias de *H. perforatum* lograron una mayor inducción y crecimiento de raíces con el empleo de AIB y AIA comparado con la adición de ANA y el control.

Cuando se evaluó la influencia de auxinas (ANA, AIA y AIB) en el crecimiento de raíces transformadas de *R. akane* se comprobó que el ANA tuvo una marcada influencia en el crecimiento de raíces y en la concentración de antraquinonas, mientras que el AIA incluso a la mayor concentración ( $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) logró los resultados más bajos (Park y Lee, 2009). Estos resultados no están en correspondencia con los que se obtienen en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. donde la adición de ANA promovió el crecimiento de las raíces e inhibió el contenido de antraquinonas. Mientras que en presencia de AIA, se reduce el crecimiento de las raíces y se incrementa significativamente la concentración de antraquinonas ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF) (Figura 6A y 6B).

En el cultivo de suspensiones celulares de *M. citrifolia* L., altas concentraciones de ANA disminuyeron el contenido de antraquinonas (Zenk *et al.*, 1975), mientras que en esa misma especie el contenido de antraquinonas se indujo por bajas concentraciones de esta auxina y se inhibió totalmente por el 2,4-D y altas concentraciones de ANA (Hagendoorn *et al.*, 1994).

En la literatura consultada no existen informes sobre el efecto del ácido indolbutírico en el contenido de antraquinonas durante el cultivo *in vitro* de células y órganos de plantas. Esta hormona se ha utilizado para la obtención de otros metabolitos secundarios (Wu *et al.*, 2003; Kuczkiewicz y Kokotkiewicz, 2005; Sivakumar *et al.*, 2005a).

En la formación de raíces adventicias, se reconoce que el AIB es más efectivo que el ANA (De Klerk, 1995; Sreekumar *et al.*, 2000). Al evaluar la influencia de reguladores auxínicos, (ANA y AIB) sobre el crecimiento y la formación de antocianinas en el cultivo de raíces adventicias de *Raphanus sativus* se encontró que la formación de pigmentos y el crecimiento fue mayor cuando las raíces se cultivaron en la luz con  $2.46 \mu\text{M}$  de AIB (Betsui *et al.* 2004). Sin embargo, Sivakumar *et al.* (2005a) estudiaron el efecto del ANA y el AIB en la formación de raíces de *Panax ginseng* para

la obtención de ginsenosidos, e informaron el máximo valor de masa fresca con la utilización de ambos reguladores sin diferencias significativas entre ellos. Este resultado está en correspondencia con el que se obtuvo en el cultivo de raíces de *M. royoc* L. donde el crecimiento de las raíces se promovió por el efecto de ambos reguladores (Figura 6A).

Al evaluar la influencia de las auxinas en la obtención de metabolitos secundarios, se ha evidenciado que el 2,4-D ha sido muy utilizado para el cultivo no organizado, principalmente en el cultivo de suspensiones celulares y de forma general reprime la síntesis de antraquinonas. Este hecho pudiera estar relacionado con su capacidad para la desdiferenciación de los tejidos vegetales. Las auxinas como el AIA, AIB y ANA se han empleado para el cultivo de suspensiones celulares y cultivo de raíces y su efecto promotor sobre la síntesis de antraquinonas depende de su concentración y de la especie de planta en cuestión (Han *et al.*, 2001).

Al analizar las posibles implicaciones que tienen estos reguladores en la acumulación de antraquinonas, se plantea que cuando el ANA está en altas concentraciones el citoplasma se alcaliniza y se puede estimular la muerte celular con la subsecuente caída de la acumulación del metabolito; mientras que a bajas concentraciones es capaz de inducir la expresión de genes responsables de varias enzimas que participan en la vía de síntesis de antraquinonas (Hagendoorn *et al.*, 1994). El 2,4-D y el ANA en altas concentraciones inhiben la actividad de la isocorismato sintasa, enzima principal de la vía de síntesis de este metabolito, la cual juega un papel fundamental en el control del flujo de precursores que conducen a su síntesis (Stalman *et al.*, 2003).

Con el empleo de AIA como única hormona se obtienen los mayores valores de rendimiento específico de antraquinonas ( $1.23 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ MF}$ ) siendo menores que los que se obtienen en las raíces de plantas en ambiente natural. Teniendo en cuenta el papel regulador del AIA en la acumulación de antraquinonas por las raíces de *M. royoc* L., se seleccionó este regulador a la concentración de  $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para evaluar el efecto de otros factores del cultivo *in vitro* de raíces en la acumulación de antraquinonas. En el próximo experimento se estudia el efecto de la renovación del medio de cultivo cada 15 días en la concentración de antraquinonas ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ MF}$ ) como una forma de garantizar un suministro constante de nutrientes durante los 75 días de cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L.

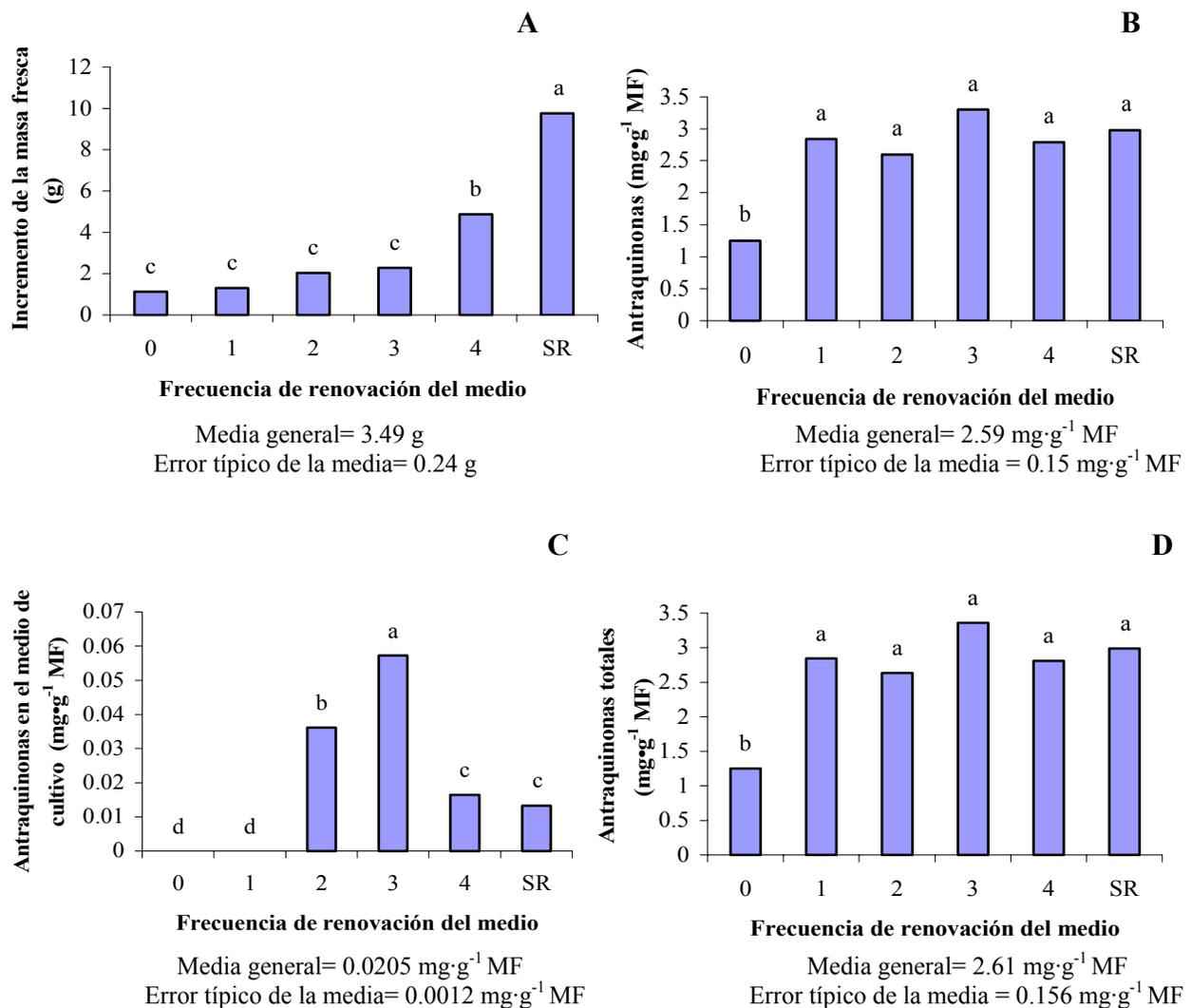
#### **4.1.4 Efecto de la frecuencia de renovación del medio de cultivo.**

En la figura 7 se muestran los resultados del efecto de la renovación del medio de cultivo en el incremento de la masa fresca (A), la concentración de antraquinonas en las raíces (B), y en el medio de cultivo (C), así como en la concentración total de antraquinonas (por unidad de masa fresca) (D) durante el cultivo *in vitro* de raíces aisladas de *M. royoc* L. Los mayores valores de incremento de la masa fresca (Figura 7A) se alcanzaron en el tratamiento control (sin renovación de medio de cultivo durante 75 días) (9.5 g). Por otra parte, el contenido de antraquinonas (por unidad de masa fresca) se incrementó al realizar el primer cambio de medio, pero no hubo diferencias en los valores obtenidos para este indicador con las restantes renovaciones de medio, ni comparados con los niveles del metabolito alcanzado al mantener el cultivo de raíces durante 75 días sin renovación del medio de cultivo (Figura 7B). Al analizar la concentración de antraquinonas en el medio de cultivo (Figura 7C) se obtuvo el mayor valor con tres renovaciones de medio. El comportamiento de la concentración de antraquinonas totales (por unidad de masa fresca) fue similar al de este metabolito en las raíces (Figura 7D).

En este estudio, mantener el cultivo de raíces durante 75 días sin renovación del medio provocó un incremento significativo de la masa fresca, con iguales concentraciones de antraquinonas en las raíces que en los diferentes cambios de medio (Figura 7A y 7B). La realización de una primera renovación de medio de cultivo (30 días totales), incrementó significativamente los rendimientos de antraquinonas (por unidad de masa fresca) sin diferencias significativas con el resto de los tratamientos y el control (75 días), lo que equivale a obtener mayor eficiencia metabólica para la producción del metabolito con menor masa y en menos tiempo.

Según Bourgaud *et al.* (2001), la obtención eficiente de metabolitos significa que cada cultivo debe evaluarse separadamente en cuanto a su velocidad de crecimiento y las concentraciones intracelulares y extracelulares de los metabolitos. Lo que permite, por ejemplo para un cultivo de suspensión celular, la evaluación de la productividad de cada línea (mg de producto por gramo de célula por día, o mg de producto por litro por día). Las líneas altamente productoras, que se seleccionan para su escalado, deben igualar o exceder los niveles de producción que se obtienen en

los cultivos no seleccionados y la productividad biosintética natural de plantas intactas (plantas en ambiente natural) (Matkowski, 2008; Smetanska, 2008).



**Figura 7.** Efecto de la frecuencia de renovación del medio de cultivo en el incremento de la masa fresca de las raíces (A), concentración de antraquinonas en las raíces (B), concentración de antraquinonas en el medio de cultivo (C) y la concentración de antraquinonas totales (D). **0**: sin cambio de medio (15 días); **1**: primer cambio de medio (30 días); **2**: segundo cambio de medio (45 días); **3**: tercer cambio de medio (60 días); **4**: cuarto cambio de medio (75 días); **SR**: sin renovación (75 días). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey HSD,  $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ ).

En el cultivo *in vitro*, la renovación del medio de cultivo a intervalos durante todo el cultivo es una práctica que se realiza para evitar el agotamiento del medio, la acumulación de sustancias tóxicas, el agotamiento de los nutrientes y así garantizar un adecuado nivel de respuesta de las células, tejidos u órganos (George *et al.*, 2008). Durante el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. se encontró que la

renovación del medio no estimuló el crecimiento de las raíces hasta el cuarto cambio de medio (Figura 7A). Si tenemos en cuenta que la dormancia desde el punto de vista fisiológico se define como una suspensión temporal del crecimiento visible de estructuras meristemáticas se puede considerar que el cambio del medio de cultivo provocó un efecto dormante sobre las raíces durante los días de cultivo (Taiz y Zeiger, 2002).

Durante el cultivo *in vitro* el fenómeno de la dormancia también está presente. El efecto de varios factores físicos, nutricionales y hormonales sobre la dormancia de bulbos de *Lilium in vitro* se ha investigado. Entre todos los factores la temperatura, la duración del cultivo, la concentración de sacarosa y ABA fueron los que tuvieron una mayor influencia (De Klerk y Gerrits, 1996).

El hecho de que la renovación del medio no estimulara el crecimiento de las raíces de *M. royoc* L. hasta el cuarto cambio de medio (Figura 7A), puede deberse a un aumento del estrés de las raíces provocado por las altas concentraciones de nutrientes y auxinas a la que son expuestas, después de un período en que las mismas logran un equilibrio entre los requerimientos endógenos y el suministro exógeno de nutrientes. También puede estar relacionado con el efecto tóxico del amonio. Con la renovación del medio de cultivo se mantienen las concentraciones de amonio a nivel elevado, lo cual puede inhibir el crecimiento de las raíces (George *et al.*, 2008).

La renovación del medio de cultivo cada 15 días no influyó en la concentración de antraquinonas por unidad de masa fresca presentes en las raíces de *M. royoc* L. (cambios de medio de cultivo del 1 al 4, Figura 7B). En la concepción de este experimento se tuvo en cuenta que para la obtención de antraquinonas la presencia de la auxina era un factor importante, de allí que lograr altas concentraciones del regulador cada 15 días iba a ser determinante en la promoción de este metabolito. Sin embargo, cuando el medio no se renovó durante los 75 días de cultivo se lograron los mismos niveles de antraquinonas en las raíces y totales, lo que presupone que el AIA puede actuar como inductor de la síntesis de este metabolito en las vías iniciales de las rutas metabólicas implicadas, por ello aunque se pudiera agotar en el medio no influye en la acumulación de antraquinonas por unidad de masa fresca.

La figura 8 muestra la presencia de antraquinonas en el medio de cultivo con la realización de tres cambios de medio, comparados con raíces sin renovación del medio de cultivo donde no se aprecia coloración en el medio producto de la liberación de antraquinonas. Resultados similares obtuvieron Bulgakov *et al.* (2002) en cultivo de callos transgénicos y no transgénicos de *R. cordifolia*. Estos autores demostraron que en aquellos cultivos donde hay una menor masa fresca, la concentración de antraquinonas en el medio fue mayor.

El mayor valor de excreción de las antraquinonas fue de  $0.057 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF en el medio cuando se realizaron tres renovaciones de medio de cultivo a las raíces (Figura 7C). Sin embargo, a pesar de que se observó una coloración naranja intenso en el medio de cultivo (Figura 8), cuantitativamente se pudo demostrar que la concentración de antraquinonas fue baja (Figura 7C), comparado con la concentración de antraquinonas en las raíces (Figura 7B).



**Figura 8.** Crecimiento del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. sin renovación del medio durante 75 días (izquierda) y con tres cambios de medio (derecha).

La excreción de antraquinonas al medio de cultivo a partir de las raíces puede observarse fácilmente por la coloración de los extractos (Shotipruk *et al.*, 2004). Schripsema *et al.* (1999) y Komaraiah *et al.* (2005), observaron una coloración naranja en el medio de cultivo de suspensiones celulares de *M. citrifolia* L. y *C. robusta* la cual apareció durante la fase estacionaria como resultado de la liberación de antraquinonas.

Oliveira *et al.* (2007) informaron una coloración amarilla-naranja en el medio de suspensiones celulares de *R. jasminoides*, debido a la acumulación de antraquinonas. Además esta coloración en

el medio pudiera estar asociada a la presencia de otros pigmentos no identificados o a la presencia de diferentes tipos de antraquinonas que varían en su coloración.

La excreción de los metabolitos al medio de cultivo es de gran importancia ya que permitiría su obtención sin la necesidad de destruir el material vegetal, así como la continua utilización del mismo. La espontánea liberación de los metabolitos en el medio facilitaría la producción con el empleo de métodos semi-automatizados (Smetanska, 2008). Sin embargo, la realización de tres cambios de medio implica gasto de mano de obra, de reactivos y tiempo que no se recompensa con la poca excreción del metabolito al medio.

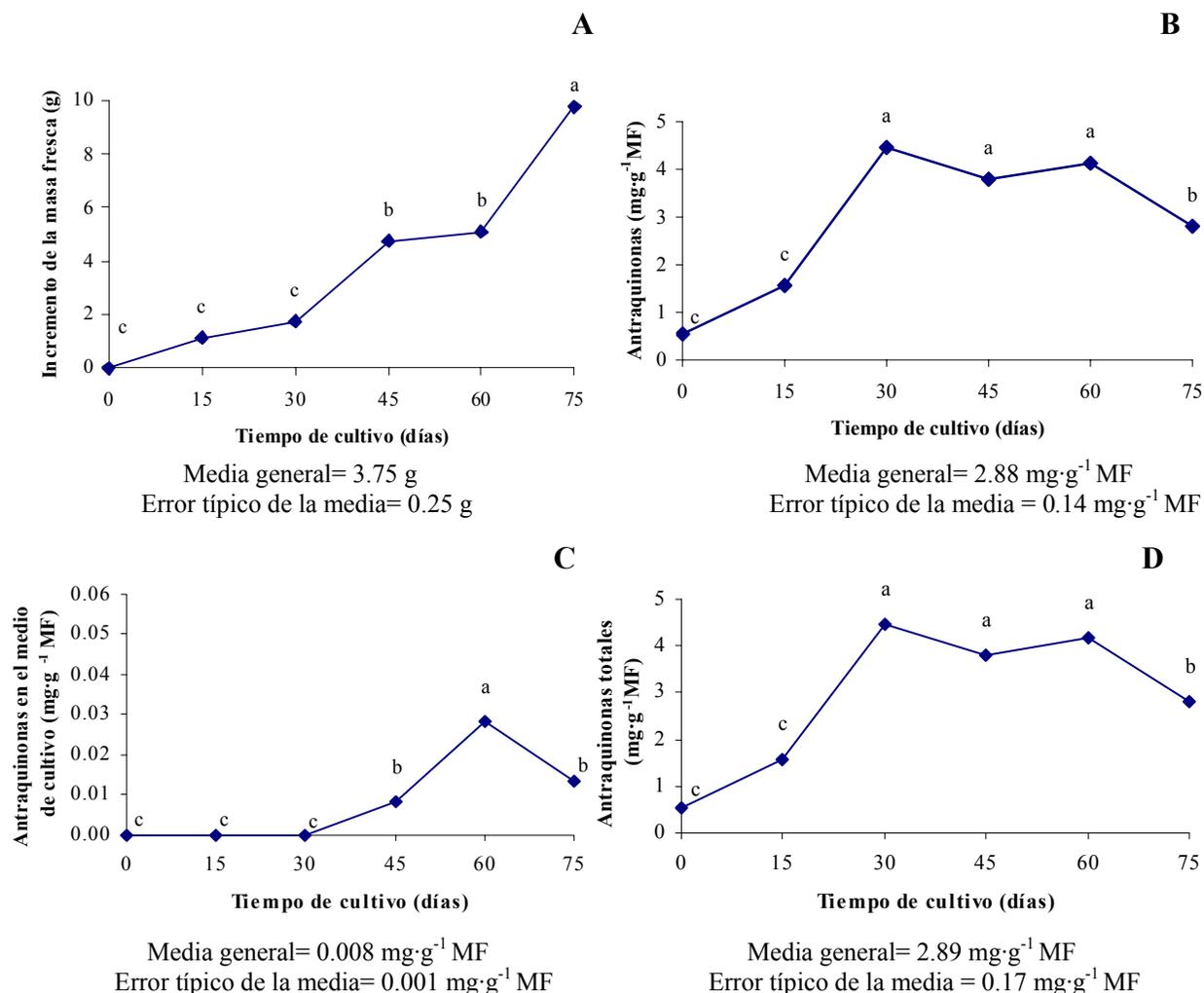
Teniendo en cuenta que no se conoce el efecto del tiempo de cultivo en la concentración de las antraquinonas en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L., en el próximo experimento se evalúa el incremento de la masa fresca, el contenido de antraquinonas en las raíces, en el medio de cultivo y las totales a intervalos de 15 días durante 75 días de cultivo.

#### **4.1.5 Efecto del tiempo de cultivo de raíces.**

En la figura 9 aparece el efecto del tiempo de cultivo en el incremento de la masa fresca, el contenido de antraquinonas en las raíces y las excretadas al medio de cultivo, así como en la concentración total de antraquinonas (por unidad de masa fresca). El incremento máximo de masa fresca de las raíces se obtuvo a los 75 días (9.76 g) que coincide con el último día de cultivo (Figura 9A). La concentración de antraquinonas en las raíces alcanzó su valor máximo (4.46 mg·g<sup>-1</sup> MF) a los 30 días, sin diferencias significativas a los 45 y 60 días, momento a partir del cual decrece aproximadamente en un 50% (2.80 mg·g<sup>-1</sup> MF) (Figura 9B). Similar comportamiento se observó para la concentración total de antraquinonas (Figura 9D). El mayor valor de antraquinonas en el medio de cultivo fue de 0.028 mg·g<sup>-1</sup> MF a los 60 días de cultivo (Figura 9C).

La máxima concentración de antraquinonas (por unidad de masa fresca) se logró entre los 30 y 60 días del cultivo de raíces de *M. royoc* L., etapas tempranas de la fase exponencial del crecimiento, mientras que en el momento de máximo crecimiento (75 días) disminuyó la concentración de este metabolito (Figura 9B). El crecimiento de las raíces y el contenido de antocianinas en *R. sativus*

tuvo un comportamiento similar. La masa fresca de las raíces tuvo un incremento gradual hasta la semana siete mientras que el contenido de antocianina alcanzó su máximo valor en la semana cinco a partir de la cual disminuyó gradualmente (Betsui *et al.*, 2004).



**Figura 9.** Efecto del tiempo de cultivo en el incremento de la masa fresca de las raíces (A) concentración de antraquinonas en las raíces (B), concentración de antraquinonas en el medio de cultivo (C) y la concentración de antraquinonas totales (D). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey HSD,  $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ ).

Para la obtención de metabolitos secundarios a partir del cultivo *in vitro* de plantas es necesario obtener la mayor cantidad de productos por célula por día, por lo que la productividad decrece con el incremento del tiempo de cultivo (Misawa, 1994; Matkowski, 2008). Para obtener un extracto con altas concentraciones de antraquinonas para su caracterización es necesario partir de raíces con alto contenido del metabolito con el objetivo de disminuir otros compuestos que puedan interferir en la

calidad de la extracción (Sakunpak et al., 2009). Por otra parte, 60 días significa mayor riesgo de contaminación en el cultivo *in vitro* por hongos y bacterias (George et al., 2008).

En el cultivo *in vitro* la producción de metabolitos no siempre está relacionado con el incremento de masa. Por ejemplo, en un estudio comparativo de la influencia de la composición salina del medio de cultivo (MS y B5) en el incremento de la la masa fresca y la concentración de metabolitos en raíces de *Solanum khasianu* se encontró la máxima acumulación de solasadina en el medio de menor concentración salina (B5) además se encontró que la concentración de este metabolito fue menor cuando se aumentó el nitrógeno total, lográndose un mayor crecimiento de las raíces (Jacob y Malpathak, 2005).

En el cultivo de raíces de *Albizzia kalkora* se estudió el efecto del nitrógeno en las formas de  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  y se comprobó que cuando la concentración de amonio era el doble que la de nitrato se alcanzó el mayor crecimiento de las raíces asociado a una disminución de la concentración del metabolito, demostrándose que para alcanzar la máxima acumulación del metabolito no es necesario lograr una biomasa máxima (Park et al., 2006). También en el cultivo de *Genista* se ha informado una correlación negativa entre el crecimiento de callos y la síntesis de isoflavina (Luczkiewicz y Glod, 2003).

En el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. el aumento del contenido de antraquinonas (por unidad de masa fresca) (Figura 9B) no estuvo relacionado con el incremento máximo de la masa fresca que se logró a los 75 días de cultivo (Figura 9A). Los resultados de este experimento señalan que la concentración del metabolito (por unidad de masa fresca) disminuye con el incremento significativo del crecimiento de las raíces. Este comportamiento se enmarca en el esquema de plantas donde la acumulación del metabolito no parece estar relacionado a un aumento del crecimiento y puede deberse a que durante un lento crecimiento, el carbono se hace menos necesario para el metabolismo primario y los compuestos secundarios se sintetizan activamente (Bourgaud et al., 2001). Resultados similares se alcanzaron en suspensiones celulares de *Cassia acutifolia* expuestas a estrés salino donde se redujo el crecimiento de los cultivos celulares, pero la acumulación de antraquinonas se incrementó (Nazif et al., 2000).

La relación directa entre el crecimiento de los cultivos y la biosíntesis de metabolitos secundarios se ha informado para varias especies de plantas. En raíces transformadas de *Ophiorrhiza pumila* se logró una mayor acumulación de camptotecina a las cinco semanas de cultivo, momento que correspondió con el mayor crecimiento de las raíces (Saito *et al.*, 2001). También en raíces transformadas de *Harpagophytum procumbens* se encontró que la concentración de iridoides estuvo en relación directa con el crecimiento de las raíces (Georgiev *et al.*, 2006). La mayor biomasa y el mayor contenido de alcaloides en presencia de 62.5 mM de  $\text{NO}_3^-$  se alcanzó en raíces transformadas de *Datura stramonium* (Amdoun *et al.*, 2009). En *R. akane* se encontró una relación directa entre el crecimiento de las raíces y la acumulación de las antraquinonas alizarina y purpurina después de 20 días de cultivo (Park *et al.*, 2009). Por otra parte, la adición de sacarosa en la fase exponencial del crecimiento de suspensiones celulares de *P. corylifolia* incrementó la biomasa y la concentración de fitoestrógenos (Shinde *et al.*, 2009).

Los contenidos de las antraquinonas que se determinaron en el medio de cultivo, sugieren poca excreción al mismo por parte de las células (Figura 9C). El contenido de antraquinonas en las raíces (Figura 9B) fue 193 veces mayor que el determinado en el medio de cultivo a los 60 días (Figura 9C). Estos resultados son similares a los obtenidos por Chong *et al.* (2004) en el cultivo de suspensiones de *M. elliptica* quienes obtuvieron poca excreción de antraquinonas con respecto a las contenidas en la masa celular.

En el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. el contenido de antraquinonas totales (por unidad de masa fresca) (Figura 9D) estuvo marcadamente determinado por el contenido de este metabolito en las raíces (Figura 9B) más que las excretadas al medio de cultivo (Figura 9C), lo cual pudiera evidenciar que las antraquinonas se encuentran en compartimentos celulares (Han *et al.*, 2001). Varios metabolitos secundarios por su composición y estructura química son hidrofóbicos, se almacenan en el citosol o en las vacuolas desde donde pueden ser solo excretados al medio de cultivo como resultado de la lisis celular (Chiang y Abdullah, 2007).

Por otra parte, la disminución significativa que se alcanzó en el contenido de antraquinonas a los 75 días de cultivo (Figura 9B) pudiera estar asociada al agotamiento de la sacarosa, componente esencial de cultivos heterotróficos, a la que se le reconoce un papel importante en la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios, en las células de las plantas (Han *et al.*, 2001). Un aumento de

la sacarosa en un 8% (m:v) en el medio MS, incrementó la concentración de antraquinonas en las raíces transformadas de *Cassia obtusifolia* (Guo *et al.* 1998). Además los productos pueden ser rápidamente degradados no enzimáticamente o enzimáticamente por peroxidasa en el medio extracelular (Ramachandra y Ravishankar, 2002). La disminución del contenido de antraquinonas en el medio de cultivo a los 75 días (Figura 9C) pudiera ser debido a que por mecanismos enzimáticos o no enzimáticos sean degradadas en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L.

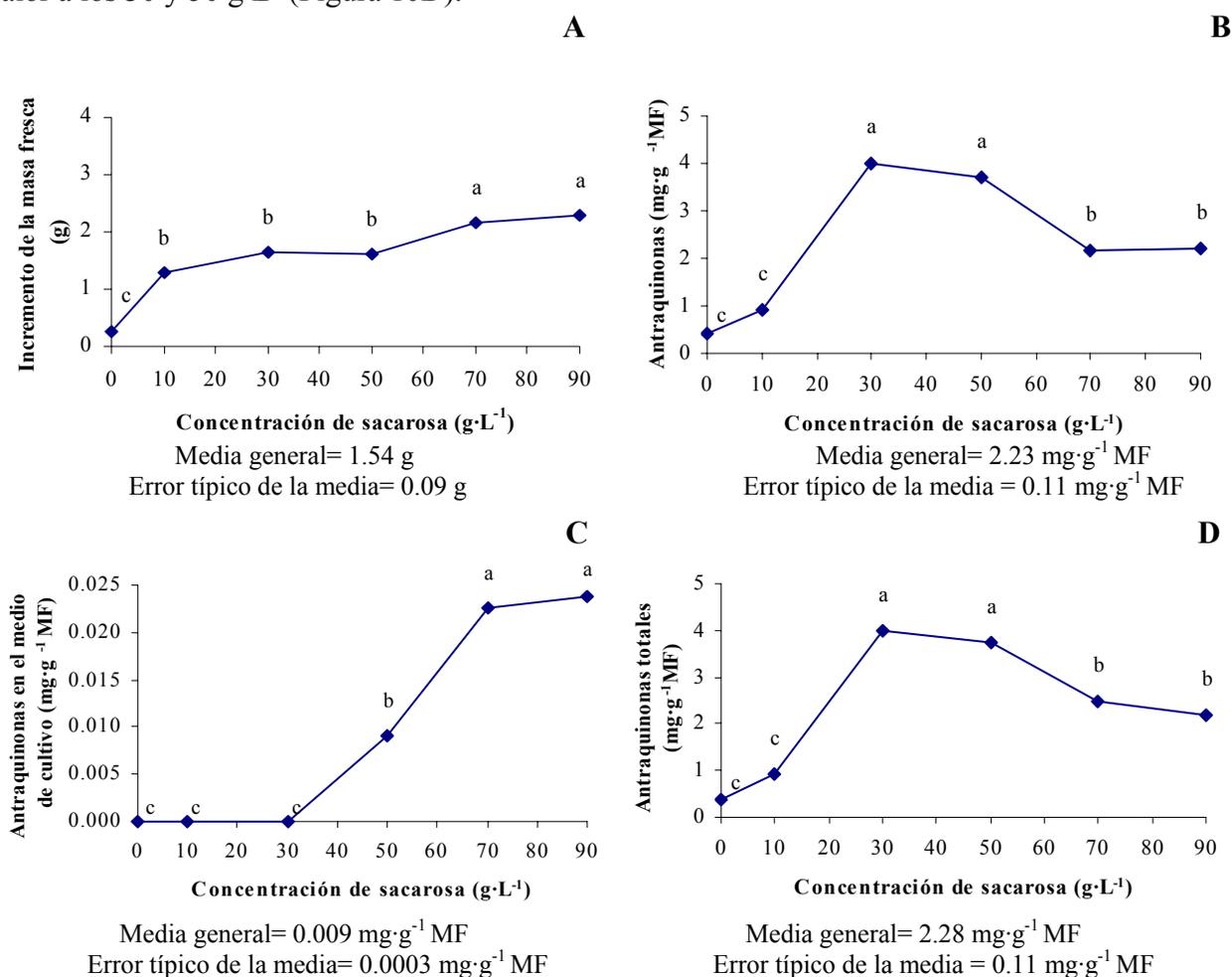
En el cultivo *in vitro*, el agotamiento progresivo de los nutrientes en el medio es uno de los factores que puede provocar un pobre desarrollo de los explantes (George *et al.*, 2008). En esta investigación de manera sorprendente se observó que a los 75 días (Figura 7A y 9A), tiempo suficiente para que existiera un agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo, se alcanzó un aumento en el incremento de la masa fresca de las raíces con una disminución marcada de la concentración de antraquinonas por unidad de masa (Figuras 9A y 9B). El bajo incremento de la masa fresca que se observó previo a los 75 días pudiera estar asociado a que el medio de cultivo MS, tiene una formulación muy enriquecida de iones amonio, sustancia tóxica a nivel celular (George *et al.*, 2008) la que pudiera provocar una disminución en el crecimiento de las raíces en esta planta. A diferencia de otros iones en el medio, el nitrato se absorbe en los primeros 15 días de cultivo (George *et al.*, 2008). Es posible que el agotamiento de nitrato y amonio a partir de los 30 días justifique el marcado incremento de la masa fresca de las raíces de *M. royoc* L., el cual se hace significativo a los 75 días (Figura 9A).

Si se comparan los incrementos de masa fresca en dependencia de la frecuencia de renovación del medio de cultivo (Figura 7A) y del tiempo de cultivo (Figura 9A) se puede observar que al realizar las renovaciones el incremento es menor. Los valores de incremento de masa fresca son menores con tres renovaciones de medio en comparación con un tiempo de cultivo de 60 días lo que pudiera ser debido a los efectos tóxicos del amonio (añadido en cada renovación de medio) sobre el crecimiento de las raíces.

Teniendo en cuenta los resultados de este experimento y con el propósito de igualar los contenidos de antraquinonas con los encontrados en las plantas en ambiente natural, se seleccionó 30 días de cultivo como estrategia para evaluar otros factores del ambiente *in vitro* que favorezcan el mayor rendimiento específico de antraquinonas.

#### 4.1.6 Efecto de la concentración de sacarosa.

La concentración de sacarosa en el medio de cultivo influyó en el incremento de la masa fresca de las raíces (Figura 10A), los máximos valores se lograron con 70 y 90  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las antraquinonas en las raíces presentaron su mayor concentración a los 30 y 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, siendo significativamente superior al resto de los tratamientos (Figura 10B). La concentración de antraquinonas en el medio de cultivo aumentó a partir de concentraciones de sacarosa superiores a 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  alcanzando los valores máximos a 70 y 90  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 10C). La concentración de antraquinonas totales alcanzó su mayor valor a los 30 y 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 10D).



**Figura 10.** Efecto de la concentración de sacarosa en el incremento de la masa fresca (A), concentración de antraquinonas en las raíces (B), concentración de antraquinonas en el medio de cultivo (C) y la concentración de antraquinonas totales (D). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey HSD,  $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ ).

La fuente de carbono y su concentración influyen en el crecimiento y la concentración de antraquinonas (Han *et al.*, 2001). En cultivos celulares de *M. lucida* a la luz, las lipoquinonas se

formaron en el medio sin sacarosa pero no hubo producción de antraquinonas. Sin embargo, cuando los cultivos se transfirieron a medio fresco con sacarosa en la oscuridad, las antraquinonas se produjeron y las lipoquinonas desaparecieron (Igbavboa *et al.*, 1985). Estos resultados sugieren que la sacarosa no sólo juega un papel importante como elemento nutritivo sino también que puede tener función reguladora en la formación de productos secundarios (Han *et al.*, 2001; Smetanska, 2008). A los azúcares se le han reconocido importantes funciones de señalización durante el ciclo vegetal (Smeekens, 2000).

En cultivos celulares de *M. citrifolia* L, la sacarosa estimuló más la formación de antraquinonas que la glucosa, el mayor rendimiento se logró a la concentración de 5% (Zenk *et al.*, 1975). Sin embargo, en cultivos celulares de *R. cordifolia* el efecto fue contrario, el menor contenido de antraquinonas se alcanzó con la sacarosa y en presencia de glucosa este fue mayor (Suzuki *et al.*, 1984). En cultivos elicitados de *C. robusta*, se obtuvieron resultados similares (Han *et al.*, 2001).

En el cultivo de callos de *R. ribes* la concentración óptima de sacarosa para el crecimiento no fue la misma que para la obtención de antraquinonas. El crecimiento de los callos fue mayor con 6% (m:v) de sacarosa, mientras que el máximo contenido de antraquinonas (reina y crisofanol) se logró con 3% (m:v) de sacarosa (Farzami-Sepehr y Ghorbanli, 2002). Resultados contradictorios se informaron para el crecimiento celular y la concentración óptima de antraquinonas en suspensiones celulares de *R. cordifolia*, donde la concentración de sacarosa del 5% fue óptima tanto para el crecimiento celular como para la acumulación de antraquinonas (Suzuki *et al.*, 1984).

En raíces transformadas de *R. tinctorum* altas concentraciones de sacarosa (6-18%) en presencia de los reguladores del crecimiento auxínicos AIA y ANA inhibieron el crecimiento. Mientras el medio estaba libre de hormonas, a la concentración de sacarosa del 12% se logró el crecimiento máximo y el máximo contenido de antraquinonas (Sato *et al.*, 1991). La masa fresca y seca de raíces adventicias de *P. ginseng* incrementó debido a un aumento de la sacarosa de 3-5% a partir de la cual ambos parámetros disminuyeron. La máxima concentración de saponinas correspondió con la concentración óptima de sacarosa para el crecimiento de las raíces (5%) (Sivakumar *et al.*, 2005a).

En el cultivo de raíces de *M. royoc* L. las concentraciones más elevadas de sacarosa (70-90 g·L<sup>-1</sup>) favorecieron el crecimiento de las raíces (Figura 10A) y la excreción de antraquinonas al medio de cultivo (Figura 10C). Sin embargo, los mayores contenidos de antraquinonas en las raíces se alcanzaron a concentraciones de 30 y 50 g·L<sup>-1</sup> (Figura 10B). A partir de estos resultados y otros que se informan en la literatura se demostró claramente que cada especie de planta en dependencia de la forma de cultivo tiene sus propios requerimientos en el tipo y concentración de carbohidratos para la producción de metabolitos secundarios (Han *et al.*, 2001). En el cultivo *in vitro*, la generalidad del empleo de la sacarosa sobre la glucosa para el cultivo de estructuras organizadas como las raíces aisladas está dado por la mayor efectividad en la translocación de este disacárido a los meristemos apicales (George *et al.*, 2008).

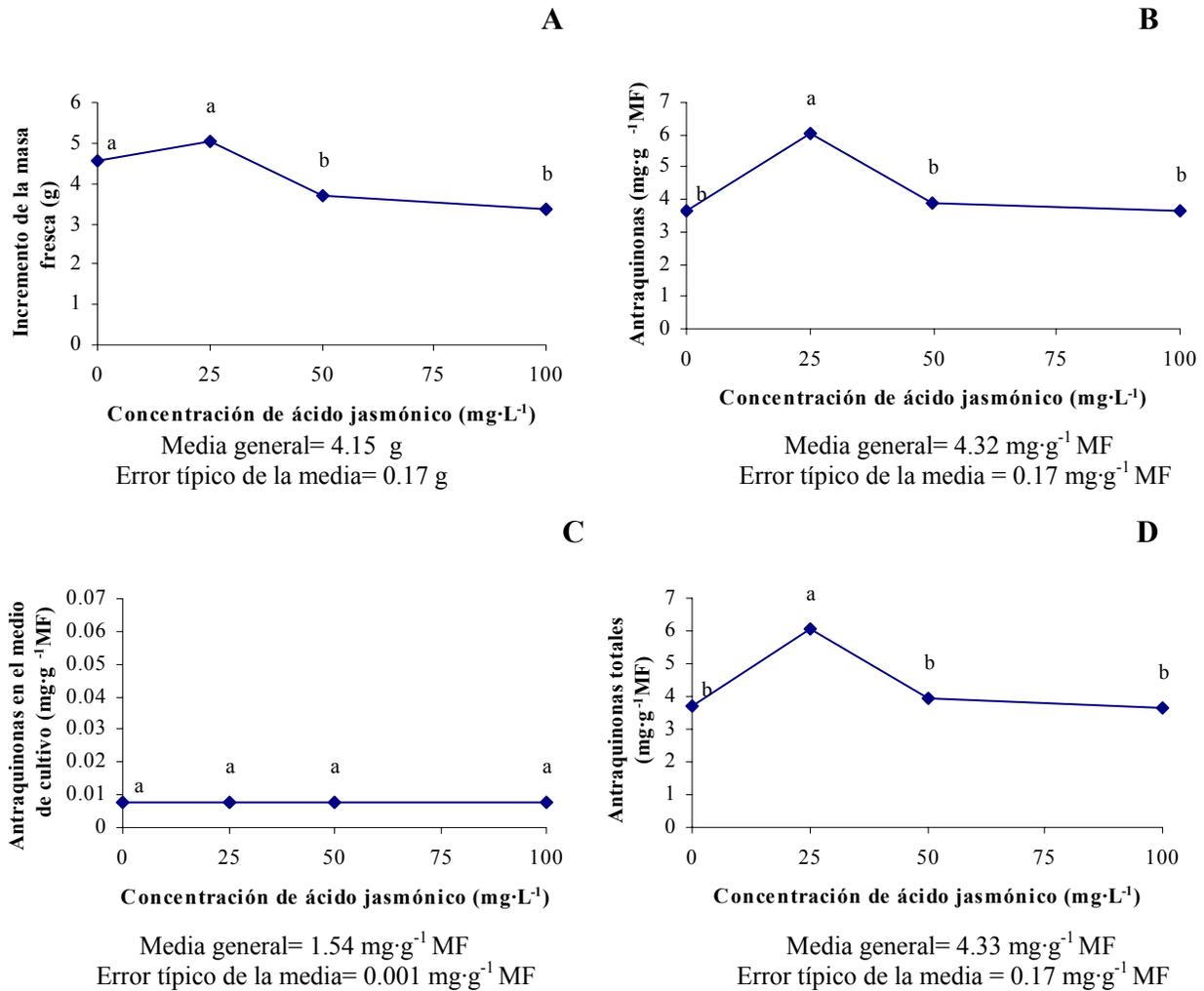
En el caso del incremento de antraquinonas en el medio de cultivo (Figura 10C) las mayores concentraciones de sacarosa (70-90 g·L<sup>-1</sup>) puede ser debido al papel osmótico de este disacárido. El contenido de agua en los tejidos decrece cuando el nivel de sacarosa en el medio se incrementa (George *et al.*, 2008).

A partir de los resultados obtenidos en estos experimentos, se observó que el contenido de antraquinonas en las raíces de *M. royoc* L. se favoreció en la oscuridad con la adición al medio de 5.7 μM de AIA, 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa y 30 días de cultivo. Bajo estas condiciones se alcanzó un contenido de antraquinonas de 4.46 mg·g<sup>-1</sup> de masa fresca. Sin embargo, el contenido de antraquinonas de raíces de plantas en ambiente natural se encuentra entre 5 y 6 mg·g<sup>-1</sup> de masa fresca (Rivas *et al.*, 2006), de ahí la necesidad de continuar otros estudios que permitan incrementar los valores de antraquinonas en las raíces cultivadas *in vitro*.

#### **4.1.7 Efecto de los elicitores ácido jasmónico y extracto de levadura.**

Los resultados del efecto del ácido jasmónico y el extracto de levadura sobre el incremento de la masa fresca y la concentración de antraquinonas en las raíces de *M. royoc* L. se muestran en las figuras 11 y 12. La adición de ácido jasmónico al medio de cultivo a la concentración de 25 mg·L<sup>-1</sup> no afectó el incremento de la masa fresca de las raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro* (Figura 11A). Sin embargo, las concentraciones mayores (50 y 100 mg·L<sup>-1</sup>) disminuyeron

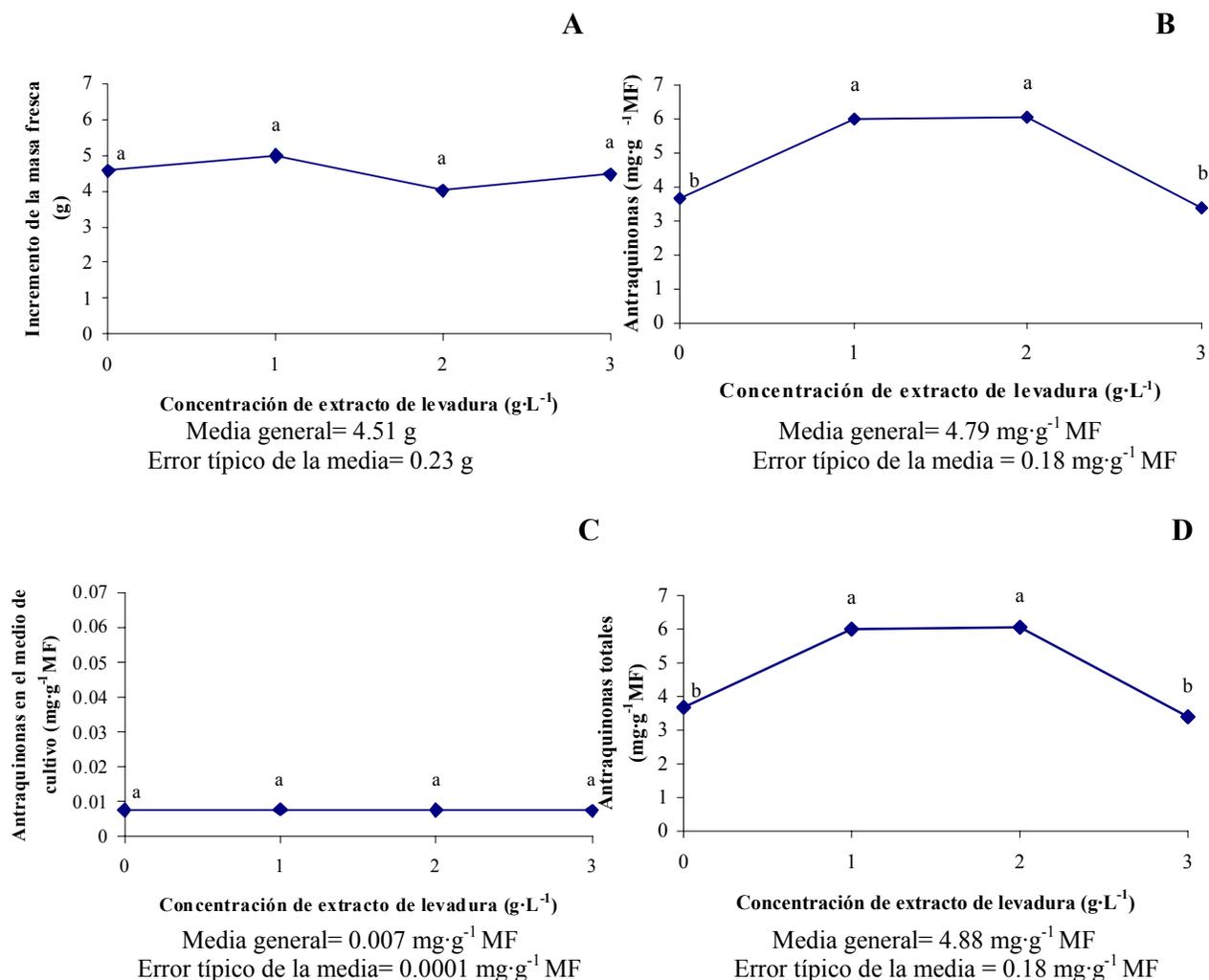
significativamente el incremento de la masa fresca. Con la adición de ácido jasmónico a la concentración de 25 mg·L<sup>-1</sup> se alcanzó el mayor contenido de antraquinonas en las raíces (6.07 mg·g<sup>-1</sup> MF) (Figura 11B).



**Figura 11.** Efecto de la concentración de ácido jasmónico en el incremento de la masa fresca (A) concentración de antraquinonas en las raíces (B), concentración de antraquinonas en el medio de cultivo (C) y la concentración de antraquinonas totales (D). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey HSD,  $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ ).

La adición al medio de cultivo del elicitador extracto de levadura no tuvo influencia en el incremento de la masa fresca de las raíces (Figura 12A). Con el empleo del extracto de levadura a 1 y 2 g·L<sup>-1</sup> se lograron las mayores concentraciones de antraquinonas en las raíces (6.0 y 6.05 mg·g<sup>-1</sup> MF respectivamente) sin diferencias significativas entre ellas (Figura 11B). Ambos elicitores no

incrementaron el contenido de antraquinonas en el medio de cultivo con respecto al control y su valor fue de  $0.008 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ MF}$  (Figuras 11C y 12C).



**Figura 12.** Efecto de la concentración de extracto de levadura en el incremento de la masa fresca (A), concentración de antraquinonas en las raíces (B), concentración de antraquinonas en el medio de cultivo (C) y la concentración de antraquinonas totales (D). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey HSD,  $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ ).

El ácido jasmónico y sus derivados, tales como metil jasmonato, representan moléculas importantes en las plantas relacionadas con la traducción de señales en la respuesta a patógenos. Su adición exógena al cultivo de células y tejidos, así como a plantas intactas estimulan la biosíntesis de un gran número de metabolitos secundarios (Sivakumar *et al.*, 2005a; Krollicka *et al.*, 2008; Prakash y Srivastava, 2008).

En el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L., el ácido jasmónico ( $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) incrementó la concentración de antraquinonas sin afectar la masa fresca de las raíces (Figuras 11A y 11B). Se reconoce que la sobreacumulación de metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro* de plantas en respuesta a la adición de un elicitor está asociado a la activación de genes de respuesta (Radman *et al.*, 2003) o a la liberación de especies reactivas del oxígeno que actúan como moléculas señalizadoras en la inducción de genes relacionados con la producción de metabolitos (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2005).

En raíces transformadas de *R. tinctorum*, la adición de metil jasmonato resultó en un incremento de cinco a ocho veces la concentración de antraquinonas comparado con el testigo (Mantrova *et al.*, 1999). En cultivos celulares *M. elliptica* la elicitación con ácido jasmónico indujo la síntesis de antraquinonas sin reducción de la masa seca de las células, con altos niveles de estrés oxidativo y alta actividad antioxidante. El ácido jasmónico incrementó el contenido de antraquinonas en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa seca 2.1 veces más que el control, pero con un valor de masa seca comparable al control (Chong *et al.*, 2005a).

En cultivo de raíces de *P. ginseng* se evaluó el efecto del ácido jasmónico ( $0, 1, 2, 3, 4$  y  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en el contenido de ginsenosides (saponinas triterpenoides) y se demostró que el ácido jasmónico provocó un incremento de 2 veces el contenido del metabolito mientras que la masa fresca de las raíces disminuyó (Sivakumar *et al.*, 2005b). El patrón del contenido de antraquinonas por las raíces de *M. royoc* L. fue algo diferente, ya que con el empleo de los elicitores ácido jasmónico ( $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el extracto de levadura se incrementó la concentración de antraquinonas en las raíces (Figuras 11B y 12B) sin afectar el crecimiento de las mismas (Figuras 11A y 12A). Con el empleo del ácido jasmónico a la concentración de  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  se logró incrementar la concentración de antraquinonas 1.65 veces en comparación con el control (Figura 11B).

Las concentraciones mayores de ácido jasmónico afectaron el crecimiento y el contenido de antraquinonas en el cultivo de raíces de *M. royoc* L. Esto puede ser debido a efectos tóxicos del ácido jasmónico sobre la biomasa y sobre la síntesis y acumulación de antraquinonas en las raíces y

pérdida de la viabilidad del cultivo (Kuzma *et al.*, 2009). La disminución de masa fresca en algunos cultivos elicitados pudiera ser el resultado del bloqueo del metabolismo primario y activación del metabolismo secundario por acción del elicitador (Chen y Chen, 2000; Wang *et al.*, 2001).

Aunque se reconoce que el ácido jasmónico y el metil jasmonato son fuertes elicitores de varios metabolitos secundarios, en estudios con raíces vellosas de *P. ginseng*, el crecimiento de las raíces se inhibió cuando se empleó a altas concentraciones (Yu *et al.* 2000). Sin embargo, en estudios posteriores, Dewir *et al.* (2010) informaron la sobreproducción de ginsenosides en raíces de *P. ginseng* después del tratamiento con ácido linoleico (probablemente debido a una estimulación de la biosíntesis de ácido jasmónico) pero en este caso sin afectar la biomasa.

También se ha encontrado que el ácido jasmónico a altas concentraciones afectó el crecimiento *in vitro* de brotes, raíces y hojas de *Oryza sativa* L. (Cho *et al.*, 2007). En contraste, el ácido jasmónico ( $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) incrementó la masa fresca de las plantas *in vitro* de *Drosera capensis*, lo cual estuvo asociado a un incremento del contenido de naftoquinonas (Krolicka *et al.*, 2008).

El extracto de levadura es otro elicitador ampliamente utilizado en el cultivo de células y tejidos para la obtención de metabolitos secundarios (Lu *et al.*, 2001; Chong *et al.*, 2005b; Yan *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Prakash y Srivastava, 2008). En suspensiones celulares de *R. tinctorum* las células incrementaron el contenido de antraquinonas después de ser elicitadas durante cuatro horas con extracto de levadura. En este proceso se estimuló la actividad isocorismato sintasa, enzima clave en la síntesis de antraquinonas (Van Tegelen *et al.*, 1999).

El extracto de levadura incrementó el contenido de ácido rosmarínico y los fenoles totales en raíces transformadas de *S. miltiorrhiza* a las concentraciones más altas ( $0.2$  y  $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Yan *et al.* 2006). De igual forma, en suspensiones celulares de *R. jasminoides* el extracto de levadura incrementó la biomasa de la célula y el contenido de antraquinonas hasta 2.5 veces comparados con el control después de 13 días de la aplicación (Oliveira *et al.*, 2007).

En el cultivo de raíces de *M. royoc* L. el extracto de levadura no influyó en el incremento de la masa fresca (Figura 12A) pero si incrementó el contenido de antraquinonas 1.6 veces a las

concentraciones de 1 y 2 g·L<sup>-1</sup> (Figura 12B). En suspensiones celulares de *A. indica* el extracto de levadura incrementó la masa fresca hasta 50 mg·L<sup>-1</sup> y la concentración de 100 mg·L<sup>-1</sup> disminuyó la masa fresca (Prakash y Srivastava, 2008). Estas concentraciones son menores a las que se ensayaron en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L.

El momento de aplicación del elicitor es un aspecto que incide en el nivel de rendimiento del metabolito. Chong *et al.* (2005b) sugirieron elicitar suspensiones celulares de *M. elliptica* durante la fase exponencial temprana o media, en lugar de la fase estacionaria. De igual forma otros autores informaron que los cultivos jóvenes con crecimiento rápido son más sensibles al tratamiento del elicitor (Lu *et al.*, 2001; Zhao *et al.* 2001; Qian *et al.*, 2004; Sakunphueak y Panichayupakaranant, 2010). En el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. los elicitores se aplicaron a los 30 días, momento de activo crecimiento. En etapas tempranas de activo crecimiento existen grandes cantidades de precursores, ya que las células están metabólicamente activas y no hay limitaciones de nutrientes (Ramos-Valdivia *et al.* 1997a). Sin embargo, todos los metabolitos, aún en el mismo cultivo, no se comportan de igual forma (Sakunphueak y Panichayupakaranant, 2010). En contraste, otros autores sugieren la adición del elicitor en la fase estacionaria del crecimiento con la argumentación que uno de los efectos del elicitor es la inhibición del crecimiento y estimular la producción de metabolitos (Wang *et al.*, 2001; Vanisree *et al.*, 2004; Kuzma *et al.*, 2009).

La adición de elicitores es una práctica común para incrementar el contenido de metabolitos secundarios que tienen baja o nula concentración en el cultivo *in vitro* comparado con plantas intactas (Antognoni *et al.*, 2007; Amdoun *et al.*, 2009). En el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L., el uso de elicitores provocó un incremento significativo de las antraquinonas y los valores que se obtuvieron están en el rango de los que se obtienen para raíces de plantas en ambiente natural. Con ambos elicitores (25 mg·L<sup>-1</sup> de ácido jasmónico ó 1 g·L<sup>-1</sup> de extracto de levadura) se incrementó el contenido de antraquinonas hasta valores de 6.07 y 6.0 mg·g<sup>-1</sup> MF, respectivamente. La utilización de ácido jasmónico (**Biojas**<sup>®</sup>) permitió además la validación del uso del producto cubano para la obtención de metabolitos secundarios en este cultivo.

El protocolo que se propone en la presente investigación permite la obtención de antraquinonas a partir de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*. Se pudieran evaluar otros factores del cultivo *in vitro* para incrementar la producción eficiente del metabolito (López-Laredo *et al.*, 2009; Kuzma *et al.*, 2009), así como otras formas de cultivo (Pérez-Alonso *et al.*, 2009), que permitan la producción de antraquinonas a gran escala. Sin embargo, la concentración de antraquinonas que se logró en raíces de *M. royoc* L. a partir de las mejores condiciones de cultivo *in vitro* y la acción de elicitors, confirman que este es un método eficaz para este propósito, porque se lograron valores de concentración por unidad de masa del compuesto de interés comparables con los obtenidos a partir de plantas en ambiente natural. Bajo las condiciones descritas en los experimentos, la extracción de antraquinonas es un método más factible a partir de las raíces *in vitro* de *M. royoc* L., porque los rendimientos son significativamente más altos que los que se detectan en el medio de cultivo.

Como conclusión del conjunto de experimentos desarrollados en esta etapa, se presenta un esquema general de obtención de antraquinonas (por unidad de masa fresca) en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. (Figura 13). Las raíces de siete plantas *in vitro* se colocaron en frascos de cultivo con 25 mL de medio MS líquido suplementado con  $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA durante 30 días en presencia de luz. Las raíces (1 g) se colocaron en Erlenmeyer con 30 mL de medio MS líquido suplementado con  $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA,  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, en la oscuridad. Los cultivos crecieron durante 30 días en zaranda orbital, momento de adición al medio de  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido jasmónico. La extracción de antraquinonas se realizó a los 15 días posteriores a la elicitación. A partir de estas condiciones se logró un contenido de antraquinonas de  $6.07 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MF lo cual fue 1.65 veces mayor que los cultivos sin elicitar. El protocolo podrá ser utilizado en aplicaciones de producción a gran escala del metabolito teniendo en cuenta su importancia para la agricultura y la medicina. A partir de estas condiciones se procedió al aislamiento de las antraquinonas que se obtienen a partir de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro* para su identificación.



**Plantas *in vitro* de *M. royoc* L.  
(4<sup>to</sup> subcultivo)**

Plantas *in vitro* que crecen en la luz en medio semi-sólido MS con sacarosa (30 g·L<sup>-1</sup>), AIA (5.7 μmol·L<sup>-1</sup>), mio-inositol (0.001 g·L<sup>-1</sup>), tiamina-HCL (0.001 g·L<sup>-1</sup>) y *gelrite* (2.5 g·L<sup>-1</sup>).



**Cultivo estático de raíces aisladas de *M. royoc* L.**

Raíces de siete plantas que crecen en la luz en medio MS líquido con AIA (5.7 μmol·L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g·L<sup>-1</sup>), mio-inositol (0.1 g·L<sup>-1</sup>), tiamina-HCL (0.001 g·L<sup>-1</sup>).



30 días



**Cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. en zaranda orbital**

1 g de raíces en medio MS líquido con AIA (5.7 μmol·L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g·L<sup>-1</sup>), mio-inositol (0.1 g·L<sup>-1</sup>), tiamina-HCL (0.001 g·L<sup>-1</sup>) en la oscuridad.



**Extracción de antraquinonas**



15 días



**Cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. en zaranda orbital**

Adición de ácido jasmónico **Biojas**<sup>®</sup> (25 mg·L<sup>-1</sup>) al medio de cultivo.



30 días

**Figura 9.** Esquema general para la obtención de antraquinonas por unidad de masa fresca a partir del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L.

## **4.2 Identificación de las antraquinonas presentes en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L.**

### **4.2.1 Aislamiento de las antraquinonas.**

Como producto de la extracción del material vegetal con diclorometano y del fraccionamiento con solventes orgánicos se obtuvieron 4 Filtrados. El Filtrado 1 se analizó primeramente por HPLC-DAD y el cromatograma resultante se comparó con los perfiles de HPLC-DAD de antraquinonas patrones. Posteriormente este Filtrado se sometió a una purificación en columna de gel de sílice. Los Filtrados 2 y 3 (F2, F3) se unieron y se analizaron en columna de gel de sílice (Esquema 2).

#### ***Extracción de antraquinonas con solventes orgánicos.***

La extracción con diclorometano (180 mL) rindió un producto de color naranja (200 mg) que después de concentrarse hasta sequedad se disolvió en metanol (5 mL). El solubilizado en metanol se evaporó para dar un residuo de 93 mg (Filtrado 1). Al precipitado residual de la filtración se le adicionó diclorometano y la suspensión resultante se filtró, el diclorometano se evaporó y se obtuvo un residuo de 83 mg (Filtrado 2). Al precipitado producto de la segunda filtración se le adicionó hexano: cloroformo: metanol (9:9:1). La suspensión resultante se filtró y el hexano: cloroformo: metanol se evaporó para dar un residuo de 10 mg (Filtrado 3). Al precipitado producto de la tercera filtración se le adicionó agua: acetonitrilo (1:2). La suspensión resultante se filtró y el sobrenadante se evaporó, el residuo obtenido fue de 5 mg (Filtrado 4) (Esquema 2). El total de masa que se obtuvo fue de 191 mg. La diferencia de 9 mg (200 mg-191 mg) corresponde a las pérdidas por manipulación al resuspender con los cuatro solventes orgánicos el residuo sólido producto a la extracción con diclorometano.

#### ***Cromatografía en capa fina (CCF).***

Los resultados de la cromatografía en capa fina de los Filtrados provenientes de raíces *in vitro* de *M. royoc* L. se muestran en la tabla 2. Como se puede observar los Filtrados 1, 2 y 3 mostraron el mayor número de componentes después del revelado por lo que se utilizaron para la separación y elucidación estructural de los compuestos presentes. El Filtrado 1 presentó el mayor número de compuestos y el menos complejo fue el Filtrado 4. Como se observa existe concordancia en cuanto a colores y valores de R<sub>f</sub> entre los compuestos presentes en los Filtrados. El Filtrado 4 no se sometió a ningún estudio por HPLC-DAD o separación en columna de gel de sílice (Esquema 2), debido a que presentó sólo dos compuestos y los mismos estaban presentes en los demás Filtrados.