

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE
HIDROXIMETILFURFURAL EN SUSPENSIONES CELULARES DE
PSYCHOTRIA PARVIFOLIA BENTH BAJO DIFERENTES
CONDICIONES DE CULTIVO**

**Tesis sometida a la consideración de la
Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias
Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de
Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales
con Énfasis en Biotecnología**

ALEJANDRA ROJAS VARGAS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2012

DEDICADA

A mis padres Víctor Rojas Cordero e Isabel Vargas Morales por su incondicional amor, paciencia y apoyo en todos estos años de estudio.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios porque sin él nada es posible.

Gracias a mis hermanos Cindy, Melissa y Felipe Rojas Vargas por su paciencia, amor y apoyo durante estos años de estudio. Gracias, por sus palabras de aliento e interés en mi proceso de formación académica.

A los profesores del Posgrado por su ayuda y formación.

A mi tutora de tesis Dra. Rosaura Romero Chacón por su tiempo, dedicación, esfuerzo y consejos para terminar con éxito este proceso académico.

Al Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional por el gran apoyo brindado durante los años de estudio.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología”.




Dr. Luis Gómez Alpizar
Representante del SEP



Dra. Rosaura M. Romero Chacón
Directora de tesis



Dra. Giselle Tamayo Castillo
Asesora



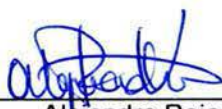
Dr. Víctor Jiménez García
Asesor



M.Sc. Jorge Herrera Quirós
Asesor



Dr. Eric Guevara Berger
Director del programa de posgrado en
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Alejandra Rojas Vargas
Candidata

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
HOJA DE APROBACIÓN	iv
RESUMEN	vii
LISTA DE DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
CAPITULO I. Revisión de literatura	6
Generalidades sobre la familia Rubiaceae	7
<i>Psychotria</i>	7
<i>Psychotria parvifolia</i> Benth	8
Metabolismo secundario	8
5-Hidroximetilfurfural	10
Producción de compuestos a partir de cultivo <i>in vitro</i> de células o tejidos vegetales	13
Literatura citada	16

CAPITULO II. Establecimiento <i>in vitro</i> de suspensiones celulares de <i>Psychotria parvifolia</i> Benth	19
Resumen	20
Introducción	21
Materiales y métodos	24
Resultados y discusión	32
Literatura citada	46
CAPITULO III. Determinación de la concentración de compuestos químicos en suspensiones celulares y plantas <i>in vitro</i> de <i>Psychotria parvifolia</i>	53
Resumen	54
Introducción	55
Materiales y métodos	57
Resultados y discusión	60
Literatura citada	79
CAPITULO IV. Discusión general	85
ANEXOS	

RESUMEN

Se desarrolló un protocolo para el establecimiento *in vitro* de la especie *Psychotria parvifolia*. El interés particular para el estudio de esta planta fue debido a que se detectó la presencia de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) en sus cultivos de células en suspensión. El 5-HMF es un precursor en la síntesis de plásticos y químicos finos. Sin embargo, el uso industrial del 5-HMF tiene como limitante su alto costo de producción. La mejor metodología de desinfección para las semillas (tratamiento E) presentó un 69,2% de explantes libres de contaminación. El porcentaje de germinación de las semillas fue de un 17,54% y el desarrollo completo de la plántula con su parte apical y radical tardó cuatro meses. La mayor formación de callo friable, un 33,33%, se obtuvo en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 1 mg/l) y cinetina (0,1 mg/l). Mediante un análisis químico utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS) se identificaron 15 compuestos, tanto en las vitroplantas como en las suspensiones celulares. Los compuestos mayoritarios en las vitroplantas fueron el ácido palmítico, el neoditadieno y el 5-hidroximetilfurfural, mientras que para las células en suspensión, el 5-hidroximetilfurfural, el ácido palmítico y el fitol.

LISTA DE CUADROS

CAPITULO II. Establecimiento *in vitro* de suspensiones celulares de *Psychotria parvifolia* Benth

Cuadro 1.	Tratamientos de desinfección para el establecimiento <i>in vitro</i> de semillas y hojas de <i>Psychotria parvifolia</i> en orden secuencial de pasos.	25
Cuadro 2.	Tratamientos para inducir la formación de callos en hojas de <i>Psychotria parvifolia</i> .	29
Cuadro 3.	Porcentaje de explantes no contaminados después de los tratamientos de desinfección.	33
Cuadro 4.	Porcentaje de respuesta de los explantes al tratamiento de formación de callos después de tres meses de cultivo.	38

CAPITULO III. Determinación de la concentración de compuestos químicos en suspensiones celulares y vitroplantas de *Psychotria parvifolia*

Cuadro 1	Compuestos químicos presentes en extractos de células en suspensión de <i>Psychotria parvifolia</i> detectados mediante GC-MS.	62
Cuadro 2.	Porcentaje relativo de los compuestos químicos mayoritarios en extractos de células en suspensión de <i>Psychotria parvifolia</i> detectados mediante GC-MS.	70
Cuadro 3	Compuestos químicos presentes en vitroplantas de <i>Psychotria parvifolia</i> detectados mediante GC-MS.	74
Cuadro 4.	Porcentaje de los compuestos mayoritarios producidos en vitroplantas de <i>Psychotria parvifolia</i> detectados mediante GC-MS.	77

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I. Revisión de literatura

Figura 1.	Rutas metabólicas para la producción de compuestos en plantas.	10
Figura 2.	Formación de compuestos acetilénicos en planta.	11
Figura 3.	Formación del 5-HMF.	12
Figura 4.	Principales usos del 5-hidroximetilfurfural.	13

CAPITULO II. Establecimiento *in vitro* de suspensiones celulares de *Psychotria parvifolia* Benth

Figura 1.	Lámina foliar de <i>Psychotria parvifolia</i> en un medio de cultivo MS.	33
Figura 2.	Proceso de germinación <i>in vitro</i> de <i>Psychotria parvifolia</i> en un medio de cultivo MS. A. Radícula surgida (30 días), B. Plántula en proceso germinación (60 días de cultivo) y C. Planta germinada (90 días de cultivo).	35
Figura 3.	Callos de <i>Psychotria parvifolia</i> en un medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D y KIN. A. Callo a partir de hojas y B. Callo a partir de fruto.	39
Figura 4.	Callo de <i>Psychotria parvifolia</i> en un medio de cultivo MS líquido con 2 mg/l de BAP y 3 mg/l de 2,4-D.	40
Figura 5.	Suspensiones celulares de <i>Psychotria parvifolia</i> en un medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D y KIN. A. Suspensión celular formada a partir de callo de hoja. B. Suspensión celular formada a partir de callo de semilla.	44

CAPITULO III. Determinación de la concentración de compuestos químicos en suspensiones celulares y plantas *in vitro* de *Psychotria parvifolia*

Figura 1.	Cromatograma de gases del extracto etanólico de células en suspensión de <i>Psychotria parvifolia</i> para el día 13 de cultivo	61
Figura 2.	Estructura química de los compuestos mayoritarios en suspensiones celulares de <i>Psychotria parvifolia</i> . A. Ácido palmítico, B. 5-HMF y C. Fitol.	68
Figura 3.	Cromatograma de gases del extracto etanólico de vitroplantas de <i>Psychotria parvifolia</i>	73
Figura 4.	Estructura química de neofitadieno.	77

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA: acetil coenzima A

ACP: de sus siglas en inglés acethyl carrier protein

ANA: ácido naftalen acético

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

5-HMF: 5-hidroximetilfurfural

BAP: Bencil amino purina

CIPRONA: Centro de Investigación en Productos Naturales

CV: coeficiente de variación de la mediana

DAM : Desviación absoluta de la mediana de la muestra

GC-MS: cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas

g/ mol: gramos/ mol

KIN: cinetina

MS: Murashige y Skoog

NaClO: hipoclorito de sodio

RI : recorrido intercuartilíco

Determinación de la concentración de hidroximetilfurfural en suspensiones celulares de *Psychotria parvifolia* Benth bajo diferentes condiciones de cultivo

INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de especies vegetales presente en los bosques ofrece una enorme posibilidad para la búsqueda y obtención de nuevos productos naturales. Las plantas producen una gran diversidad de sustancias químicas, procedentes tanto del metabolismo primario como del secundario. Los compuestos provenientes del metabolismo secundario, a diferencia de los primarios, tienen una distribución restringida a ciertos grupos de plantas y algunos son de particular interés económico (Haslam 1985, Croteau *et al.*, 2000).

Kutchan (2001) explica que en la mayoría de los casos, la función de los metabolitos secundarios en las plantas es desconocida. Sin embargo, algunos tienen importancia ecológica, en la interacción planta-ambiente, en la interacción simbiótica, en las señales de transducción en la membrana celular y en defensa contra patógenos o herbívoros. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son la quinina, alcaloide utilizado contra el paludismo y que se extrae de *Cinchona officinalis*, y la cafeína, que se obtiene de *Coffea arabica* y actúa como estimulante del sistema nervioso central (Croteau *et al.*, 2000, Ciccio 2000, Taiz y Zeiger 2002).

La biotecnología vegetal y más específicamente el cultivo de tejidos vegetales, se ha utilizado como una herramienta para aislar e identificar metabolitos secundarios de interés comercial. Razdan (2002) menciona que la producción de estos compuestos mediante el cultivo de tejidos vegetales es más barata, si se compara con la producción sintética y al mismo tiempo es posible incrementar su nivel de producción mediante técnicas biotecnológicas.

Una de las familias de plantas más representadas en Costa Rica es la familia Rubiaceae. Plantas pertenecientes a ella contienen metabolitos de interés para la industria farmacéutica y alimentaria. Dentro de esta familia, uno de los géneros con mayor número de especies es *Psychotria*, el cual produce diferentes constituyentes químicos con potencial farmacológico y actividad antimicrobiana, antiviral, analgésica y antitumoral (Kuo *et al.*, 2001).

El interés particular de este proyecto se enfocó en la especie *Psychotria parvifolia* Benth, en la cual se detectó la presencia de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) en sus cultivos de células en suspensión (Romero y Tamayo, comunicación personal¹). El 5-HMF es un precursor en la síntesis de plásticos y químicos finos. Sin embargo, el uso industrial del 5-HMF tiene como limitante su alto costo de producción (Leshkov *et al.*; 2006). Por ejemplo, 1 kg del furano tiene un valor de US \$6 300 (Sigma Aldrich, 2010).

Por lo anterior, se desarrolló una metodología para el establecimiento *in vitro* de suspensiones celulares de *Psychotria parvifolia* Benth, a partir de explantes establecidos *in vitro* y, finalmente, se evaluó la capacidad de producción de 5-HMF en plantas *in vitro* y suspensiones celulares de la especie en estudio.

¹ Romero, R.M; Tamayo, G. 2007. Compuestos químicos presentes en *Psychotria parvifolia*. Comunicación personal.

Objetivos

A. Objetivos general

Determinar la concentración de 5-HMF en tejidos de *Psychotria parvifolia* Benth bajo diferentes condiciones de cultivo *in vitro*.

B. Objetivos específicos

1. Definir los requerimientos para la germinación en condiciones asépticas de semillas obtenidas de frutos maduros de *Psychotria parvifolia*.
2. Determinar las condiciones experimentales para el establecimiento *in vitro* de la planta.
3. Obtener un método para la inducción y crecimiento de callo y suspensiones celulares a partir de explantes establecidos *in vitro*.
4. Evaluar la capacidad de producción de 5-HMF en cultivos de plantas y suspensiones celulares de la especie en estudio bajo diferentes condiciones de cultivo.

LITERATURA CITADA

- Ciccío, JF. 2000. Metabolitos secundarios y quimiotaxonomía. *In* Montiel, M. ed. Introducción a la flora de Costa Rica. 3 ed. San José, CR, Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 139-164.
- Croteau, R; Kutchan, T; Lewis. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). *In* Buchanan, B; Gruissem, W; Jones R. eds. Biochemistry Molecular Biology of Plants. US, American Society of Plant Physiologists. p. 1250-1318.
- Haslam, E. 1985. Metabolites and metabolism. Oxford, GB, Oxford Science Publications. 161 p.
- Kuo, Y; Chen, C; Tsai, W; Ho, Y. 2001. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in vero cell by *Psychotria serpens*: relations to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Research* 51: 95-109.
- Kutchan, T. 2001. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology* 125:58-60.
- Leshkov, Y; Chheda, J; Dumesic, J. 2006. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose. *Science* 312: 1933- 1937.
- Razdan, MK. 2002. Introduction to plant tissue culture. 2 ed. Enfield, US, Science Publishers. p. 263-285.

Sigma Aldrich 2008. Hydroxymethylfurfural (en línea). Consultado 27 diciembre 2010. Disponible en <http://www.sigmaldrich.com/catalog/ProductDetail.do>

Taiz, L; Zeiger, E. 2002. Plant physiology. 3 ed. Massachusetts, US, Sinauer Associates. p. 283-308.

CAPITULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Generalidades sobre la familia Rubiaceae

La familia Rubiaceae es una de las más numerosas de las angiospermas, con 10,700 especies distribuidas en 637 géneros. Se ubica principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Mongrand *et al.*, 2005).

Las rubiáceas son árboles o arbustos, hierbas y plantas trepadoras, de hojas simples, opuestas o verticiladas, usualmente pecioladas. Las estípulas son simples, enteras y caducas; las hojas tienen tricomas unicelulares. Las inflorescencias son cimosas, las flores son perfectas, raramente unisexuales y actinomorfas y en algunas especies pueden ser zigomórficas (Calderón, 1994).

En Costa Rica existen varios géneros representativos de la familia como: *Hoffmannia*, *Psychotria*, *Palicourea*, *Hamelia*, *Calycophyllum* y *Randia*. Sin embargo, el género *Psychotria* es el más numeroso con 112 especies (Taylor, s.f). Este grupo de plantas produce una gran variedad de compuestos de interés económico o farmacéutico, entre ellos: terpenoides, fenilpropanoides, antraquinonas, cumarinas, polifenoles, iridoides, flavonoides y alcaloides (Phillipson, 1982).

B. *Psychotria*

Los miembros de este género son árboles o arbustos de tamaño pequeño, aunque ocasionalmente se encuentran especies herbáceas. Sus hojas son simples, opuestas o verticiladas. Las inflorescencias son panículas terminales o axilares y las flores son bisexuales; la corola es blanca o amarilla (Fournier *et al.*, 1966).

El fruto es una drupa o una baya de color azul, negro o púrpura, que cuando llega a la madurez es alimento para aves. En Costa Rica se han identificado 112 especies que están distribuidas en el sotobosque, cerca de ríos y riachuelos. De la infusión del tallo de varias de sus especies, se extrae un tinte azulado para textiles (Fournier *et al.*, 1966, Vargas *et al.*, 2001).

C. *Psychotria parvifolia* Benth.

Es un arbusto de 2 a 3 metros de alto, de ramas delgadas pero muy abundantes. Sus hojas pueden medir de 1,0 a 3,5 cm de longitud y 1,5 cm de ancho. Las flores son poco dentadas, con corola blanca, y pueden llegar a medir de 3 a 4 mm de longitud. Los frutos son pequeños, de color rojo y alcanzan hasta 6 mm de diámetro (Burger y Taylor, 1993; León, 2000).

Es una especie que se encuentra en elevaciones de 1200 a 2200 msnm. Las flores se observan entre los meses de julio y agosto, y los frutos entre octubre y mayo (Burger y Taylor, 1993; León, 2000).

D. Metabolismo secundario

Los organismos sintetizan y degradan compuestos químicos mediante reacciones mediadas por enzimas. Este proceso es conocido como metabolismo y comprende tanto al catabolismo (degradación) como al anabolismo (síntesis). Todos los seres vivos tienen rutas metabólicas similares para la síntesis de compuestos esenciales como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y proteínas. Este metabolismo se conoce como primario y sus compuestos son esenciales para la supervivencia y desarrollo de las especies (Mann, 1987, Dixon, 2001).

Algunos seres vivos utilizan otras rutas metabólicas, produciendo compuestos que aparentemente no tienen utilidad, por no ser esenciales para los procesos metabólicos básicos. Por lo general, estos compuestos secundarios se activan durante una etapa particular del crecimiento y desarrollo del organismo, o durante periodos de estrés provocados por limitaciones nutricionales, ataques de insectos, animales o microorganismos (Mann, 1987, Dixon, 2001). El ser humano utiliza dichos metabolitos secundarios para procurarse bienes y servicios en diferentes industrias como la farmacéutica, la alimentaria y la agroindustria, entre otras. Las propiedades, tanto físicas, químicas y biológicas de estos compuestos, han hecho que puedan ser utilizados como materia prima para la producción de colorantes, insecticidas y saborizantes (Croteau et al., 2000).

Los compuestos naturales provienen de diferentes vías metabólicas: la ruta del acetato, la del mevalonato, la del shiquimato y las que dan origen a los aminoácidos. En las plantas, la biosíntesis de los metabolitos secundarios se inicia con el proceso de fotosíntesis (Figura 1). La acetil coenzima A (acetil-CoA) es la precursora del ácido mevalónico que da origen a los isoprenoides, terpenos, esteroides y carotenoides. La acetil-CoA también, luego de una serie de reacciones, forma los policétidos de cadena lineal que posteriormente producen los ácidos grasos. Entre los derivados de los ácidos grasos se pueden encontrar a los poliacetilenos y a las prostanglandinas (Mann, 1987, Dewick, 2002).

Por su parte, el ácido shiquímico es el precursor de compuestos aromáticos, como los aminoácidos aromáticos, ácidos cinámicos, ciertos polifenoles y lignanos. Finalmente, el ácido cítrico es precursor de aminoácidos alifáticos que originan alcaloides (Mann, 1987, Dewick, 2002).

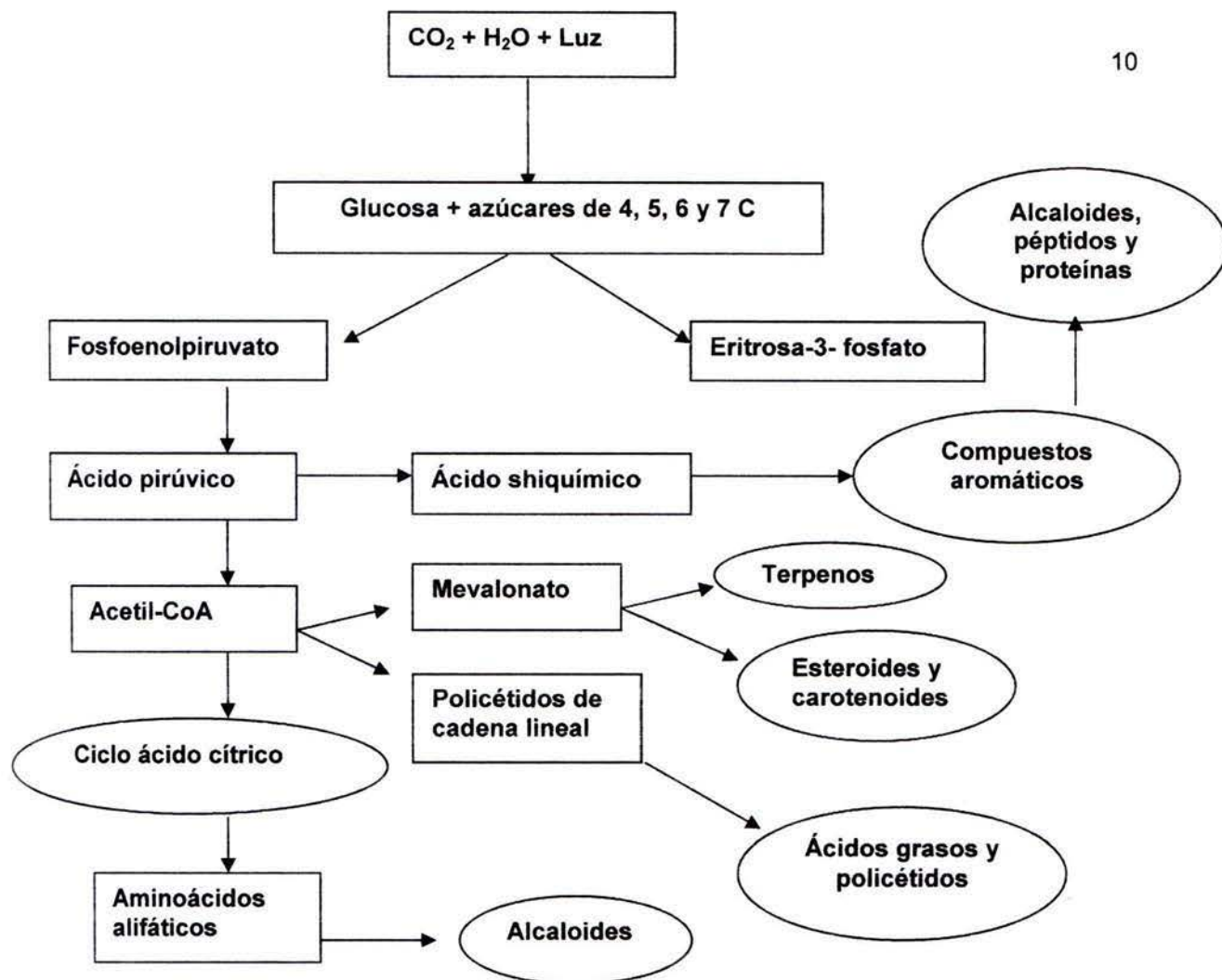


Figura 1. Rutas metabólicas para la producción de compuestos en plantas (Mann,1987; Dewick, 2002). ("C"= carbono).

E. 5-HMF

Los furanos se forman a partir de ácidos grasos, siendo el ácido linolénico el precursor más común en las plantas superiores. Tomando como ejemplo dicho ácido, la biosíntesis inicia con la formación de compuestos acetilénicos mediante la deshidrogenación de los dobles enlaces. Posteriormente, la cadena carbonada es acortada mediante oxidaciones α y β , descarboxilaciones e isomerizaciones (Figura 2).

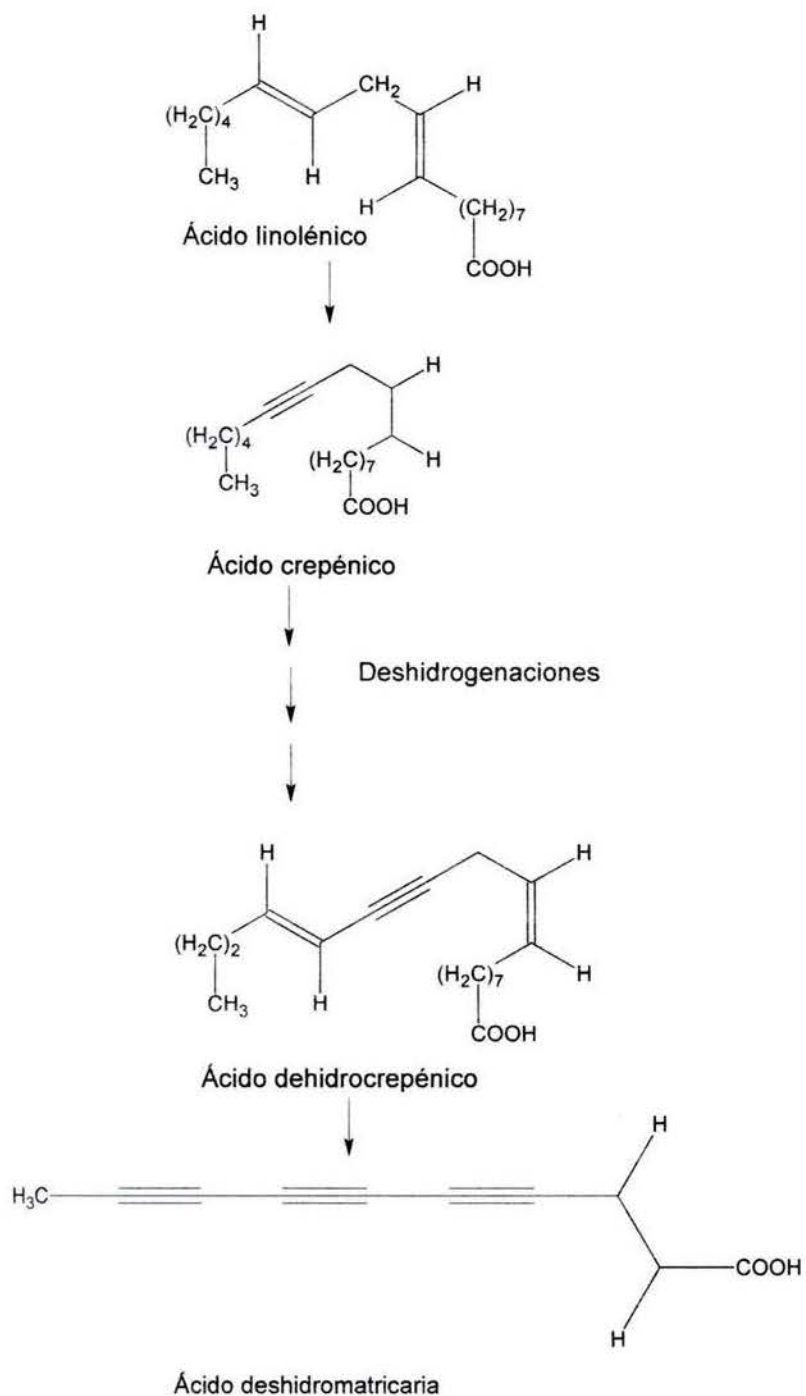


Figura 2. Formación de compuestos acetilénicos en plantas (Luckner, 1990).

En el caso de la formación del anillo de furano, éste se forma a partir de un inenol, que a su vez es el resultado de la adición de oxígeno a un triple enlace (Luckner, 1990). Posteriormente, luego de varios pasos que se desconocen, se forma el 5-HMF (ver figura 3).

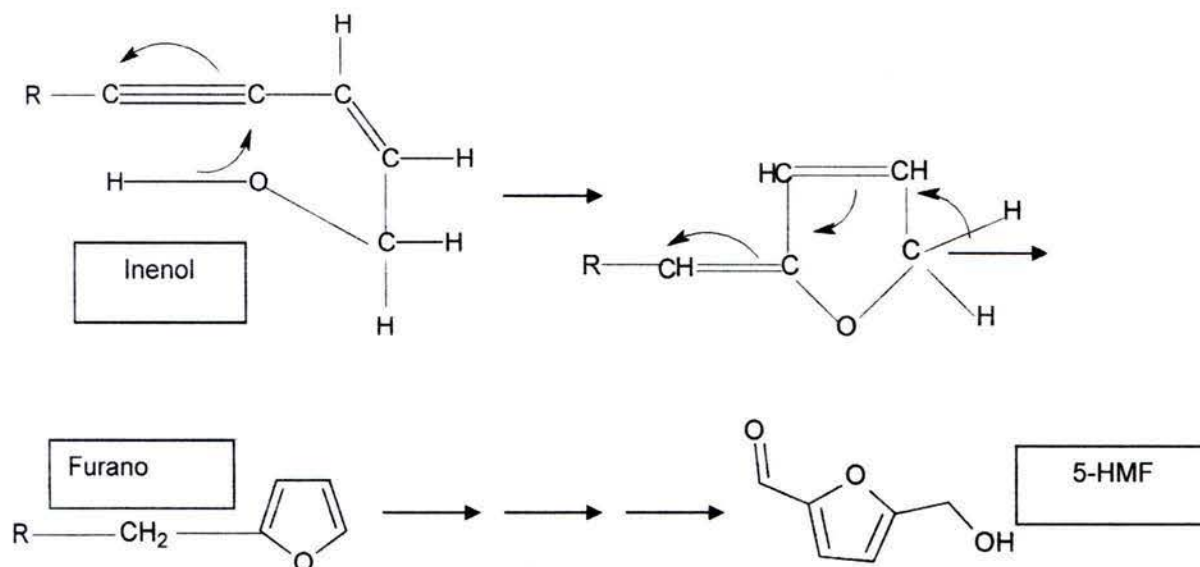


Figura 3. Formación del 5-HMF (Luckner, 1990).

El 5-HMF se utiliza para la obtención de plaguicidas, como el furadan, la piramina, el eudatol y el NC 8438, pero principalmente para la producción de derivados del furano, que se utilizan como intermediarios para la elaboración de muchos bienes. Por ejemplo, el furano, el succinato, los ésteres y el ácido levunílico, se utilizan en la producción de poliuretanos que se emplean en equipos de protección, películas de cámaras, partes de bicicletas, tapas para CD y DVD, equipo de golf, botas, fibras ópticas y partes de computadoras (Figura 4, Werpy y Petersen, 2004).

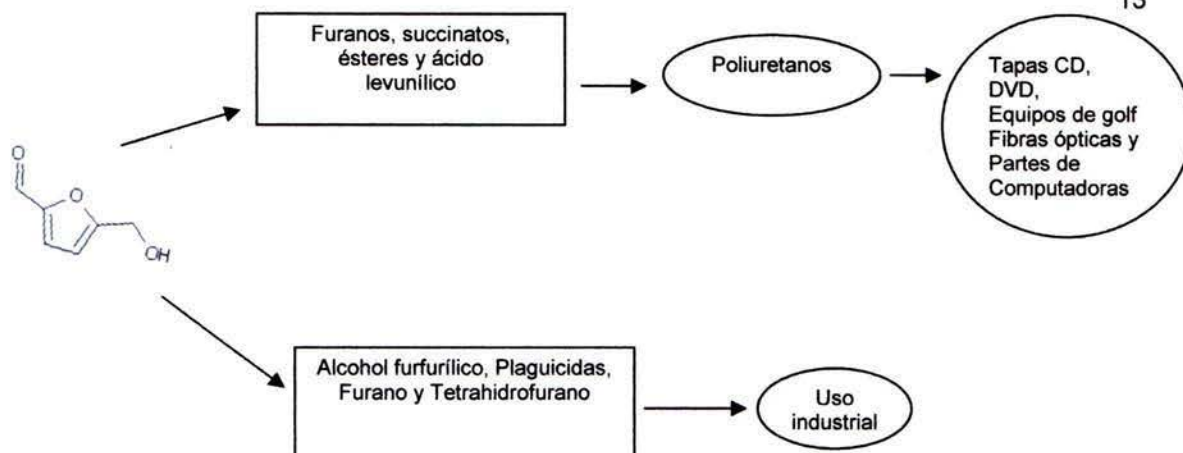


Figura 4. Principales usos del 5-HMF (Werpy y Petersen, 2004).

Varios autores han explicado que el uso industrial del 5-HMF como intermediario es limitado por su alto valor de producción, que provoca, a su vez, que tenga un alto valor económico (Lichtenthaler y Mondel, 1997, Leshkov *et al.*, 2006). Por lo anterior, la obtención de una nueva fuente para dicho compuesto es de importancia comercial.

F. Producción de compuestos a partir de cultivo *in vitro* de células o tejidos vegetales

Los avances en cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* han proporcionado grandes logros en la manipulación de plantas utilizando diferentes metodologías que permiten obtener un producto (plantas mejoradas, clones de interés en la agricultura o un producto natural) (Navarro y Perea, 1996).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* implica el crecimiento de células vegetales, tejidos u órganos aislados de la planta madre sobre un medio artificial. Se puede utilizar cualquier parte viva de la planta, como meristemos, yemas axilares, embriones, cotiledones y tallos, entre otros. Además, se puede trabajar con tejidos de crecimiento desorganizado, con técnicas como el cultivo de callos y células en suspensión (George, 1993, Navarro y Perea, 1996).

Por otra parte, por medio del cultivo de tejidos vegetales, se pueden producir compuestos con actividad biológica e importancia económica. Dos ejemplos representativos del éxito en la producción industrial de compuestos mediante cultivo de tejidos vegetales son la producción de shikonina y de taxol. El pigmento shikonina fue producido por más de una década por Mitsui Petrochemical Industries utilizando células en suspensión de *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita y Tabata, 1987). Por su lado, el alcaloide diterpénico paclitaxol (Taxol[™]), utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el de ovario, seno, esófago, endometrio y cérvix, también ha sido producido a partir de cultivos vegetales (Zhong, 2002). Originalmente, el taxol se aisló del árbol *Taxus brevifolia*, pero su producción comercial la ha realizado la compañía Phyton, utilizando células en suspensión de la especie *T. chinensis*.

A pesar del éxito que se ha logrado al obtener algunas sustancias de interés industrial, como las que se mencionaron, la técnica de cultivo *in vitro* se puede utilizar con rentabilidad económica únicamente para producir compuestos cuyo valor sea superior a \$6 000 por kg debido a los altos costos de producción (Misawa, 1994). Además de lo anterior, el empleo de cultivos vegetales implica la superación de varios "obstáculos" como el crecimiento lento de los cultivos, la inestabilidad genética, agregación celular, control de la diferenciación celular, definición de la composición del medio de cultivo y de reguladores de crecimiento (Fujita y Tabata, 1987). En los últimos años se ha logrado un avance en la composición de medios de cultivo (uso de alternativas en la fuente de carbono y de reguladores de crecimiento), así como el uso de inductores y de cambios en las condiciones de crecimiento, como el tipo de luz, la intensidad lumínica o el intercambio gaseoso entre el recipiente de cultivo y el ambiente externo, que inducen o favorecen la síntesis de compuestos de interés (George, 1993, Zhong, 2002).

A pesar de lo anterior, también hay ventajas al trabajar en la producción de compuestos de interés mediante cultivo de tejidos vegetales, si se les compara con la obtención de los compuestos mediante agricultura tradicional. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* permiten la multiplicación masiva de individuos genéticamente idénticos que pueden ser derivados de un programa de mejoramiento genético, se facilita la disponibilidad de plantas en cualquier época del año y por largos periodos de tiempo en espacios reducidos, se controlan las condiciones de crecimiento y se requiere de menos espacio (Navarro y Perea, 1996). Además, en muchos casos, no se puede olvidar que se trabaja con plantas amenazadas o en peligro de extinción.

LITERATURA CITADA

- Burger, WC; Taylor, CM. 1993. Flora costaricensis, Family #202 Rubiaceae. Fieldiana 33: 1-333.
- Calderón, F. 1994. Rubiáceas arbóreas y arbustivas de la Estación de Biología Tropical Río Macho, Orosí, Cartago. Tesis Licenciatura en Manejo de Recursos Naturales. Heredia, CR, Universidad Nacional. 112 p.
- Croteau, R; Kutchan, T; Lewis. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). *In* Buchanan, B; Gruissem, W; Jones R. eds. Biochemistry Molecular Biology of Plants. US, American Society of Plant Physiologists. p. 1250-1318.
- Dewick, P. 2002. Medicinal natural products a biosynthetic approach. Sussex, GB, Ed John Wiley Sons. p. 35-405.
- Dixon, R. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Fournier, LA; Jiménez, A; Salas, S; Marín, F. 1966. Las familias y géneros de árboles y arbustos de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 14: 317-328.
- Fujita, Y; Tabata, M. 1987. Secondary metabolites from plant cells, pharmaceutical applications and progress in commercial production. *In* Green, C; Somers, P; Hackett, W; Bresboer, D. eds. Plant tissue and cell culture. Proceedings of the VII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Minnesota, USA. p. 169-185.

- George, E. 1993. Plant Propagation by tissue culture. (Chapter 1:Plant tissue culture techniques). 2 ed. Editorial Exegetics Limited. UK.574 p.
- León, J. 2000. Los nombres comunes de las plantas en Costa Rica. San José, CR, Ed Guayacán. 870 p.
- Leshkov, Y; Chheda, J; Dumesic, J. 2006. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose. Science 312: 1933- 1937.
- Lichtenthaler, F; Mondel, S. 1997. Perspectives in the use of low molecular weight carbohydrates as organic raw materials. Pure and Applied Chemistry 69: 1853-1866.
- Luckner, M. 1990. Secondary metabolism in microorganism, plants and animals.3 ed. Gustav Fischer Verlag, Jena. 563 p.
- Mann, J. 1987. Secondary metabolism. 2 ed. Oxford, GB, Oxford Science Publications. p. 6-9.
- Misawa, M. 1994. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites . FAO Agricultural Services Bulletin. 108: 1–87.
- Mongrand, S; Badoc, A; Patouille, B; Lacomblez, C; Chavent, M; Bessoule, J. 2005. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. Phytochemistry 66: 549-559.
- Navarro, W; Perea, M. 1996. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de las plantas. 2 ed. Heredia, CR, Ed EUNA. 104 p.

- Phillipson, D. 1982. Chemical investigations of herbarium material for alkaloids. *Phytochemistry* 21: 2441-2456.
- Taylor, C. (s.f). Rubiaceae. *In* Hammel, B; Garyum, M; Herrera, C; Zamora, N. eds. *Manual de plantas de Costa Rica*. Missouri Botanical Garden. St Louis, USA, Instituto Nacional de Biodiversidad. Heredia, CR y Museo Nacional de Costa Rica. San José, CR. (en preparación).
- Vargas, G; Celis G; Viera D. 2001. Árboles y arbustos del Centro de Conservación Santa Ana. San José, CR, Ed. Fundación Pro Zoológicos. 94 p.
- Werpy, T; Petersen, G. 2004. Top value added chemicals from biomass. Results of screening for potencial candidates form sugars and synthesis gas. Pacific Northwest National Laboratory and National Renewable Energy Laboratory. Oak Ridge US. 76 p.
- Zhong, J. 2002. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94: 591-599.

**CAPITULO II. ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE
SUSPENSIONES CELULARES DE *Psychotria parvifolia*
BENTH**

RESUMEN

Se desarrolló un protocolo para el establecimiento *in vitro* de la especie *Psychotria parvifolia*. La mejor metodología de desinfección para las semillas presentó un 69,2% de explantes libres de contaminación. El porcentaje de germinación de las semillas fue de un 17,54% y el desarrollo de la plántula tardó cuatro meses. La mayor formación de callo friable, un 33,33%, se obtuvo en el medio de cultivo MS con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 1 mg/l) y cinetina (0,1 mg/l).

Palabras claves: *Psychotria parvifolia*, suspensión celular, 2,4-D, cinetina, semilla.

INTRODUCCION

El cultivo de células vegetales y los recientes avances en biotecnología son una alternativa para producir compuestos en condiciones artificiales controladas. La obtención de metabolitos, mediante diferentes estrategias, ha sido de interés para el hombre durante años, debido a la importancia económica que tienen muchos, por su uso en diversas industrias como la farmacéutica. En general, los metabolitos más atractivos para la industria mencionada son aquellos a los que se les designa con el término de metabolitos secundarios. El término secundario se le adjudicó a estos compuestos por no comprender en su momento la importancia que tienen para los organismos que los producen, tanto que se les llamó inclusive “moléculas de desecho o sobros metabólicos” (Kutchan, 2001).

En la mayoría de los casos, estos compuestos, a diferencia de los generados como producto del metabolismo primario, tienen una distribución restringida en el reino vegetal, y se encuentran sólo en ciertas familias y ciertas especies (Verpoorte *et al.*, 1998, Saito y Mizukami, 2002). Además, estas moléculas no tienen una función directa en el crecimiento y desarrollo de la planta, ni un rol continuo en procesos como fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes y formación de carbohidratos o lípidos. Por lo general, el hombre los ha utilizado como materia prima para diferentes industrias (Pasquali *et al.*, 2006).

La lista de compuestos naturales con importancia en la industria farmacéutica y alimentaria, que pueden ser producidos por medio del cultivo de células vegetales en grandes cantidades se ha incrementado en los últimos años. Ejemplos de ellos son la obtención del paclitaxel (Taxol®), de la vinblastina y vincristina a partir de *Catharanthus roseus* y de la berberina mediante el cultivo de células de *Coptis*, que acumulan más de 7 g/l del alcaloide (Pasquali *et al.*, 2006, Julsing *et al.*, 2007).

Por lo general, la producción de compuestos se ha realizado mediante el cultivo de células y tejidos, principalmente generando primero un callo y luego la formación de suspensiones celulares. El callo se define como un crecimiento de células desorganizado que se obtiene de diferentes tipos de explantes y en donde su formación inicia con el cultivo de órganos o tejidos diferenciados, los cuales después se desdiferencian ante la presencia exógena de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Kosky, 1998). Por su parte, el cultivo de células en suspensión son un conjunto de células aisladas o agregados celulares distribuidos en un medio líquido, que no sólo se emplean para la obtención de metabolitos secundarios, sino para embriogénesis somática, determinación de crecimiento y diferenciación de células, organogénesis, y estudios de nutrición, entre otros. Un cultivo de células en suspensión se puede establecer partir de callos, pero depende de la friabilidad del tejido (facilidad de separación de las células después de una división celular) (Kosky, 1998).

El crecimiento de células vegetales en la mayoría de los casos presenta un crecimiento sigmoide, como el bacteriano. Las células presentan una fase de reposo o latencia, después aceleran la división celular (fase exponencial) y finalmente, se realiza un subcultivo de las células para evitar que lleguen a la fase estacionaria o disminución progresiva del crecimiento (Kosky, 1998, George *et al.*, 2008).

En países tropicales, como el nuestro, existe una amplia gama de familias de plantas por investigar que podrían ser una fuente potencial de compuestos producto del metabolismo secundario de interés para diferentes industrias. Por ejemplo, la familia Orchidaceae, la más numerosa de todas las del mundo por contener cerca de 20,000 especies y con alrededor de 1300 especies en nuestro país, es una de las familias que podría ser investigada mediante cultivo *in vitro* (Morales, 2005). Otra de las familias de plantas de angiospermas más numerosas

es la Rubiaceae, con 10,700 especies distribuidas en 637 géneros y que posee importancia económica por el uso como plantas ornamentales y por la obtención de drogas y tintes (Montiel, 2000, Mongrand *et al.*, 2005, Gerlach *et al.*, 2010).

Uno de los géneros de la familia Rubiaceae más estudiados es *Psychotria*, que comprende cerca de 1500 especies. Este género es fuente de poliindoles, indoles monoterpenos y alcaloides que tienen residuos de glucosa con aplicaciones en sistemas biológicos e industria farmacológica con propiedades aún desconocidas, como por ejemplo, el bahienósido (Paul *et al.*, 2003). Además, algunas especies dentro del género tienen compuestos con propiedades citotóxicas, alucinógenas, antimicrobianas, antivirales, analgésicas y antitumorales (Kuo *et al.*, 2001; Pasquali *et al.*, 2006).

La especie *Psychotria parvifolia*, conocida en Costa Rica como *cafecillo*, produce compuestos fenólicos como la vainillina y el ácido vainillínico que se derivan de la ruta de los fenilpropanoides y otras moléculas procedentes del metabolismo de ácidos grasos (Fuentes, 2004).

Por lo tanto, el interés particular de esta investigación se enfocó en la especie *Psychotria parvifolia* Benth, su establecimiento *in vitro* para la formación de callo y suspensiones celulares. Para ello, se evaluaron factores como metodologías de desinfección, concentración y tipos de reguladores de crecimiento para formación de callo y establecimiento de suspensiones celulares, que pudieran influir en la obtención de productos naturales en suspensiones celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en los laboratorios de la Escuela de Química y en los del Área de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica.

El material vegetal se recolectó en San Rafael de Heredia, Costa Rica, en las siguientes coordenadas geográficas: 10° 08' 18" N y al 84° 08' 17" O, en un bosque secundario bajo el pago de Servicios Ambientales, perteneciente a la Empresa de Servicios Públicos de Heredia.

Tratamientos de desinfección y establecimiento *in vitro* de semillas y hojas

Se seleccionaron frutos y hojas sin síntomas de contaminación por hongo, bacteria o levadura, ni lesión mecánica o física. Para el establecimiento *in vitro* de la especie se evaluaron doce tratamientos de desinfección superficial de frutos y cuatro para el caso de las hojas (Cuadro 1). En todos los tratamientos, después de la desinfección con hipoclorito de sodio, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, en una cámara de flujo laminar.

Semillas: para la extracción aséptica de las semillas, se eliminó la mayoría de la *drupa carnosa del fruto*. En condiciones asépticas se cultivaron de tres a cuatro semillas por frasco de cultivo (tipo alimento para bebé) que contenía 20 ml de medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado estaba compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (MS 1962), con 0,1 mg/l de tiamina, 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 0,5 mg/l de piridoxina, 2 mg/l de glicina, 100 mg/l de inositol, 3% (m/v) de sacarosa y 0,7% (m/v) de agar, y ajustado a un pH 5,8 (Murashige y Skoog, 1962). El medio se esterilizó por autoclavado durante 20 minutos a 121°C y una presión de 1,1 kg/cm² (Fuentes, 2004).

Las semillas se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, a un fotoperíodo de 12 horas luz y una intensidad lumínica de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para su germinación. Semanalmente, y por un periodo de 2 meses, se evaluaron factores como: porcentaje de germinación, contaminación (hongo o bacteria), número de brotes aéreos y radicales, número de hojas formadas, necrosis o clorosis.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de semillas y hojas de *Psychotria parvifolia*, en orden secuencial de pasos

Tratamiento	Tipo de explante	Flujo constante en agua del grifo (min)	Tiempo de exposición				Tiempo exposición NaClO (2,0%) (min)
			Detergente líquido al 17%, marca Member's Selection ² (horas)	Sacarosa 20% (horas)	Benlate 2 g/l+ Terramicina 2 g/l (min)	Etanol 70% (min)	
A	Fruto	15	0,16	-	10	-	15
B	Fruto	10	0,16	-	10	-	40
C	Fruto	-	6	-	-	2	20
D	Fruto	-	6	24	-	2	25
E	Fruto	-	6	24	-	2	20
F	Fruto	-	6	24	-	2	15
G	Fruto	-	6	24	-	2	30
H	Fruto	-	6	-	-	2	20
I	Fruto	15	1	-	-	5	20
J	Fruto/Hoja	15	-	24	-	-	10
K*	Hoja	15	0,083	-	-	5	20*
L	Hoja	15	0,083	-	-	1	20

*El tratamiento K fue el único que se utilizó con una concentración de NaClO (2,5%).

² Detergente líquido 17% (i.a surfactantes anionicos y no ionicos) marca Member's Selection

A las semillas que no fueron capaces de romper la cubierta seminal durante el proceso de germinación se les eliminó la cubierta con un bisturí en la cámara de flujo laminar. Posteriormente, las plántulas germinadas se seccionaron en segmentos de 2 cm de longitud, compuestos por una hoja, un nudo y su respectivo segmento de entrenudo, y se cultivaron de 3 a 4 segmentos en el medio de cultivo MS descrito anteriormente. Las plántulas se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, a un fotoperíodo de 12 horas luz y una intensidad lumínica de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Hojas: se utilizaron las hojas más jóvenes de plantas adultas en el campo, según la ubicación geográfica descrita en la página 35. Las hojas tenían un tamaño aproximado de 1,5 cm de largo. Se desinfectaron con los tratamientos B, J, K y L (Cuadro 1).

Las hojas se seccionaron eliminando la parte basal y apical de la lámina y se hicieron discos de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ que se colocaron con el haz en contacto con el medio de cultivo. El medio de cultivo fue el MS descrito en la página 35.

Los segmentos de hoja se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas luz y una intensidad lumínica de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La presencia de contaminación (hongo o bacteria), necrosis, clorosis y oxidación se evaluaron semanalmente durante 15 días.

Inducción *in vitro* de callos: se utilizaron dos tipos de explantes: semillas y hojas. La desinfección de las semillas se realizó con los tratamientos del A al J (Cuadro 1). La extracción de las semillas se realizó con la metodología descrita en la página 35.

En el caso de las hojas, se utilizaron los segmentos de lámina foliar que se encontraron libres de contaminación después de los 15 días de evaluación, posterior al establecimiento *in vitro* descrito en la página 37. Lo anterior, con el fin de optimizar los recursos empleados en el proceso de establecimiento *in vitro* de hojas, ya que durante este proceso se obtienen altos porcentajes de contaminación y se desperdiciaría el regulador de crecimiento si la introducción se efectúa en un medio con su presencia. Además, al disminuir la presencia de reguladores de crecimiento los costos de establecimiento *in vitro* de las especies son menores.

Posteriormente, los dos tipos de explantes (semillas y segmentos de hoja) se cultivaron en el medio de cultivo MS descrito previamente, suplementado con 1 mg/l de ácido 2,4-D y 0,1 mg/l de KIN (tratamiento H) (Cuadro 2) ajustado a un pH 5,8. Para el caso de las semillas el embrión se colocó en contacto con el medio de cultivo y las hojas se colocaron con el haz en contacto con el medio de crecimiento.

Para la formación de callo friable, los callos formados se subcultivaron cada 30 días en el mismo medio de cultivo utilizado para la inducción. Para su multiplicación cada callo se separó en pequeñas fracciones. Todos los explantes, se mantuvieron en oscuridad a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se evaluó semanalmente, por un período de 3 meses, la formación de callo friable y la presencia de algún tipo de contaminante (hongo o bacteria).

Para el caso específico de las hojas, además del tratamiento antes mencionado, se evaluó la respuesta a los tratamientos descritos en el cuadro 2, pero en un medio de cultivo MS en estado líquido. Cada frasco de cultivo consistió de un Erlenmeyer de 50 ml con 10 ml de medio de cultivo según el tratamiento. Los medios se esterilizaron por autoclavado durante 20 minutos a 121°C y una presión de 1,1 kg/cm².

Los frascos se sellaron con tapones de algodón y tapas de aluminio y se mantuvieron en luz indirecta (6,13 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en constante agitación a 100 rpm a 25 ± 2 °C. En cada experimento se emplearon 15 réplicas.

Semanalmente, por un período de 2 meses, se evaluaron tanto la formación de callo friable y la formación de una suspensión celular; así como la presencia de algún tipo de contaminante (hongo o bacteria).

Finalmente, cada mes se realizó la sustitución de 5 ml del medio de cultivo con medio fresco del tratamiento correspondiente. La sustitución de medio consistió en eliminar con una pipeta estéril 5 ml del medio de cultivo y reemplazarlo por 5 ml del medio fresco del tratamiento correspondiente estéril, para un volumen total de 10 ml.

Cuadro 2. Tratamientos para inducir la formación de callos en hojas de *Psychotria parvifolia*

Tratamiento	BAP (mg/l)*	2,4-D (mg/l)	KIN (mg/l)
A	1	2	
B	2	3	
C	3	4	
D	4	5	
E		2	1
F		3	2
G		4	3
H		1	0,1
Control	-	-	-

*BAP: Bencil amino purina

Establecimiento *in vitro* de suspensiones celulares: los callos formados a partir de semillas, con alta friabilidad y de hojas de aproximadamente 1 cm de diámetro y un peso aproximado de 0,75 g se colocaron en frascos tipo Erlenmeyer de 50 ml con 10 ml del mismo medio de cultivo autoclavado, utilizado para la inducción del callo, pero en estado líquido (tratamiento H) (Cuadro 2). A pesar de que los callos provenientes de hojas no se notaban tan friables al tocarlos con pinza en la cámara de flujo laminar, se decidió utilizarlos debido a la poca cantidad de material con la que se contaba para establecer las suspensiones.

Todos los frascos se sellaron con la misma metodología descrita en la página 40. Los cultivos se mantuvieron en luz indirecta ($6,13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en agitación constante a 100 rpm a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y se subcultivaron cada 30 días (Fuentes, 2004). Para realizar el subcultivo se transfirió 5 ml de la suspensión a un nuevo frasco con 5 ml con el medio de cultivo (tratamiento H) (Cuadro 2), para un volumen total de 10 ml.

Análisis estadístico

Se calculó el porcentaje de explantes no contaminados y el porcentaje de respuesta a la formación de callos. Además se realizó un análisis de estadística no paramétrica con una prueba de Ji-cuadrado para evaluar si existe relación entre el tipo de explante y la respuesta a la formación de callo.

Se establecieron las siguientes hipótesis:

H_0 : no existe relación entre el tipo de explante y la respuesta a la formación de callo

H_1 : sí existe relación entre el tipo de explante y la respuesta a la formación de callo

El alfa utilizado fue de 0,05 grados de libertad 1, prueba de dos colas y el valor de Ji-cuadrado para el alfa y grados de libertad correspondiente fue de 3,84. Se utilizó el programa estadístico InfoStat /Profesional Versión 1.1 (Universidad de Córdoba, España).

RESULTADOS Y DISCUSION

Establecimiento *in vitro* de semillas y hojas de *Psychotria parvifolia*

La primera parte de un protocolo de introducción *in vitro* es lograr el establecimiento del cultivo en condiciones asépticas. Lo anterior, debido a que las plantas en el campo siempre están en contacto con hongos, bacterias y levaduras. En el caso de *Psychotria parvifolia* se evaluaron doce tratamientos de desinfección. Sin embargo, en todos los tratamientos hubo presencia de microorganismos (hongos y bacterias) que afectaron el crecimiento *in vitro* del cultivo. Los mejores tratamientos de desinfección para las semillas fueron el B y E, donde se obtuvo un porcentaje de explantes no contaminados entre 50,6 y 69,2% (Cuadro 3). Para la especie en estudio se puede eliminar el uso de bactericidas y fungicidas en el protocolo de desinfección, ya que el protocolo E no incluía estas sustancias (mientras que el protocolo B si los incluía) y fue el que presentó el mayor porcentaje de explantes no contaminados. Además, el protocolo E, utilizaba la exposición durante 24 horas a una disolución de sacarosa al 20% en constante agitación como un pretratamiento de desinfección superficial. Esta exposición a la sacarosa ha resultado efectiva en otros trabajos (Romero, comunicación personal³) y se creó que resulta porque los microorganismos superficiales en el explante, se reproducen en el medio de sacarosa y disminuye la carga microbiana en el explante. Además, Sale y de Fosssard (2012) también mencionan que la sacarosa favorece la germinación de las esporas de hongos y, en consecuencia, la sacarosa se puede utilizar como pretratamiento de desinfección para disminuir la presencia de contaminantes en el explante.

Otro aspecto que favoreció que el porcentaje de contaminación no fuera tan alto en semillas, es que la recolección se hizo en verano. Esta es la época en que fructifica *Psychotria parvifolia* y hay menos microorganismos presentes durante la estación seca que en la lluviosa (Burger y Taylor ,1993; León, 2000).

³ Romero, R.M.2010.Efecto de la sacarosa en metodologías de desinfección *in vitro*. Comunicación personal.

Cuadro 3. Porcentaje de explantes no contaminados después de los tratamientos de desinfección

Tratamiento de desinfección	Tipo de explante	Porcentaje de explantes no contaminados (%)
A	Semilla	15,4
B	Semilla / Hoja	50,6/ 12,9
C	Semilla	0
D	Semilla	6,7
E	Semilla	69,2
F	Semilla	6,7
G	Semilla	6,7
H	Semilla	0
I	Semilla	30,33
J	Semilla/ Hoja	9, 2/ 26,81
K	Hoja	39,45
L	Hoja	12,39

La hoja fue el otro explante utilizado para el establecimiento de la especie. El mejor protocolo de desinfección fue el K, que correspondió a la metodología utilizada por Lopes *et al.* (2000) (Figura 1).

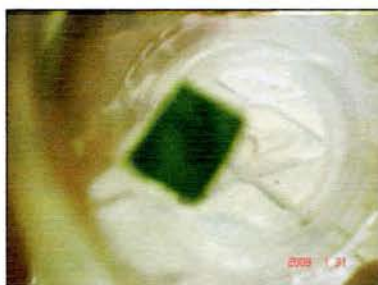


Figura 1. Lámina foliar de *Psychotria parvifolia* en un medio de cultivo MS.

Smith (2000) menciona que el tiempo de exposición al desinfectante debe ser adecuado para que no ocasione daño y el explante se logre establecer *in vitro*. En *Psychotria parvifolia*, esto se logró en el tratamiento K de 20 minutos en NaClO (2,5%). Sin embargo, la contaminación en hojas fue muy alta, cerca del 60-90% de los explantes se contaminaron con hongos. Este resultado fue similar al observado por Lara *et al.* (2003b), quienes obtuvieron un 80% de contaminación en el establecimiento *in vitro* de hojas de *Psychotria acuminata* provenientes de campo. La metodología utilizada por estos investigadores fue similar al tratamiento K, solo que sumergieron las hojas en una disolución del bactericida Agrimicin (i.a. sulfato de estreptomicina) 2 g l⁻¹ y el fungicida Benlate (i.a. benomil) en agitación constante por 2 horas.

Por otra parte, un aspecto importante para establecer un cultivo *in vitro* es el tratamiento de plantas madres en invernadero. Lo anterior favorece que la contaminación inicial de los explantes no sea tan alta, ya que tienen un pretratamiento de desinfección. En ocasiones las plantas son tratadas con funguicidas, bactericidas o productos comerciales como, Kilol L DF-100, con el fin de disminuir la presencia de microorganismos y que las plantas estén en condiciones sanitarias y fisiológicas aptas para el establecimiento *in vitro* (Jiménez *et al.*, 2006). Para el caso específico de *Psychotria parvifolia*, los explantes se trasladaron directamente del campo al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIPRONA y no se contó con plantas madres o donantes en invernadero. Este es un factor a considerar para disminuir el alto porcentaje de contaminación.

Una vez que se superó la etapa de iniciación *in vitro*, las semillas duraron aproximadamente tres meses en el proceso de germinación, desde que emergió la radícula hasta la formación de una planta completa con su parte apical y radical (Figura 2, a, b y c). Este comportamiento es similar al de otras especies herbáceas y leñosas en cultivo *in vitro*, en las cuales también se utilizó semillas como explante inicial. Semillas de *Psychotria leiocarpa* tardaron siete semanas en germinar en las mismas condiciones de cultivo evaluadas en este trabajo y su desarrollo *in vitro* fue lento (Valverde, 2000; Henriques *et al.*, 2004).

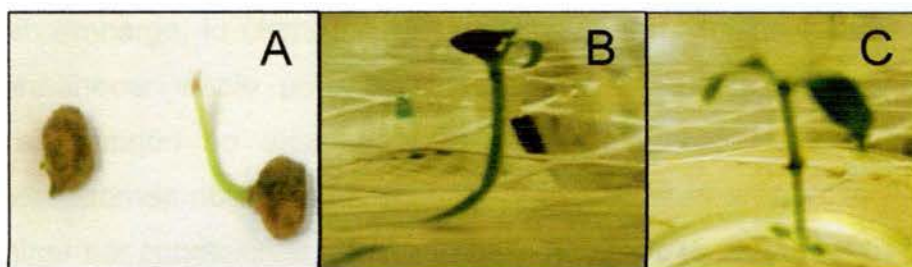


Figura 2. Proceso de germinación *in vitro* de *Psychotria parvifolia* en un medio de cultivo MS. **A.** Radícula surgida (30 días de cultivo), **B.** Plántula en proceso de germinación (60 días de cultivo) y **C.** Planta germinada (90 días de cultivo).

Además, el 82.46% de las semillas no germinaron. Estos resultados coinciden con lo investigado por varios autores, quienes mencionan que la germinación de algunas especies del género *Psychotria* es lento y que la emergencia total de la planta puede tardar de 3 a 5 meses después de la siembra de la semilla en condiciones de invernadero. Por lo tanto, el género presenta un proceso de germinación lento en invernadero e *in vitro* (Paz *et al.*, 1999, López, 1989, Araújo y Cardoso, 2006).

También, se debe recordar que existen condiciones como la temperatura, la luz, el genotipo y la madurez del embrión que influyen sobre la germinación de una semilla (Salisbury y Ross, 2000). En el caso de *Psychotria parvifolia*, la luz blanca pudo haber favorecido la germinación, ya que existe un estudio de Araújo y Cardoso (2006) en el que se menciona que la luz blanca beneficia el proceso de germinación en especies del género al compararse con plantas que germinan en la oscuridad.

En la mayoría de los casos las semillas no mostraron ninguna señal del proceso de ruptura de la cubierta, o puede ser que se trabajó con semillas que no eran viables. Sin embargo, lo último no se puede asegurar, debido a que una semilla puede permanecer viable pero ser incapaz de crecer o germinar por varias razones: el embrión no alcanza la madurez morfológica para germinar, las condiciones externas no son adecuadas o la semilla está en reposo (incapacidad para germinar por condiciones internas) (Salisbury y Ross, 2000).

En este trabajo se observó que durante el proceso de germinación de *Psychotria parvifolia* hubo semillas que no fueron capaces por sí solas de romper la cubierta de la semilla. Este podría ser un comportamiento generalizado en especies del mismo género y podría estar relacionado con la dureza de la semilla, como menciona Rodríguez (2006) para la semilla de *Psychotria ipecacuanha*.

Lo anterior se pudo presentar en *Psychotria parvifolia* debido a que los frutos para el establecimiento *in vitro* sólo se les eliminó parte de la drupa carnosa y por ende el embrión debía romper la cubierta de la semilla y el resto de la cubierta del fruto. Por lo anterior, se puede recomendar para la germinación *in vitro* de *Psychotria parvifolia* algún proceso de escarificación, como por ejemplo el utilizado por Araújo y Cardoso (2006) en *Psychotria vellosinana*, que consistió en friccionar la semillas sobre una hoja de papel lija.

También, en algunas especies tropicales se ha utilizado unos minutos de exposición de la semilla al ácido sulfúrico concentrado y la germinación mejora notablemente (Salisbury y Ross, 2000). Por lo que, este procedimiento también podría probarse para mejorar la germinación, que para este estudio fue de un (17,54%).

Inducción *in vitro* de callos de *Psychotria parvifolia*

El callo es un tejido amorfo formado cuando las células se multiplican en una forma desorganizada y, dependiendo del objetivo de investigación, estas células se pueden diferenciar y especializar (Kosky, 1998).

Durante la investigación, los dos tipos de explantes utilizados, segmentos de hoja y semillas, a los 15 días de cultivo iniciaron la deformación de tejido. Para el caso de las hojas la deformación inició en su borde. El borde de las hojas primero se enrolló y después se formaron unas protuberancias, que a los 30 días formaron callo. En las semillas la deformación inició en el embrión, después se presentaron unas protuberancias que los 30 días también formaron callo (Cuadro 4).

Sin embargo, los callos variaron entre sí en cuanto a coloración y friabilidad. Los callos provenientes de semillas tenían una coloración amarillo oscuro y los que provenían de hojas eran de color crema. Este resultado es similar al obtenido por Gatica (2002), quien obtuvo callos de coloración crema cuando utilizó hojas como explantes para la inducción de callo embriogénico en *Coffea arabica* (Rubiaceae).

Cuadro 4. Porcentaje de respuesta de los explantes al tratamiento de formación de callo después de tres meses de cultivo

Tratamiento	Tipo de explante	Respuesta a la inducción de callo (%)
A	Hoja	20
B	Hoja	26,7
C	Hoja	0
D	Hoja	0
E	Hoja	0
F	Hoja	46,7
G	Hoja	46,7
H	Hoja	66,7
H (semisólido)	Hoja	6,3
H (semisólido)	Semilla	33,3
Testigo (MS)	Hoja/semilla	0

El grado de compactación de los callos formados a partir de hoja fue mayor que la de los callos provenientes de semilla (Figura 3). Lo anterior coincide con George *et al.* (2008), quienes mencionan que los callos difieren en color, apariencia, grado de compactación y respuesta morfogénica, según el tipo de explante utilizado para la inducción. La respuesta fue diferente entre tejidos. Los tejidos jóvenes, como las semillas, responden mejor al cultivo *in vitro* que los tejidos más viejos o diferenciados como las hojas.



Figura 3. Callos de *Psychotria parvifolia* en un medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D y KIN. **A.** Callo a partir de hojas y **B.** Callo a partir de fruto.

El porcentaje de respuesta a la formación de callo no fue el mismo para los dos tipos de explantes (Cuadro 4). Sin embargo, luego de tres meses de transferencias a medio fresco cada cuatro semanas, se obtuvieron callos de apariencia friable a partir de semillas, no tanto así en hojas en el tratamiento H, ya que eran callos más compactos al tocarlos con pinza en cámara de flujo laminar (Figura 3). Lo anterior se pudo deber al efecto de los reguladores de crecimiento exógenos que se encontraban en el medio de cultivo, los que por lo general estimulan el metabolismo de las células, que pasaron de un estado quiescente a un estado de activa división. Además, de acuerdo con la literatura, la combinación de reguladores utilizados favorece la inducción de callos friables en muchas especies (Pierik, 1987; Machakova *et al.*, 2008). Sin embargo, se recomienda evaluar otras combinaciones de auxina/citocinina para inducir formación de callo en *Psychotria parvifolia*. Por ejemplo, una concentración baja de auxina (ANA) con una concentración alta de citocinina (BAP) se podría utilizar, debido a que concentraciones a estos niveles han producido callos friables y con respuesta morfogénica con hojas de especies del mismo género (Lara *et al.*, 2003 a y b).

Los callos de *Psychotria parvifolia* formados en los tratamientos evaluados en estado líquido no fueron friables, sino compactos y duros al tocarlos con la pinza. La utilización de concentraciones altas de auxina, con el objetivo de aumentar la actividad específica de enzimas que actúan sobre la disolución de la lámina media de la pared celular de la planta, así como el cambio de medio de cultivo durante tres meses consecutivos para favorecer la disgregación de células, no fueron suficientes para lograr la formación de un callo friable (Figura 4) (George ,1993).



Figura 4. Callo de *Psychotria parvifolia* en un medio de cultivo MS líquido con 2 mg/l de BAP y 3 mg/l de 2,4-D.

El balance de auxina/citocinina no favoreció la disgregación celular. La concentración de la citocinina fue alta en los tratamientos, por lo que se recomienda evaluar concentraciones menores a 1 mg/l. Algunas especies del mismo género han respondido a esos niveles de citocininas (Lopes *et al.* 2000; Lara *et al.* 2003 a y b).

En el tratamiento C (Cuadro 4) se obtuvo un 93,3% de explantes oxidados y necrosados (14 explantes) y solo uno que no tuvo respuesta a la formación de callo, pero no se oxidó, ni necrosó. Lo anterior se pudo deber a que cuando se aísla un tejido del resto de la planta, este sufre un estrés que ocasiona que el

balance hormonal y el metabolismo celular se altere. Por lo tanto, la concentración endógena de fitohormonas pudo variar en el tejido y la interacción con los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo ocasionó un cambio que pudo ser la ausencia en la respuesta a la inducción de callo (Kosky, 1998, Gatica, 2002; Gómez *et al.*, 2010).

El tratamiento H en medio líquido con hojas como explantes fue el que presentó el mayor porcentaje de respuesta: las hojas se enrollaron, cambiaron de color verde a café y formaron callo (Cuadro 4). De 15 explantes, 10 respondieron a la formación de callo. Sin embargo, estos callos eran compactos y duros, lo que no permitió establecer suspensiones celulares a partir de ellos.

Las condiciones de un cultivo líquido no favorecieron la formación de callo friable en *Psychotria parvifolia*. Este resultado difiere del de Kosky (1998), quien menciona que el inicio y establecimiento de cultivo de células se puede hacer directamente en un medio líquido a partir de hojas. Holst *et al* (1996) y Freire-Seijo *et al* (2006) han obtenido callos y hasta estructuras embriogénicas en especies como *Cyclamen*, *Solanum lycopersicum*, *Cucumis sativus* L, *Beta vulgaris* L, *Capsicum annum* L, *Viola odorata* L, *Pelargonium* y *Saccharum* spp. Híbrido, respectivamente al utilizar este método de trabajo. Por lo anterior, es viable colocar el explante directamente en un medio de cultivo líquido para formar callo. Sin embargo, en *Psychotria parvifolia* fue el medio semisólido el que lo favoreció, aunque con un porcentaje menor de respuesta (Cuadro 4).

Al realizar la prueba de estadística no paramétrica se obtuvo un valor de Ji-cuadrado de 14.55 y una probabilidad de 0.0001, por lo tanto $14.55 X_c^2 > 3.84 X_e^2$ se rechaza la hipótesis nula. En consecuencia, hubo más formación de callo cuando se utilizó la semilla como explante inicial en el tratamiento semi sólido H.

Este resultado es diferente al obtenido en especies de la misma familia de plantas e inclusive del mismo género, en las cuales se han obtenido callos con respuesta morfogenética, ya sea para la organogénesis o embriogénesis somática, utilizando hojas jóvenes y el medio de cultivo MS adicionado con una mezcla de BAP con KIN, BAP con ANA, y BAP sola, en concentraciones similares a las del tratamiento H de la presente investigación (Lopes *et al.*, 2000, Lara *et al.*, 2003a y b, Ducos *et al.*, 2007, Priyono *et al.*, 2010). Sin embargo, en *Psychotria parvifolia* el callo formado no presentó ninguna de las respuestas morfogenéticas antes mencionadas.

Lo anterior, pudo estar relacionado a la diferencia en las hormonas endógenas presentes en el tejido empelado en esta investigación en relación con las especies utilizadas por los autores antes mencionados. Además, el estado fisiológico del explante y las características de la especie son factores que influyen en la respuesta morfogenética y que conllevan a que el establecimiento *in vitro* sea particular para cada especie vegetal (Ishikawa y Evans, 1995; Pérez, 1998; García, 2001).

El embrión presente en la semilla resultó ser el mejor explante para la inducción de callo y se sugiere que se debe a su estado fisiológico y edad ontogenética. Las semillas inmaduras o maduras se utilizan como principal explante en dicotiledóneas para iniciar el cultivo de callos, debido a que el embrión es un tejido juvenil que usualmente responde mejor al cultivo de tejidos porque es más fácil de desdiferenciar en un medio de cultivo artificial con las condiciones adecuadas (Pierik, 1987; Benson, 2000; Smith, 2000). Además, la diferencia en la formación de callo también se pudo deber a que los tejidos (explantes) presentan niveles diferentes de fitohormonas, que interactúan de forma desigual con los reguladores de crecimiento del medio de cultivo y provocan una respuesta variable en condiciones *in vitro* (Smith, 2000; Gómez *et al.*, 2010).

Establecimiento *in vitro* de suspensiones celulares

Las células en suspensión se definen como un conjunto de células aisladas o de agregados de ellas distribuidos en un medio líquido, que se utiliza para la obtención de metabolitos secundarios, embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación de células, organogénesis, y estudios de nutrición, entre otros (Kosky, 1998).

Las suspensiones celulares se establecieron con callos compactos, formados a partir de hojas. Esto se hizo a pesar de que las características del callo no eran muy favorables para el establecimiento de suspensiones celulares. Sin embargo, se decidió realizarlo de todas maneras debido a la poca cantidad de callos de ambos explantes que se tenían y con los cuales debía lograr el establecimiento de las suspensiones. También se evaluó el establecimiento de suspensiones a partir de callos de semillas en el medio de cultivo semisólido (tratamiento H). Sin embargo, hubo diferencias en la disgregación de las células debido a las diferencias que existían en la compactación de los callos utilizados (Figura 5 A). Los callos formados a partir de hojas se notaban más duros y compactos al tocarlos con la pinza, que los formados a partir de semillas. Por lo tanto, los callos formados a partir de semillas se disgregaban con facilidad al tocarlos con la pinza, lo que favoreció una proliferación de las células en el medio de cultivo líquido.

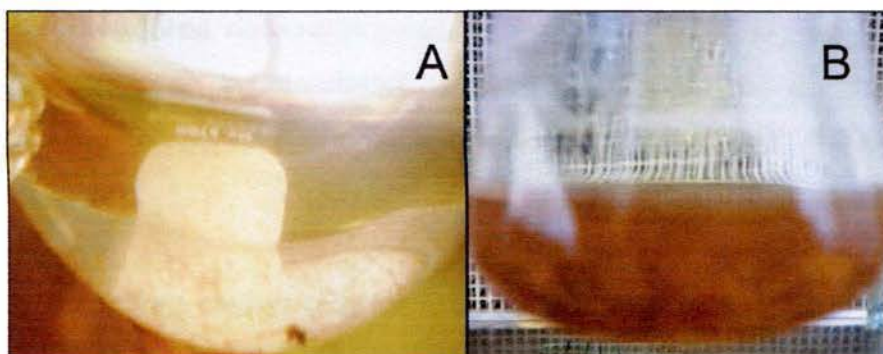


Figura 5. Suspensiones celulares de *Psychotria parvifolia* en un medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D y KIN. **A** Suspensión celular formada a partir de callo de hoja **B**. Suspensión celular formada a partir de callo de semilla.

Las suspensiones celulares formadas a partir de callos originados de semillas mostraron mayor dispersión celular y se pudieron subcultivar al mes de iniciado el cultivo (Figura 5 B). La suspensión celular se logró establecer porque las células del callo formado después de la dediferenciación celular se dividieron intensivamente bajo los efectos de los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo y fueron capaces de disgregar células. Lo contrario se presentó en la suspensión obtenida a partir de hojas, donde el callo formado fue menos friable y al mes de cultivo sólo se pudo hacer cambio de medio de cultivo. A pesar de lo anterior, no se puede establecer todavía que el callo formado a partir de hojas no es capaz de formar una suspensión celular. Esto debido a que se requiere de un periodo de adaptación al medio líquido, etapa que se conoce como desagregación y que depende del grado de friabilidad del callo utilizado.

Pero, para este caso en particular, es posible modificar componentes del medio de cultivo, como reguladores del crecimiento (auxinas y citocininas), calcio, hierro y azúcares, para mejorar la friabilidad del tejido y optimizar el protocolo de establecimiento de suspensiones celulares (Pierik, 1987, Kosky, 1998, Razdan, 2002).

El aumento de biomasa celular (Figura 5 B) se logró en menor tiempo (4 meses) en las suspensiones originadas a partir de semillas. Lo anterior se pudo deber a la naturaleza del callo, ya que como se mencionó anteriormente el callo de semilla era más friable, mostró mayor dispersión celular y las células después de la desfiliación celular se dividieron intensivamente bajo los efectos de los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo y fueron capaces de disgregarse células.

Las suspensiones celulares de callos provenientes de semillas se subcultivaron cada mes durante un año y las suspensiones se conformaron de agregados celulares y células en dispersión de coloración café claro, que se utilizaron para realizar el análisis químico.

LITERATURA CITADA

- Araújo, C; Cardoso; V. 2006. Storage in cerrado soil and germination of *Psychotria vellosiana* (Rubiaceae) seeds. *Brazilian Journal of Biology* 66 (2B): 709-717.
- Benson, E. 2000. Special symposium: in vitro plant recalcitrance, in vitro plant recalcitrance an introduction. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 36: 141–148.
- Burger, WC; Taylor, CM. 1993. Flora costaricensis, Family #202 Rubiaceae. *Fieldiana* 33: 1-333.
- Ducos, J; Labbe, G; Lambot, C; Petiard. 2007. Pilot scale process for production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 43 (6): 652–659.
- Fuentes, A. 2004. Estudio fitoquímico de *Psychotria parvifolia* Benth planta silvestre y su cultivo *in vitro*. Tesis Magister Scientiae en Química. San José, CR, Universidad de Costa Rica. 108 p.
- Freire-Seijo, M; Kosky, R; Herrera, I; Reyes, M. 2006. Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de azúcar a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 6 (1): 51–57.
- García, E. 2001. Propagación masiva de begonia (*Begonia rex*) y violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). In Perea, M. ed. *Biotecnología Agrícola: Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*. Editorial Guadalupe. Colombia. P 127-136.

- Gatica, A. 2002. Regeneración de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Caturra y Catuaí) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hojas. Informe final de práctica de especialidad Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Cartago, CR, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 92 p.
- George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture. (Chapter 1:Plant tissue culture techniques). 2 ed. Editorial Exegetics Limited. UK.574 p.
- George, E. 2008. Plant Tissue Culture Procedure Background. *In* George, E; Hall, M; Jan de Klerk, G. eds. Plant Propagation by tissue culture. 3 ed. Editorial Springer. Nertherlands.479 p.
- Gerlach, S; Burman, R; Bohlin, L; Mondal, D; Goransson. 2010. Isolation, characterization and bioactivity of cyclotides from the Micronesian plant *Psychotria leptothyrsa*. *Journal of Natural Products* 73: 1207–1213.
- Gómez, P; Iracheta, L; Castellanos, M; Méndez, I; Sandoval, A; Aguirre, J; Ojeda, M; Gutiérrez, A. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33 (3): 205–213.
- Henriques, A; Lopes, S; Paranhos, J; Gregianini, T; Von Poser, G ; Fett-Neto, A ; Schripsema, J. 2004. N, β -d- Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leicocarpa*. *Phytochemistry* 65: 449–454.

- Holst, G; Mare, K; Wiert, M; Postman, H; Abbestee, R. 1996. Somatic embryogenesis method. United States Patent. Patent number 5,587,312.
- Ishikawa, H; Evans, M. 1995. Specialized zones of development in roots. *Plant Physiology* 109: 725–727.
- Jiménez, VM; Castillo, J; Tavares, E; Guevara, E; Montiel, M. 2006. *In vitro* propagation of the neotropical bamboo, *Guadua angustifolia*, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 389–395.
- Julsing, M; Quax, W; Kayser, O. 2007. The engineering of medicinal plants: prospects and limitations of medicinal plant biotechnology. *In* Kayser, O; Quax, O. eds. *Medicinal plant biotechnology*. Weinheim, GER, Wiley-VCH. p. 1-8.
- Kosky, R. 1998. Cultivo de células y tejidos. *In* Pérez, J. ed. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de Plantas. p. 25-44.
- Kuo, Y; Chen, C; Tsai, W; Ho, Y. 2001. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in vero cell by *Psychotria serpens*: relations to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Research* 51: 95-109.

- Kutchan, T. 2001. Ecological Arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology* 125: 58–60
- Lara, A; Valverde, R; Gómez. 2003a. Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(1): 37-48.
- Lara, A; Valverde, R; Gómez, L; Hidalgo, N. 2003b. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(2): 7-20.
- León, J. 2000. Los nombres comunes de las plantas en Costa Rica. San José, CR, Ed Guayacán. 870 p.
- Lopes, O; Moreno, P; Henriques, A. 2000. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 259-264.
- López, H. 1989. Semilla, germinación y plántula de *Psychotria trichotoma* Mart. & Gal. *Revista Forestal Venezolana* 31:119-137.

- Machakova, I; Zazimaloya, E; George, E. 2008. Plant growth regulators I : introduction ; auxins, their analogues and inhibitors. *In* George, E; Hall, M; Jan de Klerk, G. eds. Plant Propagation by tissue culture. 3 ed. Editorial Springer. Netherlands.479 p
- Mongrand, S; Badoc, A; Patouille, B; Lacomblez, C; Chavent, M; Bessoule, J. 2005. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 66: 549-559.
- Montiel, M. 2000. Introducción a la flora de Costa Rica. 3 ed. San José, CR, Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 303.
- Morales, F. 2005. Orquídeas de Costa Rica /Orchids of Costa Rica. Santo Domingo de Heredia, CR, Ed INBio. 160 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Pasquali, G; Porto, D; Fett-Neto, A. 2006. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (4): 287-296.
- Paul, J; Maxwell, A; Reynolds, F. 2003. Novel bis (monoterpenoid) indole alkaloids from *Psychotria bahiensis*. *Journal of Natural Products* 66 (6): 752-754.

- Paz, H; Mazer, S; Martínez, M. 1999. Seed mass, seedling emergence and environmental factors in seven rain forest *Psychotria* (Rubiaceae). *Ecology* 80: 1594-1606.
- Pérez, J. 1998. Variación somaclonal. *In* Pérez, J. ed. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de Plantas. p. 105-121.
- Pierik, R. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, NL, Ed Martinus Nijhoff Publishers . 334 p.
- Priyono; Florin, B; Rigoreau, M; Ducos, J; Sumirat, U; Mawardi, S; Lambot, C; Broun, P; Pétiard, V; Wahyudi, T; Crouzillat, D. 2010. Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. *Plant Cell Reports* 29: 343-357.
- Razdan, MK. 2002. Introduction to plant tissue culture. 2 ed. Enfield, US, Science Publishers. p. 263-285
- Rodríguez, H. 2006. La utilidad de las plantas medicinales en Costa Rica. 1 a ed. Heredia, CR, EUNA. p. 9-209.
- Saito, K; Mizukami, H. 2002. Plant cell cultures as producers of secondary compounds. *In* Oksman, K; Barz, W. ed. Plant biotechnology and transgenic plants. New York, USA, Marcel Dekker. p. 77-110.

Sale, A; de Fossard, R 2012. *Abelmoschus esculentus* –The free plant TC protocol source (en línea). Consultado 14 enero 2012. Disponible en http://www.planttccases.org/mediawiki/index.php?title=Abelmoschus_esculentus

Salisbury, F; Ross, C. 2000. *Fisiología de las Plantas 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Madrid, ES, Paraninfo.Thomson Learning p. 527-985.

Smith, R. 2000. *Plant tissue culture techniques and experiments*. 2 ed. California, US, Academic Press. p. 69-81.

Valverde, L. 2000. Propagación in vitro de pilón (*Hyeronima alchomeoides*). *Uniciencia* 17: 35-38.

Verpoorte, R; van der Heijden, R; ten Hoopen, H; Memelink, J. 1998. Metabolic engineering for improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4 (1): 3-20.

**CAPITULO III. DETERMINACIÓN DE LA
CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS EN
SUSPENSIONES CELULARES Y VITROPLANTAS DE
*Psychotria parvifolia***

RESUMEN

Se realizó un análisis químico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS) a las vitroplantas y suspensiones celulares formadas a partir de callos originados de semillas de *Psychotria parvifolia*. El análisis químico mostró que la planta *in vitro* produce entre los compuestos mayoritarios ácido palmítico y 5-hidroximetilfurfural (porcentajes relativos 25 y 0,07, respectivamente). En el caso de las células en suspensión, se produjo 5-hidroximetilfurfural, ácido palmítico y fitol (porcentajes relativos 1,2, 5,4 y 1,1, respectivamente).

Palabras claves: *Psychotria parvifolia*, suspensión celular, planta *in vitro*, compuestos químicos, GC-MS.

INTRODUCCION

Las plantas son muy eficientes en la formación de compuestos orgánicos a partir de los metabolitos producidos por medio de la fotosíntesis y de compuestos inorgánicos que se encuentran en el ambiente. Esta síntesis o degradación de compuestos químicos se lleva a cabo mediante el metabolismo (Dewick, 2002). El metabolismo se refiere a todas las reacciones químicas que suceden en un organismo y es un proceso por el cual uno o más compuestos son convertidos a otros diferentes, utilizando la energía útil generada en las reacciones químicas (Roskoski, 1998).

Las vías metabólicas primarias sintetizan, degradan y convierten compuestos en todos los organismos. Sin embargo, existe un metabolismo secundario que involucra vías metabólicas con enzimas específicas. Algunos de estos compuestos o metabolitos secundarios son sintetizados en sitios que varían de acuerdo al tipo de compuesto y especie, y en la mayoría de los casos tienen una localización celular específica (Baldi *et al.*, 2007).

Los metabolitos secundarios tienen una distribución limitada en la naturaleza. No se producen bajo todas las condiciones y en la mayoría de los casos, su función es desconocida, pero beneficia al organismo que lo produce. Algunos son compuestos tóxicos contra depredadores y otros son compuestos coloridos para atraer otras especies (Dewick, 2002).

Estos compuestos naturales que producen las plantas también pueden tener efectos medicinales o terapéuticos interesantes. Sin embargo, producir compuestos naturales con rentabilidad económica, extrayéndolos directamente de las plantas es difícil. En algunos casos lo anterior se debe a la baja concentración del compuesto en la especie, a un crecimiento lento de ella, a una forma compleja de acumulación y alta susceptibilidad a las condiciones geográficas y ambientales (Baldi *et al.*, 2007). Otro problema es que la síntesis química del compuesto de interés muchas veces es poco rentable, particularmente por la gran cantidad de pasos sintéticos que se requieren para producir la mayoría de compuestos de

origen natural (Baldi *et al.*, 2007). Por los argumentos anteriores, métodos biotecnológicos como el cultivo de tejidos y específicamente el cultivo de células en suspensión son una alternativa de producción para algunos de estos compuestos

Una de las familias de plantas más numerosa de los trópicos es Rubiaceae, con 10,700 especies y 637 géneros (Mongrand *et al.*, 2005). Plantas de dicha familia producen compuestos de interés económico o farmacéutico, como: terpenoides, fenilpropanoides, antraquinonas, flavonoides y alcaloides (Phillipson, 1982). Dentro de ella, uno de los géneros más representativos y en el cual se ha detectado la presencia de compuestos de interés farmacéutico con actividad antimicrobiana, antiviral, analgésica y antitumoral es *Psychotria* (Kuo *et al.*, 2001). Por lo anterior, el interés de la presente investigación fue determinar la presencia y concentración de compuestos químicos en suspensiones celulares y plantas establecidas *in vitro* de *Psychotria parvifolia*.

Materiales y métodos

Determinación de la concentración de compuestos químicos en vitroplantas y suspensiones celulares de *Psychotria parvifolia*

Se utilizaron cuatro vitroplantas que se cultivaron en un medio de cultivo MS con 3% (m/v) de sacarosa, 0.7% (m/v) de agar y ajustado a un pH 5, 8. Los cultivos se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas luz y una intensidad lumínica de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Además, se utilizaron 99 suspensiones celulares que correspondieron a tres repeticiones. Cada suspensión celular consistió de Erlenmeyers de 50 ml de capacidad con su respectivo cierre, rotulados cada uno con números del 1 al 33. A cada uno, en una cámara de flujo laminar, se les agregó 4,5 ml de suspensión celular y 5,5 ml de medio de cultivo MS suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, 1 mg/l de 2,4-D y 0,1 mg/l de KIN, ajustado a pH 5,8, previamente autoclavado durante 20 minutos a 121°C y una presión de $1,1 \text{ kg/cm}^2$.

El volumen total en cada Erlenmeyer fue de 10 ml. Los cultivos celulares se sellaron con plástico autoadhesivo y se mantuvieron en luz indirecta ($6,13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en agitación constante a 100 rpm a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta el día correspondiente a determinar la masa fresca.

En el caso de las células en suspensión, una vez que se determinó la masa fresca, estas se congelaron a -20°C , liofilizaron y se determinó su masa seca. Posteriormente, se realizaron extracciones por triplicado con 1 ml etanol (95%) durante 20 minutos en baño ultrasónico. Seguidamente, se realizó una filtración con ayuda de pipetas Pasteur con algodón por dentro. El extracto etanólico se hizo pasar por la pipeta y el extracto que se obtuvo se recogió en un vial pequeño. Posteriormente, el extracto se evaporó para eliminar el etanol con un Speed Vac marca Savant modelo sc210 115 (Ohio, USA). Se eliminaron las grasas del extracto mediante precipitación y para ello se agregó a cada extracto 0,3 ml de metanol (100%). Seguidamente, los extractos se congelaron durante 24 horas a -20°C . Después, se realizó la filtración con pipetas Pasteur enfriadas a -20°C con algodón por dentro. El extracto desengrasado se recogió en un vial pequeño (Romero, comunicación personal⁴).

Posteriormente, el metanol presente en el extracto desengrasado se eliminó por evaporación en el Speed Vac marca Savant modelo sc210 115 (Ohio, USA). Finalmente, todas las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) (Romero, comunicación personal³). Para las vitroplantas el procedimiento fue similar al anterior, con la diferencia de que no se liofilizaron sino que se secaron en estufa a 60°C por 16 horas.

Los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se realizaron en el CIPRONA en un equipo marca Shimadzu modelo 0.05QP5000 controlado con una computadora equipada con el software GCMSsolution versión 1,2 y las bases de datos NIST 107, NIST 21 y Wiley 139.

⁴ Romero, R.M. 2008. Metodología para la extracción etanólica de compuestos celulares y tejidos de *Psychotria parvifolia*. Comunicación personal.

Para inyectar la muestra se utilizó una jeringa con capacidad para 10 μl . \pm 0,05. La columna utilizada fue una capilar de sílice, con una longitud de 30 m y un diámetro interno de 0,25 mm. Los volúmenes inyectados consistieron de 1,5 μl provenientes de las muestras disueltas en pentano (100%).

El tiempo total de corrida de cada muestra fue de 26 minutos, utilizando un flujo de 4 ml/min.

Identificación de compuestos

La interpretación del espectro de masas de cada componente se realizó con el uso del software GCMSsolution versión 1,2 y las bases de datos NIST 107, NIST 21 y Wiley 139. Cada espectro se comparó con el espectro del compuesto suministrado por las bases de datos.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística no paramétrica para determinar la mediana del porcentaje de concentración de cada compuesto en cada día de cultivo y valores de las vitroplantas, ambos datos basados en el valor del extracto etanólico correspondiente.

Resultados y discusión

Determinación de la concentración de los principales compuestos químicos detectados en suspensiones celulares de *Psychotria parvifolia*

El análisis químico se realizó con el fin de determinar la concentración de los compuestos mayoritarios, que correspondieron al mayor porcentaje de área obtenido en cada cromatograma. Se obtuvo un cromatograma por cada muestra de las 99 suspensiones utilizadas en las tres curvas de crecimiento determinadas. En la figura 1 se presenta el cromatograma obtenido a partir del extracto de células en suspensión de *Psychotria parvifolia* para la muestra 1,13 del día 13 de cultivo en la primera réplica de la curva crecimiento. En la figura se muestran 50 señales cromatográficas que corresponden a distintos compuestos. Sin embargo, es importante aclarar que no todos los picos corresponden a compuestos del metabolismo vegetal. Por lo general, en la mayoría de los cromatogramas obtenidos las señales después de la número 38 corresponden a grasas de alta masa molecular y a contaminación debida al proceso realizado.

En el cuadro 1 se presentan los 15 compuestos más representativos del metabolismo vegetal de la planta estudiada, detectados por el GC-MS. Los metabolitos se identificaron al comparar su espectro de masas (Anexo 1-15), con el suministrado por las bases de datos.

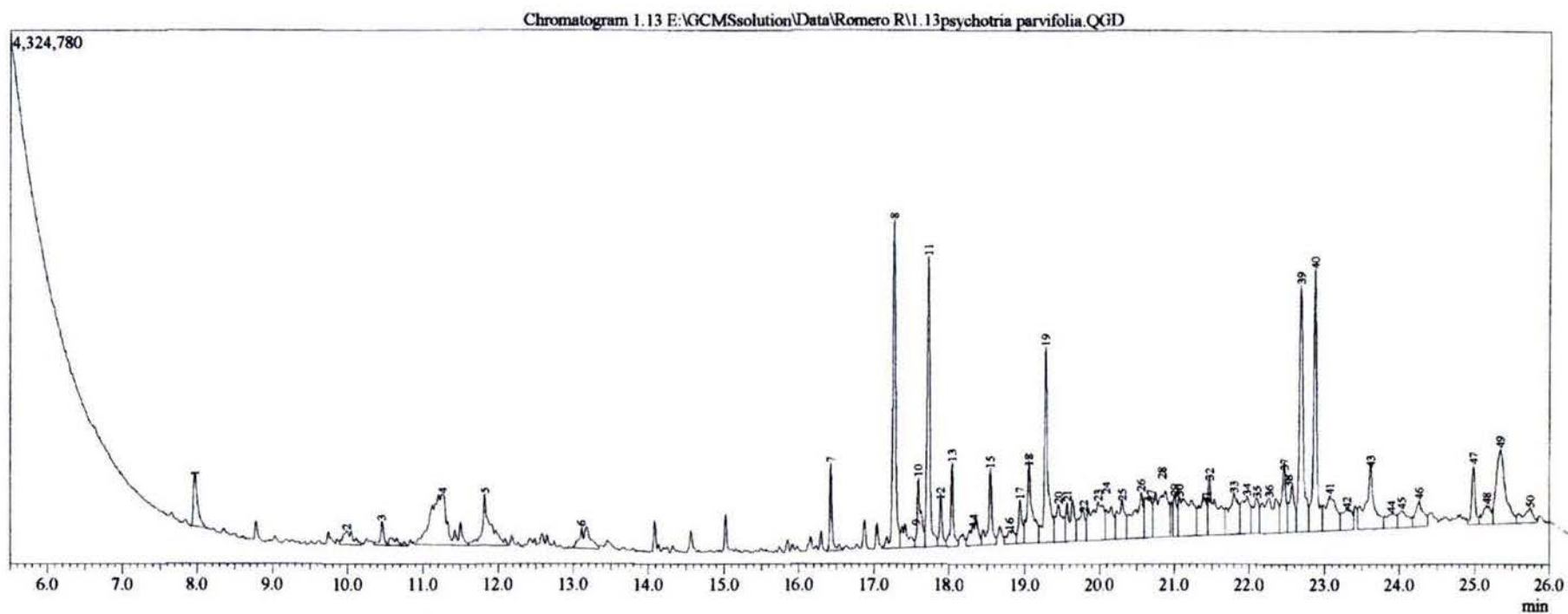


Figura 1. Cromatograma de gases del extracto etanólico de células en suspensión de *Psychotria parvifolia* para el día 13 de cultivo.

Cuadro 1. Compuestos químicos presentes en extractos de células en suspensión de *Psychotria parvifolia* detectados mediante GC-MS

Nombre del compuesto	Tiempo retención (min.)	Masa molecular	Masa de fragmento m/z (intensidad relativa)
5-hidoximetilfurfural	7,97	126	126 (32,6), 97 (62,5), 69 (31,6), 53 (18,0), 41 (100), 39 (41,6), 38 (16,6), 37 (14,2)
Dodecanol	11,50	186	(m ⁺ n.d), 112 (11,6), 111 (21,6), 98 (17,5), 97 (17,7), 96 (17,9), 84 (31,1), 83 (41,1), 82 (14,1), 73 (11,9), 71 (25,2), 70 (47,8), 69 (64,2), 68 (32,3), 67 (12,8), 57 (56,0), 57 (56,0), 56 (59,8), 55 (95,6), 54 (17,2), 43 (87,6), 42 (31,3), 41 (100), 39 (17,5)
Pentadecano	11,81	212	212 (1,2), 85 (23,0), 71 (46,9), 57 (100), 56 (14,3), 55 (17,5), 43 (90,7), 42 (11,8), 41 (40,2)

m⁺: peso molecular

nd: no detectado

Cuadro 1. Cont

Ácido laúrico	12,62	200	200 (3,6), 129 (15,8), 85 (24,7), 73 (58,9), 71 (37,2), 69 (10,7), 61 (13,2), 60 (74,7), 57 (78,8), 56 (13,7), 55 (25,8), 43 (100), 42 (19,5), 41 (56,0)
D- Galactonolactona	13,45	178	(m ⁺ n.d), 85 (14,5), 72 (100), 71 (10,0), 70 (15,4), 69 (30,8), 61 (30,7), 60 (15,0), 57 (30,5), 55 (18,3), 54 (10,4), 45 (43,3), 44 (66,7), 43 (57, 0), 42 (18,7), 41 (21,0), 39 (10,5)
Ácido mirístico	15,01	228	(m ⁺ n.d) 185 (15,3), 129 (32,3), 115 (14,8), 99 (10,0), 98 (11,4), 87 (20,4), 85 (13,2), 84 (10,8), 83 (14,3), 74 (14,3), 73 (77,2), 71 (30,8), 69 (24,4), 61 (19,9), 60 (94,9), 57 (69,3), 56 (17,7), 55 (54,4), 54 (12,4), 45 (10,4), 43(100), 42 (10,5), 41 (77, 8), 39 (12,0), 38 (10,3)

m⁺: peso molecular

nd: no detectado

Cuadro 1. Cont.

Fitol	16,38	296	(m ⁺ n.d), 124 (15,3), 123 (35,3), 111 (10,7), 109 (21,1), 97 (22,9), 96 (25,4), 95 (66,6), 85 (12,3), 83 (35,9), 82 (83,7), 81 (84,4), 79 (33,7), 71 (36,4), 70 (13,5), 69 (50,0), 68 (71,1), 67 (45,9), 57 (95,1), 56 (25,6), 55 (67,6), 53 (23,0), 43 (100), 42 (11,3), 41 (87,6), 39 (13,9)
Ácido palmítico	17,20	256	256 (8,4), 149 (37,1), 129 (22,2), 115 (10,2), 97 (12,0), 87 (15,5), 85 (15,5), 83 (15,9), 73 (75,8), 71 (30,1), 69 (24,6), 61 (22,3), 60 (85,4), 57 (67,7), 56 (16,9), 55 (57,9), 45 (10,5), 43 (100), 42 (15,9), 41 (78,2), 39 (11,7)
Dímero del 5-HMF	17,64	234	(m ⁺ n.d), 206 (11,7), 125 (12,3), 110 (50,9), 109 (98,9), 95 (18,4), 82 (48,8), 81 (100), 53 (97,5), 52 (28,4), 51 (22,9), 41 (17,5), 39 (41,9), 38 (12,6)

m⁺: peso molecular

nd: no detectado

Cuadro 1. Cont.

Antraquinona	17,72	208	208 (15,1), 207 (100), 206 (16,9), 181 (12,8), 180 (87,6), 152 (71,4), 151 (36,7), 150 (17,3), 89 (13,2), 76, 95 (13,3), 76 (67,9), 75 (26,5), 74 (12,7), 63 (25,0), 50 (28,9)
Éster metílico del ácido esteárico	18,17	294	(m ⁺ n.d), 110 (10,8), 109 (13,1), 96 (26,3), 95 (38,0), 94 (10,5), 93 (11,8), 83 (13,0), 82 (41,2), 81 (68,9), 80 (14,7), 79 (28,9), 69 (24,8), 68 (49,5), 67 (100), 55 (65,6), 54 (54,0), 53 (13,6), 43 (32,9), 41 (90,9), 39 (21,1)
Ácido oleico	19,05	282	282 (0,7), 165 (6,5), 111 (13,9), 110 (14,9), 98 (15,5), 97 (30,6), 96 (14,1), 95 (12,5), 84 (23,8), 83 (35,7), 82 (12,5), 81 (18,4), 71 (16,0), 70 (20,5), 69 (53,3), 68 (15,5), 67 (21,2), 57 (37,8), 56 (29,5), 55 (100), 54 (29,6), 45 (15,6), 43 (58,6), 42 (11,6), 41 (86,6)
Ácido esteárico	19,27	284	284 (8,0), 185 (10,4), 129 (22,6), 97 (11,9), 87 (14,0), 85 (15,3), 83 (15,00), 72 (67,6), 71 (28,6), 69 (26,6), 61 (23,0), 60 (69,2), 57 (67,8), 56 (14,8), 55 (54,9), 43 (100), 42 (15,6), 41 (73,2)

m⁺: peso molecular

nd: no detectado

Cuadro 1. Cont.

Sitosterol	19,89	414	(m ⁺ n.d), 329 (11,8), 289 (10,8), 229 (18,9), 213 (13,5), 163 (11,9), 161 (10,5), 160 (11,1), 159 (10,7), 149 (13,2), 148 (11,7), 147 (16,7), 145 (16,3), 135 (16,8), 133 (12,8), 131 (12,3), 124 (59,4), 123 (11,7), 122 (11,7), 122 (11,8), 121 (17,6), 120 (10,4), 119 (16, 6), 109 (18,7), 108 (13,1), 107 (26,2), 106 (12,4), 105 (20,5), 97 (13,0), 95 (26,5), 94 (12,9), 93 (21,5), 91 (25,1), 85 (13,8), 83 (13,6), 81 (31,1), 79 (24,5), 71 (15,2), 69 (22,3), 67 (25,6), 57 (44,2), 55 (65,9), 43 (100), 41 (55,1)
Eicosano	20,57	282	(m ⁺ n.d), 85 (28,8), 74 (13,3), 71 (49,0), 57 (100), 56 (11,0), 55 (30,6), 43 (76,3), 41 (35,2)

m⁺: peso molecular

nd: no detectado

De acuerdo con el cuadro 1, se detectó la presencia de compuestos naturales que en su mayoría se clasifican como ácido grasos, hidrocarburos saturados e insaturados, y terpenoides.

Se detectó la presencia de ácidos grasos comunes en las plantas como el ácido láurico, mirístico, palmítico, esteárico y oleico. También hubo presencia de hidrocarburos propios del metabolismo celular como eicosano, pentano y hexano que también han sido detectados en otras plantas como el cardamomo. Ambos tipos de compuestos, ácido grasos e hidrocarburos, se proponen actualmente como compuestos naturales de interés como biocombustibles (Raonizafinimanana *et al.*, 1997, Mesquita *et al.*, 2011). Además, se identificó la presencia de fitol (alcohol) que ha sido reportado en otros estudios de plantas establecidas *in vitro* (Ma y Gang, 2006; Fudouji *et al.*, 2009).

Otro compuesto de interés particular para la presente investigación fue el 5-HMF y su dímero. Como se ha mencionado previamente, este furfural tiene diferentes usos en la industria química y actualmente se utiliza como preservante y antibacterial (Gopalakrishnan, 2011). Dicho compuesto que también ha sido detectado en la planta *Mussaenda frondosa*, familia Rubiaceae (Fan *et al.*, 2011). Se considera importante debido a que es un intermediario para la síntesis de muchos compuestos de interés para el hombre y que actualmente se producen a partir de hidrocarburos (Werpy y Petersen, 2004; Leshkov *et al.*, 2006).

También se detectó la presencia de terpenoides que, por lo general, se encuentran mayoritariamente en ceras, resinas, látex y aceites de plantas.

Dichos compuestos, como el sitosterol (triterpeno, constituyente de membrana celular), y la antraquinona, se utilizan en la industria química en la fabricación de cosméticos e insecticidas naturales (Heldt, 2005).

De los compuestos presentes en las suspensiones celulares (Cuadro 1), se escogieron los tres compuestos que presentaron el mayor porcentaje relativo: el ácido palmítico (A) (5,4%), el 5-HMF (B) (1,2%) y fitol (C) (1,1%) (Figura 2, A, B y C).

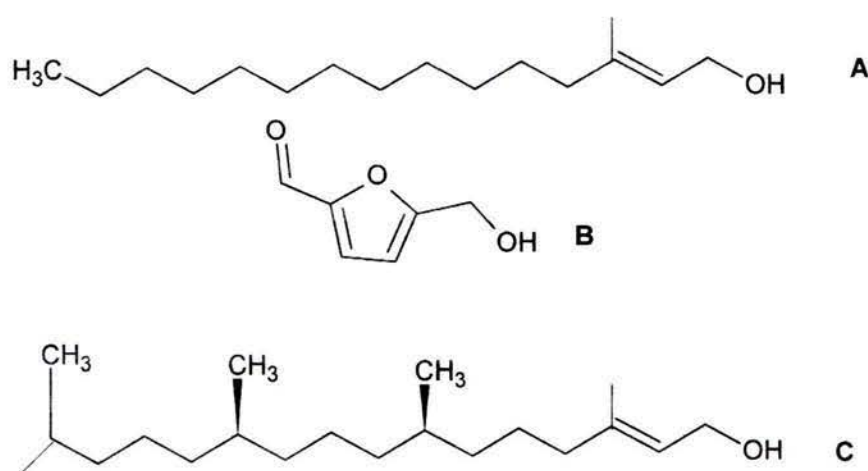


Figura 2. Estructura química de los compuestos mayoritarios en suspensiones celulares de *Psychotria parvifolia*. **A.** Ácido palmítico, **B.** 5-HMF y **C.** Fitol.

En el Cuadro 2 se presenta la concentración de los tres compuestos mayoritarios en cada día de cultivo durante el tiempo de duración de la curva de crecimiento. De acuerdo con el Cuadro 2, al inicio de la curva de crecimiento las células de *Psychotria parvifolia* no producen 5-HMF. Lo anterior, se puede deber a que en esos días las células están en una fase de adaptación al medio y el metabolismo que realizan es primario, para las funciones de la célula y, por ende, no producen compuestos secundarios (Razdan, 2002; George, 2008).

Los mayores porcentajes de concentración de 5-HMF se presentaron en los días de cultivo 13 y 16. Desafortunadamente, por la forma de la curva (datos no mostrados), no es posible decir si existe una relación entre el crecimiento celular y la formación del compuesto, tal y como se reporta para algunas plantas en cuanto a la producción de compuestos (Roskoski, 1998; Dewick, 2002).

El mayor porcentaje de concentración de ácido palmítico se presentó en el día 16. En ese día la curva de crecimiento muestra también un máximo en la producción de masa fresca (datos no mostrados). Por lo general, cuando las células están en los días de la fase exponencial, aumenta el crecimiento celular y el metabolismo (George, 2008). Es probable que esto sucediera con la planta, pero no se tiene certeza por la ausencia de una curva normal de crecimiento.

Cuadro 2. Porcentaje relativo de los compuestos químicos mayoritarios en extractos de células en suspensión de *Psychotria parvifolia* detectados mediante GC-MS

Días de cultivo	Porcentaje de compuesto		
	1 (5-HMF)	2 (ácido palmítico)	3 (Fitol)
1	n.d	10,2	0,8
4	n.d	4,4	0,3
7	n.d	3,1	0,2
10	n.d	4,5	0,3
13	3,4	3,4	0,4
16	3,9	7,1	0,2
19	0,4	1	0,2
22	0,1	2,1	0,4
25	0,9	4,3	0,3
28	0,1	0,7	0,2
31	0,4	3,6	1,1

nd: no detectado

Por otra parte, el fitol en los días 13 y 22 obtuvo los mayores porcentajes de concentración. El fitol es un diterpeno producto del metabolismo secundario, que forma la cadena lipofílica de la molécula de clorofila *a* y en consecuencia tiene una relación directa con la fotosíntesis, uno de los procesos fisiológicos más importantes en la célula vegetal (Dewick, 2002).

En el caso de las células en suspensión se sugiere que la presencia del fitol se debe a procesos propios del metabolismo celular. Lo anterior, debido a que por lo general la clorofila *a* forma su parte hidrofóbica con residuos de lípidos de membrana que se sintetizan por lo general, a partir de la hidrogenación del geranilgeranil difosfato, reportado en la literatura para plantas y no en algas fotosintéticas (Rüdiger, 2006).

En el extracto de células en suspensión no se detectó la presencia de alcaloides. Este resultado coincide con Lopes *et al.* (2000), quienes no detectaron la presencia de alcaloides en hojas, callos y suspensiones celulares de *Psychotria carthagenesis*. Además, este resultado también está acorde con el obtenido por Fuentes (2004) en la planta silvestre de *Psychotria parvifolia*, donde no se detectaron alcaloides.

Por otra parte, la célula vegetal, tejido u órgano que se cultiva *in vitro* tiene la capacidad de producir y acumular los mismos compuestos químicos que la planta silvestre (Karuppusamy, 2009). Sin embargo, en los 99 extractos de células en suspensión analizados no se detectó la presencia de los compuestos reportados como mayoritarios para la planta silvestre de *Psychotria parvifolia* (ácido vainillínico, vainillina y el siringaldehído) (Fuentes, 2004). Por lo tanto, se sugiere que las condiciones físicas y químicas del cultivo *in vitro* pudieron haber tenido un efecto sobre el metabolismo de las células en suspensión de la planta. Sin embargo, otro aspecto muy importante que se debe tener en cuenta es que existe una diferencia en el estado de desarrollo de las células en suspensión celular y las células de una planta silvestre. Por ende el metabolismo y producción de compuestos puede ser diferente (Verpoorte *et al.*, 2002).

Por otro lado, los compuestos de mayor concentración detectados en los extractos de las células en suspensión derivan de rutas metabólicas diferentes. El fitol deriva de la ruta del mevalonato, el ácido palmítico proviene de la vía del acetato y el 5-HMF es un furano que deriva de un ácido graso. Además, Funk y Brodelius (1990) reportan que, un medio de cultivo que contiene 2,4-D, tiene una influencia drástica o efecto negativo sobre el metabolismo de fenilpropanoides. Este resultado puede explicar el por qué en el medio de cultivo utilizado no se formaron los principales compuestos reportados para *Psychotria parvifolia* que derivan de la ruta del shiquimato, que implica la síntesis de fenilpropanoides (Dewick, 2002).

En *Catharanthus roseus*, por ejemplo, se ha incrementado la producción de alcaloides al eliminar las auxinas del medio (DiCosmo y Misawa, 1995). Por lo que se recomendaría eliminar las auxinas del medio o disminuir su concentración y aumentar la concentración de citocininas para investigar si este cambio favorece la expresión de rutas metabólicas típicas del género o la formación de compuestos fenólicos detectados por Fuentes (2004). Sin embargo, se debe tener en cuenta que sólo este medio de cultivo de los investigados formó un callo friable para establecer suspensiones celulares.

Compuestos mayoritarios producidos por vitroplantas de *Psychotria parvifolia*

En el extracto de las vitroplantas se detectó la presencia de al menos 76 compuestos (Figura 3). Al igual que en el extracto de las suspensiones celulares no todos los compuestos eran propios del metabolismo celular. Las señales a partir de la 56, corresponden a contaminantes debidos al proceso.

En el cuadro 3 se presentan los 15 compuestos más representativos del metabolismo vegetal detectados por el GC-MS. Los metabolitos se identificaron al comparar su espectro de masas, con el suministrado por las bases de datos (Anexo 1,3,4,6,7,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19 y 20).

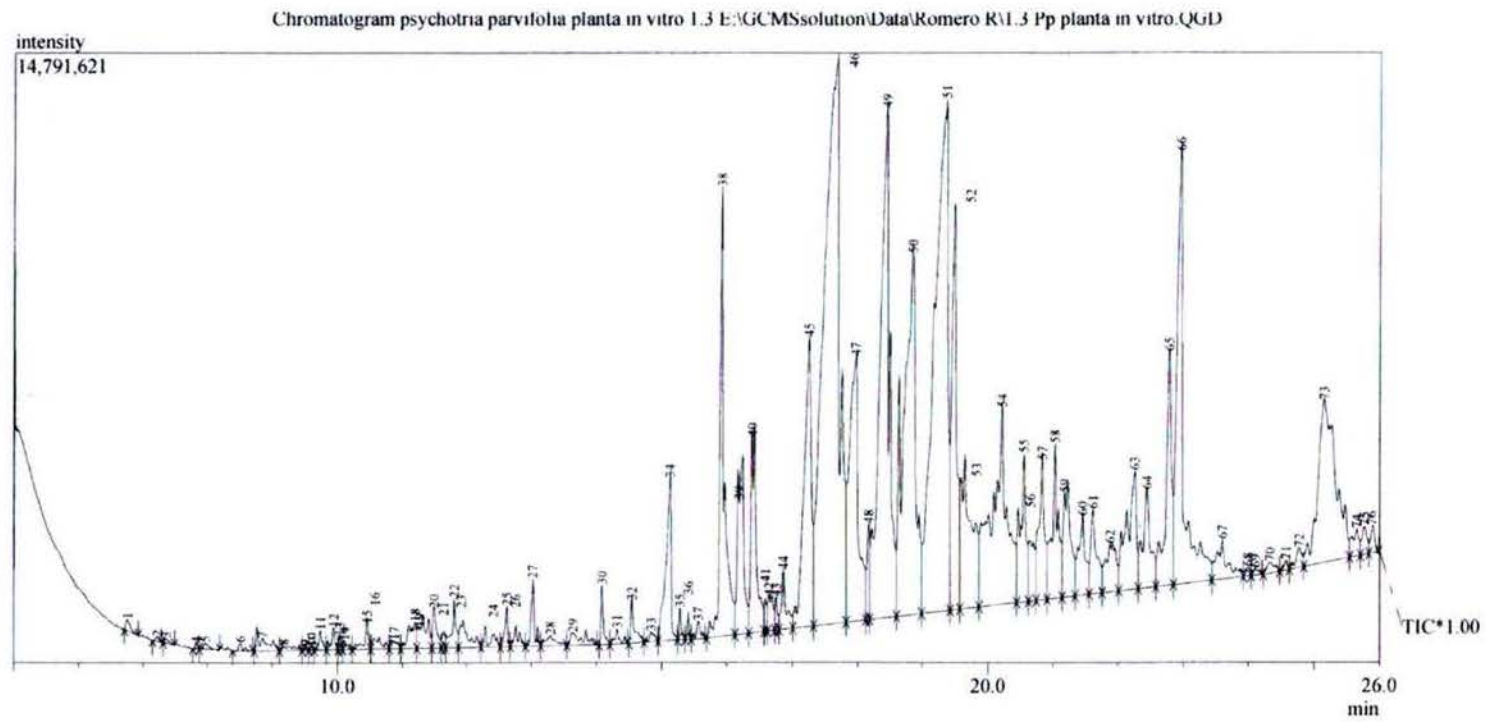


Figura 3. Cromatograma de gases del extracto etanólico de vitroplantas de *Psychotria parvifolia*.

Cuadro 3. Compuestos químicos presentes en vitroplantas de *Psychotria parvifolia* detectados mediante GC-MS

Nombre del compuesto	Tiempo retención (min)	Número de pico	Masa molecular	Masa de fragmento m/z (intensidad relativa)
5-hidoximetilfurfural	7,97	5	126	126 (32,6), 97 (62,5), 69 (31,6), 53 (18,0), 41 (100), 39 (41,6), 38 (16,6), 37 (14,2)
Ácido nonanóico	8,52	6	158	(m ⁺ n.d) 129 (14,0), 115 (14,3), 87 (10,6), 81 (10,9), 73 (58,2), 70 (13,4), 69 (10,7), 66 (6,2), 60 (100), 55 (35,1), 45 (13,4), 43 (39,8), 41 (46,0), 39 (17,1)
Resorsinol	8,82	7	110	110 (100), 82 (26,1), 81 (19,8), 69 (16,0), 55 (15,4), 54 (13,3), 53 (23,1), 43 (15,8), 39 (25,3), 38 (10,1)
Metil hexadecano	10,03	13	240	(m ⁺ n.d), 85 (21,5), 71 (46,9), 57 (100), 56 (33,5), 55 (34,1), 43 (67,4), 42 (12,2), 41 (57,7)
Pentadecano	11,81	22	212	212 (1,2), 85 (23,0), 71 (46,9), 57 (100), 56 (14,3), 55 (17,5), 43 (90,7), 42 (11,8), 41 (40,2)
Ácido laúrico	12,62	25	200	200 (3,6), 129 (15,8), 85 (24,7), 73 (58,9), 71 (37,2), 69 (10,7), 61 (13,2), 60 (74,7), 57 (78,8), 56 (13,7), 55 (25,8), 43 (100), 42 (19,5), 41 (56,0)
Hexadecano	13,10	27	226	(m ⁺ n.d), 85 (27,8), 71 (46,5), 70 (10,7), 57 (100), 56 (15,6), 55 (18,9), 43 (98,8), 42 (11,2), 41 (45,5)

m⁺: peso molecular

nd: no detectado

Cuadro 3. Cont.

Ácido mirístico	15,01	34	228	(m ⁺ n.d) 185 (15,3), 129 (32,3), 115 (14,8), 99 (10,0), 98 (11,4), 87 (20,4), 85 (13,2), 84 (10,8), 83 (14,3), 74 (14,3), 73 (77,2), 71 (30,8), 69 (24,4), 61 (19,9), 60 (94,9), 57 (69,3), 56 (17,7), 55 (54,4), 54 (12,4), 45 (10,4), 43(100), 42 (10,5), 41 (77, 8), 39 (12,0), 38 (10,3)
Neofitadieno	15,92	38	278	278 (0,8), 124 (14,6), 123 (34,7), 111 (10,1), 109 (19,1), 97 (23,8), 96 (22,7), 95 (67,8), 83 (37,7), 82 (67,3), 81 (44,3), 79 (11,9), 71 (32,3), 70 (11, 5), 69 (59, 2), 68 (94,5), 67 (52,1), 57 (87,4), 56 (22,0), 55 (79,2), 53 (14,9), 43 (100), 42(10,6), 41 (91,9), 39 (13,1)
Trans-fitol	16,38	40	296	(m ⁺ n.d), 124 (15,3), 123 (35,3), 111 (10,7), 109 (21,1), 97 (22,9), 96 (25,4), 95 (66,6), 85 (12,3), 83 (35,9), 82 (83,7), 81 (84,4), 79 (33,7), 71 (36,4), 70 (13,5), 69 (50,0), 68 (71,1), 67 (45,9), 57 (95,1), 56 (25,6), 55 (67,6), 53 (23,0), 43 (100), 42 (11,3), 41 (87,6), 39 (13,9)
Ácido palmítico	17,20	46	256	256 (8,4), 149 (37,1), 129 (22,2), 115 (10,2), 97 (12,0), 87 (15,5), 85 (15,5), 83 (15,9), 73 (75,8), 71 (30,1), 69 (24,6), 61 (22,3), 60 (85,4), 57 (67,7), 56 (16,9), 55 (57,9), 45 (10,5), 43 (100), 42 (15,9), 41 (78,2), 39 (11,7)
Éster del ácido esteárico	18,16	48	294	(m ⁺ n.d), 110 (10,8), 109 (13,1), 96 (26,3), 95 (38,0), 94 (10,5), 93 (11,8), 83 (13,0), 82 (41,2), 81 (68,9), 80 (14,7), 79 (28,9), 69 (24,8), 68 (49,5), 67 (100), 55 (65,6), 54 (54,0), 53 (13,6), 43 (32,9), 41 (90,9), 39 (21,1)
Ácido oleico	19,05	51	282	282 (0,7), 165 (6,5), 111 (13,9), 110 (14,9), 98 (15,5), 97 (30,6), 96 (14,1), 95 (12,5), 84 (23,8), 83 (35,7), 82 (12,5), 81 (18,4), 71 (16,0), 70 (20,5), 69 (53,3), 68 (15,5), 67 (21,2), 57 (37,8), 56 (29,5), 55 (100), 54 (29,6), 45 (15,6), 43 (58,6), 42 (11,6), 41 (86,6)
Ácido esteárico	19,27	52	284	284 (8,0), 185 (10,4), 129 (22,6), 97 (11,9), 87 (14,0), 85 (15,3), 83 (15,00), 72 (67,6), 71 (28,6), 69 (26,6), 61 (23,0), 60 (69,2), 57 (67,8), 56 (14,8), 55 (54,9), 43 (100), 42 (15,6), 41 (73,2)
Eicosano	20,57	55	282	(m ⁺ n.d), 85 (28,8), 74 (13,3), 71 (49,0), 57 (100), 56 (11,0), 55 (30,6), 43 (76,3), 41 (35,2)

m⁺: peso molecular

nd: no detectado

Los compuestos identificados en la planta *in vitro*, al igual que los que se detectaron en las células en suspensión, corresponden a ácidos grasos, alcoholes, y alquenos. Normalmente, este tipo de compuestos forman parte de las ceras o látex de las plantas (Taiz y Zeiger, 2002).

Uno de los compuestos presentes, el ácido nonanoico, ocurre naturalmente en plantas y animales. Este metabolito es coproducto de la oxidación del ácido oleico y se utiliza como herbicida, en productos de cuidado personal, plásticos y lubricantes (Noureddini y Rempe, 1996).

El neofitadieno fue otro de los compuestos mayoritarios, al igual que el ácido palmítico (Cuadro 4). El neofitadieno (Figura 4) es un diterpeno que tiene como precursor al ácido mevalónico (Mann, 1987, Dewick, 2002). El neofitadieno no se detectó en las suspensiones celulares analizadas, pero en la planta *in vitro* fue el que presentó el segundo mayor porcentaje relativo. De acuerdo con Loughrin (1990), el neofitadieno fue el mayor componente en hojas de *Nicotiana tabacum*, por lo que se sugiere que el neofitadieno podría ser un compuesto presente en hojas de *Psychotria parvifolia*, y por ello sólo se detectó para las vitroplantas. El 5-HMF también fue uno de los componentes mayoritarios detectados.

Cuadro 4. Porcentaje de compuestos mayoritarios producidos en vitroplantas de *Psychotia parvifolia* detectados mediante GC-MS

Compuesto	Porcentaje relativo planta <i>in vitro</i>
5-HMF	0,1
Neofitadieno	4,7
Ácido palmítico	24,8

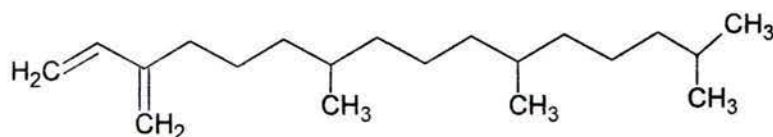


Figura 4. Estructura química de neofitadieno

Investigaciones con plantas del mismo género en estado silvestre, como es el caso de *P. klugii*, *P. colorata*, *P. corraeae*, *P. brachyceras*, entre otras, reportan la presencia de alcaloides como: cefaelina, psychotridino y brachycerina (Adjibade *et al.*, 1992, Achenbach *et al.*, 1995, Kerber *et al.* 2001, Van de Santos *et al.*, 2001, Both *et al.*, 2002, Muhammad *et al.*, 2003). Sin embargo, en las vitroplantas analizadas y al revisar los cromatogramas tampoco se detectó la presencia de alcaloides.

La ausencia de alcaloides en las vitroplantas de *Psychotria parvifolia* coincide con el resultado de Fuentes (2004), cuyo estudio fitoquímico confirmó la ausencia de ellos. Sin embargo, tampoco se presentaron los compuestos reportados para la especie: el ácido vainillínico, la vainillina y el siringaldehído.

Schröder et al. (1999) plantean que la luz puede interferir en procesos de activación de genes y diferenciación que no se expresan en condiciones de luz u oscuridad. Por lo que también se sugiere como una explicación a la diferencia en la producción de compuestos en la planta *in vitro* que se encontraba bajo luz blanca. Además, Bais et al. (2001), Funk y Brodeliust (1990), Panichayupakaranant y Tewtrakul (2002), y Pérez et al. (2004), consideran que las auxinas y citocininas tienen efecto en el crecimiento y en el metabolismo secundario de las plantas. Por lo tanto, es un aspecto a considerar en la formulación de medios de cultivos utilizados para la producción *in vitro* de compuestos.

Por lo tanto y de acuerdo con Rout et al. (2000), la acumulación de productos secundarios en células de plantas *in vitro* depende del tipo de explante utilizado, composición del medio de cultivo, incluidos tipos y cantidades de reguladores del crecimiento, sales minerales y fuentes de carbono así como, de condiciones ambientales, temperatura, luz y composición gaseosa durante el cultivo.

LITERATURA CITADA

- Achenbach, H; Lottes, M; Waibel, R; Karikas, G; Correa, M; Gupta, M. 1995. Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*. *Phytochemistry* 38 (6) : 1537-1545.
- Adjibade, Y; Weniger, B; Quirion, J; Kuballa, B; Cabalion, P; Anton, R. 1992. Dimeric alkaloids from *Psychotria forsteriana*. *Phytochemistry* 31 (1): 317-319.
- Bais, H; Sudha, G; George, J; Ravishankar, G. 2001. Influence of exogenous hormones on growth and secondary metabolite production in hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. CV. Luccknow local. *Pharmaceutical Biology* 40 (5): 336-341.
- Baldi, A; Bisaria, V; Srivastava, A. 2007. Biotechnological approaches for the production of some promising plant-based chemotherapeutics. In Kayser, O; Quaz, W. eds. *Medicinal plant biotechnology. From Basic research to industrial applications*. Weinheim, NL, WILEY-vch Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 117.
- Both, F; Kerber, V; Henriques, A; Elizabetsky, E. 2002. Analgesic properties of Umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharmaceutical Biology* 40 (5): 336-341.
- Dewick, P. 2002. *Medicinal natural products a biosynthetic approach*. Sussex, GB, Ed John Wiley Sons. p. 35-405.
- DiCosmo, F; Misawa, M. 1995. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances* 13 (3): 425-453

- Fan, C; Guan, H; Zhang, H; Wang, J; Wang, S. 2011. Conversion of fructose and glucose into 5-hydroxymethylfurfural catalyzed by a solid heteropolyacid salt. *Biomass and Bioenergy* 35 : 2659-2665.
- Fudouji, R; Tanaka, T; Taguri, T; Matsuo, Y; Kouno, I. 2009. Coupling reactions of catechins with natural aldehydes and allyl alcohols and radical scavenging activities on the triglyceride-soluble products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6417-6424.
- Fuentes, A. 2004. Estudio fitoquímico de *Psychotria parvifolia* Benth planta silvestre y su cultivo *in vitro*. Tesis Magister Scientiae en Química. San José, CR, Universidad de Costa Rica. 108 p.
- Funk, C; Brodelius, P. 1990. Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* 29 (3): 845-848.
- George, E. 2008. Plant Tissue Culture Procedure Background. *In* George, E; Hall, M; Jan de Klerk, G. eds. *Plant Propagation by tissue culture*. 3 ed. Editorial Springer. Netherlands. 479 p.
- Gopalakrishnan, S. 2011. GC-MS analysis of some bioactive constituents of *Mussaenda frondosa* Linn. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2 (1): 313-320.
- Heldt, H. 2005. A large diversity of isoprenoids has multiple functions in plant metabolism. *In* *Plant Biochemistry*. 3 ed. Editorial Elsevier Academic Press. UK. 413 p.

- Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(13): 1222 -1239.
- Kerber, V; Gregianini, T; Paranhos, J; Schwambach, J; Farias, F; Fett, J; Fett-Neto, A; Zuanazzi, J; Quirino, J; Elizabetsky, E; Henriques, A. 2001. Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *Journal of Natural Products* 64: 677-679.
- Kuo, Y; Chen, C; Tsai, W; Ho, Y. 2001. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in vero cell by *Psychotria serpens*: relations to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Research* 51: 95-109.
- Leshkov, Y; Chheda, J; Dumesic, J. 2006. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose. *Science* 312: 1933- 1937.
- Lopes, O; Moreno, P; Henriques, A. 2000. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 259-264.
- Loughrin, J; Kemp, T; Andersen, R; Hildebrand, D. 1990. Headspace compounds from flowers of *Nicotiana tabacum* and related species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (2): 455- 460.

- Ma, X; Gang, D. 2006. Metabolic profiling of turmeric (*Curcuma longa* L.) plants derived from in vitro micropropagation and conventional greenhouse cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9573-9583.
- Mann, J. 1987. Secondary metabolism. 2 ed. Oxford, GB, Oxford Science Publications. p. 6-9.
- Mesquita, F; Feitosa, F; Santiago, R; Sant' Ana, H. 2011. Density, excess volumes, and partial volumes of binary mixtures of soybean biodiesel + diesel and soybean biodiesel + *n*-hexadecane at different temperatures and atmospheric pressure. *Journal of Chemical Engineering Data* 56: 153-157.
- Mongrand, S; Badoc, A; Patouille, B; Lacomblez, C; Chavent, M; Bessoule, J. 2005. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 66: 549-559.
- Muhammad, I; Dunbar, D; Khan, S; Tekwani, B; Bedir, E; Takamatsu, S; Ferreira, D; Walker, L. 2003. Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. *Journal of Natural Products* 66 (7): 962-967.
- Noureddini, H; Rempe, M. 1996. Pelargonic acid in enhanced oil recovery. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73 (7): 939-941.
- Panichayupakaranant, P; Tewtrakul, S. 2002. Plumbagin production by root cultures of *Plumbago rosea*. *Electronic Journal of Biotechnology* 5 (3): 228-230.

- Pérez, N; Barbón, R; Capote, A; Jiménez, E; Wilken, D. 2004. Producción de taxoides en callos y suspensiones celulares de *Taxus chinensis* mediante el uso de elicitores abióticos. *Biotecnología Vegetal* 4 (3): 171-176.
- Phillipson, D. 1982. Chemical investigations of herbarium material for alkaloids. *Phytochemistry* 21: 2441-2456.
- Raonizafinimanana, B; Gaydou, É; Bombarda, I. 1997. Hydrocarbons from three *Vanilla* bean species: *V. fragrans*, *V. madagascariensis* and *V. tahitensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2542-2545.
- Razdan, MK. 2002. Introduction to plant tissue culture. 2 ed. Enfield, US, Science Publishers. p. 263-285.
- Roskoski, R. 1998. Bioquímica. Mexico D.F, MX. Mc Graw-Hill Interamericaca p. 80-95.
- Rout, G; Samantaray, S; Das, P. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18: 91-120.
- Rüdiger, W. 2006. Biosynthesis of chlorophylls *a* and *b*: the last steps. In Grimm, B; Porra, R; Rüdiger, W; Scheer, H. eds. Chlorophylls and bacteriochlorophylls biochemistry, biophysics, functions and applications. Editorial Springer. Netherlands. 189 p.
- Schröder, G; Kaltenbach, M; Schmidit, J; Strack; D; De Luca, V; Schröder, J. 1999. Light- induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloids biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. *FEBS Letters* 458: 97-102.

- Taiz, L; Zeiger, E. 2002. Plant physiology. 3 ed. Massachusetts, US, Sinauer Associates. p. 283-308.
- Van De Santos, L; Fett-Neto, A; Kerber, V; Elisabetsky, E; Quirion, J; Henriques, A. 2001. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 1185-1187.
- Verpoorte, R; Contin, A; Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1: 13-25.
- Werpy, T; Petersen, G. 2004. Top value added chemicals from biomass. Results of screening for potencial candidates form sugars and synthesis gas. Pacific Northwest National Laboratory and National Renewable Energy Laboratory. Oak Ridge US. 76 p.

CAPITULO IV. DISCUSION GENERAL

Actualmente, la destrucción de aéreas boscosas y el incremento en el uso de los compuestos de las plantas para uso medicinal, farmacológico y en industria, como la alimentaria, han promovido el uso de la biotecnología para la producción de compuestos de interés (Rout *et al.*, 2000).

Durante la presente investigación se desarrolló un protocolo para el establecimiento *in vitro* de *Psychotria parvifolia* y para el establecimiento de suspensiones celulares para determinar los compuestos que las células producen. El establecimiento *in vitro* de la especie fue un poco difícil. En todas las metodologías de desinfección utilizadas se detectó presencia de microorganismos. Los microorganismos ocasionan que la planta no se establezca *in vitro*, e inclusive causan la muerte del explante (Alvarado, 1998).

Se utilizaron dos tipos de explantes para iniciar el cultivo *in vitro*, hoja y semilla. Se presentó diferencia en el porcentaje de contaminación entre los dos tipos de explantes. Las hojas siempre presentaron mayor contaminación. La semilla fue el mejor explante para el establecimiento *in vitro* de la especie. Lo anterior, se pudo deber a que el fruto y su drupa carnosa protegieron a la semilla de los contaminantes y efectos negativos que pudiese ocasionar el agente desinfectante (Kosky, 1998). Sin embargo, siempre hubo presencia de microorganismos indeseados.

Las semillas duraron casi cuatro meses en germinar, y tuvieron un crecimiento muy lento. Sin embargo, de acuerdo con Valverde (2000), lo anterior es típico de las especies leñosas y forestales en cultivo *in vitro*, y además, su comportamiento fue similar al de *Psychotria leucocarpa* (Henriques *et al.*, 2004). Para facilitar la germinación de la planta en condiciones *in vitro*, se recomienda evaluar algún proceso de escarificación de la semilla.

Las hojas establecidas *in vitro* formaron callos con muy baja friabilidad. A pesar de ello, se utilizaron estos callos para intentar el establecimiento de suspensiones celulares debido a la poca cantidad de callo con la que se contaba, aunque sin

éxito. No obstante, no se puede concluir que la hoja no sea capaz de formar un callo friable, se sugiere modificar las condiciones del medio de cultivo específicamente la combinación de reguladores del crecimiento auxina/citocinina y sus concentraciones para evaluar el efecto sobre la inducción de callo friable en hojas como explante inicial.

Las semillas *in vitro* fueron capaces de formar callos friables, necesarios para el establecimiento de suspensiones celulares. Sin embargo, el crecimiento de las células y la multiplicación de ellas para realizar la determinación de la curva de crecimiento (datos no mostrados) tardaron doce meses. Por lo anterior, se sugiere evaluar otro tipo de combinación de auxina/citocinina como ANA y KIN, para mejorar la respuesta de las semillas a la inducción de callo. Una vez formados callos friables se podría modificar condiciones físicas como luz, densidad inicial de formación de suspensión celular y velocidad del agitador orbital para evaluar el efecto sobre el crecimiento celular (Kosky, 1998; George, 2008).

Las suspensiones celulares produjeron principalmente 5-HMF, ácido palmítico y fitol, mientras que la planta, también en condiciones *in vitro* produjo, además de los dos primeros, neofitadieno.

Se presentó diferencia en cuanto a la cantidad de 5-HMF sintetizada en los dos tipos de cultivo. Se produjo "55 veces más cantidad" de 5-HMF en las suspensiones celulares que en la planta. Se debe tener en cuenta que los tipos de explantes eran diferentes y las células presentan diferentes estados de diferenciación bioquímica y morfológica, por lo tanto la producción de compuestos *in vitro* de *Psychotria parvifolia* no debía ser igual.

La cantidad detectada del compuesto de interés para la presente investigación en los extractos de las suspensiones celulares es bajo. Sin embargo, existen varias estrategias que se pueden utilizar para mejorar la producción de él. Por ejemplo, se pueden cambiar varias condiciones del cultivo, así como seleccionar la línea celular más productora y la incorporación de elicitores (como constituyentes de la

pared celular de microorganismos) para inducir la formación de metabolitos secundarios (Verpoorte *et al.*, 1998; Rout *et al.*, 2000).

La producción del 5-HMF ya había sido reportada en suspensiones celulares de *P. parvifolia*. Sin embargo, en la planta silvestre se reportaron otros compuestos que no se detectaron en la planta *in vitro* como la vainillina, el ácido vainillínico y el siringaldehído (Fuentes 2004). Además, durante el estudio realizado tampoco se detectó la presencia de alcaloides ni en los extractos de las suspensiones celulares ni en los extractos de las vitroplantas analizadas, resultado que coincide con el de Lopes *et al* (2000), quienes detectaron la ausencia de alcaloides en hojas, callos y suspensiones de *Psychotria carthagenesis* y Fuentes (2004) en el análisis fitoquímico de la planta silvestre de *Psychotria parvifolia*.

LITERATURA CITADA

- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. *In* Pérez, J. ed. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de Plantas. p. 81-104.
- Fuentes, A. 2004. Estudio fitoquímico de *Psychotria parvifolia* Benth planta silvestre y su cultivo *in vitro*. Tesis Magister Scientiae en Química. San José, CR, Universidad de Costa Rica. 108 p.
- George, E. 2008. Plant Tissue Culture Procedure Background. *In* George, E; Hall, M; Jan de Klerk, G. eds. Plant Propagation by tissue culture. 3 ed. Editorial Springer. Netherlands. 479 p.
- Henriques, A; Lopes, S; Paranhos, J; Gregianini, T; Von Poser, G ; Fett-Neto, A ; Schripsema, J. 2004. N, β -d- Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leicocarpa*. *Phytochemistry* 65: 449–454.
- Kosky, R. 1998. Cultivo de células y tejidos. *In* Pérez, J. ed. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de Plantas. p. 25-44.
- Lopes, O; Moreno, P; Heriques, A. 2000. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 259-264.

Rout, G; Samantaray, S; Das, P. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18: 91-120.

Valverde, L. 2000. Propagación in vitro de pilón (*Hyeronima alchorneoides*). *Uniciencia* 17: 35-38.

Verpoorte, R; van der Heijden, R; ten Hoopen, H; Memelink, J. 1998. Metabolic engineering for improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4 (1): 3-20.

ANEXOS

ANEXO 1

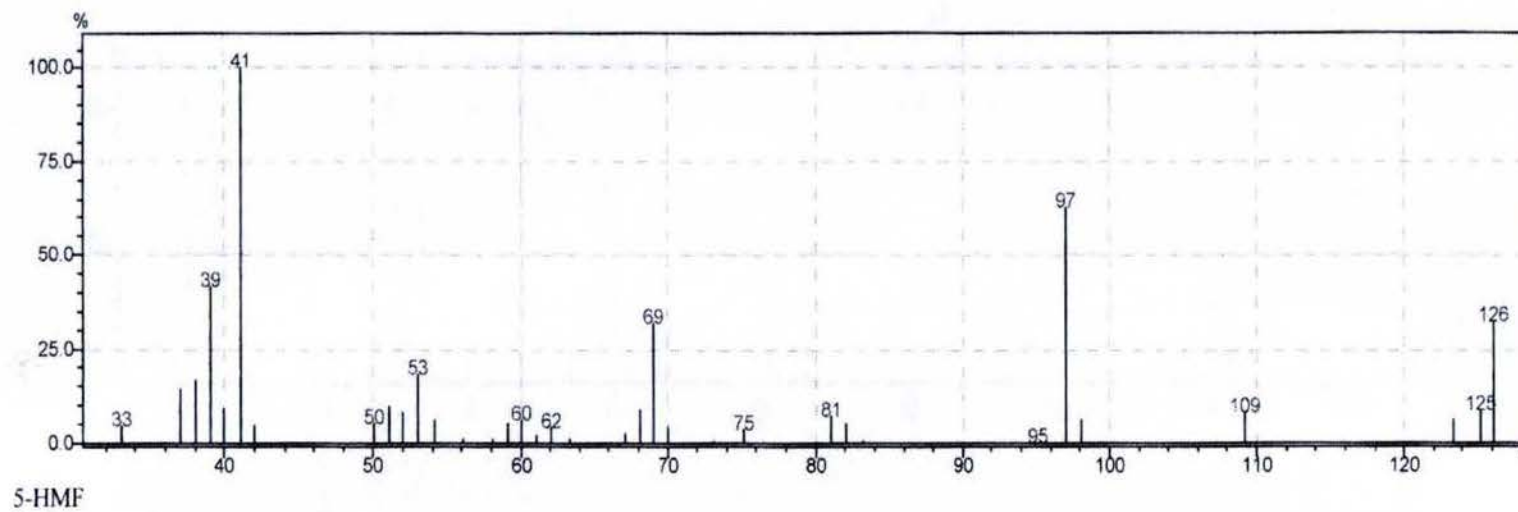


Figura 1. Espectro de masas del 5-HMF en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 2

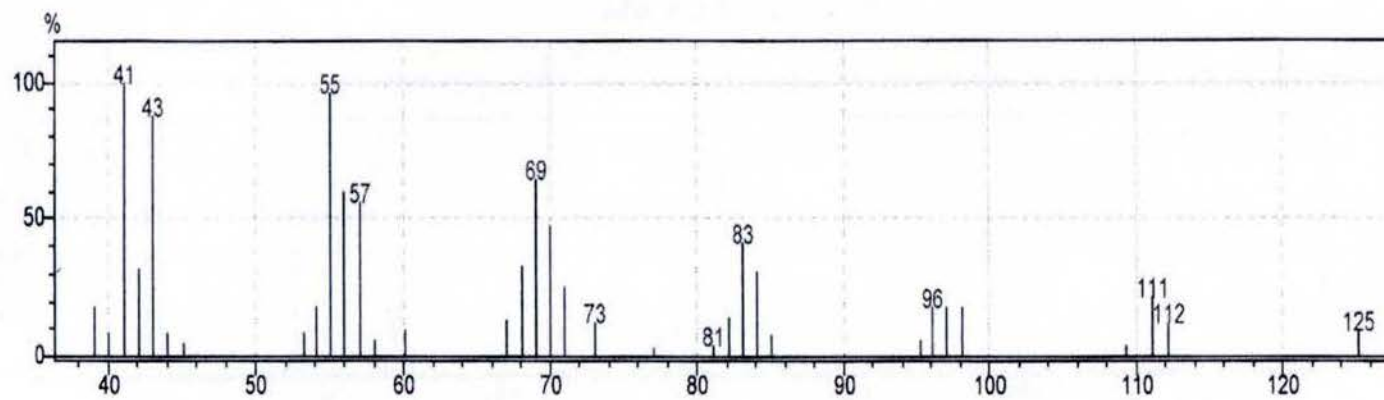


Figura 2. . Espectro de masas del dodecanol en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 3

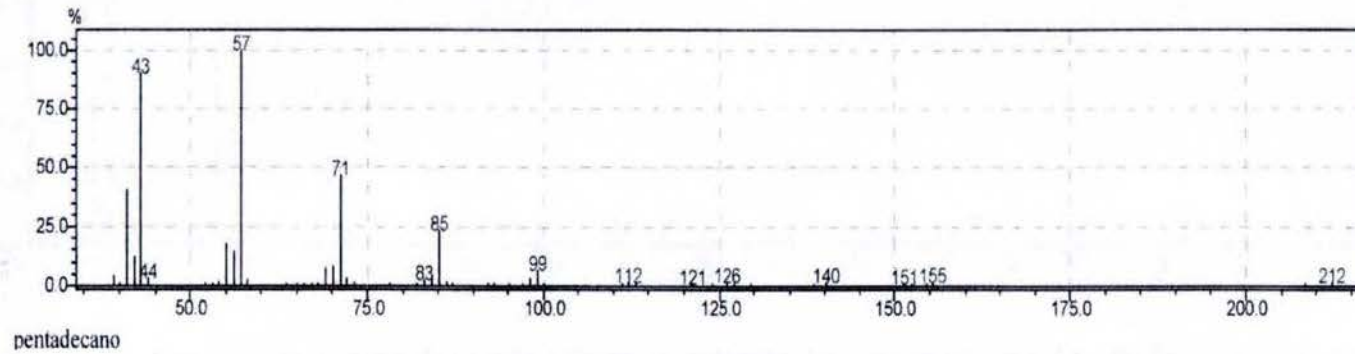


Figura 3. . Espectro de masas del pentadecano en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 4

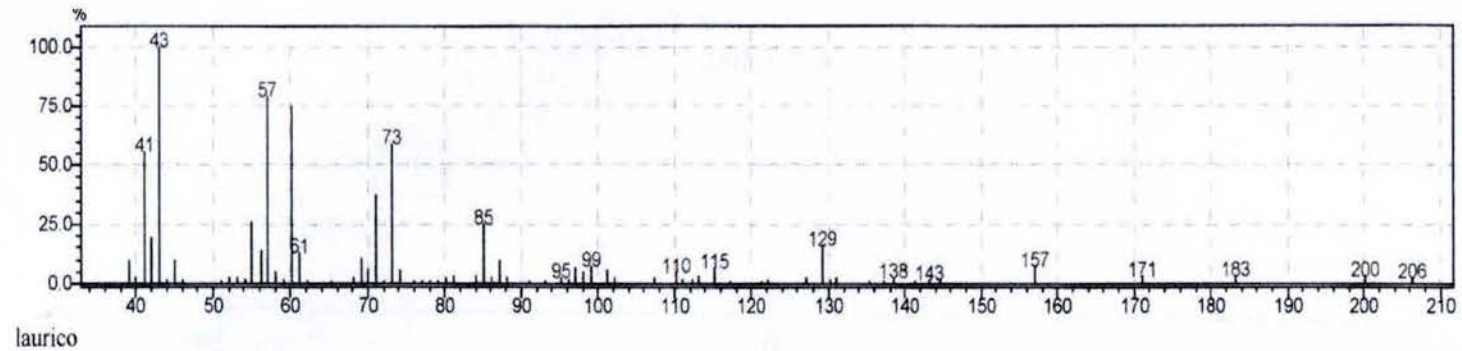


Figura 4. . Espectro de masas del ácido laúrico en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 5

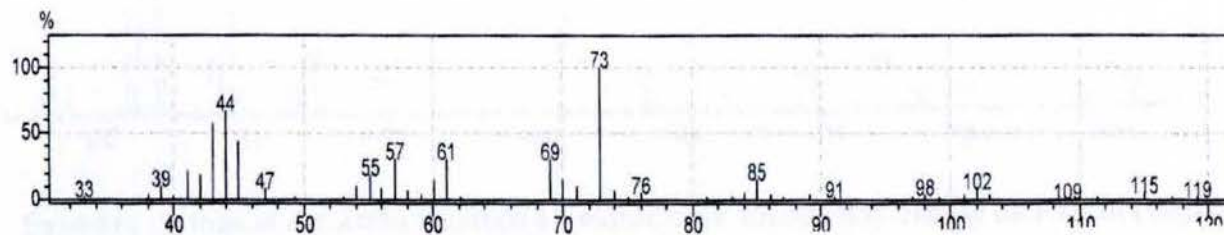


Figura 5. . Espectro de masas del D-galactonolactona en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*

ANEXO 6

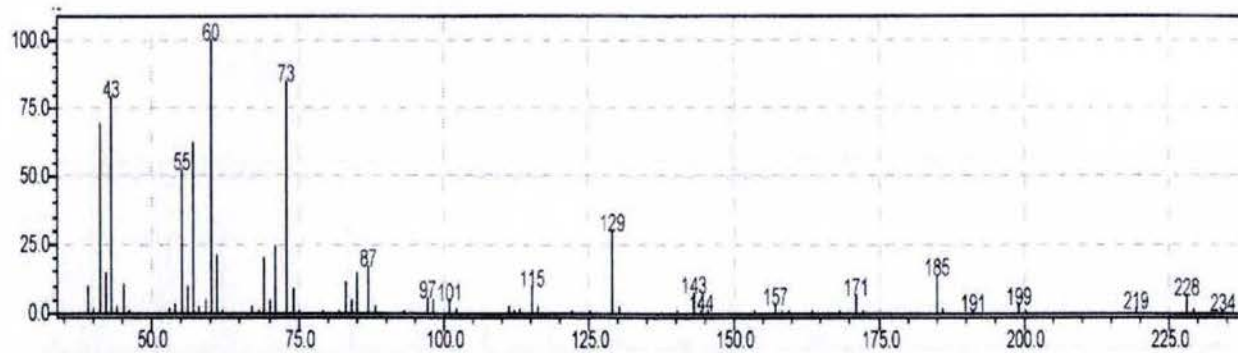


Figura 6. . Espectro de masas del ácido mirístico en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 7

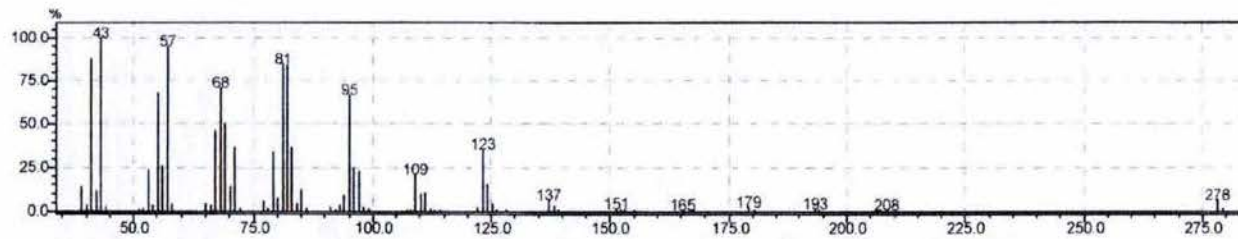


Figura 7. . Espectro de masas del trans-fitol en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 8

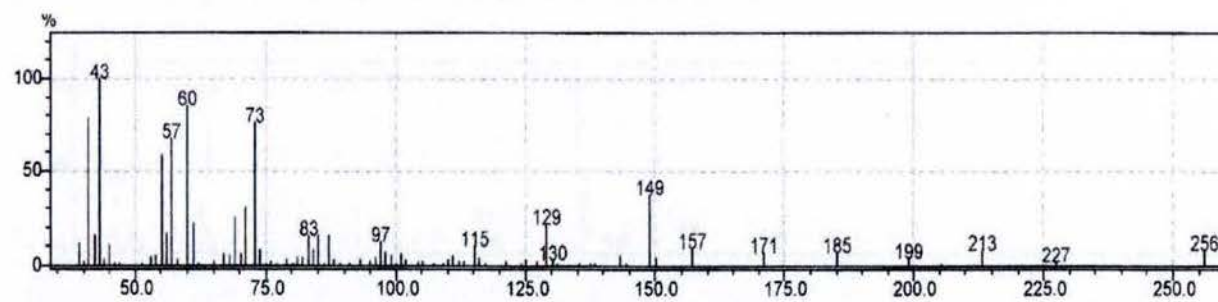


Figura 8. . Espectro de masas del ácido palmítico en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 9

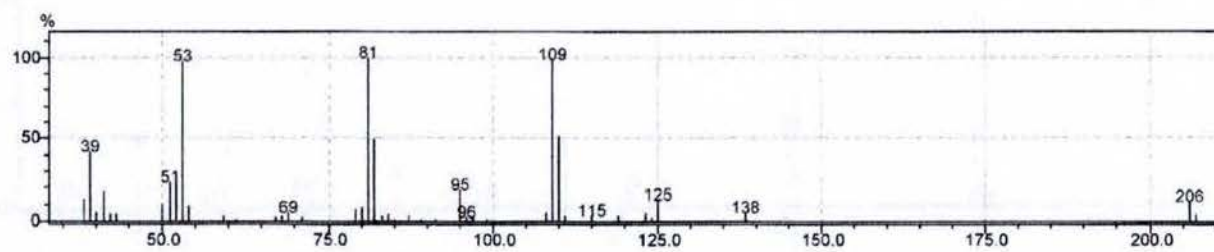


Figura 9. . Espectro de masas del dímero del 5-HMF en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 10

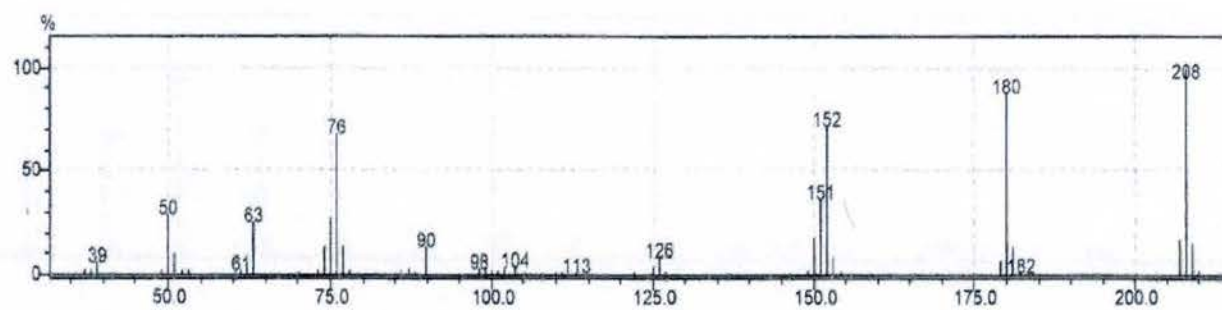


Figura 10. Espectro de masas de antraquinona en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 11

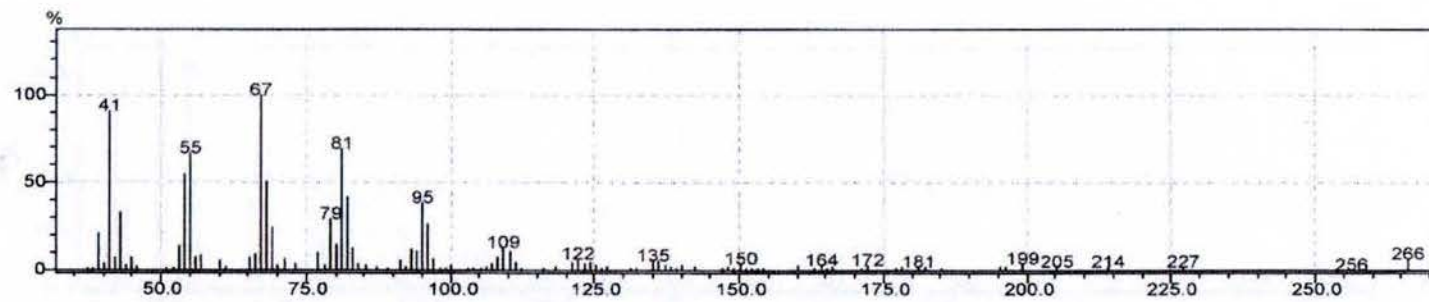


Figura 11. . Espectro de masas del éster del ácido esteárico en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 12

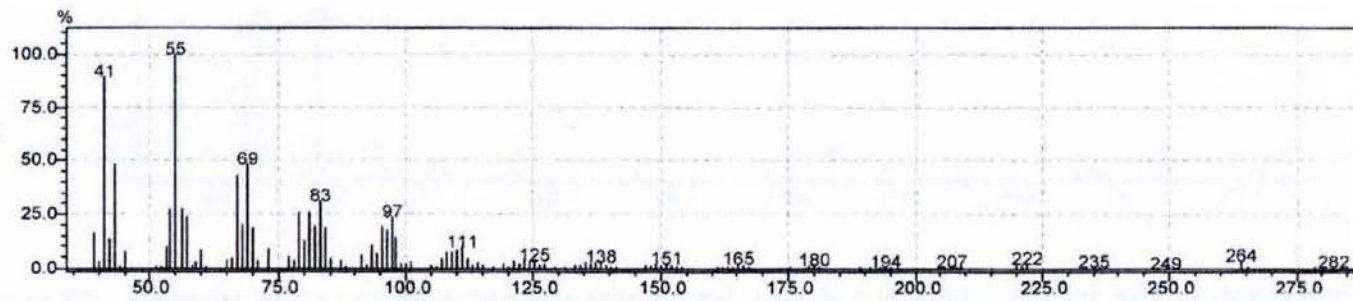


Figura 12. . Espectro de masas del ácido oleico en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 13

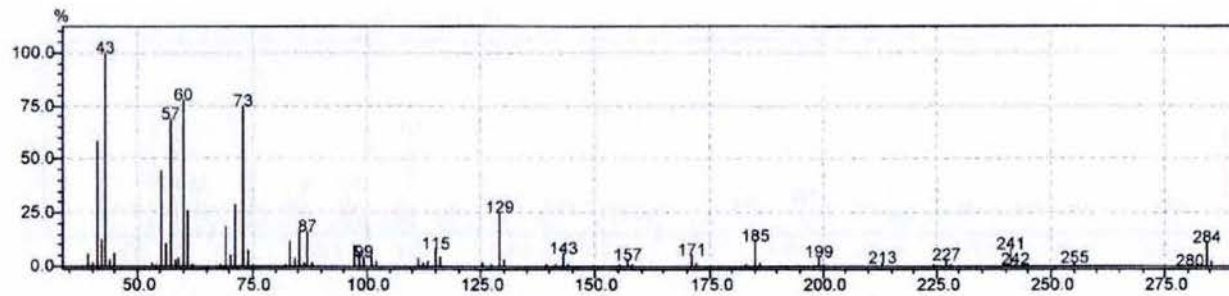


Figura 13. . Espectro de masas del ácido esteárico en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*.

ANEXO 14

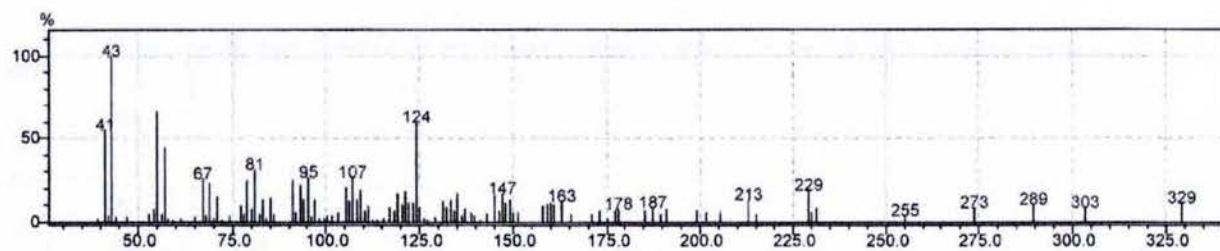


Figura 14. Espectro de masas del sitosterol en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*

ANEXO 15

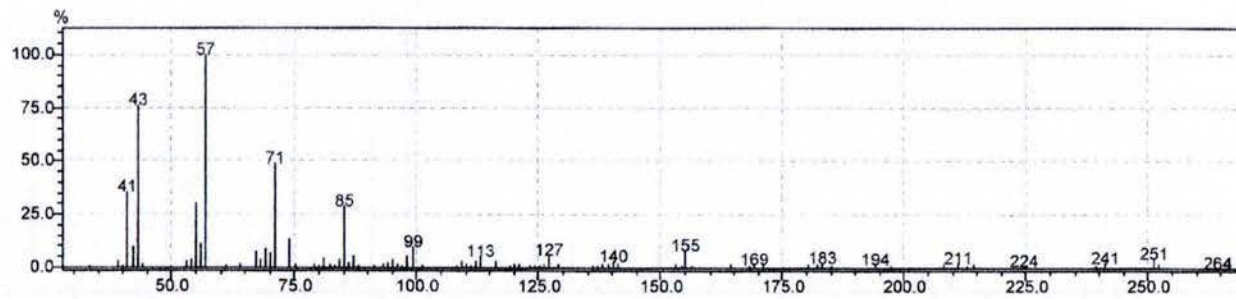


Figura 15. . Espectro de masas del eicosano en extracto de suspensión celular de *Psychotria parvifolia*

ANEXO 16

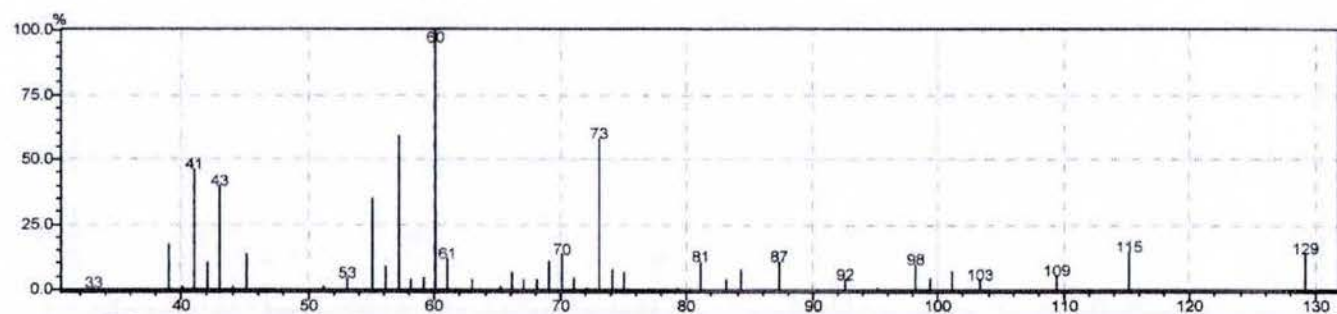


Figura 16. . Espectro de masas del ácido nonanoico en extracto de vitroplantas de *Psychotria parvifolia*

ANEXO 17

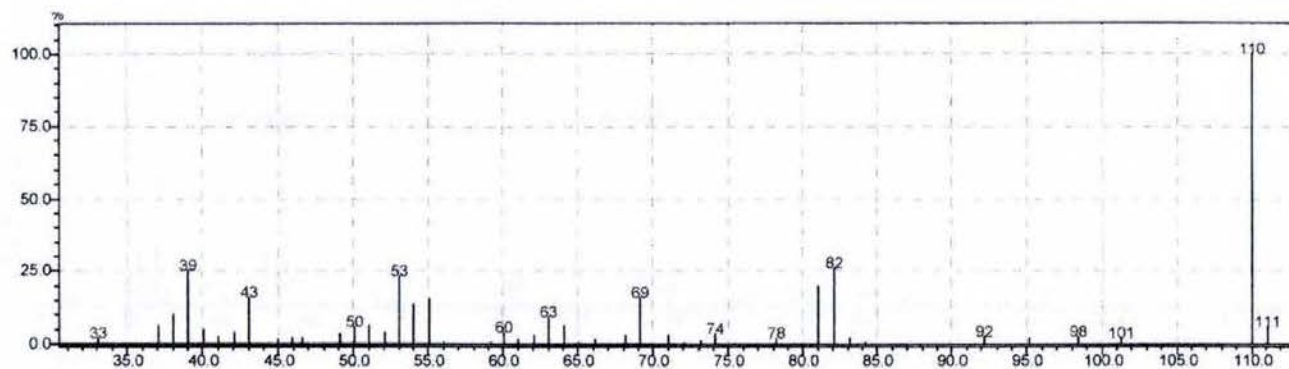


Figura 17. . Espectro de masas del resorcinol en extracto de vitroplantas de *Psychotria parvifolia*

ANEXO 18

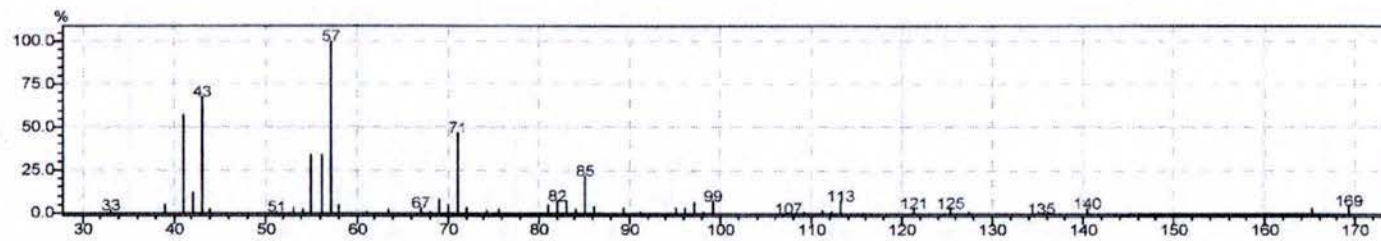


Figura 18. . Espectro de masas del metilhexadecano en extracto de vitroplantas de *Psychotria parvifolia*

ANEXO 19

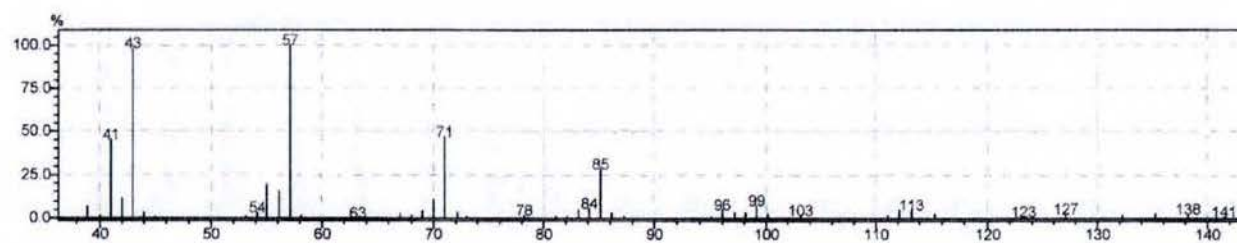


Figura 19. . Espectro de masas del hexadecano en extracto de vitroplantas de *Psychotria parvifolia*

ANEXO 20

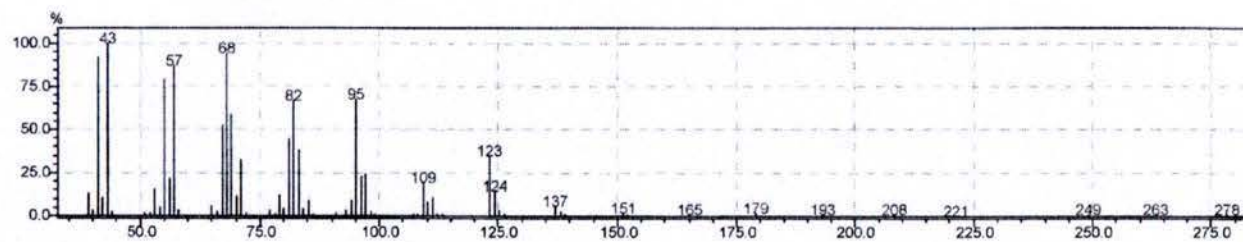


Figura 20. . Espectro de masas del neofitadieno en extracto de vitroplantas de *Psychotria parvifolia*