

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION ESTUDIOS DE POS-GRADO



Estudio comparativo de los componentes químicos de callo  
y plántula de *Stenocereus griseus* (Haworth) Buxabaum

TESIS  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA

POR  
JAIME FRANCISCO TREVIÑO NEAVEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. OCTUBRE DE 2000

TM

OK495

.C115

T7

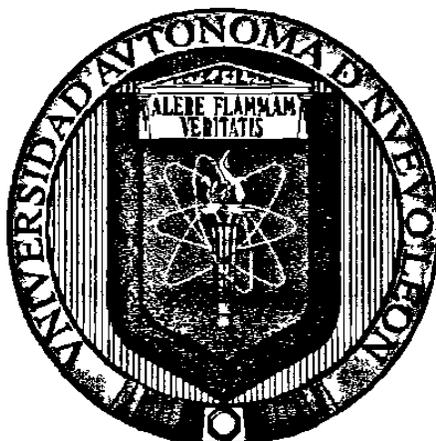
2000

c.1



1080124410

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Estudio comparativo de los componentes químicos de callo y plántula de**

*Stenocereus griseus* (Haworth) Buxabaum

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OPTAR AL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON**

**ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA**

**POR**

**JAIME FRANCISCO TREVIÑO NEÁVEZ**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L.**

**OCTUBRE 2000**

TM

Q/K495

.C115

T7

2000



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**Estudio comparativo de los componentes químicos de callo y plántula de**  
***Stenocereus griseus* (Haworth) Buxabaum.**

**TESIS**

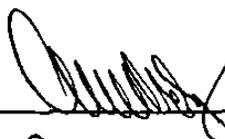
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON**  
**ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA**

**POR**

**JAIME FRANCISCO TREVIÑO NEÁVEZ**

**COMISIÓN DE TESIS:**

**PRESIDENTE: DRA. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS**



**SECRETARIO: DRA. JULIA VERDE STAR**



**VOCAL: M.C. GLAFIRO ALANÍS FLORES**



**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L.**

**OCTUBRE 2000**

# **DEDICATORIA**

**Dedico este trabajo:**

**Con todo el cariño del mundo a mi esposa M.C. María Eufemia Morales Rubio que siempre me a apoyado en todos mis proyectos y me a estimulado para seguir adelante, le doy gracias por compartir los momentos difíciles y hermosos de mi vida, gracias por compartir estos años tan esplendorosos que hemos pasado juntos.**

**Con todo mi amor a mis hijos Jacques Jair y Vanessa Dalia que son la luz que me a dado la fuerza para seguir luchando, y el orgullo de tenerlos como hijos.**

**A mis inigualables padres Pedro y Margarita que me dieron la vida y las enseñanzas básicas sin las cuales no sería nada en este mundo.**

**A mis hermanos Pedro, Bonifacio (que en paz descanse), Margarita, Horacio, Francisco, y José por haber puesto su granito de arena en mi formación, por su cariño y comprensión.**

**A mí queridísima madre política Consuelo por aceptarme como su hijo.**

A la Dra. Ma. Azucena Oranday Cárdenas por su apoyo constante, comprensión y su interés en brindarme su ayuda en la realización de este trabajo. Sobre todo gracias por que me hizo sentir que tenía una amiga y no solamente una asesora.

A las Dra. María Julia Verde Star por su amistad, disposición y apoyo incondicional, que siempre me ha demostrado, gracias por la confianza que me ha brindado para la culminación de mi trabajo.

Al M.C. Glaforo Alanís Flores por sus innumerables consejos y entusiasmo que siempre me ha ofrecido, por sus enseñanzas y su disponibilidad.

A la Dra. Catalina Rivas Morales por sus acertados consejos para la realización de múltiples actividades, gracias por su amistad.

A todos mis compañeros y amigos por hacer que la vida sea placentera al estar con ellos.

A todos mis maestros que se esforzaron en transmitir su sabiduría hacia mi persona.

# **AGRADECIMIENTOS**

A mi esposa María Eufemia Morales Rubio por su constante ayuda en la realización de este trabajo, por su comprensión, y su entusiasmo constante que me permitió llegar a esta meta.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas por haber aceptado ser mi asesora además de sus atinados consejos y excelente dirección que tubo hacia mi persona.

A la Dra. María Julia Verde Star por formar parte de mi comisión de tesis así como por la acertada revisión que realizo a mi trabajo y por todos sus consejos para mejorarlo.

Al M.C. Glafiro Alanís Flores por aceptar participar en la asesoría de mi tesis y por la revisión y corrección de este trabajo.

A la Dra. Catalina Rivas Morales por participar activamente con sugerencias muy acertadas en la realización de este proyecto.

A la M.C. María Luisa Cárdenas Ávila por facilitarme materiales necesarios para la realización de este trabajo así como su amable colaboración constante en un sinnúmero de actividades que hemos realizado.

A las Q.B.P. Yesenia y Beatriz del laboratorio de fitoquímica por su colaboración en la realización de esta trabajo.

A los miembros de La Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L. por haber facilitado el espectrómetro de infrarrojo para realizar mis comprobaciones.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo brindado en el "Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica" (PAICYT) 2000 # de proyecto CN-291-00.

## ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico
HCl	Ácido clorhídrico
Na <sub>2</sub> EDTA	Sal Sódica del etilendiaminotetra-acético
IAA	Ácido Indolacético
NAA	Ácido Naftalenacético
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
BA	Benciladenina o N-(fenilmetil)-1H-purina-6-amino
K	Cinetina
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio dihidratado
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobalto hexahidratado
FeCl <sub>3</sub> ,	Cloruro férrico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de ácido de potasio
F	Fuerte
M'	Medio
D	Débil
g	Gramo
h	Horas
HC	Hexánico callo
HP	Hexánico plántula
NaOH	Hidróxido de Sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio

DIP	Inmersión rápida en una solución
KI	Ioduro de Potasio
Mg	Magnesio
Mg	Miligramo
Mg/l	Miligramo por litro
MC	Metanólico callo
MP	Metanólico plántula
ML	Mililitro
$\mu\text{M}$	Micromoles
M	Molar
$\text{KMnO}_4$	Molibdato de potasio
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio dihidratado
MS	Murashige y Skoog
Nm	Nanómetros
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Nitrato de amonio
$\text{KNO}_3$	Nitrato de potasio
ppm	Partes por millón
Rf	Relación de frentes
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso heptahidratado
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso monohidratado
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado
$\text{Br}_2/\text{CCl}_4$	Bromo en tetracloruro de carbono

# ÍNDICE

	PÁGS.
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE Y UBICACIÓN TAXONÓMICA	5
FAMILIA CACTÁCEA	5
COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS CACTACEAS Y ALGUNOS METABOLITOS ENCONTRADOS EN EL GENERO <i>Stenocereus</i>	6
ALCALOIDES	8
GENERO <i>Stenocereus</i>	9
CULTIVO DE TEJIDOS	10
INDUCCIÓN DE CALLO	11
DESINFECCIÓN	12
AISLAMIENTO DE METABOLITOS A PARTIR DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	14
AISLAMIENTO DE COMPUESTOS	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
MATERIAL	19
METODOLOGÍA	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
FIGURAS	33
TABLAS	41
APÉNDICE DE FOTOGRAFÍAS	44
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
LITERATURA CONSULTADA	48

## RESUMEN

La pitaya de mayo *Stenocereus griseus* (Haworth) Buxabaum es una planta cultivada principalmente por sus frutos y es en la actualidad una especie con un futuro promisorio en las zonas áridas y semiáridas del país, aunado a su importancia económica en el aspecto alimenticio, se tienen reportes de que esta planta contiene alcaloides cuya estructura no ha sido determinada, estos compuestos son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y agrícola, por lo que en el presente trabajo se realizó el estudio fitoquímico preliminar tanto en la planta como en los tejidos cultivados *in vitro*, ya que estos pueden ser mucho mas efectivos para la producción de metabolitos. Para la obtención de callo se usó el medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con reguladores de crecimiento, las plántulas fueron germinadas en almácigo, una vez obtenidas las muestras se realizó la extracción hexánica y metanólica con agitación constante para separar los compuestos polares y no polares. Por medio de reacciones coloridas y cromatografía en capa fina con diferentes reveladores, se identificaron, en plántula y callo, oxidrilos fenólicos, sesquiterpenlactonas, coumarinas, flavonoides y alcaloides. Estos últimos fueron separados por cromatografía preparativa y purificados. Su espectro infrarrojo nos confirma la presencia del mismo compuesto en plántula y callo por lo que concluimos que el cultivo *in vitro* puede ser una alternativa para la obtención de compuestos de interés farmacológico o industrial.

## SUMMARY

"La pitaya de Mayo" , *Stenocereus griseus* (Haworth) Buxabaum is a plant that is cultivated mainly because of its fruits and at the present time a species with a promissory future in the arid and semi-arid areas of the country. Besides its economic importance in the nutritious aspect, there are reports that this plant contains alkaloids whose structure has not been determined, these compounds are widely used in the pharmaceutical and agricultural industry. A preliminary phytochemistry study was carried out to study the plant as well as it's tissue cultivated *in vitro*, since these can be more productive for the metabolic production. For the callus induction Murashige and Skoog medium (1962) added with regulators of growth were used, plántulas were germinated in almácigo, once the samples were obtained hexánic and methanólic extraction was carried out with constant agitation to separate the polar and non-polar compounds. By means of colorful reactions and chromatographic in thin layer with different developing agents. In plántula and callus, phenolic hidroxiles, sesquiterpenlactones, coumarins, flavonoids and alkaloids were identified. These last ones were separated by preparative chromatography and they were purified. Their infrared spectrum confirms the presence of the same compound in plántula and callus. We conclude, that the cultivation *in vitro* can be an alternative for obtaining compounds of pharmacological or industrial interest.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENERALIDADES

Desde sus inicios la humanidad como tal siempre ha tenido como aliadas en su desarrollo a las plantas, les ha dado diversos usos, desde los más simples, como alimento, techo, abrigo, hasta como agentes medicinales, en la actualidad son una importante fuente de donde obtener diversos fármacos a través de sofisticados sistemas de cultivo y extracción.

Las plantas sintetizan dos tipos de metabolitos: Los primarios, que son esenciales para su crecimiento y desarrollo, entre ellos podemos mencionar a los ácidos nucleicos, las proteínas, lípidos, etc., y los secundarios que son aquellos específicos para ciertas especies de plantas, en este grupo tenemos los flavonoides, alcaloides, aceites esenciales, etc. Los alcaloides son de suma importancia ya que su aplicación como fármacos es muy diversa, los aceites esenciales se usan en perfumería, en la industria alimentaria y como solventes. El conocimiento de los metabolitos secundarios que una planta produce y su subsecuente aprovechamiento son estudios que se deben de realizar para aprovechar al máximo los recursos naturales.

La extracción de estos compuestos, es de suma importancia ya que son la fuente primaria para un sinnúmero de medicamentos, en forma tradicional estos productos se obtienen por extracciones a partir de plantas cultivadas, pero esto conlleva a una serie de problemas como son: La producción en el campo que está directamente relacionada con el clima, enfermedades, plagas, una disminución de las áreas de cultivo, necesidad de mano de obra, costos elevados, etc. Por estas

razones se ha optado por métodos más eficaces para la obtención de estos productos, como lo es, la técnica de cultivo de tejidos vegetales, la cual inicialmente puede ser costosa pero a la larga se tendrán mayores rendimientos, disminución de costos y un suministro continuo de materia prima para la obtención del metabolito. La comparación entre los metabolitos producidos a nivel de planta y de los tejidos *in vitro*, es muy importante para el establecimiento a futuro de un sistema de producción masiva, ya que en ciertas especies se ha observado diferencias en el tipo y cantidad de metabolitos producidos (Vázquez y Villegas 1989 y Pierik. 1990.)

En fechas recientes ha cobrado importancia el estudio y cultivo de las cactáceas columnares, por diversas razones, como son: por ser fuente de metabolitos secundarios y por ser fuente de alimento, sobre todo aquellas que producen frutos comestibles entre las que destacan las pitayas (*Stenocereus spp*) y las pithayas (*Hylocereus spp.* y *Selenocereus spp.*), etc. La extracción e identificación de estos productos es esencial para establecer su uso potencial, así mismo es muy importante la disponibilidad del material vegetal para la obtención de estos compuestos químicos.

## 1.2 ANTECEDENTES

### CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE Y POSICIÓN TAXONÓMICA

Orden: CACTALES Britton et Rose, Cactaceae 1: 8. 1919

Familia: CACTACEAE Lindley, Nat. Sist. Ed. 2, 53. 1856

Subfamilia: CEREOIDEAE Schum.

Tribu: PACHYCEREAE Buxab.

Subtribu: STENOCEREINAE Buxab.

Género: *Stenocereus* (Berg.) Ricc.

Especie: *S. griseus* (Haworth) Buxabaum

Nombre Vulgar "Pitayo de mayo"

### FAMILIA CACTÁCEA:

El género *Stenocereus* pertenece a la familia de las cactáceas la cual ha jugado un papel importante en muchos aspectos de la vida cotidiana de nuestro pueblo, desde el arribo de sus primeros pobladores hasta nuestros días y en muchos de los casos no han recibido la atención que merecen. Los primeros pueblos le dieron múltiples usos como alimento, bebida, medicina y material de construcción, en la actualidad algunos de sus usos se mantienen, otros han desaparecido y también hemos desarrollados nuevos como son: forraje, ornato, fuente de metabolitos secundarios y simplemente como un recurso mas de nuestra biodiversidad; la pitaya de mayo tiene un amplio uso en las regiones tropicales y semitropicales de México donde es cultivada en forma semiintensiva (Bravo y Scheinvar, 1995 y Bravo y Sánchez, 1978a). Cuentan con una serie de características anatómicas, morfológicas y fisiológicas, que les permiten

desarrollarse en lugares donde la cantidad de agua y suelo son insuficientes para otros cultivos. (Cruz, 1997).

De la época prehispánica se tienen reportes del uso del fruto y semillas de "pitaya" dentro de la farmacopea de ese tiempo, reportándose para dolores de cabeza y "clorosis" (Valverde y Pérez 1988).

### **COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS CACTACEAS Y ALGUNOS METABOLITOS ENCONTRADOS EN EL GENERO *Stenocereus*.**

Las cactáceas son un grupo de vegetales que presentan como la mayoría de las plantas superiores un gran número de compuestos diversos debido a sus complicados procesos metabólicos. A continuación se enumeran algunos: el agua es uno de los constituyentes principales de las cactáceas reportando varios autores concentraciones que van desde 74% hasta un 94% de su peso total. La composición de sales minerales es muy variable, no sólo entre las distintas especies, sino también entre individuos de la misma especie, ya que dependen, en parte, de la composición química del suelo y de los complicados fenómenos de la disponibilidad de ellos para la planta relacionados con la acidez, salinidad, conductividad, grado de disociación o ionización, humedad y textura de los suelos. Las sustancias pécticas son muy comunes entre los frutos de las cactáceas principalmente tunas y pitahayas, que tienen un valor muy importante en la manufactura de jaleas, dulces y otros productos. Tiene diversos grados de contenido de azúcares que pueden usarse para formar ácidos, siendo los principales los ácidos urónicos, estos ácidos cuando están en solución, pueden formar ésteres internos denominados lactonas como la histrixlactona, la cual se encontró en *S. griseus* (Bravo y Sánchez 1978) .

Los glicósidos, son compuestos formados por la combinación de un azúcar con una o más sustancias distintas, algunos presentan propiedades tónicas para los órganos cardiovasculares. Las ceras que juegan un importante papel en las cactáceas como mecanismo de conservación de la humedad. Las saponinas triterpénicas o esteroideas son glucósidos carentes de propiedades cardiovasculares que con el agua producen una sustancia jabonosa. De estas saponinas se pueden producir hormonas esteroideas como cortisona, testosterona y progesterona. La presencia de saponinas en *Machaerocereus gummosus*, ha sido reportada, produciendo una resina que los nativos de Baja California utilizan para envenenar peces (Bravo y Sánchez 1978) .

Se han encontrado 18 triterpenos en las cactáceas algunos reportados para *S. griseus*, como la betulina y el ácido oleanólico. Los principales pigmentos de las cactáceas están dentro de los grupos de clorofilílicos, carotenoides y fenólicos. Los principales compuestos nitrogenados en esta familia son aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos y alcaloides, siendo estos los más estudiados. Los alcaloides son importantes por sus efectos fisiológicos y sus usos farmacológicos, el 40% de las pruebas de campo para detección de alcaloides en cactáceas han sido positivas, se aislaron tres alcaloides de *Stenocereus marginatus* a los que denominó cereína, pachicereína y ochoterenina, aunque no se llegó a establecer la estructura de estos. La mayor parte de los alcaloides de las cactáceas estudiados pertenecen al grupo químico de la feniletilaminas o de las tetrahidroisoquinolinas, aunque algunos como la pilocereína muestra estructuras más complejas. Se ha demostrado que los alcaloides en las cactáceas no se encuentran distribuidos uniformemente en toda la planta pues se encuentran

concentrados en la epidermis y en menor cantidad existen en la corteza, mientras que la médula prácticamente carece de ellos. Es importante notar que ciertos compuestos como la dopamina y tiramina aunque no son alcaloides propiamente dichos pertenecen a la biosíntesis de alcaloides en las cactáceas. Se han encontrado Anhalonidina en *S. weberi* y Pilocereína en *S. marginatus*, en otros géneros se han encontrado muy diversos alcaloides (Bravo y Sánchez 1978) .

Arnaud Viñas R, et al 1997, reportan para el fruto de *S. griseus*, la presencia de colorantes (betacianinas y betaxantinas), en una proporción de 100 mg. de betaleínas por 100 g. de pulpa seca de pitaya 250 mg. de betaleínas por 100 g. de pulpa seca las cuales reúnen las propiedades bromatológicas adecuadas para la elaboración de productos alimenticios.

## **ALCALOIDES**

Domínguez, (1973) menciona que se ha tratado de conocer la función de los alcaloides en las plantas, considerándose como productos terminales del metabolismo del nitrógeno, también se les ha asociado con la protección del vegetal ante los actos predatorios de insectos y animales herbívoros, aunque hay alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales superiores, pero no para los insectos. Se han aportado datos que sugieren que algunos alcaloides intervienen en el crecimiento vegetal, ya sea por su capacidad de formar quelatos o intervenir en fenómenos de óxido-reducción. En lo que corresponde a su distribución en la planta, en ocasiones, se hallan restringidos a ciertos órganos o a ciertas partes de la planta; a veces se les encuentra en toda la planta. Hay casos en los cuales sólo se presentan en alguna etapa de crecimiento o época del año, o en determinadas condiciones ecológicas.

## **GENERO *Stenocereus***

El genero *Stenocereus* (Berg. ) Ricc., Según Bravo (1978) presenta 19 especies de plantas arborescentes a veces gigantescas, provistas de tronco bien definido y de una copa amplia y muy ramificada; algunos son arbustivos produciendo ramas más o menos curvas y a veces casi rastreras, aunque algunas pueden ser erectas; las ramas son gruesas, largas, provistas de costillas numerosas, 5 o más. Se les conoce en el país con el nombre de "pitahayos" , "pitajayos" , "xoconostles", y algunas de ellas se cultivan por sus frutos comestibles, muy agradables. Florecen de marzo a mayo y fructifican de mayo a junio.(Bravo y Sánchez 1978).

**Características de la especie: *Stenocereus griseus* (Haworth) Buxabaum**  
**sinónimos a través de la historia.**

*Cereus griseus* Salam-Dyck, Observ. Bot. 3: 6. 1822

*Cereus crenulatus griseus* SD. In Pfeinffer, Enum. Cact. 85. 1837.

*Cereus resupinatus* SD., Allg. Gart. 8: 10. 1840.

*Cereus gladiger* Lemaire, Hort. Univ. 6: 60. 1843.

*Lemaireocereus griseus* (Haw.) Britton et Rose, Contr. U.S. Nat. Herb. 12: 425.  
 1909.

*Ritterocereus griceus* (Haw.) Backeberg, Cact. Succ. Journ. Am. 23: 121. 1951.

Planta arborescente candelabriformes de 6 a 9 metros de altura, ramosa con tronco bien definido, como de 35 cm. de diámetro, o con ramas desde la base. Ramas de color verde más o menos glauco, generalmente erectas, a veces flexuosas. Costillas de 8 a 10 areolas, distantes entre sí 2 a 3 cm. , dé 8 mm. de longitud, con fieltro moreno, con el tiempo grisáceo. Espinas más o menos subuladas (estrechándose hacia el ápice). Espinas radiales 10 a 11, de 6 a 10

mm. de largo. Espinas centrales 3, de 15 mm. de largo o más, las más largas hasta de 4 cm. de longitud, al principio color rojo claro con la punta obscura, después grisáceas. Flores hasta de 10 cm. de longitud; segmentos exteriores del perianto rojizos; segmentos interiores del perianto blancos; botón floral obtuso o redondeado, con el ápice cubierto por escamas obtusas, morenas. Fruto globoso hasta ligeramente ovoide, de 5 cm. de diámetro, provisto de areolas espinosas y caducas, color que varía desde el verde amarillento hasta rojo o moreno purpúreo; pulpa del mismo color que el pericarpelo, comestible. Su distribución está establecida para Venezuela y Antillas; en México fue posiblemente introducida para ser cultivada. Los campesinos la cultivan en sus huertos por el sabor muy agradable de sus frutos llamados "pitayas" que se venden en los mercados en los meses de mayo. (Bravo y Sánchez 1978).

Arnaud Viñas R, et al 1997, describen el fruto de la pitaya de mayo como ovoide, con un diámetro de 5 a 12 cm, con un peso que puede oscilar entre los 150 g. hasta los 800 g. Su cáscara es lisa con tonalidades de verde a rojas, según el grado de maduración, cubierta de aereolas y de espinas caedizas. Su pulpa es dulce, jugosa, rica en proteínas y con semillas negras de 1 mm de diámetro.

#### **CULTIVO DE TEJIDOS:**

Mantell and Smith (1986), reconocen que el cultivo de células puede contribuir de varias formas para la producción de productos vegetales naturales: como una ruta de síntesis para nuevos productos, como una vía de síntesis para un producto que la planta tiene dificultades para producir o como un sistema de biotransformación.

## Inducción de callo

Se puede definir el callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales luego son llevados a una diferenciación celular, estas células presentan proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada que dan lugar a una masa amorfa de tejido. Algunos callos son masas celulares compactas mientras que otros son esponjosos. La inducción de callos a partir de una porción de vegetal sucede cuando él inóculo ya estéril se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga un crecimiento y una división celular continua. (Hurtado y Merino 1988). Existen múltiples reportes para la inducción de callo de diferentes especies: Secciones de peciolo de *Tropaeolum tuberosum* fueron colocadas en medio Murashige y Skoog ajustado a un pH de 5.8, para la inducción de callo se usaron combinaciones de cinetina en un rango de 1 a 5 ppm con cada una de las siguientes auxinas 2,4-D 0.5 a 10 ppm; IAA 0.01 a 2 ppm y NAA 0.5 a 2 ppm (Torres O, *et al* 1989). Para nopal se ha reportado la formación de callo al colocar explantes de cladodio en medio MS adicionado con una combinación de picloram 1.5 mg/l y BAP 0.2 mg/l. (Villegas, *et al* 1989).

Smith, *et al.* (1991), propagaron *Coryphantha macromeris* en un medio Murashige y Skoog, al cual se le adiciona 0.4mg/l de tiamina•HCl, 100mg/l de inositol, 20g/l de sacarosa, 44  $\mu$ M N-(fenilmetil)-1H-purina-6-amino(BA), 0.5  $\mu$ M de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) con un pH de 5.7, para el desarrollo de callo.

Silos y Meléndez (1995), trabajaron con una cactácea, *Mammillaria bocasana*, emplearon las areolas espiníferas como explantes en un medio Murashige y Skoog

adicionado 2,4-D y K (cinetina) en diferentes concentraciones. Todos los tratamientos formaron callo y solamente en uno de ellos hubo brotación, posterior a los callos formados.

Oliveira, *et al.* (1995), utilizaron semillas como recursos de explantes y lograron inducir y mantener tejidos de callo en rápido crecimiento usando una combinación de 2,4-D en 18.1  $\mu\text{M}$  con K en 18.6  $\mu\text{M}$  o 27.9  $\mu\text{M}$ .

Se ha observado formación de callos de *Ariocarpus retusus*, después de doce meses de cultivo, utilizando medio MS adicionado con BA 0-3 mg/l y NAA 0-1 mg/l. (Olguín y Chávez 1994).

Morales E (2000), logró la inducción de callo de *Hylocereus undatus*, con medio MS adicionado con BAP (6 mg/l) y NAA (2 mg/l).

### **Desinfección**

Para la desinfección de nopal (cladodios, fruto y flor) da buenos resultados lavarlos con NaClO (50%) y etanol (70%) (Villegas, *et al* (1989)). Para la desinfección de semillas de sorgo para su germinación *in vitro*. Mir (1996) recomienda lavar en agua destilada estéril con tween 20, enjuagar con agua destilada estéril dos veces y colocar en una gasa en grupos de 5 semillas para ser sumergidos en tubos de ensaye con solución desinfectante de hipoclorito de sodio (cloralex comercial) al 15 % por 20 minutos, dentro de la campana de flujo laminar, enjuagar 3 veces en agua destilada y colocar una semilla por tubo de ensaye con plataforma de Heller, con medio nutritivo MS líquido.

Villalobos (1985). reportó que para la desinfestación de explantes herbáceos se recomienda incorporar detergente a la solución desinfectante para romper la

tensión superficial y eliminar así los microorganismos, o combinar un lavado en alcohol absoluto.

Pierik (1990), recomendó la técnica siguiente para la desinfección de explantes:

1) lavar el material en forma intensiva en agua limpia, 2) colocarlo por unos segundos en alcohol etílico al 70%, para eliminar las burbujas de aire y de esta manera el líquido desinfectante estará en contacto con el material vegetal. 3) desinfectar los explantes en una solución, de hipoclorito de sodio al 10% con Tween 20 u 80 para disminuir la tensión superficial y así permitir un mejor contacto con la superficie del explante.

Morales E. (2000), recomienda la germinación *in vitro* para obtener explantes asépticos y eliminar así los problemas con la desinfección y el riesgo de contaminación.

## **AISLAMIENTO DE METABOLITOS A PARTIR DE CULTIVO IN VITRO**

Arias et al, (1992), mencionan que los primeros metabolitos secundarios detectados en cultivo de tejidos, fueron descubiertos por Gautheret en 1942 en cultivo de callo, y también hacen mención de que la dediferenciación del tejido de la planta con la finalidad de obtener el cultivo de células en suspensión, va acompañado por una aparente pérdida de la habilidad de acumular el metabolito, debido a: 1) carencia de expresión en las células no especializadas de los genes que regulan la ruta de la biosíntesis. 2) uso del sustrato en otras rutas que no son del metabolismo secundario, 3) ausencia de mecanismos de transporte para remover del sitio de la biosíntesis productos tóxicos. 4) falta de sitios para almacenar el metabolito secundario. 5) catabolismo no regulado del metabolito sintetizado.

Reinert y Yeoman (1982), hacen referencia de que los cultivos de células vegetales pueden acumular una serie de metabolitos secundarios como los polifenoles, alcaloides, esteroides y pigmentos, y algunos de ellos pueden almacenarse en el medio e inhibir el crecimiento, como es el caso de los polifenoles. Recomiendan para ciertas especies el cultivo de callo para obtener metabolitos secundarios y para otros el cultivo de células en suspensión.

Briones(1989) citando a Banthrope, *et al* (1986), menciona que de cuatro especies de plantas aislaron siete aceites esenciales por métodos fitoquímicos, luego cultivaron *in vitro* estas mismas especies para verificar si los callos formaban y acumulaban estos compuestos, observando que tenían la capacidad de acumular y sintetizar compuestos semejantes pero en menores proporciones.

Friederich (1975) y Robins, *et al* (1986), mencionan la influencia de los reguladores del crecimiento de tipo auxínico y citocinínico de manera favorable para la producción de metabolitos secundarios.

Topete, *et al* (1991), consideran al cultivo de tejidos como una de las alternativa mas importantes para obtener metabolitos secundarios de las plantas, los cuales son difíciles de sintetizar por la vía química. Hacen mención que el primer metabolito producido por la técnica de cultivo de tejidos a escala comercial, fue la chiconina, producto usado como colorante en cosmetología y en la industria del vestido y como fármaco auxiliar en el tratamiento de heridas y quemaduras.

Robert y Loyola (1985), mencionan a ciertas especies como *Nicotiana rustica* y *Cassia tora*, cuyos callos cultivados *in vitro* tienen la capacidad de sintetizar y acumular metabolitos secundarios que se aproximan o exceden a los producidos por plantas completas.

Vázquez y Villegas (1989), cultivaron *in vitro* cinco especies de plantas medicinales: epazote, albahaca, muitle, espinosillo y diente de león, logrando la inducción de callo, la extracción y caracterización del metabolito en la planta original y en el cultivo *in vitro*.

Chávez, *et al* (1997), realizaron un estudio comparativo de betacianinas presentes en callo y fruto de *Stenocereus queratoerensis*, concluyendo que a nivel de callo la biosíntesis parece no completarse y solo se produce un tipo de betacianina.

Chávez M y Villegas T (1989), cultivaron *in vitro* cinco especies de plantas porductoras de pigmentos, el medio utilizado fue el de MS usando 2,4-D en una concentración de 1.5 mg/l y K en 0.2 mg/l , obteniendo la producción de betaleínas.

Reinert J. y Bajaj Y. (1977), enlistan los siguientes metabolitos secundarios obtenidos de cultivo de tejidos de árboles forestales: aminoácidos del *Ginkgo biloba*, taninos y compuestos fenólicos de *Juniperus communis* y *Pinus resinosa*, agentes antimicrobianos de *Populus tremuloides* y *Phytolacca americana*, y la camptothecina, que es un alcaloide usado como agente antitumoral y antileucémico y obtenido de *Camptotheca acuminata*, sin embargo las cantidades obtenidas por esta técnica son pequeñas y no se pueden comparar con una escala industrial.

### **AISLAMIENTO DE COMPUESTOS**

Valencia O (1995), menciona que las formas de aislar los principios activos presentes en las plantas son muy diversos entre los que describe: precipitación disolvente-disolvente, extracción líquido-líquido. Para su caracterización recomienda reacciones coloridas, métodos cromatográficos, electroforéticos y de espectrofotometría.

La propiedad química más característica de los alcaloides es su basicidad (exceptuando, la ricinina, colchicina y otros casos muy particulares), por lo que los métodos para aislarlos, purificarlos e identificarlos por lo general aprovechan su basicidad. Aunque muchos alcaloides pueden extraerse con disolventes neutros, como alcoholes y cloroformo, es frecuente extraerlos con soluciones de ácidos en agua, con lo cual se separan los alcaloides y sus sales. En algunos casos el material vegetal se desengrasa con éter de petróleo o benceno y después se alcaliniza con hidróxido de calcio, de amonio o con solución de carbonato de sodio y después se extraen con disolventes orgánicos, tales como cloroformo, benceno,

cloruro de metileno, éter etílico o isopropílico. De estos disolventes se pasa el alcaloide a una fase de agua acidulada de donde se precipitan con álcali y se vuelven a pasar a una fase orgánica, con la que se separa de sustancias neutras y ácidas. Los alcaloides contenidos en la última fase orgánica pueden separarse por métodos particulares como cromatografía, intercambio iónico, cristalización fraccionada, etc. Unos cuantos alcaloides son arrastrados con vapor de agua, como la nicotina en medio alcalino. También se les puede precipitar de soluciones ácidas con silicato de aluminio (reactivo de Lloyd) y después eluirse selectivamente con bases diluidas. De los precipitados formados por los alcaloides al mezclarse con el mercurio-yoduro de potasio (reactivo de Mayer), con las sales de Reinecke y con el tetrafenilboro sodio, pueden descomponerse permitiendo la recuperación de los alcaloides. Domínguez, (1973) .

Wagner *et al* (1984), refieren que la basicidad de los alcaloides difiere grandemente, y que pueden ser obtenidos por extracción metanólica y mencionan que de los métodos cromatográficos actuales disponibles, el método de cromatografía en capa fina ha sido adoptado por su rapidez y efectividad para detectar drogas.

Domínguez X.A. (1973)., refiere varios métodos químicos para detectar compuestos como: insaturaciones, con la prueba del  $\text{Br}_2/\text{CCl}_4$  o del  $\text{KmnO}_4$ ; para grupo carbonilo la prueba de 2-4- dinitrofenilhidracina; para oxidrilos fenólicos la reacción con  $\text{FeCl}_3$ ; para esteroides y terpenos la prueba de Liebermann-Burchard y la de Salkowski; para carbohidratos la prueba de Molisch; para cumarinas la prueba con  $\text{NaOH}$  al 10%; para sesquiterpenlactonas la prueba de Baljet; para flavonoides la prueba de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y para alcaloides la prueba de Dragendorff.

### 1.3 HIPÓTESIS

Existe una diferencia en el contenido de metabolitos de los tejidos de la plántula y el callo desarrollado *in vitro*

### 1.4 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio fitoquímico comparativo de tejidos cultivados *in vitro* e *in vivo* de *Stenocereus griseus* (Haworth) Buxabaum.

### 1.5 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Establecer un protocolo de desinfección para cultivo *in vitro*
- ❖ Obtener una reserva de tejido vegetal *in vitro* e *in vivo* de *Stenocereus griseus* para estudio, a partir de semillas.
- ❖ Instaurar el cultivo aséptico de callo.
- ❖ Realizar el estudio fitoquímico comparativo de los tejidos cultivados *in vitro* e *in vivo*.

## 2. MATERIAL

Agitador Dual Action Shaker Lab Line

Agitador magnético y térmico

Balanza analítica

Balanza granataria

Campana de flujo laminar

Clima

Espectrómetro de Infrarrojo Perkin Elmer, Pargon 2,000 FTIR.

Jeringa Hamilton 710 N

Lámpara de alcohol

Lampara de luz ultravioleta

Potenciómetro

Refrigerador

Regulador de fotoperíodo (Timer)

Termómetro

## **2.3 REACTIVOS PARA MEDIO DE CULTIVO**

### **2.3.1 COMPONENTES INORGÁNICOS**

#### **2.3.1.1 MACROELEMENTOS:**

$\text{NH}_4\text{NO}_3$

$\text{KNO}_3$

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$\text{KH}_2\text{PO}_4$

#### **2.3.1.2 COMPONENTES INORGÁNICOS : MICROELEMENTOS:**

$\text{Na}_2\text{EDTA}$

$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$\text{H}_3\text{BO}_3$

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

KI

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Agua bidestilada

HCl 1N

NaOH 0.1 N

### **2.4. COMPONENTES ORGÁNICOS**

Myo-inositol

Ac. Nicotínico

Piridoxina \* HCl

Tiamina \* HCl

Glicina

Sacarosa

Agar

## **2.5 REGULADORES DEL CRECIMIENTO**

2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) K (Cinetina)

## **2.6 REACTIVOS PARA ESTUDIO FITOQUIMICO**

Hexano

Acetaldehido

Acetona

Dietilamina

Ciclohexano

Cloroformo

Cloruro Férrico al 5%

Metanol

Reactivo de Dragendorff

Reactivo de Baljet

Hidroxido de Sodio al 10%

### 3. MÉTODOLÓGIA

Se dividió en las siguientes etapas:

- 3.1 Desarrollo del cultivo "*in vivo*".
- 3.2 Establecimiento del cultivo aséptico y desarrollo del cultivo "*in vitro* de callo"
- 3.3 Obtención de extractos
- 3.4 Realización de pruebas coloridas
- 3.5 Cromatografía en capa fina con sílica gel.
- 3.6 Espectroscopia de infrarrojo para grupos funcionales

#### 3.1 Desarrollo del cultivo "*in vivo*"

De frutos maduros (Foto.1), se extrajeron las semillas (Foto.2), se lavaron y tamizaron, una vez limpias se procedió a inducir su germinación. Las semillas se colocaron en un almácigo consistente de sustrato orgánico y perlita (50/50) con riego diario y fotoperíodo de 12 h. luz y temperatura de 23°C (Foto. 3 y 4). Una vez que los brotes alcanzaron un tamaño aproximado de 4 centímetros (Foto. 5) se procedió a implementar la técnica de cultivo de tejidos.

#### 3.2 Establecimiento del cultivo aséptico y desarrollo del cultivo "*in vitro* de callo"

Los brotes (Foto. 6) fueron seccionados en forma longitudinal y se colocaron en una gasa para su manejo, siendo desinfectados primeramente con un lavado en agua corriente, luego un DIP con alcohol etílico y por último se sumergieron por 10 minutos en una solución de cloro 10% para luego enjuagarlas con agua estéril y colocarlos en Medio MS, con condiciones de 12 h de fotoperíodo y 23° C. El medio

MS, fue adicionado con 2,4D (5 mg/l) y K (5mg/l) para la inducción de callo (Foto. 7). Una vez establecido el cultivo de callo *in vitro* y las plántulas en almácigo se realizaron los estudios fitoquímicos.

### **3.3 Obtención de extractos**

Se tomaron las plántulas crecidas en almácigo durante un año, se removieron sus raíces, se lavaron y pesaron en una balanza analítica, el peso de las plántulas fue: 4g., se utilizó la técnica de maceración a temperatura ambiente; se le adicionó 200 mL. de hexano, las muestras fueron colocadas en matraces perfectamente cerrados, para posteriormente someterse a agitación constante en un agitador Dual Action Shaker Lab Line a temperatura ambiente por espacio de 48h. Después de esto se separó el hexano y se centrifugó por 5 minutos a 2500 r.p.m., para luego evaporarlo y así concentrar la muestra de la extracción. Al sólido del tubo de ensayo se le agregó mas hexano, para extraer la mayoría de los compuestos no polares que se encontraban en la muestra, nuevamente se centrifugó a las mismas revoluciones y tiempos y se depositó él liquido restante en un vaso de precipitado, para su evaporación, con esto se terminó la extracción hexánica y sé continuó con la metanólica, que comienza devolviendo el sólido restante al matraz Erlenmeyer original y agregando una cantidad de 200 mL de metanol para su agitación por dos días, después de esto se centrifugó bajo las mismas condiciones a las que se sometió el extracto hexánico y luego se evaporó. Al sólido restante, se le reintegró al matraz para su segunda extracción con el mismo alcohol durante otros dos días. A los dos días de evaporación de los

extractos se pesaron para obtener la diferencia entre el peso del vaso y la solución extractada. Para el callo se siguió el mismo procedimiento.

### **3.4 Realización de pruebas coloridas**

A partir de los extractos (Foto. 8) se desarrollaron las pruebas coloridas para la identificación de los compuestos presentes:

#### **Prueba de Dragendorff:**

Modificación de Munier y Machelobuf. Para alcaloides. Solución A: Se disuelven en 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Solución B: Se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 mL de A, 4 mL de B y 100 mL de agua, el reactivo es estable por un año, la prueba es positiva para alcaloides al dar la placa coloraciones rojo o naranja, persistentes por 24 h.

#### **Prueba de hidróxido de sodio**

Prueba de hidróxido de sodio al 10% para cumarinas: se disuelven 100 microlitros de la muestra en una solución de NaOH al 10% si aparece una coloración amarilla al acidular, la prueba es positiva.

#### **Prueba de Shinoda:**

Para compuestos de tipo flavonoide; 1.0 mg de la muestra disuelta en etanol y limaduras de magnesio se le aplica calor (60 °C) y después unas gotas de HCl por

las paredes. Se considera positiva con la aparición de colores naranja, rojo, rosa, a violeta.

#### **Prueba de Baljet:**

Esta prueba es para sesquiterpenlactonas, donde se usan dos soluciones, la solución A) se coloca 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol y la solución B) se agregan 10 g de NaOH en 100 mL de agua. Para la prueba se agregan 100 microlitros de la muestra y 3 ó 4 gotas del reactivo siendo la prueba positiva si adquiere una coloración naranja o rojo oscuro.

#### **Prueba de cloruro férrico:**

La solución de cloruro férrico al 5%, se utiliza para determinar oxidrilos fenólicos, se toma 1 o 2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol y se le adicionan una gotas de cloruro férrico al 5%, la aparición de un precipitado rojo, azul violeta o verde se considera positivo.

También se realizaron pruebas cromatográficas para la separación e identificación por métodos de agentes cromogénicos con luz ultravioleta de onda corta (254/366 n.m.), para obtener los R.f. (Relación de frentes).

### **3.5 Cromatografía**

En la página de internet <http://www.ur.mx/cursos/diya/quimica/jescobed/> menciona la definición de la palabra Cromatografía la cual significa "Escribir en Colores" ya que cuando fue desarrollada, los componentes separados eran colorantes. Los componentes de una mezcla pueden presentar una diferente tendencia a permanecer en cualquiera de las fases involucradas. Mientras más veces los componentes viajen de una fase a la otra (partición) se obtendrá una mejor separación.

Las técnicas cromatográficas se basan en la aplicación de la mezcla en un punto (punto de inyección o aplicación) seguido de la influencia de la fase móvil. Hay diversas técnicas cromatográficas la empleada en el presente trabajo, fue la cromatografía en capa fina.

#### **3.5.1 Cromatografía en capa fina.**

En esta técnica se utiliza una placa de vidrio recubierta con fase estacionaria (generalmente con sílica u óxido de magnesio con algunas variantes) manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. La placa se coloca en una cuba cromatográfica, la cual debe encontrarse saturada con el eluyente (fase móvil líquida). El eluyente ascenderá por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo "manchas" de los componentes. Si los componentes no son coloreados se requerirán técnicas de revelado (adición de ninhidrina a aminas, ácido sulfúrico para carbonizar compuestos orgánicos, solución de Dragendorff, etc.) y/o observación bajo luz ultravioleta.

Para las pruebas cromatografías se usó como absorbente sílica Gel G, F-254, sobre placas de vidrio las cuales fueron activadas en una estufa a 115°C durante 2:00 h, mediante un Jeringa de 100 microlitros se distribuyó una porción del extracto, se dejó evaporar el solvente, posteriormente se efectuó el corrimiento dentro de una cámara de vidrio con la mezcla de solventes seleccionados.

### **3.5.2 Técnica para la preparación de las placas para la cromatografía en capa fina**

Pasos para la realización de las placas con 10 g de sílica gel 7G

1. Limpiar la placa de vidrio con etanol.
2. En un vaso de precipitado agregar 10 g de sílica gel 7G
3. Agregar agua destilada, la cantidad determinada es de 1:3, o sea que por cada g de sílica se deben de colocar tres mililitros de agua destilada (pero se recomienda colocar 1:2.5 para determinar la consistencia de la mezcla y agregar el otro medio mililitro solo si la mezcla no esta muy líquida).
4. Se mezcla lentamente para que no se formen burbujas.
5. Se vacía la mezcla sobre las placas de vidrio asegurándose que se reparta equitativa y uniformemente sobre la superficie de esta, para lo cual se recomienda hacer movimientos ondulatorios de la placa de vidrio. ( Con 10 g de sílica se logran hacer de 7 a 9 placas de 10 X 5 cm.).
6. Se deja secar en un área horizontal plana.
7. Se activan colocándolas en la estufa a 120°C por una hora aproximadamente.

Para la realización de las cromatografías, los extractos se disuelven en ½ mL. de cloroformo al extracto hexánico y ½ mL. de metanol al extracto metanólico. se colocan 50 microlitros en las placas, con una jeringa Hamilton de 100 microlitros, aproximadamente en el cuadrante de un cm. de la parte inferior y lateral, en el lado derecho el callo y en el izquierdo la plántula, para poder comparar las dos muestras, asegurándose de poner cada gota en forma tal que seque cada una antes de poner la siguiente. Después de secar las gotas se colocan en los eluentes para su corrimiento. Los diferentes eluentes que se utilizaron para arrastrar los compuestos fueron:

1. Benceno -Metanol 6:4
2. Benceno -Metanol 7:3
3. Benceno -Metanol 8:2
4. Benceno -Metanol 9:1
5. Cloroformo- Metanol 15:5
6. Cloroformo- Metanol 17:3
7. Cloroformo- Metanol 19:1
8. Cloroformo - Acetona - Dietilamina 5:4:1
9. Tolueno - Acetato de Etilo - Dietilamina 7:2:1
10. Tolueno - Eter 1:1 (Saturado con Ac. Acético al 10%)

Al colocar las placas en los recipientes de los eluentes se debe observar que estos se encuentren por debajo de las manchas o sea menor de un cm. y que el corrimiento no llegue hasta la parte superior de la placa para que se puedan determinar las relaciones de frentes " Rf ", las cuales se obtienen calculando la

distancia del punto de aplicación al centro de la mancha estudiada y se divide entre la distancia recorrida por el eluente.

$$R.f. = \frac{a}{b}$$

R f = Relación de Frentes

a = Distancia recorrida por los compuestos presentes en la muestra

b = Distancia total recorrida por el eluente.

### **3.6 Métodos espectroscópicos para la determinación de grupos funcionales**

La determinación de los grupos funcionales del alcaloide se llevó a cabo con un espectrómetro de Infrarrojo Perkin Elmer, Pargon 2,000 FTIR, en la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Desarrollo de callo

El establecimiento del cultivo de callo "in vitro" para *Stenocereus griseus*, se logró con el medio MS (1962) adicionado con 5 mg/l de 2,4-D y 5 mg/l de K, lo que concuerda con Morales E (2000) y Silos y Meléndez (1985), que utilizaron esta combinación de reguladores de crecimiento para inducir callo en otras especies de esta familia, siendo la proliferación de callo para *S. griseus* mas abundante que la reportada por estos autores.

### 4.2 Pruebas coloridas de callo y plántula

Los resultados de los estudios fitoquímicos para plántula y callo (tabla 1), indican la presencia de alcaloides, cumarinas, sesquiterpenlactonas y oxidrilos fenólicos en ambas muestras, los cuales en forma cualitativa se encuentran en mayor cantidad en los tejidos *in vivo*, resultados que concuerdan con Chávez et al 1997 que encontró mayor cantidad de betaleinas, pero no con Vázquez y Villegas 1989 y Pierik. 1990. La presencia de alcaloides para esta especie es también reportada por <http://www.herbal-shaman.com/>

En base a los resultados de las pruebas cromatográficas se puede concluir que los extractos polares obtenidos a través de la extracción metanólica corroboran la hipótesis, ya que muestran una diferencia entre los compuestos encontrados en plántula y callo, como se puede observar en la Fig. 3,4, 6 y 7. Por otro lado, los compuestos no polares obtenidos de la extracción hexánica son muy similares, esto fue corroborado con la prueba del espectrofotómetro infrarrojo,

que demuestra que se trata de los mismos compuestos, como se puede ver en la Fig.10.

### **4.3 Cromatografía**

Sobre la base de las observaciones de los corrimientos cromatográficos (Fig 1 – 9) y el revelado de los mismos se obtuvieron las relaciones de frentes mencionadas en la tabla 2 . Las cuales nos muestran los siguientes resultados:

1. En plántula y callo se encuentran alcaloides.
2. Los extractos hexánicos y metanólicos separaron diferentes compuestos.
3. Las relaciones de frentes de los alcaloides encontrados en plántula y callo de extractos hexánicos son similares por lo que se puede deducir que son los mismos compuestos (tabla 3-4).
4. Los extractos metanólicos solamente se separaron con ciertos eluentes como se observa en la tabla 2 y 5, dando como resultado, relaciones de frentes diferentes en los alcaloides, por lo que se puede deducir que son compuestos distintos.
5. Los eluentes que mejor separaron los extractos fueron Benceno – Metanol.
6. Las proporciones óptimas de Benceno – Metanol para la separación de los compuestos fueron 7:3, 8:2, 9:1, en orden progresivo.

#### 4.4 Espectro infrarrojo

1. Los resultados de las pruebas con el infrarrojo mostrados en la Fig. 10 y 11, comprueban la similitud de los compuestos extraídos hexanicamente en plántula y callo. Banthrope y colaboradores (1986), reporta resultados similares pero con aceites esenciales.
2. El espectro de infrarrojo de la banda identificada como alcaloide con el reactivo de Dragendorff, mostró las siguientes bandas: a  $2921$  y  $2852\text{ cm}^{-1}$  (F) correspondientes a vibraciones por estiramiento de enlaces C-H de metilos y metilenos; a  $1704\text{ cm}^{-1}$  (M') se debe al estiramiento C=N, a  $1461\text{ cm}^{-1}$  (M') al estiramiento C-N y a  $1375, 1278$  y  $724\text{ cm}^{-1}$  (D) correspondientes a movimiento de flexión C-H (Domínguez 1973, Silverstein 1991), con los datos anteriores confirmamos la presencia de un alcaloide en *Stenocereus griseus*, este resultado concuerda con Domínguez (1973) quien reporta que 19 géneros de la familia cactácea contienen estos compuestos, también Bravo y Sánchez (1978) encontraron alcaloides en dos especies de *Stenocereus*, *S. weberi* y *S. marginatus*.

## FIGURAS

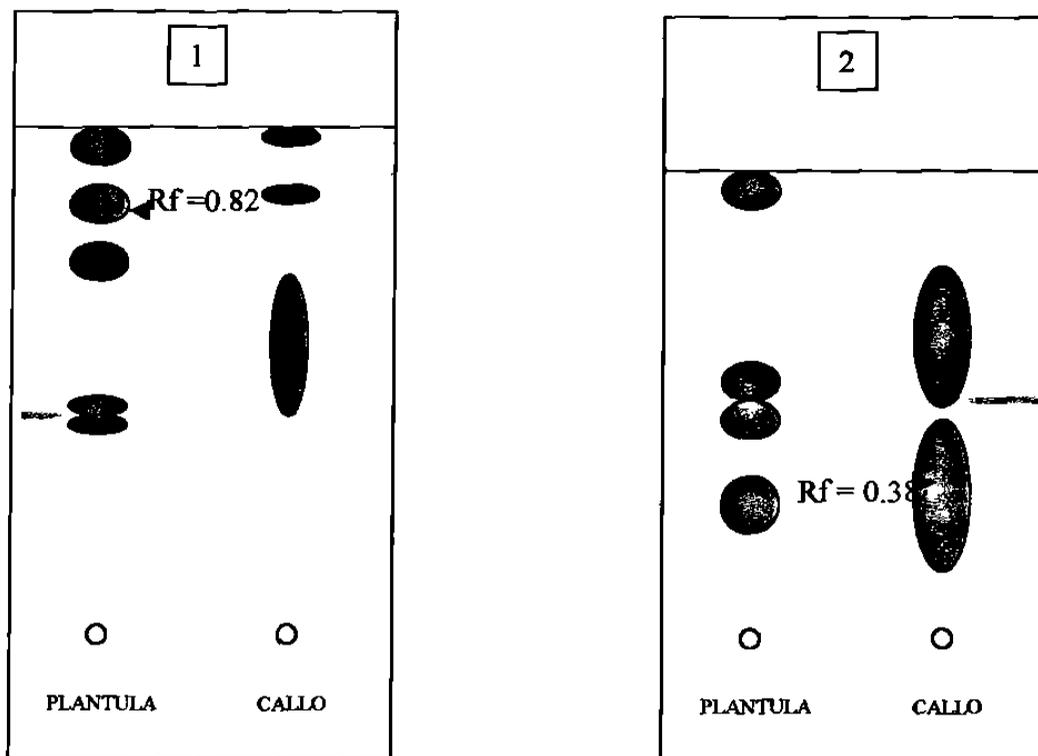


Fig. 1.- Corrimiento de extracto hexánico (1) y metanólico (2) de plántula y callo en placas de 5 X 10 cm. con eluente de Benceno - Metanol 8:2.

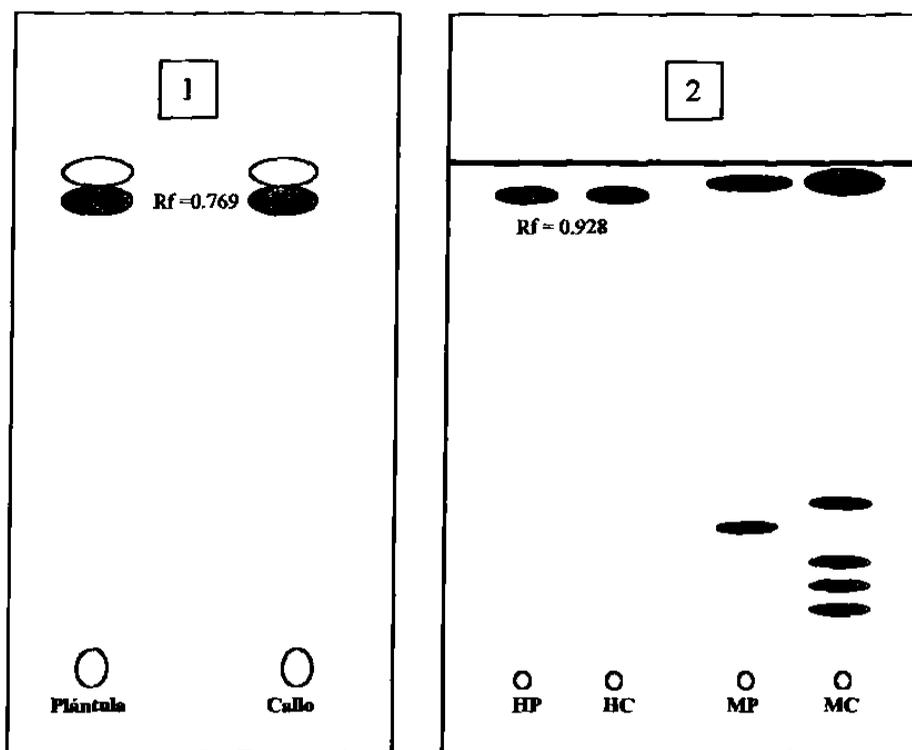


Fig. 2.- Corrimiento de extracto hexánico (1) de plántula y callo en placas de 20 X 10 cm. con eluyente de Benceno - Metanol 6:4 .

Fig. 3.- Corrimiento de extracto hexánico (H) y metanólico (M)(2) de plántula(P) y callo(C) en placas de 10 X 20 cm. con eluyente de Cloroformo - Metanol 15:5.

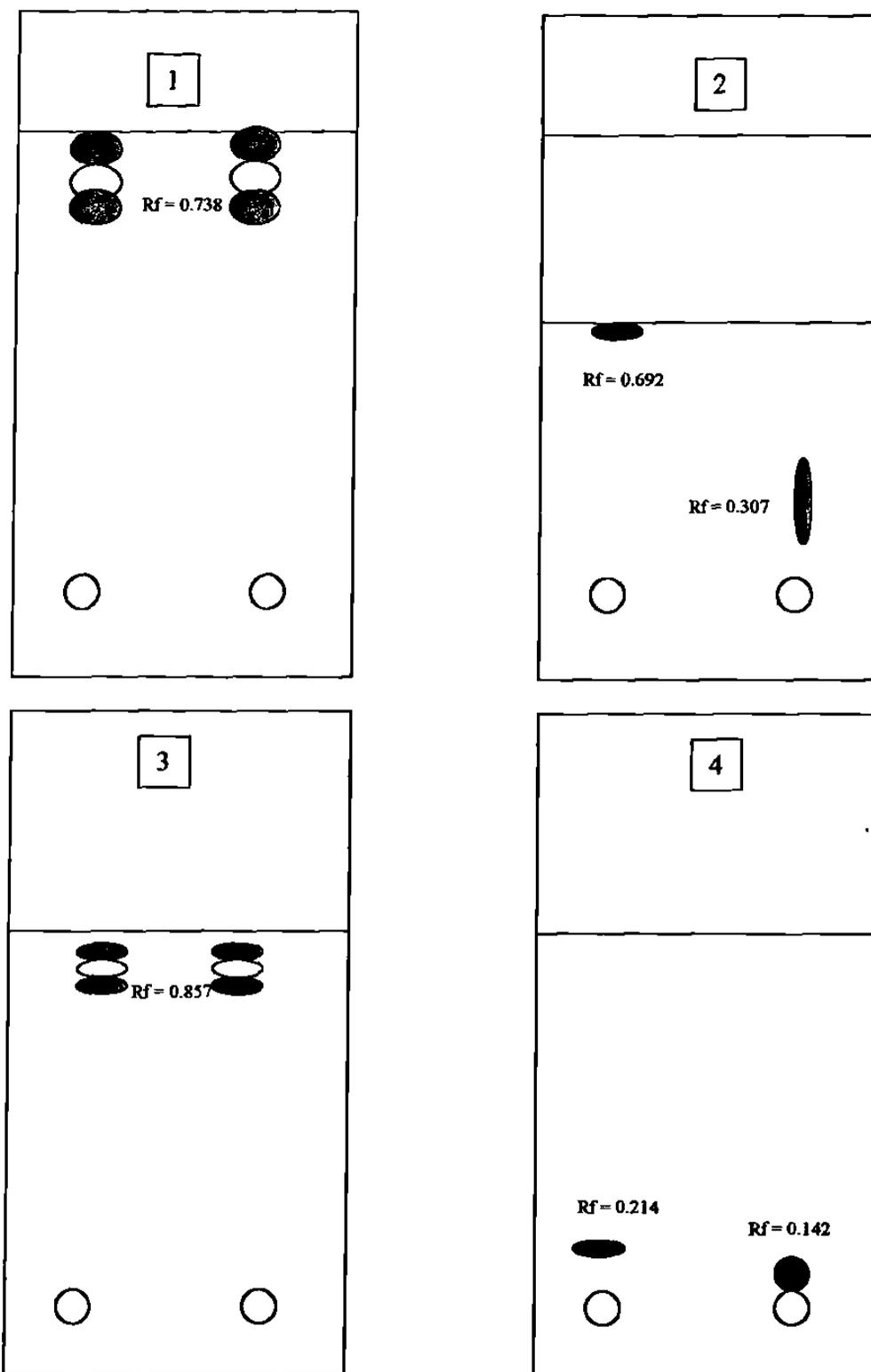


Fig. 4.- Corrimiento de extracto hexánico (1,3) y metanólico (2,4) de plántula y callo en placas de 5 X 10 cm. con eluente de Benceno - Metanol 7:3 (1,2) Y 9:1(3,4) respectivamente.

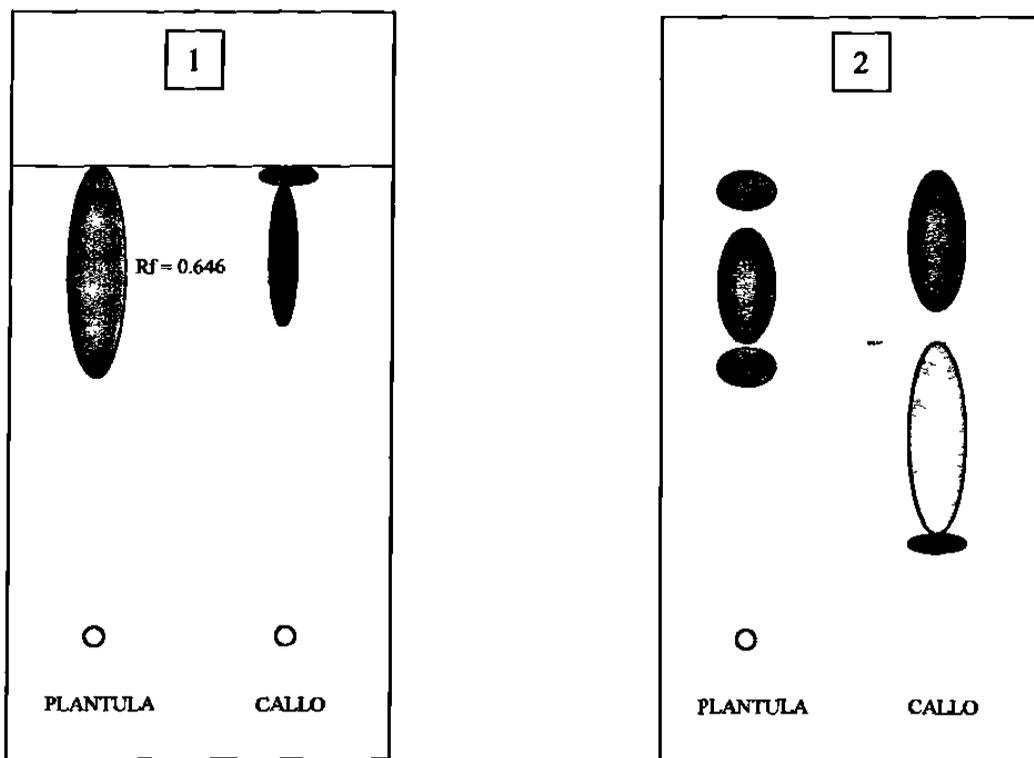


Fig. 5.- Corrimiento de extracto hexánico (H)(1) y metanólico (2) de plántula(P) y callo(C) en placas de 5 X 10 cm. con eluente de Cloroformo - Metanol 17:3.

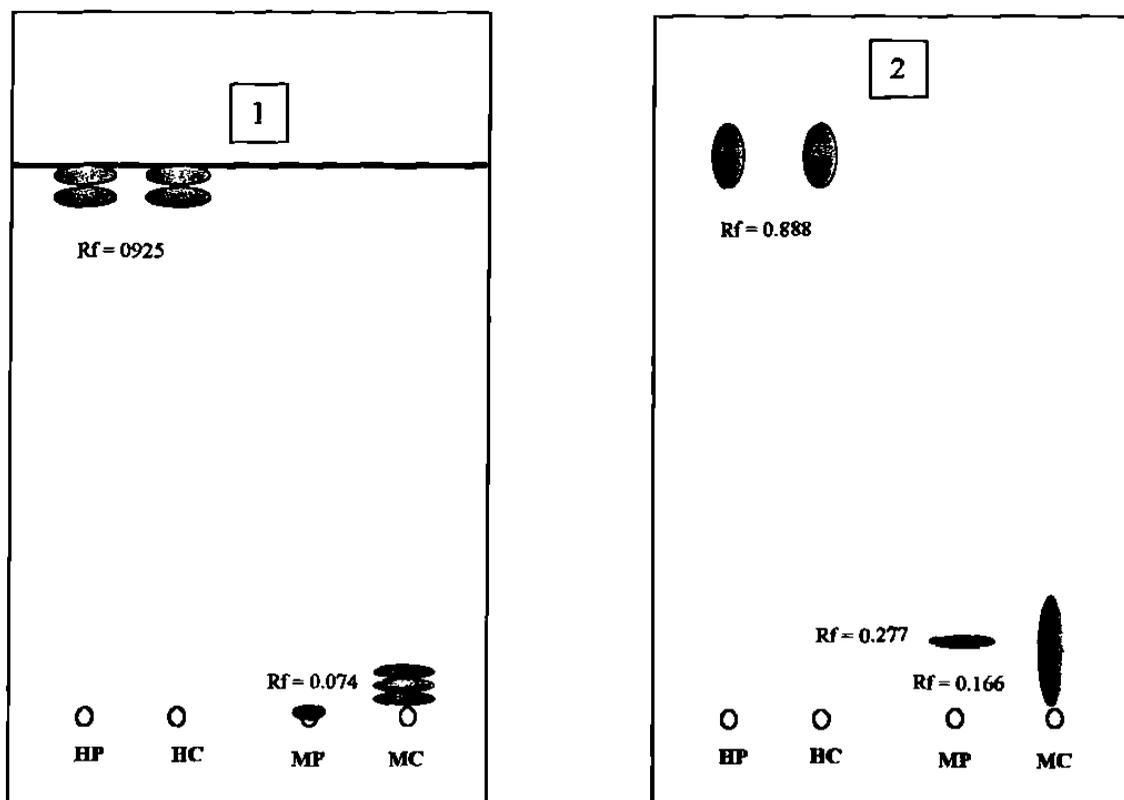


Fig. 6.- Corrimiento de extracto hexánico (H) y metanólico (M)(1) de plántula(P) y callo(C) en placas de 10 X 20 cm. con eluente de Cloroformo - Metanol 19:1.

Fig. 7.- Corrimiento de extracto hexánico (H) y metanólico (M)(2) de plántula(P) y callo(C) en placas de 10 X 20 cm. con eluente de Cloroformo - Acetona - Dietilamina 5:4:1.

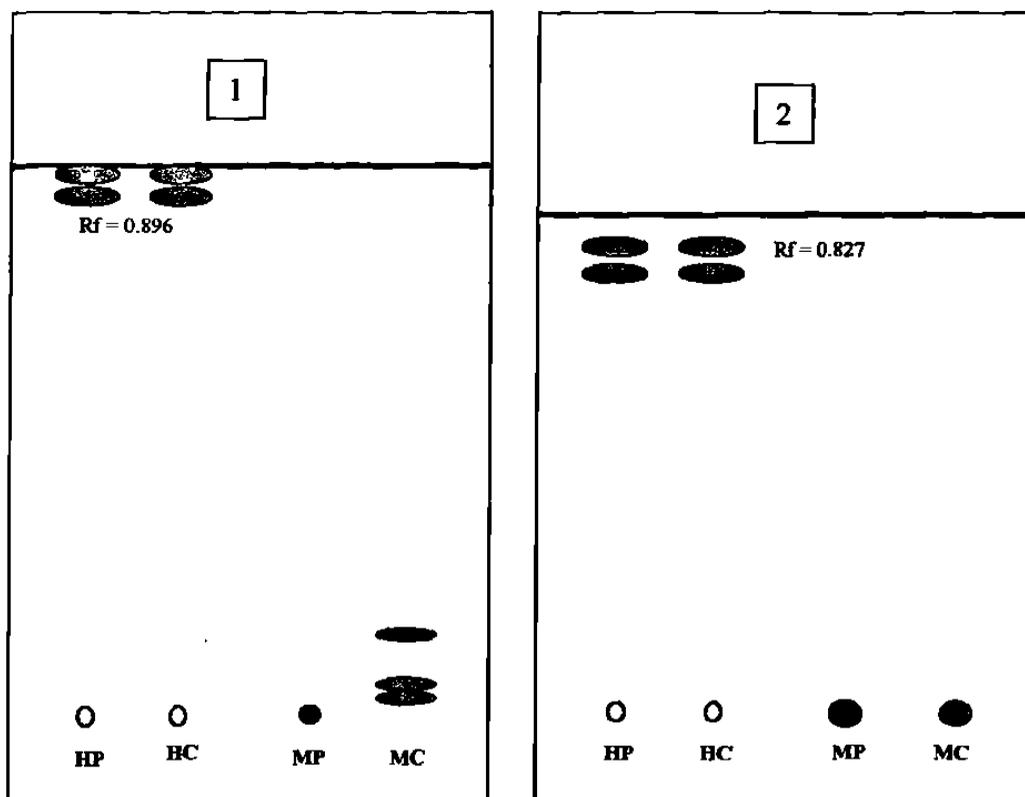
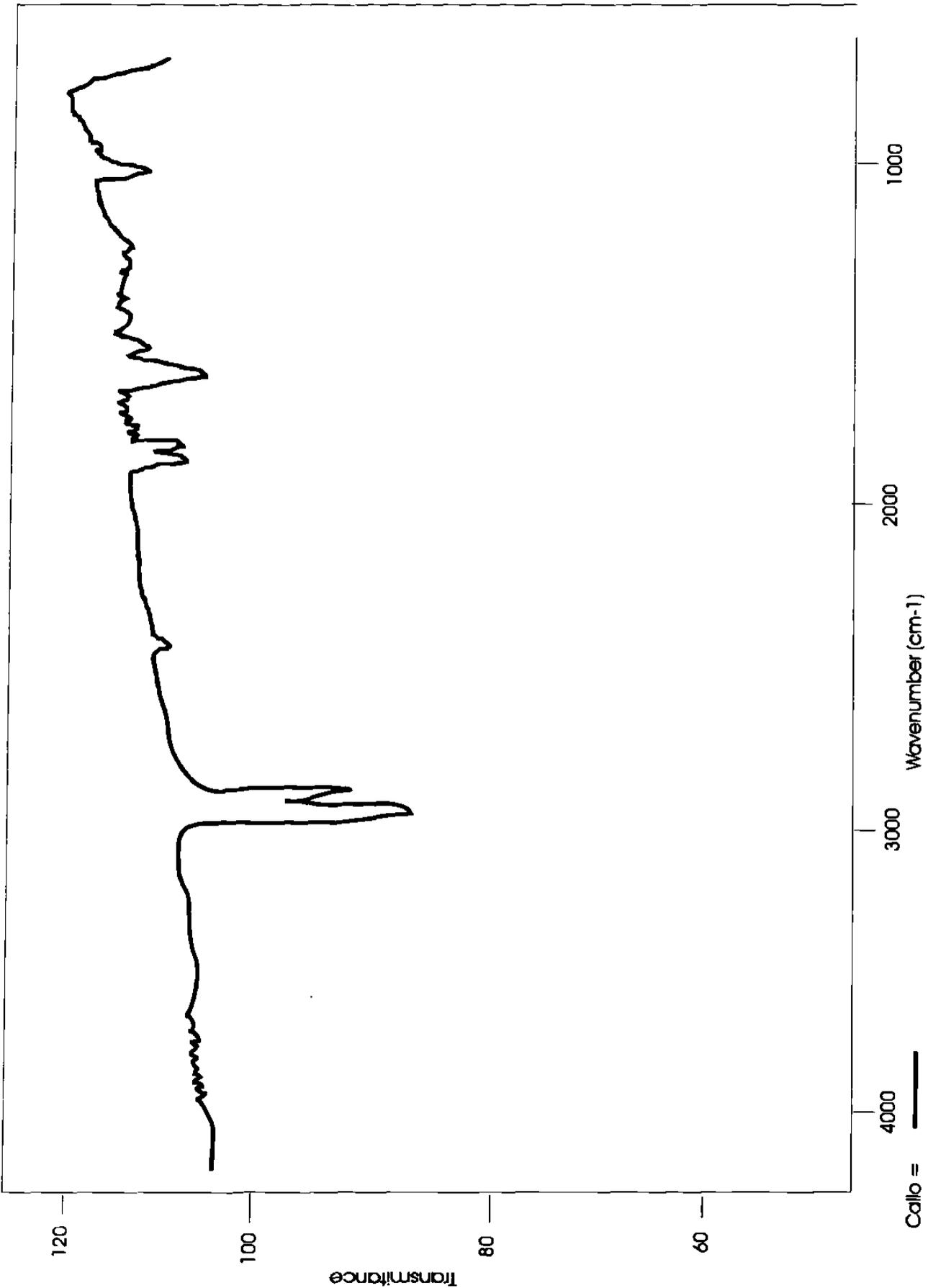


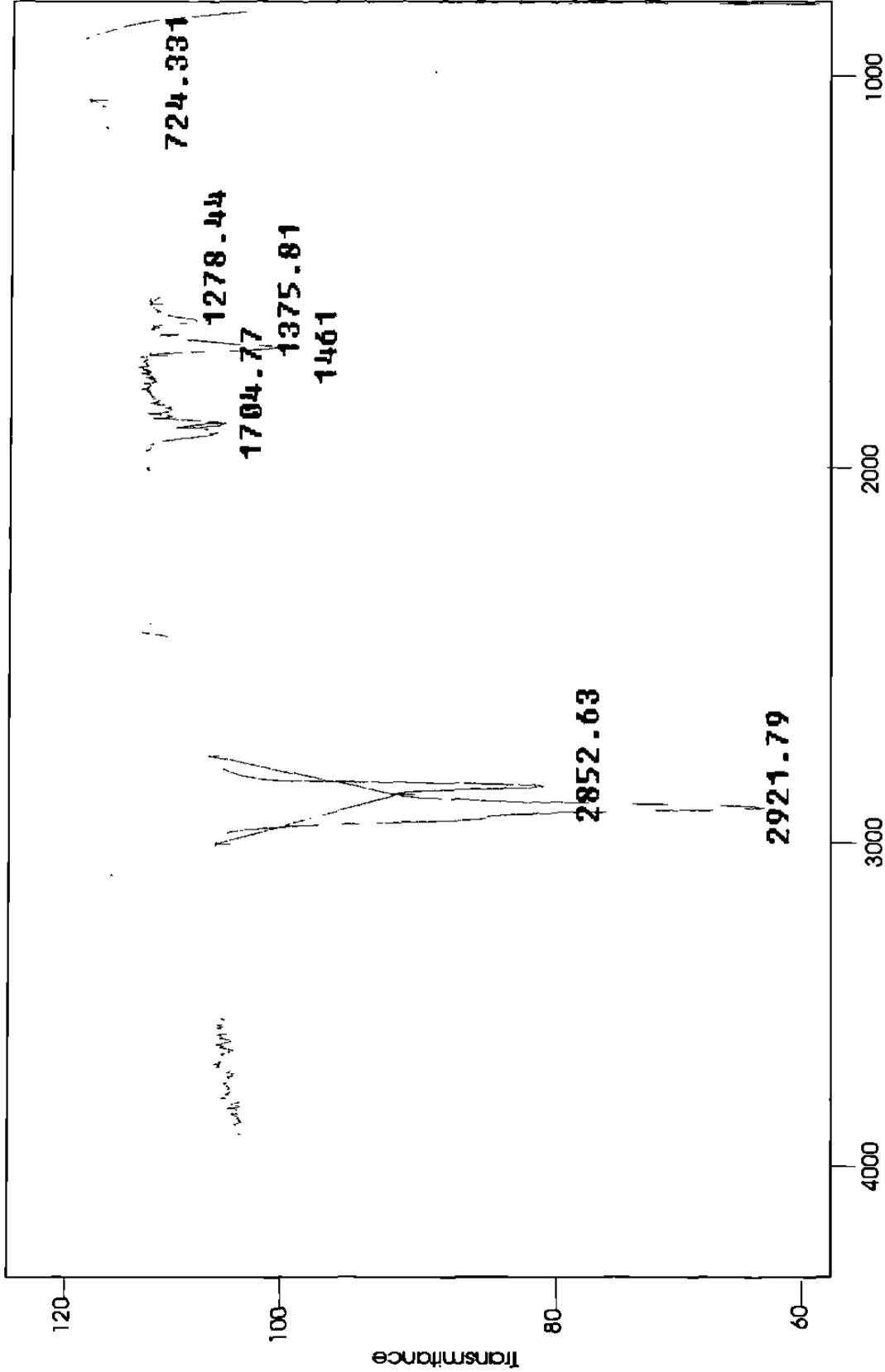
Fig. 8.- Corrimiento de extracto hexánico (H) y metanólico (M)(1) de plántula(P) y callo(C) en placas de 10 X 20 cm. con eluente de Tolueno – Acetato de etilo – Dietilamina 7:2:1.

Fig. 9.- Corrimiento de extracto hexánico (H) y metanólico (M)(2) de plántula(P) y callo(C) en placas de 10 X 20 cm. con eluente de Tolueno – Eter 1:1 (saturado con Ácido Acético al 10%).



Callo =   
 Plantula =   
 Resolution = 2 cm-1  
 Date & Time = 22/09/00 12:08 PM

Fig. 10. Resultados del espectro infrarrojo para determinar la similitud de los compuestos extraídos en la cromatografía de capa fina, de callo y plántula, de los extractos hexánicos.



File name = Callo  
 Resolution = 2 cm-1  
 Date & Time = 22/09/00 12:08 PM

Wavenumber (cm-1)

Fig.11.- Espectro Infrarrojo de callo de *Stenocereus griseus*

## TABLAS

	Alcaloides	Coumarinas	Flavonoides	Sesquiterpenlactonas	Oxidrilos fenólicos
Plántula (Hexano)	+	+	-	+	+
Callo (Hexano)	+	+	-	+	+
Plántula (Metanol)	+	+	-	+	+
Callo (Metanol)	-	+	-	+	+
Prueba	Dragendorff	NaOH 10%	Shinoda HCl +Mg	Baljet	Cloruro férico 5%

**Tabla 1.- Pruebas coloridas de *Stenocereus griseus***

	<b>ELUENTES</b>		<b>Hexano Plántula Rf</b>	<b>Hexano Callo Rf</b>	<b>Metanol Plántula Rf</b>	<b>Metanol Callo Rf</b>
1	Benceno - Metanol	6:4	0.769	0.769	0	0
2	Benceno - Metanol	7:3	0.738	0.738	0.692	0.307
3	Benceno - Metanol	8:2	0.828	0.828	0.323	0.307
4	Benceno - Metanol	9:1	0.857	0.857	0.214	0.142
5	Cloroformo - Metanol	15:5	0.928	0.928	0	0
6	Cloroformo- Metanol	17:3	0.646	0.646	0	0
7	Cloroformo- Metanol	19:1	0.925	0.925	0	0.074
8	Cloroformo - Acetona - Dietilamina	5:4:1	0.888	0.888	0.277	0.166
9	Tolueno - Acetato de Etilo - Dietilamina	7:2:1	0.896	0.896	0	0
10	Tolueno - Éter (Saturado con Ac. Acético al 10%)	1:1	0.827	0.827	0	0

Tabla 2. Resultados de las relaciones de frentes (**Rf**), de los alcaloides encontrados en plántulas y callo con extracciones hexánicas y metanólicas y revelados con el reactivo de Dragendorff.

Eluentes	Rf	Visible	uv	Dragendorff
1	0.769	Amarillo claro	Verde brillante	café
2	0.738	Amarillo claro	Azul verdoso	café
3	0.828	Amarillo claro	Verde brillante	café
4	0.857	Amarillo claro	Verde brillante	café
5	0.928	Amarillo claro	Azul verdoso	café
6	0.646	Amarillo claro	Azul verdoso	café
7	0.925	Amarillo claro	Verde brillante	café
8	0.888	Amarillo claro	Azul verdoso	café
9	0.896	Amarillo claro	Verde brillante	café
10	0.827	Amarillo claro	Verde brillante	café

**Tabla 3.-** Cromatografía en capa fina con varios eluentes (tabla 2) de callo y plántula de *Stenocereus griseus* en extracto hexánico.

Eluentes	Rf	visible	uv	Dragendorff
1	0	-----	-----	-----
2	0.692	Amarillo claro	Rojo	Café
3	0.323	Amarillo claro	Naranja	Café
4	0.214	Amarillo claro	Rojo	Café
5	0	-----	-----	-----
6	0	-----	-----	-----
7	0	-----	-----	-----
8	0.277	Amarillo claro	Azul verdoso	Café
9	0	-----	-----	-----
10	0	-----	-----	-----

**Tabla 4.-** Cromatografía en capa fina con varios eluentes (tabla 2) de plántula de *Stenocereus griseus* en extracto metanólico

Eluentes	Rf	visible	Uv	Dragendorff
1	0	-----	-----	-----
2	0.307	Amarillo claro	Azul verdoso	Café
3	0.307	Amarillo claro	Azul verdoso	Café
4	0.142	Amarillo claro	Azul verdoso	Café
5	0	-----	-----	-----
6	0	-----	-----	-----
7	0.074	Amarillo claro	Azul verdoso	Café
8	0.166	Amarillo claro	Azul verdoso	Café
9	0	-----	-----	-----
10	0	-----	-----	-----

**Tabla 5.-** Cromatografía en capa fina con varios eluentes (tabla 2) de callo de *Stenocereus griseus* en extracto metanólico

## FOTOS



Foto.- 1 Fruto de *Stenocereus griseus* (Hawort) maduro.

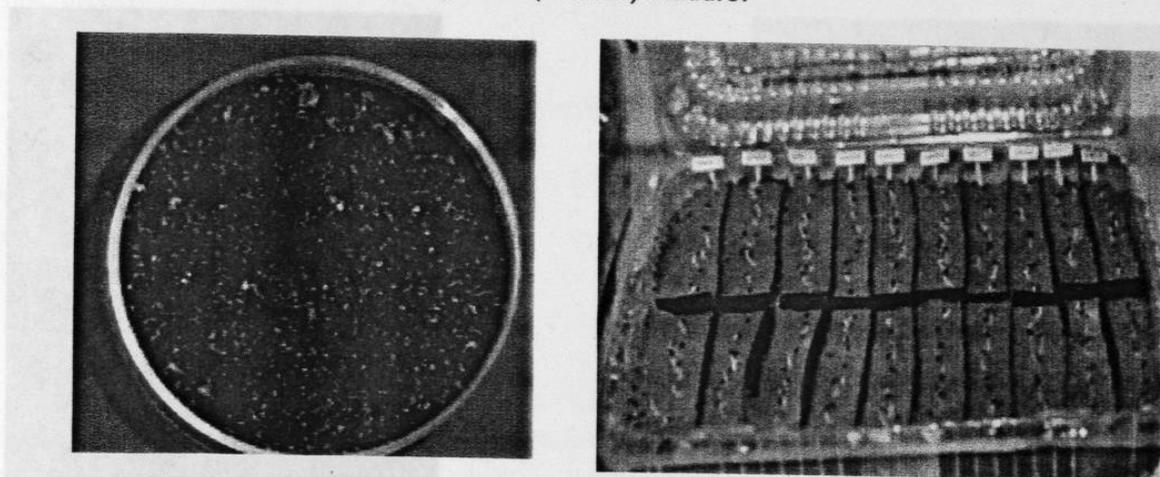


Foto.- 2 Semillas de *S.griseu* (Hawort)

Foto.- 3 Almacigo de *S.griseus* (Hawort)

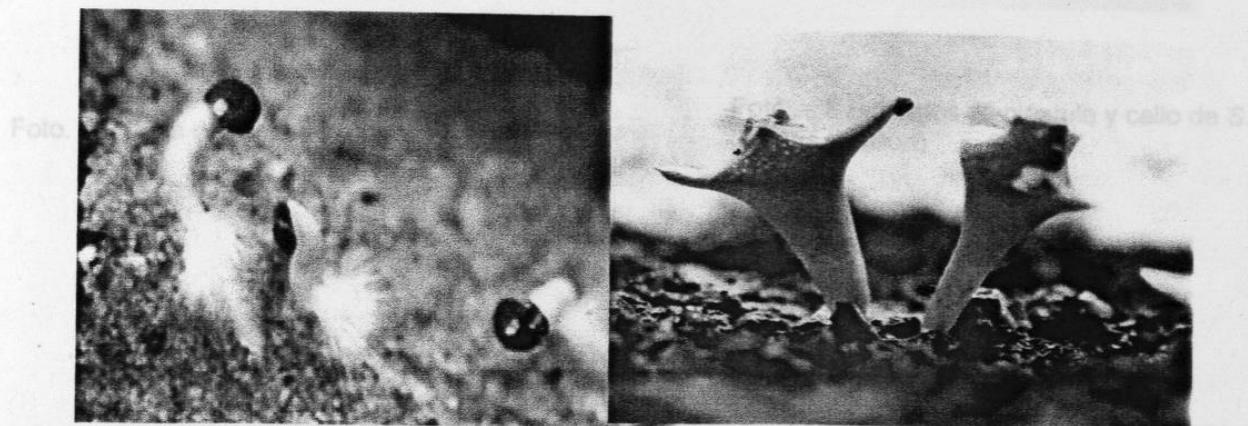
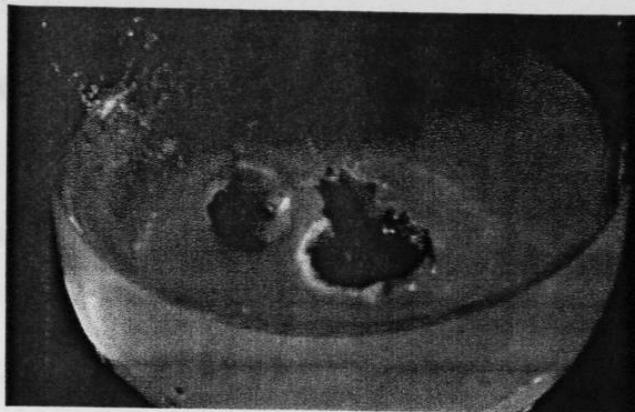
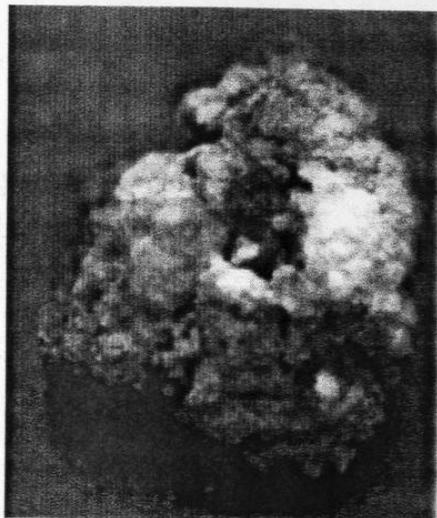


Foto.- 4 Semillas en proceso de germinación y plántulas de *S.griseus* (Hawort)

## 5. CONCLUSIONES

Foto. 5 Plántula de *S. griseus* (Hawort)Foto .-6 Callo de brote de *S. griseus* (Hawort)Foto. - 7 Callo de *S. griseus* (Hawort)Foto. - 8 Extractos de plántula y callo de *S. griseus* (Hawort)

## 5. CONCLUSIONES

- Se logró establecer el cultivo "*in vivo*" de *Stenocereus griseus* (Haworth) Buxbaum, al lograr su germinación y crecimiento en almácigo para así tener una reserva de material vegetativo para su estudio.
- Se estableció el protocolo de desinfección para el cultivo "*in vitro*" para esta especie, para lo cual se llevaron a cabo: lavados de los brotes de plántulas con agua corriente, inmersión en alcohol etílico, solución de cloro, tween 20 y agua estéril, para luego sembrarlos en el Medio MS.
- Se logró la inducción y desarrollo de callo, con el medio MS (1962) adicionado con 2,4-D, 5 mg/l, (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) y K 5 mg/l (cinetina).
- Los metabolitos secundarios encontrados en plántula y callo fueron: alcaloides, sesquiterpenlactonas, coumarinas y oxidrilos fenólicos.
- El alcaloide obtenido en plántula y callo a partir del extracto hexánico es el mismo, esto fue corroborado con el espectro infrarrojo.

## RECOMENDACIONES

- Probar nuevos y diversos eluentes para encontrar los que separen mejor los extractos metanólicos.
  
- Buscar la identificación de los alcaloides así como sus posibles aplicaciones.
  
- Trabajar con mayores cantidades de planta para obtener mayor cantidad de extracto.
  
- El cultivo *in vitro* puede ser explotado como una alternativa para la obtención de compuestos de interés a la industria.

## 6. LITERATURA CITADA

Arias Castro C, Rodríguez Mendiola M y Calva Calva G. 1992. Biotecnología de células y tejidos vegetales: Metabolismo secundario. Avance y Perspectiva.

11: 367-374.

Arnaud Viñas, R, Santiago García P y Benito Bautista P. 1997. Cactáceas, suculentas mexicanas. CONABIO, SEMARNAP, UNAM, CVS. México. pp 79-85.

Bravo - Hollis H. y M.H. Sánchez . 1978 . Las Cactáceas de México. Vol. I Universidad Autónoma de México, México D.F. pp 446-453.

\_\_\_\_\_ a). Las Cactáceas de México. Vol. III Universidad Autónoma de México, México D.F. pp 501-553.

Bravo-Hollis H. y L. Scheinvar 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica. México D.F. pp 127.

Briones Vargas M. (1989). Cultivo de tejidos de seis Plantas Medicinales del Noroeste de México y su estudio fitoquímico preliminar. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias Biológicas. UANL. pp 1-7.

Chávez A, Arceta I, López F, Lugo E y Villafaña J. 1997. Estudio comparativo del pigmento extraído de los cultivos de callos de *Stenocereus queretaroensis* (pitaya) y de fruto. Memorias del VII Congreso Nacional y V Internacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del Nopal. FAUANL, Monterrey., N.L. México. pp 245-246.

Chávez M. Martha y Thelma Villegas G. 1989. Cultivo *in vitro* de algunas especies vegetales para la obtención de colorantes naturales. Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. UANL. III 19.

Cruz H. J.P. 1997. Otras Cactáceas de importancia económica en México, por su producción de frutos comestibles. Memorias de VII Congreso Nacional y V Internacional sobre conocimiento y aprovechamiento del Nopal. Monterrey, N.L. México pp 70-80

Domínguez X A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México D.F. pp 39-44, 211-228, 246.

Espinosa C. 1990. Estudio químico de *Krameria interior* y *Aristolochia brevipes*. Tesis de Maestría. FCBUANL. Monterrey, N.L. México. pp 1-3.

Hurtado M. D. y Merino. M.E. 1988. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México D.F. pp 94 y 95.

<http://www.ur.mx/cursos/diya/quimica/jescobed/>

<http://www.herbal-shaman.com/>

Mantell S. and H. Smith. 1986. Plant Biotechnology. Cambridge University Press. Melbourne, Australia. pp 8-12.

Mir A. I. 1996. Estudio de la respuesta de cuatro genotipos de sorgo "Glossy" y uno "no glossy" a factores de estrés, salinidad, sequía y exposición a un herbicida en desarrollo de plántula y callo. Tesis Doctoral. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores. Monterrey N.L. México. pp 34, 40, 44, 46.

Morales R.E. 2000. Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo *in vitro* de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose. Tesis de Maestría, División de Estudios de Postgrado de la Fac. de Ciencias Biológicas. UANL. Mty, N.L. México. pp 25,35.

Olguín S. y V. Chávez. 1994. Regeneración "*in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw, cactácea amenazada de extinción. Primer congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. México D.F. pp 28.

- Oliveira S.A, Machado M, Prioli A and Mangolin C. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 31(1):47-50.
- Pierik R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa pp 292-295.
- Reinert J. and Yeoman M 1982. *Plant Cell and tissue culture, a Laboratory Manual*. Springer – Verlag. New York. pp 47-55.
- Reinert J. y Bajaj Y. 1977. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Springer-Verlag. New York. pp 107
- Robert M.L y Loyola V.M. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. CONACYT. pp 110-132.
- Silos E. H. *et al.* 1995. Obtención de brotes *in vitro* de *Mammillaria bocasana*, con 2,4-D y Kinetina. En Memorias del II Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. ANABAF. Aguascalientes, Ags. México. pp 56
- Silverstein, R.M., Bassier, G.C., Torril, T.C. 1991 *Spectrometric Identification of Organic Compounds Fifth Edition* John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y. Chichester Brisbane, Toronto, Singapore. pp 106-127

- Smith, R.H., P.J. Burdick, J. Anthony and A.A. Reilley . 1991. *In vitro* Propagation of *Coryphantha macromeris*. HortScience, 26(3):315.
- Topete M, Torres L, Ramírez E, Herrera M y Galindo E. 1991. Avances en los sistemas de Cultivo Masivo de células vegetales. Ciencia y Desarrollo.17(99): 73-85.
- Torres F. O, G.T. Fandiño y D.M. Perea. 1989. Aspectos anatómicos y fisiológicos de cultivo *in vitro* de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón). Acta Biológica Colombiana, Vol. 1 No. 5 Universidad Nacional de Colombia, Colombia pp 70-79.
- Valencia C O. 1995. Fundamentos de fitoquímica. Editorial Trillas. México. D.F. pp 11-31.
- Valverde J.L., Pérez R.J. 1988. Drogas americanas en fuentes de escritores franciscanos y dominicos. Universidad de Granada, España. Pp. 178-179
- Vázquez Vargas M y Villegas G. T. 1989. Obtención de metabolitos secundarios por cultivo de tejidos vegetales de algunas plantas medicinales de interés farmacológico. Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. UANL. pp III 8-C.

- Villalobos A. V.M. 1985. Fundamentos teórico-práctico de cultivo de tejidos vegetales. Colegio de Posgraduados de Chapingo, México D.F. pp 73.
- Villarreal Valdez N. 1999. Estudio Fitoquímico y actividad microbiana de *Solanum eleagnifolium* y *Clematis drummondii*. Tesis de licenciaturas. Fac. de Ciencias Biológicas UANL. Mty. N.L. pp 12-18.
- Villegas G.T., A.A. Jiménez, O.G. Dávila, M.A. Del Villar y N.A. Rhode. 1989. Establecimiento de las condiciones de propagación de *Opuntia microdasys* (Cactáceae) a través de cultivo de tejidos. Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Fac. C. Biológicas U.A.N.L. Monterrey.,N.L. México. pp. III-14 .
- Wagner H, Blatt S y Zgainski E. 1984. Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag. pp 1-3,52-69.



