



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Unidad Iztapalapa

---

**Casa abierta al tiempo**

**PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS  
ANTINEOPLÁSICOS Y ANSIOLÍTICOS HONOKIOL Y  
MAGNOLOL POR CULTIVOS EN SUSPENSIÓN Y POR  
PROPAGACIÓN *in vitro* DE LA PLANTA MEXICANA  
*Magnolia dealbata* Zucc; UNA ESPECIE EN PELIGRO DE  
EXTINCIÓN**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**IRMA FABIOLA DOMÍNGUEZ AVILÉS**

**Director de Tesis: Dr. Francisco Cruz Sosa**

**México, DF.**

**Julio de 2010**

---

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACYT y además cuenta con el convenio 471-01 Doctorado en biotecnología”

La alumna de doctorado Irma Fabiola Domínguez Avilés recibió el apoyo económico del CONACyT con el número de registro de becario 152390

Iztapalapa, D.F. Julio de 2010

---

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Producción de los Compuestos Antineoplásicos y Ansiolíticos Honokiol y Magnolol por Cultivos en Suspensión y por Propagación *in vitro* de la Planta Mexicana *Magnolia dealbata* Zucc; una Especie en Peligro de Extinción**

Que presentó

IRMA FABIOLA DOMÍNGUEZ AVILÉS

Comité Tutorial:

Director Dr. Francisco Cruz Sosa  
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila  
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor: Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Jurado:

Presidente: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Secretario Dra. Sandra Adela Orozco Suárez

Vocal: Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

Vocal: Dr. Martín Mata Rosas

---

## DEDICATORIA

*A ti, Dios, por todo lo que me has dado y por lo que te has llevado...te agradezco infinitamente*

*A mi madre, Irma del Carmen Avilés Iglesias. Gracias mamá por todo lo que me diste, por todo lo que me enseñaste, por tu paciencia y por tu bondad. Todas mis acciones diarias están encaminadas a que, cuando la muerte me llame, poder lograr un lugar a tu lado. Te amo y te extraño tanto*

*A mi padre, Noé Domínguez Ávila. Gracias por tus enseñanzas, por...  
"Nunca me digas no puedo"... esto es un logro tuyo, te quiero papi.*

*A mí adorado esposo Ramón Sebastián Acle. Gracias por todo tu amor, por no cortarme las alas, por dejarme ser libre y productiva, por esas horas que jugaste a las princesas con Farah mientras yo trabajaba. Por acompañarme siempre y en todo momento...Te amo marido*

*A ti princesa Farah gracias por el tiempo que me otorgas para realizar lo que me gusta hacer...gracias por existir mi niña, eres el amor y motor de mi vida.*

---

*A Lili Noé y Are....gracias por ser mis hermanos, en los momentos buenos y en los malos,  
siempre juntos.*

*A mi abue Angélica y a mi familia Avilés Iglesias y Meza Iglesias, gracias por acompañarme  
siempre*

*A todos ustedes está dedicado mi trabajo y logros*

*Gracias*

*Faby*

---

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi casa, el Instituto Mexicano del Seguro Social, por la libertad y el cobijo en la investigación que hace más de quince años me ha otorgado.

Mi profundo agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo, la libertad y por las herramientas que nos brinda para realizar nuestro trabajo científico. El apoyo de esta Institución es invaluable, sin el cual, nuestra independencia y productividad científicas serían prácticamente nulas.

Agradezco profundamente al Dr. Francisco Cruz Sosa su dirección y apoyo en todo momento. Así como por su amistad, muchas gracias.

Al Q. Marco Antonio Chávez y al Dr. Martín Mata, por ser una parte fundamental de este trabajo

A los sinodales, Dr. Víctor Manuel Chávez, Dra. Sandra Orozco, Dra. Hermelinda Salgado y Dr. Martín Mata, por su tiempo en la revisión de este escrito, así como de sus valiosos comentarios, observaciones y aportaciones al mismo.

A mis amigos y compañeros del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Julio, Verónica, Gerardo, Maricruz, María Luisa, Juan Carlos y Lupita con quienes el quehacer científico y el trabajo intelectual siempre es alentador, productivo y divertido.

A mis amigos Sandra, Mely, Paty, y Diego, quienes siempre me han apoyado en todos mis trabajos científicos, con el deseo de que nuestras colaboraciones y amistad sigan adelante y rindan muchos frutos más.

---

## ÍNDICE

Índice de tablas	i
Índice de figuras	iii
Resumen	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	
<b>2.1. LAS PLANTAS MEDICINALES</b>	
2.1.1. La importancia de las plantas medicinales	8
2.1.2. Producción y cultivo de plantas medicinales	9
2.1.3. Actividad comercial mexicana con plantas medicinales	10
<b>2.2. LOS FITOFARMACOS</b>	
2.2.1 El concepto de fitofármaco	12
2.2.2 El mercado moderno de los fitofármacos	15
<b>2.3. LOS NEUROFITOFARMACOS</b>	
2.3.1. Los ansiolíticos y los desórdenes de la ansiedad	17
<b>2.4. LOS ONCOFITOFARMACOS</b>	
2.4.1. Los antitumorales y antineoplásicos	19
<b>2.5. <i>Magnolia dealbata</i> Zucc</b>	
2.5.1. Aspectos botánicos de la especie	21
2.5.2 Clima y floración	22
2.5.3. Origen y hábitat	23
<b>2.6. ASPECTOS FITOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS</b>	<b>23</b>
<b>2.7. PROCEDIMIENTOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS</b>	<b>26</b>

---

2.7.1. Cultivo de tejidos vegetales	27
2.7.2. Reguladores de crecimiento vegetal	28
2.7.3. Cultivo de callos	30
2.7.4. Cultivo de células en suspensión	32
2.7.5. Metabolitos secundarios	35
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>39</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>41</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>41</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	
6.1 Objetivo general	42
6.2 Objetivos particulares	42
<b>7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	
Colecta e identificación de especies de la familia Magnoliácea	43
Preparación de extractos vegetales	45
Identificación de honokiol y magnolol por cromatografía De líquidos de alta resolución (HPLC)	45
Establecimiento de la curva de calibración estándar	46
<b>Establecimiento de Cultivos Celulares de Callos</b>	
Limpieza de explantes	46
Combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal	47
Determinación de viabilidad celular	48
Estimación de crecimiento celular	48
Identificación y cuantificación de honokiol y magnolol en Líneas celulares de callos	48
Histología de callos	49
<b>Establecimiento de Cultivos en Suspensión</b>	<b>51</b>
Cinética de producción de honokiol y magnolol.	51



---

Análisis de carbohidratos	52
<b>Micropropagación</b>	52
Inducción de brotes adventicios y proliferación.	52
Inducción de raíces y aclimatación de plántulas	53
Determinación de honokiol y magnolol en plántulas adaptadas	53
<b>8. RESULTADOS</b>	55
<b>9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	71
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	74
<b>11. APÉNDICES</b>	91
I.    Natural product communications 2009	
II.   Natural product communications 2010	

---

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales países con mayor superficie de cultivo de plantas medicinales y empresas fitofarmacéuticas	9
<b>Tabla 2.</b> Exportaciones mundiales de plantas medicinales	10
<b>Tabla 3.</b> Importaciones mundiales de plantas medicinales	10
<b>Tabla 4.</b> Intoxicaciones registradas por el American Association of Poison Control Centre en EUA	13
<b>Tabla 5.</b> Volúmenes de venta de los fitofármacos en la Unión Europea	16
<b>Tabla 6.</b> Plantas utilizadas como fitofármacos para el tratamiento de ciertos Tipos de cáncer y de algunas afecciones del sistema nervioso centra	17
<b>Tabla 7.</b> Productos medicinales de origen vegetal obtenidos por cultivos biotecnológicos	36
<b>Tabla 8.</b> Metabolitos de importancia farmacéutica	38
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos hormonales propuestos para la obtención de callos de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc	47
<b>Tabla 10</b> Combinaciones de reguladores de crecimiento propuestas para la Obtención de multibrotación de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc	53
<b>Tabla 11</b> Combinaciones de reguladores de crecimiento propuestas para Inducir rizogénesis en plántulas de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc	54

---

<b>Tabla 12.</b> Identificación y cuantificación de honokiol y magnolol en plantas silvestres de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc	59
<b>Tabla 13.</b> Efecto del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético y Cinetina sobre La formación de callo a partir de explantes de hojas de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc	63
<b>Tabla 14.</b> Concentraciones de honokiol y magnolol en plantas silvestres y cultivos <i>In vitro</i> de <i>Magnolia dealbata</i>	64
<b>Tabla 15.</b> Concentraciones de honokiol y magnolol en plantas silvestres y cultivadas <i>In vitro</i> de <i>Magnolia dealbata</i>	66
<b>Tabla 16.</b> Efecto de las citocininas sobre la regeneración de callos de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc	66
<b>Tabla 17.</b> Efecto de las auxinas sobre el enraizamiento de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc Y su contenido de honokiol y magnolol	68

---

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Magnolia dealbata</i> Zucc	21
<b>Figura 2.</b> Hojas y fruto de <i>Magnolia dealbata</i>	22
<b>Figura 3.</b> Estructuras químicas de honokiol y magnolol	25
<b>Figura 4.</b> Imagen que muestran el lugar de la colecta de <i>Talauma mexicana</i> en Duraznillo, Puebla	43
<b>Figura 5.</b> La imagen muestra el lugar de colecta de <i>Magnolia grandiflora</i> y <i>Magnolia dealbata</i> en Coyopola Veracruz	44
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas de los picos de retención de magnolol a los 5, 10 y 15 $\mu$ l y su ecuación de la recta	56
<b>Figura 7.</b> Espectros ultravioleta de honokiol y magnolol	56
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de estándares de honokiol y magnolol en la misma corrida de HPLC.	57
<b>Figura. 9.</b> Cromatogramas de extracto de corteza de <i>Talauma mexicana</i> y <i>Magnolia grandiflora</i> donde no hay presencia de honokiol y magnolol	57
<b>Figura 10.</b> Cromatograma del extracto metanólico de corteza de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc se demuestra la presencia de honokiol, el partenólido y magnolol y su espectro UV	58
<b>Figura 11.</b> Cromatograma del extracto metanólico de hojas de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc que muestra la presencia de honokiol y magnolol	59

---

<b>Figura 12.</b> Callos de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc a partir de explantes de hoja a los 30 días, a los 45, a los 60 y a los 90 días. También se muestra la prueba de viabilidad con fluoresceína a 10x	61
<b>Figura. 13.</b> Callos de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc a partir de diferentes tipos de explantes: hipocótilos y cotiledones a los 30 días así como a los 90 días en los que no se logró detener la oxidación celular.	62
<b>Figura 14.</b> Detección de honokiol y magnolol en callos FA1 obtenidos a partir de explantes de hojas de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc, cultivadas en medio MS adicionado con (1 mg/l) 2,4-D: (1 mg/l) Kin	63
<b>Figura 15.</b> Crecimiento y acumulación de honokiol y magnolol y consumo de la Fuente de carbón o por células FA2 en suspensión	65
<b>Figura 16.</b> Generación de brotes adventicios de <i>M. dealbata</i> en medio MS con 1.5 mg/L de TDZ	67
<b>Figura 17.</b> Plantas de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc en medio MS, suplementado con 0.5 mg/L de AIA que presentan enraizamiento	69
<b>Figura 18.</b> Plantas de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc <i>in vitro</i> aclimatadas a condiciones ambientales naturales.	69
<b>Figura 19.</b> Cromatograma del extracto metanólico de hojas de <i>Magnolia dealbata</i> Zucc micropropagadas, en donde se demuestra la presencia de honokiol y magnolol .	70

---

## RESUMEN

En la presente tesis, se comunica el establecimiento de un proceso biotecnológico que permitió, la obtención de líneas celulares de la planta mexicana en peligro de extinción, *Magnolia dealbata* Zucc productoras de los importantes compuestos farmacológicos, honokiol y magnolol. Esta planta fue seleccionada para desarrollar cultivos biotecnológicos debido a varios aspectos. Entre los más importantes se encuentra su actividad ansiolítica y anticancerígena, actividades atribuidas a los compuestos bifenólicos honokiol y magnolol. Las diversas e importantes actividades de estos compuestos están ampliamente reportados en la literatura. En estudios científicos, al ser comparados con el Diazepam®, exhiben su actividad ansiolítica sin efectos tóxicos ni colaterales como la adicción al fármaco. Al mismo tiempo, la actividad anti cancerígena de honokiol y magnolol está ampliamente documentada para distintos tipos de cáncer como el de colón, pulmón y mama, ejerciendo un efecto farmacológico doble, impidiendo que el cáncer crezca y evitando que este pase a otros órganos del cuerpo, sobretodo, por las vías de las caspasas e inhibiendo la formación de la matriz VG1, necesaria para la transferencia de células cancerosas al torrente sanguíneo, Es así, como estos compuestos, exhiben un doble efecto farmacológico, como anticancerígeno y como antineoplásico. Por otro lado, si tomamos en cuenta que este tipo de enfermedades afecta a un gran porcentaje de la población mundial y que se buscan moléculas novedosas que sean más efectivas y menos tóxicas para el tratamiento de ellas, honokiol y magnolol se perfilan como dos de los compuestos con alto valor agregado para su utilización en la clínica.

En México contamos con la planta *Magnolia dealbata* Zucc de la cual existen muy pocos ejemplares y que anteriormente, se creía extinta. Actualmente, se encuentra incluida en la lista de especies en peligro de extinción de la Unión internacional para la conservación de la naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés). Honokiol y magnolol se han empezado a comercializar en extractos estandarizados de corteza de la planta asiática *Magnolia obovata*. Uno de los mayores problemas, que se presenta con la obtención de los compuestos, es que, se necesitan aproximadamente 15 años de edad vegetal para que los árboles inicien su producción. Dada la importancia farmacológica, es importante resolver los problemas de abastecimiento de estos compuestos de forma controlada, empleando tecnologías modernas que permitan el abastecimiento del material vegetal y sus metabolitos de una forma

---

permanente y controlada para su futura industrialización. Es así como en el presente proyecto de investigación se reporta el establecimiento de un bioproceso mediante el cultivo de células en suspensión de *Magnolia dealbata* Zucc, el cual nos permitió la regulación y control de la producción de los compuestos en forma precisa y con mayores ventajas que las observadas en los cultivos agroindustriales. Se definieron todas las condiciones experimentales controlables en un sistema de cultivo tipo batch. Así mismo, se estableció un proceso de propagación masiva de la misma especie, vía organogénesis indirecta, monitoreando la producción de honokiol y magnolol en las plantas micropropagadas. .

Para la obtención de callos a partir de los diferentes tipos de explantes, se ensayaron diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal, que fueron adicionados a los medios nutritivos sólidos. Para la detección y cuantificación de honokiol y magnolol, se estableció un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el cual fue ampliamente probado con los estándares (98% de pureza) de los compuestos.

Se logró establecer el cultivo de callos de *Magnolia dealbata* Zucc a partir de hojas jóvenes, las cuales fueron la mejor fuente de explantes. Se lograron callos productores de honokiol y magnolol (línea FA1) en un medio Murashige Skoog (MS) suplementado con 1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1 mg/L de cinetina (CN) el cual rindió 2.3 mg /g de honokiol y 5.9 mg/g de magnolol. La contaminación bacteriana y fúngica fue controlada con un proceso de esterilización en varias etapas y con el uso de plant preservative mixture (PPM). La oxidación producida por la alta generación de fenoles fue controlada con 1 g/L de carbón activado. En una segunda fase, se logró establecer un cultivo en suspensión tipo batch a partir de los callos (FA1). Se logró establecer una suspensión homogénea, friable y viable en un sistema de cultivo de 30 días en matraces agitados en medio MS. A través de todo el ciclo celular de 30 días, se monitorearon los niveles de producción de honokiol y magnolol, el crecimiento celular vía peso fresco y seco y la captación y consumo de sacarosa. Se estudiaron los efectos de la fuente de carbono sobre la concentración en la acumulación de biomasa respecto a la síntesis de los compuestos bioactivos honokiol y magnolol. La línea celular FA2, fue la que produjo las mayores concentraciones de los metabolitos. En ella, se utilizaron 3 ml de inóculo el cual se suplemento con 3% de sacarosa arrojando rendimientos máximos de honokiol de 8.1 mg/g y 13.4 mg/g de magnolol. Estos rendimientos fueron 300% y 382% respectivamente, más altos que los obtenidos en las plantas de *Magnolia dealbata* colectadas en campo. Los resultados de

---

estos estudios son promisorios, ya que presentan por primera vez el establecimiento *in vitro* de producción de honokiol y magnolol, además del uso de una especie endémica.

Además, se estableció un eficiente protocolo de propagación *in vitro* de *Magnolia dealbata* vía organogénesis indirecta, con el propósito de establecer un procedimiento para acelerar la propagación de esta especie que se encuentra en peligro de extinción. Dos factores fueron fundamentales en la regeneración *in vitro* de la especie y en la producción de honokiol y magnolol, el tipo de explante y la combinación y concentración reguladores de crecimiento. Se estableció el sistema de multibrotación a partir de los callos verdes friables FA1 obtenidos en la primera etapa de esta investigación. Se indujo la multibrotación en medio MS suplementado con 5 mg/L de ácido 2,4- D y 1.5 mg/L CIN. La secreción de fenoles se controló con la adición de 250 mg/L de carbón activado. La multiplicación de los brotes se obtuvo con el medio MS suplementado con 1.5 mg/L de Tidiazuron (TDZ). Para la inducción de rizogénesis, los brotes fueron transferidos a medio MS suplementado con diversas auxinas pero el tratamiento con el ácido indol butírico (AIB) 0.5 mg/L se logró obtener el mayor enraizamiento. Después, las plantas fueron cultivadas con vermiculita a cielo abierto y cubiertas con bolsas plásticas para mantener la mayor cantidad de humedad posible. A estas plantas con una edad de 6 meses se les determinó la cantidad de honokiol y magnolol mediante las técnicas de HPLC establecidas previamente. Los análisis revelaron que los contenidos de los metabolitos en las partes aéreas y raíces de las plantas micropropagadas fueron mayores que las observadas en plantas de campo. Nuestros resultados sugieren que es posible la conservación de *Magnolia dealbata* mediante la vía de multiplicación *in vitro* a partir de fragmentos de hoja. El alto rendimiento en la regeneración vegetal y en la producción de honokiol y magnolol en las plántulas regeneradas pueden ser atribuidas a la apropiada selección del explante y el establecimiento del correcto medio de cultivo. Estas plantas pueden ser la fuente de material vegetal para los estudios de farmacología y fitoquímica de *Magnolia dealbata* Zucc



---

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Secretaría de Salud, la prevalencia de trastornos del sistema nervioso como la ansiedad afecta al 8.3% de la población y ocupa el doceavo lugar de morbilidad en México y aproximadamente un 15% de la población mundial se encuentran afectados por este padecimiento[1]. En la actualidad, para su manejo se administran benzodiazepinas como Librium® (clordiazepoxido), Valium® (diazepam) y Agadon® (nitrazepam) los cuales producen efectos secundarios y colaterales, tales como depresión central, ataxia, sobre-sedación, amnesia y potenciación barbitúrica y alcohólica [2]. El inconveniente más importante en el uso de estos productos es la tolerancia y la rápida dependencia que se presenta con la administración de este tipo de compuestos. Por otra parte, el cáncer es una de las enfermedades de mayor prevalencia a nivel mundial y en México según datos del Instituto Nacional de Cancerología, originan la muerte de seis personas cada hora y dada su creciente tendencia se prevé que en el futuro, uno de cada tres mexicanos tendrá alguno de los más de 100 tipos de tumores malignos existentes [3]. Si bien, se ha avanzado en el manejo del cáncer, las terapias son extremadamente costosas y causan un sinnúmero de efectos colaterales. Tales efectos secundarios reducen la calidad de vida y desalientan a terminación de los protocolos médicos. Otra de las limitantes, es la existencia de cánceres refractarios a las terapias existentes [4]. De ahí, que la búsqueda de otros compuestos con utilidad en el manejo de estas enfermedades más eficientes y sin tantos efectos secundarios se ha convertido en un tema de la mayor relevancia en la investigación farmacéutica actual.

Dentro de los productos que están siendo investigados, se encuentran dos compuestos de origen vegetal llamados honokiol y magnolol, bifenoles que han sido identificados en la corteza del árbol *Magnolia obovata*, una planta de origen asiático. Recientemente, se identificaron a estos dos compuestos como los responsables del efecto ansiolítico proporcionado por la planta, demostrándose que a una concentración de 0.2 a 2 mg/kg es 500 veces más potente que el extracto original completo de la planta [5]. Se ha demostrado también que el honokiol al ser comparado con diazepam produce el mismo efecto ansiolítico pero a una menor dosis y, sin afectar la función motora, sin producir sedación y, lo más importante, sin provocar dependencia física [6]. Estos compuestos reducen la ansiedad y la muerte neuronal debido a su actividad

---

antioxidante y protectora de neuronas corticales, su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica en las mitocondrias protegiendo a las células de la lisis oxidativa evitando de esta manera la muerte celular [7]. También ejercen un efecto neuroprotección contra la isquemia en la lesión cerebral focal, resguardando a las neuronas corticales contra la hipoxia [8].

En forma paralela, desde el año 2002, mas de 100 artículos han referido el efecto benéfico de honokiol y magnolol en diferentes tipos de cánceres. Ambos compuestos inhiben la invasividad de las células tumorales. Honokiol presenta actividad antiproliferativa potente contra el SVR (sustained virologic response) de las células e inhibe el crecimiento de las células endoteliales transformadas, lo cuál demuestra su actividad anti-angiogénica y antitumoral lo que los coloca como compuestos altamente eficaces con grandes posibilidades para su uso clínico [9]. En este contexto, en algunos estudios clínicos, la combinación de honokiol con dosis bajas de docetaxel ha sido utilizada para mejorar los resultados que con el docetaxel por separado en cáncer de próstata dependiente de andrógenos que llega a producir metástasis en hueso [10]. Magnolol posee una fuerte actividad anti-metastásica, al inhibir la metástasis de pulmón causado por células de linfoma, al inducir apoptosis a concentraciones de 80-100 uM, vía caspasas 3 y 9 posee una fuerte capacidad anti-metastásica al inhibir la metástasis de pulmón causada por células del linfoma [11]. En este 2010, estudios recientes indican que magnolol suprime la metástasis mediante la vía de la inhibición de la invasión, migración y formación de la matriz de metaloproteínasa en células de cáncer de próstata [12].

Por todo lo antes mencionado, honokiol y magnolol se ubican como dos de los compuestos más prometedores para la aplicación clínica y para la industria farmacéutica. Actualmente, para su comercio en el mercado mundial, los compuestos se ofrecen en extracto seco de corteza de la especie asiática, *Magnolia officinalis*. Uno de los mayores problemas, que se presenta con la obtención de los compuestos, es que, se necesitan aproximadamente 15 años de edad vegetal para que los árboles inicien su producción [13]. Dada la importancia farmacológica, es importante resolver los problemas de abastecimiento de estos compuestos de forma controlada, empleando tecnologías modernas que permitan el abastecimiento del material vegetal y sus metabolitos de una forma permanente y controlada para su futura industrialización.

---

El cultivo de células vegetales para la producción de compuestos activos, representa una alternativa ventajosa con relación a los métodos convencionales de extracción que utilizan material vegetal silvestre o cultivado [14].

Entre los principales beneficios que ofrecen estas tecnologías se encuentran la síntesis de metabolitos en condiciones ambientales controladas y el suministro continuo de estos fármacos; que de otra manera pueden perderse por plagas, inundaciones y sequías, además de evitar pérdidas en la biodiversidad del ecosistema [15].

En México y dentro de la familia *Magnoliaceae*, existen diferentes especies del género *Magnolia* y *Talauma*, algunas de las cuales han sido estudiadas por el uso medicinal que se hace de sus flores [16]. Dentro de un barrido de detección de honokiol y magnolol en diferentes especies de la familia *Magnoliaceae* realizado por la presente autora durante el año 2005, se identificó y se cuantificó la presencia de ambos metabolitos en una planta mexicana de la cuál existen muy pocos ejemplares y que anteriormente, se creía extinta, la *Magnolia dealbata* Zucc. Al mismo tiempo, al no existir literatura alguna acerca de alguna actividad farmacológica de la especie, se investigó su posible actividad sobre el sistema nervioso central [17].

Actualmente, *Magnolia dealbata* Zucc, se encuentra incluida en la lista de especies en peligro de extinción de la Unión internacional para la conservación de la naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés), debido a que su medioambiente natural ha sido destruido, esto aunado a los problemas de propagación natural que presenta [18].

Una de las alternativas en la producción de fármacos de origen vegetal es el empleo de sistemas de cultivo de células y tejidos. Estas técnicas biotecnológicas han ganado prestigio mundial en los últimos años debido a que pueden ser aplicadas a la mayoría de las especies de plantas superiores. Utilizando fragmentos vivos del vegetal en cuestión, se puede lograr la producción clonal masiva y la preservación de la especie medicinal deseada. Así mismo, los cultivos celulares en suspensión, producen los compuestos medicinales en sistemas nutritivos artificiales que permiten la regulación y control de su producción en forma precisa y con mayores ventajas que las observadas en los cultivos agroindustriales.

Estas técnicas de cultivo de plantas podrían facilitar no solo la producción de la especie *in vitro*, sino también la producción *in vitro* de sus metabolitos honokiol y magnolol [19].

---

En vista del potencial farmacológico de *Magnolia dealbata* y a que es una especie en peligro de extinción el objetivo del presente trabajo de investigación es definir las condiciones experimentales para obtener un cultivo en suspensión de células de *Magnolia dealbata* Zucc que produzcan los metabolitos honokiol y magnolol. Al mismo tiempo, se plantea definir las condiciones experimentales para su eficiente propagación *in vitro*, monitoreando la producción de los compuestos activos en los individuos obtenidos.

---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. LAS PLANTAS MEDICINALES

#### 2.1.1. La importancia de las plantas medicinales

No sabemos cómo se comenzaron a utilizar las plantas medicinales, pero el primer escrito de naturaleza científica a este respecto, data de la época clásica y se titula *De Materia médica*, escrita por Dioscórides. Este médico griego, trabajaba con los romanos como botánico, lo que le permitió viajar mucho. Durante sus viajes estudió las propiedades de más de 600 plantas y de muchos principios químicos y su obra sirvió de referencia hasta el siglo XV [20].

En forma paralela, las civilizaciones prehispánicas del Nuevo Mundo también hacían uso de las plantas con propósitos curativos aunque, en el Viejo Mundo no se enteraron hasta que Colón desembarcó en América. El primer libro de la herbolaria medicinal azteca y una de las más importantes fuentes bibliográficas históricas de la materia médica en América lleva por título *Libellus de medicinalibus indorum herbis* (librito de las yerbas medicinales de los indios) que se conocería cuatro años después como Códice Badiano. Martín de la Cruz, un médico azteca que asistía al colegio de la Santa Cruz en Tlatelolco, escribió esta obra con una descripción del uso medicinal de más de 150 plantas originarias de México [21]. Durante la época de la conquista, el uso de las plantas medicinales se extendería a lo largo de todo el continente, desde el Ártico hasta la Tierra del Fuego. Los chamanes o curanderos eran los que tenían el poder de utilizar la magia y las plantas medicinales para curar las enfermedades.

Maravillados sobre la variedad de hierbas y raíces que se vendían en las calles de la ciudad de Tenochtitlán y en el mercado de Tlatelolco para su uso médico, los conquistadores llevaron esas noticias a Europa. En Sevilla, el médico Nicolás Monardes, fue comisionado para clasificar las plantas medicinales que llegaban de México. A su vez, Felipe II, envía a su médico

Francisco Hernández para estudiar la flora y la fauna de México, quien realiza una obra en 16 volúmenes que se destruye en el incendio del Escorial. Afortunadamente, Francisco Hernández había resumido aquella obra y esta síntesis pudo ser editada [22].

### **2.1.2. Producción y cultivo de plantas medicinales**

En México, prácticamente, no existe el cultivo de plantas medicinales, la mayoría de la venta se basa en la colecta de campo. Con respecto a este rubro, en los países miembros de la Unión Europea, el sector de los fitofármacos reagrupa a más de 21 mil productores/recolectores que en su conjunto explotan una superficie de 100 mil hectáreas de producción, en las cuales se cultivan una variedad de aproximadamente de 150 plantas para uso farmacéutico. Considerando la información de los 25 países que conformaron la Unión Europea hasta Diciembre de 2006, existen 21, 454 productos fitofarmacéuticos registrados [23].

Los principales proveedores intraeuropeos de materia prima para la fabricación de fitofármacos son: Irlanda, Rumania y Hungría aunque de manera particular, sobresalen Francia y Alemania, que son grandes productores y a su vez grandes consumidores de materia prima para la fabricación de este tipo de medicamentos [24].

Se observa que los países con mayor superficie dedicada a los cultivos de este tipo de plantas para la fabricación de fitofármacos, suelen ser aquellos que tienen un mayor número de industrias productoras de medicamentos (Tabla 1)

**Tabla 1. Principales países con mayor superficie de cultivo de plantas medicinales y empresas fitofarmacéuticas**

<b>PAIS</b>	<b>HECTAREAS DE CULTIVO</b>	<b>EMPRESAS FARMACEUTICAS</b>
Reino Unido	91, 679	<b>412</b>
Francia	351, 559	<b>172</b>
Alemania	101, 351	<b>176</b>
Italia	11, 713	<b>136</b>
Rumania	91, 968	<b>76</b>
<b>TOTAL UE</b>	<b>907, 765</b>	<b>1, 444</b>

Fuente: Kompass 2006 y The Market for Natural Ingredients for Pharmaceuticals in EU, p23

## 2.1.4. Actividad comercial mexicana con plantas medicinales

En el periodo comprendido entre el año 2003 y el 2005, 90% de las exportaciones de México, la fracción 1211 (fracción arancelaria para plantas medicinales) fueron dirigidas en primer lugar, a los Estados Unidos y en segundo lugar a la Unión Europea, China y Canadá (Tabla 2)

**Tabla 2. Exportaciones mundiales de plantas medicinales (millones de dólares)**

	2003	%	2004	%	2005	%
<b>El Mundo</b>	28, 331	100	31, 098	100	32, 559	<b>100</b>
Estados Unidos	25, 697	90.7	27, 756	89.2	29, 536	<b>90.7</b>
Unión Europea	1, 299	4.6	1. 476	4.7	1, 153	<b>3.5</b>
Alemania	0.700	2.5	0. 714	2.3	0, 640	<b>1.9</b>
China	0	0	0. 458	1.5	0. 463	<b>1.4</b>
Canadá	0.346	1.22	0. 357	1.15	0, 454	<b>1.4</b>
Chile	0.033	0.12	0. 104	0.33	0, 167	<b>0.51</b>
Italia	0.078	0.28	0. 137	0.44	0, 165	<b>0.51</b>
Guatemala	0.265	0.93	0. 042	0.14	0, 143	<b>0.44</b>
<b>Países Bajos</b>	<b>0.099</b>	<b>0.35</b>	<b>0. 079</b>	<b>0.26</b>	<b>0, 133</b>	<b>0.41</b>

Fuente : World Trade Atlas

Mientras que los principales países de los cuales, México importó, productos comprendidos en la fracción 1211 en el mismo periodo, fueron Sudán; Estados Unidos y China. De la Unión Europea importó un promedio de 3 % del total. En ambas fracciones, la balanza comercial es superavitaria (produce mas de lo que se demanda) con Estados Unidos (Tabla 3).

**Tabla 3. Importaciones mundiales de plantas medicinales  
(millones de dólares)**

	2003	%	2004	%	2005	%
<b>El Mundo</b>	29, 151	100	24, 702	100	<b>19, 508</b>	<b>100</b>
Sudán	17, 611	60.4	12, 880	52.1	10, 711	<b>54.9</b>
Estados Unidos	3, 533	12.1	2, 307	9.3	2, 625	<b>13.5</b>
China	1, 443	4.9	1, 738	7.0	1, 896	<b>9.7</b>
India	2, 531	8.7	3, 380	13.7	1, 623	<b>8.3</b>
Senegal	1, 889	6.5	1, 683	6.8	0, 796	<b>4.0</b>
Unión Europea	0, 855	2.93	0, 715	2.9	0, 663	<b>3.41.7</b>
Madagascar	0, 593	2.0	0, 541	2.19	0, 376	<b>1.9</b>
Alemania	0, 651	2.2	0, 504	2.0	0, 369	<b>1.9</b>
Italia	0, 205	0.7	0, 473	1.9	0, 328	1.7

Fuente : World Trade Atlas

---

Las fuentes especializadas estiman que los próximos años serán muy importantes para el consumo y utilización de productos naturales y que habrá interés especial de las empresas del sector por desarrollar nuevos medicamentos a base de plantas, sobretodo aquellas que sirven para prevención de padecimientos generalizados entre la población [25].

Después de Brasil y Colombia, nuestro país ocupa en Iberoamérica el tercer lugar en importancia en cuanto a biodiversidad vegetal. Dicha condición genera grandes oportunidades de desarrollo de alianzas estratégicas con la industria procesadora europea. Más útil aún, si consideramos que México cuenta tradicionalmente con una amplia cultura y experiencia en el uso de plantas medicinales [26].

Las empresas mexicanas transformadoras de materias primas y productoras de plantas medicinales para facilitar su incursión en los mercados internacionales, requieren de información científica que valide los efectos terapéuticos de cada una, y del reporte correspondiente reportarlas en fuentes especializadas a nivel internacional. Actualmente, los fitofármacos especializados, que se apoyan en la mercadotecnia enfocada a resaltar sus propiedades, son un ejemplo del dinamismo en los mercados en este campo. Uno de los aspectos más importantes en la elaboración de un fitofármaco es la búsqueda de materias primas que puedan ser rentables una vez presentados como productos para el consumidor final.

Una de las preguntas que se plantean los investigadores que trabajan en el aislamiento de compuestos bioactivos naturales es la de que criterio seleccionar las plantas que serán evaluadas, al azar o teniendo en cuenta si poseen antecedentes en la medicina tradicional. Seleccionar únicamente, este último mecanismo, en cierta forma limitaría la investigación, debido a que menos del 10% del total de las plantas que se estima hay en el planeta (en promedio de 250, 000) han sido evaluadas científicamente con fines terapéuticos [27] y que cerca de 15, 000 plantas medicinales ya estarían amenazadas de extinción según la Lista Roja de la *International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources* (UICN) del 2000 [18].

Estos datos, nos demuestran que a este ritmo, tal vez se agoten los recursos naturales antes de que podamos confirmar sus potenciales propiedades benéficas para la salud por lo que es necesario aprovechar que actualmente, se disponen de técnicas avanzadas para la purificación



---

e identificación de compuestos químicos y de ensayos biológicos rápidos desarrollados *in-vitro* y en forma automatizada para la detección de diversas actividades farmacológicas que aceleran y facilitan la búsqueda de nuevos fármacos [28, 29].

Debido a que a lo largo de la historia del uso de las hierbas medicinales, se ha acumulado la valiosa información sobre las propiedades terapéuticas de muchas especies de plantas, resulta lógico pensar que la mejor combinación para arribar con éxito al descubrimiento de un compuesto vegetal con uso clínico potencial es seleccionar la planta por sus datos etnomédicos y realizar el ensayo biológico que se correlacione con la actividad terapéutica descrita [30].

Una vez que se selecciona el compuesto “candidato”, el camino que se debe transitar para llegar a ser aprobado para su uso en humanos es largo, ya que durará entre 10 o 20 años y con un costo estimado de alrededor de 231 millones de dólares [31]. Además, en el caso de candidatos derivados de una fuente natural, se presentan otros problemas que se deben tener en cuenta, la factibilidad para obtener la biomasa y los problemas relacionados con la posibilidad de proteger el medioambiente [32].

## **2.2. LOS FITOFARMACOS**

### **2.2.1. El concepto de fitofármaco.**

La idea de utilizar como medicamento un compuesto “puro” obtenido a partir de una planta con acción terapéutica, surge en 1803 con el aislamiento de los primeros alcaloides. El farmacéutico alemán Friedrich W.A. Sertumer los descubre intentando obtener el principio activo del opio. En 1819, Pelletier y Caventou, dos químicos franceses aislaron dos alcaloides diferentes a partir de muestras de corteza de cinchona, la quinina y la cinchonina. En 1826, E. Merck obtiene la morfina a partir del opio (*Papaver somniferum* L) y en 1831 se aísla la atropina de la planta *Atropa belladonna* L [33]. El primer fármaco semi-sintético, la aspirina, creado por Bayer, aparece en 1899, pero fue en la segunda mitad del siglo XX, después de la Segunda Guerra Mundial, cuando la industria de medicamentos adquirió su verdadero auge comercial. Es así que, la aparición de la aspirina hasta la era de los antibióticos, creció un mercado que hizo

prevalecer la síntesis química por sobre el producto natural en la elaboración de medicamentos [34]. En la dinámica de éste fenómeno influyó la imposibilidad que existe de patentar yerbas medicinales en un mercado que ve garantizadas sus ganancias sólo mediante la protección legal de sus productos. Se pensó que, con el tiempo, esta estrategia (la creciente producción de cápsulas, tabletas e inyectables elaborados con compuestos puros, sintetizados químicamente) daría solución a todas las enfermedades y que las plantas medicinales, como antiguos recursos curativos, entrarían en desuso [35].

Así, durante toda la segunda mitad del siglo XX, el desarrollo de la química orgánica y la farmacología dieron paso a la producción masiva de medicamentos sintéticos y semisintéticos que el público consumidor conocería bajo la denominación de productos 'químico-farmacéuticos', cuyas industrias generarían un emporio económico que ha controlado el mercado de medicamentos en Occidente [36].

Sin embargo, si bien este fenómeno produjo muchos beneficios en el manejo terapéutico moderno de las enfermedades más comunes, también a lo largo del tiempo se acumularon sus desventajas, como la presencia cada vez más notable de efectos colaterales tóxicos producidos por los medicamentos químico-farmacéuticos (Tabla 4). Se fue haciendo evidente que las empresas del ramo en su avidez por sacar al mercado rápidamente sus nuevos productos, desestimaron los efectos tóxicos de muchos de ellos, que han ocasionado cientos de miles de muertes en todo el mundo durante este medio siglo. De acuerdo con un informe publicado en el *Chemical Marketing Reporter*, el 51.5% de los fármacos aprobados por la FDA entre 1976 y 1985, produjeron reacciones indeseables graves que determinaron su recalificación o retiro del mercado [37].

**Tabla 4. Intoxicaciones registradas por el American Association of Poison Control Centre en EUA.**

Productos	Casos de intoxicación (1989)	Decesos
Antidepresivo	1375	140 (10.18%)
Analgésicos	705	126 (17.8%)
Sedantes	1020	78 (7.6%)
Cardiotónicos	286	70 (24.4%)
Psicotrópicos	276	64 (23.1%)
	<b>89.2% del total</b>	
Humos, gases, vapores	129	46 (35.6%)
Productos de limpieza	173	24 (13.8%)
Pesticidas	111	12 (10.8%)
	<b>10% del total</b>	
Plantas y sus derivados	32	1 (3.1%)
	<b>0.8% del total</b>	

(Modificada de Alonso J. Tratado de Fitomedicina, Ed. ISIS, Buenos Aires, Argentina, 1998, pág.33)

---

La toxicidad, los efectos colaterales y los efectos secundarios de los medicamentos de síntesis, influyeron fuertemente en el renovado interés que al final del siglo XX se produjo ha producido por el estudio de las plantas medicinales. Pero también fue determinante el hecho de que, la cuarta parte de los fármacos empleados hoy en los países industrializados aún proceden o se han modelado a partir de productos vegetales. Paradójicamente, se ha demostrado que la mayor parte de los productos 'químico-farmacéuticos' que utiliza la medicina moderna se siguen elaborando con plantas y sus derivados, y refiere que en los Estados Unidos de 1959 a 1980, cerca del 25% de las prescripciones extendidas por los médicos, contenían extractos de vegetales o principios activos obtenidos de plantas superiores. Estos datos no variaron más de  $\pm 1\%$  en cualquiera de los últimos 22 años [38]. Todas estas circunstancias, han determinado la aparición de un fenómeno que ha sido interpretado como el "regreso" de la investigación científica al campo de las plantas medicinales y con ello el surgimiento de nuevos conceptos teóricos en la farmacología y la fitoquímica que, finalmente, han dado origen a los "fitofármacos" actuales.

El término 'fito-fármaco' se emplea para referirse a los productos medicinales obtenidos de plantas superiores, usualmente provenientes de la tradición herbolaria popular en forma de extractos, fracciones y conjuntos de compuestos, pero que han sido investigados científicamente para garantizar su eficacia terapéutica y baja toxicidad [39]. Para su elaboración se ha recurrido a tecnologías sofisticadas de estandarización y control de calidad en la producción industrial. Los fitofármacos representan una combinación de formas químico-farmacéuticas tradicionales (tabletas, cápsulas, inyectables) pero están elaborados con productos naturales originales (raíces molidas, hojas pulverizadas, etc.) o poco procesados químicamente (extractos crudos, fracciones enriquecidas, mezclas de grupos de compuestos) y, en los que, la cuantificación y dosificación de sus principios biológicamente activos ha sido posible gracias al desarrollo tecnológico de la fitoquímica y la farmacología de finales de siglo [40].

Es así que actualmente, los fitofármacos se elaboran, en muchos casos, con las mismas plantas medicinales ya conocidas de antaño, pero cuyas aplicaciones médicas y presentaciones farmacéuticas están basadas en conocimientos científicos más profundos o novedosos acerca de su modo de acción, y con un sistema de cultivo e industrialización muy diferente al utilizado en el pasado.

---

### **2.2.2 El mercado moderno de fitofármacos**

Las plantas medicinales han sido la fuente más importante para la obtención de medicamentos a través de nuestra evolución histórica, ya que según la Organización Mundial de la Salud, para aproximadamente el 80% de la población mundial, la medicina tradicional a base de plantas, aún sigue siendo su principal fuente de medicación para el cuidado general de la salud [41]. En la medicina moderna se usan, actualmente, 121 entidades químicas de origen natural, que se derivan de sólo 95 especies vegetales, lo interesante es que el 60% de éstas son de origen latinoamericano [42].

En el año 2006, el mercado farmacéutico mundial generó 643 mil millones de dólares [43] y el mercado de las plantas medicinales alcanzó, los 50 mil millones de dólares, con una tasa anual de crecimiento estimada según un informe del Banco Mundial de entre el 5 y el 15% [44].

Estos datos incluyen tanto a los países en vías de desarrollo como a las naciones industrializadas, las cuáles, paradójicamente están haciendo amplio uso de estos productos a diferentes niveles. Por ejemplo, desde los años 90's, el Ministerio de Salud y Bienestar de China había aprobado para su uso 210 prescripciones herbolarias de su medicina tradicional, la cual es una parte integral del sistema de salud formal y su farmacopea oficial incluía 164 fármacos crudos de origen vegetal con una producción anual de fitofármacos calculada en \$1, 400 millones de dólares [45].

Otros países asiáticos como la India, Tailandia e Indonesia, también son grandes consumidores y exportadores de productos medicinales elaborados con la flora de sus propios países [46].

De acuerdo con las estadísticas del Banco de Comercio Exterior, en este 2010, el comercio de productos naturales alcanzará los 80 mil millones de euros, de los cuales el 80% corresponderá a los fitofármacos. Tan solo en Francia, las empresas dedicadas a la producción de fitofármacos genera más de 40 000 millones de euros anualmente.

Entre los principales mercados consumidores de materias primas para fitomedicamentos destacan, Alemania, China, Japón, Estados Unidos, Francia, Italia, Reino Unido y España. Un claro ejemplo de que las perspectivas de crecimiento del mercado son positivas es, sin duda, el creciente número de monografías de productos herbolarios que son inscritas cada año en la

Farmacopea Europea. Así tenemos, que analizando el periodo de 1997 a 2005 el número de registros pasó de 67 a más de 123 [48].

Tal ha sido el éxito de las plantas medicinales como fuente para aislar compuestos bioactivos para su uso directo o como precursores de moléculas modificadas por síntesis química para producir nuevas entidades patentables con mayor actividad y/o menor toxicidad que, en la actualidad (según datos del National Prescription Audit de los Estados Unidos) casi el 25% de los fármacos que se prescriben contienen uno o más principios activos derivados de alguna planta [49]. En Alemania, existen algunos medicamentos herbolarios con tasas sobresalientes de volúmenes de venta, como es el caso, por ejemplo, del Tebonin de la compañía Dr. Willmar Schawbe, cuyo volumen de venta anual es de 195 millones de dólares (Tabla 5) [50].

**Tabla 5. Volúmenes de venta de los fitofármacos en la Unión Europea**

Fitofármaco	Fabricante	Volumen de venta (Millones de dls)	Planta medicinal
Tebonin	Schwabe	195	<i>Ginko biloba</i>
Ginsana	Pharmaton/Boehringer Ingelheim	50	<i>Panax ginseng</i>
Kwai	Lichtwer	40	<i>Allium sativa</i>
Efamol	Scotia-Pharm	30	<i>Oenothera biennis</i>
Echinacin	Madaus	30	<i>Echinacea purpurea</i>

Tomado de: Grunwald J. The European phytomedicines: market, figures, trends analyses. *Herbgram* 34:60-65, 1995.

Dentro del conjunto de plantas medicinales que actualmente están siendo comercializadas en forma de fitofármacos, sobresalen aquellas cuyas propiedades curativas se aplican a enfermedades neurológicas y aquellas con posibles aplicaciones contra el cáncer, condición que es un reflejo del estado que guarda la salud de los habitantes de países industrializados, el predominio de enfermedades de tipo neurológico y oncológico. Las plantas más comercializadas, son aquellas utilizadas para el tratamiento de ambas afecciones (Tabla 6)

---

**Tabla 6. Plantas utilizadas como fitofármacos para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer y de algunas afecciones del sistema nervioso central**

<b>Planta medicinal</b>	<b>Uso médico del fitofármaco</b>
<i>Panax ginseng</i>	Tónico nervioso en la recuperación postoperatoria y en estados de fatiga severa.
<i>Ginkgo biloba</i>	Aumento del flujo sanguíneo cerebral en la demencia senil y enfermedad de Alzheimer
<i>Piper methysticum</i>	Enlace con el receptor GABA en la ansiedad y epilepsia.
<i>Hypericum perforatum</i>	Inhibidor de la recaptura de la serotonina en la depresión leve y moderada.
<i>Taxus brevifolia</i>	Anticancerígeno, con su metabolito taxol
<i>Cataranthus roseus</i>	Antileucémicos con sus metabolitos vincristina y vinblastina

## **2.3. LOS NEUROFITOFARMACOS**

### **2.3.1 Los ansiolíticos y los desórdenes de la ansiedad**

La ansiedad (del latín *anxietas*, 'angustia, aflicción') es un estado que se caracteriza por un incremento de las facultades perceptivas ante la necesidad fisiológica del organismo de incrementar el nivel de algún elemento que en esos momentos se encuentra por debajo del nivel adecuado, o -por el contrario- ante el temor de perder un bien preciado

En las sociedades avanzadas modernas, esta característica innata del hombre se ha desarrollado de forma patológica conformando, en algunos casos, cuadros sintomáticos que constituyen los trastornos de ansiedad, que tienen consecuencias negativas y muy desagradables para las personas que los padecen. Entre los trastornos de ansiedad se encuentran las fobias, el trastorno obsesivo-compulsivo, el trastorno de pánico, la agorafobia, el trastorno por estrés postraumático y el trastorno de ansiedad generalizada, la cual se vive como una sensación difusa de angustia o miedo y deseo de huir, sin que quien lo sufre pueda identificar claramente el peligro o la causa de este sentimiento. Esta ansiedad patológica es resultado de los problemas de diversos tipos a los que se enfrenta la persona en su vida cotidiana, y sobre todo de la forma en que interioriza y piensa acerca de sus problemas y suelen presentar tres o más de los siguientes síntomas: inquietud, cansancio fácil, dificultad para concentrarse, irritabilidad, tensión muscular y alteración del sueño [51].

Aproximadamente del 3 al 5% de los adultos, presenta ansiedad en algún momento durante el transcurso de un año, pero las mujeres tienen el doble de probabilidades de presentarla.

---

Frecuentemente, comienza en la niñez o en la adolescencia, pero se puede presentar a cualquier edad. Para la mayor parte de la gente, esta condición es fluctuante, empeorando en determinados momentos (sobre todo en épocas de estrés) y persiste a lo largo de muchos años [52].

Alrededor del 15% de la población mundial se encuentra afectada por este padecimiento y de acuerdo con la Secretaría de Salud, la ansiedad afecta al 8.3% de la población y ocupa el doceavo lugar de morbilidad en México [53]. Dentro del campo de la investigación de nuevos psicofármacos, se encuentra la búsqueda de nuevos compuestos ansiolíticos debido a que los tratamientos utilizados en la actualidad, para el manejo de la ansiedad se basa solamente en la administración de benzodiazepinas (BZD) como Librium® (clordiazepoxido), Valium® (diazepam) y Agadon® (nitrazepam), los cuales presentan efectos secundarios y colaterales causando depresión central, ataxia, sobre sedación, amnesia y potenciación barbitúrica y alcohólica [54]. Además, las BZD a largo plazo pueden crear dependencia. Si se decide su interrupción, debe reducirse escalonadamente y no de forma brusca [55].

Desde comienzos de la década de 1980 hasta la época actual, las BZD han sido los más utilizados a nivel mundial que aunque son útiles para disminuir la ansiedad y el insomnio de forma temporal, desde 1979, se considera que no son terapéuticamente eficaces para períodos superiores a dos semanas [56]. Más aún, este tipo de compuestos son seguros cuando se emplean solos, pero cuando se mezclan con alcohol en dosis suficientes, pueden producir estado de coma e incluso la muerte. La administración a largo plazo a dosis mayores de las habituales pueden producir dependencia física, con síntomas de abstinencia característicos que van desde las pesadillas hasta convulsiones [57]

En las últimas décadas las BZD se convirtieron en uno de los fármacos más prescritos en la práctica médica general y existe evidencia de que más del 10% de la población de los países desarrollados es consumidora de psicofármacos [58].

Todos estos inconvenientes y la creciente demanda de este tipo de medicamentos, ha urgido a que la investigación y búsqueda de otros compuestos con utilidad en el manejo de la ansiedad sea un tema de la mayor relevancia en la investigación farmacéutica actual. Dentro de los productos que están siendo investigados en el mundo para el tratamiento de la ansiedad se

---

encuentran dos compuestos de origen vegetal llamados honokiol y magnolol derivados de distintas variedades del género *Magnolia*.

## **2.4. LOS ONCOFITOFARMACOS**

### **2.4.1. Los antitumorales y antineoplásicos.**

Los tratamientos convencionales contra el cáncer como la quimioterapia y la radioterapia, son extremadamente costosos y causan efectos secundarios como; vómito, alopecia, diarrea, estreñimiento, mielosupresión, alteraciones neurológicas, cardíacas, pulmonares y renales. Los efectos secundarios producidos por los fármacos y los tratamientos existentes reducen calidad de la vida y desalientan la correcta y completa terminación de los protocolos médicos con la progresión concomitante del cáncer y de sus complicaciones asociadas [59]. Aunado a todo esto, el crecimiento mundial en la incidencia de diferentes tipos de cáncer, ha dado como resultado, una necesidad de descubrir nuevos fármacos, más potentes, más selectivos y menos tóxicos que los empleados actualmente

En este contexto, algunos de los fármacos han surgido a partir de programas de investigación creados especialmente para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer. Con dicha finalidad, en 1960, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos inició junto con el Departamento de Agricultura (USDA) un programa de recolección de plantas, principalmente de regiones templadas del planeta [60]. Hasta la finalización del programa en 1982, se evaluaron 114.000 extractos correspondientes a unas 35, 000 especies diferentes de plantas. La actividad antitumoral de los extractos, obtenidos a partir de estas plantas se ensayó principalmente usando dos modelos de leucemia en ratones, el L1210 y el P388 [61].

Actualmente, más de 3000 plantas en todo el mundo se han reportado como anti cancerígenos constituyendo una alternativa común para el tratamiento contra el cáncer en muchos países [62, 63] debido a que se estima que del 10 al 30% de la población mundial las usa para este fin y en los países asiáticos, el porcentaje sube hasta el 50% [64]. Aunque en Europa, el gasto para productos herbarios durante el 2005 en este rubro se estimó en 5 mil millones de euros la mayor parte de los médicos aún discrepan respecto al uso de los productos vegetales que carecen de estudios toxicológicos y farmacológicos.



---

En México, del 30 a los 70% de enfermos oncológicos utilizan los extractos herbarios como terapia alternativa para diversos tipos de cáncer [65,66]. Las principales estrategias para la selección de la especie vegetal a probar de como nuevos compuestos oncológicos son, la información quimiotaxonómica disponible y el conocimiento etnomédico. La quimiotaxonomía relaciona el género con las especies de acuerdo a la producción de los diversos metabolitos secundarios que produce, de diversas características ecológicas y de diversos caracteres fisiológicos [67].

El conocimiento etnobotánico o etnomédico incluye las plantas usadas por médicos tradicionales. El procedimiento de la preparación puede dar una indicación del mejor método de la extracción. La investigación inicial para las plantas usadas para el tratamiento contra el cáncer corresponde a los análisis celulares usando, principalmente, líneas P388 y variedades de células KB [68]. Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), los extractos de plantas y los compuestos puros con el  $\leq 30 \mu\text{g/mL}$  de los valores ED50 y el  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente, se consideran citotóxicamente activos [69].

La mayor parte de los agentes antitumorales usados actualmente en la clínica, poseen actividad citotóxica significativa en sistemas de cultivo celular. Una vez que se extraen los compuestos que dan positivos en las pruebas *in vitro*, se procede a correr las pruebas *in vivo* utilizando por ejemplo los ratones inmunodeficientes NOD-SCID y los ratones de Balb C57BL/6, cuando los extractos o los compuestos demuestran actividad contra variedades de células cancerígenas, se habla de citotoxicidad [70]. Si los compuestos son eficaces en pruebas experimentales *in vivo* se denominan compuestos antitumorales y antineoplásicos, mientras que, aquellos que son activos clínicamente contra cáncer en humanos se denominan compuesto anticancerígenos. Aproximadamente, el 60% de los fármacos usados actualmente para el tratamiento contra el cáncer se han aislado de los productos naturales [71], dando como resultado que el reino vegetal ha sido la fuente más importante de obtención de este tipo de compuestos, como los alcaloides del *Vinca rosea* (vincristina y vinblastina), los diterpenos del *Taxus brevifolia* Nutt (taxol), los alcaloides de *Camptotheca acuminata* Decae (campotecinas) y los lignanos del *Podophyllum peltatum* (podofilotoxina) [72].

Actualmente, hay 16 nuevos compuestos derivados de plantas que han sido probados en ensayos clínicos. De estos, 13 se prueban en la fase I o II (estudios *in vitro* y en animales) y 3 compuestos en la fase III (estudios clínicos en humanos) [73]. Entre estos compuestos, el

---

honokiol y el magnolol, se perfilan como importantes compuestos activos sobre una variedad de tipos de cáncer y con poca toxicidad en comparación con los fármacos convencionales.

## **2.5. *Magnolia dealbata* Zucc**

### **2.5.1. Aspectos botánicos de la especie**

Las *Magnolias* son árboles y arbustos llamados así en honor a Pierre Magnol, profesor francés de botánica y medicina quien identificó y clasificó a las primeras especies de *Magnolia*, pero la familia Magnoliaceae fue descrita por Jussieu en 1789 [74] y se compone de 2 subfamilias y 9 géneros, siendo el género *Magnolia* el más numeroso con 80 especies [75]. Son árboles de hasta 30 a 40 m de altura, de hojas simples con forma obovada u oblonga; papirácea; de color verde el haz y blanco el envés, de 35 a 50 cm de largo por 24 a 27 cm de ancho con flores bisexuales y estambres numerosos [76].

Específicamente, *Magnolia dealbata* fue descrita por Francisco Hernández en el siglo XVI aunque para la ciencia, esta especie fue colectada y descrita por Zuccarini en 1837 quien la señala en las selvas tropicales mexicanas, después de esta descripción durante cien años no se volvió a saber de ella y no fue sino hasta 1960 cuando fue nuevamente colectada y determinada por Rzedowski en el estado de Hidalgo “El redescubrimiento de una especie arbórea que se creía extinta representa una opción más para la humanidad” [77]



**Figura.1. *Magnolia dealbata* Zucc.**

---

## Ubicación taxonómica

REINO	Vegetal
DIVISION	Embryophyta
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Magnoliales
FAMILIA	Magnoliaceae
SUBFAMILIA	Magnoliadeae
GENERO	<i>Magnolia</i>
ESPECIE	<i>dealbata</i>
Nombre Común:	Eloxochitl, Cow-Cumbre

### 2.5.2. Clima y Floración

Se localiza en climas templados, temperaturas anuales de 16 a 22°C. Es un árbol raro de los bosques mesófilos de montaña en la Sierra Madre oriental y en la Sierra de Oaxaca en el trópico mexicano. El mayor atractivo de *Magnolia dealbata* Zucc, lo constituye el gran tamaño de sus hojas de hasta 50 cm de longitud y en algunos casos un poco mayores, las cuales sobresalen del resto de las otras especies arbóreas (Figura 2 y 3). El periodo de floración es durante los meses de marzo a mayo y la dispersión de las semillas se da en los meses de agosto a octubre. Los frutos inmaduros se encuentran en el árbol desde el mes de Julio. [78]



Figura.2. Hoja  ar colectado en  
Coyopola, Veracruz

---

### **2.5.3. Origen y hábitat**

El área de distribución natural de *Magnolia dealbata* Zucc ha sido en su mayoría transformada a cultivos y pastizales, ocasionando que su distribución de por sí restringida a ciertas áreas, quede aún más limitada a manchones semiperturbados en terrenos con pendientes abruptas, al borde de arroyuelos donde la inaccesibilidad relativa de estos microambientes ha permitido conservar pocos individuos. En la actualidad, *Magnolia dealbata* Zucc se encuentra restringida a poblaciones muy reducidas en los estados de Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, San Luis Potosí y Veracruz [79] (Figura 3). Siendo en este último estado de la república en donde se encuentran las poblaciones mejor estudiadas, algunas de estas se componen de 6 a 10 individuos y sólo en la población de Coyopola, municipio de Ixhuacán de los Reyes Veracruz, se encuentran las poblaciones con cerca de 80 individuos [80]. Debido a su reducido número y limitada distribución, esta especie se encuentra en peligro de extinción y protegida por la secretaría de ecología [81]. Además, esta listada en el libro rojo de la IUCN en la categoría de Endangered [18].

El conocimiento existente, respecto a *Magnolia dealbata* Zucc es muy limitado debido a su relativo poco tiempo de su redescubrimiento. Por lo tanto, existen muy pocos trabajos al respecto ya que pese a ser una especie nativa y endémica de México, las investigaciones desarrolladas sólo se refieren a su redescubrimientos [82-83], así como los estudios taxonómicos como los de Hernández Cerda [86], Johnson [87] y el de Vázquez [88, 89] quién realizó una amplia revisión al género *Magnolia* en México y Centroamérica. Así como los publicados por Sánchez y colaboradores, respecto a la ecología de *Magnolia dealbata* Zucc [90, 91].

### **2.6. ASPECTOS FITOQUIMICOS Y FARMACOLOGICOS**

Los estudios taxonómicos tempranos de *Magnolia dealbata* Zucc no están analizados ampliamente como en otras especies, incluso del mismo género *Magnolia*. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones, muestran que las Magnolias conservan estructuras primitivas, como los estambres laminares grandes y numerosos y el reducido tamaño del embrión, por lo que representan un punto interesante en el estudio evolutivo, taxonómico y ecológico, así como

---

de importancia ornamental y en la medicina tradicional ya que es una especie de uso medicinal amplio y antiguo sobretodo en el centro y sureste del país, en Hidalgo, San Luis Potosí y Veracruz, se emplea principalmente, para tratar problemas del corazón y dolores estomacales.

Como *Magnolia dealbata*, Zucc, es una especie no cultivada; Russel colectó semillas en la localidad de Coyopola Veracruz y en colaboración con el Dr. Pattison, realizaron ensayos de germinación obteniendo sólo 50 plántulas después de 2 o 3 semanas. Posteriormente, Pattison realizó otra colecta de semillas, con lo que no obtuvo resultados favorables [96]. Por su parte, Vovides e Iglesias realizaron un estudio sobre la germinación de esta especie encontrando que las semillas tienen un porcentaje de germinación muy bajo y errático, además de que pierden rápidamente su viabilidad.

Una forma de promover la conservación de *Magnolia dealbata* Zucc, ha sido su cultivo en colecciones botánicas y de jardín. Pattison, Vovides e Iglesias, contribuyeron de esta forma a su conservación; aunque si bien de esta manera, se asegura su permanencia, no permite realizar investigaciones encaminadas a desarrollar metodologías que favorezcan su propagación.

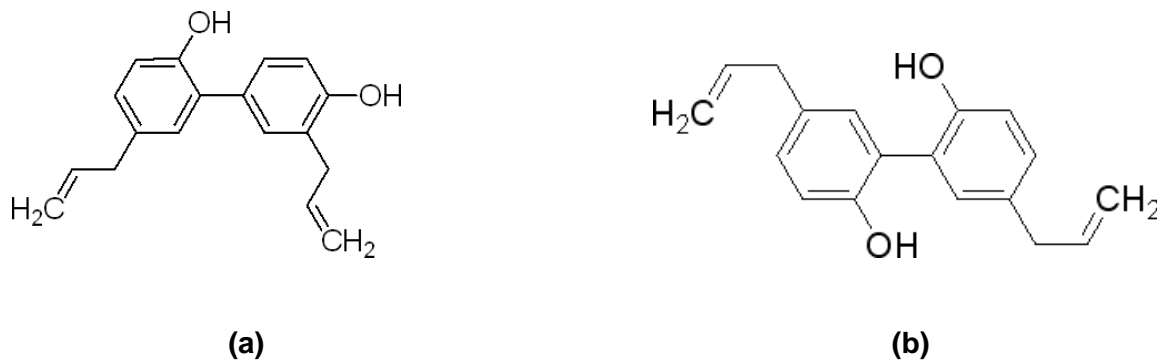
En el año 2006, Mata y colaboradores [92], realizaron la propagación *in vitro* de *Magnolia dealbata* Zucc vía embriogénesis somática y organogénesis directa a partir de embriones cigóticos, con un 90% de sobrevivencia de las plántulas y hasta la fecha, es el único estudio biotecnológico que se ha realizado en este sentido con esta especie.

En Puebla, *Magnolia dealbata* Zucc, se indica en problemas del corazón, incluyendo ataques, para calmar los nervios y para el susto [93]. En la literatura científica solo existe un reporte farmacológico de nuestro grupo de investigación, en el cual se estudian los efectos de los extractos alcohólicos de esta especie sobre el Sistema Nervioso Central demostrando su actividad como ansiolítico, sin producir sedación. Además, se demostró su actividad antiepiléptica, disminuyendo las convulsiones y evitando la muerte en ratones [17], lo cual viene a reforzar el uso etnobotánico descrito. En este reporte de investigación, se detectó y se cuantificó honokiol y magnolol en *Magnolia dealbata* Zucc (Fig 4). Estos dos compuestos están directamente implicados en una serie de actividades farmacológicas de diversa índole con más

---

de 2 mil artículos científicos que reportan su efecto antioxidantes, sobre el SNC y al parecer la más importante, sobre el cáncer.

Honokiol, (3, 5'-di-2-propenil-1,1'-bifenil-2-4'-diol) fue el primer compuesto aislado e identificado de la corteza de *Magnolia obovata* Thunb (Saiboku-to en Japonés) [94]. Esta planta es usada en la medicina tradicional china para el tratamiento de la fiebre tifoidea, fiebre y el dolor de estomago [95]. La corteza de *Magnolia obovata*, ha sido utilizada en Japón desde hace cientos de años en remedios herbales contra la neurosis, ansiedad, histeria, insomnio, identificando al honokiol y al magnolol (un isómero del honokiol) como los compuestos responsables de la actividad ansiolítica en los extractos de Saiboku-to [96].



**Figura 3 . Estructura química de honokiol (a) y magnolol (b)**

Previamente, Kuribara y colaboradores habían demostrado que el honokiol posee actividad ansiolítica a concentraciones de 0.2 a 2 g/kg y que al ser comparado con el diazepam, produce el efecto ansiolítico a una menor dosis, sin afectar la función motora, sin producir sedación y lo más importante, sin provocar dependencia física [97]. La administración oral de honokiol y magnolol en modelos animales de depresión, disminuye los niveles de la 5-HT en corteza frontal y, reduce las concentraciones elevadas de corticosterona en suero normalizando la hiperactividad cerebral [98]. Estudios experimentales demostraron que los efectos neuroprotectores de honokiol y magnolol están relacionados con su acción antioxidante y con su capacidad para antagonizar aminoácidos que producen toxicidad, sugiriendo que ambos compuestos podrían ser agentes potenciales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas [99], en procesos de isquemia cerebral [109, 101] y en otras patologías [102]. Otros estudios han reportado que magnolol inhibe fuertemente la liperoxidación lipídica

---

en las mitocondrias protegiendo a las células de lisis oxidativa y evitando la muerte celular [103].

En los últimos siete años se han generado alrededor de 400 estudios sobre la actividad de estos dos compuestos sobre cáncer, donde sitúan al honokiol como un prometedor agente antitumoral que induce apoptosis e inhibe el crecimiento de endotelio vascular en diversas líneas celulares de cáncer [113]. *In vivo*, la administración sistémica de honokiol en liposomas y Adriamicina®, detienen significativamente el crecimiento tumoral vía el incremento de la apoptosis, esto al compararlo con la administración de Adriamicina® sola [104]. Así también, honokiol en liposomas aumentan la inducción de apoptosis en células 4T1 *in vitro* e *in vivo* y los tratamientos combinados muestran sinergismo en la supresión del progreso tumoral [105]. En tratamientos combinados, honokiol y dosis bajas de Docetaxel se han empezado a usar para aumentar la respuesta terapéutica de los pacientes con cáncer de próstata con metástasis [106].

El problema que se presenta con la planta asiática *Magnolia obovata* de donde se obtienen los compuestos para abastecer al mercado mundial, es que para extraer estos compuestos de la corteza se necesitan aproximadamente 15 años de edad vegetal para que el árbol los empiece a producir. Dada la importancia farmacológica probada de estos dos compuestos, el cultivo de tejidos y células representa una alternativa ventajosa con relación a los métodos convencionales de extracción que utilizan material silvestre o cultivado sobretodo tomando en cuenta que estos compuestos se producen en mayores cantidades en la especie mexicana, pero la cual se encuentra en peligro de extinción.

## **2.7. PROCEDIMIENTOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.**

Es evidente que el mercado de fitofármacos ha iniciado una nueva época en el consumo e industrialización de las plantas medicinales en el mundo. La tendencia a incrementar este mercado ha estimulado el desarrollo científico y la investigación en el campo de los productos naturales que, seguramente perdurará durante el presente siglo

---

Una de las alternativas en la producción de fármacos de origen vegetal es el empleo de sistemas de cultivo de células y tejidos. Estas biotecnologías han ganado prestigio mundial en los últimos años, fundamentalmente por tres razones:

1. Las técnicas de cultivo de tejidos pueden ser aplicadas a la mayoría de las especies de plantas superiores. Utilizando fragmentos vivos del vegetal en cuestión se puede lograr la producción clonal masiva y la preservación de la especie medicinal deseada.
2. Los cultivos celulares en suspensión, producen los compuestos medicinales en sistemas nutritivos artificiales que permiten la regulación y control de su producción en forma precisa y con mayores ventajas que las observadas en los cultivos agroindustriales.

Este tipo de tecnología evita que las industrias del ramo dependan de plantaciones que habitualmente se hallaban en los países tropicales y cuya explotación comercial implicaba grandes costos relacionados con la problemática social y económica de los países contratados [107]. Ahora el proceso de producción se realiza en los países de origen, en las instalaciones de las propias industrias, independientemente de su clima y localización geográfica.

### **2.7.1 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales, comprende un conjunto de técnicas que han sido desarrolladas para lograr el crecimiento *in vitro* de órganos, tejidos y células vegetales. Estos procedimientos pueden ser de utilidad en la obtención de productos farmacéuticos y otros productos naturales con valor comercial. Adicionalmente, a través de estos procedimientos, es posible lograr el mejoramiento genético de plantas, la recuperación de clones libres de enfermedades y la multiplicación clonal masiva y rápida de variedades que tiene un interés como fuente de productos útiles o que se encuentran en peligro de extinción. Estas metodologías se utilizan también como herramienta para resolver problemas relacionados con fisiología y bioquímica vegetal [108].

Su historia se remonta al año 1902 cuando el fisiólogo alemán Haberlandt, realizó los primeros estudios sobre el cultivo de órganos y células vegetales, dejando la inquietud en muchos investigadores quienes profundizaron en dicho conocimiento, que años más tarde dio origen a



---

esta nueva e importante rama de la Biología [109]. La asepsia de los cultivos es fundamental para el desarrollo de estas técnicas, y fue hasta 1934 cuando White logró mantener por tiempo indefinido un cultivo *in vitro* de raíces aisladas de varias especies vegetales proporcionándoles extracto de levadura [110]. En 1938 se lograron cultivar callos (tejidos desdiferenciados) de zanahoria y tabaco. En 1939, Nobecourt, Gautheret y White reportaron el cultivo de callos vegetales en un medio sintético [111]. A partir de estos logros se ensayaron y desarrollaron diferentes medios de cultivo, lo cual permitió establecer cultivos de una amplia variedad de órganos y callos de diferentes especies. En 1948 Skoog y sus colaboradores, descubrieron el efecto de las citocininas y el control hormonal en la regeneración de tallos y raíces, proporcionando así las bases para la micropropagación, Murashige y Skoog desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco [112]. En la actualidad, las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en el cultivo de casi todas las especies vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la teoría de la totipotencialidad celular, la cual establece que es posible generar un organismo completo a partir de una sola célula. Schwann propuso que cada célula posee la capacidad y la información genética para generar un nuevo individuo idéntico al que le dio origen, siempre y cuando se provea al progeitor de las condiciones externas que le permitan expresar su información genética [113]

### **2.7.2.Reguladores de crecimiento vegetal**

Las hormonas o reguladores de crecimiento vegetal, son moléculas orgánicas producidas por las plantas que no están involucradas directamente en los procesos metabólicos, pero que actúan en concentraciones bajas para modificar dichos procesos.

En las células, algunas hormonas se unen a un receptor proteico que envía una señal que hace que se enciendan determinados genes, lo cual produce la síntesis de alguna enzima que modifica el crecimiento vegetal [114].

Las principales características de las hormonas vegetales son las siguientes:

1. Tienen efecto a bajas concentraciones

- 
2. El efecto que producen es dependiente de su concentración y del balance con respecto a los otros reguladores de crecimiento.
  3. El sitio de la planta en el que las hormonas ejercen su acción generalmente es distinto del sitio donde se producen.

Actualmente, se reconocen cinco clases de reguladores del crecimiento vegetal, divididos en tres grupos principales:

- a) Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberilinas
- b) Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico
- c) Etileno

**Auxinas:** Dentro de estas se encuentran el ácido indolacético (AIA), que es la única auxina de origen natural y deriva del aminoácido triptófano. Dentro de las sintéticas se localizan el ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Las funciones de las auxinas son las siguientes: dormancia apical; aumentan el crecimiento de los tallos; estimular la formación de raíces adventicias; estimulan el desarrollo de los frutos; promueven la división celular, la floración de algunas especies y la síntesis de etileno, además favorecen la maduración de los frutos e inhibir la abscisión o caída de los frutos [115].

**Citocininas:** En este grupo se encuentran la zeatina (ZN), la 6-bencil-aminopurina (BAP) y la cinetina (CN). Las funciones de estas hormonas son las siguientes: estimulan la división celular y el crecimiento. Inhiben el desarrollo de raíces laterales, rompen la latencia de las yemas axilares, promueven la organogénesis en los callos celulares, retrasan la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales, promueven la expansión celular en cotiledones y hojas; promueven el desarrollo de los cloroplastos [116].

**Giberilinas:** Constituyen el grupo más numeroso, está constituido más o menos por unos 70 compuestos, aunque no todos son activo biológicamente, las más utilizadas son GA1, GA3, GA4, GA7 Y GA9. Las funciones que se llevan a cabo en la planta son las siguientes:

---

incrementan el crecimiento de tallos, interrumpen el periodo de latencia de semillas haciéndolas germinar, inducen la brotación de yemas, promueven el desarrollo de los frutos, estimulan la síntesis de mRNA [117].

Ácido abscísico: El ácido abscísico (ABA) pertenece al grupo de los isoprenoides y tiene actividad inhibitoria en la división y el crecimiento celular, promueve la latencia en yemas y semillas.

Etileno: Es la única hormona gaseosa en el reino vegetal y tiene las siguientes funciones: Promueve la maduración de los frutos, promueve la senescencia (envejecimiento), la caída de las hojas y el geotropismo en las raíces.

Las auxinas y citocininas son las hormonas más importantes para el cultivo de tejidos de vegetales ya que de acuerdo al régimen hormonal utilizado son estimuladores de la elongación celular, la brotación y el enraizamiento [118].

### **2.7.3. Cultivo de callos**

Se denomina callo vegetal a un tejido obtenido mediante el aislamiento de órganos y tejidos diferenciados y que es conducido a una desdiferenciación celular, presentando la apariencia de una masa aforme que presenta una proliferación celular continua, acelerada y desorganizada. La formación de callos involucra la pérdida de la especialización de las células y de las estructuras organizadas [119]. Los callos vegetales difieren en cuanto a su apariencia externa, textura, composición celular y contenido de compuestos químicos.

Estudios microscópicos han demostrados que los tejidos de tipo calloso generalmente son heterogéneos en su composición celular es decir, un mismo callo puede presentar varios tipos celulares. Algunos son compactos y duros con células íntimamente unidas, otros son esponjosos y friables, con una gran cantidad de espacios intercelulares, que incluso pueden presentar diferentes coloraciones que pueden ser desde hialinos, beige. Café, verdes, rojos,

---

etc., aunque procedan de una misma especie vegetal. Estos cambios de coloración están íntimamente relacionados con factores nutricionales, ambientales y de la edad del cultivo [120].

Desde el punto de vista morfogénico, una característica importante de los callos es la totipotencialidad de sus células, ya que bajo condiciones nutricionales, hormonales y ambientales adecuadas, estos tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces o embriones pudiendo llegar a formar plántulas completas [121].

Para el cultivo de callo, se han usado varios medios de cultivo, pero el más común es el medio Murashige-Skoog (MS), desarrollado especialmente para callo de tabaco [18]. Este medio es rico en macronutrientes, en particular nitrógeno incluyendo iones tanto de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) como de amonio ( $\text{NH}_4$ ), sacarosa y ciertas vitaminas. La iniciación de la división celular y la subsiguiente producción de callos requieren que se adicionen en las proporciones adecuadas una citocinina y una auxina. La auxina en concentraciones de moderadas a elevadas, es la hormona primaria que se usa para producir callo, la citocinina es proporcionada en una cantidad menos [122].

El crecimiento del callo sigue un patrón logarítmico típico, presentándose un periodo lento de inducción de división celular que requiere de auxina, una fase de división celular rápida que implica la síntesis activa de AND, ARN y proteína, seguida por una cesación gradual de la división celular. La división celular no se efectúa en toda la masa en cultivo sino que se localiza principalmente en una capa meristemática en la periferia exterior de las células, y las partes interiores del callo permanecen como una masa no dividida del tejido viejo [123].

Un problema de estos cultivos, es que se pueden presentar modificaciones en la citología nuclear de las células durante el cultivo, presentándose aberraciones cromosómicas y mutaciones, las cuales generalmente se incrementan conforme aumenta la edad del cultivo, aunque cada especie vegetal tiene su propio patrón de comportamiento y pueden presentarse problemas de este tipo, en cultivos jóvenes [124].

---

#### **2.7.4. Cultivo de células en suspensión**

El cultivo de células vegetales en suspensión es una herramienta poderosa para llevar a cabo tanto estudios sobre embriogénesis, crecimiento y diferenciación, organogénesis, ciclo celular y metabolismo, así como para la obtención de diversos productos del metabolismo secundario. Estos cultivos están constituidos por un conjunto de células aisladas, así como pequeños racimos celulares, distribuidos en un medio de cultivo líquido, cuya proporción y tamaño depende de la especie vegetal de la cual se ha derivado el cultivo, de la edad del tejido, de la composición del medio y de las condiciones ambientales [125].

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión puede lograrse directamente a partir de un inóculo (fragmentos de hoja, cotiledón, etc) o bien, transfiriendo fragmentos de callos friables en matraces con medio líquidos, los cuales son colocados en una agitador rotatorio para proveer a las células de aireación. El establecimiento del cultivo de células en suspensión a partir de un fragmento de callo es más rápido, aunque depende de la friabilidad del tejido calloso [126]. El término friable se emplea para describir la capacidad de separación de las células, es decir, que éstas se disgreguen fácilmente después de una división celular, así, conforme se forman nuevas células, estas son dispersadas en el medio líquido formando racimos y agregados. Aun cuando el callo presente una alta friabilidad, el cultivo requiere de un periodo de adaptación para que pueda establecerse una buena suspensión [127].

La composición del medio de cultivo líquido y la agitación continua del medio son factores que influyen en el grado de dispersión de las células del tejido, dando como resultado unidades más pequeñas y ayudando al intercambio gaseoso. Las condiciones óptimas para el máximo crecimiento y dispersión de las células vegetales varía de una especie a otra, pero la velocidad de agitación apropiada para la mayoría de los cultivos va de 60 a 180 rpm [128].

La capacidad de separación o friabilidad de las células en un cultivo en suspensión se puede promover con una mayor concentración de auxinas que de citocininas; sustituyendo la sacarosa

---

por glucosa; con vitaminas como la B12, B1, E o incrementando los niveles de algunas sales minerales como el calcio y el fierro [129].

Las células vegetales son relativamente más grandes que las bacterias y hongo, pero aun dentro de un mismo cultivo existe una amplia variedad de formas y tamaños, desde esféricas hasta cilíndricas. Las dimensiones de estas células varían de 20 a 40  $\mu$  de diámetro y de 30 a 200  $\mu$  de longitud. Presentan una pared celular delgada (0.2 a 0.6  $\mu$ ) y su volumen es 100 000 a 200 000 veces mayor que el de las bacterias. Las células en suspensión presentan mayores índices de división celular que los cultivo de callos, la duplicación de las células se alcanza generalmente entre las 24 y las 72 h por lo que el riesgo de alteraciones genéticas es potencialmente mayor que en un cultivo de callos [130].

Es así como los cultivos de células en suspensión están constituidos principalmente por células meristemáticas indiferenciadas, más débiles e inestables en comparación con su estado en el ambiente natural. Estos cultivos, respecto a los cultivos de células diferenciadas (raíces y brotes), presentan la ventaja de poder ser cultivadas a mayor concentración celular y a mayor velocidad de crecimiento. En el cultivo en suspensión el estado que más se aproxima a las condiciones naturales es la fase estacionaria, diversos autores han reportado un cierto grado de diferenciación, observándose que la acumulación de los metabolitos secundarios se presenta principalmente durante ese periodo. Sin embargo, en el caso de metabolitos asociados al crecimiento, su acumulación puede ser proporcional a la producción de la biomasa, lo cual se ha observado durante la fase exponencial en ciertas líneas celulares y en la producción de betalainas, carotenoides y azdiractina [131, 132].

Las células vegetales en suspensión tienden a formar agregados de manera natural ya que al dividirse no se separan adecuadamente, lo cual puede afectar la producción de los metabolitos secundarios, probablemente por estrés nutricional especialmente relacionado con el oxígeno y causado por la limitación en la transferencia de masa a los agregados y por la diferenciación celular dentro de los mismos; además, el aumento de las interacciones intercelulares puede facilitar el intercambio de señales y metabolitos necesarios en la síntesis de algunos compuestos particulares [133].

---

La mayoría de las investigaciones bioquímicas y fisiológicas del crecimiento y división celular en plantas superiores han sido llevadas a cabo en cultivos tipo-lote. Los cultivos vegetales de células en suspensión tipo lote, son aquellos en los que el material celular crece en un volumen fijo de medio de cultivo al que se han adicionado desde un principio todos los nutrientes necesarios para el cultivo, en un sistema que es cerrado excepto por el intercambio de gases.

Este tipo de cultivo exhibe un patrón de crecimiento sigmoideo en 5 fases, que es el igual al presentado por las bacterias:

1. Fase de reposo, donde las células no presenten ninguna señal de división celular, ya que únicamente se están adaptando a las nuevas condiciones nutricionales y preparándose para iniciar la división celular.
2. Fase exponencial, donde hay un alto grado de división celular
3. Fase lineal, donde es un poco menor la división celular pero se incrementa al grado de expansión celular.
4. Fase de disminución progresiva, donde los grados de división celular y elongación van disminuyendo gradualmente.
5. Fase estacionaria, donde el número y tamaño de las células permanecen constantes, y se han agotado los nutrientes, o al menos alguno de ellos. Durante la fase estacionaria las células han alcanzado su máxima densidad celular, permaneciendo viables pero sin división [134].

El establecimiento y duración de cada fase depende de la especie vegetal, la frecuencia de los subcultivos, la densidad inicial y el medio de cultivo empleado. La mayoría de los cultivos en suspensión de vegetales alcanza su máxima densidad celular entre los 18 y los 25 días, aunque pueden existir cultivos muy activos que la alcanzan entre los 6 y 9 días [135].

Los cultivos de células en suspensión pueden también ser crecidos en un sistema semicontinuo, o de lote extendido en los cuales, los nutrientes se suplen periódicamente o continuamente durante el curso de un cultivo mediante la adición de medio fresco en un determinado intervalo de tiempo. En el sistema de cultivo continuo abierto, se va introduciendo constantemente medio de cultivo, causando el desplazamiento de un volumen igual del cultivo

---

(medio nutritivo más células) sin interrumpir el cultivo, o bien en un sistema continuo cerrado, en el cual continuamente, se alimenta el cultivo con medio fresco sin la pérdida de células, lo cual incrementa la acumulación de biomasa [136].

El crecimiento de las células en suspensión puede ser monitoreado por el número celular, el cual está correlacionado con el peso seco y el volumen del paquete celular, el cual está correlacionado con el peso fresco. El peso seco es mucho más exacto y nos permite estimar el tiempo de duplicación y la velocidad específica de crecimiento [137].

### **2.7.5. Metabolitos secundarios**

Los compuestos sintetizados por las plantas que son esenciales para su crecimiento y multiplicación, son conocidas como metabolitos primarios e incluyen a los lípidos, carbohidratos y proteínas. Además de estas sustancias, las plantas producen otros compuestos conocidos como metabolitos secundarios, que llevan a cabo diversas funciones y que generalmente están involucrados en las interacciones de las plantas con el medio ambiente. Entre los metabolitos secundarios se encuentran diversos compuestos como pigmentos y aromas que ayudan a la polinización atrayendo insectos hacia las flores; compuestos que les ayudan a defender a la planta de patógenos y depredadores; compuestos que les ayudan a tolerar condiciones ambientales adversas; venenos que las hacen no comestibles, etc. Estos compuestos se ven de naturaleza química diversa e incluyen alcaloides, fenoles, glicósidos, fenoles, saponinas, esteroides entre otros [138].

En suspensión, las células individuales se distribuyen en forma homogénea a través del medio de cultivo y por estar rodeadas del mismo, se facilita la transferencia de nutrientes y de oxígeno hacia el citoplasma. Este tipo de cultivo tiene la ventaja de permitir el control relativamente sencillo de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto; sin embargo, pueden verse modificadas algunas características de las células presentes en las plantas como su diferenciación y la comunicación intercelular [139]. Lo cual implica en muchos casos la disminución en la producción de metabolitos secundarios, pues se ha reportado que en algunas especies, la síntesis de ciertos metabolitos requiere la coexistencia de diferentes tipos celulares o la compartimentalización intracelular [140].



En la actualidad, se conocen pocos procesos industriales para la utilización de metabolitos secundarios. La tabla 8, muestra los productos obtenidos por diferentes tipos de cultivos biotecnológicos.

**Tabla 7 Productos medicinales de origen vegetal obtenidos por cultivos biotecnológicos.**

Categoría química	Producto	Especie	Tipo de cultivo
Alcaloides	Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Raíces [141]
	Berberina	<i>Coptis japonica</i>	Suspensión [142]
	Digital	<i>Digitalis lanata</i>	Embriones [142]
	Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión [144]
	Sanguinarina	<i>Papaver somniferum</i>	Suspensión [145]
	Vindolina	<i>Cataranthus roseus</i>	Suspensión [146]
Esteroides	Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Suspensión [146]
	Panaxadiol	<i>Panax ginseng</i>	Embriones [147]
Fenilpropanoides	Chiconina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Raíces transformadas [148]
		<i>Taxus brevifolia</i>	
Diterpenos	Taxol		Suspensión [149]

Recientemente, el proceso de producción de compuestos a gran escala se ha perfeccionando, principalmente mediante la utilización de grandes biorreactores con un alto nivel de rendimiento. Hasta el momento, la comercialización de este tipo de cultivos que han sido escalados industrialmente, se ha realizado fundamentalmente en Japón, país líder en esta tecnología, quizás porque los productos naturales juegan un papel central como insumos de su sistema de salud y porque las empresas japonesas han decidido apoyar programas de largo plazo tanto en la investigación como en el desarrollo de estos productos [150]. El hecho es que hasta el momento en ese país se han desarrollado tres grandes procesos de producción de fitofármacos a gran escala utilizando como tecnología el cultivo de tejidos vegetales. El primero fue la producción de *chiconina*, compuesto que posee propiedades cicatrizantes y el cual es producido en cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon* por la compañía Mitsui Petrochemical Industries [151]. El segundo es la *berberina*, alcaloide de conocida utilidad medicinal que se obtiene por cultivos celulares de *Coptis japonica* [142]. Y recientemente, se introdujo el cultivo en bioreactores de raíces de *Panax ginseng* [147] cuya demanda está en crecimiento por la utilización cada vez más generalizada de sus saponinas medicinales. Algunos otros compuestos como la cafeína, la ubiquinona, la diosgenina, el ácido rosmarínico,

---

la digitoxina, la atropina y la papaverina, también se obtienen mediante procedimientos biotecnológicos [141-143].

La compañía Phyton realizó escalamientos comerciales del taxol (paclitaxel), compuesto antitumoral obtenido originalmente de la corteza de *Taxus brevifolia*. El taxol es un buen ejemplo para ilustrar cómo la demanda creciente de un fármaco obtenido a partir de una fuente natural llevó al desarrollo de métodos alternativos para aumentar la producción de biomasa [149-151]. Con una muestra inicial de 0.3 a 1 kg de planta seca de *Taxus brevifolia* se obtiene suficiente extracto (10-40 g) para permitir el aislamiento y la identificación de un compuesto puro, los ensayos secundarios y preclínicos pueden requerir de 5 a 50 kg de material seco. Cuando el paclitaxel fue aprobado para el tratamiento del cáncer de mama y de ovario, la demanda del compuesto ascendió a más de 250 kg por año [152]. Considerando que el paclitaxel se obtiene de la corteza con un rendimiento promedio de 0.01% del peso seco y el crecimiento del árbol es muy lento, había que encontrar una forma alternativa para abastecer al mercado. Los primeros intentos consistieron en probar si otras partes del árbol o si otras especies relacionadas de *Taxus* producían el compuesto. Así se llegó a recolectar especies salvajes y cultivadas. Sin embargo, la técnica de producción era poco práctica. En cambio, el grupo francés de Pierre Potier describe una vía semi-sintética de producción a partir del compuesto intermedio 10-deacetil bacatina aislado del *Taxus baccata* [153]. No obstante lo anterior, en 1992, el grupo de Holton patenta otra vía semisintética con un rendimiento del 80% mucho mayor al de Potier [154].

Actualmente, Bristol-Myers-Squib, produce el paclitaxel utilizando la tecnología de cultivo de células vegetales desarrollada por la compañía de Biotecnología Phyton, en su planta de Alemania. El proceso se inicia con la propagación de una línea celular de *Taxus* específica en medio líquido en tanques de fermentación, luego se purifica directamente el paclitaxel por cromatografía y se aísla por cristalización [155]. Aún hoy continúan las investigaciones sobre los aditivos que se pueden agregar a estos cultivos para aumentar la producción de paclitaxel en estas células. Actualmente se adiciona fenilalanina y sulfato de vanadio a las líneas de *Taxus baccata* [156].

---

Todos estos ejemplos ilustran claramente la tendencia que seguirá en los próximos decenios la investigación biotecnológica de las plantas medicinales, lo cual genera en los países en desarrollo, la necesidad de abordar el estudio de su flora local mediante estrategias capaces de competir en el mercado mundial de fitofármacos.

En este rubro, actualmente existen compuestos con actividad farmacológica que ya se obtienen mediante estas técnicas en la industria de fitofármacos (Tabla 9)

**Tabla 8. Metabolitos de importancia farmacéutica**

Metabolito	Uso	Costo (US/Kg)
Ajmalicina	Antihipertensivo	37 000
Campotecina	Antineoplásico	432 000
Digoxina	Carditónico	3 000
Taxol	Anticancerígeno	600 000
Vincristina	Antileucémico	1 000 000
Vinblastina	Antileucémico	2 000 000

Ramachandra S, Ravishankar G. Plant Cell Cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advance* 2002; 20 (2): 101-153.

---

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con la Secretaría de Salud, la prevalencia de trastornos producto de la ansiedad y el cáncer es muy alta, situándolas como dos de las enfermedades que afectan a un gran porcentaje de la población. Dentro de la investigación de nuevos psicofármacos y fármacos oncológicos se buscan moléculas que sean más potentes, más selectivos y menos tóxicas que las utilizadas hasta ahora. Actualmente, los fármacos empleados para tratar la ansiedad son las benzodiazepinas, las cuales originan un sin número de efectos secundarios y colaterales como depresión central, ataxia, sobre-sedación, amnesia y potenciación barbitúrica y alcohólica. El inconveniente más importante es la tolerancia y dependencia que se presenta al fármaco. El honokiol y el magnolol son dos compuestos bifenólicos de origen vegetal identificados en la corteza de la especie asiática *Magnolia obovata*, los cuales, comparados con el diazepam producen el efecto ansiolítico a mucha menor dosis sin afectar la función motora, sin producir sobre sedación y lo más importante sin producir dependencia física.

Por otro lado, el crecimiento mundial de incidencia de diferentes tipos de cáncer, ha dado como resultado una necesidad de contar con diversos recursos terapéuticos. Actualmente, hay 16 nuevos compuestos derivados de plantas que han sido probados en ensayos clínicos, de los cuales, 13 se prueban en la fase I o II y 3 compuestos en la fase III. Entre estos, el honokiol y el magnolol, se perfilan como importantes compuestos activos sobre varios tipos de cáncer con poca toxicidad que los fármacos convencionales.

Actualmente, la obtención de estos compuestos se lleva a cabo a través de extractos secos de la corteza de *Magnolia obovata*, pero para que se inicie la producción de los metabolitos se necesitan al menos 15 años de edad vegetal para que el árbol inicie su producción. Recientemente, hemos demostrado la presencia de estos compuestos en hojas y corteza de la planta mexicana *Magnolia dealbata* Zucc, en mayores concentraciones que en la planta asiática. Esta especie, es endémica de México, pero se encuentra en peligro de extinción, por lo que se plantea que la biotecnología sería una alternativa idónea para la producción de honokiol y magnolol, sin utilizar la planta completa como se hace actualmente con *Magnolia*

---

*obovata*. Definiendo condiciones experimentales se podrían producir ambos compuestos en sistemas nutritivos artificiales que permitirían la regulación y control de su producción en forma precisa y con mayores ventajas que las observadas en los cultivos agroindustriales. Al mismo tiempo, utilizando fragmentos vivos del vegetal en cuestión, se podría lograr la producción clonal masiva y la preservación de *Magnolia dealbata* Zucc. Es así como el cultivo de células vegetales para la producción de compuestos activos, representa una alternativa ventajosa con relación a los métodos convencionales de extracción que utilizan material vegetal silvestre o cultivado. Dada la importancia farmacológica de estos dos compuestos, es importante resolver los problemas de abastecimiento en forma controlada, empleando tecnologías modernas que permitan disponer del material vegetal y de sus metabolitos de una forma permanente para su industrialización.

Es por ello que en la presente tesis, se propone, el establecimiento de un bioproceso de producción de honokiol y magnolol a través del cultivo de células de la planta mexicana *Magnolia dealbata* Zucc, controlando los parámetros correspondientes e identificando y cuantificando la presencia de estos dos metabolitos en las plantas regeneradas *in vitro*.. Al mismo tiempo, se propone el establecimiento de un bioproceso de organogénesis para contrarrestar el problema de extinción de la especie.

---

#### 4. JUSTIFICACION

Un gran porcentaje de la población mundial padece problemas neuropsiquiátricos y oncológicos, problemas de la medicina contemporánea que busca contar con medicamentos menos tóxicos y más efectivos. Dada la importancia farmacológica de honokiol y magnolol, compuestos presentes en la planta mexicana *Magnolia dealbata* Zucc, esta ha adquirido gran importancia tanto clínica como comercial, por lo que se está buscando en el campo de la investigación de nuevos fitofármacos, la aplicación de la biotecnología para resolver problemas específicos que afectan la producción de esta planta, identificando un bioproceso que produzca *in vitro* y de forma homogénea altos contenidos de honokiol y magnolol y desarrollar un método eficaz y rápido para propagar la especie botánica que se encuentra en peligro de extinción.

#### 5. HIPOTESIS

La acumulación de los metabolitos bioactivos en cultivos en suspensión de *Magnolia dealbata* Zucc, dependerá del manejo de los nutrientes y reguladores vegetales en el medio, por lo tanto, una adecuada combinación de estos factores permitirá obtener cultivos altamente productores de honokiol y magnolol

La inducción adecuada de procesos morfogénéticos en cultivos de *Magnolia dealbata* Zucc, permitirá el desarrollo de un método de propagación de la especie, rápido y altamente productivo.

---

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo General

Establecer líneas de *Magnolia dealbata* Zucc productoras de los metabolitos honokiol y magnolol, mediante el establecimiento de un bioproceso en suspensión, determinando y controlando la cinética de producción de honokiol y magnolol

Establecer un proceso altamente productivo de organogénesis y regeneración de plantas de *Magnolia dealbata* Zucc, productoras de honokiol y magnolol .

### 6.2. Objetivos particulares

Identificar honokiol y magnolol en plantas de campo mediante el establecimiento de la técnica de HPLC y su curva de desviación estándar.

Establecer cultivos de callos determinando la combinación y concentración de los reguladores de crecimiento adecuados para inducir la producción de honokiol y magnolol.

Establecer líneas celulares altamente productoras de honokiol y magnolol, determinando su curva de crecimiento celular y de producción.

Inducir respuesta morfogénica *in vitro* de *Magnolia dealbata* Zucc vía organogénesis indirecta determinando los requerimientos óptimos para la producción de honokiol y magnolol

Establecer un protocolo de regeneración de *Magnolia dealbata* Zucc

Identificar *honokiol* y *magnolol* en líneas celulares y en plantas regeneradas de forma *in vitro*.

---

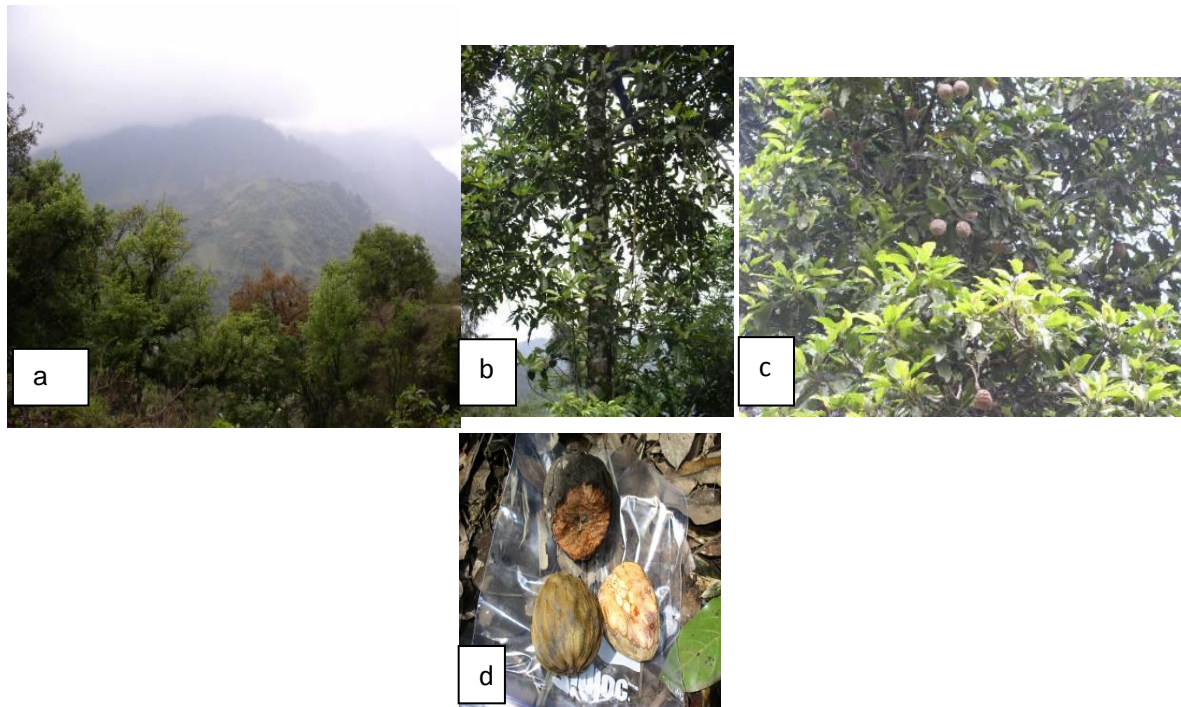
## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### Colecta e identificación de especies de la familia magnoliácea

En México, se cuenta con diferentes especies pertenecientes a la familia Magnoliácea. La colecta de las especies de esta familia se realizó en el estado de Veracruz durante el mes de Mayo contando con el apoyo del Dr. Martín Mata Rosas del Instituto de Ecología A.C. (INECOL) de Xalapa, Veracruz para la identificación de las especies. Se depositaron los vouchers, en el herbario para futuras referencias.

Las especies colectadas fueron las siguientes:

**Talauma mexicana** Se colectaron flores, frutos, corteza y hojas de este espécimen la comunidad de Duraznillo municipio de Quimixtlán, Puebla (Figura 5).



**Figura 4 .** Imágenes que muestran el lugar de la colecta de ***Talauma mexicana*** en Duraznillo, Puebla **(a)**, los especímenes **(b y c)** y los frutos de la misma **(d)**.



---

***Magnolia grandiflora* y *Magnolia dealbata*** se colectaron hojas, corteza y semillas de ambos especímenes en la Comunidad de Jesús María, Municipio de Quihuixtlán Tonatlisco Chico, Veracruz (Fig. 6).



**Figura 5.** La imagen muestra el lugar de colecta de ***Magnolia grandiflora* y *dealbata*** en Coyopola Veracruz (a), los especímenes de *Magnolia grandiflora* (b) y los de *Magnolia dealbata* Zucc (c-d).

Las semillas de ***Magnolia obovata*** se compraron al banco de semillas Chiltern Seeds, en Inglaterra para tomarse como referencia y/o como control positivo para la detección de los dos compuestos y someterlos al mismo sistema de extracción e identificación.

**Preparación de extractos vegetales.** Se molieron finamente y se pesaron 2 g de cada uno de los explantes de *Magnolia obovata* (referencia), *Magnolia dealbata*, *Magnolia grandiflora* y *Talauma mexicana* y se colocaron por separado en cartuchos de filtro Whatman No. 1, en un

---

aparato soxhlet de 500 ml para su extracción exhaustiva por reflujo con metanol durante 7 h. Los extractos se concentraron en un rotavapor a 60°C (Hei-VAP-Advantage, Heildoph) y después se liofilizaron (Free Zone Labconco) por 12 h. Se reconstituyeron con 10 ml de metanol grado HPLC y se filtraron a través de acrodiscos de membrana 0.45 µm (Millipore) para eliminar pequeñas partículas. Una alícuota de 10 µl se inyectó en el HPLC (Waters) para el análisis de la identificación y posterior cuantificación de honokiol y magnolol en cada uno de los extractos de cada especie vegetal.

### **Identificación de honokiol y magnolol por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

El equipo utilizado fue un **Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)** Waters Millennium<sup>32</sup> (Waters 2795; Waters Corp., Milford MA, USA) equipado con un automuestreador y un detector UV-Vis con arreglo de diodos 996. La columna empleada fue una Kromasil RP18 de 150x 4.6 mm con 5 µm de tamaño de partícula y una precolumna Lichrospher RP18. Todas las muestras (extractos vegetales y celulares) se corrieron con el siguiente sistema de elusión:

**Solvente A** agua/ácido fosfórico 10 mM grado HPLC

**Solvente B** Acetonitrilo grado HPLC

En un inicio el sistema fue isocrático pero una vez que se estableció el sistema de elusión para cada uno de los estándares, se corrió un sistema por gradiente para la mezcla de los dos estándares, esto con el objeto de que los picos se separaran de forma completa. El tiempo de retención de cada uno de los picos, así como la comparación del espectro UV sirvieron como parámetros para autentificar la identidad de los compuestos que se determinaron en los extractos.

### **Establecimiento de la curva de calibración estándar.**

Se compraron los estándares de honokiol y magnolol con 98% y 95% de pureza, respectivamente (Nacalai Tesque Inc, Kyoto, Japón). Se estableció la técnica de HPLC con

---

estos estándares bajo las condiciones anteriormente mencionadas, para lo cual se disolvieron por separado 10 mg de los estándares de honokiol y magnolol en 10 ml de metanol y de ahí se tomaron e inyectaron alícuotas de 5, 10 y 15  $\mu$ l. Con dichas condiciones de elusión y mediante regresión lineal de área y concentraciones, se obtuvo la ecuación de la recta, dando como resultado una curva del estándar mediante la cual se demostró la linealidad del método. Se substituyeron en esta ecuación los resultados de las corridas de cada uno de los extractos detectando y determinando la cantidad de principio activo producida por gramo de planta o por grama de biomasa.

El honokiol presento un tr (tiempo de retención) de 8.8 min con dos longitudes de onda máxima a los 255.8 y a los 292.4 nm, mientras que magnolol presentó un tr de 12.2 min, con una absorción máxima a los 290 nm. Las imágenes de los espectros UV se guardaron en la biblioteca del cromatógrafo para efectos de confirmación en futuras detecciones.

## **Establecimiento de cultivos celulares de callos**

### **Limpieza de explantes**

Para establecer los cultivos *in vitro* de callos de *Magnolia dealbata*, se emplearon cotiledones, hojas (5mm) y brotes jóvenes del material colectado en campo. Se utilizó un bisturí desinfectado para remover los tejidos de las plantas recolectadas. Se cortaron tejidos de hoja así como de brotes jóvenes, hipocótilos y cotiledones. Todos los brotes se desinfectaron lavándose con una solución al 5% (v/v) de detergente Extran(Labo Clean, Inc., Puebla, México) por 5 a 10 min con agitación suave y constante. Se enjuagaron dos veces con agua desionizada estéril. Se lavaron durante 30 a 40 s, en una solución al 70% (v/v) de etanol, seguido de una solución al 1% (v/v) de hipoclorito de sodio durante 10 min en agitación suave. Bajo condiciones de esterilidad, en una campana de bioseguridad, todos los explantes, se enjuagaron tres veces con agua desionizada por 10 min para eliminar todo residuo. Finalmente, los fragmentos se sumergieron lavaron en una solución al 5% (v/v) de Plant Preservative Mixture (PPM<sup>®</sup> Plant Cell Technology, Inc). El material se dejo secar sobre papel filtro estéril e inmediatamente, se sembraron en medio de cultivo adicionado con diferentes concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento.

---

### Combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal

Los fragmentos se sembraron en medio sólido MS (Murashige Skoog, 1962) conformado por sales inorgánicas y vitaminas, suplementadas con 2 mg/l de glicina, 100 mg/l, de myo-inositol, 30g/l de sacarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) como fuente de carbono y 1% de PPM. Se probaron diversos agentes antioxidantes como 1g/L de carbón activado, 0.1 g/l de polivinilpirrolidona (PVP) y 2 mg/L de ácido ascórbico. Los medios se suplementaron con diferentes combinaciones hormonales de ácido 2, 4 diclorofenoxiacético (2,4-D), y Kinetina (KIN) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). El pH de los medios fue ajustado a  $5.7 \pm 0.1$  con NaOH 1N y/o HCl 1 N previo a la adición de 0.3 g/L de Phytigel® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los frascos conteniendo 25 ml de medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120 °C y 1.2 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min.

Los cultivos se mantuvieron incubados a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 h y una intensidad luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  proporcionada por lámparas Ecolux (General Electric, USA) de 75 W. Los callos obtenidos fueron subcultivados cada 4 semanas realizándose un muestreo del peso fresco y seco (por liofilización).

**Tabla 9. Tratamientos hormonal propuestos para la obtención de callos de *Magnolia dealbata* Zucc**

2, 4-D: (mg/L)	Kinetina (mg/L)
0.0	0.5
0.5	0.5
0.5	1.0
0.5	1.5
0.5	2.0
1.0	0.5
1.0	1.0
1.0	1.5
1.0	2.0
1.5	0.5
1.5	1.0
1.5	1.5
1.5	2.0
2.0	0.5
2.0	1.0
2.0	1.5
2.0	2.0

---

### **Determinación de viabilidad celular.**

La viabilidad celular se midió mediante la técnica de diacetato de fluoresceína por microscopía de fluorescencia [126]. Esta prueba se realizó en todas las líneas celulares obtenidas tanto de callo como de las células en suspensión, así como en cada dos subcultivos. A un vial que contenían 3 ml de una solución al 0.5% de diacetato de fluoresceína y se le adicionó un fragmento de tejido vegetal. Se le realizaron 3 lavados con buffer de fosfatos a pH 7.0, para eliminar el exceso de fluoresceína. Al ser vistas bajo el microscopio, las células viables se observaron de un color verde fluorescente al microscopio. La viabilidad se determinó contando el número de células (células/por campo en una cámara de Neubauer y el resultado se expresó en porcentaje respecto al total observadas por campos. Su clasificación (meristemática y parenquimatosas) se realizó por medio de microscopía óptica (Axioskop, Carl Zeiss).

### **Estimación de crecimiento celular**

Para evaluar que tratamiento inducía mayor crecimiento celular, se determinó la diferencia de pesos entre el material celular fresco y el seco. Se realizó para la biomasa celular de callos, así como del agregado celular en las suspensiones.. Cada 30 días se tomaron tres muestras de 0.5 g de cada una de las líneas celulares. Las biomásas se pesaron en una balanza de precisión, determinándose el peso fresco para cada tratamiento. Este material, se seco por separado por liofilización (Free Zone, Labconco), se registró el peso seco por cada tratamiento para determinar por diferencia de pesos, el crecimiento celular final.

### **Identificación y cuantificación de honokiol y magnolol en las líneas celulares de callos**

Para identificar y cuantificar la presencia y variación del contenido de honokiol y magnolol en los callos y en las células en suspensión, respecto al tiempo de cultivo, se tomaron muestras de 250 mg (peso seco) de todas las líneas celulares al 4<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> y 8<sup>o</sup> subcultivo. La extracción química y la identificación por HPLC, se realizó de la misma manera que para las plantas recolectadas en campo.

---

## **Histología de Callos**

Para distinguir entre un proceso de organogénesis y una embriogénesis somática y tener la seguridad de que se está manejando una organogénesis; se procedió a realizar la histología celular de las líneas seleccionadas, para lo cual se utilizó la técnica de inclusión en parafina y la tinción seleccionada fue la de safranina y verde rápido, con la que se puede apreciar perfectamente la morfología de las células [127, 128].

### a) Preparación de las laminillas:

Cada laminilla se lava perfectamente y se les hizo un pre tratamiento con 3 amino propiltriétoxilano (APES), al 2% por 1 min. Después se les da un baño con metanol al 100% por 1 min y con agua desionizada por 1 min. Las laminillas se sacaron en estufa por 24 h.

### b) Fijación

El tejido se colocó en una solución de FAA (Formaldehído, ácido acético y etanol) por 24 horas y se deshidrató mediante el seguimiento de etanol que se muestra en la Tabla

### C) Deshidratación

Posteriormente se realizó la deshidratación a través de una serie gradual de solución agua-alcohol etílico-alcohol terbutílico (ATB), con concentraciones de 30%, 50%, 70%, 95%, 100% y ATB absoluto. Las muestras permanecieron 24 h en cada solución. La infiltración e inclusión se realizaron con paraplast puro por 24 h

### D) Infiltración

Del último cambio de ATB se desechó un poco, para sólo dejar el volumen que cubriera la muestra. Posteriormente, a intervalos de 1 hora, se agregaron hojuelas de paraplast puro colocando los viales tapados en la estufa a 60° C, hasta doblar el volumen inicial del último cambio de ATB puro. Después de haber alcanzado dicho volumen, se destaparon los viales colocándolos nuevamente dentro de la estufa para la completa evaporación del TBA, dejándolo de esta manera durante 24 h. Se vació el paraplast del vial y se reemplazó con paraplast puro fundido y se dejó en la estufa por un periodo de 48 h

---

### E) Inclusión

El material se incluyó en paraplast puro del mismo punto de fusión. Para hacer los bloques, se vertió paraplast fundido en recipientes de papel encerado (“cubos”) y se colocó la muestra de callo en el centro, dejándolos enfriar y solidificar. Los cubos se refrigeraron a 4°C por un intervalo de 2 a 3 h, después de las cuales se eliminó el exceso de paraplast y se montaron en una base de madera o portabloques, refrigerando nuevamente por 2 a 3 h (Sandoval, 2005).

### F) Obtención de secciones

Se obtuvieron cortes de 6, 8, 10  $\mu$  de espesor con un micrótopo. Los listones se colocaron en un baño de flotación (agua a 23-25 °C más una pizca de grenetina disuelta) hasta que estuvieron completamente extendidos, se recuperaron con un portaobjetos y se dejaron secar por un periodo de 24 h a temperatura ambiente

### G) Desparaplastificación y rehidratación

Se colocaron los portaobjetos en una canastilla y se introdujeron a la estufa (60 °C) por un periodo de 20 min para su desparaplastificación. Para rehidratar las muestras se colocaron en la canastilla en un tren de alcoholes graduales, dejándolos 10 min en cada solución (xileno puro, xileno-alcohol etílico 1:1, etanol absoluto, 96%, 70%, 50%, 30% y agua destilada)

### H) Tinción con safranina “O” – verde rápido

Las muestras se tiñeron con la técnica dicrómica safranina-verde rápido). Esta técnica de tinción utiliza dos colorantes selectivos para ciertos tejidos, proporcionando un buen contraste entre los distintos tipos celulares. La safranina tiñe estructuras nucleares, paredes celulares lignificadas, cutinizadas y suberizadas. El verde rápido es un colorante ácido que actúa sobre estructuras citoplasmáticas y paredes celulósicas. Las muestras rehidratadas se tiñeron con safranina durante 24 h, para posteriormente lavarlas con agua destilada. Posteriormente se sometieron a un tren de deshidratación de alcoholes graduales 30%, 50%, 70% y 96%, por un periodo de 5 min en cada uno. Se les agregó verde rápido durante 2 min, para después retirar el exceso de verde rápido con alcohol absoluto.

---

A continuación se les aplicó aceite de clavo por un periodo de 8 min para finalmente colocarlas en xileno por 5 min .

### I) Montaje

Las preparaciones obtenidas se montaron en resina sintética Permout y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Posterior al registro de las laminillas, éstas se analizaron y se capturaron imágenes digitales a través de un fotomicroscopio Carl Zeiss-Axioskop.

### **Establecimiento de Cultivo en Suspensión**

Para el establecimiento del cultivo de células en suspensión tipo-lote (batch), se transfirieron 5 g de fragmentos de callos friables de seis meses de edad a matraces Erlenmeyer blafeados de 250 ml y cerrados con un tapón de algodón y conteniendo 100 ml del medio de cultivo MS libre de agar, con 30 g/L. Para el establecimiento de los cultivos en suspensión y producción de los compuestos, cuatro diferentes tratamientos fueron ensayados para la producción de los compuestos. Se manejo una concentración constante (2mg/L) de Kin suplementado con una de las siguientes auxinas: 1 mg/L 2,4-D; 1 mg/L ácido naftalén acético (NAA) o 1 mg/L ácido indol acético (IAA). Los matraces se guardaron en oscuridad en un agitador G10 orbital a 100 rpm (New Brunswick Scientific Co) y se incubaron bajo las mismas condiciones descritas previamente. Se realizaron subcultivos cada 30 días usando un inoculo de 3 mL.

### **Cinética de Producción de Honokiol y Magnolol**

Para los estudios de cinética de crecimiento y producción de honokiol y magnolol, las variables medidas fueron peso seco (PS), peso fresco (PF), viabilidad celular, consumo de carbohidratos y producción de los compuestos bioactivos honokiol y magnolol. Todas las variables se midieron por triplicado cada 5 días durante 30 días de cultivo. El peso fresco fue medido como la biomasa filtrada, el peso seco fue determinado después de la liofilización y la viabilidad celular fue medida usando el método de diacetato de fluoresceína, anteriormente descrito.



---

## **Análisis de Carbohidratos**

Para el análisis de carbohidratos en el medio de cultivo, una muestra de 2mL se tomo de cada uno de los medios por separado y cada dos días. Las alícuotas se centrifugaron durante 10 min a 10, 000 rpm y el sobrenadante se filtró a través de acrodiscos (0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, Nalgene®, NY, USA). La presencia y concentración de sacarosa fue determinada por HPLC de acuerdo a procedimientos antes reportados por De Vries. [129]. Todos los datos fueron expresados como el promedio desviación estándar (DS) de tres experimentos (n=3). La significancia estadística fue evaluada utilizando una ANOVA de una vía seguida de una prueba múltiple de Duncan (DMRT).

## **Micropropagación**

### **Inducción de brotes adventicios y proliferación**

Los callos obtenidos en la fase anterior y que dieron positivos para la producción de honokiol y magnolol fueron utilizados en esta fase de inducción de plántulas. Los callos organogénicos de 8 semanas de edad fueron transferidos a 20 mL de medio MS con sales inorgánicas, vitaminas, 100 mg/l, de myo-inositol, 30g/l de sacarosa y 0.3 g/L de Phytigel®. Los medios fueron suplementados con diferentes concentraciones de citocininas como N<sup>6</sup>-Benzyladenine (BA), 2-Isopentenyladenina (2iP), Kin y Tidiazuron (TDZ) (Tabla 11). Múltiples brotes fueron obtenidos después de 15 días y los subcultivos se realizaron cada 30 días. Durante el proceso de regeneración de plántulas, el proceso oxidativo se hizo presente y para controlar este exudado de fenoles, se evaluaron diferentes concentraciones de antioxidantes: carbón activado (100-300 mg.L<sup>-1</sup>) polivinilpirrolidona (PVP) (10-30 mg. L<sup>-1</sup>) y ácido ascórbico (10-30 mg.L<sup>-1</sup>) (todos, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los cultivos fueron incubados en una cámara incubadora (Barnstead, Lab-Line) con un fotoperiodo de 12 h.

**Tabla 10. Combinaciones de reguladores de crecimiento propuesta, para la obtención de multibrotación de *Magnolia dealbata* Zucc**

Regulador de crecimiento*	Concentración (mg.L <sup>-1</sup> )
BA	1.0
	1.5
	2.0
	2.5
	3.0
2 iP	1.0
	1.5
	2.0
	2.5
	3.0
Kn	1.0
	1.5
	2.0
	2.5
	3.0
TDZ	1.0
	1.5
	2.0
	2.5
	3.0

### **Inducción de raíces y aclimatación de plántulas.**

Los brotes obtenidos, fueron individualizados y transferidos a medio de cultivo MS suplementado con una combinación de hormonas diseñadas para inducir raíces con ácido-indol 3-acético (AIA), ácido-indol-3-butírico (AIB) y ácido- $\alpha$ -naftalenacético (ANA) a dos diferentes concentraciones (Tabla 12). La brotes de aproximadamente 3 cm y que desarrollaron raíces adventicias fueron transferidas a botes conteniendo arena, tierra y vermiculita a una proporción 1:1:1 y fueron completamente cubiertas por bolsas plásticas por 1½ semanas para mantener una alta humedad. Fueron progresivamente removidas para adaptarlas a las condiciones ambientales normales a cielo abierto..

### **Determinación de honokiol y magnolol en plántulas micropropagadas**

Se emplearon plantas de *Magnolia dealabata* de origen *in vitro* para la detección y cuantificación de honokiol y magnolol. Plantas con una talla aproximada de 20 cm y con un tiempo de desarrollo en invernadero de 6 meses, fue lavado con agua corriente, se secó a temperatura ambiente y se molieron finamente cada una de las partes. El proceso de extracción

---

química y de detección de honokiol y magnolol se realizó mediante HPLC siguiendo la metodología antes mencionada.

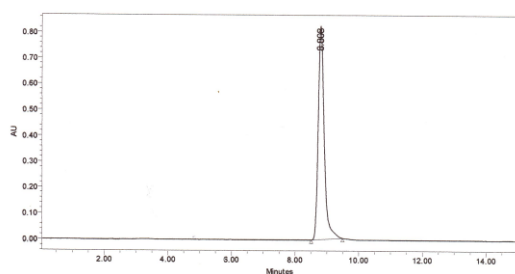
**Tabla 11. Combinaciones de reguladores de crecimiento propuestas, para inducir rizogénesis en plántulas de *Magnolia dealbata* Zucc**

Auxinas (mg.L <sup>-1</sup> )
IAA 0.5
IAA 1.0
IBA 0.5
IBA 1.0
NAA 0.5
NAA 1.0

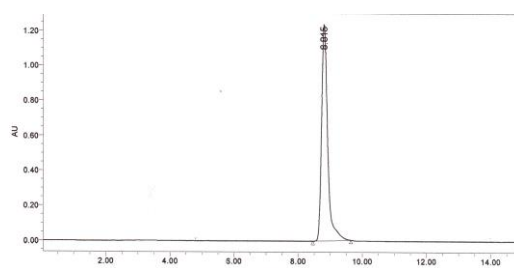
---

## 7. RESULTADOS

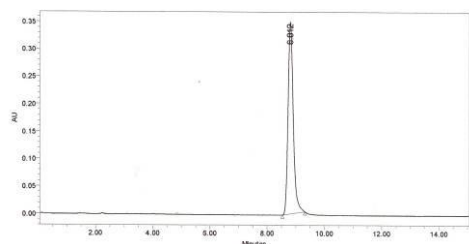
Se logró estandarizar la técnica de HPLC propuesta para la identificación de los dos metabolitos. Se corrieron cada uno de los estándares por separado en alícuotas de 5, 10 y 15ul y después se estableció la ecuación de la recta para cada uno de ellos. El honokiol se detectó a los 8 min, así como su espectro UV, (Figura.7), el cual mostro dos picos máximos de absorbancia a los 255.8 nm y a los 292.4 nm (Fig 9-a). El magnolol (Figura 8) tuvo un tiempo de retención de 12.3 min y su espectro UV tuvo una absorbancia máxima a de 290 nm (Figura 9-b). Todas las corridas y los respectivos espectros UV se guardaron en la biblioteca del cromatógrafo para efectos de comparar resultados de plantas y células.



5 µl



10µl



15µl

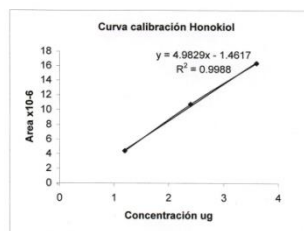
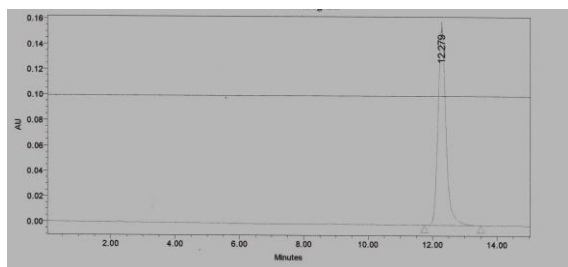
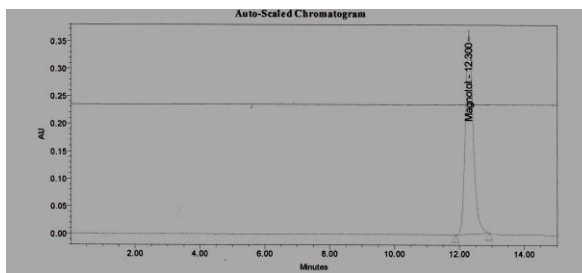


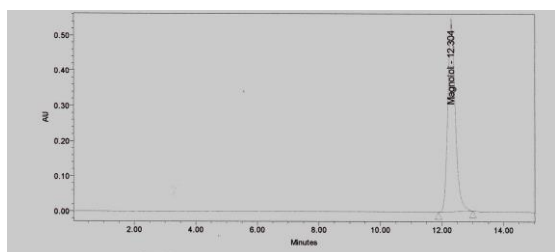
Figura. 6. Cromatogramas de los picos de retención de honokiol a los 5, 10 y 15 µl y la ecuación de la recta correspondiente



5 µl



10µl



15µl

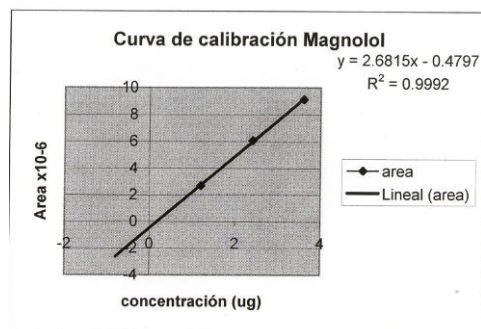
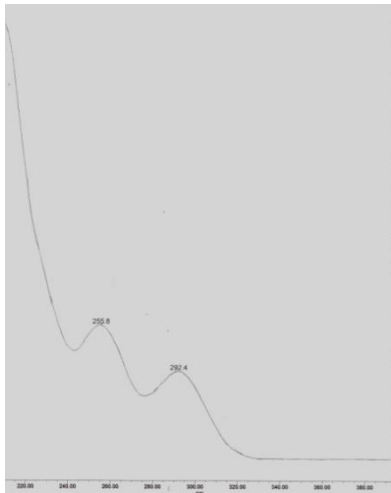
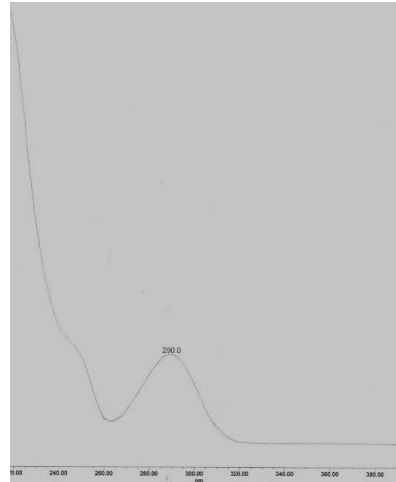


Fig.7. Cromatogramas de los picos de retención de magnolol a los 5, 10 y 15 µl y su ecuación de la recta



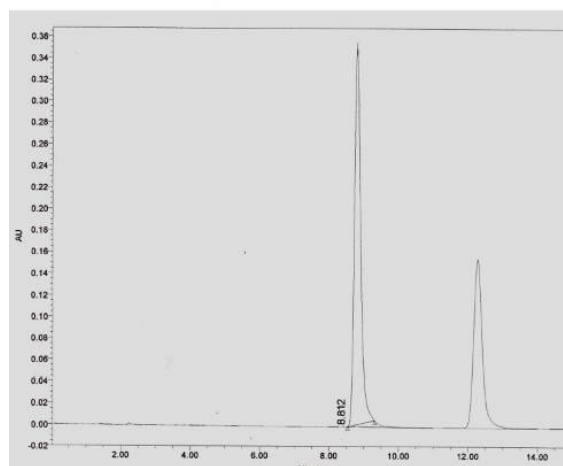
(a)



(b)

**Figura. 8. Espectros ultravioleta del (a) honokiol y (b) magnolol**

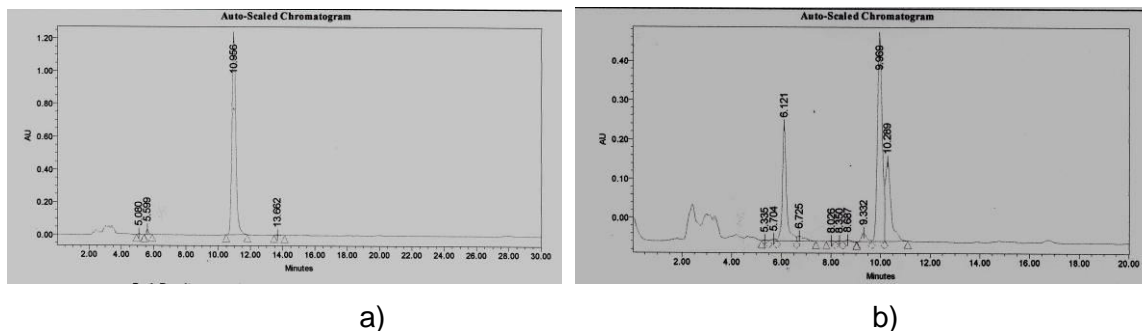
Para determinar que el mismo sistema de HPLC era el óptimo para la detección de ambos compuestos en una misma corrida cromatográfica, los estándares de honokiol y magnolol se mezclaron en metanol y se corrieron juntos en el sistema de HPLC propuesto. Se determinó que el sistema de elución era idóneo ya que ambos compuestos se separaban muy bien y no había traslape entre ellos (Fig. 10). Así mismo, se corroboraron determinaron los espectros UV de honokiol y magnolol de esta corrida



**Fig. 9. Cromatograma de estándares de honokiol (8.8 min) y magnolol (12.3 min) en la misma corrida de HPLC.**

Una vez establecido el sistema de HPLC, se procedió a realizar los extractos de cada una de las partes de las especies colectadas. Existían diversos reportes donde el procedimiento lo llevaban a cabo en extractos acuosos a temperatura ambiente. Se corrieron de esa manera y no se pudieron detectar los metabolitos ni siquiera en *Magnolia obovata* que era el control positivo. Por lo tanto, se dedujo que el método de extracción no era el adecuado o que existía un problema de muy bajas concentraciones de los compuestos en estudio. Como primer recurso, se abordó el cambio de solvente. Se pesaron 2 g de cada una de las partes de las especies y se extrajeron bajo reflujo en aparato soxhlet con metanol grado reactivo durante 6 h por cada muestra. Después se secaron, se reconstituyeron con metanol grado HPLC y se inyectaron las muestras, donde las de *Magnolia obovata* resultaron positivas para honokiol (8.74 min) y magnolol (12.16 min), lo cual nos demostró que el sistema de extracción seleccionado había sido el correcto.

Todas las partes colectadas de *Talauma mexicana* y *Magnolia grandiflora*, resultaron negativas a la detección de ambos compuestos (Fig. 11). En cambio, todas las partes de la planta *Magnolia dealbata* Zucc resultaron positivas para honokiol y magnolol.



**Figura. 10. Cromatogramas de extracto de corteza de a) *Talauma mexicana* y b) *Magnolia grandiflora* donde no hay presencia de honokiol y magnolol**

En la corteza de *Magnolia dealbata* Zucc la detección de honokiol se efectuó al minuto 8.62 de la corrida cromatográfica (Figura 12-a), el magnolol a los 11.9 min y el partenólido a los 11.62 min. Se corroboraron tr y espectro uv (Figura 12-b)

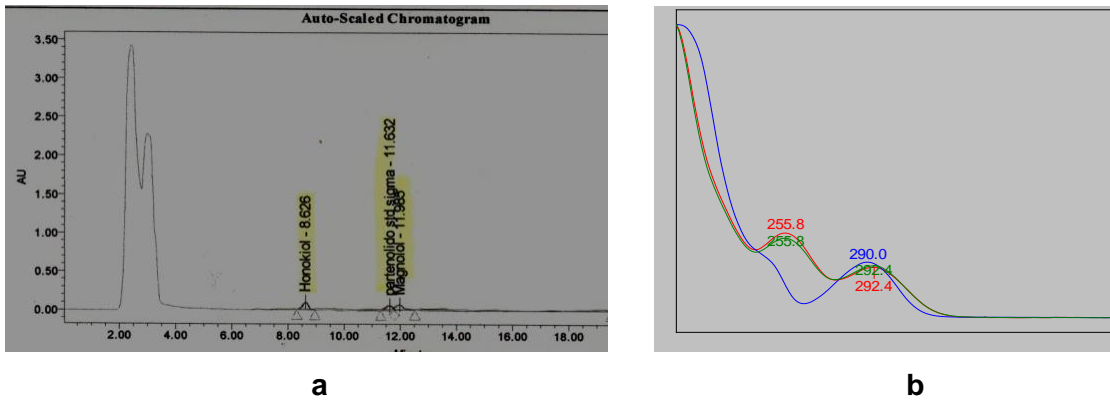


Figura. 11. Cromatograma del extracto metanólico de corteza de *Magnolia dealbata* Zucc se demuestra la presencia de honokiol (8.6 min), partenólido (11.6min) y magnolol (11.9 min) (a), así como su espectro UV (b).

En los extractos de hojas y semillas de *Magnolia dealbata* Zucc, se detectó y cuantifico la presencia de honokiol y magnolol pero no del partenólido (Fig. 13), el cual sólo se detectó en la corteza de esta planta .

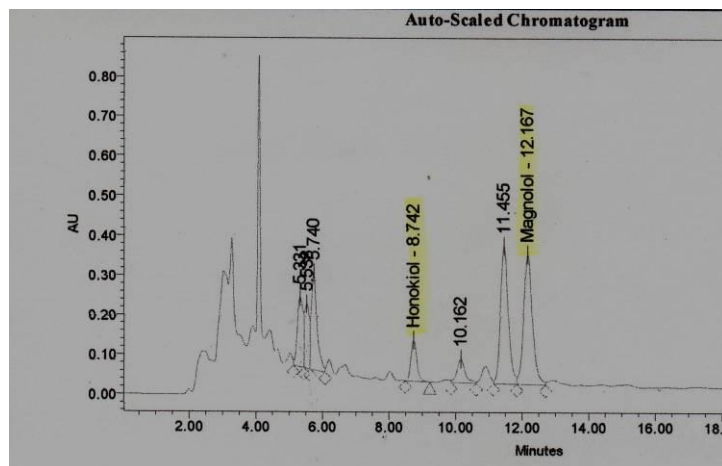


Figura. 11. Cromatograma del extracto metanólico de hojas de *Magnolia dealbata* Zucc que muestra la presencia de honokiol (8.7 min) y magnolol (12.1 min).



Las concentraciones de honokiol y magnolol detectadas en *Magnolia dealbata*, fueron mayores en la corteza que en las semillas y las hojas, además de que la corteza presentaba el partenólido (Tabla 10).

**Tabla. 12. Identificación y cuantificación de honokiol y magnolol en plantas silvestres de *Magnolia dealbata* Zucc.**

<i>Magnolia dealbata</i>	Honokiol	Magnolol	Partenólido
Corteza	4.638 mg/g hojas	8.44 mg/g hojas	negativo
Semillas	1.345 mg/g semillas	2.1 mg/g de semillas	negativo
Hojas	2.75 mg/g corteza	3.5 mg/g corteza	positivo
<i>Magnolia obovata</i>			
Semillas	2.743 mg/g semilla	1.09 mg/g semilla	negativo

Es así como analizando, los resultados obtenidos en la detección de los dos metabolitos bioactivos, se tomó la decisión de elegir a *Magnolia dealbata* Zucc. como la fuente de explantes para iniciar el cultivo celular y la futura producción de honokiol y magnolol. Los resultados obtenidos en nuestra investigación sobre la frecuencia en la inducción de callos a partir de hojas, brotes, hipocótilos y cotiledones fueron dependientes de la concentración de 2,4-D y de la incorporación de Kin.

En los medios de cultivo con las concentraciones similares entre la auxina y la citocinina se lograron generar la mayor cantidad de callos a partir de los 60 d de cultivo (Figura 14). Se sembraron diferentes tipos de explantes, pero fue en el cultivo de hojas jóvenes donde se obtuvieron los mejores resultados de obtención y producción de callos (Tabla 12)

Los callos cuyo explante origen fueron hojas jóvenes y que se manejaron con los fitoreguladores 2,4,D y CN, proliferaron a los 60 d con una buena friabilidad, requisito prácticamente indispensable para iniciar los cultivos en suspensión, además de una viabilidad del 100% (Figura 14), pero a los 50 d de cultivo se había presentado oxidación celular y se probaron diferentes tipos y concentraciones de antioxidantes.

---

Esta oxidación, se logró controlar con la adición de 1 g/L de carbón activado, el cual logro controlar la generación de fenoles en los callos, pero solamente en aquellos generados a partir de fracciones de hoja. Los callos obtenidos de hipocótilos y cotiledones decrecieron a partir del tercer mes y presentaron una oxidación difícil de controlar.

Desde un inicio, su crecimiento fue muy lento pero se pudieron mantener hasta el tercer mes, debido al manejo de antioxidantes. En el cuarto mes, si crecimiento decayó completamente y las pruebas de viabilidad resultaron negativas a partir de la semana 10 (Fig. 15). La oxidación fue una limitante determinante en la obtención de callos a partir de otros explantes diferentes al de la hoja. .

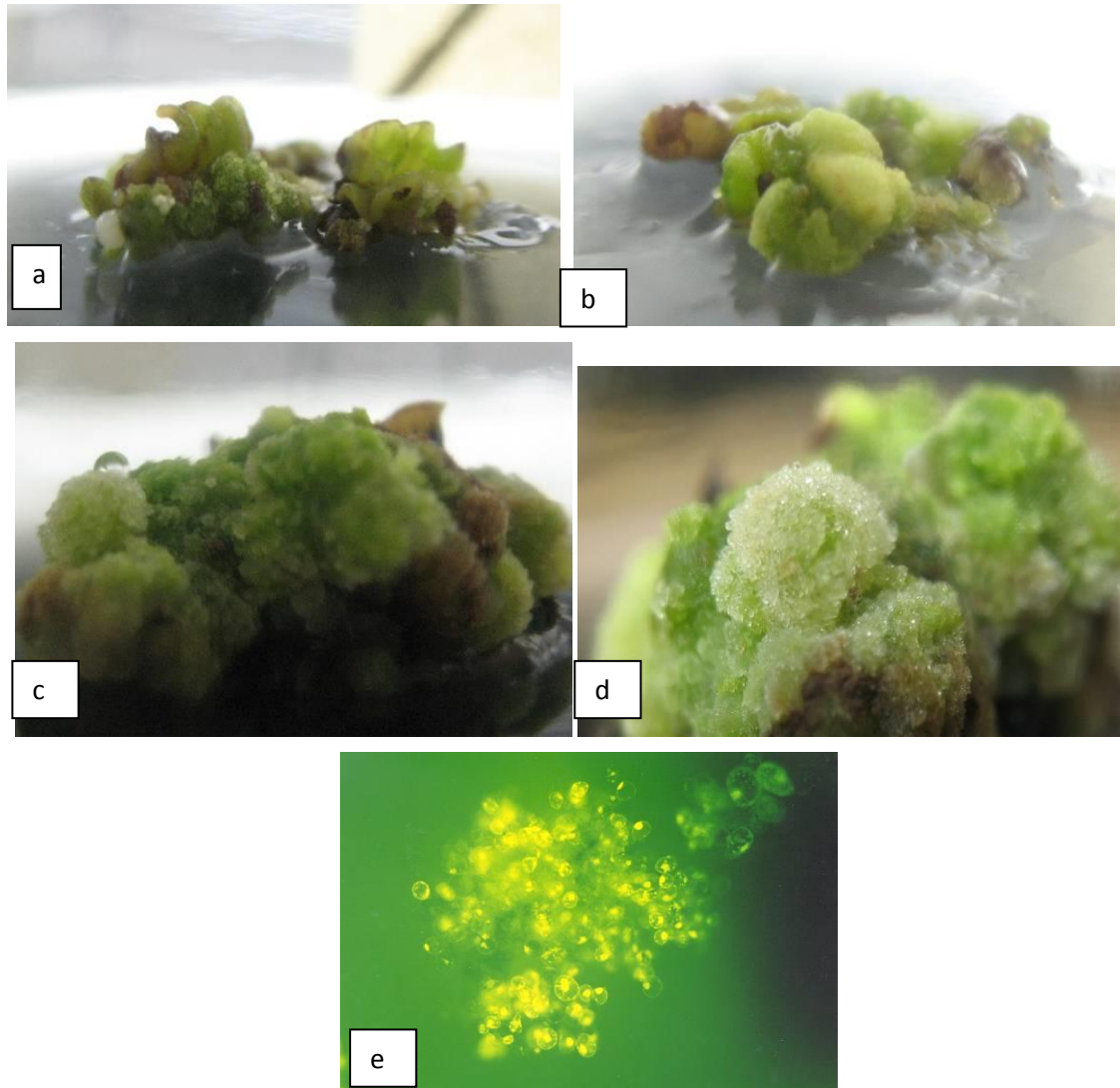
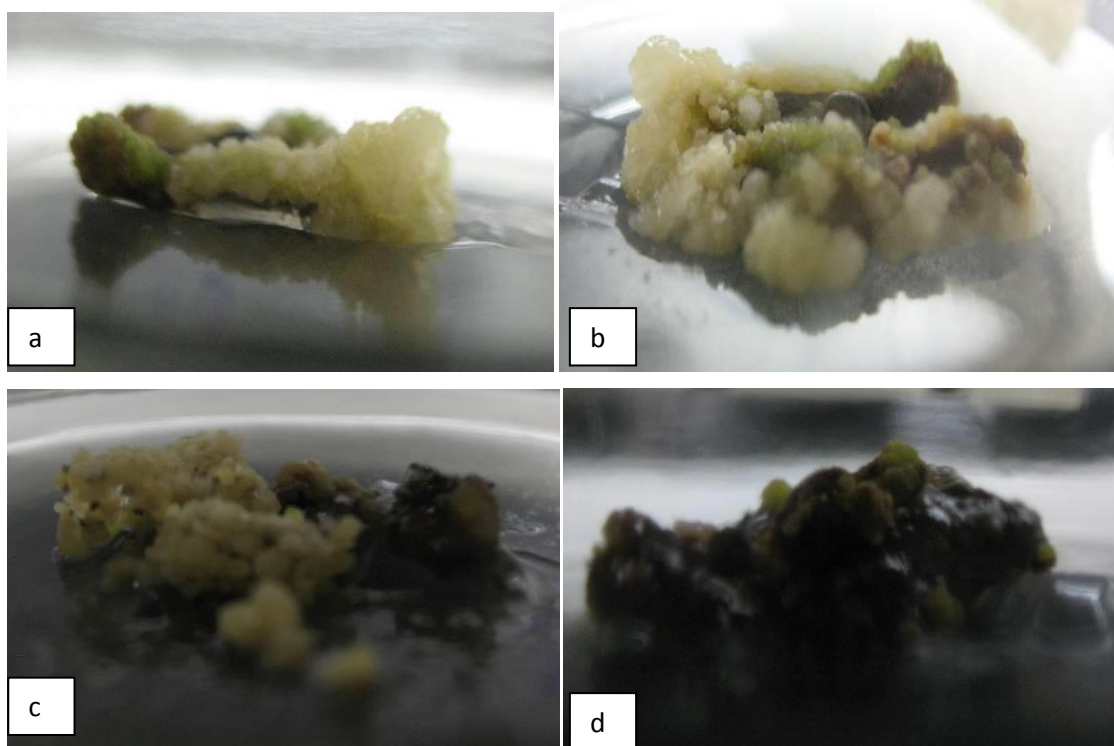


Figura. 12. Callos de *Magnolia dealbata* Zucc a partir de explantes de hoja a los 30 días (a), a los 45 (b), a los 60 (c) y a los 90 días (d). También se muestra la prueba de viabilidad con fluoresceína a 10x (e).



**Figura. 13. Callos de *Magnolia dealbata* Zucc a partir de diferentes tipos de explantes: hipocótilos (a) y cotiledones (b) a los 30 días así como a los 90 días (c y d), en los que no se logró detener la oxidación celular.**

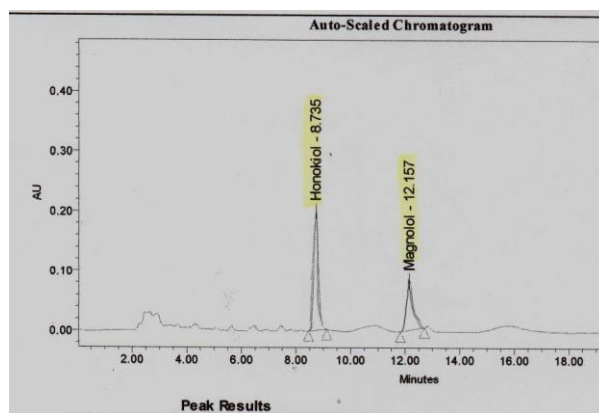
El nivel de inducción de callos varío dependiendo de la concentración de los reguladores de crecimiento. El crecimiento celular máximo se presento en medio MS suplementado con (1.5 mg/L) 2,4-D y (1.5 mg/L) Kin (Tabla 12). Es así como las hojas inmaduras fueron la mejor fuente de explantes sobretodo, al ser cultivadas en MS con diferentes niveles y combinaciones de 2,4-D y Kin mostrando las primeras señales de indiferenciación dentro de los 15 a 25 días

**Tabla 13. Efecto del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético y Kinetina sobre la formación de callo a partir de explantes de hoja de *Magnolia dealbata* Zucc.**

2,4-D: (mg.L <sup>-1</sup> )	Kinetina (mg.L <sup>-1</sup> )	Cantidad de callos	%Cultivo de callos*
0.0	0.5	0	0.0
0.5	0.5	0	0.0
0.5	1.0	+	20
0.5	1.5	+	28
0.5	2.0	0	0.0
1.0	0.5	+	20
1.0	1.0	++	45
1.0	1.5	++	49
1.0	2.0	+	21
1.5	0.5	+	19
1.5	1.0	+++	70
1.5	1.5	+++	95
1.5	2.0	++	81
2.0	0.5	++	74
2.0	1.0	++	71
2.0	1.5	+	35
2.0	2.0	+	40

\*\*8 semanas de cultivo

Al correrse por HPLC, muestras de los callos de todas las líneas celulares viables, solamente la línea celular de callo obtenida del tratamiento con 2,4-D (1 mg/L) en combinación con Kin (1 mg/L) influenció la síntesis de honokiol y magnolol (Fig. 16). La detección de honokiol ocurrió en el minuto 8.73 y del magnolol en el 12.15.



**Fig. 14. Detección de honokiol (8.7 min) y magnolol (12.1 min) en callos FA1 obtenidos a partir de explantes de hojas de *Magnolia dealbata* Zucc, cultivadas en medio MS adicionado con (1 mg/l) 2,4-D: (1 mg/l) Kin**

En cuanto a rendimientos, se produjeron 2.3 mg/g de honokiol y 5.9 mg/g de magnolol A esta línea celular de callos se designo como FA1 (2,4-D 1 mg/L: Kin 1 mg/L), en la que el rendimiento de honokiol equivale al 85% y el de magnolol al 168% respecto a lo que produjeron las hojas de los especímenes recolectados en campo (Tabla 11).

**Tabla 14. Concentraciones de honokiol y magnolol en plantas silvestres y cultivos *in vitro* de *Magnolia dealbata* Zucc.**

<i>Magnolia dealbata</i>	Honokiol	Magnolol	Partenólido
Corteza	4.638 mg/g hojas	8.44 mg/g hojas	negativo
Semillas	1.345 mg/g semillas	2.1 mg7g de semillas	negativo
Hojas	2.75 mg/g corteza	3.5 mg/g corteza	positivo
Callos	2.3 mg/g callo	5.9 mg/g callo	negativo

A partir de esta línea celular de callo FA1, se establecieron los cultivos de células en suspensión de *Magnolia dealbata* Zucc, debido a que estas células presentaron una buena friabilidad, viabilidad, y sobretodo, produjeron mayor cantidad de honokiol y magnolol respecto a los tratamientos con ANA o AIA, los cuales solo produjeron cantidades trazas de metabolitos, además de que no se les logró controlar la oxidación Es por ello, que se seleccionó al medio de cultivo FA1 para el establecimiento de un cultivo en suspensión tipo batch de *Magnolia dealbata* Zucc.

Los cultivos en suspensión de *Magnolia dealbata* se lograron establecer con un buen crecimiento celular y viabilidad. Se obtuvo una suspensión celular fina y homogénea. La suspensión celular mostro una acumulación de biomasa estable y continua después de 10 subcultivos. En cada ciclo de cultivo de aproximadamente 30 días, las células crecieron lentamente durante el periodo inicial de cultivo hasta los 6 días. Después, la biomasa se acumula rápidamente, con valores de 129 g/L en peso fresco y 14.8 g/L en peso seco sobre el día 10. La producción de honokiol y magnolol incrementa muy lentamente al inicio del cultivo pero se eleva significativamente el sexto día. La producción de estos metabolitos, empieza a decrecer al acercarse el día 30, para el cultivo completo de 30 días. En el sexto día la producción de los metabolitos fue de 8.03 mg/g de honokiol y de 13.41 mg/g de magnolol, aunque ambos metabolitos exhiben un pico de acumulación constante a través del periodo de

cultivo, el cual pasa la fase estacionaria después de 10 días siempre al mayor nivel del carbohidrato (28 g/L) remanente en el medio. La producción de ambos compuestos no estuvo asociada al crecimiento, como evidencia la relativa acumulación baja de los productos que ocurre previo a la concentración celular de 14.8 g/L (peso seco). A esta línea celular se le llamo FA2.

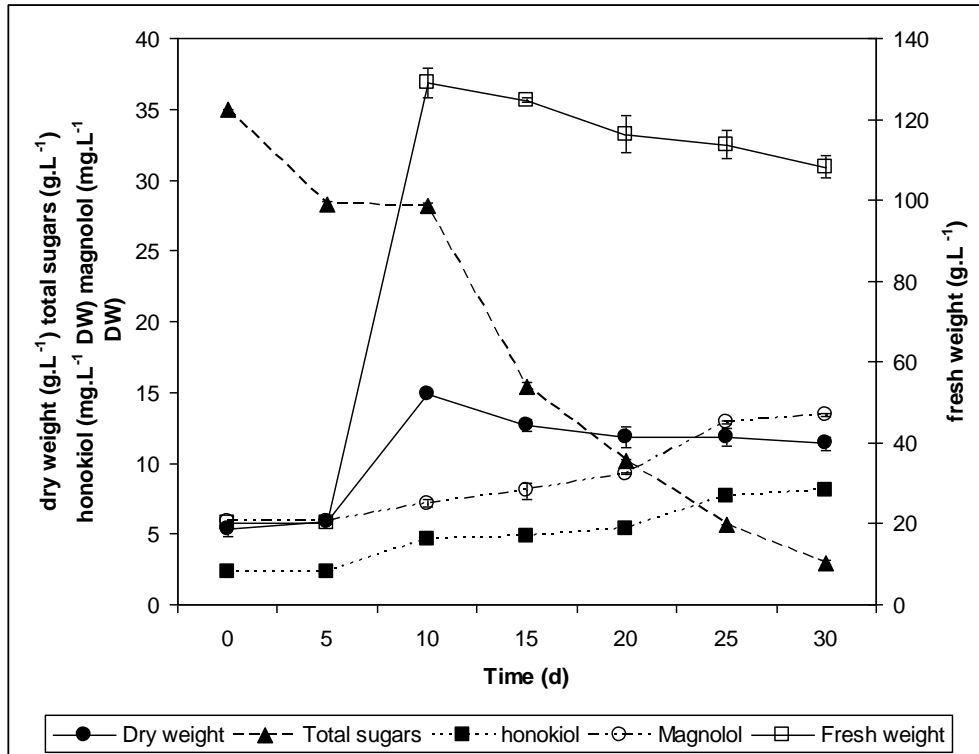


Figura 15. Crecimiento y acumulación de honokiol y magnolol y consumo de la fuente de carbono por células FA2 en suspensión: (□) peso fresco, (●) peso seco, (▲) azúcares totales (■) honokiol and (○) magnolol.

En el cultivo piloto se mostró que las células en suspensión FA2 de *Magnolia dealbata* Zucc pueden producir 8.0 mg/g de honokiol y 13.4 mg/g de magnolol. Estos rendimientos, equivalen al 300% y 382% respectivamente, de los obtenidos de plantas recolectadas en el campo (Tabla 11)

**Tabla 15. Concentraciones de honokiol y magnolol en plantas silvestres y cultivos *in vitro* de *Magnolia dealbata* Zucc.**

<i>Magnolia dealbata</i>	Honokiol	Magnolol	Partenólido
Corteza	4.638 mg/g hojas	8.44 mg/g hojas	negativo
Semillas	1.345 mg/g semillas	2.1 mg/g de semillas	negativo
Hojas	2.75 mg/g corteza	3.5 mg/g corteza	positivo
Callos	2.3 mg/g callo	5.9 mg/g callo	negativo
Células/suspensión	8.0 mg/ g células	13.4 mg/g células	Negativo

Para el establecimiento de la micropropagación, se utilizaron los callos FA1, los cuales, se subcultivaron cada quince días, durante dos meses. Buscando la formación de la multibrotación, estas líneas se subcultivaron en diversos tipos y concentraciones de citocininas para inducir la organogénesis indirecta (Tabla 13).

**Tabla 16. Efecto de las cintocininas sobre la regeneración de callos de *Magnolia dealbata* Zucc.**

Regulador de crecimiento*	Concentración (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de brotes	Largo del brote (cm)	%de brotes por cultivo	
BA	1.0	2.5 ± 1.1	1.20 ± 0.5	14	
	2	1.5	3.6 ± 0.9	0.80 ± 0.2	18
	2.0	5.1 ± 2.0	0.96 ± 0.5	25	
	2.5	5.4 ± 1.7	0.90 ± 0.6	28	
	3.0	4.5 ± 1.0	0.75 ± 0.5	22	
2 iP	1.0	1.8 ± 0.7	0.62 ± 0.2	9	
	1.5	2.0 ± 1.0	0.41 ± 0.2	14	
	2.0	2.5 ± 0.7	0.52 ± 0.2	12	
	2.5	2.9 ± 1.2	0.55 ± 0.2	10	
	3.0	3.5 ± 0.8	0.60 ± 0.2	12	
Kn	1.0	5.2 ± 1.6	1.45 ± 0.6	35	
	1.5	6.2 ± 1.6	1.34 ± 0.5	46	
	2.0	6.8 ± 1.8	1.20 ± 0.2	48	
	2.5	4.5 ± 1.8	1.10 ± 0.2	35	
	3.0	2.4 ± 1.4	0.95 ± 0.3	20	
TDZ	1.0	25.5 ± 3.6	1.89 ± 0.7	85	
	1.5	32.8 ± 2.2	2.50 ± 0.4	96	
	2.0	22.6 ± 1.9	1.84 ± 0.5	81	
	2.5	11.8 ± 1.0	1.26 ± 0.2	75	
	3.0	6.6 ± 0.9	0.98 ± 0.2	72	

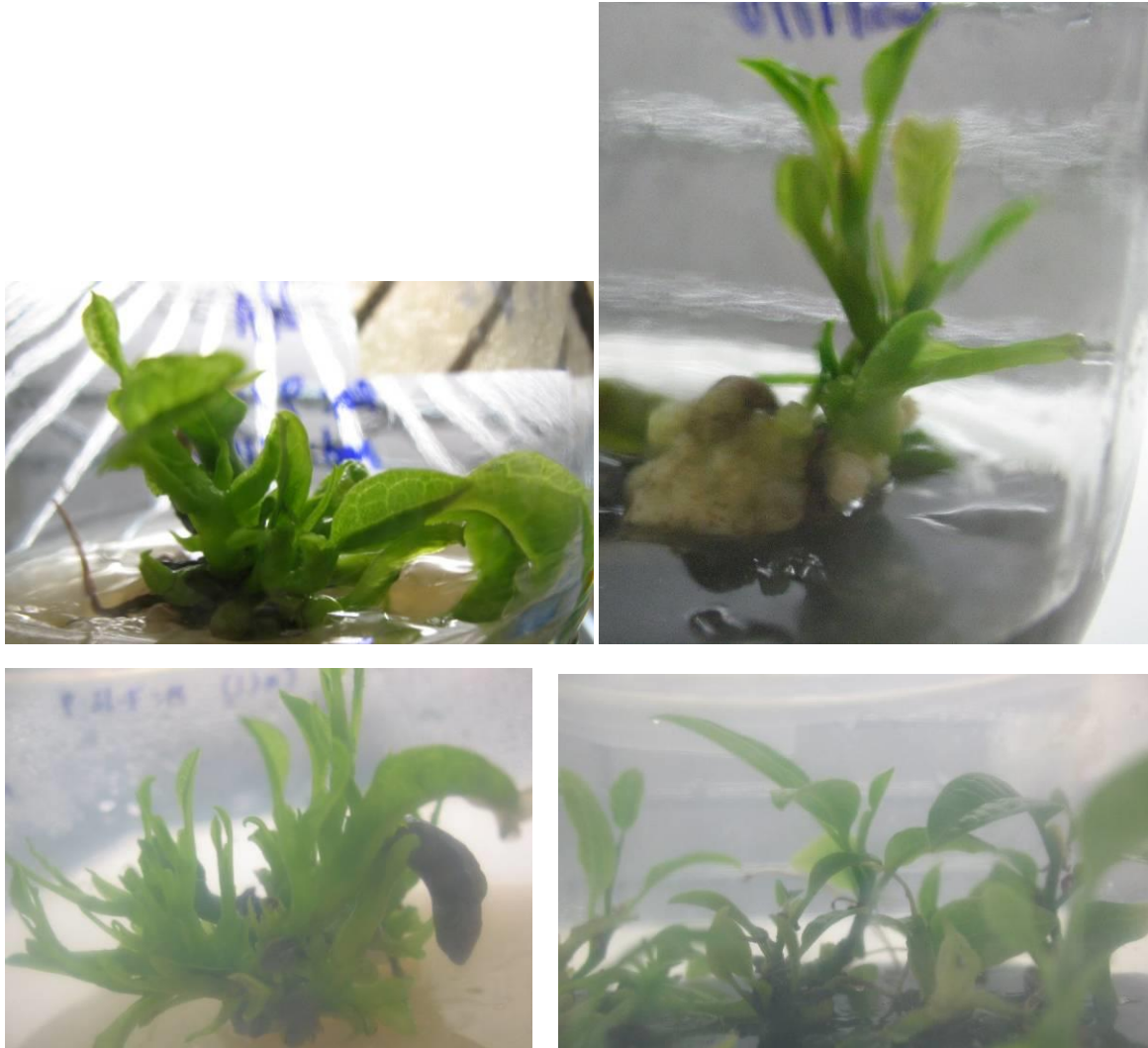
\*Medias de 5 replicaciones de cada tratamiento, seguido de la desviación estándar

La regeneración de brotes adventicios y su proliferación a partir de callos se observó en general en mayor proporción en los medios MS suplementados con TDZ. El tratamiento con 1.5 mg/L de TDZ en comparación presentó el mayor índice de formación de brotes con 32.8 brotes y de mayor longitud (Figura 18). Fue en este tratamiento donde se la mejor respuesta donde todos



---

los explantes presentaron crecimiento de meristemo y formación de hojas, así como el máximo desarrollo de yemas. Sin embargo, a concentraciones mayores de 2 mg/L, se suprimió casi en un 22% la formación de brotes. Los tratamientos que contenían 2iP, Kin o BA, presentaron muy baja y casi nula respuesta morfogénica y la sobrevivencia de los explantes fue muy baja. El crecimiento fue muy lento y la oxidación alta, aún con la presencia de carbón activado en el medio de cultivo.



**Figura. 16. Generación de brotes adventicios de *Magnolia dealbata* Zucc. Medio MS con 1.5 mg/L de TDZ.**

Es así que solo a los brotes del tratamiento TDZ 1.5 mg/L, se les transfirió a tratamiento experimentales para la inducción de raíz. Se probaron los reguladores de crecimiento AIA, AIB y ANA. Se presentaron diferencias en el número de raíces formadas y la longitud de las mismas. Para AIA los resultados fueron casi el doble que para AIB. El tratamiento que contenía. El medio que contenía 0.5 mg/L de AIA produjo 4 raíces por brote con una longitud de 3.95 cm  $\pm$  la mayor cantidad de raíces por cultivo (Figura 19 y Tabla 14).

Las plántulas enraizadas fueron cultivadas en vasos de unicel con vermiculita, se cubrieron con bolsas plásticas para guardar el máximo contenido de humedad. Después de al. Después de 2 meses se pasaron a un invernadero en bolsas negras. La aclimatación a tierra resulto en un 100% de sobrevivencia (Figura 20). Las plantas con una talla aproximada de 20 cm y con un tiempo de desarrollo en invernadero de 6 meses, fue lavado con agua corriente, se seco a temperatura ambiente y se molieron

**Tabla 17. Efecto de las auxinas sobre el enraizamiento de *Magnolia dealbata* Zucc y su contenido de honokiol y magnolol**

Auxinas (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de raíces <sup>¶</sup>	Largo de raíz (cm)	Raíces de honokiol (mg.g <sup>-1</sup> DW) ♦	Raíces de magnolol (mg.g <sup>-1</sup> DW)	Hojas de honokiol (mg.g <sup>-1</sup> DW)	Hojas de magnolol (mg.g <sup>-1</sup> DW)
AIA 0.5	4.00 $\pm$ 2.34	3.95 $\pm$ 0.74	3.50 $\pm$ 0.08	3.87 $\pm$ 0.21	2.50 $\pm$ 0.24	3.15 $\pm$ 0.45
AIA 1.0	3.15 $\pm$ 2.85	2.65 $\pm$ 0.64	3.83 $\pm$ 0.92	4.12 $\pm$ 0.81	3.25 $\pm$ 0.10	3.90 $\pm$ 0.66
AIB 0.5	2.24 $\pm$ 2.61	4.81 $\pm$ 2.17	3.10 $\pm$ 0.56	3.25 $\pm$ 0.38	2.10 $\pm$ 0.49	3.00 $\pm$ 0.50
AIB 1.0	2.38 $\pm$ 2.14	2.50 $\pm$ 0.99	2.14 $\pm$ 0.72	3.82 $\pm$ 0.33	2.00 $\pm$ 0.10	2.80 $\pm$ 0.17
ANA 0.5	3.80 $\pm$ 4.18	2.50 $\pm$ 0.68	2.97 $\pm$ 0.04	3.25 $\pm$ 0.23	2.18 $\pm$ 0.01	2.91 $\pm$ 0.32
ANA 1.0	3.65 $\pm$ 4.27	2.25 $\pm$ 1.15	3.11 $\pm$ 0.09	3.10 $\pm$ 0.14	2.75 $\pm$ 0.60	3.14 $\pm$ 0.18

.<sup>¶</sup>El número de raíces es un promedio del número de raíces producidas en 10 o más cultivos. Cada ejemplo fue analizado por HPLC en tres corridas consecutivas.

♦ El contenido de honokiol y magnolol es un promedio de cuatro cultivos extraídos con metanol.



Figura 17. Plantas de *Magnolia dealbata* Zucc en medio MS, suplementado con 0.5 mg/L de AIA que presentan enraizamiento.



Figura 18. Plantas de *Magnolia dealbata* Zucc *in vitro* aclimatadas a condiciones ambientales naturales.

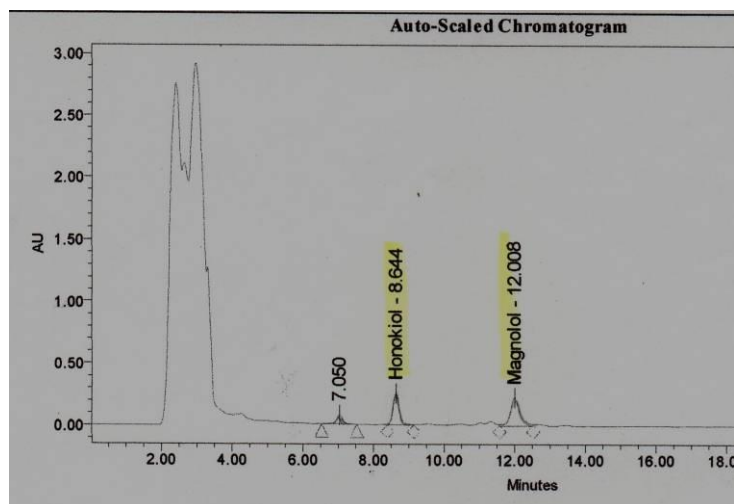
Se realizó la detección y cuantificación de los dos metabolitos bioactivos en hojas y raíces de las plántulas adaptadas al medio ambiente. Se compararon los espectros UV de los estándares previamente corridos. La tabla 14 muestra el contenido de honokiol y magnolol en raíces y hojas. Las plantas en medio MS suplementado con 1.0 g/L de AIA mostraron la producción de las mayores cantidades de los metabolitos en hojas y raíces (Figura 21).

**Tabla 18.** Efecto de las auxinas sobre el enraizamiento de *Magnolia dealbata* Zucc y su contenido de honokiol y magnolol

Auxinas (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de raíces <sup>ψ</sup>	Largo de raíz (cm)	Raíces :honokiol (mg.g <sup>-1</sup> DW) ♦	Raíces:magnolol (mg.g <sup>-1</sup> DW)	Hojas: honokiol (mg.g <sup>-1</sup> DW)	Hojas :magnolol (mg.g <sup>-1</sup> DW)
IAA 0.5	4.00 ± 2.34	3.95 ± 0.74	3.50 ± 0.08	3.87 ± 0.21	2.50 ± 0.24	3.15 ± 0.45
IAA 1.0	3.15 ± 2.85	2.65 ± 0.64	3.83 ± 0.92	4.12 ± 0.81	3.25 ± 0.10	3.90 ± 0.66
IBA 0.5	2.24 ± 2.61	4.81 ± 2.17	3.10 ± 0.56	3.25 ± 0.38	2.10 ± 0.49	3.00 ± 0.50
IBA 1.0	2.38 ± 2.14	2.50 ± 0.99	2.14 ± 0.72	3.82 ± 0.33	2.00 ± 0.10	2.80 ± 0.17
NAA 0.5	3.80 ± 4.18	2.50 ± 0.68	2.97 ± 0.04	3.25 ± 0.23	2.18 ± 0.01	2.91 ± 0.32
NAA 1.0	3.65 ± 4.27	2.25 ± 1.15	3.11 ± 0.09	3.10 ± 0.14	2.75 ± 0.60	3.14 ± 0.18

<sup>ψ</sup>El número de raíces es una mean de raíces producidas en 10 o más cultivos. Cada ejemplo fue analizado por HPLC en tres corridas consecutivas.

♦ El contenido de honokiol y magnolol es una mean de cuatro cultivos extraídos con metanol



**Figura 19.** Cromatograma del extracto metanólico de hojas de *Magnolia dealbata* Zucc micropropagadas, en donde se demuestra la presencia de honokiol (8.6 min) y magnolol (12.0 min).

---

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una de las fases más difíciles del cultivo *in vitro* es el establecimiento de cultivos asépticos sobretodo a partir de explantes obtenidos de campo. En este trabajo de investigación el factor de contaminación por microorganismos patógenos no fue determinante. El sistema de desinfección de los explantes fue efectivo, sobretodo, con la adición de PPM, tanto en el lavado como en la formulación del medio y se convirtió en un factor determinante en el establecimiento de cultivos libres de patógenos. Aquellos cultivos a los cuales no se les lavo ni se les agrego PPM, no se pudieron lograr debido a la contaminación. Sin embargo la necrosis celular, resultado de la oxidación inducida por la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos sí fue determinante en el establecimiento de cultivos de callos. En muchas combinaciones de reguladores de crecimiento, la oxidación no se pudo controlar a pesar de la adición de diferentes tipos de agentes antioxidantes tratando de controlar y/o inhibir la liberación de fenoles.

Gracias al control de ambos aspectos, contaminación y fenolización, se pudo establecer el cultivo de callos de *Magnolia dealbata*, detectándose la producción de honokiol y magnolol.

Así mismo, se logró establecer el cultivo de células de *Magnolia dealbata* en suspensión a partir de los callos friables de FA1 los cuales son productores de los metabolitos.

Se logró mantener estable y de forma repetible la producción de los metabolitos en esta línea celular de una forma no asociada al crecimiento. Con esta línea celular, por primera vez se establece un proceso de producción *in vitro* de honokiol y magnolol a concentraciones mayores que las plantas silvestres, lo cual difícilmente ocurre en la biotecnología vegetal, a menos sin el uso de elicitores.

Es ampliamente conocido que en biotecnología vegetal uno de los primeros problemas a los que nos enfrentamos, es la baja producción de metabolitos secundarios en callos o en plantas micropropagadas, esto en parte debido a la variación somaclonal. En este caso, el contenido original de los metabolitos en las plantas madre recolectadas en el campo en raíces fue de 3.1 mg/g peso seco de honokiol y 3.8 mg/g de magnolol, mientras que para las hojas fue de 2.7 mg/g de honokiol y de 3.5 de magnolol. Las concentraciones de los metabolitos en las plantas micropropagadas estuvieron por arriba de las producidas por las plantas recolectadas en el campo. La regeneración de *Magnolia dealbata* Zucc y las producciones de honokiol y magnolol

---

se pueden atribuir a la selección apropiada del explante y a las combinaciones adecuadas de reguladores de crecimiento en todas las fases de la organogénesis indirecta

Los cultivos en suspensión de *Magnolia dealbata* Zucc fueron más productivos que los cultivos de callos debido a una mayor captación de nutrientes provistos en el medio. En los cultivos en suspensión, las células o agregados celulares son agitados, lo cual no solo proporciona aireación sino también maximiza el acceso a las fitohormonas, vitaminas y otros nutrientes contenidos en el medio líquido.

En resumen, nuestros resultados indican que los cultivos celulares de *Magnolia dealbata* Zucc producen honokiol y magnolol, lo que la sitúa como una potencial fuente para la producción de estos compuestos. Al mismo tiempo, estos bioprocesos facilitarían el uso de la biotecnología para el estudio y mejoramiento posterior de esta especie vegetal para la investigación farmacológica o fitomédica, pero sobretodo, salvaguardando esta especie de la extinción.

El presente trabajo de investigación plantea una diversidad de perspectivas como es manejar la línea FA2 8(en suspensión) con elicitación biótica y abiótica como herramientas biotecnológicas para aumentar la productividad de los metabolitos honokiol y magnolol.

Al mismo tiempo, iniciar el escalamiento del cultivo celular, manejando todos los parámetros de control del cultivo.

---

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Medina M, Borges G, Lara MC, Benjet C, Blanco JJ, Fleiz BC, Villatoro VJ, Rojas GE, Zambrano RJ, Casanova RL, Aguilar G **(2003)** Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios Resultados de la Encuesta Nacional de epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental* **26**: 4-8
- [2] Baghai T, Rupprecht R. **(2008)** New Developments in the treatment of Anxiety Disorders. *Current Pharmaceutical Design* **14**:3481
- [3] Mohar A, Bargalló E, Ramírez MT, Lara F, Beltrán O **(2009)** Recursos disponibles para el tratamiento del cáncer de mama en México. *Salud Pública de México* **51** (2)
- [4] Smith R, Cokkinides V, Brawley O. **(2009)** Cancer screening in the United States, 2009: A review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *Cancer Journal Clinical* **59** :27-41
- [5] Kuribara H; Marita M, Ishige A, Hayashi K, Maruyama Y **(1996)** Investigation of the anxiolytic effect of the extracts derived from Saiboku-to, an oriental herbal medicine by an improved Pluz-Maze test in mice *Journal Neuropsychopharmacology* **18**:643-53
- [6]. Kuribara H, Stavinoha W, Maruyama Y **(1999)**. Honokiol a Putative Anxiolytic Agent Extracted from Magnolia Bark has no Diazepam like side effects in mice. *Journal Pharmaceutical Pharmacology* **51**: 97-103
- [7].Lin Y, Chen HH, Ko CH, Chan MH **(2006)** Neuroprotective activity of honokiol and magnolol in cerebellar granule cell damage *European Journal of Pharmacology* **537**, 64-69
- [8] Min L, Huang H, Hsieh M, Chen Ch, Yeh F, Kuo J. **(2000)** Anti-inflammatory and neuroprotective effects of magnolol in chemical hypoxia in rat cultured cortical cells in hypoglycemic media. *Chinese Journal of Physiology* **43** 61:7

- 
- [9] Bai X, Cerimele F, Ushio FM, Vargas M, Campebell PM, Govindarajan B, Cer CH, Battle J, Frank D, Ye K, Murad E, Dubiel w, Soft G, Arbisier J (2003) Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis *in vitro* and tumor growth *in vivo*. *Journal Biological Chemistry*, **37**, 35501-35507
- [10] Shigemura K, Arbisier J, Sun S, Zayzafoon M, Johnstone P, Fujisawa M, Gotoh A, Weksler B, Zhau H, Chung L (2007) Honokiol a natural product, inhibits the bone metastatic growth of human prostate cancer cells. *Cancer* **109**, 1279-1289
- [11] Ikeda K, Sakai Y, Nagase H (2003) Inhibitory effect of magnolol on tumor metastasis in mice. *Phytotherapy Research* **7**, 933-937
- [12] Hong Mk, Sun JB, Dong WK, Bo KK, Soo BL, Ung SL (2007) Inhibitory role of magnolol on proliferative capacity and matrix metalloproteinase-9 expression in TNF-  $\alpha$ -induced vascular smooth muscle cells. *International Immunopharmacology* **7** 108-1091
- [13] Rigang L, Minlin T, Xianghong W (2004) Determination of honokiol in Jianpi Zhixie powder by HPLC. *Chinese Pharmaceutical Affairs* **40**: 320-331
- [14] Shuler ML (1981) Production of secondary metabolites from plant tissue culture problems and prospects *Annals of the New York Academy of Sciences* **369**: 65-79
- [15] Ramachandra R, Ravishankar G (2002) Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* **20**: 101-153
- [16] Weizel BJ (2002) Uso tradicional e investigación científica de *Talauma mexicana* (D,C) Don.,o flor de corazón, *Revista Mexicana de Cardiología* **13**:1-5
- [17] Martínez AL, Domínguez F, Orozco S, Chávez M, Salgado H, González ME (2006) Neuropharmacological effects of an ethanol extracts of the *Magnolia dealbata* (Zucc) leaves in mice *Journal of Ethnopharmacology* **30**, 250)
- [18] Hilton-Taylor C (compiler) (2000) IUCN Red List of threatened Species. Gland, Switzerland, and Cambridge, U.K: World Conservation Union (IUCN)). (Hilton-Taylor, C. (compiler) 2000. IUCN red list of threatened species. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Xviii +



---

[19] Kolewe M, Gaurav V, Roberts S **(2008)** Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Molecular Pharmaceutics* **5** (2) 243-256

[20] Tyler V. Natural products and medicine: an overview. Medicinal resources of the tropical forest, Columbia University press, New York, 1996, 1-10

[21] Valverde J, **(1984)**. The azteca herbal of 1552. Martín de la Cruz “Libellus de medicinalibus indorum herbis”, context of the sources on naualt materia medica. *Veroff Int Ges Gesch Pharm* **53**: 9-30

[22] Lozoya X. Fármacos de origen vegetal de ayer y hoy. Investigación y Ciencia **(1997)** *Scientific American* **254**: 4-10

[23] BANCOMEXT, Consejería Comercial del Bancomext S.N.C en Francia **(2006)** Mercado Europeo para Fitofármacos 1-88

[24] Cañigüeral S, Dellacassa E, Bandoni A. **(2003)** Plantas Medicinales y Fitoterapia ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Latin American Journal Pharmacy* **22** 256-78

[25] Verpoorte R **(2000)** Pharmacognosy in the new millenium: leadfinding and biotechnology. *Journal of Pharmaceutical and Pharmacology* **52**:253-262

[26] Heinrich M, Akly , Frei B, Weimann C, Sticher O **(1998)** Medicinal plants in Mexico: healers consensus and cultural importance *Social Sciencen & Medicine* **47**: 1859-1871.

[27] Buitrón Ximena, 2007. Las plantas medicinales y aromáticas en América del Sur: balance entre conservación, desarrollo y rescate de conocimientos. Boletín Especies Amenazadas número 12 disponible en: [http://www.sur.iucn.org/lista\\_roja/boletín/boletín12/index.htm](http://www.sur.iucn.org/lista_roja/boletín/boletín12/index.htm)).

[28] Alonso J. Tratado de Fitomedicina Ed. Isis, Buenos Aires, Argentina, 1998, p 30.

[29] Wagner H, Ulrich MG **(2009)** Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* **16**: 97-110

---

[30] Bermúdez A, Olivira B, Velázquez D (2005) La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales : una revisión de sus objetivos y enfoques actuales, *Intercencia* **30**: 453-459

[31] Fabricant D, Farnsworth N (2001). The Value of plants used in traditional medicine for drug Discovery. *Environmental Health Perspectives* **109**: 69-75

[32] Balunas M, Kinghorn D (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* **78**: 431-441

[33] DaSilva E, Hoareau L (1999) Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology* **2**:

[34] Balick M, Cox P Plants, people and cultura: the science of ethnobotany New York Botanical Gardens. Ed.,Scientific American Library, New York, 1996

[35] Oubre A, Carlson T, King R, Reaven M (1997) From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetología* **40**: 614-617

[36] Lipp F (1996) The efficacy, history and politics of medicinal plants. *Alternative Therapy of Health Medicine* **2**: 36-41

[37] Robbins P, Sharp J (2005) The lawn-chemical economy and its discontents *Antipode* **35**: 955-979.

[38] Akele O. (1993) Summary of who guideline for the assessment *Herbal Gram* **28**: 13-20

[39] Lozoya X, Cañigüeral S (2006) Sobre la Fitoterapia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **5**: 67

[40] Farnsworth N., Akarele O (1985). Medicinal plants in therapy, Bull. WHO **63** :965-981,

[41] Farnsworth N, Akarele O (1985) Medicinal plants in therapy Bull WHO **63** : 965-981

---

[42] Gupta M. La industria de fitofármacos en Latinoamérica. En. Lozoya X y Gómez E (Ed) Fitofármacos 1: 19-70, 1997. Edit IMSS -Farmasa Schwabe, 1997

[43] Calixto J **(2000)** Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents) *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**:179-189

[44] Chandra S, Ruchi B **(2000)** Medicinal plant cultivation and sustainable development. *Mountain Research and Development* **20**: 272-279.

[45] Patwardhan B, Warude D, Pushpangadan P, Bhatt N **(2005)**. Ayurveda and tradicional Chinese medicine:a comparative overview. *Evidential Based Complementary Alterntive Medicine* **2**: 465-473.

[46] The Market for Natural Ingredients for Pharmaceucales in the UE, CBI, NI, Sep 2006, p, 14).

[47] Grunwald J. **(1995)** The European phytomedicines: market, figures, trends, analyses. *Herbalgram* **34**: 60-65

[48] Council of Europe. European Pharmacopeia 5ª ed y suplementos 5.1 a 5.5 Strasbourg: Council of Europe, 2005-2006

[49] Matthews H, Lucier G, Fisher K **(1999)** Medicinal herbs in the United States: research needs *Environmental Health Perspectives* **107**: 773-778

[50] Grunwal J **(1995)** The european phytomedicines: market, figures, trends analyses *Herbalgram* **34**:60-65

[51]. Fukuhara S, Green J, Albert J, Mihara H, Pisoni R, Yamazaki S, Akiba T, Akizawa T, Asano Y, Saito A, Port F, Held P, Kurokawa K. **(2006)** Symptoms of depression, prescription of benzodiazepines, and the risk of death in hemodialysis patients in Japan. *Kidney International* **70**: 1866-1872

---

[52]. Hernández LR, González RM (2007) Escala de cansancio emocional (ECE) para estudiantes universitarios: propiedades psicométricas en una muestra de México. *Anales de Psicología* 23: 253-257).

[53]. Medina Ma. Elena. La Salud Mental en México. Retos y perspectivas. Instituto Nacional de Psiquiatría. Internet [www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx)

[54]. American Psychiatric Association (1998) Practice guidelines for the treatment of patients with panic disorder. *American Journal of Psychiatric*, 155 : 1-34.

[55]. Schweizer E, Rickels K. (2007) Benzodiazepine dependence and withdrawal: a review of the síndrome and its clinical management. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 98: 95-101).

[56] Ramírez N, Arranz B, Sánchez M, Centeno M (2006) Depression in Schizophrenia, can it be treated? A review of the evidence. *Current Psychiatry Reviews* 2: 371-379

[57] Lader M, Morton S (2006) Benzodiazepine problems. *British Journal of Addiction* 86:823-828

[58] Woods J, Katz J, Winger G (1988) Use and abuse of benzodiazepines *Journal of the American Medical Association* 260: 3476-3480

[59] Gerson-Cwilich, R., Serrano-Olvera, A., Villalobos-Prieto, A. (2006) Complementary and alternative medicine (CAM) in Mexican patients with cancer. *Clinical and Translational Oncology* 8, 200–207

[60] Cragg G, Boyd M. Drug Discovery and development at the National Cancer Institute: the role of natural products ps plan origin. Medicinal resources of the tropical forest, Columbia University Press, New York, 1996, 102-136

[61] Tascilar, M., de Jong, F.A., Verweij, J., Mathijssen, R.H (2006). Complementary and alternative medicine during cancer treatment: beyond innocence. *Oncologist* 11, 732–741

---

[62] Slevin M, Plant H, Drinkwater J, Gregory W **(1988)** Who should measure quality of life, the doctor or the patient? *British Journal of Cancer* 57: 109-112

[63] Cragg G, Newman D (2005) Plantas a source of anti-cancer agents *Journal of Ethnopharmacology* 100: 72-79.

[64] Perdue Jr R, (1976). Procurement of plants materials for antitumor screening. *Cancer Treatment Report* **60**: 987-998

[65] Gordaliza, M., (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology* **9**, 767–776

[66] Phillipson D **(2001)** Phytochemistry and medicinal plants *Phytochemistry* **56**: 237-243

[67] Lautié, E., Quintero, R., Fliniaux, M.A., Villarreal, M.L **(2008)**. Selection methodology with scoring system: application to Mexican plants producing podophyllotoxin related lignans. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 402–412).

[68] Suffness, M., Pezzuto, J.M., **(1990)**. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, 6. Academic Press, London

[69] Saklani, A., Kutty, S.K., 2008. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today* **13**, 161–171

[70] Itharat A, Houghton P, Eno A, Burke P, Samps J **(2004)** In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cáncer *Journal of Ethnopharmacology* **90**:33-38

[71] Michael H, Bremmer P **(2006)** Ethnobotany and Ethnopharmacy, their role for anti-cancer drug development. *Current Drug Targets* **7**:239-245

[72] Avni D, Oazi G, Ghulam N, Ramesh G, Mahmoud E et al. **(2008)** Medicinal plants and cáncer chemoprevention. *Current Drug Metabolism* **9**: 581-591

---

[73] Mantle D, Lennard T, Pickering A **(2000)** Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer : a review of their pharmacology, efficacy and tolerability *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews* **19**: 223-240

[74] H Hernández- Cerda. M.; 1980. Flora de Veracruz: Magnoliaceae, 14: 3, 4) (Hilton-Taylor C. (compiler) (2000)

[75] Satyajit Saker, Maruyama Y. Magnolia. The genus Magnolia, Taylor and Frnaxis , 2002, New York, NY)

[76] Gutiérrez L. **(1993)** Estudio Biológico de una Especie Forestal Endémica: Magnolia dealbata Zucc [Dissertation]. Universidad Autónoma de Nuevo León, México

[77] Gutiérrez, L. y Vovides, A. **(1997)** An in situ study of Magnolia dealbata Zucc. in Veracruz state: an endangered endemic tree of Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 6: 89-97

[78] Dood T. III, **(1980)**.Paying a callo in *Magnolia dealbata* Vol 16, :29-32)

[79] Gutiérrez L. **(1993)** Estudio Biológico de una Especie Forestal Endémica: *Magnolia dealbata* Zucc [Dissertation]. Universidad Autónoma de Nuevo León, México

[80] Hernández C, 1980 Magnolidaceae. Flora de Veracruz Fasc 14 México: INIREB 14 p.

[81] Norma Oficial Mexicana No. 059-ECOL-2001) Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo. (6 de Marzo 2002) México, D.F.: Diario Oficial de la Federación.

[82] Vazquez G **(1994)** Magnolia (Magnoliacear) in Mexico and central america: a zynopsis *Brittonia* **46**: 1-23

[83] Corral A, Sanchez V **(2005)** Seed ecology ang germination tratments in Magnolia dealbata: An endangered species *Flores-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 201: 227-232

---

[84] Cicuzza D, Newton A, Oldfield S **(2007)** The red list of Magnoliaceae. Fauna and Flora International, Cambridge

[85] Sánchez V, Pineda L **(2010)** Comparative demographic analysis in contrasting environments of *Magnolia dealbata*: an endangered species from Mexico *Population Ecology* 52: 203-210

[86] Foroughbakhch R, Alanís F, Alvarado V, Velazco M **(2008)** *Magnolia dealbata* en Nuevo León , México *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79:126-130

[87] Johnson D **(1989)** Nomenclatural changes in Magnolia. *Baileya*, **23** :55-56

[88] Vázquez J **(1990)** Taxonomy of the genus Magnolia (Magnolidaceae) in México and Central America. Ms: Thesis (Botany), University of Wisconsin, Madison

[89] Vázquez J. **(1994)** Taxonomy of the genus Magnolia (Magnolidaceae) in México and Central America: a sinopsis. *Britonia* **46**:219-228.

[90] Sánchez V, Pineda L **(2006)** Species diversity, structure and dynamics of two populations of an endangered species, *Magnolia dealbata* (Magnoliaceae) *Revista de Biología Tropical* 54:

[91] Sánchez V, Pineda L **(2010)** Comparative demographic analysis in contrasting environments of *Magnolia dealbata*: an endangered species from Mexico *Population Ecology* **52**: 203-210

[92] Mata M, Jimenez A, Chávez V **(2006)**. Somatic embriogénesis and organogénesis in *Magnolia dealbata* Zucc (Magnolidaceae) and endangered endemic Mexican species. *HortScience* **41** 1325-1329.

[93] Lozoya X, Aguilar A, Camacho J.**(1987)** Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana / Inquest about the current use of traditional Mexican medicinal plants. *Revista Médica del IMSS* **25**: 283-291

---

[94] Maruyama Y, Kuribara H, Morita M, Yuzurihara M, Weintraub S. (1998) Identification of magnolol and honokiol as anxiolytic agents in extracts of saiboku-to, an Oriental herbal medicine. *Journal Natural Products*, **61**, 135-138.

[95] Kuribara H, Stavinoha W, Mruyama Y (1998) Behavioral Pharmacological Characteristics of honokiol on anxiolitic agent present in extracts of Magnolia bark evaluated by an elevated plus-maze test in mice. *Journal Pharmaceutical Pharmacology* **50**: 819-26

[96] Kuribara H, Kishi E, Hattori N, Okada M, Maruyama Y (2000) The Anxiolytic Effect of Two Oriental Herbal Drugs in Japan Attributed to Honokiol from Magnolia Bark *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **52**: 1425-1429

[97] Seo J, Lee S, Lee Y, Know B, Ma Y, Hwang B (2007) Anxiolytic-like effects of obovatol isolated from *Magnolia obovata*: Involvement of GABA/benzodiazepine receptors complex *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **31**: 1363-1369

[98] Oh K, Seo J, Lee S, Park M, Lee M, Kwon (2005) A52 Anxiolytic Effects of Cbpharm-001 Isolated From Magnolia Obovata and Its Possible Molecular Mechanisms. *Behavioural Pharmacology* **16**: 40

[99] Ogata M, Hoshi M, Shimotohno K, Urano S, Endo T (1997) Antioxidant activity of Magnolol, honokiol, and related phenolic compounds. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **74**: 557-562

[100] Kuo TL, Yung CS, Chieh FC, Cheng MT, Shen KT. (2003) Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production *Brain Research*, **992**, 159-166

[101] Chang CP, Hsu YC, Lin MT. (2003) Magnolol protects against cerebral ischemic injury of rat heatstroke *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology*, **30**, 87-92.

[102] Lee MM, Hseih HT, Kuo JS, Yeh FT, Huang HM. (1998) Magnolol protects cortical neuronal cells from chemical hypoxia in rats *Neuroreport*, **9**, 224-32.



- 
- [103] Lo YC, Teng CM, Chen CF, Chen CC, Hong CY **(1994)** Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation *Biochemical Pharmacology* **9**: 594-553
- [104] Hou W, Chen L, Yang G, Zhou H, Jiang Q, Zhong Z, Chen X et al. **(2008)** Synergistic antitumor effects of liposomal honokiol combined with adriamycin in breast cancer models *Phytotherapy Research* **22**: 1125-1132
- [105] Chen F, Wang T, Wu Y, Gu Y, Xu X, Zheng S, Hu S **(2004)** Honokiol: A potent chemotherapy candidate for human colorectal carcinoma *World Journal of Gastroenterology* **10**:3459-3463
- [106] Shigemura K, Arbiser J, Sh Y, Zayzafoon M, Johnstone P, Fujisawa M, Gotoh A, Weksler B, et al **(2007)** Honokiol, a natural plant product, inhibits the bone metastatic growth of human prostate cancer cells. *Cancer* **109**: 1279-1289
- [107] Yerman M, Yerman C. **(1996)** Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist* **134**: 53-569)
- [108] Bougard F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. **(2001)** Production of secondary metabolites a historical perspective. *Plant Science* **161** : 839-851
- [109] Schlatmann J, Hoopen H, Heijnen J. Large-scale production of secondary metabolites by plant cell cultures. En: DiCosmo F, Misawa M. Editores. *Plant cell culture secondary metabolism: toward industrial application*. New York: CRS Press; 1996 p-11-52),
- [110] Guillón S, Tremouillaux J, Pratap K, Rideau M, Ganter P. **(2006)**. Hairy roots research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**: 341-346
- [111] Kargi F, Rosenberg M **(2008)** Plant cell biorreactors: Present status and future trends *Biotechnology Progress* **3**: 1-8
- [112] Murashige T; Skoog E. **(1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant* **15**: 473-497.

- 
- [113] Thanh Van T **(1981)** Control of morphogenesis in *in vitro* cultures. *Annual review of plant physiology* **32**: 291-311
- [114] Davies P. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions En: Plant hormones 3. Springer Eds, New York NY, 2010
- [115] Barba A. Reguladores del crecimiento vegetal: En: Hurtado, D.V. y Merino M,E. (Eds) Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México,1991 p: 48-63
- [116] Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid D, Thorpe T **(1996)** Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* **32**: 272-289
- [117] Kende H, Zeevaart J **(1997)** The Five "Classical" Plant Hormones *Plant Cell* **9**: 1197-1210
- [118] Liu C, Xu Z, Chua N **(1993)** Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis *The Plant Cell* **5**: 621-630
- [119] Meindl T; Boller T, Felix G **(1998)** The Plant Wound Hormone System in Binds with the N-Terminal Part to Its Receptor but Needs the C-Terminal Part to Activate
- [120] Gerstenfeld L, Alkhiary Y, Krall E, Nicholls F, Stapleton S, Fitch J, Bauer M, Kayal R, Graves D et al. **(2006)** Three-dimensional Reconstruction of Fracture Callus Morphogenesis *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **54**: 1215-1228
- [121]. Halperin W **(1969)** Morphogenesis in cell cultures. *Annual Review of Plant Physiology* **20**:395-418
- [122] Stafford A, Morris P, Fowler M **(1986)** Plant cell biotechnology: A perspective. *Enzyme and Microbiological Technology* **8**: 578-587
- [123] Torrey JG, DE Fosket D **(1970)** Cell division in relation to cytodifferentiation in cultured pea root segments *American Journal Botany* **57**: 1072-1080

---

[125] Larkin P, Scowcroft W **(1981)** Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement *Theoretical and Applied Genetics* **60**: 197-214

[126] Lindsey K, Jones MG, Suspension cultures. En : *Plant Biotechnology in agricultura*. Prentice Hall New Jersey, 1990 20-24

[127] Collin H, Edward S . Growth of callus and cell suspension cultures En: Bios (Eds) *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publishers New York 1998, 35-43

[128] Phillips G, Hubstenberger J, Hansen. Plant regeneration by organogénesis form callus and cell suspension cultures En: Gamborg O., Phillips G (Eds) *Plant Cell Tissue and organ Culture*, Springer-Verlag Berlín Heidelberg, New York, 1995; 69-90

[129] Payne F, Bringi V, Prince C, Shuler M. Quantifying growth and growth related process. En: *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, INC. New York, 1992; 51-53

[130] Wei W **(2007)** Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **50**: 189-230

[131] Ketchum R, Gibson D, Croteau R, Shuler M **(2000)** The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate *Biotechnology and Bioengineering* **62**:97-105

[132] Cazzulino L, Pedersen H, Chin Ch, Styer D **(2004)** Kinetics of carrot somatic embryo development in suspension culture *Biotechnology and Bioengineering* **35**:781-786

[133] Curtis W, Emery A **(2004)** Plant cell suspension culture rheology *Biotechnology and Bioengineering* **42**: 520-526

[134] Zhong J **(2001)** Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures *Advances En Biochemical Engineering/Biotechnology* Springer Berlín/Heidelberg Vol 72

---

[135] Fisher R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman M (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals *Current Opinion in Plant Biology* 7: 152-158

[136] M. Jolicoeur, C. Chavarie\*, P. J. Carreau, J. Archambault (2004) Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture  
*Biotechnology and Bioengineering* 39: 781-786

[137] Ryu S, Lee S, Romani R (1990) Determination of growth rate for plant cell cultures : comparative studies. *Biotechnology and Bioengineering* 35: 305-311

[138] Bennet R, Wallsgrove R (2006) Secondary metabolites in plant defense mechanisms *New Phytologist* 127: 617-633

[139] Vining L (1990) Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology* 44: 395-427

[140] Maplestone R, Stone M, Williams D (1992) The evolutionary role of secondary metabolites a review. *Gene* 115: 151-157

[141] Akita H., Takayama S (1988) Root cultures of *Atropa belladonna* in bioreactors. *Acta Horticultural* 55: 230-236

[142] Sato F., Yamada Y. (1991) High berberine producing cultures of *Captus japonica* cells. *Phytochemistry* 23: 281-285

[143] Greidzak N., Diettrich B., Luckner H (1990) Batch culture of somatic embryos *Digitalis lanata* in gaslift fermenters. Development and cardenolide accumulation. *Planta Medica* 56: 175-178.

[144] Watter G., Mac Vean C., Suzuki T (1983) High production of caffeine and related enzyme activities in callus culture of *Coffea arábica* L. *Plant Cell Reports* 2: 109-112, 1983

---

[145] Cline S., Coscia C The stimulation of sanguinarine production in plant cells cultures . En: JB. Morborne & FA Tomas Barbera (Ed) *Ecological Chemistry & Biochemistry of Plant Terpenoids* p 95:132, 1988. Edit. Clarendon, UK,.

[146] Drapeau A., Blanch H., Wilke C **(1987)** Economic assessment of plant cell culture for the production of ajmalicine. *Biotechnology and Bioengineering* **30**: 946:953.

[147] Ushiyawa K. Production of saponin by large scale tissue culture of *Panax ginseng*. Paper read at the International Chemical Congress of Pacific Basic Sciences. Honolulu Hawaii, Dic 17-22, 1989.

[148] Tabata M., Fujita Y. Production of shikonin by plant cell cultures. En :Zaitlin M y Day P (Ed). *Biotechnology in Plant Sciences, Relevance of Agriculture in the Eighties* p 207-218, 1985. Edit. Academic Press, USA.

[149] Ketchum R, Gibson D **(1996)** Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **46**: 9-16

[150] Noguchi H., Matsumoto T., Hirata Y., Yamamoto K., Katsuyama A., Kato A., Azechi S. Improvement of growth rates of plant cell cultures. En: Barz W., Reinhard E., Zenk M (Ed). *Plant tissue culture and its Biotechnological Application*. p 85-94., 1977.Edit Springer- Verlag, Berlín, Alemania.

[151] Sim S; Chang H **(1993)** Increased shikonin production by hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon* in two phase bubble colum reactor. *Biotechnology Letters* **15**: 145-150

[152] Zhong J **(2002)** Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**: 591-599

[153] Holton R, Somoza C, Baik H, Liang F, Biediger R, Boatman D, Shindo M, Smith Ch, Kim S **(1994)** First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society*. **116**:1597-1598

---

[154] Holton R, Baik H, Somoza C, Liang F, Biediger R, Boatman D, Shindo M, Smith Ch, Kim S (1994) First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings. *Journal of the American Chemical Society*. **116**:1599-1600

[155] Ciddi V, Srinivasan V, Shuler M (1995) Elicitation of *Taxus* s.p. cell cultures for production of taxol. *Biotechnology Letters* **17**: 1343-1346

[156] Cusidó R, Palazón J, Navia A, Mallol A, Bonfill M (1999) Production of Taxol and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture *Plant Science* **146**: 101-107

[157] Wildham J (1972) The use of fluorescent diacetate and phenosatramine to determine viability of cultured plant cells. *Stain Technology* **47**: 189-194

[158] Johansen, D (1940) Plant microtechnique. Edit McGraw-Hill. U.S.A. 523 pp.

[159] Sandoval, Z. E. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos IBUNAM 38. Instituto de Biología, 2005. UNAM. 278p



**APENDICES**  
**Artículos Publicados**

---