



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

---

---

**INDUCCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA  
EN CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE  
*SPHAERALCEA ANGUSTIFOLIA* (CAV.) G. DON (MALVACEAE)  
A NIVEL DE MATRACES Y EN BIORREACTOR**

**T E S I S**

**Para obtener el grado de  
Doctor en Biotecnología**

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

**M. en C. JUANITA PÉREZ HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR**

**Dr. FRANCISCO CRUZ SOSA**

**CO-DIRECTORA**

**Dra. MARÍA DEL PILAR NICASIO TORRES**

**Julio 2014**



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00133  
Matrícula: 210180333

INDUCCION DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. DON (MALVACEAE) A NIVEL DE MATRACES Y BIORREACTOR.

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 8 del mes de julio del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA AURORA MARTINEZ TRUJILLO  
DRA. LIDIA TERESA OSUNA TORRES  
DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO  
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO  
DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR



JUANITA PEREZ HERNANDEZ  
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: JUANITA PEREZ HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. MARIA AURORA MARTINEZ TRUJILLO

VOCAL

DRA. LIDIA TERESA OSUNA TORRES

VOCAL

DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO

VOCAL

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

SECRETARIO

DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR

México D.F. a 4 de Julio del 2014

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

Inducción de compuestos con actividad antiinflamatoria en  
cultivos de células en suspensión de *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don  
(Malvaceae) a nivel de matraces y en biorreactor

Que presentó

M. en C. Juanita Pérez Hernández

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Codirectora: Dra. María del Pilar Nicasio Torres

Asesor: Dr. Manases González Cortazar

**Jurado:**

Presidente: Dra. María Aurora Martínez Trujillo

Secretario: Dr. Manases González Cortázar

Vocal: Dr. Antonio Bernabé Antonio

Vocal: Dra. Lidia Teresa Osuna Torres



El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.

La M. en C. Juanita Pérez Hernández recibió la beca de CONACYT con el número de registro 240850 y apoyo complementario como becaria de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El desarrollo de la tesis contó con financiamiento del Instituto Mexicano del Seguro Social, FIS/MSS/PROT/G13/1225.

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>Páginas</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>I. ANTECEDENTES</b>	7
<b>1. Inflamación</b>	7
<b>1.1 Células mediadoras del proceso infamatorio</b>	8
<b>1.1.1 Aminas</b>	8
<b>1.1.2 Lípidos</b>	8
<b>1.1.3 Proteínas</b>	9
<b>1.1.4 Especies reactivas de oxígeno (ERO)</b>	12
<b>1.2 Agentes antiinflamatorios</b>	13
<b>1.2.1 Antiinflamatorios esteroidales o glucocorticoides</b>	13
<b>1.2.2 Antiinflamatorios no esferoidales (AINEs)</b>	13
<b>1.3 Modelos farmacológicos de evaluación antiinflamatoria</b>	15
<b>1.3.1 Modelos de inflamación <i>in vitro</i></b>	15
<b>1.3.2 Modelos de inflamación <i>in vivo</i></b>	15
<b>1.3.2.1 Edema plantar inducido con carragenina</b>	15
<b>1.3.2.2 Edema auricular inducido con 12-O-tetradecanoilforbol (TPA)</b>	16
<b>1.4 Plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la inflamación</b>	17
<b>2. <i>Sphaeralcea angustifolia</i> (Cav.) G. Don</b>	19
<b>2.1 Características morfológicas</b>	19
<b>2.2 Clasificación taxonómica</b>	20
<b>2.3 Sinonimias</b>	20
<b>2.4 Distribución y usos etnobotánicos</b>	20
<b>2.5 Estudios fitoquímicos y farmacológicos</b>	21
<b>2.6 Estudios clínicos</b>	23
<b>2.7 Estudios biotecnológicos</b>	23
<b>3. Metabolismo secundario en plantas</b>	25

3.1 Compuestos fenólicos	26
3.2 Cumarinas	27
4. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	29
4.1 Cultivo de células en suspensión	30
4.2 Estrategias de estimulación para la producción de metabolitos secundarios	30
4.2.1 Estrés biótico y abiótico	31
4.3 Importancia del nitrógeno en las plantas	33
4.3.1 Relación entre la fotosíntesis y el metabolismo del nitrógeno	33
4.3.2 Efecto del nitrato en el desarrollo de las plantas	34
4.3.3 Efecto del nitrato en la producción de metabolitos secundarios	34
4.4 Función del cobre en las plantas	36
4.4.1 El cobre en los procesos de crecimiento y senescencia	36
4.4.2 El cobre en la fotosíntesis, la cadena respiratoria y el estrés oxidativo	37
4.4.3 Estrés por cobre y producción de compuestos fenólicos	38
5. Aplicación del cultivo de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios.	42
5.1 Uso de biorreactores en cultivos de células en suspensión	43
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
III. JUSTIFICACIÓN	47
IV. HIPOTESIS	47
V. OBJETIVOS	48
5.1 OBJETIVOS GENERALES	48
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	48
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	49
6. Material vegetal de <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	49
6.1 Cultivos de células en suspensión	49
6.2 Inducción y producción de compuestos en cultivos de células en	49

<b>suspensión</b>	
<b>6.2.1 Extracción y purificación de compuestos</b>	49
<b>6.2.2 Condiciones de análisis por HPLC</b>	51
<b>6.3 Identificación de compuestos</b>	52
<b>6.3.1 Análisis espectroscópicos</b>	52
<b>6.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de compuestos aislados del cultivos de células en suspensión</b>	52
<b>6.4.1 Animales</b>	52
<b>6.4.2 Edema subplantar inducido con carragenina</b>	53
<b>6.4.3 Edema auricular inducido con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)</b>	53
<b>6.4.4 Análisis estadístico</b>	53
<b>6.5 Optimización de la producción de compuestos con actividad antiinflamatoria en cultivos de células en suspensión de <i>Sphaeralcea angustifolia</i></b>	54
<b>6.5.1 Diseño experimental Metodología de Superficie de Respuesta</b>	54
<b>6.5.2 Evaluación del crecimiento de las suspensiones celulares</b>	56
<b>6.5.3 Análisis de la producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálico</b>	57
<b>6.5.3.1 Extracción de biomásas celulares</b>	57
<b>6.5.3.2 Extracción del medio de cultivo</b>	57
<b>6.6 Cultivo de células en suspensión en bioreactor de agitación mecánica</b>	58
<b>6.6.1 Determinación de crecimiento celular</b>	58
<b>6.6.2 Viabilidad celular</b>	58
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	59
<b>7. Aislamiento e identificación de compuestos activos en cultivos de células en suspensión de <i>Sphaeralcea angustifolia</i></b>	59
<b>7.1 Purificación y caracterización estructural de compuesto 1</b>	60

<b>7.2 Purificación y caracterización estructural de compuesto 2</b>	67
<b>7.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria del ácido sphaerálcico y tomentina</b>	70
<b>7.3.1 Modelo de edema subplantar inducido con carragenina</b>	70
<b>7.3.2 Modelo de edema auricular inducido con TPA</b>	71
<b>7.4 Optimización de la concentración de nitratos y cobre en el medio de cultivo de Murashigue y Skoog utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta</b>	74
<b>7.4.1 Cinéticas de crecimiento en el modelo de Diseño Factorial 2<sup>K</sup></b>	74
<b>7.4.2 Cinéticas de producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico en el modelo de Diseño Factorial 2<sup>K</sup></b>	79
<b>7.4.3 Cinéticas de producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico en la metodología de paso ascendente</b>	84
<b>7.4.4 Optimización de la producción de cumarinas (escopoletina y tomentina)</b>	88
<b>7.4.5 Optimización de la producción de ácido sphaerálcico</b>	92
<b>7.5 Crecimiento y producción de compuestos antiinflamatorios en suspensiones celulares cultivadas en biorreactor</b>	100
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	104
<b>IX. PERSPECTIVAS</b>	106
<b>X. BIBLIOGRAFIA</b>	107
<b>XI. ANEXOS</b>	115



## ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Condiciones de fraccionamiento en columna del extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH (9:1) de biomásas celulares de <i>S. angustifolia</i> .	50
Tabla 2. Condiciones de separación cromatográfica en columna de la fracción 4.	51
Tabla 3. Condiciones de separación cromatográfica en columna de la fracción 5.	51
Tabla 4. Matriz del diseño factorial 2 <sup>K</sup> utilizado para el establecimiento de cinéticas de crecimiento y producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> .	55
Tabla 5. Datos de RMN de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C (400 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> , δ ppm) determinados para el compuesto 1.	66
Tabla 6. Actividad inhibitoria del desarrollo del edema subplantar de ratón inducido con carragenina de los compuestos aislados ácido sphaerálcico, tomentina y el fármaco indometacina.	70
Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de tomentina, ácido sphaeralcico, naproxeno e indometacina en el modelo de edema auricular en ratón.	72
Tabla 8. Parámetros de crecimiento de los cultivo de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> en lote desarrollados en medio de Murashige y Skoog complementado con diferentes niveles de nitrato y cobre en el Diseño Factorial (DF) 2 <sup>K</sup> .	76
Tabla 9. Coeficientes del modelo lineal de los parámetros de crecimiento de los cultivo de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> obtenidos en el modelo de Diseño Factorial (DF) 2 <sup>k</sup> .	76
Tabla 10. Contenidos de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en medios de cultivo de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> desarrollados en medio de Murashige y Skoog complementado con diferentes niveles de nitrato y cobre en el Diseño Factorial (DF) 2 <sup>K</sup> .	80
Tabla 11. Acumulación de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en los cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> desarrollados en medio de Murashige y Skoog complementado con diferentes niveles de nitrato y cobre en el Diseño Factorial (DF) 2 <sup>K</sup> .	80
Tabla 12. Coeficientes del modelo lineal del Diseño Factorial (DF) 2 <sup>k</sup> sobre la producción y la excreción de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico de los cultivo de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> obtenidos en el modelo.	81
Tabla 13. Coeficientes del modelo lineal de la producción de cumarinas	84

(tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico de los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* obtenidos en el modelo de Diseño Factorial (DF) 2<sup>k</sup>.

Tabla 14. Parámetros de crecimiento de los cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* en lote desarrollados en medio de Murashige y Skoog complementado con diferentes niveles de nitrato y cobre en el Diseño de Paso Ascendente (DPA). 86

Tabla 15. Excreción de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de diseño de paso ascendente (DPA). Media±EEM. 86

Tabla 16. Acumulación de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño de Paso Ascendente (DPA). Media±EEM. 88

Tabla 17. Producción de cumarinas en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño Compuesto Central (DCC). Media±EEM. 89

Tabla 18. Coeficientes de la producción de cumarinas (escopoletina y tomentina) en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño Compuesto Central (DCC). Media±EEM. 89

Tabla 19. Producción de ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño Compuesto Central (DCC). Media±EEM. 93

Tabla 20. Coeficientes de la producción de ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño Compuesto Central (DCC). Media±EEM. 93

## ÍNDICE DE FIGURAS

Paginas

Figura 1. Proceso inflamatorio y mediadores de la inflamación.	10
Figura 2. Planta completa (a), flor (b), haz y envés de la hoja de <i>Sphaeralcea angustifolia</i> (c). Fotografías tomadas del invernadero y jardín del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS).	19
Figura 3. Metabolitos secundarios identificados en <i>Sphaeralcea angustifolia</i> , a) compuestos fenólicos y b) terpenos (Osti-Castillo et al. 2010; García-Rodríguez et al., 2012).	22
Figura 4. Estructuras químicas base de cumarinas.	28
Figura 5. Ruta biosintética activada por la reducción del contenido de nitratos para la formación de compuestos fenólicos. PAL, fenilalanina amonioliasa; TAL, tirosina amonioliasa; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; GS, glutamina sintetasa; GHD, glutamato deshidrogenasa; GOGAT, glutamato sintetasa.	35
Figura 6. Reacciones químicas que participan en la producción del radical hidroxilo.	39
Figura 7. Relación entre el ataque causado por patógenos y metales ( $\text{Cu}^{2+}$ ) y los mecanismos de defensa en las plantas. AGPI (ácidos grasos poliinsaturados), AGPI-OOH (ácidos grasos poliinsaturados hidroxiperoxidados).	41
Figura 8. Cromatoplaqueta en gel de sílice del estándar de escopoletina (A) y del extracto de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) eluidos con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (90:10), de las biomásas celulares de <i>S. angustifolia</i> derivadas del cultivo de células en suspensión desarrolladas en medio MS con reducción de nitrato (B).	59
Figura 9. Cromatograma y espectros de absorción de los compuestos detectados en el extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de <i>S. angustifolia</i> (a) y el estándar de escopoletina (b).	60
Figura 10. Cromatograma de HPLC (a) y espectro de absorción (b) del compuesto <b>1</b> derivado del extracto de diclorometano:metanol de las biomásas celulares de <i>S. angustifolia</i> desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.	61
Figura 11. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de <i>S. angustifolia</i> desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.	61
Figura 12. Espectro de HSQC del compuesto <b>1</b> ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de <i>S. angustifolia</i> desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato	62

reducido

- Figura 13. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomasaas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido. 62
- Figura 14. Espectro de HMBC del compuesto **1** ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomasaas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido. 63
- Figura 15. a) Correlaciones HMBC para el H-3 y b) correlaciones HMBC para el H-5 del compuesto **1** derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomasaas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido. 63
- Figura 16. Espectro de  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY del compuesto **1** ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomasaas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido. 64
- Figura 17. Espectro de IR del compuesto **1** ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomasaas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido. 65
- Figura 18. Espectro de masas del compuesto **1** ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomasaas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido. 65
- Figura 19. Estructura del compuesto **1** asignado con el nombre ácido 2-(1,8-dihidroxi-4-isopropil-6-metil-7-metoxi) naftoico (ácido sphaerálcico) aislado de cultivos de células de suspensión de *S. angustifolia*. 67
- Figura 20. Cromatograma de HPLC (a) y espectro de absorción (b) del compuesto **2** derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomasaas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido. 67
- Figura 21. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **2** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomasaas celulares de *S. angustifolia* establecidas en el medio MS con el contenido de nitratos reducido. 68
- Figura 22. Espectro de  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  NOESY del compuesto **2** ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomasaas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido. 69

Figura 23. Estructura del compuesto <b>2</b> determinado como 5-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina (tomentina) aislado de las biomásas celulares de <i>S. angustifolia</i> desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.	69
Figura 24. Relación entre la dosis de ácido sphaerálcico y el porcentaje de inhibición del edema auricular, así como entre la dosis y el peso del edema auricular del ratón inducido con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). La línea de ajuste fue generada por regresión lineal de los datos. Media $\pm$ EEM ( $n=5$ ).	72
Figura 25. Cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> establecidos en medio MS completo (a) y con 2.74 mM de nitratos y 0.1 $\mu$ M de cobre (b) en el modelo de Diseño Factorial (DF) $2^K$ .	74
Figura 26. Curvas de crecimiento de cultivos en lote de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el medio de cultivo MS mediante el Diseño Factorial (DF) $2^K$ . Media $\pm$ EEM ( $n=3$ ).	76
Figura 27. Cinéticas de contenido en medio de cultivo de a) cumarinas (escopoletina y tomentina) y b) ácido sphaerálcico en los cultivos en suspensión de <i>S. angustifolia</i> variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el medio MS mediante el Diseño Factorial (DF) $2^K$ . Media $\pm$ EEM ( $n=3$ ).	82
Figura 28. Cinéticas de contenido en biomásas de a) cumarinas (escopoletina y tomentina) y b) ácido sphaerálcico en los cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> variando las concentraciones de nitrato y cobre en el medio MS mediante el diseño factorial (DF) $2^K$ . Media $\pm$ EEM ( $n=3$ ).	83
Figura 29. Curvas de crecimiento de cultivos en lote de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el medio de cultivo mediante el modelo de Diseño de Paso Ascendente (DPA). Media $\pm$ EEM.	85
Figura 30. Excreción (a) y acumulación (b) de cumarinas a los dos días en cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño de Paso Ascendente (DPA). Media $\pm$ EEM.	87
Figura 31. Excreción (a) y acumulación (b) de ácido sphaerálcico a los cuatro días en cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño de Paso Ascendente (DPA). Media $\pm$ EEM.	87
Figura 32. Producción de cumarinas excretadas (a) y acumuladas (b) en los cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> en el modelo del Diseño Compuesto Central (DCC) a los dos días de cultivo.	91

Figura 33. Producción de cumarinas excretadas (a) y acumuladas (b) en los cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> en el modelo del diseño compuesto central (DCC) a los cuatro días de cultivo.	92
Figura 34. Producción de ácido sphaerálcico excretado (a) y acumulado (b) en los cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> en el modelo del Diseño Compuesto Central (DCC) a los dos días de cultivo.	95
Figura 35. Producción de ácido sphaerálcico excretado (a) y acumulado (b) en los cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> en el modelo del Diseño Compuesto Central (DCC) a los cuatro días de cultivo.	96
Figura 36. Curva de crecimiento de la suspensión celular de <i>S. angustifolia</i> cultivada en biorreactor de agitación mecánica.	101
Figura 37. Viabilidad celular de los cultivos en suspensión de <i>S. angustifolia</i> desarrollados en biorreactor de agitación mecánica.	101
Figura 38. Cinéticas de producción de cumarinas (escopoletina y tomentina, a) y ácido sphaerálcico (b) en cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> en biorreactor de agitación mecánica.	103

## RESUMEN

---

La inflamación es un proceso fisiopatológico asociado a un gran número de padecimientos crónico degenerativos, principalmente reumáticos, cardiovasculares, gástricos y neurológicos. Las enfermedades reumáticas son uno de los principales problemas de salud en el mundo; en México, las personas en edad productiva laboral son las más afectadas por estas enfermedades. Por lo anterior, es un tema prioritario de salud y de importancia económica que motiva a la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios que actúen sobre los blancos terapéuticos de interés. Las plantas medicinales son una gran fuente de compuestos que poseen una diversidad estructural química con potencial biológico, por lo que pueden ser utilizadas como medicamentos o como base para su producción. Un número importante de especies vegetales han sido utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de pacientes con enfermedades que conllevan un proceso inflamatorio, dentro de estas se destaca *Sphaeralcea angustifolia*. Esta especie cuenta con el respaldo farmacológico que sustenta el uso tradicional, así como la evaluación clínica en pacientes con osteoartritis de un fitomedicamento estandarizado en el contenido del antiinflamatorio escopoletina. No obstante, los estudios químicos de la especie son escasos, por lo que es importante el identificar y caracterizar a otros compuestos que coadyuven al efecto antiinflamatorio de *S. angustifolia*. Considerando que la planta crece en poblaciones aisladas y su colecta está controlada por la SEMARNAT (NOM-007-RECNAT-1997) fue indispensable buscar alternativas para la obtención de tejido vegetal y conservación de la especie. Para tal propósito, se desarrollaron cultivos de callos morfogénicos a través de los cuales se logró la micropropagación indirecta de la planta. Asimismo, se establecieron cultivos de células en suspensión productores del compuesto activo escopoletina. Este sistema se empleó para evaluar una estrategia de estimulación modificando el balance carbono:nitrógeno, al reducir el contenido de nitrato en el medio de Murashige y Skoog (MS) a 2.74 mM; condición que no afectó el crecimiento de la suspensión celular, favoreció la producción de la escopoletina y estimuló la producción de otros dos compuestos del tipo fenólico.

En este proyecto inicialmente se planteó aislar e identificar la estructura de los dos compuestos producidos en la suspensión celular de *S. angustifolia* cultivada en

medio MS con restricción de nitrato, así como evaluar su efecto sobre la formación de los edemas plantar inducido con  $\lambda$ -carragenina y auricular con TPA (12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato). Los datos espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) permitieron identificar estructuralmente a la tomentina (5-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina) y al ácido 2-(1,8-dihidroxi-4-isopropil-6-metil-7-metoxi) naftoico, el cual se aisló e identificó por primera vez en cultivos de células en suspensión de una especie del género *Sphaeralcea*, denominándolo como ácido sphaerálcico. Ambos compuestos inhibieron el desarrollo del edema subplantar, actividad que fue similar a la del fármaco indometacina. En el modelo de edema auricular la actividad antiinflamatoria de la tomentina fue similar a la de los fármacos sintéticos (indometacina y naproxeno); en tanto que la del ácido sphaerálcico ( $DE_{50}$  de 0.54 mg/oreja) fue significativamente superior a el efecto mostrado por la tomentina y el fármaco naproxeno.

Posteriormente, este estudio se enfocó en optimizar la producción de los compuestos activos (escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico) producidos en las suspensiones celulares de *S. angustifolia*, sin dejar de tomar en cuenta el comportamiento del crecimiento celular, siendo este uno de los factores asociado a la producción. Así, se planteó establecer los niveles óptimos de nitrato y de cobre, el cual simula el ataque de un microorganismo patógeno, empleando la metodología de superficie de respuesta (MSR) como modelo.

En la etapa de Diseño Factorial (DF) se determinó que los niveles de nitrato y cobre en el medio MS no modificaron la velocidad de crecimiento ( $0.317-0.389$  días<sup>-1</sup>) ni el tiempo de duplicación (1.78-2.18 días) de la suspensión celular de *S. angustifolia*; no obstante, la mayor biomasa celular (14.62 g/L) se obtuvo al incrementarse el contenido de nitrato (2.74 mM) y disminuyendo el del cobre (0.1  $\mu$ M). La mayor producción de cumarinas y ácido sphaerálcico se observó a los 2 y 4 días de cultivo, favorecidos por la interacción de los contenidos de nitrato y cobre, los valores de 2.74 mM de nitratos y 2  $\mu$ M de cobre fueron utilizados como base para el establecimiento del Diseño de Paso Ascendente (DPA).

En el modelo DPA el crecimiento de los cultivos celulares se redujo en un 74% en los cultivos desarrollados con mayores contenidos de ambos nutrientes. Asimismo, se determinó que contenidos por arriba de 5.68  $\mu$ M de cobre en el medio MS inhiben el



crecimiento en la suspensión celular, provocando lisis y muerte celular. La producción de cumarinas y el ácido sphaerálcico, generó un punto de inflexión de la curva y para encontrar las condiciones óptimas se evaluó el efecto del nitrato y cobre en intervalos de concentración cortos. Para completar el modelo cuadrático (Diseño Compuesto Central, DCC) y encontrar las condiciones de nitrato y de cobre óptimas, fue necesario añadir al DF cuatro puntos más (Diseño en Estrella, DE) tomando como punto de origen las condiciones nutricionales de 2.74 mM de nitratos y 2  $\mu$ M de cobre.

En el modelo DCC se determinó que la modificación en la concentración de nitrato y cobre en el medio de cultivo MS moduló favorablemente la producción de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia*. La interacción de 2.42 mM de nitratos y 1.81  $\mu$ M de cobre estimula la mayor producción de las cumarinas, registrando niveles de 236.45  $\mu$ g/L en biomásas y de 4,136.96  $\mu$ g/L en el medio a los 2 días de cultivo. No se determinó interacción de los factores sobre producción de ácido sphaerálcico, prediciendo que las mejores condiciones para su excreción se obtuvieron con 0.32 mM de nitratos libre de cobre a los 4 días (5,258.12  $\mu$ g/L) de cultivo; mientras que su acumulación (756.91  $\mu$ g/L) se favoreció con la presencia de 2.26  $\mu$ M de cobre y 0.32 mM de nitrato. La producción de las cumarinas en respuesta al estímulo es similar a la de una fitoalexína, en cambio, la producción del ácido sphaerálcico es característica de un metabolito secundario constitutivo.

A continuación, se evaluó si los compuestos antiinflamatorios obtenidos en la suspensión de *S. angustifolia* a nivel de matraces, se producen en el cultivo celular desarrollado en biorreactor de laboratorio con agitación mecánica. Las suspensiones produjeron escopoletina y tomentina con una tendencia similar a lo registrado a nivel de matraz; en cambio, las máximas producciones de ácido sphaerálcico se observaron a los 2 y 4 días de cultivo. En estos casos, con respecto a la producción registrada a nivel de matraz, la acumulación fue 20.2 y 78.1 veces mayor, y su excreción fue 6.5 y 16.9 veces superior, respectivamente.

## ABSTRACT

---

Inflammation is a physiopathological process associated with a great number of chronic degenerative afflictions, mainly rheumatic, cardiovascular, gastric, and neurological. Rheumatic diseases are one of the principal health problems worldwide; in Mexico, persons at productive employment age are those most affected by these diseases. Thus, it is a priority health theme and one of economic importance that motivates the search for novel anti-inflammatory agents that act on therapeutic targets-of-interest. Medicinal plants are a great source of compounds that possess chemical structural diversity with biological potential; therefore, the former can be utilized as medicaments or as a base for the production of these. An important number of plant have been utilized traditionally for the treatment of patients with diseases that lead to an inflammatory process; among these, *Sphaeralcea angustifolia* is highlighted. This species has the pharmacological support that sustains its traditional use, as well as clinical evaluation in patients with osteoarthritis of a standardized phytomedicament in the content of the anti-inflammatory, scopoletin. Although this, chemical studies on the species are scarce; thus, identifying and characterizing other compounds that contribute to the anti-inflammatory effect of *S. angustifolia* are important. Considering that the plant grows in isolated populations and its collection is controlled by the Mexican Ministry of the Environment and Natural Resources (SEMARNAT, NOM-007-RECNAT-1997), it was indispensable to find alternatives for obtaining the plant tissue and conserving the species. For this purpose, cultures were developed of morphogenetic calluses by means of which we achieved indirect micropropagation of the plant. Similarly, the cultures of cells in suspension producers of the active scopoletin compound were established. This system was employed to evaluate a strategy of stimulation, modifying the carbon:nitrogen equilibrium on reducing the content of nitrate in the Murashige and Skoog medium (MS) to 2.74 mM. This condition did not affect the growth of the cellular suspension, favored the production of scopoletin, and stimulated the production of another two phenolic-type compounds.

In this project, we initially proposed to isolate and identify the structure of the two compounds produced in the cellular suspension of *S. angustifolia* cultured in MS

medium with nitrate restriction, as well as to evaluate their effect on the formation of plantar edema induced with  $\lambda$ -carrageenan and auricular edema with 12-*o*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic data permitted the structural identification of tomentin (5-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin) and 2-(1,8-dihydroxy-4-isopropyl-6-methyl-7-methoxy) naphthoic acid, which was isolated and identified, to our knowledge for the first time, in cell cultures in suspension in a species of the *Sphaeralcea* genus, denominating this sphaeralcic acid. Both compounds inhibited the development of subplantar edema, an activity that was similar to that of the drug Indomethacin. In the auricular-edema model, the anti-inflammatory activity of tomentin was similar to that of the synthetic drugs (Indomethacin and Naproxen), while that of the sphaeralcic acid (ED<sub>50</sub> of 0.54 mg/ear) was significantly superior to the effect exhibited by the tomentin and the drug Naproxen.

Later, this study was focused on optimizing the production of the active compounds (scopoletin, tomentin, and sphaeralcic acid) produced in the cellular suspensions of *S. angustifolia*, without taking into account the behavior of cellular growth, the latter one of the factors associated with production. Thus, we proposed establishing optimal levels of nitrate and copper, which stimulates the attack of a pathogenic organism, employing Surface Response Methodology (SRM) as model.

During the Factorial Design (FD) stage, we determined that nitrate and copper levels in MS medium did not modify the speed of growth (0.317–0.389 days<sup>-1</sup>) or the duplication time (1.78–2.18 days) of the cellular suspension of *S. angustifolia*; notwithstanding this, the greatest cellular biomass (14.62 g/L) was obtained on increasing the nitrate content (2.74 mM) and decreasing that of copper (0.1  $\mu$ M). The greatest production of coumarins and sphaeralcic acid was observed on days 2 and 4 of culture, favoring by means of the interaction of nitrate and copper; the values of 2.74 mM of nitrates and of 2  $\mu$ M of copper were utilized as a base for establishing the Ascending design step (ADS).

In the ADS model, the growth of the cellular suspension was reduced 74% in the cultures developed with the greatest contents of both nutrients. Likewise, we determined that the copper concentration higher to 5.68  $\mu$ M in the MS medium inhibited growth in the cellular suspension, causing lysis and cell death. The production of coumarins and sphaeralcic acid generated an inflexion point of the curve and, in order to find the

optimal conditions, we evaluated the effect of the nitrate and copper in short concentration intervals. For completing the quadratic model (Central Composite Design [CCD]) and to find the optimal conditions of nitrate and copper, it was necessary to add to the FD four additional points (the Star Design [SD]), taking as point of origin the nutritional conditions of 2.74 mM of nitrate and of 2  $\mu$ M of copper.

In the CCD model, we determined that modification of nitrate and copper in the MS culture medium favorably modulated the production of tomentin, scopoletin, and sphaeralcic acid in cellular cultures in the *S. angustifolia* suspension. The interaction of 2.42 mM of nitrate and 1.81  $\mu$ M copper stimulates the greatest production of coumarins, registering levels of 236.45  $\mu$ g/L in biomasses and of 4,136.96  $\mu$ g/L in the MS medium on day 2 of culture. The interaction was not determined of the factors in the production of the sphaeralcic acid, predicting that the best conditions for their excretion was obtained with 0.32 mM of copper-free nitrates on day 4 (5,258.12  $\mu$ g/L) of culture, while its accumulation (756.91  $\mu$ g/L) was favored by the presence of 2.26  $\mu$ M of copper and 0.32 mM of nitrate. The production of coumarins in response to the stimulus is similar to that of a phytoalexin; on the other hand, the production of the sphaeralcic acid is characteristic of a constitutive secondary metabolite.

Next, we evaluated whether the anti-inflammatory compounds obtained in the suspension of *S. angustifolia* at the flask level in the cellular culture developed in the laboratory bioreactor with mechanical shaking. The suspensions produced scopoletin and tomentin with a tendency similar to that registered at the flask level; on the other hand, the maximal productions of sphaeralcic acid were observed on days 2 and 4 of culture. In these cases, with respect to the production registered flask level, the accumulation was 20.2 and 78.1 times greater, and its excretion was 6.5 and 16.9 times superior, respectively.

## **I. ANTECEDENTES**

### **1. Inflamación**

La inflamación es una respuesta inmune del organismo a un gran número de estímulos físicos (radiaciones, frío, calor, rayos UV), químicos (venenos y toxinas), biológicos (bacterias, virus, parásitos, hongos), ambientales, mecánicos (golpes, heridas, quemaduras) y/o a alteraciones inmunitarias (hipersensibilidad) o alteraciones vasculares (isquemia). La reacción inflamatoria es esencial para la supervivencia de los organismos, aunque en algunas situaciones y enfermedades tal reacción puede llegar a ser perjudicial para el organismo (<http://www.talukderbd.com/>).

La inflamación inicia en el tejido conectivo e involucra cambios vasculares, eventos celulares y la producción de mediadores químicos, con la finalidad de aislar y destruir al agente dañino. Todos estos componentes del sistema están estrechamente vinculados (Abbas y Lichtman, 2009).

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas. La fase aguda caracterizada por su breve duración, la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas y la migración de leucocitos, predominantemente neutrofilos. La fase crónica se caracteriza por una mayor duración, la presencia de linfocitos y macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis (Choyillas, 2000).

En el proceso inflamatorio después de una breve contracción de las arteriolas se produce vasodilatación, que es la causa del aumento de flujo sanguíneo y que provoca rubor, calor y un incremento de la permeabilidad vascular. Como consecuencia de estos eventos vasculares el flujo sanguíneo disminuye, provocando que los leucocitos (marginación) se sitúen sobre el endotelio vascular (rodamiento), se produce la adhesión leucocitaria y posteriormente la trasmigración, proceso mediante el cual los leucocitos (fundamentalmente neutrofilos en la inflamación aguda) atraviesan las paredes de los vasos sanguíneos. Una vez fuera del sistema vascular se produce el fenómeno de quimiotaxis, migrando los leucocitos hacia la zona de la lesión (Choyillas, 2000; <http://www.talukderbd.com/>).

El dolor se debe especialmente a la estimulación de las terminales nerviosas para las sustancias químicas o mediadores liberados.

En la zona de lesión, diversos factores favorecen la activación leucocitaria como las sustancias quimiotácticas en altas concentraciones, la fagocitosis y complejos antígeno-anticuerpo. La activación leucocitaria se caracteriza por la producción de metabolitos del ácido araquidónico (AA) debido al incremento de la actividad de fosfolipasa A2 (FLA2), por el diacilglicerol (DAG) y el calcio, generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y la

liberación del contenido lisosomal a causa de la lisis celular, lo cual conduce al daño celular y tisular (Choyillas, 2000).

## **1.1 Células mediadoras del proceso inflamatorio**

Existen dos tipos de células involucradas en la inflamación: unas se encuentran de manera permanente en los tejidos, como los mastocitos y las células endoteliales y otras migran al sitio afectado desde la sangre, como los neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos. Estas células producen una gran cantidad de moléculas activas que, de manera directa o indirecta, son mediadores del proceso inflamatorio (Gómez-Estrada et al., 2011). Los mediadores pertenecen a diferentes clases químicas aminas, lípidos y proteínas:

### **1.1.1 Aminas**

La histamina es una amina producida por basófilos y células cebadas, su liberación es estimulada por la bradiquinina y las moléculas del complemento C3a y C5a (moléculas plasmáticas con actividad proteolítica) para estimular la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la adhesión leucocitaria (Choyillas, 2000).

La serotonina se encuentra en las plaquetas y su liberación se estimula cuando éstas se agregan tras su contacto con el colágeno, la trombina, la adenosina difosfato (ADP) y los complejos antígeno-anticuerpo para estimular la permeabilidad vascular (Choyillas, 2000).

### **1.1.2 Lípidos**

Las prostaglandinas (PG) se producen a partir del ácido araquidónico (AA) por la acción de las enzimas ciclooxigenasas (COX), el cual es liberado de las membranas por la fosfolipasa A2 (FLA2) (Figura 1). Se ha demostrado que la FLA2 es de tipo secretora e inducible y su expresión se incrementa con la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (FN-kB). Se conocen dos formas de COX: la COX-1 es constitutiva y la COX-2 es inducida por citocinas y factores de crecimiento. Se ha comprobado que la activación del FN-kB está implicada en el incremento de la expresión de esta enzima. El producto final de la COX es un endoperóxido (PGH<sub>2</sub>) que por la acción de isomerasas es transformado en prostaglandinas. El principal efecto de las PGE<sub>2</sub> y la PGD<sub>2</sub> es incrementar la vasodilatación (Fylaktakidou et al., 2004; Abbas y Lichtman, 2009; Gómez-Estrada et al., 2011).

Los leucotrienos (LT) son eicosanoides producidos a partir del AA por la vía de la 5-lipoxigenasa (LOX) (Figura 1). El leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) se obtiene por hidrólisis enzimática del

leucotrieno A (LTA) en neutrofilos, eosinofilos, monocitos, macrófagos, células cebadas y queratinocitos. Las funciones del LTB<sub>4</sub> son uniones de receptores celulares, adhesión leucocitaria, quimiotáxis, activación leucocitaria y aumento de la permeabilidad vascular (Choyillas, 2000).

Los tromboxanos son eicosanoides derivados del ácido araquidónico por la acción de la enzima ciclooxigenasa (Figura 1). El tromboxano sólo es producido por las membranas de las plaquetas generado por la acción de la tromboxano sintetasa sobre endoperóxidos cíclicos de prostaglandinas. El TXA<sub>2</sub> actúa como un potente agregante plaquetario (el mayor descubierto hasta ahora) y vasoconstrictor, el cual a su vez se transforma en el tromboxano B<sub>2</sub>, que es inactivo, pero más estable que el anterior. Participa en los procesos de coagulación y agregación plaquetaria importante para cerrar heridas y hemorragias, además de ser un potente broncoconstrictor (Choyillas, 2000).

La bradicinina: es un péptido que se produce a partir de diferentes proteasas, pero la calicreina es la específica. La bradiquinina estimula la vasodilatación, la permeabilidad vascular, la liberación de interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) por los macrófagos, promoción de la síntesis de prostaglandinas y el dolor (Choyillas, 2000).

El factor activador de plaquetas (FAP) es un mediador bioactivo derivado de los fosfolípidos. Diversas células como plaquetas, basófilos y mastocitos, neutrofilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales producen FAP intracelular. Sus efectos en la inflamación son vasodilatación, aumento de la permeabilidad por contracción de las células del endotelio de las vénulas y es mil veces más potente que la histamina y la bradiquinina, factor quimiotáctico que estimula la adhesión leucocitaria (Choyillas, 2000).

### **1.1.3 Proteínas**

Las citosinas son un grupo multifuncional de sustancias mensajeras que transportan información de una célula a otra, son responsables de la activación del óxido nítrico sintasa y de la COX-2. Se han identificado más de 100 moléculas, generalmente pueden ser clasificadas como pro o antiinflamatorias dependiendo de la vía en la que participen. Entre las citosinas proinflamatorias tenemos la interleucina 1 $\beta$ , el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucinas IL-6 e IL-8 involucradas en la iniciación y amplificación de la inflamación; en el endotelio estas citosinas favorecen la expresión de moléculas de adhesión (integrinas, selectinas y adherinas), permitiendo su posterior migración tisular. Entre las citosinas antiinflamatorias se encuentran la IL-10, la IL-4, el factor- $\beta$  transformador de crecimiento (TGF-

$\beta$ ) y el activador natural del receptor de la interleucina 1 (IRA), encargados de modular negativamente el proceso inflamatorio (Choyillas, 2000).

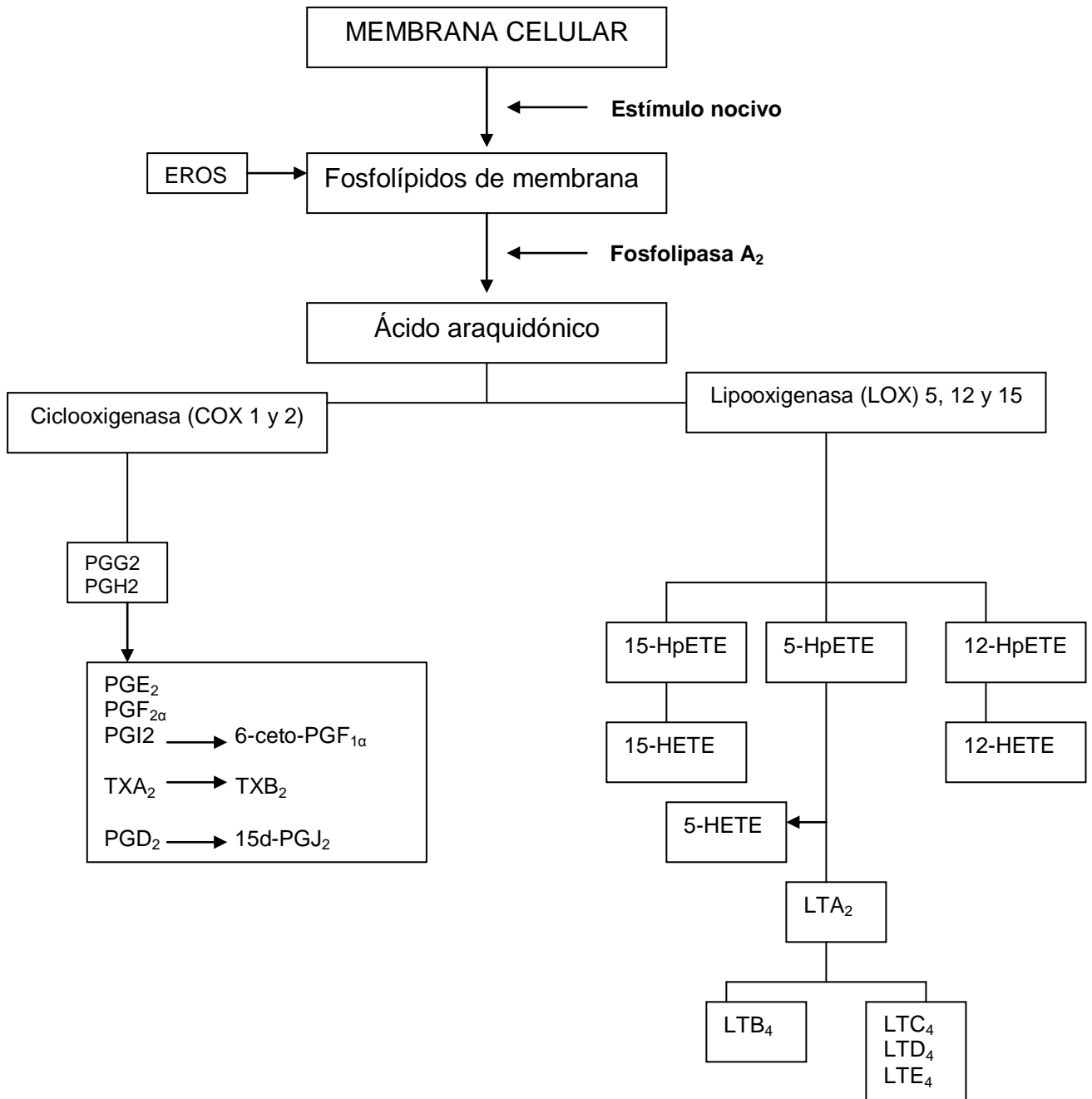


Figura 1. Proceso inflamatorio y mediadores de la inflamación.

La IL-1 y el TNF- $\alpha$  son producidos por los macrófagos activados y por las células T activadas. La IL-1 es sintetizada además por monocitos, macrófagos, células de Langerhans, células gliales, astrocitos, células epiteliales, células endoteliales, células mesangiales



glomerulares y linfocitos B. Sus principales efectos en la inflamación son aumento de la permeabilidad vascular y de la quimiotaxis (Choyillas, 2000).

El óxido nítrico (NO) es un mediador de la inflamación sintetizado por las células endoteliales, macrófagos y grupos neuronales específicos del cerebro. El NO tiene un mecanismo de acción parácrino sobre las células dianas mediante la inducción de monofosfato de guanina cíclico (GMPc) que, a su vez, inicia una serie de acontecimientos intracelulares que dan lugar a una respuesta como la relajación de las células musculares lisas de la pared vascular. El NO se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular y otros cofactores por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa. Se ha comprobado que la activación del FN-kB está implicado en el incremento de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducida (NOSi). El NO desempeña un papel importante en la función vascular durante las respuestas inflamatorias y provoca aumento de la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la quimiotaxis (Choyillas, 2000).

Un elemento importante en el mecanismo molecular de la inflamación es el FN-kB. La activación de esa familia de factores de transcripción juega un papel central en este proceso, ya que conduce a la activación de genes proinflamatorios incrementando la expresión de citocinas, COX-2, NOSi y FLA2 (Blantz y Murger, 2002; Sharma et al., 2007)

El sistema del complemento es uno de los componentes fundamentales de la respuesta inmunitaria, consta de un conjunto de moléculas plasmáticas implicadas en distintas cascadas bioquímicas, cuyas funciones son potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis de células incluyendo la apoptosis. Las funciones biológicas del complemento se incluyen en dos categorías generales: la lisis celular por el complejo de ataque a membrana (MAC) y los efectos biológicos de los fragmentos proteolíticos del complemento (Choyillas, 2000).

Los factores liberados del complemento afectan a diversos fenómenos en la inflamación: fenómenos vasculares que se ven afectados por C3a y C5a y aumentan la permeabilidad vascular y producen vasodilatación principalmente mediante la liberación de histamina desde los mastocitos. La C5a activa la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico en los neutrófilos y monocitos, la adhesión leucocitaria, la quimiotaxis (de neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos) y la activación leucocitaria (Choyillas, 2000).

Las enzimas lisosomales están presentes en neutrófilos y monocitos, y son liberadas a consecuencia de la lisis celular. Los neutrófilos presentan gránulos específicos que contienen lisozima, colagenasa, gelatinasa, lactoferrina, activador del plasminógeno, histaminasa y fosfatasa alcalina; y los granulos azurofilos que contienen mieloperoxidasa, factores

bactericidas (lisozima y defensinas), hidrolasas ácidas y proteasas neutras (elastasa, catepsina G, colagenasas inespecíficas y proteinasa). Las proteasas neutras pueden degradar colágeno, membranas basales, fibrina, elastina, y cartílago dando lugar a la característica destrucción tisular en los procesos inflamatorios purulentos y deformantes. Los monocitos y los macrófagos contienen hidrolasas ácidas, colagenasa, elastasa, fosfolipasa y el activador del plasminógeno (Choyillas, 2000).

Entre las moléculas de adhesión se encuentra a la E-selectina conocida como ELAM-1 está confinada al endotelio, P-selectina conocida como GMP140 o PADGEM está presente en el endotelio y en las plaquetas, L-selectina conocida como LAM-1 está en la mayor parte de los tipos de leucocitos. Las inmunoglobulinas son la molécula de adhesión endotelial intracelular tipo 1 (MAIC-1) y la molécula de adhesión celular vascular de tipo 1 (MACV-1) (Abbas y Lichtman, 2009).

Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas de adhesión transmembrana, también actúan como receptores de la matriz extracelular. Las integrinas FA-1 y MAC-1 son receptores para la MAIC-1 y las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) y  $\alpha 4\beta 7$  para la MACV-1. Se ha demostrado que la transducción de señales mediadas por integrinas incrementa la expresión de la IL-1, incrementa la activación del FN-kB generando mediadores de la inflamación, retarda el mecanismo de apoptosis en neutrófilos y favorece la quimiotaxis

La molécula de adhesión plaqueta- célula endotelial (MACP-1) pertenece a la superfamilia de los genes codificadores de inmunoglobulinas y es una de las moléculas de adhesión homofilas que están presentes en las uniones intercelulares del endotelio y juega un papel importante en la transmigración a través de las uniones intercelulares (Abbas y Lichtman, 2009).

#### **1.1.4 Especies reactivas de oxígeno (ERO)**

Las ERO son especies químicas muy reactivas, a partir de las cuales se producen reacciones en cadena que provocan la alteración de biomoléculas, la peroxidación de los lípidos de membrana, dañan células y tejidos. Las especies reactivas del oxígeno son el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ). Estas especies reactivas se forman en el organismo como parte de procesos metabólicos entre los que se encuentran: la cadena de transporte electrónico, la descarga respiratoria de los fagocitos, la reacción de la xantina oxidasa y el sistema enzimático del citocromo P450 (Fubini y Hubbard, 2003).

Los procesos de oxidación generan radicales libres en el organismo e incrementan o disminuyen las defensas antioxidantes, produciéndose lo que se conoce como estrés oxidativo. Este proceso está vinculado a un grupo de enfermedades, entre las cuales se encuentran el Parkinson, el Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, daño por isquemia, choque circulatorio, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, diabetes, cataratas, daño por radiaciones, el síndrome de respuesta inflamatoria y el envejecimiento (Kalra et al., 1994).

Las ERO pueden ser liberadas al espacio extracelular por los leucocitos tras la exposición a agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o estimulación fagocitaria. Su producción depende de la activación del sistema oxidativo NADPH provocando un aumento de la expresión de citocinas y de las moléculas de adhesión leucocitaria endotelial con el aumento de la permeabilidad vascular provocado por el aumento de la producción de superóxido (Kalra et al., 1994).

Se ha comprobado que el incremento de las EROS está relacionado con la activación del FN-kB el cual es muy importante en la inflamación, ya que controla la transcripción de genes que codifican la expresión de IL-1, TNF- $\alpha$ , proteínas de la fase aguda, factores de crecimiento y la expresión COX-2, NOSi y FLA2s (Seo et al., 2002).

## **1.2 Agentes antiinflamatorios**

### **1.2.1 Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides**

Los esteroides o glucocorticoides son los antiinflamatorios más potentes, actúan reduciendo el número y la activación de eosinófilos, desencadenando apoptosis, disminuyendo factores quimiotácticos que incluyen las IL-3 y 5, el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos. Con su acción también se reduce la liberación de linfocitos T, IL-2, mastocitos (células presentadoras de antígeno) y células dendríticas. Estos efectos son producidos por diversos mecanismos, que incluyen entre otros, la síntesis de proteínas con efecto antiinflamatorio y la inhibición de síntesis de factores proinflamatorios y de crecimiento. En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona y mometasona, entre otros (Gómez-Estrada et al., 2011).

### **1.2.2 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)**

Son un grupo de sustancias cuyo efecto es inhibir la síntesis de prostanglandinas a través de la inhibición de la enzima COX 1. Algunos también exhiben acciones antipiréticas y analgésicas. Estos se agrupan en:

- Salicilatos: Ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, acetilsalicilato de lisina, diflunisal, sulfazalacina o salicilazo sulfapiridina, salicilato de sodio y salicilamida.
- Pirazolonas y análogos: Fenilbutazona, pirazinobutazona o feprazona, antipirina o fenasona, aminopirina, dipirona, oxifenbutazona, gamacetofenilbutazona, carudol clofenazona, bumadizona, suxibuzona, azapropazona y metamizol.
- Paraminofenol: Paracetamol o acetaminofeno y fenacetina.
- Derivados indolacéticos (Indoles): Indometacina, benzidamina, sulindac, acemetacina, proglumetacina y talmecacina.
- Derivados arilacéticos o fenilacéticos: Diclofenaco, pirrolacético (ketorolaco), piranoacético (etodolac) y clometacina.
- Fenamatos o arilantranilicos: Ácido mefenámico, flufenámico, niflúmico, flufenamato de aluminio, talniflumato, floctafenina, glafenina, meclofenamato, ácido tolfenámico, ácido meclofenámico y tolfenámico.
- Derivados arilpropiónicos: Ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, indoprofeno procetofeno, fenbufen, piroprofeno, suprofen, flurbiprofeno, fenilpropionato de lisina, fenoprofeno y ácido tiaprofénico.
- Oxicanes: Piroxicam, tenoxicam, sudoxicam, isoxicam y meloxicam.
- Derivados del ácido nicotínico: Clonixinato de lisina y isonixina.
- Derivados de la naftilalcanonas: Nabumetona.
- Derivados de ácidos heterocíclicos: Oxaprozin.
- Derivados de la sulfonilida: Nimesulida.
- Derivados de las benzoxazocinas: Nefopam.
- Analgésicos opiáceos: Morfina, meperidina, fentanilo, nalorfina, metadona y naltrexona.
- Inhibidores selectivos de COX-2: Celecoxib.

A principios del año 2000 fueron introducidos al mercado los AINEs más selectivos como celecoxib, rofecoxib, etorixib, valdecoxib y meloxicam. En Estados Unidos fue aceptado el uso de celecoxib por la FDA (Food and Drug Administration) para el manejo del dolor y la inflamación crónica como la artritis, osteoartritis, dolor post quirúrgico y recientemente como inhibidor del crecimiento tumoral. Sin embargo, los COX-2 a excepción del celecoxib, fueron retirados del mercado debido a los efectos adversos cardiovasculares (Gómez-Estrada et al. 2011).

### **1.3 Modelos farmacológicos de evaluación antiinflamatoria**

#### **1.3.1 Modelos de inflamación *in vitro***

Los ensayos de evaluación de la actividad antiinflamatoria están dirigidos a cuantificar la expresión de enzimas y/o mediadores antiinflamatorios tales como: enzima beta secretasa 1 (BACE-1), proteína C reactiva (PCR), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), la molécula de adhesión del leucocito al endotelio (ELAM-1), la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1), la metaloproteinasa de la matriz (MMP), el factor nuclear kappa Beta (NF- $\kappa$ B), la ornitina descarboxilasa (ODC), las señales de transducción y los activadores de proteínas de transcripción (STAT), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), las moléculas de adhesión de las células vasculares (VCAM) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) entre otros bioensayos (Morris, 2003; Winyard y Willoughby, 2003; Gómez-Estrada et al., 2011).

#### **1.3.2 Modelos de inflamación *in vivo*.**

Los modelos utilizados para la evaluación de la inflamación aguda y subaguda son el eritema por exposición a luz UV en cobayos, permeabilidad vascular, edema auricular inducido con Oxazolona en ratones, edema auricular inducido con esteres de forbol en rata o ratón, edema plantar inducido con carragenina en ratas y la técnica del granuloma (Gómez-Estrada et al., 2011; Patel et al., 2012).

##### **1.3.2.1 Edema plantar inducido con carragenina**

Es uno de los métodos más utilizados para la evaluación de fármacos antiinflamatorios debido a su rapidez y reproducibilidad. Esta técnica se basa en la evaluación de muchos agentes que inhiben la formación del edema producido en la zona plantar de la rata o del ratón, después de la inyección del agente flogístico (irritante) como son el formaldehído, el dextrán, la albumina de huevo, el caolín, la naftoilheparamina y la carragenina- $\lambda$  (Gábor, 2000).

Los carragenanos son una mezcla compleja de polisacáridos naturales como el almidón, la celulosa y la quitina que conforman la estructura de las paredes celulares (celulosa) de algunas algas rojas. Las carrageninas están formadas por unidades de galactosa y/o de anhidrogalactosa, sulfatadas o no, unidas por enlaces alternos a (1-3) y b (1-4). Dependiendo del grado de sulfatación, de las posiciones de los grupos sulfato y de la presencia de grupos de anhidrogalactosa se distinguen las carrageninas, cada una con propiedades hidrocoloides distintas. A mayor proporción de grupos sulfato, la solubilidad es mayor, y a mayor

proporción de grupos de anhidrogalactosa la solubilidad es menor. Aunque existen alrededor de 12 tipos de carrageninas los tres tipos más importantes son kappa (k), lambda ( $\lambda$ ) e iota (i) ([www.agargel.com](http://www.agargel.com)).

Desde la década de 1980, una parte importante de la producción mundial de carrageninas se obtiene mediante cultivos de algas de las especies *Kappaphycus alvarezii* y *Eucheuma denticulatum*. La carragenina-k y la carragenina-i son capaces de formar geles, y han sido ampliamente utilizadas como gelificantes en la industria alimentaria para la formulación de lácteos. La carragenina- $\lambda$  no gelifica fuertemente a temperatura ambiente y es muy utilizada para inducir una respuesta inflamatoria ([www.agargel.com](http://www.agargel.com)).

El modelo de edema subplantar inducido por carragenina consiste en la administración subcutánea de una solución de carragenina- $\lambda$  a través de la aponeurosis plantar de la rata, provocando una reacción inflamatoria mediada por la liberación de diversos eicosanoides (prostanglandinas, leucotrienos y tromboxanos); además, diversos factores del complemento implicados en la amplificación de la respuesta. Tales agentes se pueden generar en el sitio afectado por las células infiltradas a la zona de daño. Los signos clínicos de la inflamación edema, hiperalgesia y eritema se desarrollan inmediatamente después de la inyección subcutánea del agente proinflamatorio (Patel et al., 2012).

Una hora después de administrada la carragenina, la histamina y la serotonina tienen un papel principal como mediadores. Aproximadamente entre 1.5 a 2 horas después de la administración de la carragenina intervienen como mediadores las citosinas, la bradicinina, la migración de leucocitos polimorfonucleares y neutrofilos y en la última fase la activación de prostanglandinas (PGE1 y PEG2). La respuesta vascular máxima ocurre aproximadamente entre las 3 y 4 horas después de la administración de carragenina y coincide con la fase mediada por las prostanglandinas, mientras que la extravasación de proteínas ocurre durante toda la respuesta al agente edematógeno (Winter et al., 1962; Sughisita et al., 1981; Morris, 2003; Winyard y Willoughby, 2003).

La respuesta inflamatoria se cuantifica normalmente por el aumento en el tamaño de la pata (edema), cuyo efecto máximo es alrededor de 5 h posteriores a la administración de carragenina (Winter et al., 1962; Sughisita et al., 1981; Morris, 2003; Winyard y Willoughby, 2003).

### **1.3.2.2 Edema auricular inducido con 12-O-tetradecanoilforbol (TPA)**

El modelo de edema auricular inducido por ésteres de forbol se basa en la aplicación de un agente irritante en la oreja del ratón. Los agentes inflamatorios más utilizados son el PMA

(acetato de forbol miristato) y los ésteres de forbol que se extraen del aceite de crotón (*Croton tiglium* L. El TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) es el más potente de todos, este posee propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotora de tumores (Winyard y Willoughby, 2003; Patel et al., 2012).

Son sustancias capaces de provocar inflamación local caracterizada por vasodilatación, eritema, edema y filtración de leucocitos polimorfonucleares durante las 3 y 4 horas después de administrado del agente tóxico. El TPA es capaz de activar a la proteína quinasa C (PKC) que a su vez activa otra cascada de enzimas, tales como las MAPK (proteína quinasa activadora de mitógeno) y fosfolipasa A2 (PLA2) que conducen a la liberación del factor de activación plaquetario (PAF) y del ácido araquidónico (AA). También se promueve la liberación de histamina y serotonina, así como la síntesis de eicosanoides (prostanglandinas, leucotrienos y tromboxanos) mediada por la activación de las enzimas lipoxigenasa (LOX) y ciclooxigenasas (COX) (Patel et al., 2012).

A nivel histológico, se produce agregación plaquetaria y adherencia de compuestos polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos), migración a la dermis y degranulación de mastocitos. También se observa la acumulación y migración de leucocitos al epitelio. A partir de 24 h se incrementa la mitosis celular en la membrana basal epidérmica, lo que conlleva a una hiperplasia y engrosamiento epidérmico aparente (Gómez-Estrada et al., 2011).

Este modelo es sensible a fármacos con diferentes mecanismos de acción, algunos ejemplos son la indometacina; funciona como inhibidor de las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), ketorolaco (derivado del ácido acético, inhibidor de prostanglandinas) y naproxeno (inhibidor de prostanglandinas) (Sughisita et al., 1981; Gábor, 2000).

#### **1.4 Plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la inflamación**

Los productos naturales ofrecen una gran diversidad de estructuras químicas con potencial biológico, éstas pueden ser utilizadas como medicamentos o como base para su producción. La utilización de las plantas medicinales en el tratamiento de diversas reacciones inflamatorias, como el reumatismo son prácticas comunes en la medicina tradicional. Hoy en día el enorme interés por el uso de sustancias antiinflamatorias de origen vegetal va en aumento, en algunos casos ofrecen ventajas en relación a los fármacos comerciales, como la baja incidencia de efectos secundarios. Existen muchos trabajos en los cuales se ha evaluado la actividad antiinflamatoria tanto de extractos como de compuestos puros en diferentes modelos de inflamación *in vitro* e *in vivo* (Gómez-Estrada et al., 2011).

Entre las drogas vegetales más utilizadas para el tratamiento de patologías relacionadas con la inflamación (reumatismo) se pueden citar la corteza del sauce (el glicósido salicilina) obtenida la especie del género *Salix sp*, a partir de la cual fue obtenida la aspirina o ácido acetilsalicílico, fármaco no esterooidal (ANIE) de la familia de los salicilatos, utilizado frecuentemente como antiinflamatorio, analgésico y antipirético (Gómez-Estrada et al., 2011).

La especie *Aesculus hippocastanum* (aescina, mezcla de saponinas triterpénicas) actúa como inhibidor de la actividad de PLA-2 y antagonista del receptor 5-HT<sub>2</sub>, *Allium sativum* (compuestos fenólicos obtenidos del extracto acuoso) actúa como inhibidor de moléculas de adhesión y antioxidante; *Aloe vera* (el cristal de sábila, taninos y otras sustancias antioxidantes) inhibe la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; *Annona squamosa* (flavonoides, terpenos, alcaloides, quinonas, cumarinas, antocianidinas) poseen actividad antiinflamatoria y analgésica; *Brassica nigra* (sinigrina, derivados de fenilpropanos, ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico) poseen actividad antiinflamatoria; *Curcuma longa* (curcumina) es inhibidor de moléculas de adhesión, TNF- $\alpha$  y NF-K $\beta$ ; *Justicia pectoralis Jacq.* planta medicinal utilizada en Brasil como analgésico y antiinflamatorio en el cual se han identificado la cumarina y la umbeliferona; *Kigelia africana* (verminósido y verbascócido) modulador de la producción de NO, PGE2 y de la expresión de la enzima (óxido nítrico sintasa, iNOS), inhibidor de enzimas proinflamatorias; *Harpagophytum procumbens* (éster de ácido cinámico, prucumbido) inhibidor de la expresión de iNOS y COX-2 a través de la activación de NF-K $\beta$  y la raíz de malvasisco (*Althaea officinalis*) especie utilizada desde la antigüedad para el tratamiento de inflamación en el aparato digestivo (Gómez-Estrada et al., 2011).

Actualmente se comercializan varios agentes antiinflamatorios elaborados con extractos de plantas, algunos ejemplos son: Aloe Vera Cream (*Aloe barbadensis*, *Aloe vera* Ext. 2%), Árnica Cream (*Arnica montana* 1%), Crema Artimin (*Harpagophytum procumbens*, *Uncaria tomentosa*), Gout Fórmula (Ortiga, Amor del hortelano, Jengibre, Apio, Bardana, Alforfón), Harpagin Harpagofito: *Harpagothyum procumbens* 175 mg, Sauce *Salix alba* 52.5 mg, Cola de caballo *Equisetum arvense* 52.5 mg, Enebro *Juniperus communis* 35 mg y Rusco *Ruscus aculeatus* 35 mg, Yuca (tallo de *Yuca schidigera* 490 mg), Pomada de copaiba (*Copaifera paupera*), Pomada de ajo sancha (*Mansoa alliacea*), Pomada de chuchuwasi (*Maytenus macrocarpa*), Ungüento natural (*Ruta graveolens*, *Eucalyptus globulus*, *Mansoa alliacea*, *Eugenia aromatica*, *Cinnamomum zeylanicum*) y Traumeel (*Arnica montana* 1.5 g, *Calendula officinalis* 0.45 g, *Hamamelis virginiana* 0.45 g, *Echinacea angustifolia* 0.15 g y *E. purpurea* 0.45 g). Sin embargo, son pocos los fitomedicamentos que existen en el mercado como: Cúrcuma de



Lamberts (extracto estandarizado de la raíz, aporta un 95% de curcumina) y Ortiga (extracto estandarizado de hoja de ortiga (1% de ácido silícico) (<http://www.hipermercadocultural.com>).

## 2. *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don

### 2.1 Características morfológicas

*Sphaeralcea angustifolia* (Figura 2) es una hierba erecta o arbusto de aproximadamente 1.5 m de alto cubierto por diminutos pelos ramificados (tricomas). Las hojas miden hasta 12 cm de largo y se encuentran en posición alterna, son angostamente lanceoladas y presentan un margen foliar dentado, a veces con 2 lóbulos hacia la base. Las inflorescencias se observan en racimos en las axilas de las hojas superiores. Los pedicelos que sostienen las flores son usualmente más cortos que el cáliz. Tres bractéolas lineares (más cortas que el cáliz) se encuentran en la base de cada flor formando el cálculo. En las flores, el cáliz puede medir hasta 8 mm de largo y está formado por 5 sépalos unidos en la base; la corola de 8 a 12 mm de largo es de color morados o azul-rosados y está formada por 5 pétalos; los estambres están unidos en la base formando una columna de color púrpura; estilos 10 a 16 (Gleason y Cronquist, 1963; Martínez, 1979; Calderón-Rzedowski y Rzedowski, 2001).

En algunos lugares de E.U.A. se observan flores color cobre o salmón, un color que no se observa en el centro de México, por lo cual se conoce en inglés con el nombre de “copper globenallow”. Los frutos son de tipo esquizocarpos, globosos, ápice hendido y envueltos en el cáliz. Están compuestos por 10 a 16 mericarpos que en la madurez se abren hacia la parte superior, cada mericarpo puede contener de 1 a 3 semillas usualmente glabras (Gleason y Cronquist, 1963; Calderón-Rzedowski y Rzedowski, 2001; <http://www.conabio.gob.mx/>).



Figura 2. Planta completa (a), flor (b), haz y envés de la hoja de *Sphaeralcea angustifolia* (c). Fotografías tomadas del invernadero y jardín del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS).

## 2.2 Clasificación taxonómica

Reino Plantae

Subreino Tracheophyta

Superdivisión Spermatophyta

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Malvales

Familia Malvaceae

Género *Sphaeralcea*

Especie *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don

([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)).

## 2.3 Sinonimias

*Diadesma stellata* Rafin, *Malva angustifolia* Cav, *Malva stellata* D. Dietr, *Malvastrum angustifolium* Hemsl, *Malveopsis angustifolia* Kuntze, *Phymosia cuspidata* (Gray) Britt, *Sida stellata* Torr, *Sphaeralcea angustifolia* subsp. *cuspidata* (Gray) E. Murray, *Sphaeralcea angustifolia* var. *cuspidata* A. Gray, *Sphaeralcea angustifolia* var. *lobata* (Woot.) Kearney, *Sphaeralcea angustifolia* subsp. *lobata* (Woot.) Kearney, *Sphaeralcea angustifolia* var. *oblongifolia* (A. Gray) Shinnars, *Sphaeralcea cuspidata* (Gray) Britt, *Sphaeralcea emoryi* var. *nevadensis* (Kearney) Kearney, *Sphaeralcea emoryi* subsp. *nevadensis* Kearney, *Sphaeralcea lobata* Woot, *Sphaeralcea stellata* Torr. & Gray y *Sphaeroma angustifolium* Schtdl (<http://www.catalogueoflife.org/>).

## 2.4 Distribución y Usos etnobotánicos

*Sphaeralcea angustifolia* crece en forma natural en climas cálidos, semicálidos, áridos y templados entre los 1890 y los 3900 msnm. Esta especie está asociada a pastizales, bosque de encino, pino, pino-encino, matorrales xerófilos y a terrenos agrícolas con una distribución disyunta. Se localiza en la parte occidental de Estados Unidos, en Argentina y países adyacentes, en el Norte y centro de México (Martínez, 1979; Villaseñor y Espinosa, 1998; McVaugh, 2001).

En México, a la planta se le conoce con diferentes nombres comunes dependiendo de la region donde crece; en la zona del Valle del Mezquital Hidalgo es “hierba de vara de San José”, en el Estado de México “hierba del negro” (Aguilar et al., 1994) y duraznillo cimarrón en Querétaro (Arreguin et al., 1997). También se conoce como cordón, hierba negra, hierba del

golpe, pintapan y en lengua nahuatl con el nombre de tlixihuitl" (Martínez, 1979; Villaseñor y Espinosa, 1998; McVaugh, 2001).

*S. angustifolia* es una planta medicinal de uso antiguo para controlar la diarrea, lavar heridas y disminuir la inflamación. En el siglo XVI, la raíz masticada se empleaba para mitigar el dolor de las encías, afirmar los dientes y expeler la mucosidad; la raíz en polvo en el tratamiento de la diarrea y flujos del cuerpo. Para casos de diarrea crónica se recomienda preparar una cocción de la planta junto con manzanilla (*Matricaria recutita*), sábila (*A. vera*) y yerbabuena (*Mentha spicata*) (Argueta et al., 1994).

La raíz es utilizada para limpiar la matriz y los riñones; además, se recomienda para tratar la disentería y quitar ronchas del cuerpo. En Durango y Aguascalientes esta especie se utiliza en golpes colocando la planta machacada con unas gotitas de aceite en la zona lesionada y cubriéndose con un lienzo; de igual forma se aplica esta preparación para torceduras o quebraduras. Asimismo, se recomienda bañarse con el cocimiento de las ramas cuando hay dolores de estómago, para lavar heridas, contra caída del cabello (en Guanajuato) o también para lavar el cabello y evitar su caída (Guanajuato). Además, se recomienda beber la infusión de las hojas para el tratamiento de la hipertensión, como antitusígeno y también cuando hay pujo en los niños (Argueta et al., 1994).

## 2.5 Estudios fitoquímicos y farmacológicos

El estudio farmacológico preliminar, en el que se evaluó el efecto antiinflamatorio de los extractos de catorce plantas utilizando el modelo del edema plantar inducido con carragenina en rata, demostró que el extracto clorofórmico de *S. angustifolia* inhibe la formación del edema, tanto en la fase temprana como en la fase tardía del proceso inflamatorio agudo (Meckes et al., 2004). Posteriormente, el extracto de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) se evaluó en diferentes modelos de inflamación crónica y se demostró que inhibe la respuesta inflamatoria en el modelo del edema auricular inducido con dosis múltiples de TPA aplicado por vía tópica. Asimismo, la administración intraperitoneal de dosis repetidas del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  produjo un importante efecto antiinflamatorio en el modelo de poliartritis inducida en la rata con el adyuvante de Freud (AFC), tanto en la fase aguda (1-12 días) como en la fase crónica (después de 12 días de administrado el inmunógeno) (García, 2006).

La actividad antiinflamatoria valorada por vía transdermal a dosis de 100 y 250 mg del extracto diclorometano por parche, permitió corroborar el uso popular atribuido a la planta como un antiinflamatorio, así se demostró que el extracto no producía irritación en la piel del conejo. La dosis letal cincuenta ( $\text{DL}_{50}$ ) en el ratón fue de 285 mg/kg (García, 2006).

El fraccionamiento químico biodirigido del extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  permitió la identificación de la escopoletina como el principio activo que, en interacción con otros de los constituyentes en el extracto como  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol,  $\alpha$  y  $\beta$ -amirinas y ácido *trans*-cinámico (Figura 3), serían los responsables del efecto biológico (García, 2006; García et al., 2012). Más tarde se identificó la presencia del lolilido (monoterpeno) en el extracto metanólico de las partes aéreas de la planta (Osti-Castillo et al., 2010).

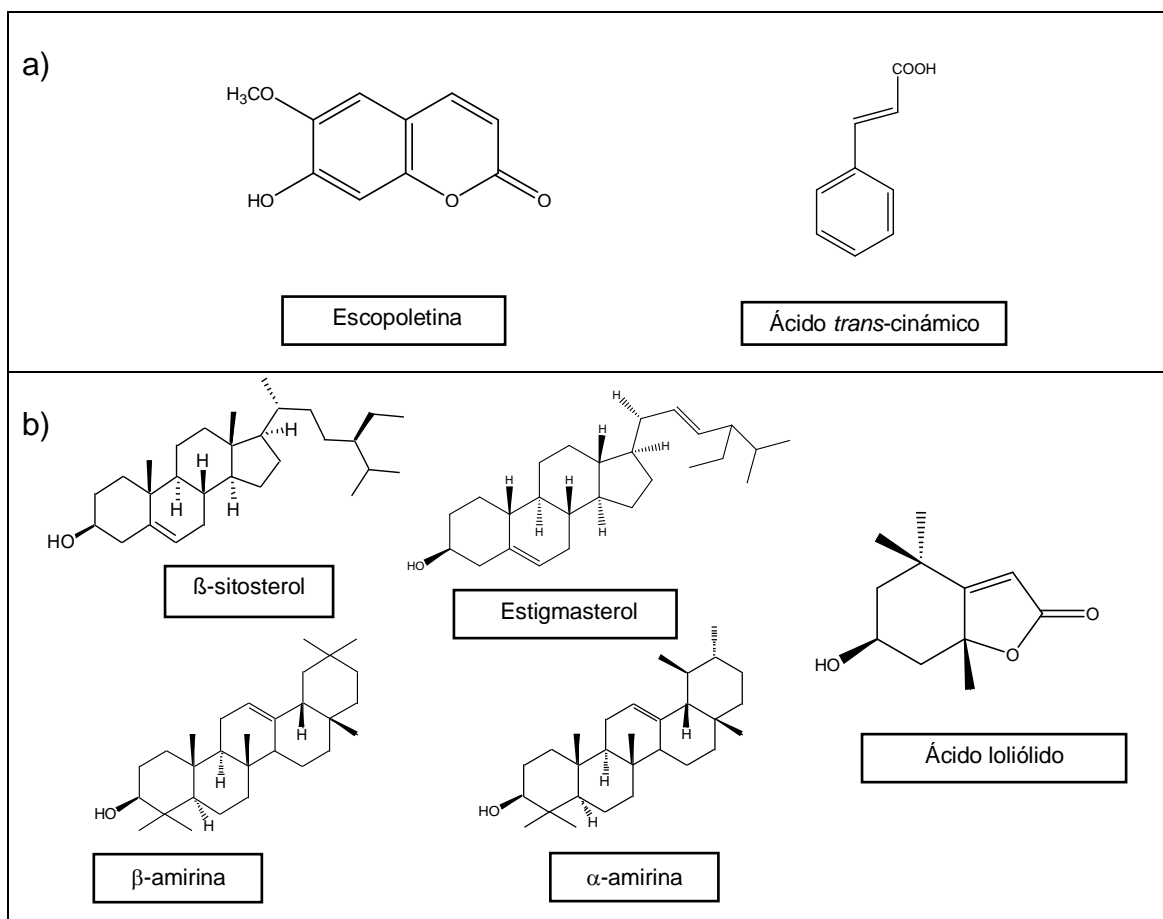


Figura 3. Metabolitos secundarios identificados en *Sphaeralcea angustifolia*, a) compuestos fenólicos y b) terpenos (Osti-Castillo et al. 2010; García-Rodríguez et al., 2012).

La actividad antiinflamatoria de los compuestos identificados en estas fracciones (escopoletina y  $\beta$ -sitosterol) se evaluó utilizando referencias comerciales. La potencia del efecto del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y de la escopoletina fueron muy cercanas ( $\text{DE}_{50}$ =640 y 660  $\mu\text{g}/\text{oreja}$ , respectivamente) y el  $\beta$ -sitosterol fue significativamente menos activo (Dosis efectiva media,  $\text{DE}_{50}$ =1,610  $\mu\text{g}/\text{oreja}$ ) (García, 2006).

Posteriormente, utilizando el modelo de inflamación de poliartritis inducido con AFC y por medio de ELISA se cuantificaron algunas citocinas pro y antiinflamatorias características en un proceso de inflamación crónica. Los resultados en estos estudios demostraron que el extracto inhibe los niveles séricos de la interleucina IL-1 $\beta$  en un 80%, IL-6 en 44% y en 59% se inhibieron los niveles de TNF- $\alpha$  en líquido sinovial. A su vez, se observó un incremento de IL-10 sérica, lo que sugiere que el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> modula la respuesta a nivel de citocinas pro y antiinflamatorias (Juárez et al., 2008). Los resultados se compararon con los obtenidos en la evaluación del efecto del extracto sobre la expresión de genes utilizando la técnica de microarreglos, determinándose una regulación negativa del proceso inflamatorio a través de la supresión de NF- $\kappa$ B, IL-R $\alpha$ , IL-12, IL-12R, CXCR4, IL-6, MNP-9, MMP-13 Hsp70 y moléculas de adhesión (Juárez et al., 2008).

## **2.6 Estudios clínicos**

Dentro de la vasta gama herbolaria *S. angustifolia* es una especie vegetal promisoría que cuenta con la plataforma científica que sustenta el desarrollo de un fitomedicamento útil como antiinflamatorio. La administración tópica de la formulación en gel elaborado con 1% del extracto estandarizado de *S. angustifolia* en el contenido de escopoletina, mostró efectividad terapéutica y tolerabilidad en pacientes administrados con osteoartritis de mano, con un efecto similar al observado en los pacientes tratados con diclofenaco al 2%. Los resultados hacen evidente que el producto evaluado fue capaz de reducir los síntomas de la enfermedad como el dolor, inflamación y rigidez de las articulaciones. El efecto fue consistente y gradual promoviendo la capacidad del movimiento de las manos en los pacientes (Romero et al., 2013).

## **2.7 Estudios biotecnológicos**

Estos antecedentes validaron la aplicación de procedimientos biotecnológicos para la micropropagación y obtención de cultivo de tejido desdiferenciado (callo) utilizando explantes de hoja de la planta, en presencia de diferentes concentraciones de ácido naftalénacético (ANA- 0.5, 1 y 2 mg/L) en combinación con 0.1 mg/L de cinetina (CN), así como con concentraciones variables de CN (1-5 mg/L) en combinación con 0.1 mg/L de ácido indolacético (AIA) (Pérez, 2007).

Los cultivos callogénicos derivados con la auxina ANA en cualquiera de las concentraciones utilizadas en combinación con CN, así como los derivados con las concentraciones más altas de CN (4 y 5 mg/L) en combinación con AIA, presentaron un proceso de organogénesis indirecta a diferentes tiempos de cultivo. Cuando se eliminó la auxina

del medio de cultivo en los tratamientos con concentraciones altas de CN, la respuesta morfogénica disminuyó (Pérez, 2007).

La respuesta morfogénica de los callos derivados con ANA se incrementó al extenderse los subcultivos, a diferencia de los callos derivados con CN donde la morfogénesis disminuyó. Después de cierto periodo de cultivo, fue posible observar la formación de brotes adventicios. El mayor porcentaje (69%) de brotes adventicios se obtuvo en los callos derivados con 0.5 mg/L de ANA; en tanto que, en los cultivos morfogénicos obtenidos con la concentración más alta (2 mg/L) se desarrolló un mayor número de brotes por callo (Pérez, 2007).

Los cambios morfológicos externos observados en los cultivos de callo morfogénicos se correlacionaron con los eventos generados en la estructura interna de los mismos. Así, fue posible observar células parenquimáticas en un plano desorganizado, las cuales se fueron agregando hasta formar una estructura organizada con la subsecuente formación de tejido vascular de *novo*. Posteriormente, se visualizó la presencia de tejido meristemático que correspondió con la formación de primordios foliares y la generación final de los brotes (Pérez, 2007).

Con base a las características de coloración (verde) y textura (friable), el cultivo de callo desarrollado con 1 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de CN (línea C-1), se utilizó para establecer la suspensión celular empleando un sistema de cultivo tipo lote. Posteriormente, se desarrollaron diferentes cinéticas de crecimiento utilizando tres diferentes concentraciones de nitrato en el medio de cultivo: MS completo con 27.4 mM y la reducción a 2.74 y 0.274 mM. El cultivo en el medio MS completo conservó las características iniciales de la suspensión celular (células libres y pigmentación verde), en tanto que en los cultivos desarrollados en el medio MS con el contenido de nitrato reducido, se formaron aglomerados celulares y se tornaron de color café. Los cultivos mostraron un patrón de crecimiento sigmoideo, velocidades de crecimiento y tiempos de duplicación similares; sin embargo, el índice de crecimiento y la biomasa máxima desarrollada disminuyeron conforme se redujo la concentración de nitrato en el medio (Pérez, 2007).

Las suspensiones celulares desarrolladas en el medio MS con 27.4, 2.74 y 0.274 mM de nitratos produjeron escopoletina, compuesto responsable de la actividad antiinflamatoria validada en *S. angustifolia*. La mayor producción de escopoletina se determinó en la suspensión celular desarrollada en medio MS con 2.74 mM de nitrato, con el máximo contenidos en biomasa de 86.84 µg/L a los 16 días del cultivo y una liberación al medio de cultivo de 1.55 mg/L desde el segundo día de cultivo (Pérez, 2009).

### 3. Metabolismo secundario en plantas

Las plantas no poseen un sistema inmunológico como tal, no obstante presentan un mecanismo de defensa complejo, variado y dinámico, resultado de un largo proceso evolutivo. Las plantas resisten a las condiciones de estrés mediante diferentes estrategias de defensa, que pueden ser constitutivas (histológicas o químicas) o inducidas por factores externos. Las defensas constitutivas incluyen barreras físicas, procesos de lignificación, suberización y formación de calosas; así como también, la presencia de espinas, tricomas, espigas y pelos glandulares. Estas barreras pueden estar presentes en determinadas etapas o en todo el ciclo biológico de la planta o bien formarse como mecanismo protector (Montes-Belmont, 2009).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no tienen una función directa en los procesos fundamentales para mantener la vida de un organismo, pero funcionan como intermediarios metabólicos en la interacción de la planta con su ambiente para su sobrevivencia. Se sintetizan en pequeñas cantidades y en algunos casos se consideran como un producto de diferenciación en grupos taxonómicos (Brunneton, 1999, Dewick 2002; Sepulveda et al., 2003).

La defensa mediante compuestos químicos tiene dos vertientes: aquellos compuestos que están estructuralmente presentes en todas las etapas del desarrollo de las plantas, en alguna fase de su ciclo biológico o bien que son producidos después de la exposición a un estímulo a partir de compuestos ya existentes son los denominados metabolitos secundarios constitutivos. Estos compuestos se pueden encontrar siempre en concentraciones bajas normalmente e incrementarse en respuesta al estímulo, o bien pueden encontrarse en las plantas en una forma inactiva y ser transformados en productos activos por medio de reacciones bioquímicas cortas y simples como la hidrólisis enzimática (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Montes-Belmont, 2009).

La defensa inducida es un sistema complejo que parte desde una señal química o estimuladora que desencadena la producción de enzimas del metabolismo secundario. Está constituida por un grupo de compuestos sintetizados únicamente en respuesta al ataque de un patógeno, o una situación de estrés, cuya presencia está restringida al tejido dañado y a las células adyacentes son las llamadas fitoalexinas. Estos compuestos son sintetizados a partir de un redireccionamiento de precursores del metabolismo primario, en función de la expresión *de novo* de genes correspondientes a enzimas que participan en las rutas biosintéticas, como la L-fenilalanina-amonialiasa (PAL), 4-coumarato: Coenzima A ligasa (4CL) y chalcona sintasa (CHS) que controlan pasos importantes en las rutas de síntesis. Comúnmente cada una de estas enzimas es codificada por una familia de genes, en las que se ha demostrado que la

estimulación o la infección de células, induce a la vez la expresión de varios genes de la misma enzima. Se ha señalado la existencia de tres genes PAL en frijol, detectándose hasta 11 isoformas de la enzima, lo que sugiere modificación post-traducciona, permitiendo diversas actividades catalíticas dependiendo de las situaciones ambientales de la planta. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran la escopoletina, umbeliferona, faseolina, faseolidina, faseolinisoflavona y kievitona. Frecuentemente más de una fitoalexina es sintetizada durante una interacción con el patógeno, en tales casos las fitoalexinas son comúnmente relacionadas biosintéticamente (Ryder et al., 1987; Smith, 1996; Alami et al., 1998; Sepúlveda-Jiménez et al., 2003).

De acuerdo a Grayer y Harborne (1994) los metabolitos constitutivos están conformados por todas las principales clases de compuestos secundarios: terpenoides, iridoides, sesquiterpenos, saponinas, compuestos azufrados o nitrogenados (alcaloides, aminas, amidas), alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos) y aromáticos (fenoles, flavonoides, estilbenos, bibenzilos, xantonas y benzoquinonas). Dentro de las fitoalexinas se encuentran lactonas sesquiterpénicas, pterocarpanos, cumarinas, indoles, derivados del ácido antranílico, estilbenos, flavanonas, diterpenos, antocianidinas, cromonas, isoflavonas, isoflavonoides, alcaloides, fenoles, antraquinonas, fenilpropanoides y sesquiterpenos. Hasta ahora no existe una división estricta desde el punto de vista químico entre los metabolitos constitutivos y las fitoalexinas (Montes-Belmont, 2009).

Los metabolitos secundarios son importantes para la propagación, supervivencia y el éxito evolutivo de las plantas, funcionan como mecanismos de defensa contra herbívoros, patógenos o competidores (alelopatía). Algunos funcionan como protectores contra la radiación ultravioleta, ayudan a la dispersión de semillas y polen y otros desempeñan funciones importantes en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas así como por la floración y la formación de frutos (Brunneton, 1999)

Asimismo, la disponibilidad de nutrientes, deshidratación, depredación, competencia, agentes químicos (herbicidas) y los cambios de temperatura son algunos estimuladores del metabolismo secundario (Charlwood y Rhodes, 1990).

### **3.1 Compuestos fenólicos**

Los fenoles tienen diferentes funciones en las plantas, algunos sirven de defensa (herbívoros y patógenos) o soporte mecánico (atraer polinizadores y dispersores de frutas). También existen compuestos que al ser secretados por las plantas inhiben el crecimiento de plantas consideradas como competidoras (alelopatía), para facilitar el acceso a la luz, al agua y



aprovechar mejor los nutrientes. Otros, como los taninos, pueden actuar como repelentes o provocar daños tóxicos a sus depredadores permitiendo que no se lleve a cabo de forma adecuada la digestión en el depredador (Taiz y Zeiger, 1991).

Los compuestos fenólicos son un grupo heterogéneo de sustancias, donde el elemento estructural característico es la presencia de un anillo aromático sustituido por uno o varios grupos hidroxilo, ya sea libre o ligado (éter, éster o glucósido).

Los fenoles surgen de dos vías de aromatización:

- Vía del ácido shikímico: es la más común, a través de esta ruta un monosacárido se convierte en un aminoácido aromático (fenilalanina y tirosina). Por desaminación del aminoácido éste se convierte en ácido *trans*-cinámico y después en numerosos derivados incluyendo fenilpropanos, cumarinas, ligninas y lignanos (Brunneton, 1999; Dewick, 2002).
- Vía del acetato-malonato o del ácido malónico: esta vía inicia con el grupo acetato produciendo un poli- $\beta$ -cetoéster de longitud variable, los cuales por ciclación forman a menudo policíclicos que incluyen isocumarinas, flavonoides, isoflavonoides, flavonolignanos, estilbenos (Brunneton, 1999; Dewick, 2002).

La diversidad estructural de los compuestos fenólicos se debe a la combinación de ambas vías de biosíntesis. Se pueden clasificar como fenoles simples (fenilpropanoides, cumarinas y derivados del ácido benzoico) y complejos (flavonoides, ligninas y lignanos) (Brunneton, 1999; Dewick, 2002).

### 3.2 Cumarinas

Las cumarinas se originan a través de la ruta del ácido shikímico, en la cual el monosacárido eritrosa 4-fosfato y el fosfoenolpiruvato se convierten, a través de una cadena de reacciones enzimáticas, en un aminoácido aromático (fenilalanina y tirosina); posteriormente, el aminoácido fenilalanina es transformado a ácido *trans*-cinámico por la fenilalanina amonioliasa (PAL), la cual es una enzima importante y fundamental para la vida de las plantas, ya que es reguladora del metabolismo secundario. Esta enzima está bajo el control de varios factores externos e internos como nivel de nutrientes, luz, hormonas e infecciones. Posteriormente, el ácido *trans*-cinámico con la incorporación de oxígeno y por la enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H) forma el ácido *p*-cumárico, que también es generado del aminoácido tirosina por la enzima tirosina amonioliasa. Enseguida, el ácido *p*-cumárico es transformado por la enzima cumarato-3-hidroxilasa (C3H) en ácido caféico o bien, puede convertirse en ácido ferúlico por la enzima

ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT); a partir de ambos compuestos se originan diversas cumarinas (Lyon, 2005).

Las cumarinas disponen de una gran cantidad de sustituyentes de distinta naturaleza química, lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas. Las cumarinas, a excepción de la cumarina propiamente dicha, presentan en la posición 7 un grupo hidroxilo, como sucede en la umbeliferona, o un grupo metilo o azúcares. Las cumarinas sencillas pueden poseer hidroxilos adicionales también libres o combinados (Figura 4).

Cumarina	$R_4-R_8=H$
Umbeliferona	$R_7=OH, R_4, R_5, R_6, R_8=H$
Escopoletina	$R_6=OCH_3, R_7=OH, R_4, R_5, R_8=H$
Esculina	$R_6=O-Glu, R_7=OH, R_4, R_5, R_8=H$
Esculetina	$R_6=OH, R_7=OH, R_4, R_5, R_8=H$
Fraxidina	$R_6=OCH_3, R_7=OCH_3, R_8=OH, R_4, R_5=H$

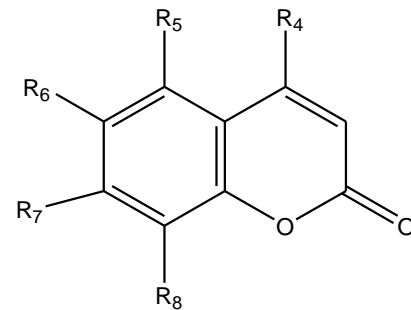


Figura 4. Estructuras químicas base de cumarinas.

Es frecuente, que sobre el anillo cumarínico básico (Figura 5), generalmente hidroxilado en C-7, se sitúen sobre los carbonos 6 u 8 radicales isoprenílicos de 5, 10 o raramente de 15 átomos de carbono, que por su alta reactividad pueden originar anillos adicionales de tipo furánico o piránico. A este grupo de cumarinas isopreniladas se les conoce en conjunto como cumarinas complejas debido a la gran variabilidad química de sus estructuras (Brunneton, 1999; Dewick, 2002).

Las cumarinas son un grupo de compuestos con múltiples actividades biológicas incluyendo antivirales, antimicrobiales, antitrombóticos y antiinflamatorios. Un gran número de cumarinas han sido evaluadas por su actividad antiinflamatorias (cumarina, umbeliferona, herniarina, esculetina, esculina, escopoletina, escopolina, fraxetina, fraxidina, cumarleucasina, dafnetina, escoparona y capensina), actuando como inhibidores de las enzimas COX y LOX ([www.ars-grin.gov/duke/plants.html](http://www.ars-grin.gov/duke/plants.html); Calixto et al., 2003; Fylaktakidou et al. 2004; Mogana et al., 2013).

Ademas, la escopoletina es un compuesto que, en virtud de su capacidad potencial para inhibir la actividad de la LOX, es capaz de mejorar los síntomas clínicos de la artritis de rata inducida por adyuvante de Freund, mediante la reducción de nuevos vasos sanguíneos en la

membrana sinovial y la producción de importantes inductores angiogénicos endógeno (Pan et al., 2010).

#### **4. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales**

Las especies vegetales durante mucho tiempo han sido utilizadas como fuente para la obtención de metabolitos secundarios con valor comercial. Usualmente, la función de estos compuestos es intervenir en la interacción de la planta con su ambiente encontrándose en muy bajas concentraciones (1% del peso seco), propiciando el uso de grandes cantidades de material vegetal silvestre para la obtención de cantidades significativas del metabolito de interés (Orozco et al., 2002).

En vista del deterioro de los recursos naturales y la necesidad de contar con alternativas técnicas para su desarrollo y conservación, organismos como la OMS (Organización Mundial de la Salud), UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) y la WWF por sus siglas en Inglés (Fondo Mundial para la Naturaleza), consideran relevante la necesidad de cultivar las plantas en lugar de recolectarlas del medio silvestre de manera indiscriminada. La continua y creciente demanda de moléculas terapéuticas, ha producido reducciones dramáticas en la diversidad natural y generando esfuerzos para desarrollar rutas alternativas para la producción sustentable de fitofármacos (Palma, 1996; Wilson y Roberts 2012; Georgiev et al., 2014).

Una alternativa es la biotecnología vegetal, esta comprende un grupo de técnicas desarrolladas a través de la investigación de procesos biológicos para solucionar problemas o generar productos útiles. Dentro de estas técnicas se incluyen el cultivo de tejidos vegetales, generación y uso de biorreactores, uso de marcadores moleculares, transformación genética, ingeniería metabólica y recientemente la genómica, proteómica y metabolómica (Wilson y Roberts 2012).

El cultivo de tejidos se refiere al cultivo de células, tejidos u órganos de plantas en forma aséptica en un medio que aporta los nutrientes necesarios para su desarrollo en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz, con el objetivo de obtener un rápido desarrollo. Estas técnicas toman como base el principio de la totipotencialidad: "toda célula viviente de un organismo multicelular es capaz de desarrollarse hasta formar una planta igual de la que proviene si se le dan las condiciones externas apropiadas". La aplicación de la biotecnología en el mejoramiento de especies vegetales ha demostrado tener un gran potencial bajo el concepto de desarrollo sustentable, ya que permite la multiplicación masiva de genotipos seleccionados, plantas libres de plagas y enfermedades obtenidas por micropropagación, la producción de

genotipos resistentes a plagas (actividad que reduciría el uso de agroquímicos), la conservación del germoplasma y la producción de combinaciones genéticas a través de la ingeniería genética (Chattopahyay et al., 2002).

#### **4.1 Cultivo de células en suspensión**

El cultivo de células vegetales se ha convertido en una de las mejores alternativas para el aprovechamiento en la producción de metabolitos secundarios derivados de plantas, debido a que en algunas ocasiones la síntesis química de dichos compuestos resulta ser un procedimiento que aporta desventajas económicas. Además, el cultivo de células de plantas es económicamente factible para la producción de algunos metabolitos de alto valor económico o principalmente de plantas en peligro de extinción; además, empleando estos sistemas se han descubierto nuevas estructuras (Rout et al., 2000; Stafford, 2002; Marja et al., 2004; Georgiev et al., 2009).

Este tipo de cultivo inicia con la selección de una planta madre con altos contenidos de los productos activos para la inducción de callos, y consecutivamente se evalúan los parámetros de crecimiento, características físicas y concentraciones de los metabolitos secundarios. Posteriormente se realiza el establecimiento y la obtención de líneas celulares de cultivos de células en suspensión, capaces de producir compuestos secundarios con un alto rendimiento. La acumulación de los metabolitos secundarios en el cultivo de células dependerá de varios factores, como la composición del medio de cultivo, incluyendo el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento, sales minerales y fuente de carbono utilizada; así como de las condiciones del medio ambiente, incluyendo temperatura, luz, y composición del gas durante el cultivo (Dornenburg y Knorr, 1995; Rout et al., 2000; Bourgaud et al., 2001; Stafford, 2002; Chattopadhyay et al., 2002).

#### **4.2 Estrategias de estimulación para la producción de metabolitos secundarios**

Los elementos químicos esenciales son una serie de elementos utilizados para completar su ciclo vital o para la subsistencia de la planta. Para que un elemento sea considerado esencial debe cumplir las siguientes condiciones: la ingesta insuficiente del elemento provoca deficiencias funcionales reversibles, sin el elemento, la planta no crece ni completa su ciclo vital, el elemento influye directamente en la planta y esta involucrado en sus

procesos metabólicos, y el efecto de dicho elemento no puede ser reemplazado por ningún otro elemento (George et al., 2008).

La alteración en el balance nutricional en las plantas hace que atraviesen por un estrés nutricional; su respuesta a este puede ser morfológica (la disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo provocan la modificación de la raíz), bioquímica (además de alterar su crecimiento y desarrollo, la planta también necesita ajustar sus procesos metabólicos, principalmente aquellos en los que participe el nutriente deficiente o en exceso), genética y/o molecular (George et al., 2008).

Basándose en este criterio, se han determinado 16 elementos esenciales: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo), cloro (Cl) y sodio (Na). Los elementos minerales se clasifican como macronutrientes, y son aquellos que se encuentran en rangos de concentraciones de 1 a 150 g/Kg de materia seca, y estos son N, P, K, Ca, Mg y S; en cambio, los micronutrientes son aquellos que son contenidos en un rango de 0.1 a 100 mg/Kg de materia seca. Estos son Fe, Zn, Mn, Cu, B, Mo, Cl y Na (George et al., 2008).

Diferentes estrategias biotecnológicas han sido aplicadas para mejorar la producción de metabolitos secundarios alterando el balance nutricional, lo cual genera un estado de estrés en las células.

#### **4.2.1 Estrés biótico y abiótico**

Generalmente la acumulación de los metabolitos secundarios en plantas superiores se genera en tejidos o células que se encuentran en un estadio específico; es decir, es un proceso que está estrechamente relacionado con el crecimiento y la diferenciación celular. Por el contrario, en los cultivos celulares, la máxima acumulación de los metabolitos se obtiene por lo regular durante la fase estacionaria (inducibles); sin embargo, se ha observado que en cultivos de células en suspensión, algunos metabolitos secundarios como las betalainas y los carotenoides están asociados al crecimiento (constitutivo) (Bourgaud et al., 2001; Mithöfer et al., 2004).

Actualmente la técnica de cultivos *in vitro* ha permitido a través del cultivo de células en suspensión, manipular la producción de algunos compuestos activos a través de la estimulación biótica y abiótica, siendo estas unas de las más exitosas. Esta técnica consiste en provocar un estrés en los cultivos con el propósito de inducir la producción de metabolitos secundarios que

no se sintetizan normalmente, o bien, que se producen en bajas concentraciones (Rao y Ravishankar, 2002; García y Pérez, 2003; Namdeo, 2007).

Los estimuladores bióticos son sustancias de origen biológico como los fragmentos de microorganismos (bacterias, hongos, nemátodos y virus) que pueden o no ser patógenos; fragmentos de paredes celulares, esporas, pectina, celulosa, ácido salicílico, metiljasmonato, glicoproteína, poliaminas, polisacáridos, ácidos grasos, proteínas intracelulares, proteínas G y la enzima celulasa. Para varias especies de plantas, la estimulación con preparaciones autoclaveadas de bacterias y hongos suele ser el método más eficiente para incrementar la producción de algunas fitoalexinas como es el caso de las cumarinas (Rao y Ravishankar, 2002; Namdeo, 2007).

Los estimuladores abióticos, de origen no biológico, como la luz UV, iones de metales pesados, cambios de pH, detergentes (xenobioquímicos), fungicidas (butilamina y benomil), herbicidas (acifluorofeno), glutatión, salinidad, sequía, químicos con alta afinidad al DNA, congelamiento y calentamiento, etc., producen estrés físico o químico alterando en diversas formas a la célula (Charlwood y Rhodes, 1990; Azcón y Talon, 2000; Bourgaud et al., 2001, Rao y Ravishankar, 2002; García y Pérez, 2003; Namdeo, 2007).

Entre las diversas hipótesis que existen actualmente sobre el mecanismo de acción de los estimuladores, se menciona la inhibición de enzimas proteolíticas como respuesta a la activación del flujo de calcio e incremento en la permeabilidad de la membrana celular. Así como por el incremento en la producción de etileno, óxido nítrico (NO) y ácido jasmónico, aumento de la respiración, inhibición o activación de vías intracelulares, cambios osmóticos, cambios rápidos en la fosforilación de proteínas, activación de proteínas cinasas y acidificación del citoplasma causado por la inactivación de la ATPasa. Además de la lignificación de la pared celular (aumento en la producción de fenoles precursores de lignina), aumento en la producción de glicoproteínas estructurales de la pared celular, producción de especies reactivas de oxígeno, la activación de la vía de las pentosas fosfato para la activación de la ruta biosintética del ácido shiquímico (precursor de flavonoides y derivados fenólicos) y muerte celular (Azcón y Talon, 2000).

Los estimuladores varían de acuerdo al origen (natural o sintético) y naturaleza (exógena o endógena) de los mismos. Algunos de los parámetros importantes que intervienen en el proceso de estimulación son el ambiente fisicoquímico, estado y ciclo del crecimiento celular, la edad del cultivo, la línea celular, la composición del medio de cultivo y la presencia de hormonas. Sin embargo, la especificidad y concentración del estimulador, así como la duración

de su exposición, son los parámetros más importantes para la producción de un determinado compuesto. Dosis elevadas del estimulador pueden producir una repuesta de hipersensibilidad (local o sistémica) o muerte celular, por lo que se requiere establecer los niveles óptimos para la inducción de los metabolitos secundarios (Sepulveda et al. 2003, Namdeo, 2007).

### **4.3 Importancia del nitrógeno en las plantas**

El nitrógeno es un elemento esencial primario para la nutrición de las plantas encargado de regular y formar parte de los aminoácidos, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos, hormonas, vitaminas, clorofila y metabolitos secundarios como los alcaloides (George et al., 2008).

Las formas iónicas en las que una raíz puede absorber el nitrógeno son como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La asimilación del nitrógeno requiere una serie compleja de reacciones bioquímicas con un alto costo energético. El  $\text{NO}_3^-$  es convertido en nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en la reacción catalizada por la nitrato reductasa, y este posteriormente es transformado en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) por acción de la enzima nitrito reductasa. Las células vegetales evitan la toxicidad del amonio incorporándolo rápidamente en los esqueletos carbonados para formar aminoácidos. El paso primario de esta incorporación involucra las acciones secuenciales de la glutamina sintetasa (GS) que combina el amonio con glutamato para formar glutamina. Otra enzima que participa en la asimilación del amonio es la glutamato deshidrogenasa (GDH), la cual cataliza una reacción reversible, sintetiza o desamina el glutamato. Especialmente, las leguminosas presentan una forma simbiótica con bacterias que transforman el nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ) en amonio con la subsecuente asimilación del amonio en los aminoácidos por la planta, proceso denominado fijación biológica del nitrógeno. Una vez asimilado el nitrógeno en glutamina y glutamato, es incorporado en otros aminoácidos por reacciones de transaminación catalizada por las transferasas (Figura 6) (George et al., 2008).

#### **4.3.1 Relación entre la fotosíntesis y el metabolismo del nitrógeno**

Como resultado de la actividad fotosintética la planta produce carbohidratos, que pueden acumularse y constituir ácidos orgánicos, azúcares, celulosa, etc. A su vez, parte de estos carbohidratos se combinan con el N absorbido y forman aminoácidos y proteínas. Por lo tanto, siempre existe dentro de la planta una competencia interna por el destino de estos carbohidratos producidos (Fritz et al., 2006).

Se ha reportado que cuando el suministro de carbono cambia, muchas de las moléculas centrales del metabolismo del carbono y del nitrógeno cambian paralelamente. Esta relación no sólo está dada por el requerimiento de esqueletos carbonados sintetizados en la fotosíntesis para la incorporación del amonio, sino también debido a la dependencia del ATP y del NADPH producido durante la fotosíntesis (Gunter y Ovodov, 2005).

La regulación de la actividad y síntesis de las enzimas del metabolismo del carbono y del nitrógeno evidencian la relación entre ambos procesos. La luz afecta la fotosíntesis, pero también controla la expresión de las enzimas nitrato y nitrito reductasas; así como a la sacarosa fosfato sintasa (SPS), enzima responsable de la síntesis de sacarosa. La acumulación de los productos finales de la fotosíntesis aumenta la actividad de la nitrato reductasa, en tanto que la SPS responde a la disponibilidad de nitrato. En consecuencia, existe un equilibrio de reducción del nitrato y la disponibilidad de carbohidratos en las células vegetales (Huber et al., 1992; Li y Oaks, 1993; Kaiser y Huber, 1994).

#### **4.3.2 Efecto del nitrato en el desarrollo de las plantas**

El contenido de nitrógeno conduce a cambios coordinados en diferentes niveles del metabolismo, desarrollo y fisiología de la planta. Si la disponibilidad de N excede la capacidad de la planta de producir carbohidratos se produce un desbalance interno, ya que se tiene que destinar una gran proporción de los carbohidratos en formar compuestos nitrogenados favoreciendo con ello el crecimiento celular y el desarrollo vegetativo. Por otro lado, un suministro deficiente de N, generalmente reduce el crecimiento del vegetal y los compuestos carbonados generados en la fotosíntesis se utilizan para síntesis de polímeros de compuestos carbonados como la lignina (Fritz et al., 2006; Mora-Izquierdo et al., 2011).

#### **4.3.3 Efecto del nitrato en la producción de metabolitos secundarios**

Diferentes estudios indican que en las plantas cultivadas en condiciones de restricción de nitratos, afecta el crecimiento de la planta, pero además estimula la producción de metabolitos secundarios ricos en carbono. Basado en la hipótesis del balance de nutrientes de carbono y de nitrógeno y por el contrario, hacia la producción de metabolitos enriquecidos en nitrógeno cuando se limita la fuente de carbono. Se ha reportado que en plantas y suspensiones celulares cultivadas con niveles bajos de nitratos se estimula la acumulación de fenilpropanoides y flavonoides (Fritz et al., 2006, Kovácik et al., 2006, Zhou y Zhong, 2009, Mora et al., 2011, Nicasio-Torres et al., 2012).



El paso inicial en el metabolismo de los fenilpropanoides esta mediado por la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL). En condiciones reducidas de nitrógeno se habilita la actividad de PAL, liberando iones amonio a partir del aminoácido fenilalanina, y el ácido *trans*-cinámico generado contribuye a incrementar el contenido de diferentes compuestos fenólicos como flavonoides, antocianinas y cumarinas. El amonio liberado por la desaminación de la fenilalanina y tirosina (Figura 5) es reciclado por las células para la formación de otros aminoácidos esenciales útiles en la producción de enzimas y proteínas necesarias para el crecimiento (Kováčik et al., 2006; Zhou y Zhong, 2009; Mora et al., 2011).

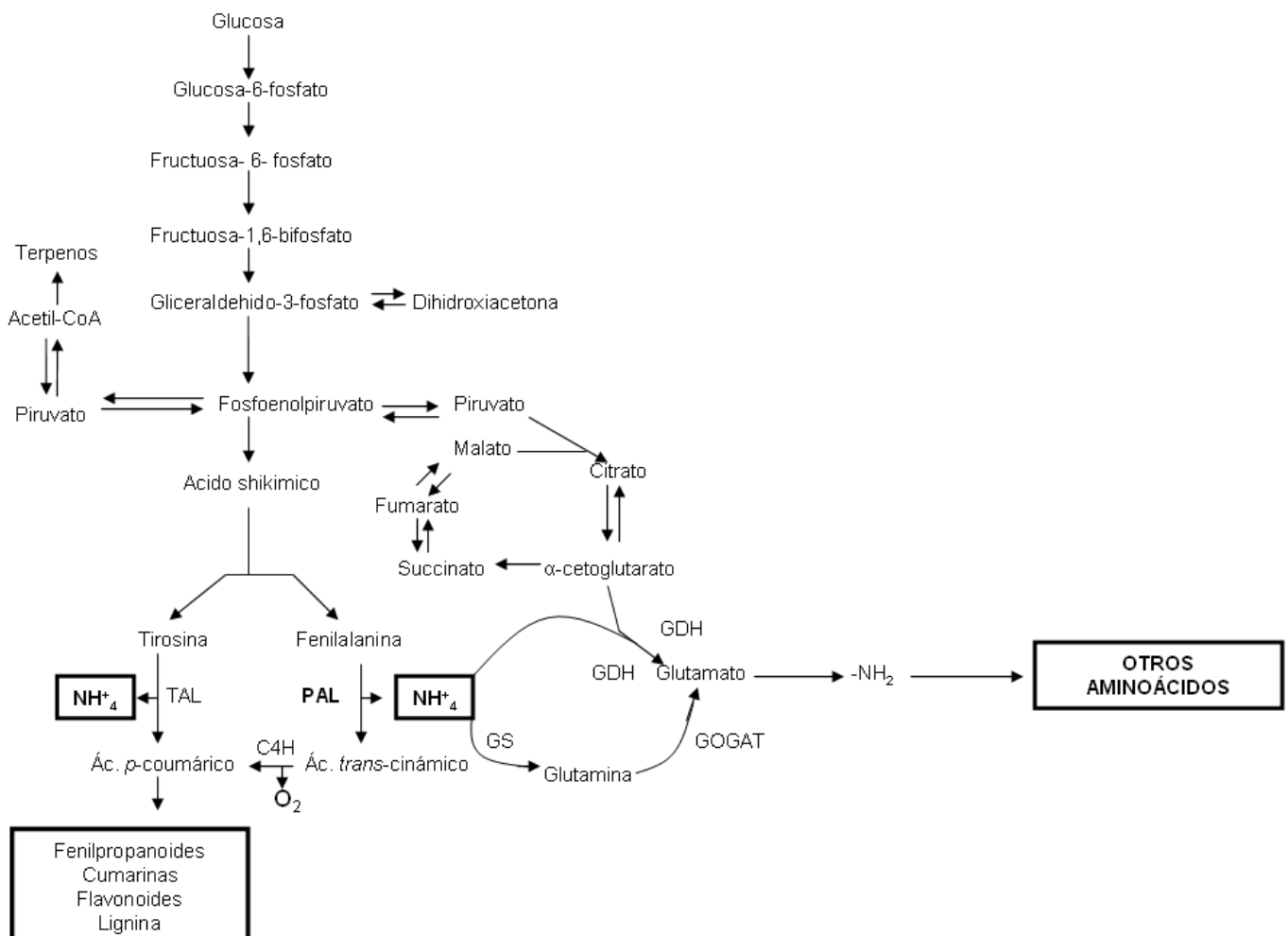


Figura 5. Ruta biosintética activada por la reducción del contenido de nitratos para la formación de compuestos fenólicos. PAL, fenilalanina amonioliasa; TAL, tirosina amonioliasa; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; GS, glutamina sintetasa; GHD, glutamato deshidrogenasa; GOGAT, glutamato sintetasa.

Se ha reportado que la restricción de nitratos en plantas de *N. tabacum* induce fuertemente la expresión de un grupo de genes involucrados en la biosíntesis de los fenilpropanoides, tales como la fenilalanina amonioliasa (*PAL1*) [fenilalanina → ácido *trans*-cinámico], la cinamato 4 hidroxilasa (*C4H*) [ácido *trans*-cinámico → ácido *p*-cumárico], la hidroxicinamato CoA ligasa (*4CL*) [ácido *p*-cumárico → *p*-cumaril CoA] y la hidroxicinamoil CoA quinototransferasa (*HQT*) [ácido caféico → ácido clorogénico] (Fritz et al., 2006, Kovácik et al., 2006).

#### **4.4 Función del cobre en las plantas**

El cobre es un micronutriente (metal) esencialmente fisiológico, que participa en los procesos de crecimiento, senescencia y fotosíntesis en la planta. El nivel crítico de cobre en las plantas está generalmente en un rango entre 1-5 µg/g de peso planta seca, dependiendo de la especie, órgano, etapa de desarrollo y suministro de nitrógeno. Para la mayoría de las especies el nivel crítico de toxicidad por cobre en las hojas por está encima de los 20-30 µg/g de peso seco. Existen, sin embargo, marcadas diferencias en la tolerancia al cobre entre las especies vegetales; estas diferencias están directamente relacionadas con el contenido de cobre en el tallo. En las especies metalófitas, su contenido en las hojas puede ser aproximadamente de 1,000 µg/g de peso seco. El cobre es incorporado a las células en forma divalente (Cu<sup>2+</sup>) a través de las raíces, sitio de acumulación preferencial de cobre cuando hay altas concentraciones en el exterior (Maksymiec, 1997).

##### **4.4.1 El cobre en los procesos de crecimiento y senescencia**

El exceso de cobre en las plantas causa varios efectos dependiendo del tiempo de exposición y etapa de crecimiento. De manera indirecta, en concentraciones altas el cobre presenta varios efectos fitotóxicos, inicialmente reduce el crecimiento radicular, seguida del crecimiento del tallo y finalmente la senescencia (Maksymiec, 1997).

Ciertos cambios en la morfología radicular como la inhibición de la elongación y la formación de raíces laterales, pueden estar relacionados con la disminución en la actividad de la enzima ácido indol-3-acético oxidasa (IAA) en raíces expuestas a altas concentraciones de cobre. El cobre induce la síntesis de etileno y este a su vez incrementa los procesos de senescencia, debido a que el cobre estimula la actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACC) y oxidasa, enzimas clave en la síntesis del etileno (Maksymiec, 2007).

En plantas deficientes de cobre se modifica la conformación de la pared y membranas celulares, cromosomas, cromatina, ácidos nucleídos y proteínas, a través de la generación de

especies reactivas de oxígeno (EROS), como el ion hidroxilo, el ion superóxido y el peróxido de hidrógeno (Maksymiec, 1997; Maksymiec, 2007; Szafranska et al., 2011).

El nitrógeno tiene efectos específicos en la disponibilidad y movilidad del cobre, incluyendo su incorporación en aminoácidos y proteínas integrados en tejidos maduros, así como una disminución en la tasa de translocación de cobre desde las hojas más viejas a áreas de nuevo crecimiento. Además, se ha demostrado que la aplicación de nitrógeno acentúa la deficiencia de cobre, retrasa la senescencia y la translocación del cobre, siendo necesaria la aplicación de fertilizantes de cobre para el máximo rendimiento (Maksymiec, 1997).

#### **4.4.2 El cobre en la fotosíntesis, la cadena respiratoria y el estrés oxidativo**

Especialmente, el cobre es un componente estructural e indispensable para el funcionamiento de diversas enzimas. Muestra una alta afinidad por los péptidos, especialmente por los grupos sulfhídrico en las proteínas ricas en cisteínas, así como por grupos carboxilo y fenoles (Maksymiec, 1997).

La mayor cantidad de cobre se acumula en el cloroplasto enlazado a la plastocianina, la cual contiene un átomo de cobre por molécula. La plastocianina es una proteína no enzimática que funciona como donador primario de electrones en el fotosistema I de la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis (Maksymiec, 1997).

En concentraciones altas de cobre, la peroxidación lipídica conlleva a la destrucción de las membranas y a modificaciones estructurales de los cloroplastos, su destrucción y disminución del contenido de clorofila (clorosis). En estas condiciones, la lamela intergrana y grana se desintegran generando daño oxidativo y probablemente una inadecuada detoxificación del ion superóxido ( $O_2^-$ ), afectando el transporte de electrones en los cloroplastos y en las mitocondrias, así como la inhibición de diversas actividades enzimáticas (Maksymiec, 2007).

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima responsable de la detoxificación de los radicales superóxido ( $O_2^-$ ). El sitio activo de la enzima SOD zinc-cobre (SOD-CuZn) contiene un átomo de cobre y uno de zinc estrechamente conectados mediante un nitrógeno de los aminoácidos histidina, triptófano y tirosina. El átomo de cobre en la CuZn-SOD está directamente involucrado en el mecanismo de detoxificación del  $O_2^-$  generado durante la fotosíntesis (Maksymiec, 2007).

La SOD-CuZn está localizada en el citoplasma, la mitocondria y los glioxisomas, en tanto que en los cloroplastos se encuentra junto con la FeSOD. En los glioxisomas la CuZn-SOD está involucrada en el control de la peroxidación de los lípidos de membrana y, de este modo, en la

senescencia. Bajo deficiencia de cobre, se inhibe drásticamente la actividad de la SOD-CuZn foliar (SOD-CuZn cloroplástica y citosólica), incrementando la actividad de la enzima dependiente de manganeso (SOD-Mn), posiblemente para equilibrar la deficiencia de la SOD-CuZn (Maksymiec, 2007).

En cloroplastos deficientes de cobre también disminuyen la actividad de la plastocianina y la actividad del fotosistema I, al mismo tiempo se ve afectada la actividad del fotosistema II, en el cual, el cobre es necesario para la síntesis de uno de sus componentes, la plastoquinona (Maksymiec, 1997; Szafranska et al., 2011).

La deficiencia de cobre afecta considerablemente el contenido de carbohidratos solubles debido a la disminución de la actividad del fotosistema I (PS I) y la baja tasa de la fotosíntesis. Sin embargo, en condiciones severas por deficiencia de cobre, la caída en la fijación neta de CO<sub>2</sub> a cerca del 50% expresada en términos de unidad de clorofila o del área foliar, no puede ser atribuida solamente a la menor actividad del fotosistema I, sino también, a la del fotosistema II (PS II), debido a la baja síntesis de carotenoides y quinonas, a la desintegración de las membranas tilacoidales y alteraciones en los polipéptidos del PS II. Otra proteína dependiente de cobre es la oxidasa alternativa en los glioxisomas involucrada en esta instauración (Maksymiec, 1997).

La citocromo oxidasa, enzima que participa en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, está conformada por dos átomos de cobre y dos de hierro en la configuración hemo. Las tasas de respiración mitocondrial no se afecta o disminuye moderadamente por la deficiencia de cobre. La ascorbato oxidasa cataliza la oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. Esta enzima está presente en las paredes celulares y en el citoplasma, y puede actuar como una oxidasa terminal respiratoria. La actividad de la ascorbato oxidasa disminuye en plantas deficientes de cobre y es una indicadora sensible del estado nutricional del cobre en la planta (Maksymiec, 2007).

#### **4.4.3 Estrés por cobre y producción de compuestos fenólicos**

De manera indirecta el exceso del metal cobre provoca un estrés oxidativo. Se ha sugerido que el primer efecto de los metales es incrementar la actividad de la NADPH oxidasa generando un incremento en el contenido de Especies Reactivas de Oxígeno (EROS), como el ion superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el ion hidróxilo ·OH, así como de las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Normalmente, en las células los metales pueden reaccionar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, generando a su vez, un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes e induciendo procesos que generan ·OH a través de las reacciones de FENTON y Haber-Weiss (Figura 6),

desencadenando la activación de vías de señalización para la expresión de genes de las enzimas antioxidantes y síntesis de metabolitos secundarios (Mithofer et al., 2004).

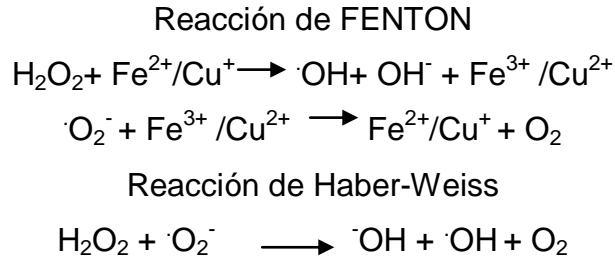


Figura 6. Reacciones químicas que participan en la producción del radical hidroxilo.

El principal daño causado por el exceso de EROS es la peroxidación lipídica de la membrana celular (Figura 7). Muchos de los mecanismos relacionados con la percepción y expansión de la respuesta celular entre los órganos de la célula, se deben a la activación particular de vías de señalización a través de la activación de receptores, canales iónicos, moléculas de señalización (oxilipínicas) y factores de transcripción, específicamente influenciado por la expresión de genes, formando las bases de la adaptación y reacción de defensa del organismo (Mithöfer et al., 2004).

La estimulación de los receptores origina incrementos en la concentración de calcio en el citoplasma, activando a la enzima calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  y a través de la activación de proteínas cinasas simultáneamente se forman potenciales eléctricos y moléculas de señalización que transmiten la información sobre el ambiente de estrés ocurrido en la célula. La sistemina, el ácido salicílico, el etileno, el ácido absícico y el jamonato se distinguen por ser moléculas de señalización. En condiciones de exceso de cobre, la actividad de la enzima carboxilasa se modifica debido a la oxidación de grupos sulfhidrilo ( $\cdot\text{SH}$ ) o por remplazamiento de los iones  $\text{Mg}^{2+}$  indispensables para la formación del complejo de la enzima con el  $\text{CO}_2$ . La interacción entre el cobre y los grupos sulfhidrilo ( $\cdot\text{SH}$ ) resulta en el incremento de la permeabilidad celular y pérdida interna de  $\text{K}^+$  (Maksymiec, 1997).

La relación entre un ataque por patógenos y la presencia de metales puede ser el resultado de la expresión de genes similares que codifican para la producción de enzimas de defensa como las glucanasas (degradadoras de  $\beta$ -glucanos), quitinasas (enzimas hidrolíticas que rompen enlaces glicosídicos en moléculas de quitina que conforman la pared celular) y proteinasas (enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas) (Maksymiec, 1997).

El incremento en las concentraciones de cobre estimula la producción de metalotioneínas, fitoquelatinas y proteínas específicas de estrés. Las fitoquelatinas son oligómeros de glutatión producidos por la enzima fitoquelatina sintasa y actúan como quelantes. Las metalotioneínas constituyen una familia de proteínas ricas en cisteína, de bajo peso molecular y se encuentran en el aparato de golgi de las células. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse a metales pesados esenciales y no esenciales, a través de los grupos sulfhidrilo (-SH) de sus residuos de cisteína, que representan casi el 30% del péptido. Los restos de cisteína de las metalotioneínas pueden capturar peligrosos radicales oxidantes, como los radicales superóxido e hidroxilo. En esta reacción, la cisteína es oxidada a cistina, y los iones metales que estaban unidos a la cisteína son liberados al medio y estos pueden activar a su vez más metalotioneínas, funcionando como mecanismo de control del estrés oxidante (Maksymiec, 1997).

Las plantas poseen dos mecanismos antioxidantes uno enzimático y otro no enzimático: dentro del sistema enzimático se encuentra la activación de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasas; entre los no enzimáticos está la producción de moléculas de bajo peso molecular como el ascorbato, glutatión, prolina, poliaminas (PAs), tocoferol y compuestos fenólicos. Las poliaminas pueden estar presentes en formas libre o unidas a ácidos fenólicos, principalmente ácidos hidroxicinámicos o a ligninas (Maksymiec, 1997; Maksymiec, 2007).

La diamina oxidasa está principalmente localizada en el apoplasto de la epidermis y el xilema de tejidos maduros, donde ésta funciona posiblemente como un sistema de entrega de  $H_2O_2$  a la peroxidasa en el proceso de lignificación y suberización. De acuerdo con esto, la actividad de la enzima diamina oxidasa se incrementa en respuesta a lesiones y está estrechamente correlacionada con la lignificación del área lesionada (Maksymiec, 1997).

Las enzimas fenol oxidasas catalizan las reacciones de oxigenación de los fenoles vegetales presentes en las paredes celulares y en las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Estas enzimas tienen dos notables funciones: (a) hidroxilan los monofenoles a difenoles, semejándose a la actividad tirosinasa, y (b) oxidan los difenoles a *o*-quinonas, semejándose a la actividad dihidroxifenilalanina (DOPA) oxidasa. Ambas reacciones necesitan oxígeno molecular. Estas enzimas son llamadas dependiendo el tipo de sustrato como monofenol oxidasas, polifenol oxidasas, fenolasas, DOPA oxidasas, tirosinasas, etc (Maksymiec, 1997).

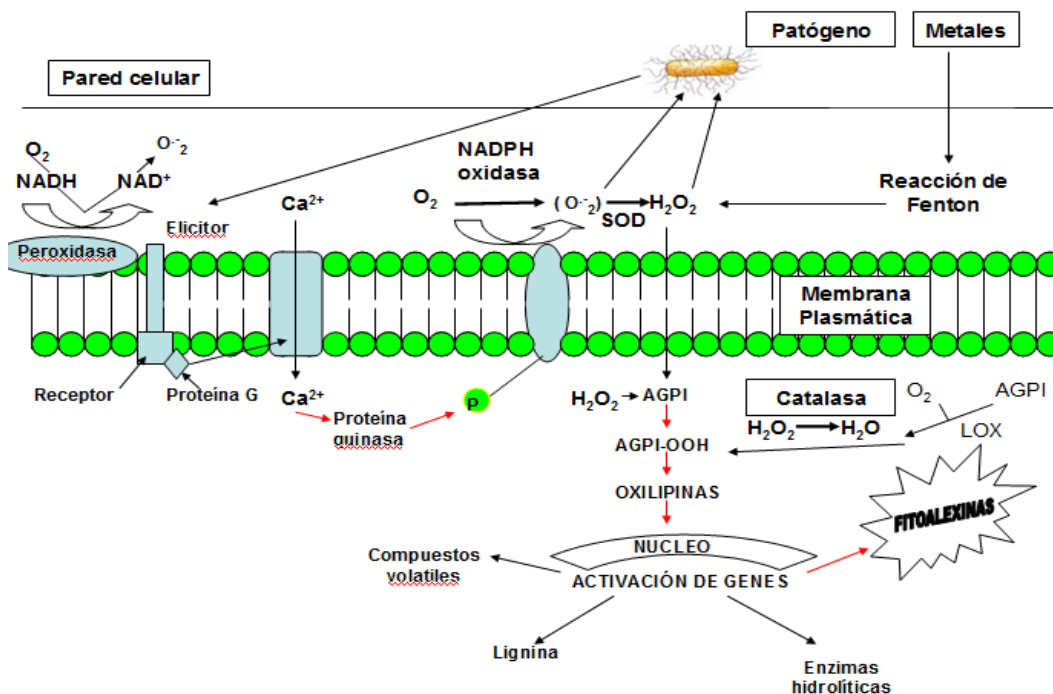


Figura 7. Relación entre el ataque causado por patógenos y metales (Cu<sup>2+</sup>) y los mecanismos de defensa en las plantas. AGPI (ácidos grasos poliinsaturados), AGPI-OOH (ácidos grasos poliinsaturados hidroxiperoxidados).

Las polifenol oxidasas están involucradas en la biosíntesis de lignina y alcaloides. En condiciones de deficiencia de cobre, la actividad polifenol oxidasa disminuye drásticamente y se correlaciona con una disminución en la producción y acumulación de compuestos fenólicos y de sustancias melanóticas. Por otro lado, en cultivo de tejidos frecuentemente deteriora severamente la regeneración vegetal por la alta actividad de la polifenol oxidasa (Maksymiec, 1997).

El grado de lignificación está relacionado con el suministro de cobre en las plantas superiores. El deterioro de las paredes celulares es el cambio anatómico típico inducido por la deficiencia de cobre. La lignificación también estimula la distorsión de las hojas jóvenes, encorvamiento y retorcimiento de los tallos y ramas. En hojas deficientes de cobre, la proporción de la pared celular en relación a la materia seca total disminuye; simultáneamente, se incrementa la proporción de  $\alpha$ -celulosa, mientras que el contenido de lignina solo es aproximadamente la mitad de la materia seca en hojas adecuadamente suplidas con cobre. Este efecto en la lignificación es aún más notable en las células esclerenquimáticas del tejido caulinar (Maksymiec, 1997).

Los periodos transitorios de deficiencia de cobre durante el periodo de crecimiento pueden ser rápidamente identificados por las variaciones en el grado de lignificación en secciones del tallo. La inhibición de la lignificación en tejido deficiente de cobre está relacionada con dos enzimas: la polifenol oxidasa, que cataliza la oxidación de los fenólicos como precursores de la lignina, y la diamina oxidasa, encargada de proporcionar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requerido para la oxidación por las peroxidases. Por consiguiente, en tejidos deficientes de cobre no solo disminuye la actividad de ambas enzimas, sino que también disminuye el contenido de compuestos fenólicos (Maksymiec, 1997).

## **5. Aplicación del cultivo de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios**

En el mundo se tienen casos exitosos de cultivo de células de plantas para la producción de metabolitos secundarios de alto valor. Ejemplo de ello son la producción de shikonina mediante el cultivo de células en suspensión de *Lithospermum erythrorhizon*, y la berberina, compuesto que se emplea para bajar de peso, obtenida por cultivo de células en suspensión de *Coptis japonica*. La producción de ácido rosmarínico por cultivo de células de *Coleus blumeii* se ha realizado también a gran escala; y sanguinarina, la cual tiene un potencial mercado en productos de higiene bucal, ha sido producido en cultivos de células de *Papaver somniferum*.

Un ejemplo de una droga de alto costo producida parcialmente mediante un cultivo de células de plantas es el paclitaxel, una droga anticancerígena extraída desde la corteza de árboles de *Taxus brevifolia* de 50-60 años. El paclitaxel y los compuestos relacionados se acumulan en bajos niveles en cultivos no estimulados, por lo que el mejorar las condiciones de producción provee los rendimientos más altos. Para estimular la producción de taxol, paclitaxel y otros taxanos en cultivos de células en suspensión, se han utilizado diversas estrategias biotecnológicas como son la aplicación de la oxilipina metil jasmonato y una preparación a base del hongo endopatógeno de *Taxus*. Otro de método empleado ha sido variar la temperatura de incubación de los cultivos celulares, o bien, remover el medio de cultivo y por ende los productos acumulados. Se reportó una producción importante de paclitaxel de 23.4 mg/L/día para una línea celular de *T. canadensis*, después de un período de incubación de 5 días posterior a la estimulación con metiljasmonato (Stafford, 2002; Marja *et al.*, 2004; Wilson y Roberts, 2012).

El agente antihipertensivo ajmalicina y los antileucémicos vinblastina y vincristina en cultivos de *Cathartus roseus* constituyen otros de los ejemplos a mencionar. Los



antitumorales colchicina de *Colchium autumnale* y ellipticina de *Orchrosia elliptica* también se producen en suspensiones celulares (Smetanska, 2008; Wilson y Roberts, 2012).

Los compuestos anticancerígenos topotecan (GlaxoSmithKline) e irinotecan (Pharmacia Corp/Aventis SA/Daiichi Seiyaku Co Ltd) son derivados semisintéticos de camptotecina, un alcaloide que ha sido aislado de diversas especies vegetales. La camptotecina se acumula en cultivos de células en suspensión de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) y de *Nothapodytes foetida* (Icacinaceae) con niveles máximos de 1 mg/L (intracelular) y 35 mg/L (extracelular), respectivamente. El rendimiento de los alcaloides en ambas especies fue posible modificarla jugando con la composición de fitohormonas en el medio de cultivo (Stafford, 2002).

La podofilotoxina (PDT) se utiliza para la preparación semisintética de los agentes antineoplásicos etopósido y tenipósido. El establecimiento y caracterización de los cultivos de células en suspensión permiten inferir que el rendimiento de PDT, tiene un rango similar al de los cultivos no inducidos de varias especies productoras del compuesto como son las especies de los géneros *Callitris* (Cupressaceae), *Linum* (Linaceae) y *Podophyllum* (Berberidaceae). El rendimiento más alto de 28 mg/L se determinó en un cultivo de *Linum album* de 11 días (Stafford, 2002).

### **5.1 Uso de biorreactores en cultivos de células en suspensión**

El escalamiento de suspensiones celulares en biorreactores es una alternativa tecnológica atractiva para la obtención de compuestos de uso en la industria farmacéutica y alimentaria que garantizan la producción de los compuestos de interés controlando aspectos físicos, químicos y biológicos que alteran y/o modifican su producción (Orozco et al., 2002).

Entre los diferentes tipos de biorreactores más frecuentemente utilizados destacan los airlif, columna de burbuja, Wilson, Wave & Undertow, BioWave, Hybrid y el de agitación mecánica. Las ventajas de este último son su aplicación a nivel industrial por la capacidad que tiene de manejar grandes volúmenes; además, permite mantener condiciones homogéneas lo que aporta mayor facilidad para la toma de muestras, el monitoreo y el control del equipo. Una limitante de este sistema radica en el uso de impulsores mecánicos para la agitación, debido a la sensibilidad de corte de las células vegetales necesitando bajas velocidades de agitación (<100 rpm, revoluciones por minuto). Sin embargo, las modificaciones que se han implementado tanto al tipo de impulsor (propela marina) como a la talla y posición, han dado resultados satisfactorios para el cultivo de células de algunas especies vegetales y la

producción de metabolitos secundarios (Zhong et al., 1999, Eibl y Eibl, 2000, Orozco et al., 2002)).

El principal propósito del escalamiento es mantener una alta productividad teniendo como referencia las propiedades físicas y químicas del proceso. La optimización de las condiciones del biorreactor como la cantidad de inóculo, fase de crecimiento, grado de diferenciación celular, formación de agregados, tiempo de cultivo, la composición de gases (oxígeno, CO<sub>2</sub> y etileno), viscosidad, sedimentación, disposición de oxígeno, medio de cultivo, estimuladores (bióticos o abióticos), concentración hormonal, velocidad de agitación, velocidad de aeración, temperatura, pH, humedad, luz y el modo de operación (batch, continuo, perfusión) deben ser considerados para lograr la estabilización del cultivo y garantizar de esta manera el crecimiento celular y por lo tanto, la producción de los metabolitos secundarios. (Bisaria y Panda, 1991; Rodríguez-Monroy, 1999; Zhong, 2001; Chattopadhyay et al., 2002; Huang et al., 2002; Huang et al., 2002; Farkya et al., 2004; Smetanska, 2008; Cloutier, 2009; Georgiev et al., 2009).

Desde una perspectiva económica, en un biorreactor, la producción del metabolito de interés (con alto valor en el mercado) y la productividad volumétrica del sistema constituyen los parámetros más importantes a considerar. En general, la producción de metabolitos secundarios representa menos del 1% del peso seco de las células vegetales; por lo que es necesario diseñar estrategias que permitan estimular su producción (Smetanska, 2008; Georgiev et al., 2009).

El primer sistema de producción comercial basado en el cultivo de células de plantas para la producción del colorante y compuesto antibacterial shikonina, a través de células de *Lithospermum erythrorhizon* en biorreactor de 750 L, fue presentado por la industria Petroquímica Mitsui (Abdullah et al., 2005).

Tecnológicamente factible, el cultivo de células vegetales a gran escala ha sido demostrado en Alemania utilizando biorreactores de tanque agitado de 75,000 L para la producción de ajmalicina un vasodilatador y reserpina un antihipertensivo en *Rauwolfia serpentina*, ginsenósidos en *Panax ginseng*, los ácidos cafeico, clorogénico, caftárico y chicóorico de *Echinaceae purpurea* (Diversa) y taxol por *Taxus chinensis* (Phyton Inc.). Además de la producción de shikonina a partir de cultivos de *Lithospermum erythrorhizon* en biorreactores de tanque agitado de 750 L (producción equivalente a un cultivo de planta de 176, 400 m<sup>2</sup>) y 1,000 L (Mitsui Chemicals, Japon), saponinas de *Panax ginseng* en bioreactor de 25,000 L (Nitto Denko, Japon), polisacáridos de *Polianthes tuberosa* en bioreractor de 4,000 L

(Kao Corp., Japon), taxol de *Taxus spp.* en biorreactor de 20,000 L (Samyang Genex, S. Korea) y Phyton Catalytic (NY, USA). La factibilidad comercial del cultivo de células vegetales ha sido demostrada en Alemania en biorreactores de tanque agitado han sido usados para la producción de biomasa de *Rauwolfia serpentina*, *Panax ginseng*, *Echinacea purpurea* (Diversa) y taxol por *Taxus chinensis* (Phyton Inc.) (Abdullah et al., 2005, Orozco et al., 2002).

Los productos terapéuticos de alto valor comercial obtenidos por cultivos celulares a escala industrial, son la berberina (3,250 US\$/Kg), el taxol (600,000 US\$/Kg), gíngenosidos y ácido rosmarínico, shikonina (4,500 US\$/Kg), sanguinarina (4,800 US\$/Kg), vinblastina (1,000,000 US\$/Kg), vincristina (2,000,000 US\$/Kg), colchicina (35,000 US\$/Kg), camptotecina (432,000 US\$/Kg), elipticina (240,000 US\$/Kg), agmalicina (37,000 US\$/Kg), artemisina (400, US\$/Kg), ajmalina (75,000 US\$/Kg), capsaicina (750 US\$/Kg), codeína (17,000 US\$/Kg), morfina (340,000 US\$/Kg) (Huang et al., 2002; Rao y Ravishankar, 2002; Eibl y Eibl, 2009; Georgiev et al., 2009).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversas enfermedades que padece el ser humano en la actualidad están asociadas a procesos de inflamación crónica, la cual no solo contribuye en aquellos problemas en los que la inflamación se hace evidente como la artritis reumatoide, sino en otros padecimientos tales como el Alzheimer, el cáncer, la arterioesclerosis, problemas en las válvulas del corazón y la diabetes mellitus tipo 2. Las enfermedades reumáticas son un problema de salud relevante alrededor del mundo; en México, la prevalencia de la artritis es del 1.6 % de la población y afecta principalmente al grupo con mayor capacidad laboral o productiva dentro de la sociedad, se calcula que hay más de un millón 700 mil personas de entre 20 y 50 años de edad con este padecimiento. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos son de gran utilidad para controlar las enfermedades reumáticas, no obstante, estos medicamentos producen efectos no deseables en el organismo como son las úlceras provocadas en el aparato digestivo.

Actualmente, una terapia alterna para el tratamiento de los procesos inflamatorios se basa en el uso de las plantas medicinales, las cuales constituyen una fuente invaluable de metabolitos secundarios y potenciales fármacos para los seres humanos. *S. angustifolia* es una especie medicinal que es utilizada por tradición en la cultura mexicana para el alivio de diferentes trastornos, sobre todo aquellos que presentan un proceso inflamatorio como es el caso de la artritis reumatoide. El efecto farmacológico del extracto de diclorometano de las partes aéreas de esta planta se ha corroborado en modelos biológicos de inflamación local, aguda y crónica en roedores; conocimiento que constituyó la plataforma científica básica para generar un fitofármaco estandarizado con respecto al compuesto antiinflamatorio identificado, la escopoletina. La evaluación clínica del fitomedicamento permitió evidenciar la eficacia y seguridad terapéutica del extracto de diclorometano de las partes aéreas de la planta. No obstante, las bondades de esta especie se ven comprometidas por su clasificación por la SEMARNAT como en “peligro de extinción”.

La biotecnología vegetal permite la producción de compuestos de interés farmacológico a través del cultivo de células en suspensión, sistema que ha demostrado tener un gran potencial bajo el concepto de desarrollo sustentable y es utilizado ampliamente a nivel industrial. Con el propósito de contar con un sistema alterno para la producción de compuestos bioactivos y continuar con los estudios farmacológicos y químicos de *S. angustifolia*, se generaron cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión a partir de explantes de hoja empleando el medio de cultivo de Murashige y Skoog. A continuación, se diseñó un modelo de señalización para inducir la biosíntesis de escopoletina en las suspensiones celulares alterando

el balance de los nutrientes carbono y nitrógeno, condición bajo la cual se produjeron otros compuestos aun no identificados en la planta y que podrían contribuir a la actividad antiinflamatoria que posee el extracto de diclorometano obtenido de partes aéreas de la planta *S. angustifolia*.

### III. JUSTIFICACIÓN

El propósito del presente trabajo de investigación fue purificar y elucidar la estructura química a través de análisis espectrofotométricos, de los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* en respuesta al estrés por restricción de nitratos. Posteriormente, los compuestos purificados e identificados se evaluaron en dos modelos de inflamación aguda en ratón con el propósito de evidenciar su actividad. Con estos avances, se procedió a establecer en las suspensiones celulares cultivadas en matraces, las concentraciones óptimas de los estimuladores nitrato y cobre en el medio de cultivo de Murashige y Skoog empleando la metodología de superficie de respuesta, con el propósito de incrementar la producción de los antiinflamatorios escopoletina y de los 2 otros compuestos caracterizados. Otro de los retos en este estudio fue cultivar a nivel de biorreactor de laboratorio la suspensión celular de *S. angustifolia* y evaluar la producción de los compuestos antiinflamatorios.

La suspensión celular de *S. angustifolia* cultivada en condiciones controladas de crecimiento y estimulación, es propuesta como una alternativa sustentable para la sobreproducción de compuestos antiinflamatorios, así como para la obtención de extractos útiles en la elaboración de un fitomedicamento estandarizado en los compuestos bioactivos y realización de los futuros ensayos clínicos.

### IV. HIPÓTESIS

1. En condiciones de restricción de nitratos, el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* produce compuestos que contribuyen a la actividad antiinflamatoria validada en la planta.
2. El estrés producido en el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* por el exceso del cobre y restricción del nitrato en el medio de cultivo de Murashige y Skoog, estimulará la producción de los compuestos antiinflamatorios.

3. La producción de compuestos con actividad antiinflamatoria en el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* a nivel de matraz, será reproducible en el cultivo celular desarrollado en biorreactor con agitación mecánica.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVOS GENERALES

- Aislar e identificar los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* cultivados en medio de Murashige y Skoog con el contenido de nitratos reducido a 2.74 mM, así como evaluar su efecto sobre la formación de los edemas plantar inducido con  $\lambda$ -carragenina y auricular con TPA (12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato) en el ratón.
- Establecer los niveles de nitrato y cobre óptimos aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta, para lograr la mayor producción de los compuestos con actividad antiinflamatoria en el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* en matraces agitados.
- Comprobar si los compuestos con actividad antiinflamatoria obtenidos en el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* a nivel de matraz, se producen en el cultivo celular desarrollado en biorreactor con agitación mecánica.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y caracterizar estructuralmente los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión desarrollados en el medio de Murashige y Skoog con reducción de nitratos (2.74 mM).
- Evaluar el efecto de los compuestos aislados sobre la formación edematosa suplantaria inducida por  $\lambda$ -carragenina en el ratón.
- Evaluar el efecto de los compuestos aislados sobre la formación edematosa auricular inducida por TPA en el ratón.
- Realizar una curva dosis respuesta del compuesto más activo en el modelo agudo de edema auricular.

- Establecer los niveles de nitrato y cobre óptimo aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), para obtener la mayor biomasa en la suspensión celular de *S. angustifolia* cultivada en matraces agitados.
- Establecer los niveles de nitrato y cobre óptimos aplicando la MSR, para lograr la mayor producción de los compuestos con actividad antiinflamatoria producidos en el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* en matraces agitados.
- Evaluar la producción de compuestos antiinflamatorios en el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* desarrollado en biorreactor de agitación mecánica.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6. Material vegetal de *Sphaeralcea angustifolia*

#### 6.1 Cultivos de células en suspensión

Los cultivos de células en suspensión tipo lote de *Sphaeralcea angustifolia* se establecieron a partir de callos friables (4%) derivados de explantes de hoja de plantas aclimatadas (Pérez-Hernández, 2007). Los callos se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 80 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) líquido con 27.4 mM de nitratos totales ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  15.9 mM y  $\text{KNO}_3$  11.5 mM), complementado con 1 mg/L de ANA en combinación con 0.1 mg/L de CN y 30 g/L de sacarosa a pH 5.7. Los matraces fueron colocados en un agitador orbital a 110 rpm (New Brunswick Scientific Co.) e incubados a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  bajo fotoperiodo de 16 h luz (irradiancia  $50 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 8 h de oscuridad. Las suspensiones celulares fueron subcultivados en medio fresco en condiciones de esterilidad cada tres semanas empleando el mismo inóculo de 4%.

#### 6.2 Inducción y producción de compuestos en cultivos de células en suspensión

La suspensión celular de *S. angustifolia* se transfirió usando un inóculo del 4%, a matraces de 1 L con 320 mL de medio MS con el contenido de nitrato totales reducido a 2.74 mM y complementado con 1 mg/L de ANA en combinación con 0.1 mg/L de CN y 30 g/L de sacarosa a pH 5.7. Los cultivos fueron incubados en las condiciones antes descritas y cosechados al tiempo (16 días) previamente determinado para la obtención de la biomasa máxima (Pérez-Hernández, 2009).

##### 6.2.1 Extracción y purificación de compuestos

Las suspensiones celulares (10 matraces de 1 L) fueron filtradas, el exceso de medio de cultivo eliminado por lavados con agua destilada, y secadas a temperatura ambiente. Las biomásas

secas (200 g) fueron extraídas por maceración con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (9:1) en una proporción 1:10 (p/v) por 24 h, repitiendo el proceso tres veces. Los extractos fueron filtrados, reunidos y concentrados a presión reducida para la obtención del extracto orgánico (8.12 g). Una muestra del extracto (10 mg) fue disuelta en 1 mL de metanol para su análisis por HPLC.

Posteriormente, el extracto (8.12 g, 2.81% de rendimiento) fue fraccionado en columna de sílica gel (9 x 28 cm, 70-230 mesh, Merck), empleando un sistema de gradiente de hexano: acetato de etilo: metanol (Tabla 1). Se colectaron alícuotas de 500 mL y las muestras con un perfil en cromatografía en capa fina (CCF) similar se reunieron en 10 fracciones (F1-F10).

Tabla 1. Condiciones de fraccionamiento en columna del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (9:1) de biomásas celulares de *S. angustifolia*.

Sistema de elución	%	Fracciones
Hexano	100	F1 (1-5)
Hexano: acetato de etilo	95:5	F2 (6-10)
Hexano: acetato de etilo	90:10	F3 (11-15)
Hexano: acetato de etilo	80:20	F4 (16-20)
Hexano: acetato de etilo	70:30	F5 (21-25)
Hexano: acetato de etilo	60:40	F6 (26-30)
Hexano: acetato de etilo: metanol	50:50:10	F7 (31-35)
Hexano: acetato de etilo: metanol	50:50:25	F8 (36-40)
Hexano: acetato de etilo: metanol	50:50:50	F9 (41-45)
Metanol	100	F10 (46-50)

### Compuesto 1

El compuesto 1 fue purificado a partir de la fracción 4 (310 mg, 97% de pureza) en una columna abierta de sílica gel RP-18 (1.5 x 28 cm, 40-63 μm, Merck, México) empleando un sistema de elución agua: acetonitrilo (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN, Merck, México), con incrementos de polaridad del 10% (Tabla 2). Se obtuvieron treinta y un subfracciones (F4<sub>1-31</sub>) de 10 mL cada una. El compuesto puro fue obtenido de las subfracciones F4<sub>11-19</sub>.



Tabla 2. Condiciones de separación cromatográfica en columna de la fracción 4

Sistema de elución	%	Fracciones
Agua: acetonitrilo	70:30	F4 (1-5)
Agua: acetonitrilo	60:40	F4 (6-10)
Agua: acetonitrilo	50:50	F4 (11-19)
Agua: acetonitrilo: metanol	50:50:10	F4 (20-25)
Metanol	100	F4 (26-31)

## Compuesto 2

El compuesto **2** fue aislado de la fracción 5 (152 mg, 88% de pureza) a través de una columna abierta de silica gel RP-18 (1.5 x 28 cm, 40-63  $\mu$ m) con un sistema de elución agua: acetonitrilo (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN) con incrementos de polaridad del 10% (Tabla 3). Se obtuvieron treinta subfracciones (F5<sub>1-30</sub>) de 10 mL cada una, el compuesto **2** purificado se obtuvo de las subfracciones F5<sub>1-9</sub>.

Tabla 3. Condiciones de separación cromatográfica en columna de la fracción 5

Sistema de elución	%	Fracciones
Agua: acetonitrilo	70:30	F5 (1-9)
Agua: acetonitrilo	60:40	F5 (10-17)
Agua: acetonitrilo	50:50	F5 (18-25)
Metanol	100	F5 (26-30)

### 6.2.2 Condiciones de análisis por HPLC

Para los análisis de HPLC se empleó un equipo Waters (Modulo de separación 2695) acoplado a un detector de arreglo de diodos (2996) con un rango de detección de 190-600 nm, operado por un software Manager Millennium (Empower 1). La separación se realizó con una columna Spherisorb® RP-18 (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Waters) con una temperatura constante de 25°C durante el análisis. Las muestras inyectadas (20  $\mu$ L) mantuvieron un flujo constante de 1.2 mL/min, con una fase móvil de gradientes de (A) H<sub>2</sub>O (ácido trifluoroacético-TFA al 1.0%) y una mezcla de (B) CH<sub>3</sub>CN: CH<sub>3</sub>OH (1:1) y monitoreadas a una longitud de onda de 340 nm. La fase móvil inicio con agua (100%) manteniéndola por 1 min; posteriormente, la proporción del

disolvente B fue incrementando gradualmente 15% (1 min), 37% (10 min) y 85% (2 min). Durante los siguientes 2 min, el disolvente B se incrementó al 100% y este sistema fue mantenido por 3 min. Finalmente, los siguientes 3 min fueron utilizados para regresar a las condiciones iniciales de la fase móvil. El método cromatográfico tuvo un tiempo de corrida de 22 min. Los tiempos de retención (tr) de la escopoletina (SC, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y los compuestos puros 1 y 2, fueron de 11.2, 10.96 y 17.3 min, respectivamente. Los compuestos aislados fueron monitoreados por tiempos de retención y espectros de absorción.

### **6.3 Identificación de compuestos**

#### **6.3.1 Análisis espectroscópicos**

Para determinar la estructura de los compuestos puros 1 y 2, aislados de los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia*, se realizaron diversos análisis espectrofotométricos: se determinó el punto de fusión en un equipo Thermo Scientific IA1900. Los espectros de RMN fueron realizados en un equipo Varian INOVA-400 a 400 MHz; para el espectro de RMN  $^1\text{H}$  y experimentos de dos dimensiones COSY, HSQC y HMBC se utilizó  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ . Los desplazamientos químicos están reportados en ppm, utilizando como referencia TMS. El espectro de IR fue obtenido en un equipo Bruker Tensor 27 FTIR; y el peso molecular fue determinado con los espectros de masas obtenidos en el equipo Hewlett Packard 5985-B y JEOL-AX 505 HA.

### **6.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de compuestos aislados de cultivos de células en suspensión**

#### **6.4.1 Animales**

Los ratones ICR (28 g) utilizados para las pruebas farmacológicas fueron manipulados de acuerdo a la norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción y uso de animales de laboratorio) y guías éticas internacionales para el uso experimental de animales. El protocolo experimental fue autorizado por el Comité Local de Investigación en Salud 1701 del IMSS con el número de registro 2011-1701-3. Los ratones fueron mantenidos a temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , humedad de  $70 \pm 5\%$  con ciclos de 12 h luz/oscuridad y acceso libre a comida y agua (*ad libitum*).

#### **6.4.2 Edema subplantar inducido con carragenina**

Los ratones fueron divididos en 5 grupos (cada grupo de 8 ratones) y administrados vía i.p. (45 mg/kg) con los compuestos puros ácido sphaerálcico (**1**, 95% de pureza), tomentina (**2**, 88% de pureza) e indometacina (99% de pureza, Sigma) como control positivo, 30 min antes de la inyección subplantar (0.02 ml) del proinflamatorio  $\lambda$ -carragenina al 1% disuelta en agua y tween 20 al 2%, en la pata posterior derecha del ratón. El volumen de la pata fue medido antes de la administración del proinflamatorio y posteriormente a la 1, 3, 5 y 7 h después de administrar la  $\lambda$ -carragenina, usando un micrómetro digital (Mitutoyo-MDC-1"-SB Productos Mitutoyo, México). El porcentaje de inhibición fue determinado a cada tiempo por la diferencia del volumen del edema, con respecto al volumen inicial de la pata usando la siguiente ecuación: Inhibición % = [(control-tratamiento/ control)  $\times$  100] (Meckes et al., 2004).

#### **6.4.3 Edema auricular inducido con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)**

Los ratones fueron asignados en siete grupos (cada grupo de cinco ratones) y el TPA (2.5  $\mu$ g disueltos en 20  $\mu$ L acetona) fue aplicado en las orejas derechas en la superficie interna y externa para generar el edema. Dosis de 0.125, 0.25, 0.5, y 1.0 mg por oreja de ácido sphaerálcico; así como 1.0 mg por oreja de tomentina, naproxeno (98% de pureza, Sigma) y/o indometacina, fueron disueltos en acetona y administrados tópicamente en ambos lados de la oreja inmediatamente después de la administración del TPA. Cuatro horas después de la administración del agente inflamatorio, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y para determinar la inflamación, secciones de 6 mm de diámetro fueron cortadas de la oreja tratada y la no tratada. El porcentaje de inhibición se determinó por las diferencias de peso de la oreja tratada (derecha) y la no tratada (izquierda) con la siguiente ecuación: % Inhibición = [(control-tratamiento/ control)  $\times$  100] (Paya et al., 1993; García et al., 2012).

#### **6.4.4 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en cada bioensayo fueron comparados por un análisis de varianza (ANOVA) y los factores cuyos valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados significativos sobre la respuesta. Diferencias significativas entre las medias de los tratamientos fueron calculados por la prueba de Tukey<sub>0.05</sub>. La curva dosis versus inhibición del edema auricular fueron linearizados y el dato del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) fue reportado (SAS, ver. 9.1; SAS Institute, Inc.).

## 6.5 Optimización de la producción de compuestos con actividad antiinflamatoria en cultivos de células en suspensión

### 6.5.1 Diseño experimental Metodología de Superficie de Respuesta.

Con el propósito de favorecer el metabolismo para la producción de compuestos fenólicos responsables de la actividad antiinflamatoria (escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico) en cultivos de células en suspensión de la especie *S. angustifolia*, se evaluaron como parte de la estrategia dos condiciones de estimulación abiótica. La reducción del contenido de nitratos, tomando como base la hipótesis del balance carbono: nitrógeno (Fritz et al., 2006) se estimó como la concentración de nitratos ( $X_1$ ); y la exposición a niveles elevados de cobre, estimulador que actúa de manera similar al ataque por patógenos induciendo la producción de fitoalexinas (cumarinas), establecida específicamente como la concentración de cobre ( $X_2$ ).

Se planteó optimizar la respuesta mediante el uso de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), con el propósito de identificar y potenciar el efecto de la concentración de ambas variables (nitratos y cobre) sobre la producción de los compuestos bioactivos. El diseño factorial  $2^K$  (DF) inicial permitió conocer el efecto de las dos variables independientes y la significancia de la interacción de ambos factores, además de proporcionar el modelo matemático a partir del cual fue posible establecer los intervalos en los que había que mantener la concentración de las variables independientes para optimizar la respuesta. Para establecer el primer DF, las variables independientes se codificaron en dos niveles (+1, -1), establecidos a partir de los valores de nitratos (2.74 mM) y cobre (0.1  $\mu$ M) presentes en el medio de cultivo MS, en el cual se producen los compuestos con actividad anti-inflamatoria (punto central, 0), como se indica en la Tabla 4.

Para este procedimiento se tomaron en cuenta tres variables dependientes a optimizar: el crecimiento celular ( $Y_1$ ), la producción de cumarinas (escopoletina y tomentina,  $Y_2$ ) y de ácido sphaerálcico ( $Y_3$ ).

Los resultados de la respuesta de las variables dependientes en el diseño factorial  $2^K$  fueron comparados a través de un análisis de varianza (ANOVA), a partir del cual se obtuvo un modelo matemático lineal con el que fue posible ubicar y en casos concretos acercarse rápidamente a los niveles de los estimuladores que definirían la región de respuesta óptima (Ryswyk y Van Hecke, 1991; Palasota y Deming, 1992).

Donde:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{1,2} X_1 X_2$$

Y= Respuesta establecida a partir de los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación, velocidad de crecimiento y biomasa máxima), y/o la liberación y acumulación de cumarinas (escopoletina, tomentina) y ácido sphaerálcico.

X<sub>1</sub>= Concentración de nitratos

X<sub>2</sub>= Concentración de cobre.

β<sub>0</sub> = intercepto (valor obtenido cuando los niveles de nitratos y cobre están en sus valor central, es decir, cuando X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> = 0).

β<sub>1</sub>= Coeficiente que indica el efecto de la variable X1 sobre la respuesta.

β<sub>2</sub>= Coeficiente que indica el efecto de la variable X2 sobre la respuesta.

β<sub>1,2</sub>= Coeficiente que indica el efecto de la interacción entre las variables X1 y X2 sobre la respuesta.

Para obtener los datos correspondientes del Diseño Factorial (DF) 2<sup>K</sup> se desarrollaron suspensiones celulares tipo lote durante un periodo de 23 días de cultivo. Los datos obtenidos en cada experimento permitieron analizar la respuesta correspondiente al comportamiento de la biomasa; en tanto que, el análisis del contenido de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico liberado al medio y acumulado en las biomasas se realizó a partir de los resultados obtenidos luego de 2 y 4 días de crecimiento, siendo estos los tiempos en los que se ha reportado la máxima producción de dichos compuestos (Pérez, 2009).

Tabla 4. Matriz del diseño factorial 2<sup>K</sup> utilizado para el establecimiento de cinéticas de crecimiento y producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia*.

Experimentos	Variables codificadas		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Cu <sup>2+</sup> (μM)
	X1 (nitratos)	X2 (cobre)		
1	-1	-1	0.685	0.1
2	+1	-1	2.74	0.1
3	0	0	1.37	1
4	-1	+1	0.685	2
5	+1	+1	2.74	2

En los casos en que el DF no declarara significancia del efecto de la interacción sobre la respuesta de las variables ( $p > 0.05$ ), para la producción de cumarinas (escopoletina y tomentina) (Y2) y de ácido sphaerálcico (Y3), se desarrolló la metodología del Diseño de Paso Ascendente (DPA), con base a la influencia de las variables (positiva de acuerdo al valor de β

expresado en el modelo lineal correspondiente). Para plantear este procedimiento, se tomó como base la relación de los coeficientes del modelo obtenido con el DF  $2^k$  y se desarrolló una nueva etapa experimental que permitió identificar el punto de inflexión, que fungiría como el punto central de un diseño más complejo denominado Diseño Compuesto Central (DCC), mediante el cual sería posible generar un modelo de segundo orden, con el que se facilitaría la ubicación de la condición con la que se generaría la máxima respuesta del sistema (modelo cuadrático).

En los casos donde el DF  $2^k$  declaró significancia del efecto de la interacción sobre la respuesta ( $p < 0.05$ ), indicó que la región de respuesta máxima estaba en la zona de los intervalos utilizados de los estimuladores (Montgomery, 2001). A partir de lo anterior, sólo era necesario completar el diseño, mediante el desarrollo del diseño en estrella (DE), que tendría como factor común con el DF los puntos centrales de éste para generar el DCC correspondiente (Ryswyk y Van Hecke, 1991; Palasota y Deming, 1992).

El análisis de los datos en el modelo de segundo orden (modelo cuadrático) con dos factores nitratos ( $X_1$ ) y cobre ( $X_2$ ) generó la expresión matemática como la siguiente:

Donde:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{1,2} X_{1,2} + \beta_{1,1} X_1^2 + \beta_{2,2} X_2^2$$

Y = respuesta: liberación y acumulación de cumarinas (escopoletina y tomentina) y ácido sphaerálcico.

$\beta_0$  = valor promedio de la respuesta, en ausencia del efecto de los factores nitratos y cobre.

$\beta_1$  = razón de cambio (efecto lineal) de nitratos sobre la respuesta promedio.

$\beta_2$  = razón de cambio (efecto lineal) de cobre sobre la respuesta promedio.

$\beta_{1,1}$  = razón de cambio (efecto cuadrático) de nitratos sobre la respuesta promedio.

$\beta_{2,2}$  = razón de cambio (efecto cuadrático) de cobre sobre la respuesta promedio.

$\beta_{1,2}$  = razón de cambio del efecto de interacción entre nitratos y cobre sobre la respuesta promedio.

### **6.5.2 Evaluación del crecimiento de las suspensiones celulares**

Las cinéticas de crecimiento en cultivo tipo lote se establecieron registrando los pesos secos (PS) de la biomasa desarrollada en cada matraz, analizando las muestras tomadas por triplicado cada tercer día durante 23 días. Para lo anterior, la suspensión celular de cada matraz se filtró al vacío en un embudo Buchner (papel Whatman No.1, 5.5 cm de diámetro) y la biomasa retenida se lavó con agua destilada para la eliminación de residuos de medio; posteriormente, la biomasa se secó a temperatura ambiente y se determinó el peso seco (PS, g/L).

El índice de crecimiento se evaluó calculando la biomasa máxima menos el inóculo entre el inóculo; la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue calculada a través del logaritmo de los pesos secos de las biombras celulares obtenidas durante la fase exponencial vs el tiempo. Para obtener el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) se utilizó la siguiente ecuación  $t_d = \ln 2 / \mu$ .

Los datos de los parámetros de crecimiento y producción obtenidos en cada condición experimental del diseño factorial fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), los factores con una  $p \leq 0.05$  fueron considerados significativos. Las diferencias significativas entre las medias de los experimentos fueron calculados por la prueba de Tukey (SAS, ver. 9.1; SAS Institute, Inc.).

### **6.5.3 Análisis de la producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico**

#### **6.5.3.1 Extracción de biombras celulares**

Las biombras secas de 3 matraces en cada tratamiento de los diseños experimentales y en cada intervalo de tiempo a evaluar, fueron extraídas por maceración a temperatura ambiente con una mezcla de diclorometano: metanol (9:1) en una relación 1:20 (p/v) por 24 h, repitiendo el proceso de extracción tres veces. Los extractos de cada muestra se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Posteriormente, los extractos fueron resuspendidos en metanol grado HPLC para su análisis.

#### **6.5.3.2 Extracción del medio de cultivo**

El medio de cultivo de cada matraz y en cada intervalo de tiempo de los tratamientos de los diseños experimentales, fue particionado por triplicado con diclorometano; los extractos fueron reunidos y concentrados a presión reducida y el residuo se recuperó y disolvió en metanol grado HPLC para su análisis.

El análisis por HPLC de cumarinas y ácido sphaerálcico en los extractos se realizó en las condiciones previamente descritas.

La identificación de los compuestos se realizó por medio de la comparación de los tiempos de retención y espectros de absorción con los parámetros de las referencias comerciales de escopoletina (Sigma) y compuestos aislados puros del cultivo de células en suspensión (tomentina y ácido sphaerálcico). La cuantificación de los metabolitos se realizó por el método de estándar externo empleando curvas de calibración realizadas con escopoletina, tomentina y el ácido sphaerálcico en niveles de 20, 40, 80, 160 y 320  $\mu\text{g/mL}$ .

## 6.6 Cultivo de células en suspensión en biorreactor de agitación mecánica

Para caracterizar el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* se utilizó un biorreactor tipo tanque agitado (Applikon, Schiedam, Holanda) de 2 L estableciendo un volumen de trabajo de 1.1 L. El biorreactor se inoculó con la suspensión celular en fase de crecimiento logarítmico al 10 % (p/v) de biomasa fresca. Los cultivos celulares de *S. angustifolia* fueron establecidos en condiciones tipo lote en medio MS (Murashige y Skoog 1962) con 2.74 mM de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) totales ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  15.9 mM y  $\text{KNO}_3$  11.5 mM) y 0.1  $\mu\text{M}$  de cobre ( $\text{Cu}_2^+$ ), complementados con 1 mg/L de ANA en combinación con 0.1 mg/L de CN y suplementado con 30 g/L de sacarosa a pH 5.7. Los contenidos de nitratos y de cobre utilizados fueron determinados como punto central en el MSR.

La aireación del sistema fue de 0.1 vvm y para la agitación se empleó un impulsor tipo Rushton a una velocidad de 300 rpm. El pH y la tensión de oxígeno disuelto se monitorearon en línea a través de electrodos conectados a un biocontrolador ADDI 1030 (Applikon, Schiedam, Holanda).

### 6.6.1 Determinación del crecimiento celular

La cinética de crecimiento en cultivo tipo lote se estableció registrando los pesos secos (PS) de las biomásas, con las muestras tomadas (30 ml) del cultivo cada tercer día durante un período de 11 días. La muestra de la suspensión celular se filtró al vacío en un embudo Buchner (papel Whatman No.1, 5.5 cm de diámetro) y la biomasa se lavó con agua destilada para la eliminación de residuos de medio; posteriormente la biomasa se secó a temperatura ambiente y se determinó el PS. El índice de crecimiento se evaluó calculando la biomasa máxima obtenida menos el inóculo entre el inóculo; la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) fue calculada a través del logaritmo durante la fase exponencial vs tiempo. Para obtener el tiempo de duplicación se utilizó la siguiente ecuación  $td = \ln 2 / \mu$ .

Las biomásas secas y los medios de cultivo de cada tiempo fueron extraídos como se mencionó anteriormente y el contenido de cumarinas y ácido sphaerálcico se determinó por HPLC en las condiciones previamente descritas.

### 6.6.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó a través de la integridad de la membrana medida por el método del azul de Evans reportado por Rodríguez-Monroy y Galindo (1999). A 1 ml de muestra con células de cada punto de muestreo de la cinética se les adicionó de azul de Evans al 0.25% y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 min. Las muestras se analizaron



microscópicamente (microscopio óptico Alphaphot-2 YS2 (Nikon, Tokio, Japón) y la magnificación de las imágenes se realizó con el objetivo 10x. Se contaron 3 campos de la muestra y el porcentaje de viabilidad se determinó como el número de células vivas en cada campo entre el número de células totales (vivas no teñidas + muertas teñidas) x 100.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7. Aislamiento e identificación de compuestos activos en cultivos de células en suspensión de *Sphaeralcea angustifolia*

La biomasa seca (200 g) obtenida de los cultivos de células en suspensión desarrollados en medio de cultivo MS con reducción de nitratos (2.74 mM), se maceró con una mezcla de diclorometano: metanol (9:1) obteniendo 8.12 g de extracto (2.81 %). En el análisis por TLC, se visualizó la presencia del compuesto escopoletina (rf=0.63) la cual presentó un frente de referencia similar al del estándar (rf=0.63) (Figura 8). Además, dicho extracto mostró la presencia de otros compuestos fluorescentes aún no identificados, denominándolos compuesto **1** (color morado) y compuesto **2** (color blanco-azul); el color de ambas señales se intensificó al utilizar el revelador de Productos naturales/Polietilenglicol (NP/PEG).

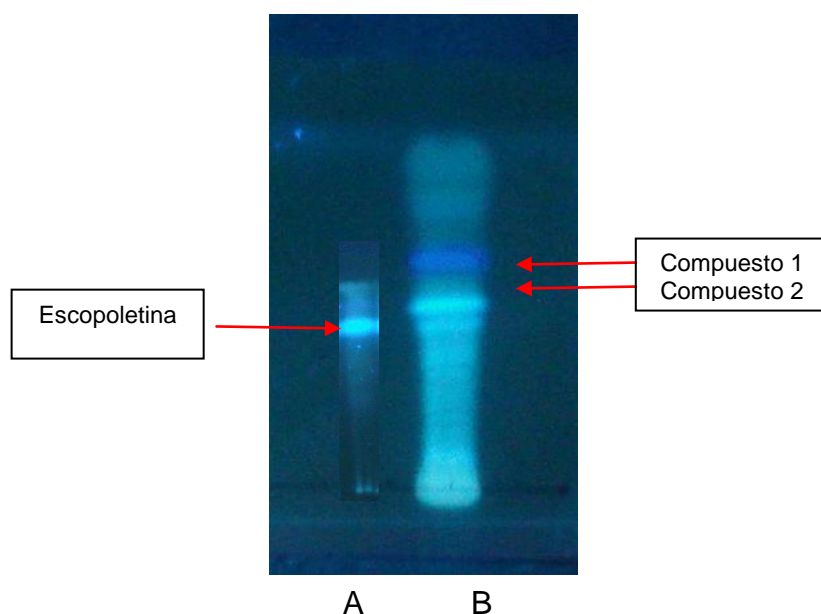


Figura 8. Cromatopla en gel de sílice del estándar de escopoletina (A) y del extracto de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):metanol (CH<sub>3</sub>OH) eluidos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (90:10), de las biomasa celulares de *S. angustifolia* derivadas del cultivo de células en suspensión desarrolladas en medio MS con reducción de nitrato (B).

El análisis por HPLC del extracto de diclorometano:metanol corroboró la presencia de escopoletina ( $t_r = 13.3$  min) al comparar el tiempo de retención y espectro de absorción con los del estándar (Figura 9 b). En el extracto de diclorometano:metanol también se detectaron otros compuestos (Figura 9 a) con base a su espectro de absorción se determinó una hidroxycumarina ( $t_r = 13.663$  min) y un flavonoides ( $t_r = 17.997$  min).

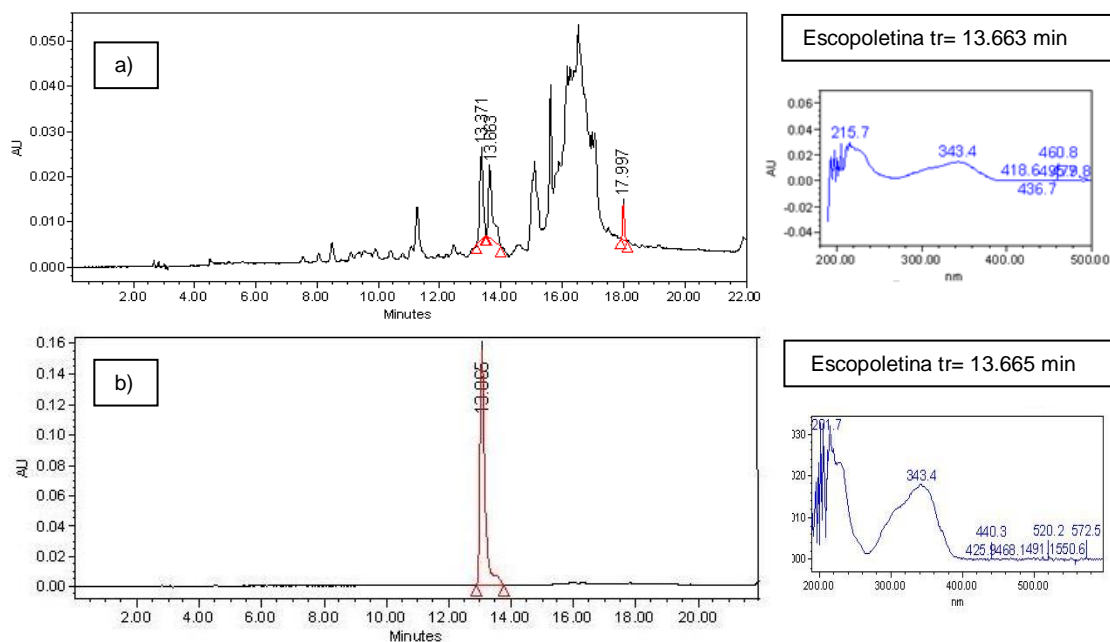


Figura 9. Cromatograma y espectros de absorción de los compuestos detectados en el extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* (a) y el estándar de escopoletina (b).

Para el aislamiento y purificación de los compuestos **1** ( $r_f = 0.75$  y  $t_r = 13.663$  min) y **2** ( $r_f = 0.66$  y  $t_r = 17.997$  min), el extracto de diclorometano:metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ ) fue fraccionado en columnas abiertas con sílica gel obteniéndose 10 fracciones (F1-F10).

### 7.1 Purificación y caracterización estructural del compuesto **1**

El compuesto **1** fue identificado en la fracción 4 (310 mg) del extracto ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ ) y posteriormente purificado de las subfracciones F4<sub>11-19</sub> (11 mg, 0.13% rendimiento por extracto y 0.004% rendimiento por biomasa) por cromatografía en columna abierta de fase reversa. El compuesto fue soluble en acetona y precipitado con metanol como un sólido de color amarillo que presentó un punto de fusión de 205 °C. En el análisis por HPLC, el compuesto **1** mostró

absorciones en el UV a  $\lambda_{\max}$ = 192, 222, 260 y 357 nm, con un tiempo de retención de 17.30 min (Figura 10).

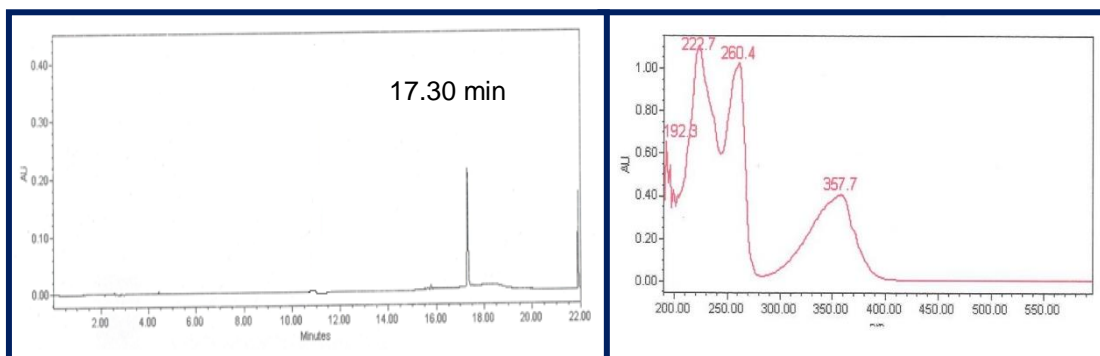


Figura 10. Cromatograma de HPLC (a) y espectro de absorción (b) del compuesto **1** derivado del extracto de diclorometano:metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

De acuerdo al análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 11), este compuesto mostró a campo bajo dos señales simples que indican un acoplamiento, característico de dos anillos aromáticos (A y B) en  $\delta$  7.62 (H-a) y  $\delta$  7.10 (H-b). Cada una de las señales integran para un solo protón, definiéndose que ambos anillos están penta sustituidos.

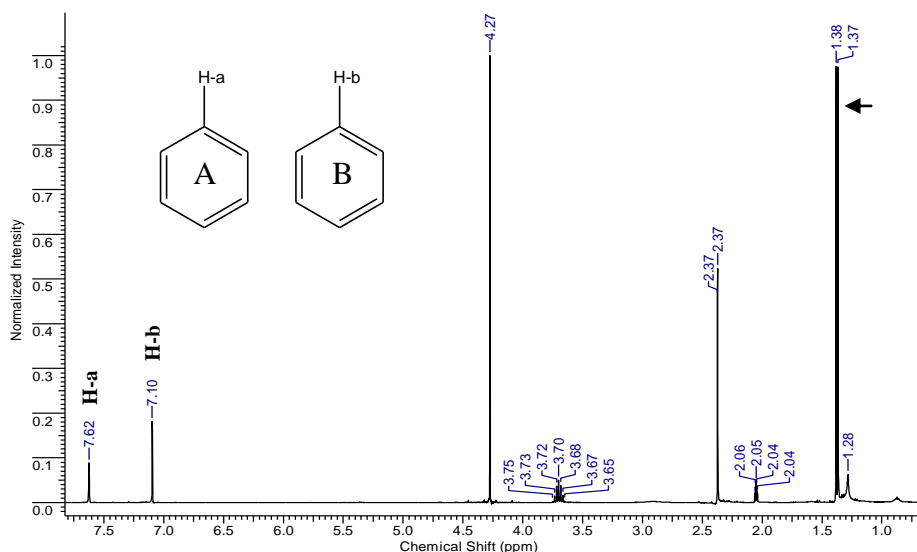


Figura 11. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

Mediante el experimento HSQC (Figura 12), se determinó la correlación que existe entre cada uno de los protones (H-a y H-b) con las señales de carbono (Figura 13). El protón H-a correlaciona con una señal de carbono en  $\delta$  115.29 y el protón H-b correlaciona con la señal de carbono en  $\delta$  120.08.

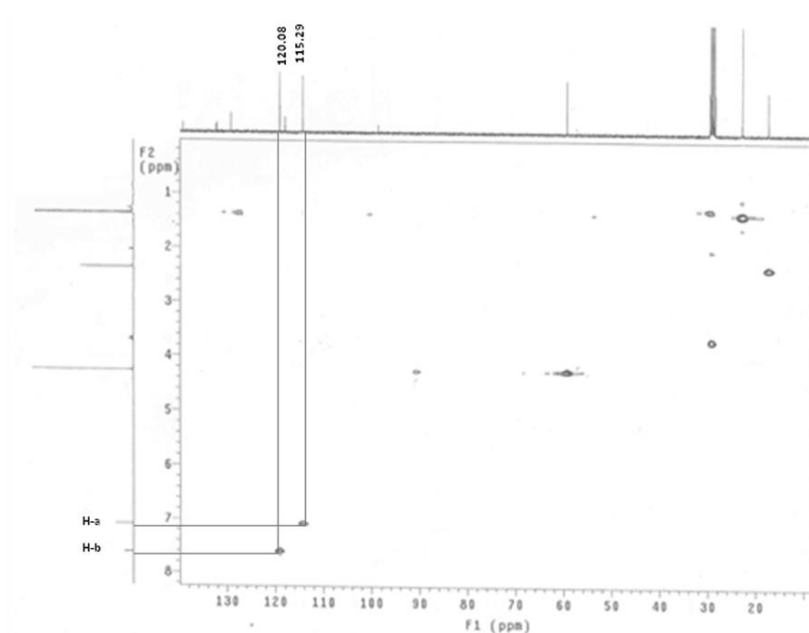


Figura 12. Espectro de HSQC del compuesto 1 ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

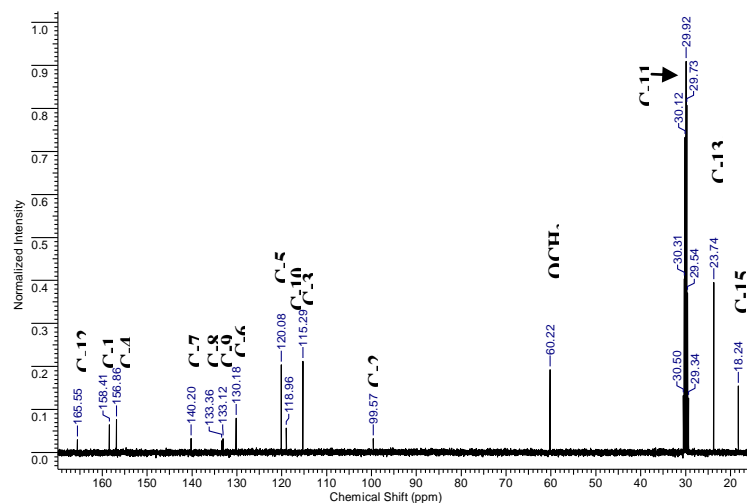


Figura 13. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

Las señales del espectro HMBC (Figura 14) muestran la conectividad entre los dos anillos a través de la correlación de la señal a  $^{2-3}J$  en  $\delta$  7.62 (H-5) del anillo A, con las señales de carbono en  $\delta$  156.86, 140.20, 133.12, 118.96 y 18.24 que fueron asignadas a los carbonos C-4, C-7, C-9, C-10 y C-15 respectivamente, proponiendo al naftaleno como estructura base. Adicionalmente se encontraron correlaciones de la señal en  $\delta$  7.10 (H-3) del anillo B con los carbonos C-1, C-2, C-10, C-11 y C-12 (Figura 15).

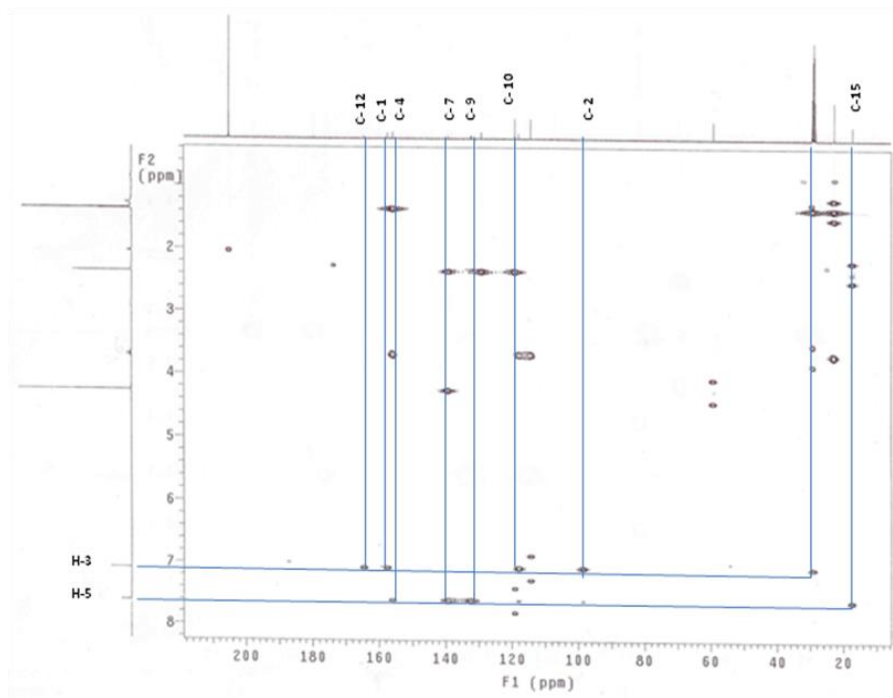


Figura 14. Espectro de HMBC del compuesto 1 ( $CD_3COCD_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

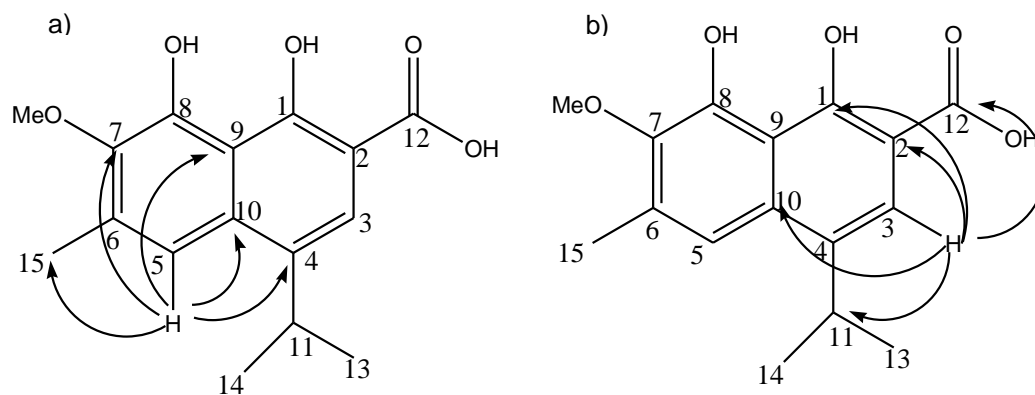


Figura 15. a) Correlaciones HMBC para el H-3 y b) correlaciones HMBC para el H-5 del compuesto 1 derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observó una señal heptuplete en  $\delta$  3.70 (H-11) con una constante de acoplamiento de  $J = 6.9$  Hz característica de un metino que es asignado a un grupo isopropilo (Figura 15). En el experimento COSY (Figura 16), esta señal mostró una correlación con una señal doblete en  $\delta$  1.37 (H-13 y H-14) que integra para seis protones (6H, d,  $J = 6.9$  Hz) que corresponden a los dos metilos del isopropilo que se correlacionan con el C-13 y C-14 ( $\delta$  23.74) de acuerdo con el experimento HSQC (Figura 12).

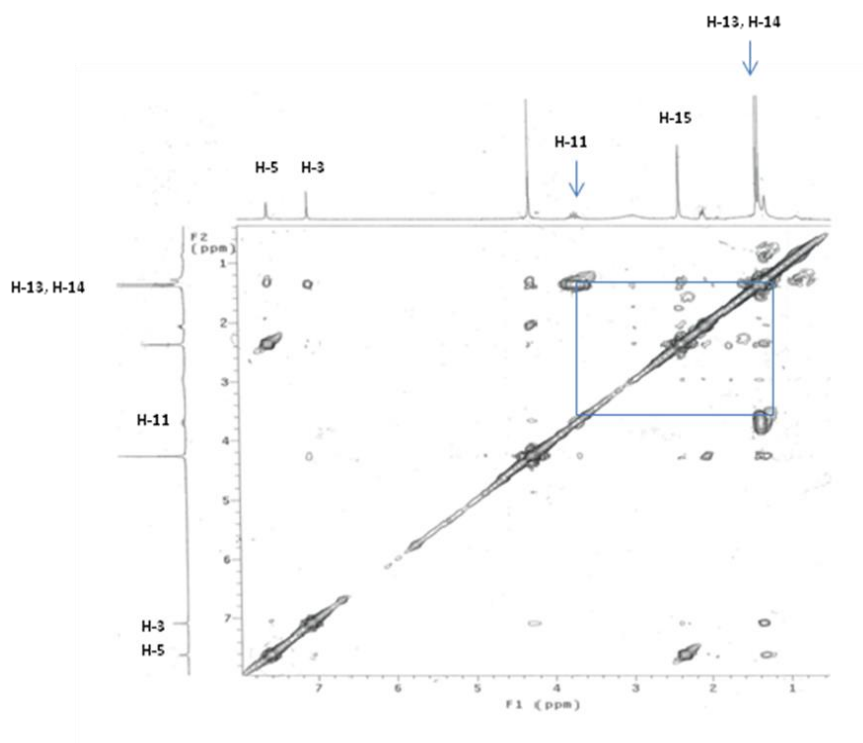


Figura 16. Espectro de  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY del compuesto **1** ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano:metanol de las biomasas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

La ubicación de los grupos isopropilo y metilo en el compuesto **1** se hizo por la correlación a tres ligaduras de la señal doble ( $\delta$  1.37, 6H, d, H-13 y H-14) con el carbono de la posición C-4 ( $\delta$  156.86) y de la señal simple ( $\delta$  2.37, 3H, s, H-15) con los carbonos de la posición C-6 ( $\delta$  130.18) y C-7 ( $\delta$  140.20) mediante el experimento HMBC (Figura 14).

El espectro de IR mostró bandas de absorción a 3368 para el grupo hidroxilo del radical ácido y 1710 para el grupo carbonilo de la molécula (Figura 18).

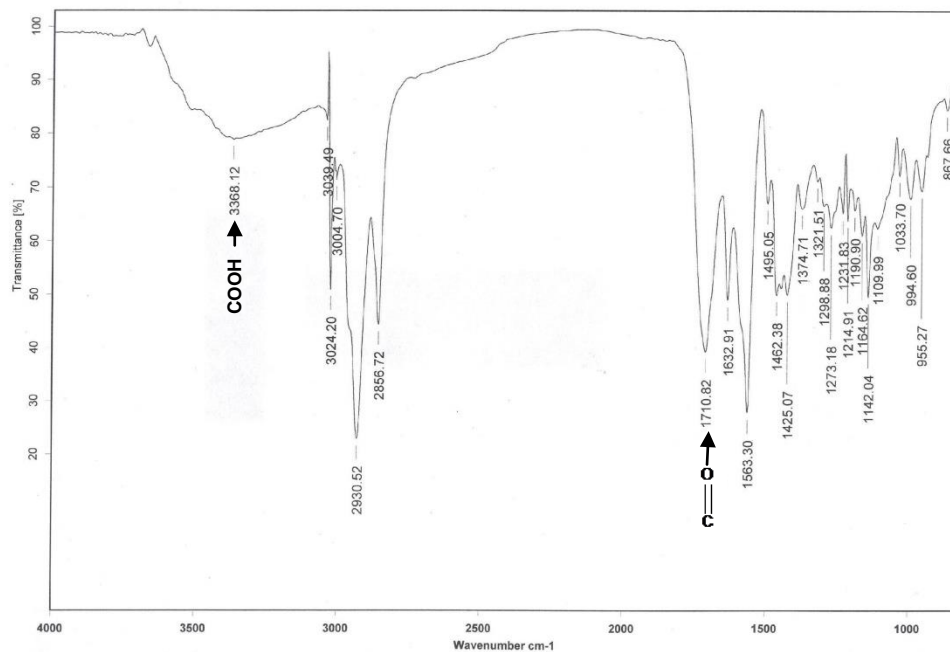


Figura 17. Espectro de IR del compuesto 1 (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

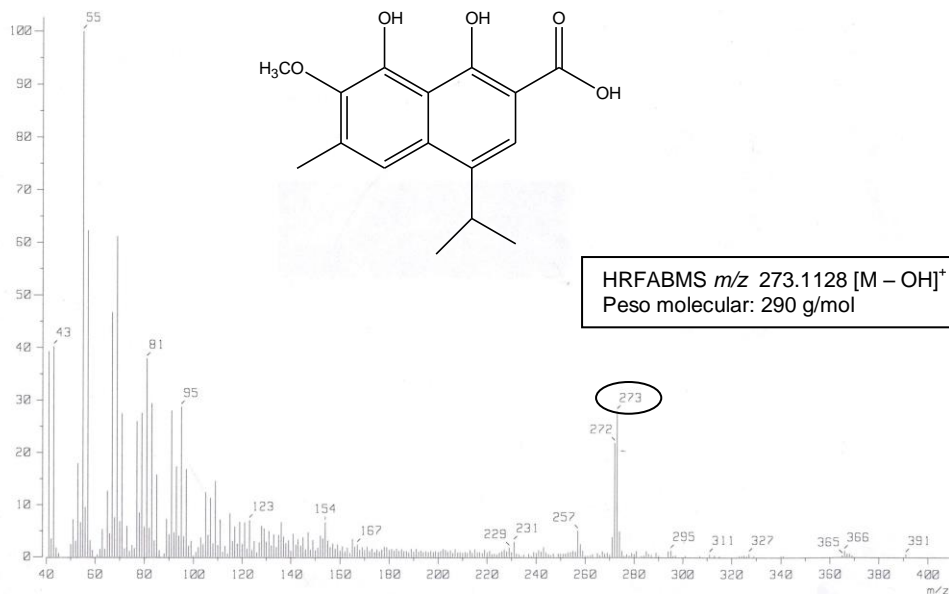


Figura 18. Espectro de masas del compuesto 1 (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

La estructura de este compuesto se confirmó por espectrometría de masas mediante las técnicas de FAB-MS  $m/z$  313  $[M + Na]^+$ , 273  $[M - OH]^+$  y HRFABMS  $m/z$  273.1128  $[M - OH]^+$ , determinando un peso molecular de 290 g/mol que corresponde a  $C_{16}H_{18}O_5$  (Figura 18).

Los datos espectroscópicos obtenidos de RMN en 1 y 2 dimensiones homo y heteronucleares (Tabla 5), permitieron establecer la identidad estructural para el compuesto **1** como ácido 2-(1,8-dihidroxi-4-isopropil-6-metil-7-metoxi) naftoico (Figura 19), el cual se aisló y caracterizó por primera vez en cultivos de células en suspensión de *S. angutifolia*, por lo que se le asignó el nombre de ácido sphaerálcico.

Tabla 5. Datos de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (400 MHz,  $CD_3COCD_3$ ,  $\delta$  ppm) determinados para el compuesto **1**

Posición	$\delta$ $^{13}C$ ,	$\delta$ $^1H$ (J en Hz)	HMBC
1	158.41, C		
2	99.57, C		
3	115.29, CH	7.10, s	1, 2, 10, 11, 12
4	156.86, C		
5	120.08, CH	7.62, s	4, 7, 9, 10, 15
6	130.18, C		
7	140.20, C		
8	133.36, C		
9	133.12, C		
10	118.96, C		
11	29.92, CH	3.70, h (J= 6.9)	3, 4, 5, 10, 13, 14
12	165.55, C		
13,14	23.74, $CH_3$	1.37, d (J= 6.9)	4, 11
15	18.24, $CH_3$	2.37	5, 6, 7
$OCH_3$	60.22	4.27, s	7



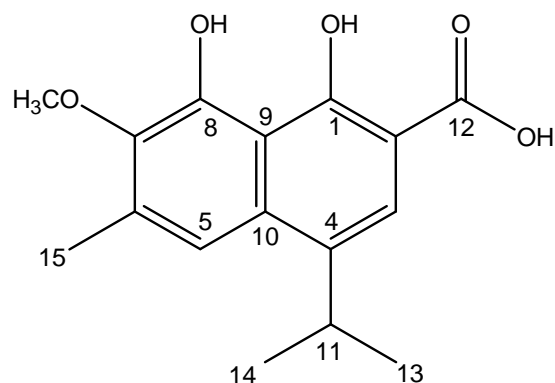


Figura 19. Estructura del compuesto **1** asignado con el nombre ácido 2-(1,8-dihidroxi-4-isopropil-6-metil-7-metoxi) naftoico (ácido sphaerálcico) aislado de cultivos de células de suspensión de *S. angustifolia*.

## 7.2 Purificación y caracterización estructural del compuesto **2**

El compuesto **2** se obtuvo de las subfracciones F5<sub>1</sub>-F5<sub>9</sub> (11 mg, 0.12% de rendimiento por extracto y 0.003% de rendimiento por biomasa) derivadas de la fracción F5 (152 mg) del extracto (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH), como un aceite de color amarillo soluble en metanol. El análisis por HPLC mostró una señal bien definida con un tr=11.20 min (Figura 20) y espectro de absorción con longitudes de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ = 202.8, 228.6, 254.5 y 343.4 nm), similares a las observadas en las hidroxycumarinas (escopoletina,  $\lambda_{\max}$ = 204.0, 228.6, 295.9 y 345.8 nm y esculetina,  $\lambda_{\max}$ = 204.0, 226.0, 298.0 y 344.0 nm).

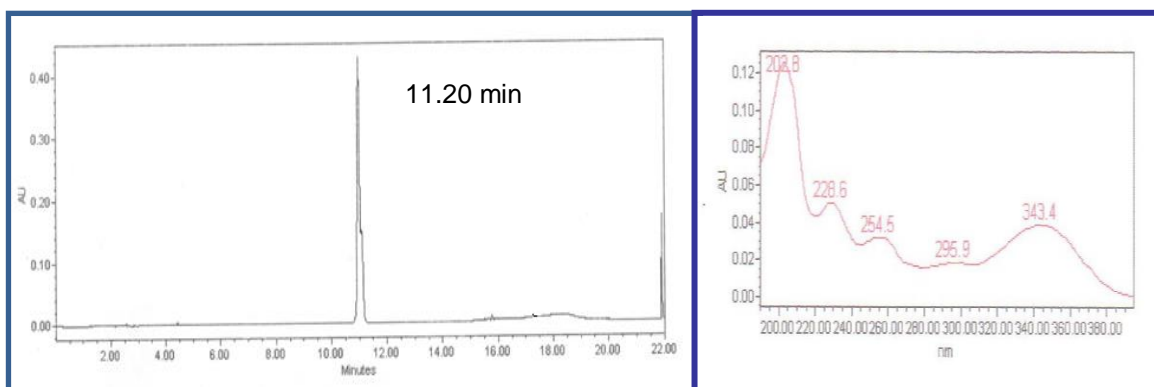


Figura 20. Cromatograma de HPLC (a) y espectro de absorción (b) del compuesto **2** derivado del extracto de diclorometano: metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

El análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 21) mostró dos señales dobletes en  $\delta$  6.2 y 7.8 (H-a y H-b) que integran cada uno para un solo protón, con una constante de acoplamiento de 9 Hz que comparten entre ellos, por lo que esta señal se asigna a dobles enlaces de tipo *cis*. Adicionalmente, se obtuvo otra señal singulete en  $\delta$  6.9 que integra para un protón correspondiendo a un anillo aromático que se encuentra penta sustituido; además, se observaron dos señales singuletes en  $\delta$  3.8 y 3.9 que integran para tres protones cada una correspondiendo a dos metoxilos. De acuerdo al análisis por RMN  $^1\text{H}$  se determinó que este compuesto estructuralmente podría definir a tomentina y/o fraxidina. La comparación de los datos con los descritos en la literatura (Hammoda et al., 2008) y el análisis del espectro NOESY (Figura 22) determinaron que se trata de 5-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina, denominada tomentina (Figura 24), debido a que no se observó ninguna interacción a través de campo entre los protones H-4 y H-5.

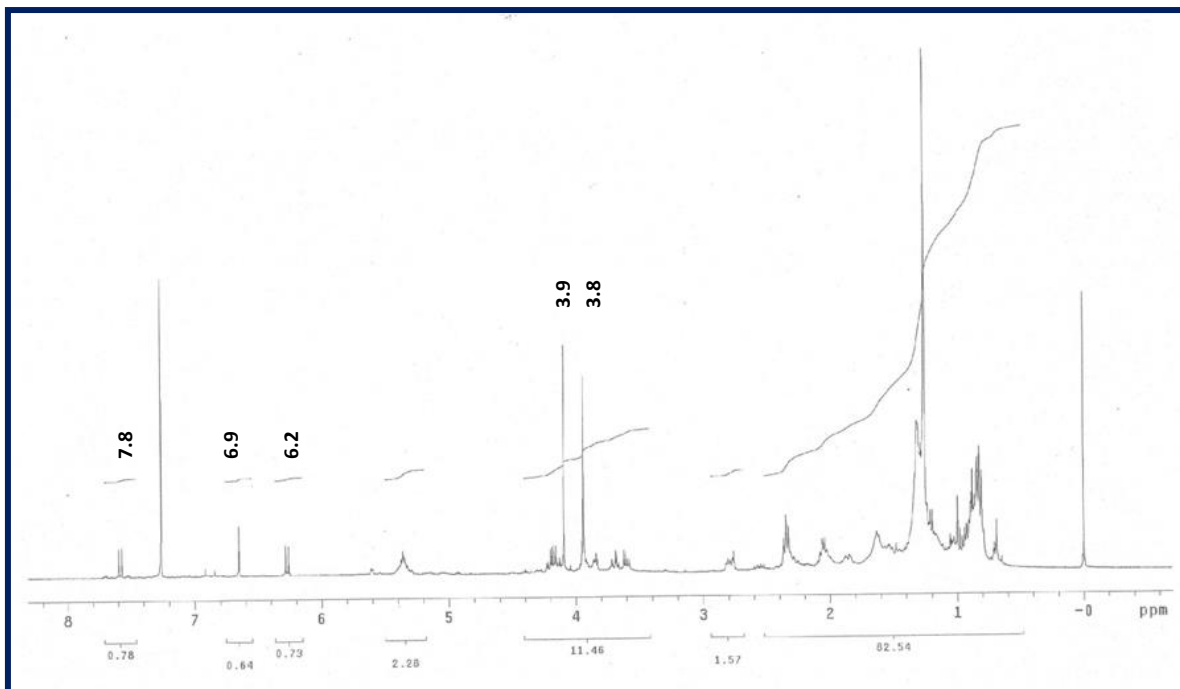


Figura 21. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **2** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano:metanol de las biomasas celulares de *S. angustifolia* establecidas en el medio MS con el contenido de nitratos reducido.

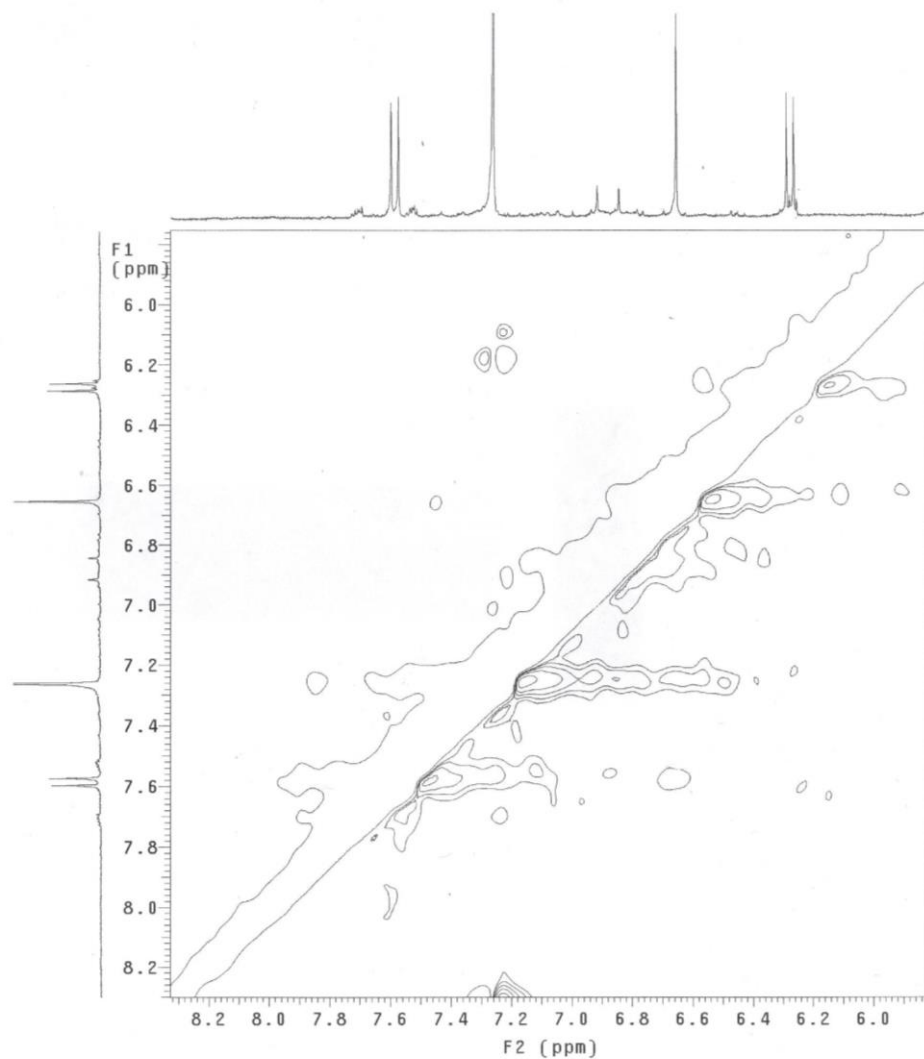


Figura 22. Espectro de  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  NOESY del compuesto **2** ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz) derivado del extracto de diclorometano:metanol de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

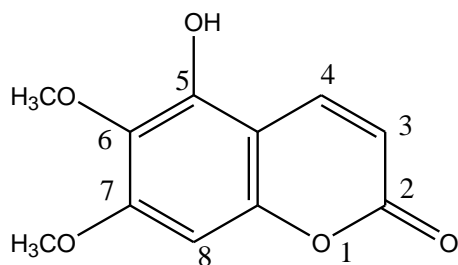


Figura 23. Estructura del compuesto **2** determinado como 5-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina (tomentina) aislado de las biomásas celulares de *S. angustifolia* desarrolladas en medio MS con el contenido de nitrato reducido.

## 7.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ácido sphaerálcico y tomentina

### 7.3.1 Modelo de edema subplantar inducido con carragenina

Los compuestos aislados **1** (ácido sphaerálcico) y **2** (tomentina) fueron analizados en dos modelos de inflamación aguda en ratón. En el modelo de edema subplantar inducido con carragenina, el mayor volumen del edema en el grupo control negativo se observó a las 3 y 5 h (1.18 mm) de la evaluación. Los volúmenes de edema subplantar en los grupos tratados con ácido sphaerálcico, tomentina e indometacina (45 mg/Kg) fueron significativamente menores que los producidos en el grupo control a la 1, 3, 5 y 7 h (Tabla 6).

El ácido sphaerálcico inhibió la formación del edema en un 41% durante la primera hora y 66 % a las 5 h, efecto que se mantuvo (62 %) hasta las 7 h. La tomentina inhibió en un 39 % la formación del edema durante la primera hora y 68 % a las 5 h, cuyo efecto se mantuvo hasta las 7 h (67 %). El fármaco indometacina inhibió la formación del edema en un 27 % en la primera hora y 60 % a las 5 h, manteniéndose con un 55 % de inhibición hasta las 7 h. El máximo efecto antiinflamatorio observado para tomentina (220 g/mol), ácido sphaerálcico (290 g/mol) e indometacina (357 g/mol) se obtuvo a las 5 h después de inducido el daño con  $\lambda$ -carragenina. Entre los compuestos evaluados no existen diferencias significativa en los porcentajes de inhibición a los diferentes tiempos de registro, indicando que la tomentina y el ácido sphaerálcico presentan una actividad anti-inflamatoria similar a la del fármaco indometacina (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad inhibitoria del desarrollo del edema subplantar de ratón inducido con carragenina de los compuestos aislados ácido sphaerálcico, tomentina y el fármaco indometacina.

Tiempo (h)	Edema (mm)				$F_{0.05}$
	control	tomentina	ácido sphaerálcico	indometacina	
1	0.78 ± 0.2	0.47 ± 0.1**	0.46 ± 0.1**	0.57 ± 0.1**	6.08
3	1.18 ± 0.3	0.65 ± 0.0**	0.57 ± 0.1**	0.59 ± 0.2**	17.08
5	1.18 ± 0.3	0.38 ± 0.2**	0.40 ± 0.1**	0.47 ± 0.3**	16.73
7	1.07 ± 0.3	0.35 ± 0.1**	0.41 ± 0.1**	0.48 ± 0.2**	15.23

Tiempo (h)	Inhibición del edema (%)				$F_{0.05}$
	control	tomentina	ácido sphaerálcico	indometacina	
1	-	39 ± 2.6	41 ± 5.1	27 ± 5.3	1.71
3	-	45 ± 1.7	52 ± 3.9	50 ± 4.9	0.65
5	-	68 ± 5.7	66 ± 3.7	60 ± 3.3	0.50
7	-	67 ± 3.9	62 ± 6.0	55 ± 5.3	1.22

Administrados vía i.p. a dosis de 45 mg/kg. Media±EEM.  $n=10$ . Los volúmenes de edema subplantar y los porcentajes de inhibición son significativamente diferentes cuando son seguidos por \*\* ( $p < 0.01$ ) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

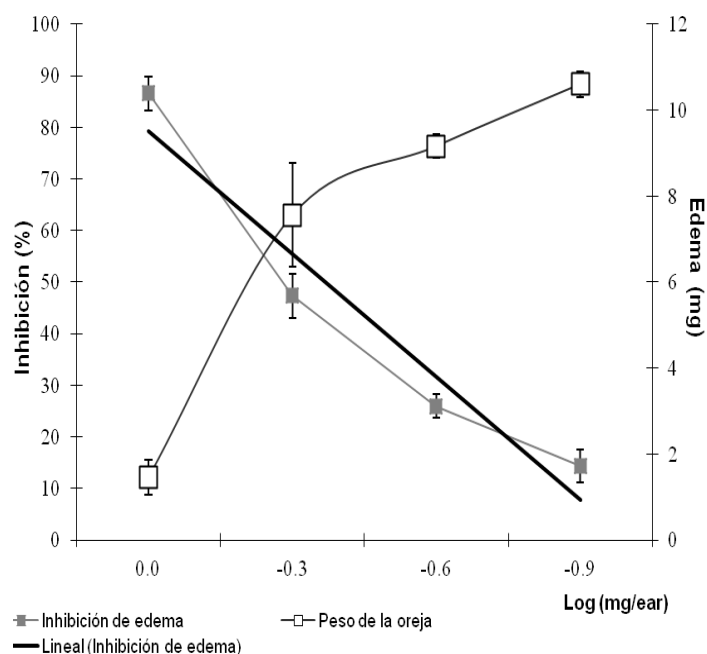
### 7.3.2 Modelo de edema auricular inducido con TPA

Los compuestos tomentina y ácido sphaerálcico se evaluaron también empleando el modelo de edema auricular inducido con el proinflamatorio TPA (2.5  $\mu$ g). En el grupo control negativo, después de 4 h se registró el máximo nivel de inflamación (12.4 mg) considerado como el 100% (Tabla 7). Los pesos de las orejas de los grupos tratados con los compuestos aislados y los controles positivos fueron más bajos que los producidos en el grupo del control negativo ( $F_{0.05} = 6.12$ ;  $p = 0.0056$ ; Tukey test<sub>0.05</sub> = 3.32).

El ácido sphaerálcico presentó un 86.6 % de inhibición del edema auricular (Tabla 7), mientras que la tomentina solo tuvo un 47.5 % de inhibición. Los controles positivos utilizados, indometacina y naproxeno, inhibieron la formación del edema en un 59.3% y 54.6%, respectivamente. Se determinaron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de los tratamientos ( $F_{0.05} = 7.81$ ;  $p = 0.006$ ; Tukey test<sub>0.05</sub> = 4.973), el ácido sphaerálcico fue más activo ( $p < 0.05$ ) que la tomentina y el naproxeno, con una actividad similar a la indometacina; mientras que la actividad de la tomentina fue similar a la de los fármacos sintéticos ( $p > 0.1$ ). El ácido sphaerálcico presentó un efecto dosis dependiente con una dosis efectiva cincuenta (DE<sub>50</sub>) de 0.54 mg/oreja (93 mM) (Figura 24).

Las cumarinas presentes en las plantas se consideran un grupo de metabolitos secundarios fenólicos estructuralmente constituidos por la fusión de un anillo de benceno y uno de pirano. Esta clase de compuestos varían ampliamente en estructura debido a los diversos tipos de sustituciones en sus anillos, que puede influir en su actividad biológica. Principalmente la presencia de radicales (hidroxilo y metoxilo) en las posiciones 5, 6 y 7 les confiere un potente efecto inhibitorio de la actividad de las enzimas lipooxigenasa (LOX) y la ciclooxigenasa (COX),

enzimas involucradas en la oxidación del ácido araquidónico, precursor de moléculas proinflamatorias como los leucotrienos y las prostanglandinas (Fylaktakidou et al., 2004).



Los volúmenes de edema auricular y los porcentajes de inhibición son significativamente diferentes cuando son seguidos por \* ( $p < 0.05$ ) ó \*\* ( $p < 0.01$ ) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Figura 24. Relación entre la dosis de ácido sphaerálcico y el porcentaje de inhibición del edema auricular, así como entre la dosis y el peso del edema auricular del ratón inducido con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). La línea de ajuste fue generada por regresión lineal de los datos. Media  $\pm$  EEM ( $n=5$ ).

Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de tomentina, ácido sphaerálcico, naproxeno e indometacina en el modelo de edema auricular en ratón.

Compuesto	Edema (mg)	$p$	Edema (%)	Inhibición del edema (%)
Control	12.4 $\pm$ 1.1	-	100	-
Tomentina	6.5 $\pm$ 0.9**	0.002	52.5 $\pm$ 7.3	47.5 $\pm$ 6.7 *
Ácido sphaerálcico	1.6 $\pm$ 0.4**	<0.001	13.4 $\pm$ 3.2	86.6 $\pm$ 3.2 **
Indometacina	5.0 $\pm$ 1.1**	<0.001	40.7 $\pm$ 9.0	59.3 $\pm$ 7.6 **
Naproxeno	5.6 $\pm$ 0.8**	<0.001	45.4 $\pm$ 6.7	54.6 $\pm$ 6.8 *

La escopoletina es el compuesto activo (antiinflamatorio) identificado en el extracto de diclorometano de las partes aéreas de *S. angustifolia*. Se ha demostrado que este compuesto es capaz de mejorar los síntomas clínicos de la artritis en ratas, debido a que reduce el número de nuevos vasos sanguíneos formados en el líquido sinovial y también inhibe inductores endógenos angiogénicos como el TNF- $\alpha$  e interleucina IL-6 (Pan et al., 2010). La tomentina aislada de los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* mostró una importante actividad inhibitoria en la formación de los edemas subplantar y auricular, indicando que este compuesto tiene actividad antiinflamatoria similar a lo observado por los fármacos indometacina y naproxeno utilizando la misma dosis. La tomentina ha sido aislada de las raíces de otras especies vegetales como *Jatropha curca*, *Platymiscium floribundum*, *Artemisia monosperma*; no obstante, en ninguna de ellas se ha reportado la actividad antiinflamatoria de este compuesto (Ravindranath et al., 2004; Hammoda et al., 2008; Ludy y Hernández-Rodríguez, 2012).

El ácido sphaerálcico fue identificado como un derivado del ácido naftoico obtenido de las rutas biosintéticas del ácido shikímico y ácido mevalónico. A partir de la vía del ácido shikímico se obtiene el ácido *p*-hidroxibenzoico; posteriormente, cadenas de unidades de isopreno obtenidas de la vía del ácido mevalónico se unen al ácido *p*-hidroxibenzoico para producir una variedad de derivados del ácido naftoico, como el ácido sphaerálcico.

Se han identificado otros compuestos derivados del naftaleno como ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico presente en *Rubia cordiflora* el cual induce apoptosis en queratinocitos de humanos teniendo una aplicación potencial para el tratamiento de la psoriasis (Mok et al., 2013), también se ha probado que reduce la inflamación en ratones con colitis deficientes de interleucina 10 (IL-10) (Okada et al., 2013). El lapachol (2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil) naftaleno-1,4-diona) se ha identificado en *Tabebuia heptaphyla*, lapachenol (2H-nafto-(1,2-b) pirano) en *Putoria calabrica*, *T. heptaphyla*, *Paratecoma peroba* y *P. alba*. El compuesto 2,4-dihidroxi-3-(2,3-dihidroxi-3-metil-1-oxo-butil)-1-metoxinaftaleno está presente en *T. heptaphyla*, 1-naftil-isopentil éter en *Galium mollugo* y 4-metoxi-1-naftol en *Asperula odorata* (Burnett y Thomson, 1968; González et al., 1997; Schmeda y Papastergiou, 2003).

Algunos compuestos sintéticos derivados del ácido naftoico se caracterizan por presentar efecto antiinflamatorio como en el caso del compuesto 6-[3-(1-adamantil)-4-metoxifenil]-2-ácido naftoico, fármaco comercialmente conocido como adapaleno y utilizado para el tratamiento del acné. Los efectos antiinflamatorios de adapaleno demostrado en modelos *in vitro* e *in vivo* se deben a la inhibición del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico, por inhibición de la enzima LOX (Millikan, 2001). Otro compuesto estructuralmente similar es el ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico, fármaco

comercialmente conocido como naproxeno, potente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) empleado en el tratamiento del dolor, la inflamación y la rigidez provocados por afecciones como la osteoartritis y la artritis reumatoide, el cual actúa inhibiendo la síntesis de la enzima COX.

El ácido sphaerálcico presentó una actividad 66% de inhibición sobre el edema subplantar en los ratones con una actividad similar a la indometacina y un 86% de inhibición del edema auricular superior a la del fármaco naproxeno, compuesto activo de la misma naturaleza química. El efecto obtenido en los modelos experimentales sugiere a este compuesto como un potente antiinflamatorio.

## 7.4 Optimización de la concentración de nitratos y cobre en el medio de cultivo de Murashige y Skoog utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta

### 7.4.1 Cinéticas de crecimiento en el modelo de Diseño Factorial $2^K$

Los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* presentaron cambios de coloración en la biomasa dependiendo de las concentraciones de nitrato y cobre utilizados en el medio MS, transformando la pigmentación verde inicial de los cultivos a rosa-blanquecino a partir del tercer día de cultivo (Figura 25).



Figura 25. Cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* establecidos en medio MS completo (a) y con 2.74 mM de nitratos y 0.1  $\mu$ M de cobre (b) en el modelo de Diseño Factorial (DF)  $2^K$ .



Las curvas de crecimiento obtenidas en los cultivos de células en suspensión mostraron un comportamiento similar de tipo sigmoideo (Figura 26). En todos los tratamientos la fase de latencia duro sólo 2 días; posteriormente, se inició la fase de crecimiento logarítmico alcanzando las biomásas máximas entre los 9 y 16 días de cultivo. Posteriormente, las células se mantuvieron en fase estacionaria y entre los 18 y 21 días se observó una declinación del crecimiento de la suspensión celular. Entre los días 21 y 23 de cultivo, en el tratamiento desarrollado con bajo contenido de ambos nutrientes (nitratos 0.685 mM, cobre 0.1  $\mu$ M) se presentó un nuevo arranque en el crecimiento (Figura 26).

De acuerdo al análisis de varianza, los niveles de nitrato y cobre en el medio no modificaron la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) ni el tiempo de duplicación (td) (Tabla 8 y 9). El análisis factorial indicó que el crecimiento al final de la fase logarítmica (9 días de cultivo) varió significativamente por efecto combinado del nitrato y del cobre; el desarrollo de la biomasa se optimiza al incrementarse el contenido de nitrato en el medio MS y disminuyendo el del cobre (Figura 26 y Tabla 9). Los parámetros de crecimiento determinados en los cultivos (Tabla 8) están dentro de los valores reportados para otras especies vegetales (Gunter et al., 2005; Nicasio-Torres et al., 2012; Tapia et al., 2013; Osuna et al., 2013).

De acuerdo al análisis de varianza, los niveles de nitrato y cobre en el medio no modificaron la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) ni el tiempo de duplicación (td) (Tablas 8 y 9). El análisis del diseño factorial indica que el crecimiento al final de la fase logarítmica (9 días de cultivo) varió significativamente por efecto combinado del nitrato y del cobre; indicando que el desarrollo de la biomasa se optimiza al incrementarse el contenido de nitrato en el medio MS y disminuyendo el del cobre (Figura 27, Tabla 9). Los parámetros de crecimiento determinados en los cultivos desarrollados en el modelo de diseño factorial  $2^k$  (Tabla 8) están dentro de los valores reportados para otras especies vegetales (Gunter et al., 2005; Nicasio-Torres et al., 2012; Tapia et al., 2013; Osuna et al., 2013).

El análisis estadístico sobre el crecimiento en el diseño factorial mostró que el contenido de nitrato debe incrementar (2.74 mM), mientras que el cobre debe disminuir (0.1  $\mu$ M) para obtener el mejor crecimiento (Tabla 10). En los cultivos celulares desarrollados con 2.74 mM de nitratos (14.62 g/L) la biomasa máxima obtenida fue de 14.25 g/L a los 9 días de cultivo, resultados similares fueron obtenidos en cultivos desarrollados en el medio MS completo (27.4 mM de nitratos) a los 21 días de cultivo (Pérez, 2009).

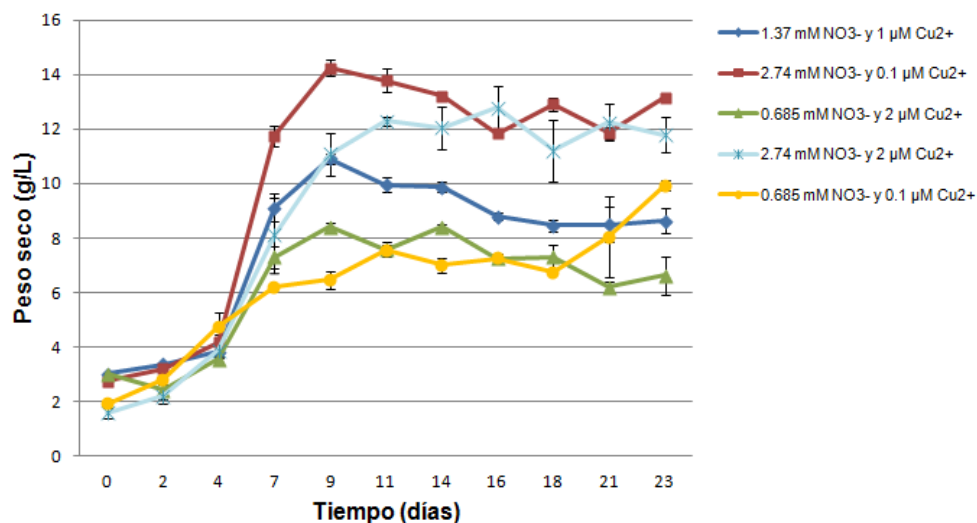


Figura 26. Curvas de crecimiento de cultivos en lote de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el medio de cultivo MS mediante el Diseño Factorial  $2^k$ . Media $\pm$ EEM ( $n=3$ ).

Tabla 8. Parámetros de crecimiento de los cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* en lote desarrollados en medio de Murashigue y Skoog complementado con diferentes niveles de nitrato y cobre en el Diseño Factorial  $2^k$ .

X1 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	X2 (Cu <sup>2+</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Cu <sup>2+</sup> (μM)	μ (días <sup>-1</sup> )	td (días)	Biomasa máxima (g/L)
+1	-1	2.74	0.1	0.389	1.78	14.25
-1	-1	0.685	0.1	0.317	2.18	7.54
+1	+1	2.74	2	0.339	2.04	12.79
-1	+1	0.685	2	0.351	1.97	8.41
0	0	1.37	1	0.364	1.90	11.08

Tabla 9. Coeficientes del modelo lineal de los parámetros de crecimiento de los cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* obtenidos en el modelo de Diseño Factorial (DF)  $2^k$ .

Parámetros de crecimiento	Coeficientes (modelo lineal)			
	β <sub>0</sub>	β <sub>1</sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	β <sub>2</sub> (Cu <sup>2+</sup> )	β <sub>1,2</sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )(Cu <sup>2+</sup> )
μ	0.376	0.012	-0.007	0.008
td	1.708	0.017	0.081	-0.072
Bmax	9.580	2.601**	-0.421**	0.346**

Los valores de los coeficientes fueron significativamente diferentes cuando estos son seguidos por \*\* ( $p < 0.01$ ) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

La biomasa máxima obtenida en los cultivos celulares de *Gymnema sylvestre* y *Withania somnifera* crecidos en medio de cultivo MS con 18.80 mM de nitratos fue de (14.95 g/L y 9.29 g/L) a los 21 días. En los cultivos de células en suspensión de *Centella asiática* crecidos en 15 mM de nitratos se obtuvo una biomasa de 16 g/L a los 14 días de cultivo. Los cultivos celulares de *Cecropia obtusifolia* crecidos en medio MS con 27.4 mM y 16 mM de nitratos, desarrollaron una biomasa de 16 g/L a los 26 días; sin embargo, la disminución a 8 mM de nitratos redujo el crecimiento a la mitad (Omar et al., 2005; Praveen y Murthy, 2011; Praveen et al., 2011; Nicasio-Torres et al., 2012).

En plantas de cassava tratadas con diferentes concentraciones de nitratos se observó un crecimiento lineal al ir incrementando el contenido de nitratos; además, se consideró que concentraciones de 12 mM de nitratos no es una limitante en el crecimiento (Cruz et al., 2004).

En los cultivos celulares de *S. angustifolia* el análisis estadístico mostró que la reducción en el contenido de nitratos a 0.685 mM, sí afectó el crecimiento celular a partir del día siete; además de afectar el aspecto fisiológico de las células cambiando su pigmentación de verde a café y generando la formación de aglomerados celulares con textura dura. Cabe asumir que la reducción en el contenido de nitratos podría estar relacionada a un proceso de lignificación, provocado por el exceso de fenoles simples inducido por la restricción en el contenido de nitrato. En plantas silvestres de *Nicotiana tabacum* deficientes de nitratos (60 veces) se observó un incremento en el contenido de algunos fenilpropanoides como el ácido *p*-cumárico, ácido cinámico, ácido caféico, ácido benzoico y ácido clorogénico, incrementándose también la lignificación de las hojas (Cruz et al., 2004; Fritz et al., 2006).

La interacción entre el metabolismo del nitrógeno y carbono modulan muchos aspectos del metabolismo, fisiología y desarrollo de la célula. Al modificar el contenido de carbono y/o de nitrógeno se conduce a una reprogramación coordinada del metabolismo, algunos de los metabolitos primarios del carbono y nitrógeno se modifican paralelamente en lugar de generar un efecto antagónico. En plantas limitadas de nitrógeno el exceso de carbohidratos se acumulan en forma de almidón, mientras que los contenidos de azúcares solubles y de aminoácidos disminuyen (Fritz et al., 2006). Cientos de genes se ven alterados por el desbalance nutricional entre el carbono y el nitrógeno, entre estos se incluyen los genes envueltos en la asimilación de nitrato (reducción de la transcripción de la nitrato reductasa; NR), los que participan en el catabolismo de aminoácidos, nucleótidos, lípidos, proteínas, síntesis de pared celular y otros componentes celulares que conllevan a la inhibición del crecimiento (George et al., 2008).

Con respecto al cobre, en altas concentraciones puede generar alteraciones en los procesos fisiológicos básicos como la fotosíntesis, el transporte de electrones en la mitocondria, asimilación del nitrógeno, conformación de la membrana celular, daño al sistema de endomembranas, la pared celular y la actividad enzimática, lo que conlleva a una inhibición del crecimiento celular. También se ha reportado que incrementos celulares de cobre superiores a 10 veces resultan tóxicos para las células (Maksymiec, 1997; Krzeslowska, 2011).

Se ha sugerido que el primer efecto de los metales es incrementar la actividad de la NADPH oxidasa generando un incremento en el contenido de EROS y de ERN, lo que genera la peroxidación lipídica de membranas, alterando la estructura de la membrana y la pared celular (Mithofer et al., 2004; Górecka et al., 2007).

La pared celular es uno de los componentes celulares que funciona como un mecanismo de defensa para las plantas, generalmente se conoce que este compartimento acumula, deposita y secuestra cationes divalentes y trivalentes tóxicos que en altas concentraciones alteran su estructura. Una de las alteraciones más notables debido a la presencia de metales es el aumento en los niveles de pectina. Estas modificaciones incrementan la rigidez de la pared celular volviéndola menos laxa, disminuyendo la permeabilidad y/o migración de diferentes moléculas dentro de la célula, como entre las células, limitando con ello el crecimiento (Krzeslowska et al., 2011).

Resultados similares se han observado en cultivos de *Nicotiana tabacum* utilizando concentraciones de 0.1  $\mu\text{M}$  de cobre, mientras que a concentraciones de 100-200  $\mu\text{M}$  fueron tóxicos para estos cultivos. Sin embargo, concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  estimularon los procesos morfogénéticos durante la micropropagación de *Dendrobium kingianum*, además de resultar óptimos para la androgénesis de *Hordeum vulgare*. Según Górecka et al., (2007) concentraciones de 1-10  $\mu\text{M}$  causan una fuerte reducción en el crecimiento de cultivos de zanahoria (Szafranska et al., 2010).

Aunque los resultados de los parámetros de crecimiento obtenidos en el diseño factorial  $2^k$  no fueron utilizados para la optimización de los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* son de gran importancia. A partir de ellos podemos establecer si los cultivos celulares tienen un crecimiento óptimo y de qué manera están siendo modificados y/o afectados por las variables a evaluar.

#### **7.4.2 Cinéticas de producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico en el modelo de Diseño Factorial 2<sup>K</sup>**

El diseño factorial 2<sup>K</sup> (DF) permitió analizar de manera general el efecto de los nitratos y cobre, así como la interacción de ambos factores sobre la producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia*. Asimismo, fue la base para generar el modelo matemático a partir del cual fue posible establecer los intervalos en las concentraciones de nitratos y cobre para optimizar la producción de estos compuestos. Los valores de las variables se codificaron en dos niveles (+1, -1), a partir de las concentraciones de nitratos (2.74 mM) y cobre (0.1µM), previamente establecidos en el medio de cultivo MS, para estimular la producción de los compuestos con actividad antiinflamatoria.

En los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* escopoletina, tomentina (Figura 27a) y ácido sphaerálcico (Figura 27b), fueron principalmente excretados al medio de cultivo al inicio de la fase de crecimiento logarítmico (2 y 4 días); posteriormente, el contenido de los compuestos declinó manteniéndose en concentraciones bajas durante todo el periodo del cultivo (23 días). Los compuestos también se acumularon en las biomasas celulares. La producción de cumarinas está asociada al crecimiento (Figura 28 a), siendo los días 7 al 11 el periodo de máxima acumulación, posteriormente su contenido disminuyó.

Las concentraciones de las cumarinas (tomentina y escopoletina) fueron mayores en el medio de cultivo (4158 µg/L a los 2 días y 3871 µg/L a los 4 días) y se obtuvieron en un periodo de cultivo más corto, en comparación con lo máximo acumulado en las biomasas a los 7 (643 µg/L) y a los 11 días (654 µg/L) de desarrollo. Un comportamiento similar se observó en la acumulación de ácido sphaerálcico (Figura 28 b). Este compuesto comenzó a acumularse en biomasa cuando su concentración disminuyó en el medio de cultivo y se incrementó hasta el final de la fase de crecimiento logarítmico, a continuación los niveles decayeron (115-412 µg/L). En los cultivos desarrollados en medio MS con 2.74 mM de nitratos y 2 µM de cobre se obtuvo el mayor contenido extracelular de cumarinas (4,136 µg/L) y ácido sphaerálcico (1,441 µg/L), además, el crecimiento de la suspensión celular no se modificó. En cambio, el contenido en biomasa de ambos tipos de compuestos se favoreció con 0.685 mM y 2.74 mM de nitrato independientemente del contenido de cobre (Tabla 10 y 11).

Tabla 10. Contenidos de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en medios de cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* desarrollados en medio de Murashige y Skoog complementado con diferentes niveles de nitrato y cobre en el Diseño Factorial (DF) 2<sup>K</sup>.

X1 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	X2 (Cu <sup>2+</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Cu <sup>2+</sup> (μM)	Cumarinas (μg/L)		Ácido sphaerálcico (μg/L)	
				2 días	4 días	2 días	4 días
+1	-1	2.74	0.1	1798.19 ± 114.65	631.02 ± 421.01	43.96 ± 2.82	46.37 ± 5.83
-1	+1	0.685	2	744.11 ± 300.43	979.42 ± 275.80	47.30 ± 1.05	46.16 ± 0.42
<b>+1</b>	<b>+1</b>	<b>2.74</b>	<b>2</b>	<b>4136.96 ± 188.17</b>	<b>3850.11 ± 291.77</b>	<b>648.91 ± 39.69</b>	<b>1442.06 ± 119.24</b>
-1	-1	0.685	0.1	1593.44 ± 346.93	683.41 ± 15.83	350.08 ± 151.02	246.95 ± 27.35
0	0	1.37	1	1174.19 ± 166.43	984.56 ± 380.06	51.02 ± 3.06	57.77 ± 10.43

Media ±EEM; n=3

Tabla 11. Acumulación de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* desarrollados en medio de Murashige y Skoog complementado con diferentes niveles de nitrato y cobre en el Diseño Factorial (DF) 2<sup>K</sup>.

X1 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	X2 (Cu <sup>2+</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Cu <sup>2+</sup> (μM)	Cumarinas (μg/L)		Ácido sphaerálcico (μg/L)	
				2 días	4 días	2 días	4 días
+1	-1	2.74	0.1	95.51 ± 4.26	90.71 ± 4.43	15.17 ± 0.64	10.37 ± 0.74
-1	+1	0.685	2	119.79 ± 13.60	<b>216.67 ± 29.47</b>	<b>135.17 ± 56.42</b>	<b>121.28 ± 10.77</b>
<b>+1</b>	<b>+1</b>	<b>2.74</b>	<b>2</b>	<b>236.45 ± 16.59</b>	184.08 ± 21.32	14.73 ± 0.36	19.85 ± 3.97
-1	-1	0.685	0.1	88.00 ± 15.01	144.44 ± 10.71	24.35 ± 1.67	18.29 ± 1.39
0	0	1.37	1	129.45 ± 4.58	87.17 ± 6.43	69.03 ± 28.57	37.27 ± 13.98

Media ±EEM (n=3)

Con el análisis de varianza desarrollado a los datos de este experimento, fue posible obtener los modelos matemáticos que describen el efecto significativo del nitrato ( $\beta_1$ ) y del cobre ( $\beta_2$ ) sobre la excreción de escopoletina y tomentina a los 2 y 4 días, así como de ácido sphaerálcico a los 4 días, indicando que las concentraciones de ambas variables de manera independiente o en interacción ( $\beta_1, 2$ ) deben incrementarse para favorecer su producción (Tabla 12).

Tabla 12. Coeficientes del modelo lineal del Diseño Factorial (DF) 2<sup>k</sup> sobre la producción y la excreción de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico de los cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* obtenidos en el modelo.

Producción (metabolitos excretados)	Coeficientes (modelo lineal)			
	$\beta_0$	$\beta_1$ (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	$\beta_2$ (Cu <sup>2+</sup> )	$\beta_{1,2}$ (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )(Cu <sup>2+</sup> )
Cumarinas (2 días)	1856.49*	858.46*	843.73*	423.97*
Cumarinas (4 días)	1437.39*	728.52*	758.12*	911.14*
Ácido sphaerálcico (2 días)	228.19	73.83	75.53	226.92*
Ácido sphaerálcico (4 días)	367.79	298.81*	298.71*	399.09*

Los valores de los coeficientes fueron significativamente diferentes cuando estos son seguidos por \* ( $p \leq 0.05$ ).

Asimismo, el análisis estadístico indicó que la acumulación de cumarinas y ácido sphaerálcico a los 2 y 4 días de cultivo, se favorece por la interacción de los contenidos de nitrato y cobre en el medio de cultivo. Aunque de manera individual los efectos de cada variable son diferentes, el contenido de nitratos debe de disminuir mientras que el de cobre debe incrementarse para favorecer la producción de los compuestos activos (Tabla 13). Los contenidos a los 2 y 4 días de cultivo son similares tanto para las cumarinas como para el ácido sphaerálcico. Los niveles detectados de cumarinas (2 días) y los de ácido sphaerálcico (4 días) son 17.5 y 73 veces menores a los detectados en el medio de cultivo.

Los datos obtenidos en cada experimento permitieron analizar la respuesta correspondiente al comportamiento de los cultivos celulares a los estímulos de la concentración de nitratos y cobre en el medio de cultivo; sin embargo, el análisis del contenido de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico liberado al medio y acumulado en las biomásas se realizó a partir de los resultados obtenidos luego de 2 y 4 días de crecimiento, siendo estos los tiempos determinados para la máxima producción de dichos compuestos.

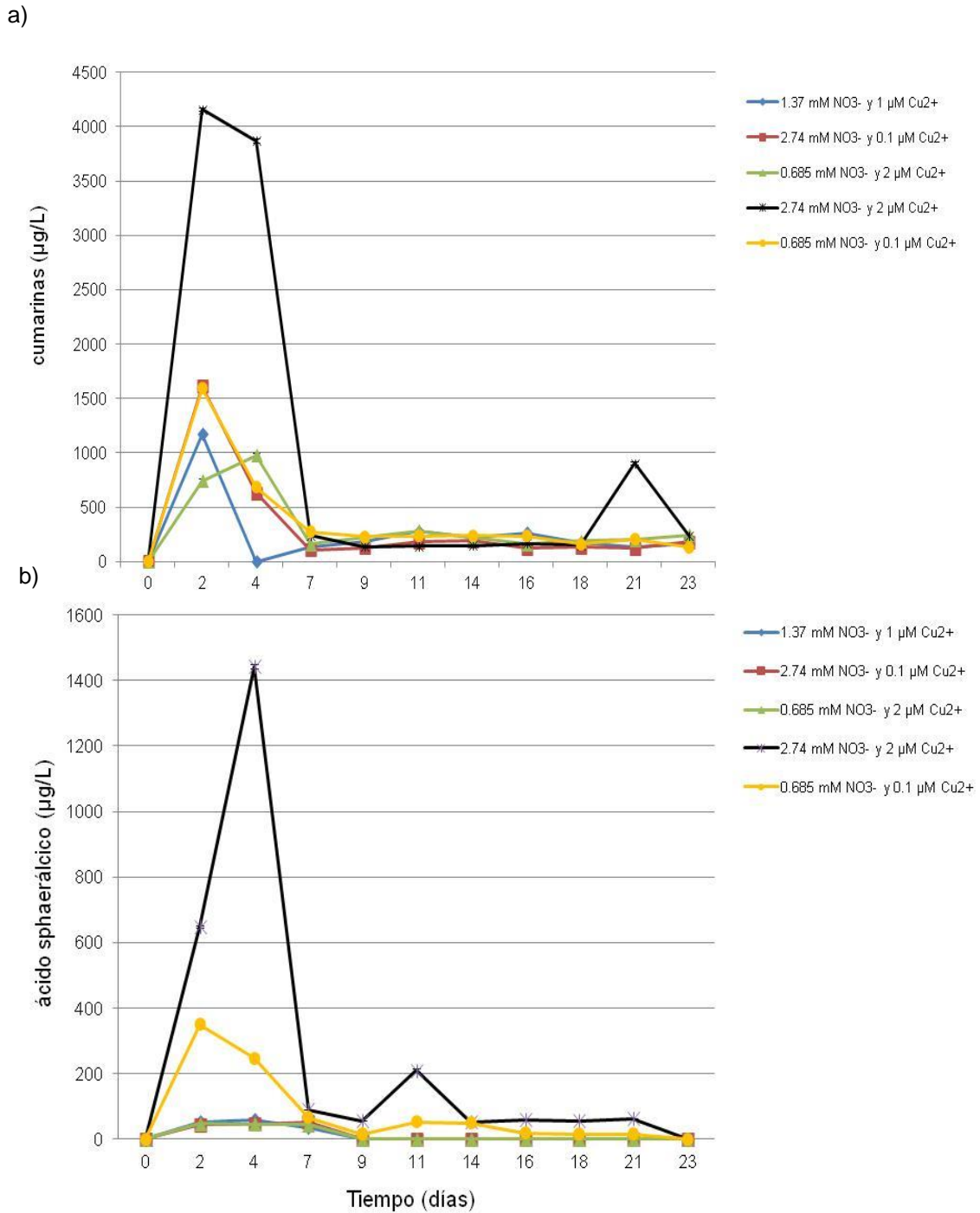


Figura 27. Cinéticas de contenido en medio de cultivo de a) cumarinas (escopoletina y tomentina) y b) ácido sphaerálico en los cultivos en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el medio MS mediante el Diseño Factorial (DF) 2<sup>K</sup>. Media±EEM ( $n=3$ ).



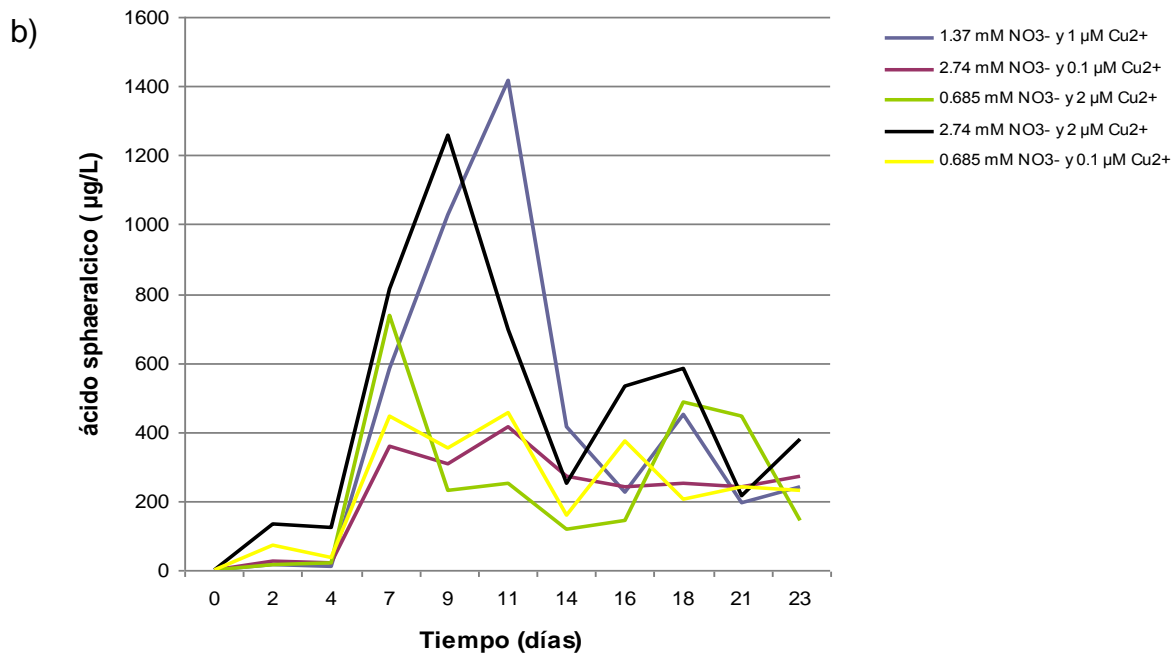
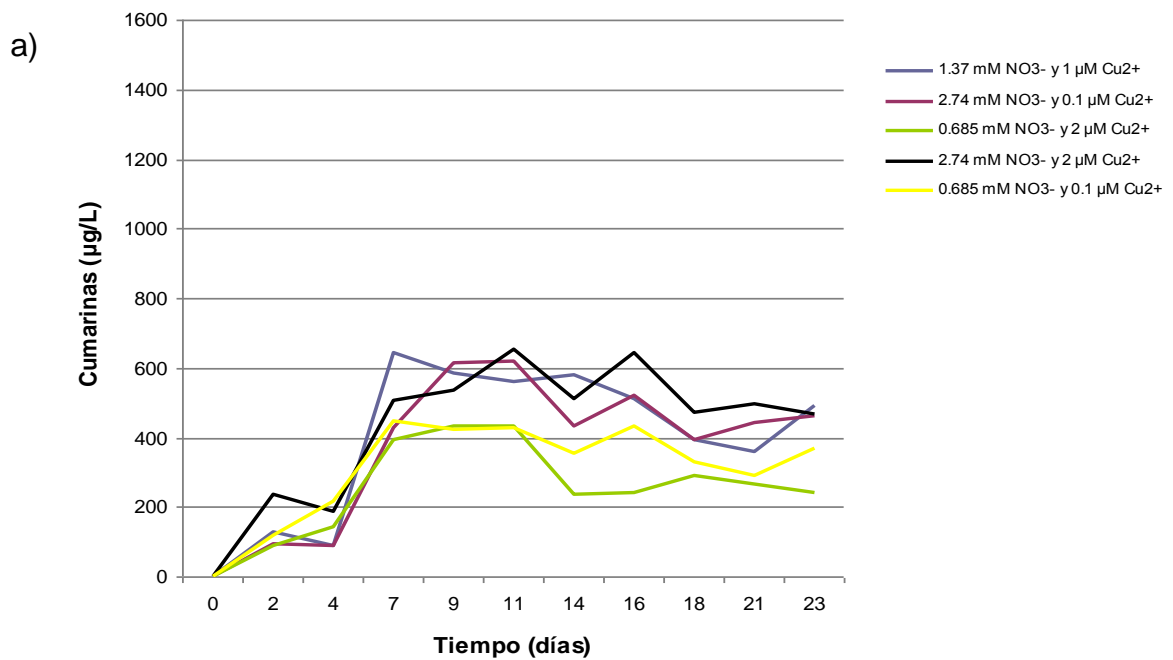


Figura 28. Cinéticas de contenido en biomazas de a) cumarinas (escopoletina y tomentina) y b) ácido sphaeralcico en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitrato y cobre en el medio MS mediante el Diseño Factorial (DF)  $2^K$ . Media $\pm$ EEM ( $n=3$ ).

Tabla 13. Coeficientes del modelo lineal de la producción de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico de los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* obtenidos en el modelo de Diseño Factorial (DF) 2<sup>k</sup>.

Producción (metabolitos acumulados)	Coeficientes (modelo lineal)			
	$\beta_0$	$\beta_1$ (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	$\beta_2$ (Cu <sup>2+</sup> )	$\beta_{1,2}$ (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )(Cu <sup>2+</sup> )
Cumarinas (2 días)	133.86	31.01*	27.26*	43.20*
Cumarinas (4 días)	144.61	-21.58	5.28	41.40*
Ácido sphaerálcico (2 días)	51.69	-32.40	27.59	27.81*
Ácido sphaerálcico (4 días)	41.60	-27.10*	28.38*	23.11*

Los valores de los coeficientes fueron significativamente diferentes cuando estos son seguidos por \* ( $p \leq 0.05$ ).

### 7.4.3 Cinéticas de producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico en la metodología de paso ascendente

Este estudio se enfocó en optimizar la producción de los compuestos activos, sin dejar de tomar en cuenta el comportamiento del crecimiento celular siendo este uno de los factores asociado a la producción. El diseño factorial 2<sup>k</sup> nos permitió conocer el efecto de los nitratos y el cobre, así como la interacción significativa de ambos factores sobre la producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico. A partir del modelo matemático lineal fue posible ubicar y acercarse rápidamente a las condiciones de operación de la región de respuesta óptima.

La segunda etapa de la metodología de superficie de respuesta (MSR), es la metodología del diseño de paso ascendente (DPA) debido a que el efecto de las variables fue positivo. De acuerdo a los resultados de crecimiento obtenidos en el modelo de diseño factorial (DF), el periodo de cultivo para la metodología del DPA se acortó a 13 días, ya que posteriormente las células entran en un estado estacionario; además de considerar que son los tiempos a los que se registran la mayor excreción y acumulación (9 y 11 días) de tomentina, esopoletina y ácido sphaerálcico (Pérez-Hernández et al., 2014).

Para plantear este procedimiento, se tomó como base la relación de los coeficientes del modelo obtenido con la interacción de las variables nitratos y cobre, sobre la producción de cumarinas en el medio de cultivo. Esta etapa experimental permitió identificar el punto de inflexión en este diseño, que fungiría como el punto central de un diseño más complejo, con el que fue posible identificar las condiciones para optimizar la producción de cumarinas y ácido sphaerálcico.

En el modelo DPA, los cultivos celulares desarrollados bajo las combinaciones experimentales de 2.74 mM de  $\text{NO}_3^-$  con 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  y 6.85 mM de  $\text{NO}_3^-$  con 3.84  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , mostraron una curva de crecimiento sigmoidea característica de las células vegetales (Figura 29). No obstante, el crecimiento de la suspensión celular se redujo en un 74% en los cultivos desarrollados con mayores contenidos de ambos nutrientes (Tabla 14). Los resultados obtenidos para los parámetros de crecimiento ( $\mu$ ,  $t_d$  y  $B_{\text{max}}$ ), indican que los cultivos de células en suspensión se encuentran lejos de sus condiciones óptimas de crecimiento. Asimismo, se determinó que el incremento en las concentraciones de cobre en el medio de cultivo por arriba de 5.68  $\mu\text{M}$  inhibe el crecimiento en las suspensiones celulares, provocando lisis y muerte celular (Tabla 14 y Figura 29).

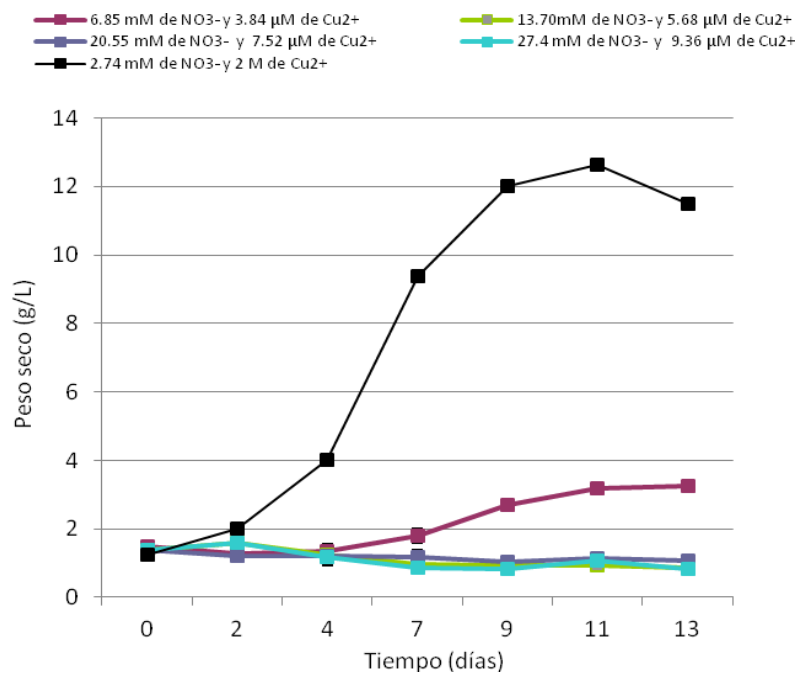


Figura 29. Curvas de crecimiento de cultivos en lote de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el medio de cultivo mediante el modelo de Diseño de Paso Ascendente (DPA). Media $\pm$ EEM.

Tabla 14. Parámetros de crecimiento de los cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* en lote desarrollados en medio de Murashige y Skoog complementado con diferentes niveles de nitrato y cobre en el Diseño de Paso Ascendente (DPA).

Variables codificadas	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Cu <sup>2+</sup> (μM)	μ (días <sup>-1</sup> )	td (días)	Biomasa Máxima (g/L)
X1+Δ	2.74	2	0.389	1.78	12.62
X1+2Δ	6.85	3.84	0.2351	2.94	3.25
X1+3Δ	13.70	5.68	NC	NC	NC
X1+4Δ	20.55	7.52	NC	NC	NC
X1+5Δ	27.4	9.36	NC	NC	NC

NC, no crecimiento.

El DPA mostró que el mayor contenido de cumarinas (Figura 30 y Tabla 15) en el medio de cultivo (4,136.96 μg/L) y biomásas (236.45 μg/L) se obtuvo a los 2 días y la del ácido sphaerálcico (Figura 31 y Tabla 16) a los 4 días (excreción: 1,441.95 μg/L y acumulación: 1,894.49 μg/L). Ambas respuestas se presentaron bajo las condiciones de origen (2.74 mM de nitratos y 2 μM de cobre), debido probablemente a que estas son las mejores condiciones de crecimiento. También se observó que a concentraciones superiores, tanto de nitratos como de cobre hay una disminución de la producción asociada al crecimiento. Esta respuesta fue validada debido a que la interacción entre los dos factores (nitratos y cobre) en el modelo de diseño factorial (DF) resultó significativa, indicando que se está cerca de la zona de optimización (Ryswyk y Hecke, 1991).

Tabla 15. Excreción de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño de Paso Ascendente (DPA). Media±EEM.

Variables codificadas	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Cu <sup>2+</sup> (μM)	Cumarinas (μg/L)		Ácido sphaerálcico (μg/L)	
			2 (días)	4 (días)	2 (días)	4 (días)
X1+Δ	2.74	2	<b>4136.96 ± 188.17</b>	<b>3850.11 ± 291.77</b>	<b>648.79 ± 39.70</b>	<b>1441.95 ± 129.25</b>
X1+2Δ	6.85	3.84	115.30 ± 1.67	165.58 ± 31.61	184.06 ± 36.39	296.08 ± 92.34
X1+3Δ	13.70	5.68	116.64 ± 0.95	128.64 ± 8.71	58.75 ± 58.75	161.26 ± 10.52
X1+4Δ	20.55	7.52	126.54 ± 8.66	116.33 ± 1.10	148.06 ± 77.24	133.20 ± 4.84
X1+5Δ	27.4	9.36	177.28 ± 14.65	160.71 ± 43.24	62.73 ± 62.73	131.59 ± 1.41

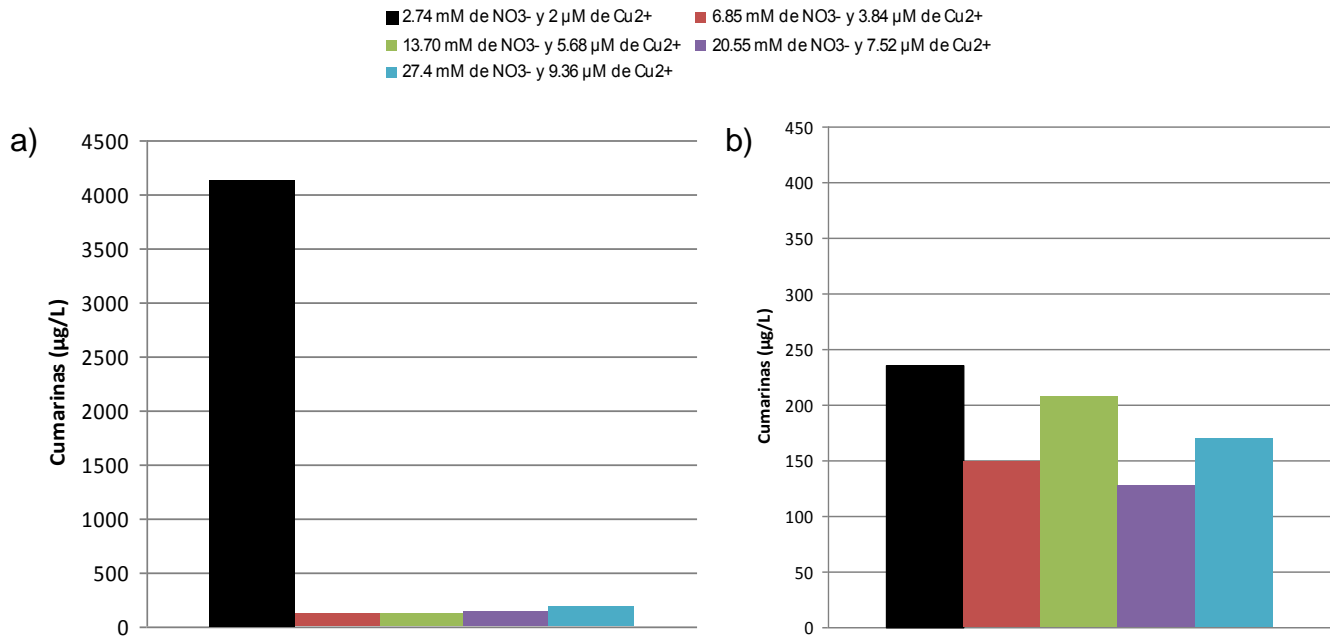


Figura 30. Excreción (a) y acumulación (b) de cumarinas a los dos días en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño de Paso Ascendente (DPA). Media±EEM.

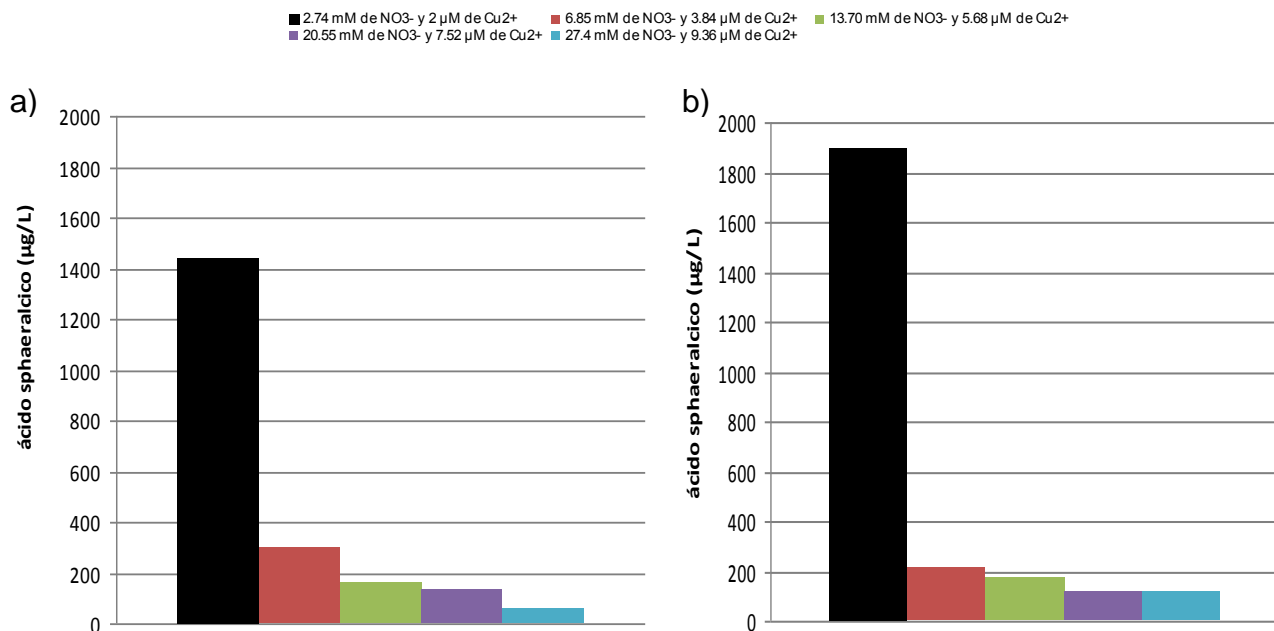


Figura 31. Excreción (a) y acumulación (b) de ácido sphaerálcico a los cuatro días en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño de Paso Ascendente (DPA). Media±EEM.

Tabla 16. Acumulación de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño de Paso Ascendente (DPA). Media±EEM.

Variables codificadas	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Cu <sup>2+</sup> (μM)	Cumarinas (μg/L)		Ácido sphaerálcico (μg/L)	
			2 (días)	4 (días)	2 (días)	4 (días)
X1+Δ	2.74	2	<b>236.45 ± 16.59</b>	<b>184.08 ± 21.32</b>	<b>280.58 ± 53.09</b>	<b>1894.49 ± 912.34</b>
X1+2Δ	6.85	3.84	148.70 ± 14.90	134.54 ± 10.20	184.64 ± 34.23	208.82 ± 39.54
X1+3Δ	13.70	5.68	208.11 ± 80.18	133.18 ± 18.40	170.47 ± 42.48	174.22 ± 58.97
X1+4Δ	20.55	7.52	128.27 ± 3.86	114.70 ± 1.72	133.85 ± 7.82	114.94 ± 13.01
X1+5Δ	27.4	9.36	169.55 ± 37.67	163.81 ± 83.69	178.12 ± 39.44	115.36 ± 49.76

En el modelo de paso ascendente, tanto para las cumarinas como para el ácido sphaerálcico, se generó un punto de inflexión de la curva, por lo tanto para encontrar las condiciones óptimas de cultivo para su producción fue necesario ampliar el campo de estudio con intervalos de concentración cortos. Por lo tanto, para completar el modelo cuadrático (diseño compuesto central, DCC) y encontrar las condiciones de nitrato y de cobre óptimas fue necesario añadir al DF cuatro puntos más (diseño en estrella, DE) tomando como punto de origen las condiciones nutricionales de 2.74 mM de nitratos y 2 μM de cobre.

#### 7.4.4 Optimización de la producción de cumarinas (escopoletina y tomentina)

En el diseño compuesto central (DCC) el análisis de producción de cumarinas y ácido sphaerálcico, tanto liberado al medio de cultivo como acumulado en las biomásas, se realizó a los 2 y 4 días de cultivo (Tabla 17 y 18), siendo estos los tiempos de máxima producción observados en los modelos de DF y DPA.

Los resultados experimentales indicaron que el nivel máximo de cumarinas excretadas al medio de cultivo se obtuvo con 2.74 mM de nitrato y 2 μM de cobre (4,136.96 μg/L a los dos días); en tanto que a los 2 días, el nivel óptimo para su mayor acumulación fue con 1.37 mM de nitratos libre de cobre (267.30 μg/L, Tabla 17).

Tabla 17. Producción de cumarinas en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño Compuesto Central (DCC). Media±EEM.

X1	X2	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Cu <sup>2+</sup> (μM)	Excreción (μg/L)		Acumulación (μg/L)	
				2 días	4 días	2 días	4 días
(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	(Cu <sup>2+</sup> )						
1	1	2.74	2	<b>4136.96±188.17</b>	<b>3850.11 ±291.77</b>	236.45 ± 16.59	184.08 ± 21.32
-1	1	0.685	2	1593.44 ±346.93	683.41 ±15.83	119.79 ±13.60	<b>216.67 ± 4.43</b>
1	-1	2.74	0.1	1798.19 ±114.65	631.02 ±421.01	95.51 ± 4.26	90.71 ± 4.43
-1	-1	0.685	0.1	744.11 ±300.43	979.42 ±275.80	88.00 ± 15.01	144.44 ± 10.71
0	0	1.37	1	1174.19 ±166.43	984.56 ±380.06	129.45 ± 4.58	87.17 ± 6.43
0	-1.414	1.37	0	800.96 ± 182.24	281.05 ± 18.00	<b>267.30 ± 23.94</b>	98.31 ± 6.34
0	1.414	1.37	2.41	255.37 ± 60.81	1054.27 ±297.71	154.19 ± 9.45	108.45 ± 13.33
-1.414	0	0	1	285.91 ± 41.02	2417.57±269.99	148.21 ± 17.54	143.64 ± 17.07
1.414	0	2.78	1	371.55 ± 71.38	1201.68 ±288.63	171.31 ± 12.02	105.72 ± 10.24

Tabla 18. Coeficientes de la producción de cumarinas (escopoletina y tomentina) en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño Compuesto Central (DCC). Media±EEM.

Metabolitos Cumarinas		Coeficientes (modelo cuadrático)					
		β <sub>0</sub>	β <sub>1</sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	β <sub>2</sub> (Cu <sup>2+</sup> )	β <sub>1,2</sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )(Cu <sup>2+</sup> )	β <sub>1<sup>2</sup></sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	β <sub>2<sup>2</sup></sub> (Cu <sup>2+</sup> )
Excretados	2 días	1773.17	444.43	327.98	423.97*	-22.51	77.23
	4 días	984.28	148.84	515.27*	912.21*	491.02	-80.09
Acumulado	2 días	129.48	17.71	-8.23	39.45*	1.62	27.12
	4 días	87.14	-17.49*	4.43	41.40*	30.01*	19.35

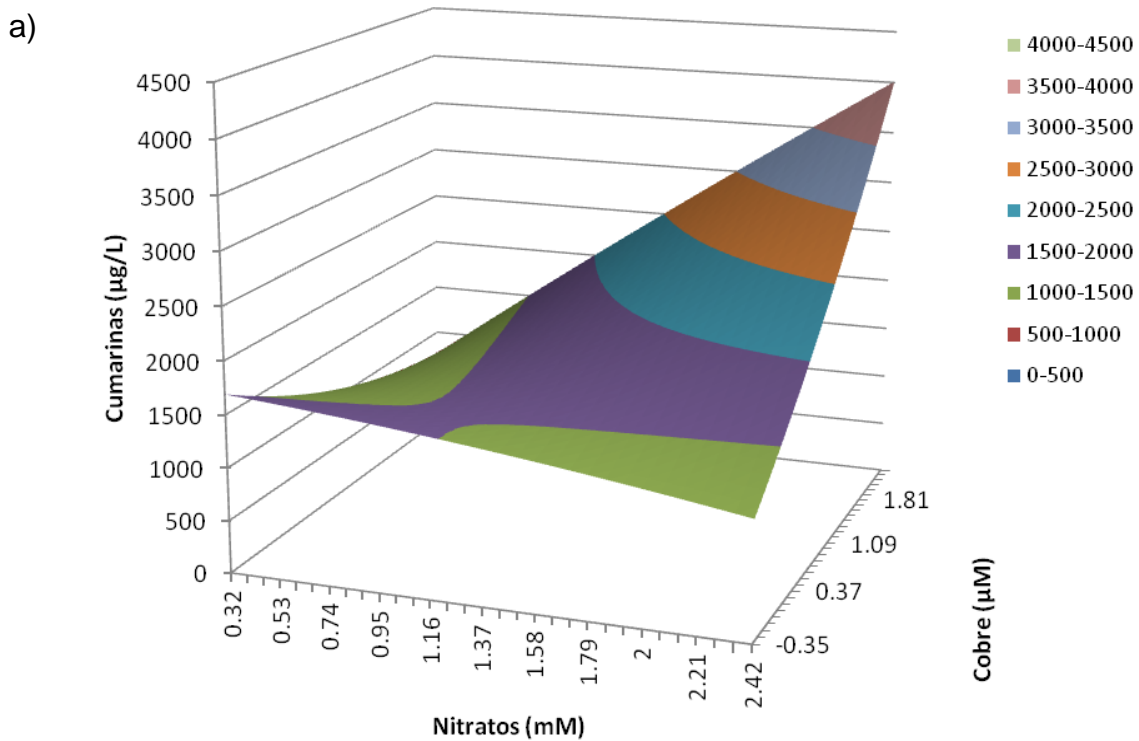
Los valores de los coeficientes fueron significativamente diferentes cuando estos son seguidos por \* ( $p \leq 0.05$ ).

El análisis del modelo cuadrático indicó que la interacción entre los nitratos y el cobre, así como el incremento en su contenido en el medio de cultivo, tienen un efecto significativo

sobre la excreción (Figura 32 a y 33 a) y acumulación (Figura 32 b y 33 b) de las cumarinas (Tabla 18) a los 2 y 4 días de cultivo. En relación a la acumulación de cumarinas a los 2 días de cultivo, los contenidos de nitrato deben de incrementarse y el cobre disminuir, en tanto que a los 4 días el efecto es inverso, siendo significativa la reducción del contenido de nitratos (Tabla 18 y Figura 32 b).

Gráficamente se predice que la interacción de los niveles más altos (2.42 mM de nitratos y 1.81  $\mu\text{M}$  de cobre) de las variables estimulan la excreción y acumulación de cumarinas (Figura 32 a). El contenido intracelular de cumarinas, a niveles bajos de nitrato (0.32-1.16 mM) se incrementa al disminuir la concentración de cobre (Figura 32 b).

A los 4 días se hizo evidente que niveles bajos de nitratos (0.32-1.16 mM) libres de cobre estimulan la producción y liberación de las cumarinas; sin embargo, la combinación de niveles altos de nitrato (1.37-2.42 mM) e incrementos en el contenido de cobre estimuló también su producción (Figura 33 a). Un efecto similar se observó en el contenido intracelular de cumarinas, la reducción de nitratos y la combinación de estos con concentraciones altas de cobre estimulan su acumulación (Figura 33 b).





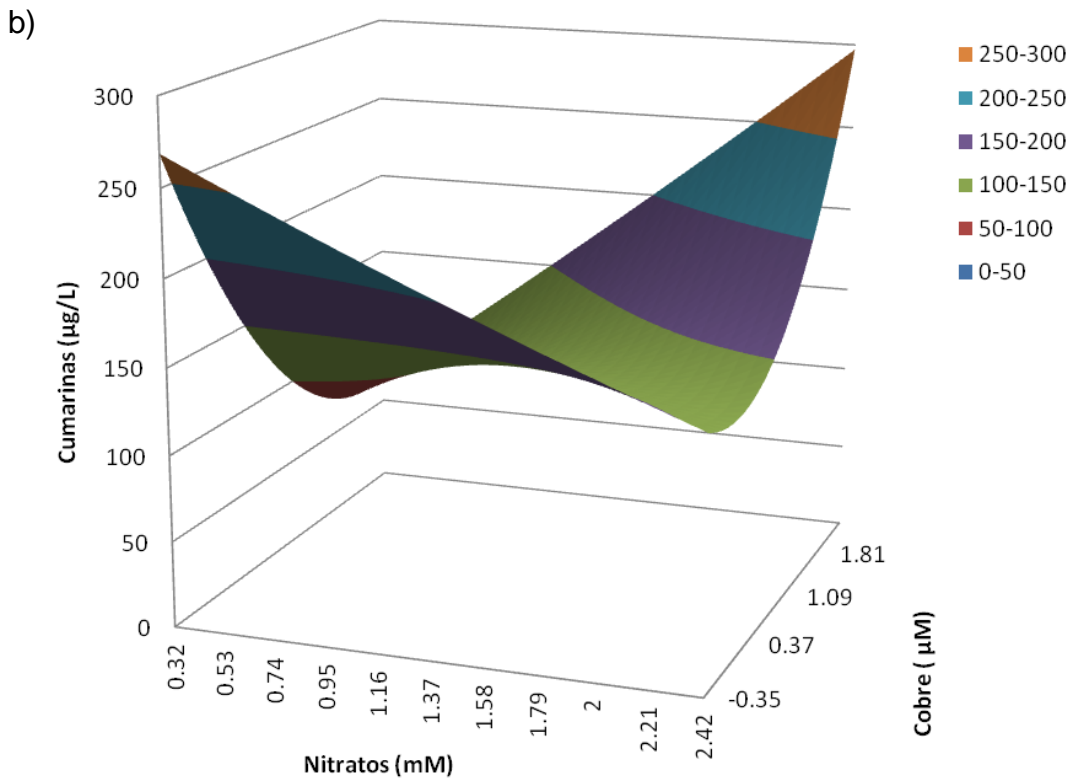
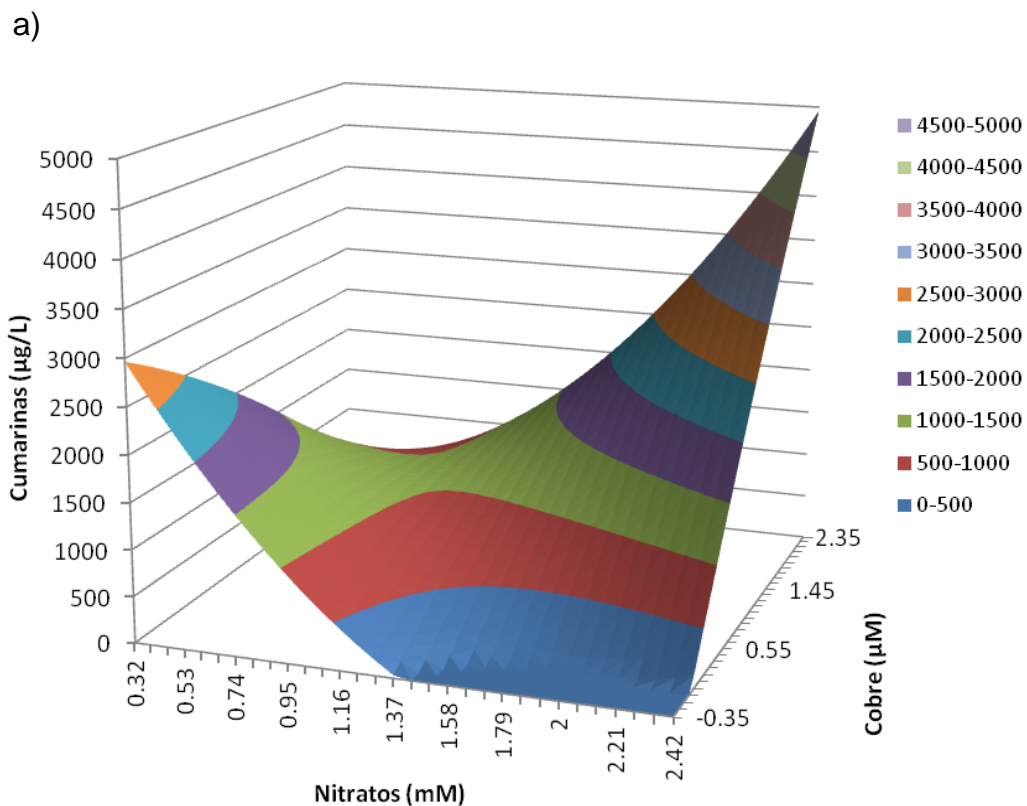


Figura 32. Producción de cumarinas excretadas (a) y acumuladas (b) en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* en el modelo del Diseño Compuesto Central (DCC) a los dos días de cultivo.



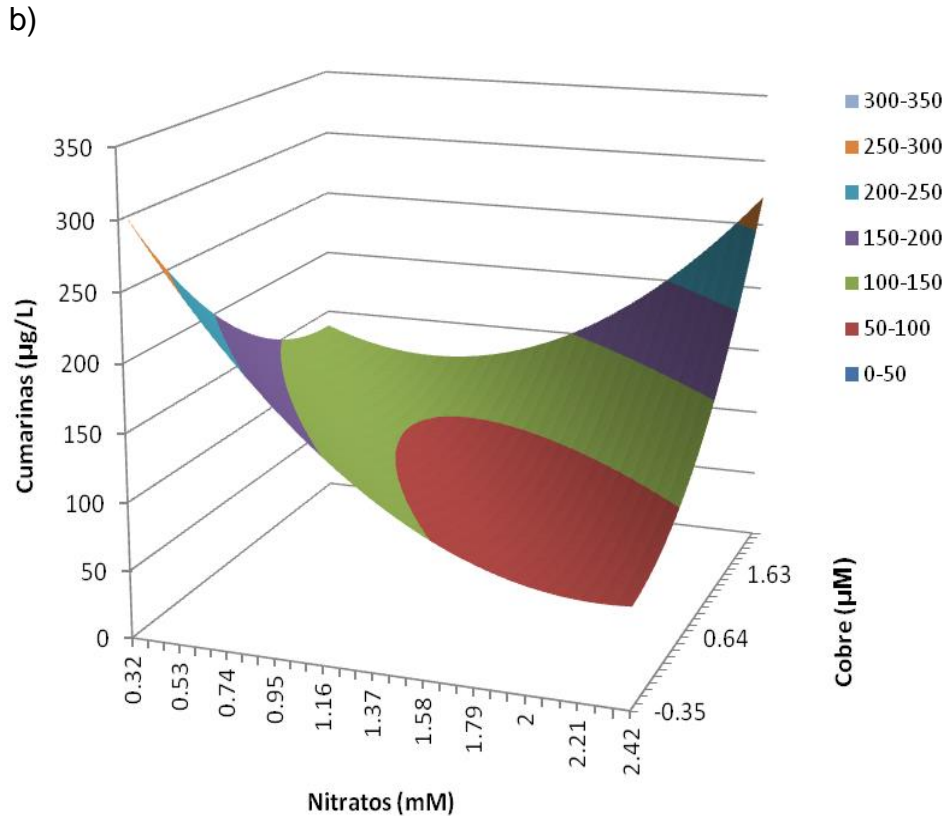


Figura 33. Producción de cumarinas excretadas (a) y acumuladas (b) en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* en el modelo del Diseño Compuesto Central (DCC) a los cuatro días de cultivo.

#### 7.4.5 Optimización de la producción de ácido sphaerálcico

Los datos experimentales muestran que la mayor excreción (5258.12 µg/L) y acumulación (756.91 µg/L) de ácido sphaerálcico se obtuvo a los 4 días, en el medio MS con 1.37 mM de nitrato libre de cobre y 1 µM de cobre libre de nitrato, respectivamente (Tabla 19).

El análisis del modelo cuadrático indicó que en el intervalo de nitrato y de cobre utilizados, los niveles del ácido sphaerálcico (excretados y acumulados) en los cultivos de células en suspensión no se modifican (Tabla 20). El modelo predice que la mayor excreción de ácido sphaerálcico se obtendría en el medio MS compuesto por 0.32 mM de nitratos libre de cobre a los 2 (4,912.28 µg/L, Figura 34 a) y 4 (5,899.51 µg/L, Figura 35 a) días de cultivo.

Tabla 19. Producción de ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño Compuesto Central (DCC). Media±EEM.

X1 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	X2 (Cu <sup>2+</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Cu <sup>2+</sup> (μM)	Excreción (μg/L)		Acumulación (μg/L)	
				2 días	4 días	2 días	4 días
1	1	2.74	2	648,91 ± 39.69	1,442.06 ± 119.24	14.73 ± 0.36	19.85 ± 3.97
-1	1	0.685	2	47.30 ± 1.05	46.16 ± 0.42	135.17 ± 56.42	121.28 ± 10.77
1	-1	2.74	0.1	43.96 ± 2.82	46.37 ± 5.83	15.17 ± 0.64	10.32 ± 0.74
-1	-1	0.685	0.1	350.08 ± 151.02	246.95 ± 27.35	24.35 ± 2.90	18.29 ± 1.39
0	0	1.37	1	51.02 ± 3.06	57.77 ± 10.43	69.03 ± 49.49	37.27 ± 13.98
0	-1.414	1.37	0	3597.33 ± 332.14	<b>5258.12 ± 156.34</b>	<b>486.61 ± 74.73</b>	82.51 ± 8.75
0	1.414	1.37	2.41	4740.75 ± 599.66	2961.72 ± 611.46	261.87 ± 28.12	511.18 ± 150.39
-1.414	0	0	1	<b>5226.13 ± 527</b>	2275.24 ± 643.49	381.32 ± 13.36	<b>756.91 ± 90.64</b>
1.414	0	2.78	1	4913.77 ± 891.53	3334.71 ± 1054.03	197.29 ± 13.95	308.45 ± 94.63

Tabla 20. Coeficientes de la producción de ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* variando las concentraciones de nitratos y de cobre en el modelo de Diseño Compuesto Central (DCC). Media±EEM.

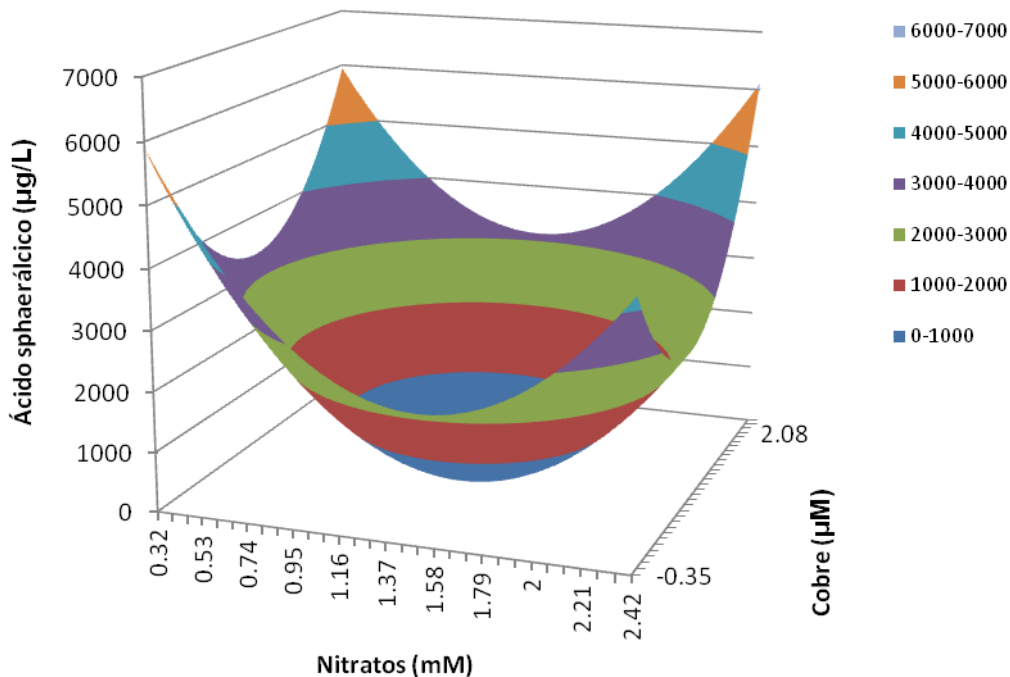
Metabolitos Cumarinas		Coeficientes (modelo cuadrático)					
		β <sub>0</sub>	β <sub>1</sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	β <sub>2</sub> (Cu <sup>2+</sup> )	β <sub>1,2</sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )(Cu <sup>2+</sup> )	β <sub>1<sup>2</sup></sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	β <sub>2<sup>2</sup></sub> (Cu <sup>2+</sup> )
Excretado	2 días	52.81	-242.28	311.57	198.14	1291.56	1155.03
	4 días	58.67	272.35	-374.74	433.16	353.8	1301.94
Acumulado	2 días	40.83	-54.48	-25.88	-39.94	56.76	106.61
	4 días	42.10	-86.34	67.67	-26.64	185.57	4.29

Aunque estadísticamente se mostró que no existe interacción significativa entre el nitrato y el cobre para promover la excreción de ácido sphaerálcico, gráficamente observamos cómo concentraciones de 2.42 y/o 0.32 mM de nitratos con 2.08  $\mu\text{M}$  de cobre en el medio MS a los 2 días de cultivo estimulan la excreción de ácido sphaerálcico (Figuras 34 a).

La excreción de ácido sphaerálcico en las suspensiones celulares a los 4 días de cultivo, se favoreció al ir disminuyendo el contenido de nitratos libre de cobre en el medio MS (Figuras 35 a), así como también por la interacción de niveles elevados de cobre (2.08  $\mu\text{M}$ ) y nitratos (2.42 mM); sin embargo, niveles altos de cobre con concentraciones bajas de nitratos (0.32 mM) afectan su producción (Figura 35 a).

Gráficamente, a los 2 días se observó que la interacción entre las variables estimulan la producción de ácido sphaerálcico intracelular (0.32 mM de nitratos y 2.35 M de cobre), mientras que su producción se limita al utilizar concentraciones altas de nitrato y cobre. Concentraciones de nitrato entre 0.32 y 2.42 mM libres de cobre generan una producción similar de ácido sphaerálcico (Figura 34 a). A los 4 días de cultivo, se observó que en el medio MS carente de cobre y en rangos de 0.1-2.26  $\mu\text{M}$ , el contenido de ácido sphaerálcico en las biomazas se incrementó al disminuir el contenido de nitrato desde 0.95 mM (Figura 35 b).

a)



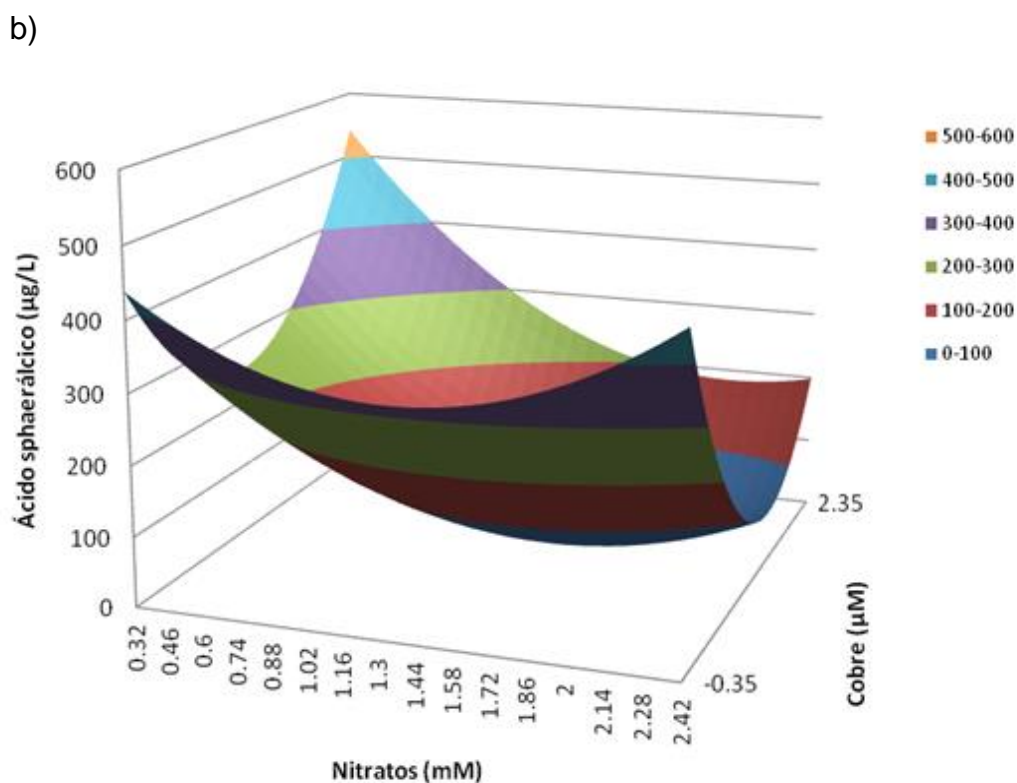


Figura 34. Producción de ácido sphaerálcico excretado (a) y acumulado (b) en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* en el modelo del Diseño Compuesto Central (DCC) a los dos días de cultivo.

El análisis del modelo cuadrático predice que la mayor acumulación de ácido sphaerálcico (760.24 µg/L) se obtiene con 0.32 mM de nitratos en combinación con 2.35 µM de cobre a los 4 días de cultivo. Cuando el contenido de nitratos se fija a 1.79 mM, el contenido de ácido sphaerálcico en biomásas se incrementa al incrementarse las concentraciones de cobre en el medio de cultivo (Figura 35 b). Además, en el medio MS carente de cobre y complementado con nitrato en intervalo de 1.16 -1.79 mM la producción del compuesto se abate.

Los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* producen dos cumarinas, escopoletina y tomentina, cuya concentración extracelular fue superior entre los 2 y 4 días de cultivo como una respuesta rápida al estímulo aplicado para incrementar su producción; después de ese tiempo su contenido disminuyó, respuesta que coincidió con un incremento de su contenido en las biomásas cuyo contenido se mantuvo constantes durante el tiempo restante del cultivo.

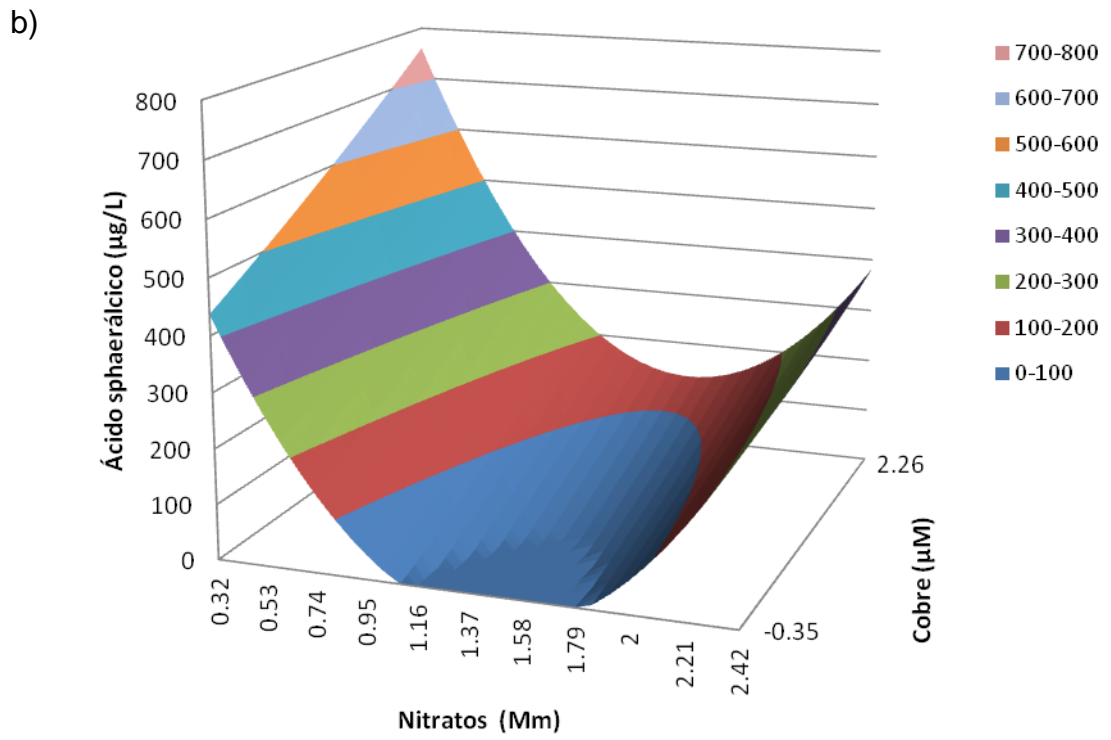
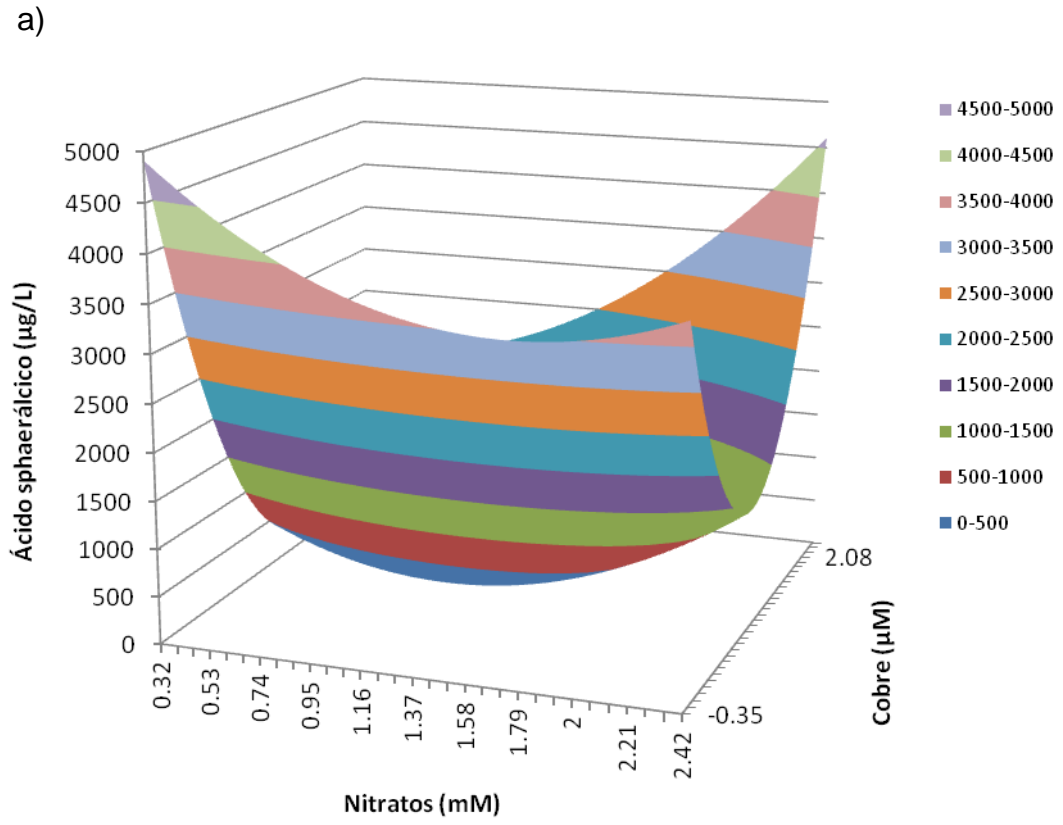


Figura 35. Producción de ácido sphaerálcico excretado (a) y acumulado (b) en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* en el modelo del Diseño Compuesto Central (DCC) a los cuatro días de cultivo.

Los niveles de cumarinas liberados al medio de cultivo fueron  $\approx 20$  veces superiores a los contenidos en las biomásas, probablemente la escopoletina y la tomentina fueron acumulados en vacuolas como escopolina y tomina (cumarinas glicosiladas), como un mecanismo de protección de las células a estos compuestos, siendo esta una respuesta característica de las fitoalexinas. Los metabolitos secundarios inducibles (fitoalexinas) como las cumarinas, son sintetizados únicamente en respuesta al ataque de un patógeno o una situación de estrés y su presencia está restringida al tejido dañado y a las células adyacentes. Asimismo, se ha reportado que diversos tipos de metabolitos secundarios tienen la capacidad de almacenarse en forma glicosilada en vacuolas una vez que ha pasado el estímulo de estrés y de esta manera no resultar tóxicos para la propia célula (Sepúlveda-Jiménez et al, 2003; Montes-Belmont, 2009).

En *Nicotiana tabacum* se ha reportado que la escopoletina se detectó a nivel extra e intracelular. Sin embargo, hay antecedentes respecto a que la escopoletina y escopolina no se han logrado sintetizar en los cultivos de células en suspensión de *Nicotiana tabacum*, *Pimpinella anisum*, *Ammi majus*, *N. plumbagnifolia*, *Duboisia myoporoides*, *Solanum aviculare* y *Papaver somniferum* (Reichling y Merkel, 1992; Fliniaux et al., 1997, Staniszewska et al., 2003).

En cambio, la producción del ácido sphaerálcico en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* en respuesta al estrés aplicado, es similar a la de un metabolito secundarios constitutivo. Al igual que las cumarinas, el contenido de ácido sphaerálcico en el medio de cultivo se incrementó a los 2 y 4 días, concentración que fue 13.7 y 63.7 veces mayor, respectivamente a lo detectado en biomásas a esos mismos tiempos. Los niveles de ácido sphaerálcico en el medio de cultivo fueron bajos cuando se extendía el tiempo de cultivo, en tanto que su contenido en las biomásas se incrementó en forma asociada con el crecimiento y alcanzó niveles similares a los detectados en el medio de cultivo. Estos compuestos pueden encontrarse siempre en concentraciones bajas e incrementar su contenido después de ser expuestos a un estímulo, o bien pueden encontrarse en las plantas en una forma inactiva (glucosilados) y después de la estimulación son convertidos en productos bioactivos por medio de reacciones bioquímicas cortas y simples como la hidrólisis enzimática (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Montes-Belmont, 2009).

Los incrementos en la producción de cumarinas en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* se debieron a la interacción e incremento en el contenido de los dos estímulos aplicados, nitrato y cobre; no obstante, se observó que de manera independiente cada estimulante también modifica la producción de las cumarinas. En tanto que, para estimular la

producción de ácido sphaerálcico, la respuesta de ambos factores fue independiente, favorecida por el incremento en el contenido de cobre y reducción del de nitrato.

Se ha demostrado que el contenido de nitratos en el medio de cultivo es un factor importante en la estimulación de metabolitos secundarios, basado en la hipótesis sobre el balance de carbono y nitrógeno en plantas, que postula que el metabolismo secundario está dirigido hacia la producción de compuestos ricos en carbono como los compuestos fenólicos cuando se limita la fuente de nitrógeno (Fritz et al 2006; Kováčik et al., 2006). Además, se ha reportado que el bajo suministro de nitrógeno también desencadena la activación de genes que codifican para enzimas que están involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios. Los aminoácidos fenilalanina y tirosina son precursores del metabolismo secundario a través de la activación de las enzimas fenilalanina amonioliasa (PAL) y la tirosina amonioliasa, generando el ácido *trans*-cinámico, útil para la formación de un gran número de compuestos fenólicos simples como los fenilpropanoides y las cumarinas, flavonoides y/o compuestos fenólicos más complejos (polímero que resulta de la unión de varios ácidos propanoicos o fenilpropanoides) como la lignina (Cruz et al., 2004; Fritz et al., 2006).

También se ha reportado que el exceso de metales en las plantas genera un mecanismo de estimulación similar al producido por un ataque microbiano. Las fitoalexinas son sintetizadas a partir de un redireccionamiento de precursores del metabolismo primario, en respuesta a las modificaciones generadas en la conformación de la membrana celular que trae como consecuencia la activación de moléculas señalizadoras, encargadas de activar la expresión de genes correspondientes a enzimas que participan en las rutas biosintéticas como la PAL (Ryder et al., 1987; Smith, 1996; Staniszewska et al., 2003; Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Kováčik et al., 2006; Namdeo, 2007).

Existen reportes sobre el efecto del incremento en el contenido de cobre y reducción del nitrato para estimular la producción de metabolitos secundarios; no obstante, no existen en la literatura estudios sobre el uso combinado de ambos estimuladores pero se sabe que el nitrógeno afecta la disponibilidad y movilidad del cobre, incluyendo su incorporación en proteínas (Maksymieck, 1997; Maksymiek, 2007).

En tejidos de embriones androgénicos de zanahoria los niveles de poliaminas como la putrecina, espermina y espermidina se incrementaron su contenido 1.3, 1.1 y 1.4 veces más, respectivamente, en los tratamientos con 1  $\mu\text{M}$  de cobre en comparación con el control (0.1  $\mu\text{M}$ ); mientras que contenidos mayores de cobre (100  $\mu\text{M}$ ) inhibieron su producción (Szafranska et al., 2011). Górecka et al., 2007 reportan también un incremento en el contenido de ácido



clorogénico y ácido caféico en los cultivos de embriones androgénicos de zanahoria desarrollados a 1 y 10  $\mu\text{M}$  de cobre. Cultivos de célula en suspensión de *Pueraria tuberosa* reportan un incremento de 2.2 veces en la producción de pueraria al incrementar el contenido de cobre de 0.025 a 0.05 mg/L en el medio de cultivo (Karwasara y Dixit, 2012).

En las plantas silvestres de *Nicotiana tabacum* fertilizadas con una solución deficiente de nitratos (60 veces), se observó un incremento al doble en ácido benzoico (derivado del ácido cinámico, un intermediario en la ruta de los fenilpropanoides) y ácido caféico, de 6 a 7 veces el contenido de ácido cumárico y de 3 a 4 y 10 veces para el ácido clorogénico y la rutina (flavonoide glicosilado derivado del ácido cumárico), respectivamente, así como un incremento en la lignificación del tallo de plantas deficientes de nitratos.

Resultados similares a los observados en los cultivos de *S. angustifolia* han sido demostrados en árboles de *Cecropia obtusifolia* y *C. peltata*, la acumulación de compuestos hipoglucemiantes como el ácido clorogénico (fenilpropanoide) e isoorientina (flavonoide) se incrementó de forma significativa en las hojas de los árboles al disminuir la concentración de nitrógeno total en el suelo (González, 2006). También se reportó un incremento al doble en la producción de ácido clorogénico al reducir a la mitad el contenido de nitratos totales en el medio de cultivo de células en suspensión de la misma especie (Ríos, 2007). Del mismo modo, se ha reportado que las suspensiones celulares de *Hippocratea excelsa* presentaron un incremento en la producción del triterpeno canofilol relacionado con una disminución del nitrógeno del 50 y 75% (Herrera, 2006). Asimismo, en otras especies, la reducción de nitrato favoreció la producción de metabolitos de interés, como la capsaicina en *Capsicum frutescens*, antroquinonas en *Morinda citrifolia* y antocianinas en especies de *Vitis* (Rao y Ravishankar, 2002). En el cultivo de células en suspensión en 2 fases de *Camptotheca acuminata* también se obtuvieron incrementos significativos del 30, 280 y 340 % en la producción de camptotecina, alcanzando el mayor rendimiento al disminuir los nitratos de 70 a 40 mM (Pan et al., 2004).

La baja disponibilidad de nitrógeno en plantas de *Jatropha curcas* provocó una disminución gradual en el crecimiento (biomasa total), así como del área foliar, debido a que el nitrógeno suprime la biosíntesis de proteínas, aminoácidos, clorofila y otros metabolitos involucrados en dicho proceso (Wang et al., 2011). En cultivos de células en suspensión de *Gymenema sylvestre*, la reducción de 1.5 veces (18.80 mM) en el suministro de nitratos generó una disminución drástica del crecimiento, favoreciendo la producción de ácido gimnémico. En suspensiones de *C. obtusifolia*, la reducción de nitratos a 8 y 16 mM incrementó 3 veces la producción de ácido clorogénico y 4 la de isoorientina; además, se identificaron dos compuestos como el ácido cafeico y ferúlico (Praveen et al., 2011; Nicasio et al., 2012).

Zong y Wang 1998 reportan que bajas concentraciones de nitrógeno estimulan una alta acumulación de ginsenósidos en cultivos de células en suspensión de *Panax quinquefolium*; Gunter y Ovodov en el 2005 reportan concentraciones diferentes de nitrógeno para la biosíntesis de silenano y ácido arabinogalactano en cultivos celulares de *Silene vulgaris*. Cultivos de células en suspensión de *Taxus chinensis* con reducción de nitratos (2 mM) muestran una reducción en el crecimiento comparado con el control (20 mM), con un incremento al doble en el contenido de Taxuyunanina C (Zhou y Zhong, 2009).

Con los resultados obtenidos se confirma cómo el metabolismo secundario en cultivos de células en suspensión de *Sphaeracea angustifolia* es estimulado por la reducción de nitratos y el uso de niveles altos de cobre. Además, la rápida producción y excreción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcio al medio de cultivo en las suspensiones celulares de *S. angustifolia*, presenta una importante ventaja, ya que no es necesario mantener los cultivos celulares por largos periodos de tiempo y a su vez reduce los costos de inversión. Conjuntamente, al ser metabolitos que se liberan al medio de cultivo permitiría realizar cultivos celulares en dos fases, por un lado mantener los cultivos en un medio adecuado para su crecimiento y posteriormente transferirlo a un medio productor.

### **7.5 Crecimiento y producción de compuestos antiinflamatorios en suspensiones celulares cultivadas en biorreactor**

Las células en suspensión (24% v/v) cultivadas en medio de MS con 2.74 mM de nitrato y 0.1  $\mu$ M de cobre en biorreactor de agitación mecánica, presentaron un crecimiento logarítmico desde el inicio hasta los 7 de cultivo (Figura 36). Los parámetros cinéticos determinados como la velocidad específica de crecimiento de 0.2341 días<sup>-1</sup> y el tiempo de duplicación de 2.96 días fueron similares a los registrados en condiciones de matraz.

La biomasa máxima de 7.12 g/L desarrollada hasta los siete días de cultivo, fue 2 veces menor a la registrado a nivel de matraz. Al inicio, el cultivo de la suspensión celular presentaba células disgregadas y después de cuatro días se formaron agregados celulares, posiblemente debido al cambio de agitación orbital a nivel de matraz, a agitación mecánica generada en el biorreactor, incrementando con ello la producción de compuestos fenólicos que conforman la lignina en la pared celular como una barrera de defensa física. Además, la viabilidad celular disminuyó con el tiempo del cultivo, de un 90% a los dos días hasta un 20% a los 11 días (Figura 37), debido a la disminución del pH del medio de cultivo hasta niveles de 3.95.

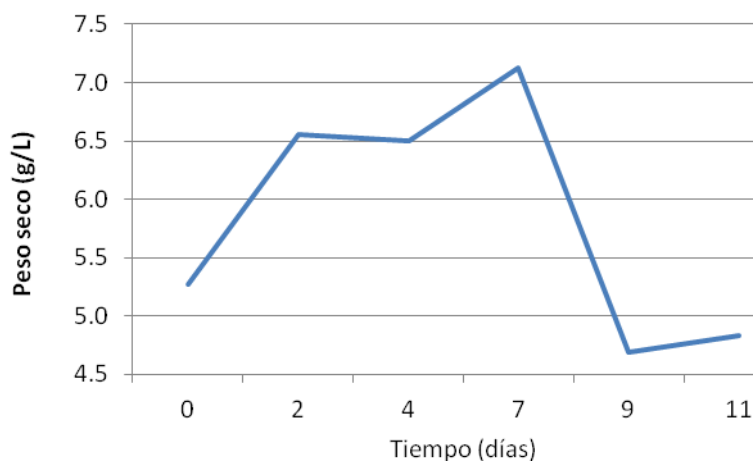


Figura 36. Curva de crecimiento de la suspensión celular de *S. angustifolia* cultivada en biorreactor de agitación mecánica.

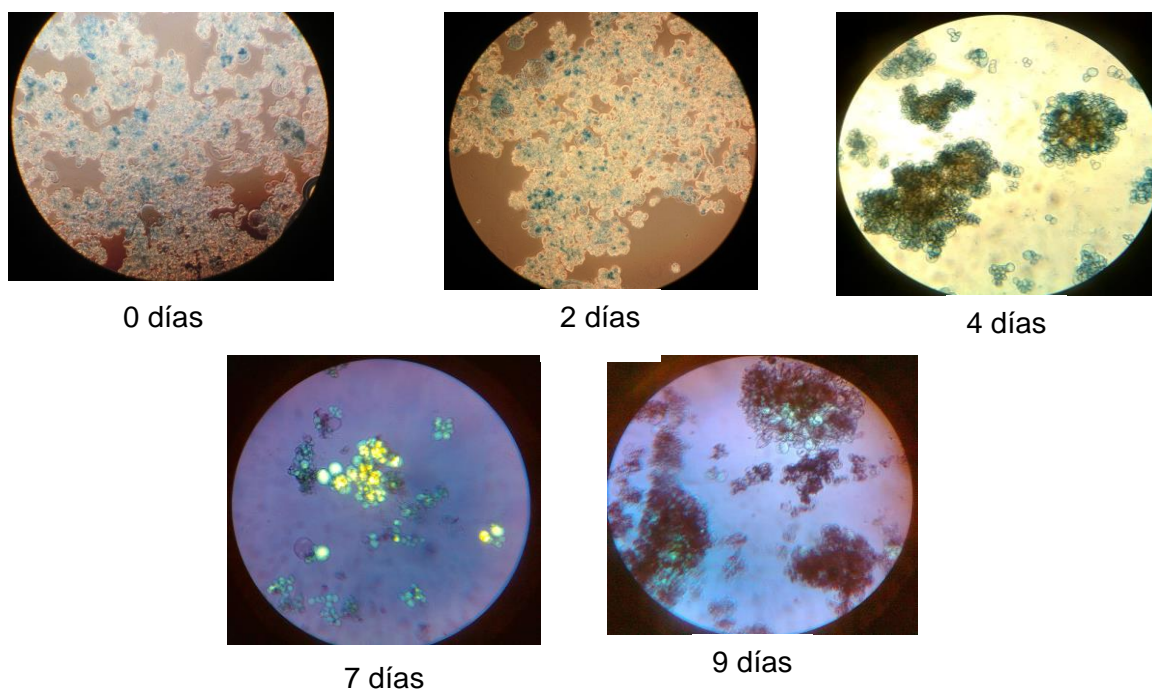


Figura 37. Viabilidad celular de los cultivos en suspensión de *S. angustifolia* desarrollados en biorreactor de agitación mecánica.

Los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico son producidos en las suspensiones celulares de *S. angustifolia* cultivadas en biorreactor de agitación mecánica (Figura 38). Las cumarinas son excretadas al medio de cultivo y los niveles registrados presentan una tendencia similar a los registrados en las suspensiones desarrolladas en matraces. La mayor excreción se observó a los 4 días (674  $\mu\text{g/L}$ ), concentración 2.6 veces

menor a la obtenida a nivel de matraz y una producción similar a la determinada a los 4 días (631  $\mu\text{g/L}$ ); posteriormente, los niveles disminuyen a valores iniciales (286  $\mu\text{g/L}$ ). Contrariamente, los contenidos de cumarinas en biomasa son altos al inicio del cultivo (1,293  $\mu\text{g/L}$ ) y disminuyen durante el crecimiento logarítmico a niveles similares a los detectados en el medio de cultivo (275  $\mu\text{g/L}$ ). Las concentraciones de cumarinas acumuladas fueron 10 (950  $\mu\text{g/L}$ , 2 días) y 8 (725  $\mu\text{g/L}$ , 4 días) veces superiores en condiciones de biorreactor con respecto a lo obtenido en matraz (95  $\mu\text{g/L}$ , 2 días; 90  $\mu\text{g/L}$ , 4 días).

Con respecto a la producción de ácido sphaerálcico, el contenido inicial en el medio de cultivo se mantuvo por dos días y durante el crecimiento logarítmico los niveles se incrementaron hasta 1,093.4  $\mu\text{g/L}$  a los 7 días de cultivo. Subsecuentemente se presentó un decaimiento en su concentración, posiblemente debido a la muerte celular del cultivo.

La acumulación de ácido sphaerálcico está asociada al crecimiento (Figura 38), al inicio del cultivo no se detectó y su concentración se incrementó hasta alcanzar la mayor acumulación a los nueve días (1,662.4  $\mu\text{g/L}$ ); posteriormente su concentración disminuyó debido a la muerte celular observada, la concentración de ácido sphaerálcico fue 4 veces superior en condiciones de biorreactor con respecto a lo obtenido en matraz (413.38  $\mu\text{g/L}$ , 4 días).

Comparado con lo obtenido en condiciones de matraz, los niveles de ácido sphaerálcico determinados en el medio de cultivo fueron 6.5 (282  $\mu\text{g/L}$ ) y 16.9 (780  $\mu\text{g/L}$ ) veces superiores a los 2 y 4 días, respectivamente en tanto que en las biomasas fue 20.2 (304  $\mu\text{g/L}$ ) y (78.1 781  $\mu\text{g/L}$ ) veces mayor su acumulación a los 2 y 4 días, respectivamente.

El crecimiento de los cultivos celulares en el cambio de matraz a biorreactor se modificó, mostrando un incremento en el tiempo de duplicación y disminución en la velocidad de crecimiento y biomasa máxima desarrollada. Los cultivos celulares de *S. angustifolia* mostraron un tiempo de duplicación menor a lo registrado en cultivos celulares de *Azadirachta indica* (3.8 días) y *Solanum chrysotrichum* (7.7 días) crecidos en biorreactor, no obstante, velocidades de crecimiento fueron similares a las reportadas para estos cultivos (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999; Muñoz-Cruz et al., 2006).

En cultivos de *Taxus chilensis* se reporta una producción de taxuyunnanina C similar a lo obtenido a nivel de matraz (Pan et al., 2000). En cultivos de *Cyclopia subternata* se observó una disminución en la producción de 7-O- $\alpha$ -glucósido de calicosina, pseudobaptigenina y formononetina en un 1.4, 1.4 y 3.2 veces, respectivamente (Kokotkiewicz et al., 2013). Resultados similares se presentaron en cultivos de *Beta vulgaris*, tanto el crecimiento como la producción de betalainas en condiciones de biorreactor disminuyó.

La producción de ácido sphaerálcico y cumarinas en las biomazas celulares de los cultivos en suspensión de *S. angustifolia* a nivel de matraz, se incrementaron cuando estos fueron desarrollados en el biorreactor de agitación mecánica. Resultados similares fueron reportados por Jiménez (1995), quién determinó una producción de betalainas 3.1 veces superior cuando las suspensiones fueron cultivadas en biorreactor (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999).

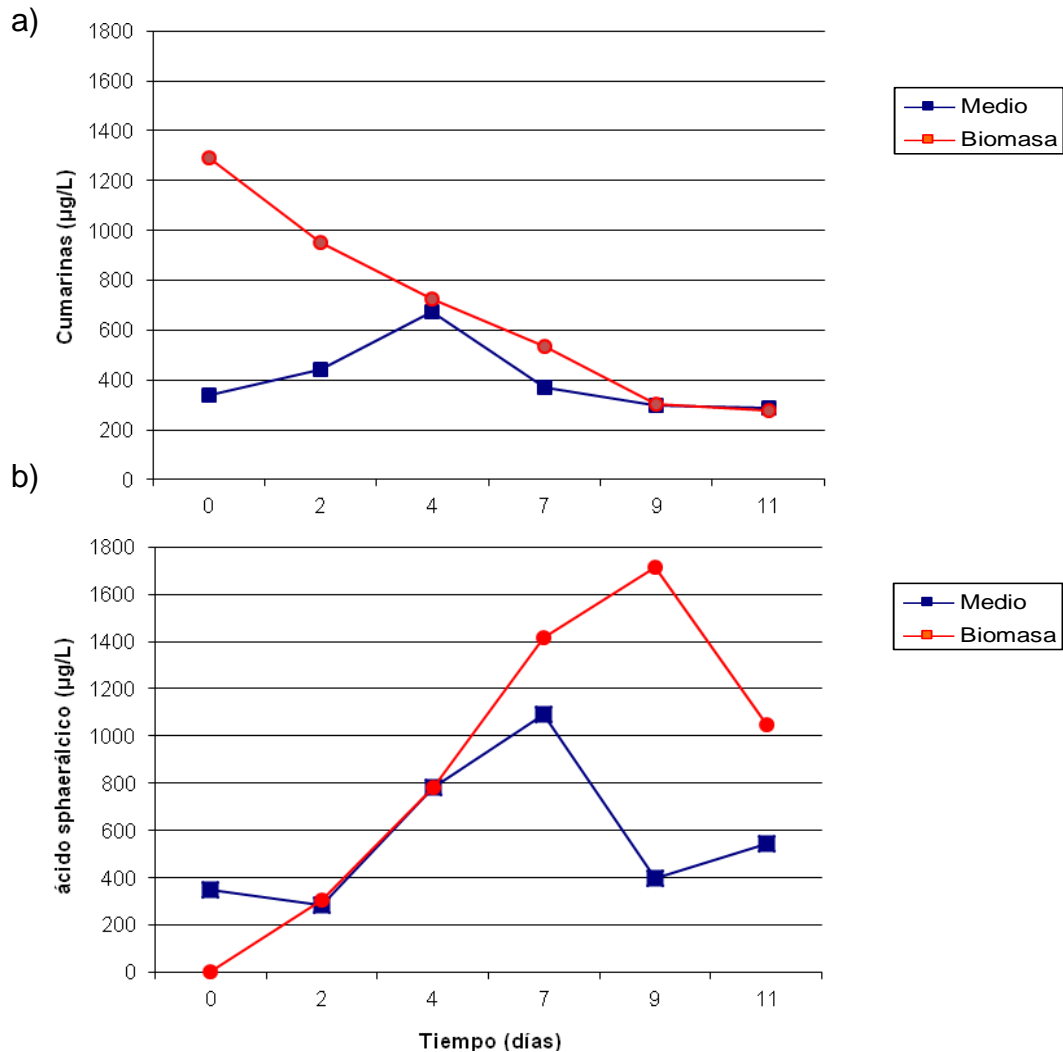


Figura 38. Cinéticas de producción de cumarinas (escopoletina y tomentina, a) y ácido sphaerálcico (b) en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* en biorreactor de agitación mecánica.

## VIII. CONCLUSIONES

- Se identificaron estructuralmente dos compuestos producidos en las suspensiones celulares de *Sphaeralcea angustifolia* cultivadas en medio MS con reducción del contenido de nitratos a 2.74 mM y 0.1  $\mu$ M de cobre.
- Los datos espectroscópicos de RMN en 1 y 2 dimensiones permitieron identificar estructuralmente al compuesto ácido 2-(1,8-dihidroxi-4-isopropil-6-metil-7-metoxi) naftoico, el cual se aisló y caracterizó por primera vez en suspensiones celulares de una especie del género *Sphaeralcea* asignándole el nombre de ácido sphaerálcico.
- Los datos espectroscópicos de RMN en 1 y 2 dimensiones permitieron identificar estructuralmente a la cumarina 5-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina denominada tomentina.
- Los compuestos tomentina y ácido sphaerálcico presentaron una actividad antiinflamatoria similar a la del fármaco indometacina evaluados en el modelo de edema subplantar, con un máximo efecto a las cinco horas después de inducido el daño.
- El efecto antiinflamatorio de la tomentina fue similar a la de los fármacos sintéticos (indometacina y naproxeno) evaluados en el modelo de edema auricular utilizado la misma dosis.
- En el modelo de edema auricular, la actividad antiinflamatoria del ácido sphaerálcico fue significativamente mayor al efecto mostrado por la tomentina y el fármaco naproxeno, actividad que fue similar al de la indometacina empleando la misma dosis.
- El ácido sphaerálcico presentó un efecto antiinflamatorio auricular dependiente de la dosis, con una  $DE_{50}$  de 0.54 mg/oreja (93  $\mu$ M).
- En el modelo del diseño factorial (DF) se determinó que la combinación de nitratos a 2.74 mM con 0.1  $\mu$ M de cobre son las condiciones óptimas para el crecimiento de los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia*.
- El análisis estadístico del DF determinó que niveles inferiores de 0.685 mM nitratos afectan el crecimiento de los cultivos celulares de *S. angustifolia*.
- En el modelo de paso ascendente se determinó que concentraciones superiores a 5.68  $\mu$ M de cobre en el medio de cultivo MS afecta el crecimiento de los cultivos celulares de *S. angustifolia*.
- La mayor producción de cumarinas y ácido sphaerálcico se obtuvo a los 2 y 4 días principalmente excretados al medio de cultivo por interacción del nitrato y el cobre.

- Se determinó que la producción de ácido sphaerálcico es característico a la de un metabolito constitutivo, asociada al crecimiento; en tanto que las cumarinas son metabolitos inducibles y su estimulación es típica a la de las fitoalexinas.
- Las mejores condiciones experimentales del diseño compuesto central (DCC) para la producción de cumarinas, excretadas (4,136.96  $\mu\text{g/L}$ ) y acumuladas (236.45  $\mu\text{g/L}$ ) se obtuvo utilizando la combinación 2  $\mu\text{M}$  de cobre con 2.74 mM de nitratos a los 2 días de cultivo.
- Con la metodología de superficie de respuesta (MSR) se predijo que la interacción de 2.42 mM de nitratos y 1.81  $\mu\text{M}$  de cobre estimulan la mayor excreción (3,430.24  $\mu\text{g/L}$ ) y acumulación (227.50  $\mu\text{g/L}$ ) de cumarinas.
- La mayor acumulación de ácido sphaerálcico se presentó a los 11 días (1,415.33  $\mu\text{g/L}$ ) en los cultivos desarrollados con 1.37 mM de nitrato y 1  $\mu\text{M}$  de cobre.
- Los compuestos antiinflamatorios hidroxycumarinas (escopoleina y tomentina) y ácido sphaerálcico son producidos en las suspensiones celulares de *S. angustifolia* y son detectas en biomasas y medio de cultivo.
- En el modelo experimental del DCC se determinó que las mejores condiciones para la mayor excreción (5258.12  $\mu\text{g/L}$ ) y acumulación (756.91  $\mu\text{g/L}$ ) de ácido sphaerálcico se obtuvo a los 4 días, en el medio MS complementado con 1.37 mM de nitrato libre de cobre y 1  $\mu\text{M}$  de cobre libre de nitrato, respectivamente.
- En el MSR el análisis estadístico determinó que no existe interacción entre el nitrato y el cobre sobre la acumulación y excreción de ácido sphaerálcico; prediciendo que las mejores condiciones para su excreción se obtienen con 0.32 mM de nitratos libre de cobre y para su acumulación 0.32 mM de nitratos con 2.26  $\mu\text{M}$  de cobre a los 2 y 4 días de cultivo.
- Los cultivos celulares de *S. angustifolia* establecidos en condiciones de biorreactor produjeron escopoletina y tomentina con una tendencia similar a lo registrado en las suspensiones desarrolladas en matraces; mientras tanto la acumulación de ácido sphaerálcico fue superior a lo registrado en matraces.
- La modificación en la concentración de las variables nitrato y cobre en el medio de cultivo MS modulan favorablemente la producción de los compuestos activos tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia*.

## IX. PERSPECTIVAS

- Evaluar la actividad antiartrítica de los compuestos puros tomentina y ácido sphaerálcico en un modelo de monoartritis articular en ratón.
- Evaluar el crecimiento y contenido de escopoletina, tomentina y/o ácido sphaerálcico en cultivos en lote a nivel de matraz, empleando los niveles de cobre y nitrato determinados a través de la MSR como óptimos para su producción.
- Establecer las condiciones de operación del biorreactor de agitación mecánica (velocidad de agitación, aireación y tipo de impulsor) para el crecimiento del cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia*.
- Caracterizar el cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* en dos fases en biorreactor de agitación mecánica, manteniendo los cultivos celulares en un medio de cultivo adecuado para su crecimiento; posteriormente, remplazar el medio de cultivo por el determinado como óptimo para la producción de compuestos antiinflamatorios.
- Realizar cinéticas de crecimiento y producción utilizando otros estimuladores abióticos específicos como el metiljasmonato, calcio (molécula señalizadora para la producción de fitoalexinas) o la utilización de precursores biosintéticos (L-fenilalanina, ácido *trans*-cinámico, ácido ferúlico) para la estimulación de la producción de los compuestos activos presentes en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia*.



## X. BIBLIOGRAFIA

- Abbas AB y Lichtman AH. Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system. 3ra edición; McGRAW-HILL; 250; 2009.
- Alami I, Mari S, Clerivet A. A glycoprotein from *Ceratocystis fimbriata* F. SP. *Platani triggers* phytoalexin synthesis in *Platanus acerifolia* cell-suspension cultures. *Phytochemistry* 1998; 48: 771-776.
- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jacquez P, López ME. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Publicación del IMSS. México D. F; 1994: 140, 251.
- Argueta VA, Cano ALM, Rodarte ME. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. I, II y III. Instituto Nacional Indigenista. México; 1994; 771, 154, 86, 141, 267, 420, 594, 636, 738, 993, 1138.
- Arreguin SML, Cabrera LG, Fernández NR, Orozco LC, Rodríguez CB, Yépez BM. Introducción a la flora del estado de Querétaro. CONCYTEC. México; 1997: 257-58, 314.
- Blantz RC y Murger K. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron*. 2002; 90(4): 373 -378.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci* 2001; 161: 839-581.
- Burnett AR, Thompson RH. Naturally occurring quinines. Part XIII. Anthraquinones and related naphthalenic compounds in *Galium* spp. In *Asperula odorata*. *J Chem Soc C* 1968: 854-857.
- Brunneton J. Pharmacognosy. *Phytochemistry, Medicinal Plants*. París, Francia. Lavoisier Publishing, 2ª edición; 1999: 227-334, 263-276.
- Calderón-Rzedowski G y Rzedowski J. Flora fanerogamica del Valle de México. Instituto Nacional de Ecología. 2ª ed. México; 2001: 393-395, 406-408.
- Calixto JB, Otuki MF, Santos ARS. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κB (NF-κB). *Planta Med* 2003; 69:973-983.
- Charlwood BV y Rhodes MJ. Secondary products from plant tissue culture. New York, Estados Unidos. Oxford University Press; 1990: 228.
- Chattopadhyay S, Farkya S, Srivastava AK, Bisaria V. Bioprocess considerations for production on secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotenol Bioprocess Eng* 2002; 7:138-149.
- Choyillas T. Inflamación aguda y crónica. En: *Patología estructural y funcional*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana; 2000: 412-437.
- Cruz JL, Mosquim PR, Pelacani CR, Araújo WL, DaMatta FM. Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava. *Biol Plant* 2004; 48(1):67-72
- Dewick PM. Medicinal natural products a biosynthetic approach. 2da edición. John Wiley & Sons Ltd; 2002: 487.
- Dornenburg H y Knorr D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb Technol* 1995; 17: 674-684.

- Eibl R y Eibl D. Cell and tissue reaction engineering. Principles and practice. Chapter 8. Plant cell-based bioprocessing 2009, 315-356.
- Fliniaux M, Gillet-Manceau F, Marty D, Macek T, Monti JP, Jacquin-Dubreuil A. Evaluation of the relation between the endogenous scopoletin and scopolin level of some solanaceous and papaver cell suspensions and their ability to bioconvert scopoletin to scopolin. Plant Sci 1997; 123: 205-210.
- Fritz C, Palacios N, Fiel R, Stitt M. Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. Plant J 2006; 46 (4): 533–548.
- Fubini B y Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. Free Radic Biol Med, 2003; 34(12): 1507-16.
- Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaidis DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with antiinflammatory/antioxidant activities. Curr Pharm Des 2004; 10(30): 3813-3833.
- García Rodríguez RV. Estudio químico y actividad biológica de *Sphaeralcea angustifolia*, Planta medicinal de México con actividad antiinflamatoria. México, DF. Tesis de Doctorado. Escuela de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional; 2006: 89.
- García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos G, Siordia G, Jiménez-Arellanes A, Chávez-Soto MA, Meckes-Fischer M. *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytomedicine to treat chronic inflammation. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 2012; 11: 454-463.
- Gábor M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, 2000; 335.
- George EF, Hall MA, DeKlerk GJ. The Components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. Plant Propagation by Tissue Culture 2008: 65-113.
- Georgiev M, Weber J, Maciuk A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. Appl Microbiol Biotechnol 2009; 83(5): 809-823.
- Georgiev M, Weber J. Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. Biotechnol Lett 2014. DOI 10.1007/s10529-014-14981
- Gleason H. A. y Cronquist A. 1963. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada. Williard Grand Prest. Boston Massachusetts. 464-465.
- González AG, Barroso JT, Cardona RJ, Medina JM, Rodríguez L. Química de las rubeaceas. Anales de Química 1997; 73: 538-545.
- Gómez-Estrada HA, González-Ruiz KN, Medina JD. Actividad Antiinflamatoria de productos naturales. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 2011; 10 (3): 182-217.
- Górecka K, Cvkrová M, Kowalska U, Eder J, Szafranska K, Górecki R, Janas KM. The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther cultures of carrot. Plant Physiol Biochem 2007; 45: 54-61.

- Grayer RJ y Harborne JB. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochem* 37; 1994: 19-42.
- Gunter EA, Ovodou YS. Effect of calcium, phosphate and nitrogen on cell growth and biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell cultures. *J Biotechnol* 2005; 117: 385-393.
- Hammouda HM, Aboul Ela MA, El-Lakany AM, El-Hanbali O, Zaki CS, Ghazy NM. New constituents of *Artemisia monosperma* Del. *Pharmazie* 2008; 63: 611-614.
- Harborne JB. Class and functions of secondary products from plants. *Chemical from plants. Perspectives on plant secondary products*. Walton NJ, Brown DE, London, Imperial College Press; 1999: 1-26.
- Herrera AA, Jiménez FE, Zamilpa A, Morales VM, García VCE, Tortoriello J. Efficacy and tolerability of a standardized herbal product from *Galphimia glauca* on generalized anxiety disorder. A randomized, double-blind clinical trial controlled with lorazepam. *Planta Med* 2006; 73: 713-717.
- Huang SY, Shen YW, Chan HS. Development of a bioreactor operation strategy for L-dopa production using *Stizolobium hassjoo* suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, 30: 779-791.
- Huber SC, Huber JL, Campbell WH y Redinbaugh MG. Comparative studies of the light modulation of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in spinach leaves. *Plant Physiol* 1992; 100, 706-712.
- Juárez-Ciriaco M, Román-Ramos R, González-Márquez H, Meckes-Fischer M. Efecto de *Sphaeralcea angustifolia* sobre la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias. *LabCiencia con noticias técnicas de laboratorio* 2008; 2: 21-23.
- Kaiser WM y Huber S. Modulation of nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*: Effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free  $Mg^{2+}$  and 5' AMP. *Planta* 1994; 193: 358-364.
- Kalra J, Martha SV, Prasad K. Oxygen free radicals: Key factors in clinical disease. *Lab Med Int* 1994; 11(2):16-21-
- Karwasara VS y Dixit VK. Culture medium optimization for improved puerarin production by cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex Willd.) DC. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 2012; 48:189-199.
- Kovácik J, Repcák M, Kron I. Nitrogen deficiency induced changes of free amino acids and coumarin contents in the leaves of *Matricaria chamomilla*. *Acta Physiol Plant* 2006; 28:159-164.
- Kovácik J, Backor M. Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in Chamomile tolerance to cadmium and copper excess. *Water Air Soil Pollut* 2007; 185:185-193.
- Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Kowalski W, Badura A, Piekus N, Bucinski A. Isoflavone production in *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) suspension cultures grown in shake flasks and stirred-tank bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97:8467-8477.
- Krzeslowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol Plant* 2011; 33: 33-35.

- Li XZ y Oaks A. 1993. Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*. Plant Physiol 1993; 102: 1251-1257.
- Ludy CP y Hernández-Rodríguez P. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. Rev Cubana Plant Med 2012; 17: 194-209.
- Lyon G. Metabolic pathways of the diseased potato, Scottish Crop Institute. Invergowrie Dundee Scotland. 2005. Web page:<http://www.drastic.org.uk> (acceso: mayo 2009).
- Maksymiec W. Signaling responses in plants to heavy metal stress. Acta Physiol Plant 2007; 29: 177-187.
- Maksymiec W. Effects of copper on cellular processes in higher plants. Photosynthetica 1997; 34 (3): 321-342.
- Mann J. Secondary metabolism. Oxford, Oxford Science Publications; 1987: 374.
- Marja K, Caldentery O, Inzé D. Plant cell factories in the post genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Science 2004; 9 (9): 433-440.
- Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de la Cultura Económica. México; 1979: 429.
- Meckes M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jiménez A. Activity of some mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. Phytomed 2004; 11: 446-451.
- McVaugh R, Ochnaceae to Loasaceae En: W. R. Andreson (ed). Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico, Vol. 3. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan; 2001; 102.
- Millikan LE. Adapaleno: actualización de los últimos estudios de comparación de los distintos retinoides. Int. J. Dermatol. 2000; 39: 784-788.
- Mithöfer A, Schulze B, Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. FEBS Letter 2004; 566: 1-5.
- Mogana R, Teng-Jin K, Wiart C. Anti-Inflammatory, anticholinesterase, and antioxidant potential of scopoletin isolated from *Canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). Evid Based Complement Alternat Med 2013, ID 734824, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/734824>.
- Mok CF, Xie CM, Sham KW, Lin ZX, Cheng CH. 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid induces apoptosis in human keratinocyte: potential application for psoriasis treatment. Evid Based Complement Alternat Med, advance online publication 11 April 2013; doi: 10.1155/2013/792840.
- Montes-Belmont R. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de micología 2009; 29: 73-78.
- Mora-Izquierdo A, Nicasio-Torres MP, Sepulveda-Jimenez G, Cruz-Sosa F. Changes in biomass allocation and phenolic compounds accumulation due to the effect of light and nitrate supply in *Cecropia peltata* plants. Acta Physiol Plant 2011; 333: 2135-2147.
- Morris CJ. Carrageenan-Induced paw edema in the rat and mouse. Methods in molecular Biology: Inflammation Protocols 2003; 225: 115-121.

- Muñoz-Cruz W, Venegas-Monterrosas A, Guzmán-Rosas AA, Capataz-Tafur J, Hoyos-Sánchez RA, Orozco-Sánchez F. Estimación de variables de operación de un bioreactor con células de *Azadirachta indica* A. Juss. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 2006; 59 (2): 3467: 3478.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium from rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiol 1962; 15:473-497.
- Namdeo AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharmacogn Rev 2007; 1 (1): 69-79.
- Nicasio-Torres MP, Meckes-Fisher M, Aguilar-Santamaria L, Garduño-Ramirez ML, Chavez-Avila VM, Cruz-Sosa F. Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. Acta Physiol Plant 2012; 34 (1): 307-316.
- Okada Y, Tsuzuki Y, Narimatsu K, Sato H, Ueda T, et al. 1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid from *Propionibacterium freudenreichii* reduces inflammation in interleukin-10-deficient mice with colitis by suppressing macrophage-derived proinflammatory cytokines. J Leukoc Biol, advance on line publication 25 June 2013; doi:10.1189/jlb.0212104jlb.0212104.
- Omar R, Abdullah MA, Hasan MA, Marziah M, Mazlina MKS. Optimization and elucidation of interactions between ammonium, nitrate and phosphate in *Centella asiatica* cell culture using response surface methodology. Biotechnol Bioprocess Eng 2005; 10:192-197.
- Orozco SF, Hoyos SR, Arias ZMA. Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. Rev Fac Nal Agr Medellin 2002; 5(1): 1473-1495.
- Osti-Castillo MR, Torres-Valencia JJM, Villagómez-Ibarra JR, Castelan-Pelcastre I. Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 2010; 9 (5): 359-366.
- Osuna L, Tapia N, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer E, Tortoriello J. Biosynthesis stimulation of nor-secotriterpene anxiolytics in cell suspension cultures of *Galphimia glauca* Cav. Eng Life Sci 2013. DOI: 10.1002/elsc.201200209.
- Palasota JA, Deming SN. Central Composite Experimental Designs. J Chem Education 1992; 69: 560-563.
- Palma T. Biotecnología en la domesticación de las plantas medicinales. X Congreso Nacional Agroquímico 1996: 31-34.
- Pan R, Gao XH, Li Y, Xia YF, Dai Y. Anti-arthritic effect of scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Benth stems, is associated with decreased angiogenesis in synovium Fundam. Clin Pharmacol 2010; 24: 477-490.
- Payá M, Ferrándiz ML, Sanz MJ, Bustos G, Blasco R, Ríos JL, Alcaraz MJ. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice. Phytother Res 1993; 7: 159-162.
- Patel M, Murugananthan, Gowda Shivalinge KP. *In vivo* animal models in preclinical evaluation of antiinflammatory activity-A review. International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Science 2012; 1(2): 1-5.

- Pérez Hernández J. Obtención de cultivos *in vitro* de la planta anti-inflamatoria *Sphaeralcea angustifolia*. Malvaceae (Cav.) G. Don. Cuernavaca Morelos, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, Universidad autónoma del Estado de Morelos; 2007: 90.
- Pérez Hernández J. Inducción de marcadores con actividad antiinflamatoria en cultivos de células en suspensión de *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. Malvaceae. Cuernavaca Morelos, México. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad autónoma del Estado de Morelos; 2009: 90.
- Pérez-Hernández J, González-Cortazar M, Marquina S, et al. Sphaeralcic acid and tomentin, anti-inflammatory compounds produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*. *Planta Med* 2014; 80(02/03): 209-214.
- Prasad MNV, Malec P, Walozek A, Bojko M, Strzalka K. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Sci* 2001; 161: 881-889.
- Praveen N, Murthy HN, Chung IM. Improvement of growth and gymnemic acid production by altering the macro elements concentration and nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Gymnema silvestre* R.Br. *Ind Crop Prod* 2011; 33: 282-286.
- Praveen N y Hosakatte NM. Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide-A production from cell suspension cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2011; 104:119-124.
- Rao S y Ravishankar G. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Advances* 2002; 20 (2): 101-153.
- Ravindranath N, Ravinder R M, Ramesh C, Ramu R, Prabhakar A, Jagadeesh B, Das B. New lathyrane and podocarpane diterpenoids from *Jatropha curcas*. *Chem Pharm Bull* 2004; 52: 608-611.
- Reichling J y Merkel B. Elicitor-induced formation of coumarin derivatives in suspension cultures of *Pimpinella anisum*. *Planta medica* 1993; 59: 187-188.
- Ríos A. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Cecropia peltata* productores de compuestos hipoglucemiantes. Cuernavaca Morelos, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2007: 85 pp.
- Romero-Cerecero O, Meckes-Fisher M, Zamilpa A, et al. Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis. *Journal Ethnopharmacology* 2013; 147: 467-473.
- Rodríguez-Monroy M y Galindo E. Las células vegetales ¿frágiles para crecer en biorreactores?. En: *Biotecnología (México)*. 2003; 8(2): 6-17.
- Rout GR, Samantaray S, Das P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol Advances* 2000; 18(2): 91-120.
- Ryder TB, Hedrick SA, Bell JN, Liang X, Clouse SD, Lamb CJ. Organization and differential activation of gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Gen Genet* 1987; 210: 219-233.
- Ryswyk HV y Van Hecke GR. Attaining optimal conditions. *J Chem Education* 1991; 68 (10): 878-882.

- Schmeda-Hirschmann G, Papastergiou F. Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug "Tayi" Pyta" (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). *Z Naturforsch C* 2003; 58: 495-501.
- Seo JY, Kim H, Seo JT, Kim KH. Oxidative stress induced cytokine production in isolated rat pancreatic acinar cells: effects of small-molecule antioxidants. *Pharmacology* 2002; 64(2): 63-70.
- Sepúlveda JG, Porta-Ducoing H, Rocha-Sosa M. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 2003; 21(3): 355-363.
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 2007; 15(6):252-259.
- Smith CJ, Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytologist* 1996; 132: 1-45.
- Sotelo MB, Nuñez-Barrios A, Pérez-Leal R, Hernández-Rodríguez OA. Fisiología del estrés ambiental en plantas. *Synthesys* 2008; 48:1-5.
- Sughisita E, Amagaya S, Ogihara Y. Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J Pharm Dyn* 1981; 4: 565-575.
- Stafford AM. Plant cell cultures as a source of bioactive small molecules. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2002; 5(2): 296-303.
- Staniszewska I, Krolicka A, Malinski E, Lojkowska E, Szafranek J. Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. *Enzyme Microb Technol* 2003; 33: 565-568.
- Szafranska K, Cvokrová M, Kowalska U, Górecka K, Górecki R, Martincová O, Janas KM. Influence of copper ions on growth, lipid peroxidation, and proline and polyamines content in carrot rosettes obtained from anther culture. *Acta Physiol Plant* 2011; 33: 851-859
- Taiz L y Zeiger E. *Physiology Plant*. California, Estados Unidos. The Benjamín/Cummings Publishing Company. Inc. 1991: 320-344.
- Tapia N, Zamilpa A, Bonfil M, Ventura E, Cruz-Vega D, Del Villar A, Cruz-Sosa F, Osuna L. Effect of the cultur medium and biotic stimulation on taxane production in *Taxus globosa* Schldl *in vitro* cultures. *Acta Physiologiae Plantarum* 2013; 35(12): 3447:55.
- Villaseñor JL y Espinosa GFJ. *Catalogo de malezas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura económica. México, D.F. 1998: 499.
- Wilson SA, Roberts SC. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J* 2012; 10: 249–268.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1962; 111: 544–547.
- Winyard PG y Willoughby DA. *Inflamation protocols en: Methods in molecular biology*; 225. Humana press Inc. 2003: 129-136.

- Zhou X, Zhong JJ. Effect of initial ammonium concentration on taxoid production and biosynthesis genes expression profile in suspension cultures of *Taxus chinensis* cells. Eng Life Sci 2009; 9 (3): 261–266.

### **Páginas WEB**

- <http://www.catalogueoflife.org/>
- <http://www.conabio.gob.mx/>
- <http://www.hipermercadocultural.com/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/SphaeralceaAngustifolia.html>
- <http://www.ars-grin.gov/duke/plants.html>
- <http://www.agargel.com>
- <http://www.talukderbd.com/>



# Sphaeralcic Acid and Tomentin, Anti-inflammatory Compounds Produced in Cell Suspension Cultures of *Sphaeralcea angustifolia*

## Authors

Juanita Pérez-Hernández<sup>1,4</sup>, Manasés González-Cortazar<sup>1</sup>, Sílvia Marquina<sup>2</sup>, Maribel Herrera-Ruiz<sup>1</sup>, Mariana Meckes-Fischer<sup>1</sup>, Jaime Tortoriello<sup>1</sup>, Francisco Cruz-Sosa<sup>4</sup>, María del Pilar Nicasio-Torres<sup>1</sup>

## Affiliations

The affiliations are listed at the end of the article

## Key words

- anti-inflammatory effects
- suspension-cultured cells
- coumarins
- naphthoic acid derivative
- *Sphaeralcea angustifolia*
- Malvaceae
- tomentin
- sphaeralcic acid

received Sept. 10, 2013  
revised Dec. 12, 2013  
accepted Dec. 30, 2013

Bibliography  
DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1360302>  
Published online January 31, 2014  
Planta Med 2014; 80: 209–214  
© Georg Thieme Verlag KG  
Stuttgart · New York ·  
ISSN 0032-0943

Correspondence  
**Dr. Manasés González-Cortazar**  
Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS)  
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)  
Argentina # 1, Col. Centro  
62790 Xochitepec, Morelos  
México  
Phone: + 5277 73 61 2155  
Fax: + 5277 73 61 21 55  
gmanases@hotmail.com

Correspondence  
**Dr. María del Pilar Nicasio-Torres**  
Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS)  
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)  
Argentina # 1, Col. Centro  
62790 Xochitepec, Morelos  
México  
Phone: + 5277 73 61 2155  
Fax: + 5277 73 61 21 55  
pilasiva@yahoo.com.mx

## Abstract

*Sphaeralcea angustifolia*, an endangered plant species in Mexico, is employed to treat inflammatory processes and as a wound healing remedy. Scopoletin (1) was reported as one of the main bioactive compounds in this plant. Here, we isolated and identified compounds with anti-inflammatory properties from the suspension-cultured cells of *S. angustifolia*. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH extract of the cells exhibited anti-inflammatory properties in acute inflammation models. Two compounds were isolated, 5-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin, named tomentin (2), and 2-(1,8-dihydroxy-4-isopropyl-6-methyl-7-methoxy)-naphthoic acid, denominated as sphaeralcic acid

(3). Their structures were determined by spectroscopic and spectrometric analyses. The anti-inflammatory effects of both compounds were also evaluated. At a dose of 45 mg/kg, compound 2 inhibited the formation of λ-carrageenan footpad edema at 58%, and compound 3 at 66%. Local application of compound 2 (225 mM per ear) or 3 (174 mM per ear) inhibited the phorbol ester-induced auricular edema formation by 57% or 86%, respectively. The effect of compound 3 was dose-dependent and the ED<sub>50</sub> was 93 mM.

Supporting information available online at <http://www.thieme-connect.de/ejournals/toc/plantamedica>

## Introduction

*Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don belongs to the Malvaceae family and is commonly known in Mexico as "vara de San José", "hierba del negro", and "hierba del golpe" in Spanish, or "pintapan" and "tlixihuitl" in the Nahuatl language. According to ethnobotanical information, the fresh aerial parts of this species are employed to treat inflammatory processes and as a wound healing remedy [1–3].

The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract from the plant's aerial parts applied topically and systemically in mice and rats, respectively, showed to be active during the acute and chronic phases of inflammation. Additionally, there is evidence that the extract regulates the response of pro- and anti-inflammatory cytokines. Scopoletin (1) was the active compound detected in the extract [4–6] and the presence of the monoterpene loliolide in the methanolic extract of *S. angustifolia* aerial parts was reported later [7].

*S. angustifolia* wild plants only grow as isolated populations in limited regions of a peculiar cli-

mate, and their collection has been restricted by the Mexican Ministry of the Environment and Natural Resources (SEMARNAT, NOM-059-ECOL-1994) because the plant is considered to be an endangered species. Due to its ability to produce specific medicinal compounds and that it grows at a rate similar or superior to that of intact plants, suspension-cultured cells have been proposed as an alternative tool for supplying high-quality plant matter [8,9]. The aim of this study was to isolate and identify the anti-inflammatory compounds produced by the suspension-cultured cells of *S. angustifolia*.

## Results and Discussion

The results evidenced that suspension-cultured cells of *S. angustifolia* developed in whole MS medium preserved the capability of producing compound 1 (○ Fig. 1), one of the compounds recognized as primarily responsible for the anti-inflammatory activity detected in the plant [4]. Under this condition, signs of compound 1 in cell

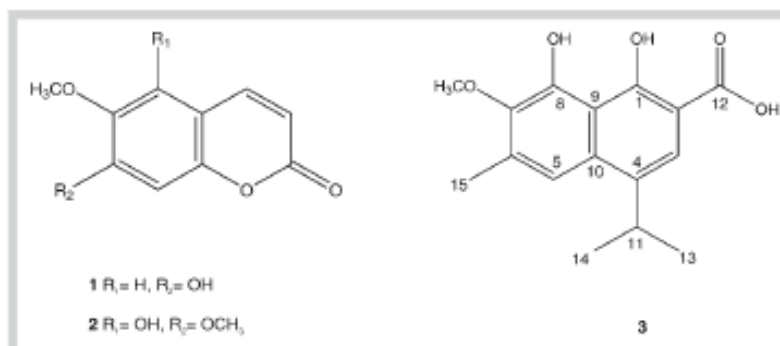


Fig. 1 Chemical structures of compounds 1, 2, and 3.

biomass extracts were only quantified at the logarithmic growth phase (9 days, 6.38  $\mu\text{g/L}$ ), and the compound was not detected in the remaining culture days. The compound 1 yield by dry biomass (2  $\mu\text{g/g}$  DB) was 3.35-fold lower than that detected by HPLC in the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  extract from the dry plant (6.7  $\mu\text{g/g}$  of DP). By reducing the nitrate content in the MS medium to 2.74 mmol, compound 1 was detected at very low concentrations in the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  extracts of biomasses obtained during the latency and logarithmic phases of cellular growth, reaching levels of 16.11 to 44.59  $\mu\text{g/L}$ . In addition, in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  extracts from suspension-cultured cells grown in MS medium with 2.74 mmol nitrate, two secondary metabolites were evidenced by HPLC; neither of these compounds were detected in the suspension-cultured cells grown in whole MS medium.

Compound 2 was isolated (○ Fig. 1) from fraction 5 which was acquired from the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  extract, with a yield of 0.003% by DB.

Compound 3 was isolated from fraction 4 with a yield of 0.004% by DB. This compound was obtained as a yellow solid, soluble in acetone, and recrystallized with methanol with a melting point of 205 °C. In the UV light spectrum, the compound showed the following  $\lambda_{\text{max}}$ : 192, 222, 260, and 357 nm. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum showed two signals at the low field in  $\delta$  7.62 and in  $\delta$  7.10, which integrated one hydrogen each. By HSQC spectroscopy, the correlation of the protons was observed with two carbons,  $\delta$  120.08 and  $\delta$  115.29, which according to their chemical shift were assigned to H-5 ( $\delta$  7.62) and H-3 ( $\delta$  7.10), respectively, of the aromatic ring. In HMBC spectroscopy, correlations with carbons C-4 ( $\delta$  156.86), C-7 ( $\delta$  140.20), C-9 ( $\delta$  133.12), C-10 ( $\delta$  118.96), and C-15 ( $\delta$  18.24) were observed for H-5. For H-3, correlations with carbons C-1 ( $\delta$  158.41), C-2 ( $\delta$  99.57), C-10 ( $\delta$  118.96), C-11 ( $\delta$  29.92), and C-12 ( $\delta$  165.55) were determined.

In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, signals corresponding to a methoxy group,  $\delta$  4.27 (3H, s), were found. According to COSY spectroscopy, in  $\delta$  3.70, a heptuplet signal ( $J = 6.9$  Hz) that is characteristic of a methine from an isopropyl group was registered. Both methyls of isopropyl showed a doublet signal in  $\delta$  1.37 (6H,  $J = 6.9$  Hz) and corresponding carbon signals for these methyl groups appear in  $\delta$  23.74 (C-13 and C-14), according to the HSQC spectroscopy.

HMBC spectroscopy indicated that C-6 ( $\delta$  130.18) and C-7 ( $\delta$  140.20) correlated with a singlet signal localized at  $\delta$  2.37 (3H), which corresponds to H-15. According to NMR analysis data (○ Table 1), the chemical structure (○ Fig. 1) was established as 2-(1,8-dihydroxy-4-isopropyl-6-methyl-7-methoxy)-naphthoic acid (3). The IR spectrum exhibited absorption bands at 3368 for the hydroxyl group of the acid and at 1710 for the carbonyl group. This structure ( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ) was confirmed for FAB-MS  $m/z$

Table 1 NMR spectroscopic data (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ,  $\delta$  ppm) for compound 3.

Position	$\delta$ $^{13}\text{C}$ , type	$\delta$ $^1\text{H}$ (J in Hz)	HMBC
1	158.41, C		
2	99.57, C		
3	115.29, CH	7.10, s	1,2,10,11,12
4	156.86, C		
5	120.08, CH	7.62, s	4,7,9,10,15
6	130.18, C		
7	140.20, C		
8	133.36, C		
9	133.12, C		
10	118.96, C		
11	29.92, CH	3.70, h ( $J = 6.9$ )	3,4,5,10,13,14
12	165.55, C		
13,14	23.74, $\text{CH}_3$	1.37, d ( $J = 6.9$ )	4,11
15	18.24, $\text{CH}_3$	2.37	5,6,7
$\text{OCH}_3$	60.22	4.27, s	7

313 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  273 [ $\text{M} - \text{OH}$ ] $^+$  and HRFABMS  $m/z$  273.1128 [ $\text{M} - \text{OH}$ ] $^+$  mass spectrometry techniques. This compound was named sphaeralcic acid (3).

The contents of compounds 2 and 3 in the cells of *S. angustifolia* grown in Murashige and Skoog (MS) medium with 2.74 mmol nitrate were evaluated at different culture times. Both compounds were accumulated in the biomasses during the culture period of suspension-cultured cells and their intracellular levels increased with the days of culture. The highest levels of compounds 3 ( $F_{0.05} = 11.73$ ;  $p = 0.0003$ ; Tukey test  $t_{0.05} = 9.16$ ) and 2 ( $F_{0.05} = 45.57$ ;  $p < 0.0001$ ; Tukey test  $t_{0.05} = 3.39$ ) were found on days 9 and 11 of the culture (○ Table 2).

The  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  extract from the suspension-cultured cells grown under nitrate restriction and the isolated compounds (2 and 3) were analyzed in two models of acute inflammation in the mouse. Subcutaneous application of  $\lambda$ -carrageenan is a reproducible model that is widely employed to evaluate anti-inflammatory agents [10,11]. In the negative control group, the maximal level of  $\lambda$ -carrageenan footpad edema (CFE) measured as the increase of the footpad volume (1.2 mm, 100%) was reached at 3 and 5 h (○ Table 3) after application of the proinflammatory agent. Intraperitoneal (i.p.) administration (100 mg/kg) of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  extract from the suspension-cultured cells inhibited the progress of CFE in the mouse by 11, 24, and 13% at 1, 3, and 5 h, respectively. The effect at 3 h (24%) was lower than that obtained with a higher dose (400 mg/kg) of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

**Table 2** Production of compounds 1, 2, and 3 in suspension-cultured cells of *Sphaerolkea angustifolia* grown in Murashige and Skoog (MS) medium with 2.74 mM of nitrates. Values represent means ( $n = 3$ )  $\pm$  standard error of the means (SEM). Values are expressed as grams of dry biomass. Production of compounds 1, 2, and 3 are significantly different when these are followed by \* ( $p < 0.05$ ) or \*\* ( $p < 0.01$ ) according to the Tukey multiple range test ( $p \leq 0.05$ ). NS = not significant

Time (days)	Dry biomass (g/L)	Compound 2 ( $\mu\text{g/L}$ )	Compound 3 ( $\mu\text{g/L}$ )
2	3.1 $\pm$ 0.1	150.2 $\pm$ 6.2 NS	599.3 $\pm$ 155.5 NS
4	4.1 $\pm$ 0.2	143.4 $\pm$ 11.6 NS	505.2 $\pm$ 74.8 NS
7	11.7 $\pm$ 0.3	271.3 $\pm$ 20.4**	826.3 $\pm$ 46.3 NS
9	14.2 $\pm$ 0.2	329.6 $\pm$ 6.9**	1205.2 $\pm$ 61.9*
11	13.7 $\pm$ 0.4	351.0 $\pm$ 14.0**	1365.9 $\pm$ 167.1*
16	13.1 $\pm$ 0.2	332.9 $\pm$ 7.9**	645.9 $\pm$ 64.3 NS

**Table 3** Inhibitory activity of compounds 2 and 3, and the drug indomethacin on  $\lambda$ -carrageenan footpad edema (CFE) administered intraperitoneally (i.p.) at a dose of 45 mg/kg. Mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n = 10$ ). CFE volumes and edema inhibition percentages are significantly different when these are followed by \* ( $p < 0.05$ ) or \*\* ( $p < 0.01$ ) according to the Tukey multiple range test ( $p \leq 0.05$ ). NS = not significant

Time (h)	Control	Compound 2	Compound 3	Indomethacin	$F_{0.05}$
Edema (mm)					
1	0.8 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1**	0.5 $\pm$ 0.1**	0.6 $\pm$ 0.1**	6.08
3	1.2 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.0**	0.6 $\pm$ 0.1**	0.6 $\pm$ 0.2**	17.08
5	1.2 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.2**	0.4 $\pm$ 0.1**	0.5 $\pm$ 0.3**	16.73
7	1.1 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1**	0.4 $\pm$ 0.1**	0.5 $\pm$ 0.2**	15.23
Edema inhibition (%)					
1	–	39 $\pm$ 3	41 $\pm$ 5	27 $\pm$ 5	1.71
3	–	45 $\pm$ 2	52 $\pm$ 4	50 $\pm$ 5	0.65
5	–	68 $\pm$ 6	66 $\pm$ 4	60 $\pm$ 3	0.50
7	–	67 $\pm$ 4	62 $\pm$ 6	55 $\pm$ 5	1.22

extract (57%) from *S. angustifolia* aerial parts [4]. CFE volumes in the groups treated with the isolated compounds (2 and 3) and indomethacin (45 mg/kg) were significantly lower than those produced in the control group at 1, 3, 5, and 7 h. The maximal anti-inflammatory effect observed for compounds 2 (220 g/mol) and 3 (290 g/mol), and indomethacin (357 g/mol) took place 5 h after damage induction. No significant differences ( $p > 0.05$ ) were found among the inhibition percentages of the treatments at each time of evaluation (Table 3).

In auricular edema, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) at a dose of 2.5  $\mu\text{g}$  per ear was employed as a substance capable of causing local inflammation characterized by vasodilatation, cellular infiltration, and erythema during the first 3 or 4 h after application of the irritant [12]. In the negative control group, the maximal inflammation level evaluated as the increase in the weight of the auricular edema was 12.4 mg (100%) after 4 h. The  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  extract from the biomass at a 2-mg dose per ear inhibited the formation of edema by 78%, an effect similar to that obtained with the same dose of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (73%) extract from *S. angustifolia* aerial parts [4].

Ear edema weights in the groups treated with isolated compounds 2 (6.5  $\pm$  0.9 mm\*\*) and 3 (1.6  $\pm$  0.4 mm\*\*), as well as in positive controls indomethacin (5.0  $\pm$  1.1 mm\*\*) and naproxen (5.6  $\pm$  0.8 mm\*\*), were lower than those produced in the negative (12.4  $\pm$  1.1 mm) control group ( $F_{0.05} = 6.12$ ;  $p = 0.0056$ ; Tukey test $_{0.05} = 3.32$ ). Additionally, significant differences were found among the treatments inhibition percentages ( $F_{0.05} = 7.81$ ;  $p = 0.006$ ; Tukey test $_{0.05} = 4.973$ ). Compound 3 (172 mM, 86.6  $\pm$  3.2%\*\*) was more active ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ) than compound 2 (225 mM, 47.5  $\pm$  6.7%\*) and naproxen (217 mM, 54.6  $\pm$  6.8%\*), and exerted a similar effect to that of indomethacin (140 mM, 59.3  $\pm$  7.6%\*\*); the effect was dose-dependent with a

median effective dose (ED $_{50}$ ) of 93 mM (Fig. 2). At the same time, the activity of compound 2 did not exhibit significant differences with both anti-inflammatory reference drugs ( $p > 0.05$ ).

Compound 1 was identified in the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extract of *S. angustifolia* aerial parts, and the anti-inflammatory (52%, 0.5 mg/ear) and antiarthritic effects have already been reported [4, 13].

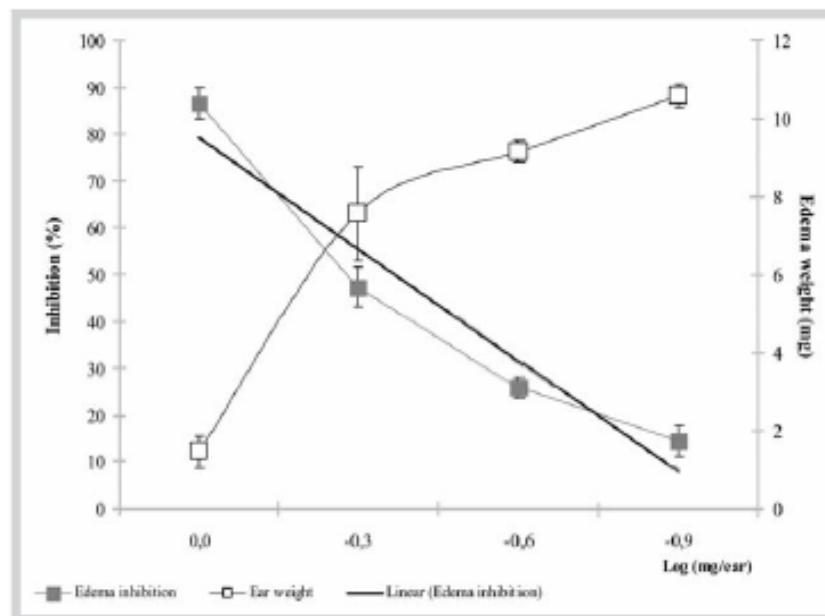
This is, to our knowledge, the first time that compounds 2 and 3 have been isolated and characterized from suspension-cultured cells of *S. angustifolia*.

To date, compound 3 has not been identified in another species of the *Sphaerolkea* genus, although the anti-inflammatory compound, 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid, isolated from *Rubia cordiflora*, was active in the colitis model of interleukin-10 (IL-10) deficient mice [14]. Additionally, this compound induced apoptosis in human keratinocytes [15].

There are other reports of naphthoic acid derivatives for plants, but they have not been tested for their biological activities. Some examples of naphthoic acid derivatives are lapachol (2-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,4-dione) identified in *Tabebeia heptaphylla* and lapachenol (2H-naphtho(1,2-b)pyran,6-methoxy-2,2-dimethyl) in *Putaria calabrica*, *T. heptaphylla*, *Paratocoma peroba*, and *P. alba* [16–18].

On the other hand, some naphthalene derivatives produced by chemical synthesis are anti-inflammatory agents, as is the case of 6-[3-(1-adamantyl)-4-methoxyphenyl]-2-naphthoic acid, which is a drug commercially known as adapalene, and of (S)-2-(6-methoxy-2-naphthyl) propanoic acid, the widely used drug naproxen.

Compound 2 has already been isolated from roots of other species, such as *Jatropha curcas*, *Platymiscium floribundum*, and *Artemisia monosperma* [19–21]; however, the anti-inflammatory effect of this compound has not been reported. The inhibitory ef-



**Fig. 2** Relationship between the dose of compound 3 and auricular edema inhibition, as well as between dose and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse auricular edema weight. The "best-fit" line shown was generated by linear regression of the data ( $n = 5$ ); squares of correlation coefficient ( $R^2$ ) regression equations are reported. Vertical and horizontal bars represent the standard error of the means (SEM) ( $n = 5$ ).

fect of compound 2 on CFE and ear edema formation was similar to that produced by indomethacin and naproxen.

The results of the present study comprise the basis for further evaluation of these compounds in the experimental model of  $\lambda$ -carrageenan-kaolin-induced arthritis in mice. Furthermore, some alternatives of the chemical process should be attempted in order to increase the recovery of these interesting compounds (2 and 3). It is also desirable to conduct cytotoxicity and *in vivo* toxicity assays of the bioactive compounds.

## Materials and Methods

### Plant cell culture

Suspension-cultured cells in a batch of *Sphaeralcea angustifolia* were cultivated in 250 mL flasks with 80 mL of whole MS liquid medium [22], with 27.4 mmol of total nitrates ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  15.9 mmol, and  $\text{KNO}_3$  11.5 mmol), supplied with 1 mg/L of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) in combination with kinetin (Kn, 0.1 mg/L), and supplemented with 30 g/L of sucrose. The flasks were placed in an orbital shaker at 110 rpm (New Brunswick Scientific Co., Inc.) and incubated at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  during a light:dark (16 h : 8 h) photoperiod under  $50 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{sec}$  warm white fluorescent light intensity. Biomasses were changed in fresh medium under sterile conditions every 3 weeks, utilizing an inoculum of 4% (w/v).

### Production of compounds 2 and 3

For the purification of compounds 2 and 3, suspension-cultured cells were grown in 2 L flasks using 4% inoculum in MS medium with the total nitrate concentration reduced to 2.74 mmol, and were incubated under the conditions described previously. Cultures were arrested on day 16 of the culture to obtain the biomass for the purification of compounds 2 and 3.

### Extraction and isolation

Suspension-cultured cells from 10 flasks were filtered and the biomasses were pooled and dried at room temperature. Then, the dry biomass (200 g) was extracted three times by maceration at room temperature with a mixture of grade-reactive solvent ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  9:1; Merck) at a ratio of 1:20 (w/v) at 24 h for each. The extracts were filtered, pooled, and concentrated to dryness under reduced pressure.

To purify the compounds (2 and 3), the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  extract (8.12 g, 2.81% yield) was fractionated by silica gel column chromatography ( $9 \times 28$  cm, 70–230 mesh; Merck) using an *n*-hexane-ethyl acetate-methanol gradient system (grade-reactive solvents; Merck) with 5% polarity increments. Aliquots of 500 mL were collected and samples with a similar TLC profile were integrated into 10 fractions (1–10), which were then analyzed by HPLC for retention time and UV spectrum examination of isolated compounds.

Compound 2 (88%) was isolated from fraction 5 (152 mg) through an open silica gel RP-18 column ( $1.5 \times 28$  cm, 40–63 mesh; Merck) with an  $\text{H}_2\text{O}$ : $\text{CH}_3\text{CN}$  elution system (grade-reactive solvents; Merck) with an increasing polarity of 10%. Thirty subfractions of 10 mL each were obtained (subfractions 5<sub>1</sub>–5<sub>30</sub>), and the compound was isolated (10 mg) from pooled subfractions 5<sub>1</sub>–5<sub>9</sub> (70:30,  $\text{H}_2\text{O}$ : $\text{CH}_3\text{CN}$ ).

Compound 3 (97%) purification was performed from fraction 4 (310 mg) utilizing the same system employed for the purification of compound 2. Thirty-one subfractions of 10 mL each were obtained (subfractions 4<sub>1</sub>–4<sub>31</sub>). Subfractions 4<sub>11</sub>–4<sub>19</sub> were pooled and recrystallized with 50:50 of  $\text{H}_2\text{O}$ : $\text{CH}_3\text{CN}$  to obtain compound 3 (11 mg).

### Analysis of compounds 1, 2, and 3

Suspension-cultured cells in batches grown in 250 mL flasks using 4% inoculum in whole MS (27.4 mmol nitrate) medium, and with the total nitrate concentration reduced to 2.74 mmol, were incubated under the conditions described previously. Cultures from 3 flasks were arrested at different growth times (at days 2, 4, 7, 9, and 11) to obtain the biomass and for analysis of com-

pounds 1, 2, and 3. Suspensions-cultured cells were filtered and samples were dried at room temperature and weighed. Then, the dry biomasses were extracted three times by maceration at room temperature with a mixture of grade-reactive solvent ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  9:1; Merck) at a ratio of 1:20 (w/v) at 24 h for each. The extracts of each biomass were filtered, pooled, and concentrated to dryness under reduced pressure by dissolving 10 mg in 1 mL of high-purity methanol (Merck) for HPLC analysis (see Table 2).

#### HPLC conditions

HPLC analyses were carried out in a Waters system (2695 Separation Module) coupled to a diode array detector (2996) with a 190–600 nm detection range, and operated by the Manager Millennium software system (Empower 1; Waters Corp.). Separations were performed in a Spherisorb® RP-18 column ( $250 \times 4.6$  mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Waters) employing a constant temperature of 25°C during analyses. Samples (20  $\mu\text{L}$ ) were eluted at a 1.2 mL/min flow rate with (A) high-purity  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  – 1.0%) and (B) high-purity  $\text{CH}_3\text{CN}$ -gradient mobile phases (Merck), and were detected by monitoring absorbance at 340 nm. The mobile phase was started with water (100%) and was maintained for 1 min. Then, the concentration of solvent B was gradually increased to 15% (at 1 min), 37% (at 10 min), and 85% (at 2 min). During the next 2 min, solvent B was increased to 100% and this proportion was maintained for 3 min. Finally, the next 3 min were used to return the mobile phase to the initial condition. The chromatographic method had a 22-min run time. The retention times (rt) of compounds 1 (99%, Sigma-Aldrich), 2 (88%), and 3 (95%) were 11.2, 10.96, and 17.3 min, respectively. Compound identification was performed by comparing their rt and absorbance spectra.

#### General experimental procedures

The melting point of the isolated compounds was obtained on Thermo Fischer Scientific IA1900 series equipment (Thermo Fischer Scientific, Inc.). All NMR spectra were recorded on a Varian INOVA-400 spectrometer at 400 MHz for  $^1\text{H}$  NMR spectra and two-dimensional spectroscopy experiments COSY, HSQC, and HMBC in  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ . Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS). The IR spectrum was recorded on a Bruker Tensor 27 FT-IR spectrometer and the molecular weight on Hewlett Packard 5985-B and JEOL-AX 505 HA (JEOL) mass spectrometers.

#### Animals

Male ICR mice (weight 28 g) were used and experiments were performed according to official Mexican Rule NOM-062-ZOO-1999 Guidelines (Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals) and international ethical guidelines for the care and use of experimental animals. The experimental protocol was authorized on January 31, 2011 by the Local Health Research Committee (IMSS, registry number R-2011-1701-3). The mice were maintained at a temperature of  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , with humidity at  $70 \pm 5\%$ , a 12-h/12-h light/dark cycle, and food/water *ad libitum*.

#### Carrageenan footpad edema (CFE)

The mice were divided into six groups (with eight mice each), and 30 min prior to  $\lambda$ -carrageenan injection, the animals were injected i.p. with 100 mg/kg of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  extract, or 45 mg/kg of compound 2 (88% purity), compound 3 (95% purity), or indomethacin (99% purity; Sigma-Aldrich), and the vehicle (Tween

20 solution at 2%; Merck). Acute inflammation was produced by the subplantar injection of 0.02 mL of 1%  $\lambda$ -carrageenan in water in the mouse's right paw. Footpad volume was measured before  $\lambda$ -carrageenan (initial time; time = 0) and 1, 3, 5, and 7 h after  $\lambda$ -carrageenan injection using a digital micrometer (Micrometric digimatic calibration MDC-1"-SB; Mitutoyo Products). Footpad edema in the control and treated groups was determined with respect to footpad volume at the initial time ( $T = 0$ ). The percentage of inhibition was calculated using the following expression: Inhibition % =  $[(\text{control} - \text{treatment}/\text{control}) \times 100]$  [23,24].

#### TPA-induced mouse ear edema

The mice were assigned to groups of five each, and TPA (2.5  $\mu\text{g}$  99% dissolved in 20  $\mu\text{L}$  acetone; Sigma-Aldrich) was applied on the right ear's internal and external surfaces to generate edema; the left ear was untreated. Doses of 0.125, 0.25, 0.5, and 1.0 mg per ear of compound 3 and 1.0 mg per ear of compound 2, naproxen (98% purity; Sigma-Aldrich), or indomethacin were dissolved in acetone and applied topically to both ears immediately after TPA administration.

Four hours after the administration of the inflammatory agent, the animals were sacrificed by cervical dislocation and circular sections (6 mm in diameter) were taken from both ears, treated and non-treated, which were weighed to determine the ear edema by differences in weight. The percentage of inhibition was obtained utilizing the following expression: Inhibition % =  $[(\text{control} - \text{treatment}/\text{control}) \times 100]$  [4,25].

#### Statistical analysis

Data obtained from concentrations of compounds 2 and 3 in biomasses, as well as from CFA (volume and inhibition %) and auricular edema (weight and inhibition %), were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and p values of  $\leq 0.05$  were considered significant. Significant differences among treatment means were calculated by the Tukey<sub>0.05</sub> test. After linear regression of data from doses vs. ear-edema inhibition, the square of the correlation coefficient ( $R^2$ ) was reported (SAS, ver. 9.1; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

**Compound 2.** Yellow oil;  $R_f$  0.66, silica gel 60  $F_{254}$ , [ $\text{CHCl}_3$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  (90:10)], UV  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 202, 228, 254, and 343 nm, and  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.8 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-4), 6.9 (1H, s, H-8), 6.2 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-3), and 3.9 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -6), 3.8 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -7) were compared with those appearing in the literature [19].

**Compound 3.** Yellow solid;  $R_f$  0.75, silica gel 60  $F_{254}$ , ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{CH}_3\text{OH}$ ; 90:10), UV  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 192, 222, 260, and 357 nm; mp  $205^\circ\text{C}$ ; IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3368 (OH), 1710 (C=O) and 1632 (C=C)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data (see Table 1); FAB-MS  $m/z$  313 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  273 [ $\text{M} - \text{OH}$ ] $^+$  and HRFABMS  $m/z$  273.1128 [ $\text{M} - \text{OH}$ ] $^+$  were calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$ .

#### Supporting information

$^1\text{H}$  CNMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC, HMBC,  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY two-dimensional IR, and mass spectra of compound 3,  $^1\text{H}$  NMR and NOESY two-dimensional spectra of compound 2 and HMBC correlations for H-5 and H-3 are available as Supporting Information.

## Acknowledgments

This work was supported by Basic Grant 240850 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT-México) for the doctoral studies of Juanita Pérez-Hernández at the Biotechnology Doctoral Program of UAM-Iztapalapa, and by Complementary Grant 99183982 from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, Mexico). The research had financial support grants provided by IS-IMSS-PROT/527 and CONACYT 90653/IS-IMSS-PROT/649.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Affiliations

- 1 Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Xochitepec, Morelos, México
- 2 Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos, México
- 3 Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales, Instituto Mexicano del Seguro Social (UIMFPN-IMSS), Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), Ciudad de México, México.
- 4 Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-Iztapalapa), Ciudad de México, México

## References

- 1 Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. México: Fondo de la Cultura Económica, Ediciones Botas; 1979: 429
- 2 Aguilar A, Gamacho JR, Chino S, Jáquez P, López ME. Herbario medicinal del instituto mexicano del seguro social. México: Instituto Mexicano del Seguro Social; 1994: 140, 251
- 3 Calderón-Rzaefowski G, Rzedowski J. Flora fanerogámica del Valle de México. Pátzcuaro, Michoacán, México: Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; 2001: 393–395, 406–408
- 4 García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos G, Sordía G, Jiménez-Arellanes A, Chávez-Soto MA, Meckes-Fischer M. *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytotherapy to treat chronic inflammation. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 2012; 11: 454–463
- 5 Juárez-Griaco M, Román-Ramos R, González-Márquez H, Meckes-Fischer M. Efecto de *Sphaeralcea angustifolia* sobre la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias. *Lab Ciencia con Noticias Técnicas de Laboratorio* 2008; 2: 21–23
- 6 Meckes M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jiménez A. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytotherapy* 2004; 11: 446–451
- 7 Osti-Castillo MR, Torres-Valencia JM, Villagómez-Ibarra JR, Castellán-Pelcastre I. Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 2010; 9: 359–367
- 8 Stafford AM. Plant cell cultures as a source of bioactive small molecules. *Curr Opin Drug Discov Dev* 2002; 5: 296–303
- 9 Vanisree M, Lee CY, Lo SF, Nalawade SM, Lin CY, Tsay HS. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sin* 2004; 45: 1–22
- 10 Morris Q. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Inflammation Protocols*, Vol. 225. University of Bath, Bath, UK: Springer Protocols; 2003: 115–121
- 11 Gërdirem A, Mshvildadze V, Süleyman H, Elias R. Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, de-rasaponin-C, hederacoldhiside-E and hederacoldhiside-F in carrageenan-induced rat paw edema. *Phytotherapy* 2005; 12: 440–444
- 12 Gábor M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Budapest: Akadémiai Kiadó; 2000
- 13 Pan R, Gao XH, Li Y, Xia YF, Dai Y. Anti-arthritis effect of scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Benth stems, is associated with decreased angiogenesis in synovium. *Fundam Clin Pharmacol* 2010; 24: 477–490
- 14 Okada Y, Tsuzuki Y, Narimatsu K, Sato H, Ueda T, Hozumi H, Sato S, Hokari R, Kurihara C, Komoto S, Watanabe C, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid from *Propionibacterium freudenreichii* reduces inflammation in interleukin-10-deficient mice with colitis by suppressing macrophage-derived proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol* 2013; 94: 473–480
- 15 Mok CF, Xie CM, Sham KW, Lin ZX, Cheng CH. 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid induces apoptosis in human keratinocyte: potential application for psoriasis treatment. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 792840
- 16 Burnett AR, Thompson RH. Naturally occurring quinines. Part XIII Anthraquinones and related naphthalenic compounds in *Galium* spp. in *Asperula odorata*. *J Chem Soc C* 1968: 854–857
- 17 González AG, Barroso JT, Cardona RJ, Medina JM, Rodríguez-Luis F. Química de las Rubiaceas. II. Componentes de la "Putoria calábrica" Perss. *An Quim* 1977; 73: 538–545
- 18 Schmeda-Hirschmann G, Papastergiou F. Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug "Tayí Pytá" (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). *Z Naturforsch C* 2003; 58: 495–501
- 19 Hammada HM, Aboul Ela MA, El-Lakany AM, El-Hanbali O, Zaki CS, Ghazy NM. New constituents of *Artemisia monosperma* Del. *Pharmazie* 2008; 63: 611–614
- 20 Ludy CP, Hernández-Rodríguez P. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. *Rev Cubana Plant Med* 2012; 17: 194–209
- 21 Ravindranath N, Ravinder Reddy M, Ramesh C, Ramu R, Prabhakar A, Jagadeesh B, Das B. New lathyranes and podocarpane diterpenoids from *Jatropha curcas*. *Chem Pharm Bull* 2004; 52: 608–611
- 22 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 1962; 15: 473–497
- 23 Gupta M, Mazumder UK, Kumar RS, Sambath R, Gomathi P, Rajeshwar Y, Kakoti BB, Selven VT. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanolextract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. *J Ethnopharmacol* 2005; 98: 267–273
- 24 Boeris MA, Toso RE, Skliar MI. Actividad antiinflamatoria de *Salpiglossa origanifolia*. *Acta Farm Bonaerense* 2004; 23: 138–141
- 25 Payá M, Ferrández MI, Sanz MJ, Bustos G, Blasco R, Ríos JJ, Alcaraz MJ. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice. *Phytother Res* 1993; 7: 159–162