

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSTGRADO



TITULO:

“Establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* de *Leucophyllum frutescens* Berl.
(I.M. Johnston), para la obtención de metabolitos
de importancia en el área de la salud”

Por

MC CLAUDIA AURORA ESPINOSA LEAL

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

FEBRERO 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSTGRADO**



TITULO:

“Establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* de *Leucophyllum frutescens* Berl.

(I.M. Johnston), para la obtención de metabolitos

de importancia en el área de la salud”

Por

MC CLAUDIA AURORA ESPINOSA LEAL

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON

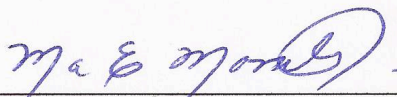
ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

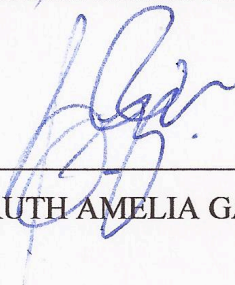
FEBRERO 2016

“Establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* de *Leucophyllum frutescens* Berl.
(I.M. Johnston), para la obtención de metabolitos
de importancia en el área de la salud”

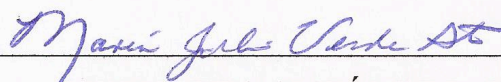
Comité de Tesis



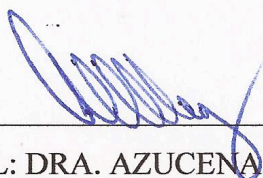
PRESIDENTE: DRA. MARÍA EUFEMIA MORALES RUBIO



SECRETARIA: DRA. RUTH AMELIA GARZA PADRON



VOCAL: DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR



VOCAL: DRA. AZUCENA ORANDAY CARDENAS



VOCAL: DR. RAMÓN G. RODRIGUEZ GARZA

San Nicolás de los Garza, N.L.

FEBRERO 2016

DEDICATORIA

A mis padres por todo su amor y apoyo al tratar de darme la mejor educación posible. Aprecio todos los sacrificios que realizaron y no habría llegado hasta esta meta sin ustedes.

A mis maestros la Dr. Eufemia Morales y el Dr. Jaime Treviño (QEPD) quienes me acogieron en su hogar académico y enseñaron importantes lecciones de vida y trabajo, sin las cuales no habría podido completar este trabajo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Micropropagación por su ayuda y comprensión durante el tiempo de realización de este trabajo.

A los lectores

Léanlo con pesadumbre y sentirán odio
Léanlo con enojo y sentirán venganza
Léanlo con paranoia y sentirán confusión
Léanlo con empatía y sentirán compasión
Léanlo con amor y se sentirán alagados
Léanlo con esperanza y se sentirán positivos
Léanlo con humor y sentirán felicidad
Léanlo con Dios y sentirán la verdad
Léanlo sin sesgo y sentirán paz
No lo lean y no sentirán nada en absoluto
-Shannon L. Alder

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, maestros, compañeros y amigos por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo. Nada de esto habría sido posible sin ustedes: Mamá, Papá, Luis, Adrián, Dra. Eufemia, Dr. Jaime, Dra. Ruth, Dr. Ramón, Dra. Julia, Dra. Azucena, Dr. Ezequiel, Dra. Catalina, Dianita, Mariana, Deniss, Rodrigo, Dianita M., Laura, Ingrid y demás personas. Mis mas sinceras y sentidas Gracias.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada número 45391

Al laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al laboratorio Micropropagación, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Contenido	Pág.
	RESUMEN	XV
	ABSTRACT	XVI
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1	Generalidades	3
2.2	Microorganismos e infecciones	4
2.3	Metabolitos secundarios	6
2.4	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	9
2.5	Distribución, descripción y clasificación de la especie	10
2.6	Determinación de grupos funcionales	12
2.7	Pruebas biológicas	12
3	JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	14
4	OBJETIVOS	15
4.1	Objetivo general	15
4.2	Objetivos específicos	15
5	HIPÓTESIS	16
6	MATERIAL Y METODOLOGIA	17
6.1	Colecta de material vegetal y obtención de explantes	17
6.2	Selección y elaboración de medios de cultivo	17
6.2.1	Germinación <i>in vitro</i>	20
6.2.2	Subcultivo de plántulas	20
6.2.3	Inducción de callo	20
6.3	Establecimiento del cultivo aséptico	20
6.4	Siembra de explantes	20
6.4.1	Semillas	20
6.4.2	Hojas	21
6.4.3	Subcultivo de plántulas	21
6.4.4	Callogénesis	21
6.5	Obtención de extractos	21
6.5.1	<i>In vivo</i>	21

6.5.2	<i>In vitro</i>	21
6.6	Pruebas de identificación de grupos funcionales	22
6.7	Pruebas biológicas	24
6.7.1	Actividad antibacteriana	24
6.7.1.1	Tinción Gram	24
6.7.1.2	Cinética de crecimiento bacteriano	24
6.7.1.3	Ensayo de difusión en agar	24
6.7.2	Actividad antioxidante	25
6.7.2.1	Técnica de secuestro de radicales libres (DPPH)	25
6.7.2.2	Técnica de descolonización del radical catiónico ABTS	25
6.7.2.3	Técnica de Fenoles Totales Folin-Ciocalteu	26
6.7.3	Bioensayo de letalidad de <i>Artemia salina</i>	26
6.8	Cromatografía de Capa Fina	26
7	RESULTADOS	28
7.1	Colecta de material vegetal y obtención de explantes	28
7.2	Procedimiento de desinfección	29
7.3	Cultivo <i>in vitro</i>	30
7.3.1	Germinación	30
7.3.1.1	Medio MS sin reguladores (M1), (Colecta Apodaca)	30
7.3.1.2	Semillas sembradas en medio M4 semillas (Colecta Apodaca)	31
7.3.1.3	Germinación en medio M6 (Colecta Apodaca)	32
7.3.1.4	Germinación en medio M1 (Colecta Sabinas Hidalgo)	33
7.3.1.5	Germinación en medio M4 (Colecta Sabinas Hidalgo)	34
7.3.1.6	Germinación en medio M6 (Colecta Sabinas Hidalgo)	34
7.3.1.7	Comparación y Análisis estadístico de germinación.	35
7.3.2	Brotación <i>in vitro</i>	41
7.3.2.1	Brotación en medio M6	41
7.3.2.2	Brotación en medio M13	41
7.3.3	Callogénesis	42
7.4	Obtención de extractos	44
7.5	Pruebas de identificación de grupos funcionales	44
7.6	Pruebas biológicas	46
7.6.1	Actividad antimicrobiana	46

7.6.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	46
7.6.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	48
7.6.1.3	<i>Salmonella typhimurium</i>	49
7.6.1.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	49
7.6.1.5	<i>Bacillus cereus</i>	51
7.6.2	Actividad antioxidante	52
7.6.2.1	Ensayo DPPH	52
7.6.2.2	Ensayo de descolorización del radical ABTS	52
7.6.2.3	Fenoles Totales (Follin-Colcateu)	54
7.6.3	Letalidad de <i>Artemia salina</i>	55
7.7	Cromatografías en Capa Delgada	55
7.7.1	Sistema de elución cloroformo:metanol 9:1	56
7.7.1.1	Revelado por luz UV	56
7.7.1.2	Revelado por cloruro de cobalto	57
7.7.2	Sistema de elución benceno:acetona 9:1	57
7.7.2.1	Revelado por luz UV	57
7.7.2.2	Revelado por cloruro de cobalto	58
8	DISCUSIÓN	59
9	CONCLUSIONES	63
10	BIBLIOGRAFÍA	64
11	RESUMEN BIOGRÁFICO	70

INDICE DE TABLAS

Tabla No	Contenido	Página
1	Sales básicas y compuestos orgánicos del medio Murashige y Skoog (MS, 1962) en mg/L.	18
2	Medios de Cultivo y sus combinaciones de reguladores.	19
3	Resumen resultados de pruebas de germinación	38
4	ANOVA para datos de germinación diaria.	40
5	Rendimientos de extractos, material <i>in vivo</i> .	44
6	Rendimientos de extractos, material <i>in vitro</i> .	44
7	Resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico.	45
8	Halos de inhibición de extractos de Raíz Cenizo Sabinas y Callo M6 de cenizo contra <i>L. monocytogenes</i> .	47
9	Halo de inhibición de extracto de Raíz Cenizo Sabinas contra <i>S. aureus</i> .	48
10	Halos de inhibición de controles contra <i>S. typhimurium</i>	49
11	Halos de inhibición de extractos de Raíz Cenizo Sabinas contra <i>E. faecalis</i> .	50
12	Halos de inhibición de extractos de planta silvestre de cenizo y de Callo M4 producido <i>in vitro</i> contra <i>B. cereus</i> .	51
13	EC ₅₀ de extractos de planta silvestre y producidos <i>in vitro</i> de <i>L. frutescens</i> .	52
14	Eq. de Trolox de extractos de planta silvestre y producidos <i>in vitro</i> de <i>L. frutescens</i> .	53
15	Eq. de ácido gálico de extractos de planta silvestre y producidos <i>in vitro</i> de <i>L. frutescens</i> .	55
16	DL ₅₀ extractos de planta silvestre y producidos <i>in vitro</i> de <i>L. frutescens</i> .	55
17	Numeración de extractos de <i>L. frutescens</i> .	56

INDICE DE FIGURAS

Figura No	Contenido	Página
1	<i>Leucophyllum frutescens</i> .	11
2	Tallos, hojas y frutos de <i>Leucophyllum frutescens</i> recolectados en el mes de Agosto del 2012 en el municipio de Apodaca, Nuevo León.	28
3	Plantas de <i>Leucophyllum frutescens</i> recolectados en el mes de Agosto del 2013 en el municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León.	29
4	Frutos (A) y semillas (B) de <i>Leucophyllum frutescens</i> vistas a través de un estereoscopio (aumento 10X).	29
5	Hojas de <i>L. frutescens</i> , donde se observa el daño al remover los tricomas.	29
6	Cultivo <i>in vitro</i> de hojas de <i>L. frutescens</i> donde se observa la contaminación por hongos.	30
7	Inicio de germinación de <i>L. frutescens</i> en medio MS sin reguladores.	30
8	Plántulas de <i>L. frutescens</i> en medio MS sin reguladores. Tres meses de edad.	31
9	Inicio de germinación de <i>L. frutescens</i> en medio M3	31
10	Plántulas de <i>L. frutescens</i> en medio M4.	31
11	Plántulas de <i>L. frutescens</i> en medio M4.	32
12	Plántulas de <i>L. frutescens</i> en medio M6.	32
13	Inicio de germinación de semillas de <i>L. frutescens</i> recolectadas en Sabinas Hidalgo N.L. en medio MS sin reguladores.	33
14	Plántulas germinadas de semillas de <i>L. frutescens</i> recolectadas en Sabinas Hidalgo N.L. en medio MS sin reguladores.	33
15	Plántulas de <i>L. frutescens</i> M4.	34
16	Inicio de germinación de semillas de <i>L. frutescens</i> recolectadas en Sabinas Hidalgo N. L. medio M6.	34
17	Plántulas germinadas de semillas de <i>L. frutescens</i> recolectadas en Sabinas Hidalgo en medio M6.	35
18	Plántulas de <i>L. frutescens</i> en medio M6.	35
19	Plántulas de <i>L. frutescens</i> recién puesto en M6.	41
20	Plántulas de <i>L. frutescens</i> en medio M6.	41
21	Plántulas de <i>L. frutescens</i> M1.	42
22	Plantulas de <i>L. frutescens</i> en medio M13	42
23	Callo de <i>L. frutescens</i> A. Callo de hoja en medio M2. B. Callo de tallo en M1.	42
24	Hojas de <i>L. frutescens</i> en medio M5 Siete días y catorce días después de siembra.	43
25	Tallos de <i>L. frutescens</i> en medio M5 Siete días después de siembra y catorce días después de siembra.	43
26	Extracto de cenizo contra <i>L. monocytogenes</i> . Halo presente en discos numerados.	47

27	Extractos de planta silvestre de cenizo contra <i>S. aureus</i> . Halo presente en disco marcado 3.	48
28	Extractos de planta silvestre de cenizo contra <i>E. faecalis</i> ,	50
29	Extractis de planta silvestre y producidos <i>in vitro</i> de cenizo contra <i>B. cereus</i> . Halo presente en los discos marcados 1.2.3.4 y 5	52
30	Placa CCD revelada con luz UV (cloroformo:metanol 9:1).	56
31	Placa CCD revelada con cloruro de cobalto (cloroformo:metanol 9:1).	57
32	Placa CCD revelada con luz UV (beceno:acetona 9:1).	58
33	Placa CCD revelada con cloruro de cobalto (beceno:acetona 9:1).	58

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica No	Contenido	Página
1	Germinación diaria T1 por localidad.	36
2	Germinación diaria Apodaca por Tratamiento.	37
3	Germinación diaria Sabinas Hidalgo por Tratamiento.	37
4	Porcentaje de Germinación.	39
5	Índice de Germinación y Velocidad de Germinación.	40
6	Cinética de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> .	46
7	Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> .	48
8	Cinética de crecimiento de <i>S. typhimurium</i> .	49
9	Cinética de crecimiento de <i>E. faecalis</i> .	50
10	Cinética de crecimiento de <i>B. cereus</i> .	51
11	Curva estándar de Trolox.	53
12	Curva estándar de ácido gálico.	54

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
2,4 D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico)
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
DL ₅₀	Dosis Letal 50
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EC ₅₀	Concentración Efectiva 50
GA3	Ácido giberélico
ICC	Infusión Cerebro Corazón
K	Cinetina
M	Medio de cultivo vegetal
MS	Medio de cultivo M
N/A	No aplica
PVP	Polivinilpirrolidona
T0	Tiempo cero
Trolox	Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Vit. C	Vitamina C

RESUMEN

En la actualidad existe una necesidad de encontrar compuestos que ayuden en el tratamiento de padecimientos humanos. Los productos naturales, como los metabolitos secundarios, presentan una fuente potencial de estos compuestos. Sin embargo su obtención se dificulta, ya que la calidad del metabolito varía de acuerdo a la ecorregión, por lo que es importante buscar alternativas para la obtención de estas sustancias. Una alternativa es el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, a través del cual podemos obtener los metabolitos, evitando la dependencia de factores ambientales y el deterioro de las especies. *Leucophyllum frutescens*, esta reportada en la literatura como fuente de metabolitos (terpenos) anti tuberculosis, hepatoprotectores y con actividad antimicrobiana (contra *Staphylococcus aureus*). El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo de cultivo *in vitro* para *L. frutescens* para determinar la presencia *in vitro* de metabolitos secundarios de importancia médica. Para establecer el cultivo *in vitro* se emplearon semillas obtenidas de frutos maduros y hojas, ambas se sometieron a un proceso de desinfección y fueron sembradas en un medio Murashige y Skoog para lograr la inducción de callo o plántulas. No se logró el establecimiento a partir de las hojas debido a la ineficacia del proceso de desinfección causada por la presencia de tricomas. Sin embargo las semillas fueron capaces de producir plántulas completas en medio MS sin reguladores, que tuvieron la capacidad de diferenciarse a callo al subcultivarse en medio M5 (MS 4 mg/L ANA). Se realizaron extracciones de planta silvestre (hojas, tallo y raíz) para las dos localidades y de los tejidos regenerados *in vitro*. Para todos los extractos se hicieron pruebas de tamizaje fitoquímico y Cromatografías en Capa Fina para la comparación de los grupos funcionales presentes en ellos. Las pruebas de tamizaje obtuvieron resultados positivos para todas las pruebas, exceptuando alcaloides. Las pruebas positivas en su mayoría coincidieron para ambos tipos de extractos. Las pruebas de las cromatografías resultaron en la presencia de manchas marrón en los extractos silvestres que coinciden con la apariencia de terpenos. Así mismo se realizaron pruebas de actividad biológica (actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, actividad toxica) para todos los extractos. El extracto de Raíz Cenizo Sabinas presentó la mejor actividad antimicrobiana y tóxica al ser activa contra cuatro de las cinco cepas estudiadas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus cereus*) y contar con una DL₅₀ de 296.346 µg/ML contra *Artemia salina*. Por otra parte los extractos de Tallo Cenizo para ambas localidades presentaron la mayor cantidad de fenoles totales con 120.22 y 78.78 µg/mL de equivalentes de ácido gálico y la mayor capacidad antioxidante, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) con CE₅₀ de 213.96 y 283.27 µg/mL y ABTS (2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) con 97.58 y 108.27 µg/mL de equivalentes de Trolox.

ABSTRACT

Today there is a need to find compounds that help in the treatment of human ailments. Natural products, as secondary metabolites produced by plants and other organisms, present a potential source for these compounds. However their collection is difficult, since the quality of the metabolites varies according to the ecoregion, so it is important to look for alternatives to obtain these substances. An alternative is the *in vitro* culture of plant tissue, through which we can get the active metabolites, avoiding dependence on environmental factors and the deterioration of the species. *Leucophyllum frutescens*, is reported in the literature as a source of metabolites (terpenes) with activity against tuberculosis, hepatoprotective and with antimicrobial activity (against *Staphylococcus aureus*), it is a shrub also known as cenizo, it is distributed in the arid regions of Northeastern Mexico. The objective of this work was to establish a protocol for the *in vitro* tissue culture of *Leucophyllum frutescens* to determine the presence of secondary metabolites of medical importance. To establish *in vitro* culture seeds obtained from ripe fruits and leaves were used, both were subjected to a process of disinfection and were planted in a Murashige and Skoog culture medium to achieve the production of either plant or callus material. The establishment of the *in vitro* tissue culture from the leaves was not achieved due to the inefficiency of the disinfection process caused by the presence of trichomes. However, the seeds were capable of producing both complete plantlets in MS medium without regulators, who had the ability to differentiate into callus when the subcultured in the M5 culture media (MS 4 mg/L ANA). Extractions of the wild plant materials (leaves, stems and roots) were conducted for two locations as well as from *in vitro* regenerated tissues. All extracts were screened for phytochemicals and performed Thin Layer Chromatographies for the comparison of the functional groups present in them. The results for the Screening tests were positive for all tests, except alkaloids. Positive tests for the most part concurred for both types of extracts. The chromatography test resulted in the presence of brown spots for the wild extracts that coincide with the appearance of terpenes. Biological activity tests were performed (antimicrobial activity, antioxidant activity, activity toxic) for all the extracts. Cenizo Sabinas Root extract presented the best antimicrobial and toxic activity being active against four of the five microbial strains studied (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus cereus*) and having an LD₅₀ of 296.346 µg/mL against *Artemia salina*. On the other hand Stem Cenizo extracts for both locations (Sabinas and Apodaca) presented the largest number of total phenols 120.22 y 78.78 µg/mL Gallic acid equivalents and the greater antioxidant capacity DPPH with an EC₅₀ of 213.96 y 283.27 µg/mL and ABTS of 97.58 y 108.27 µg/mL Trolox equivalents.

1) INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis es una enfermedad que afecta al sistema respiratorio y es la segunda causa mundial de mortalidad causada por un agente infeccioso. Esta es producida por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que al ser expulsado por un paciente infectado viaja por el aire y es inhalada por personas sanas produciendo la infección. Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo del 10% de padecer la enfermedad a lo largo de su vida. Sin embargo este riesgo aumenta cuando las personas tienen sistemas inmunes dañados, como es el caso de personas infectadas con VIH, desnutrición o diabetes y quienes consumen tabaco. La tuberculosis afecta principalmente a adultos jóvenes, es decir personas en la edad productiva, y más del 95% de las muertes se registran en países en desarrollo.

La necesidad de encontrar compuestos útiles que asistan en el tratamiento y alivio de los múltiples padecimientos humanos crece día con día. En la búsqueda de estos compuestos destaca la importancia de los productos naturales, estos son metabolitos derivados naturalmente y/o subproductos de microorganismos, plantas o animales (Baker, *et al.*, 2000). Estos compuestos han sido explotados por los humanos durante miles de años, siendo las plantas la fuente principal de compuestos usados, principalmente por sus propiedades medicinales.

Leucophyllum frutescens (comúnmente conocido como cenizo) es un arbusto perteneciente a la familia Scrophulariaceae. Se distribuye ampliamente en el norte de México (Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Chihuahua) y el sudoeste de los Estados Unidos. Típicamente es un arbusto compacto que tiene una altura aproximada de entre 0.5 a 1.5 m con un diámetro de cobertura de 1.2 a 1.8 m (TWC, 2009).

El cenizo es una planta comúnmente empleada por sus cualidades ornamentales debido a que es un arbusto siempreviva con flores atractivas y duraderas. Una calidad ecológica muy importante de esta planta es su resistencia a sequías, heladas, fuertes vientos, salinidad, ataques de herbívoros y elevadas temperaturas. Existen múltiples reportes empíricos sobre el uso medicinal de esta especie, recientemente varios grupos de investigadores han trabajado con esta planta para verificar sus propiedades antituberculosas, en el año 2011 se descubrió la presencia de una molécula conocida como leubethanol, un diterpeno, con actividad anti tuberculosis en extractos de raíz del cenizo (Molina-Salinas, *et al.*, 2011). Otra

propiedad medicinal referida para esta especie, es como hepatoprotectora (Castillo-Nava; D, *et al.*, 2004).

Los atributos antes mencionados hacen de *L. frutescens* una candidata ideal para la búsqueda de productos naturales útiles en el área de la salud, mediante los sistemas de cultivo *in vitro*.

2) ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

Desde épocas remotas el hombre tuvo que aprender a vestirse, comer y curarse. Para ello debió mimetizarse con su entorno y aprender del comportamiento de los animales, que basados en su instinto sabían seleccionar las especies que eran consideradas comestibles, de aquellas consideradas como medicinales y también tóxicas. Este aprendizaje le demandó largo tiempo y no todos estaban preparados de igual manera para llevarlo a la práctica. Los continuos éxodos de muchos pueblos debidos a las constantes guerras conspiraron contra la adaptación del hombre a su medio ambiente. Dentro de las llamadas civilizaciones avanzadas, los Egipcios dieron muestras de un profundo conocimiento médico, y a través del papiro de Ebers (primer documento médico de la antigüedad descubierto en 1872) demostraron las virtudes de muchas plantas medicinales en salud humana. En el siglo XIX, cuando Friedrich Wohler produjo sintetizó urea a partir de una sustancia inorgánica (el cianato de amonio), da comienzo la industria de la síntesis química, ya que hasta entonces no se concebía como fuente de materia orgánica ningún otro elemento que no fuese animal o vegetal. El siglo XX marca el liderazgo de los productos de síntesis, dejando relegadas a las plantas como una "práctica medicinal menor". Sin embargo, los principales productos de primera línea surgen del ámbito natural, entre ellos la penicilina, aspirina, cornezuelo de centeno, belladona, digital, vincristina, pilocarpina, ipecacuana, atropina, reserpina, podofilina, etc. Con la tragedia ocurrida a fines de la década del '50 con la sustancia química talidomida, se ponen en duda los criterios de evaluación de seguridad de la aprobación de drogas que regían hasta entonces, dando origen a la creación de los primeros Departamentos de Farmacovigilancia entre 1982 y 1990 salen del mercado más de doscientas drogas sintéticas debido a graves problemas de intoxicación entre la población. Paralelamente la investigación con plantas medicinales continuó con su silencioso trajinar y de ahí surgen nuevas drogas de amplio empleo en la actualidad: *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, *Hipericum perforatum*, *Taxus bacata*, *Centella asiática*, *Aloe vera*, *Castaño de Indias*, *Hamamelis virginiana*, *Pygeum africanum*, *Serenoa repens*, *Lentinus edodes* (shiitake), *Fucus vesiculosus*, entre otros (Asociación Argentina de Fitomedicina, 2011).

2.2 Microorganismos e Infecciones.

Los microorganismos son organismos microscópicos constituidos por una o varias células. Estos han colonizado todos los ambientes de la Tierra. Cada microorganismo puede ser clasificado en uno de tres dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya* (Editorial Nature, 2008); (Madigan, Martinko, & Parker, 2006).

Los miembros de *Bacteria* y *Archae* al ser procariotes son muy parecidos, sin embargo están muy alejados genéticamente. Ambos dominios carecen de núcleo y organelos. Su información genética se compone de DNA y es guardada en una región llamada pre núcleo. Además estas células están rodeadas por una rígida pared celular (Madigan, Martinko, & Parker, 2006); (Nester, Anderson, Roberts, & Nester, 2007).

Por otra parte los miembros del dominio *Eucarya*, llamados eucariotes, pueden ser unicelulares o pluricelulares. Siempre contienen un núcleo cubierto por una membrana verdadera y otros organelos rodeados de membranas. Todas las algas, hongos, protozoarios y parásitos multicelulares son eucariotes (Madigan, Martinko, & Parker, 2006); (Nester, Anderson, Roberts, & Nester, 2007).

Algunos microorganismos presentan una relación estrecha con organismos de otras especies llamada simbiosis. Dependiendo del efecto neto del microorganismo sobre la aptitud inclusiva del organismo hospedero, la relación entre ellos se puede clasificar como: mutualismo, comensalismo o parasitismo. En el mutualismo, ambas especies se benefician de la relación, en el comensalismo una de las especies se beneficia mientras que la otra no se ve ni perjudicada ni beneficiada, por el contrario en las relaciones de parasitismo los microorganismos huéspedes perjudican al hospedero con su presencia (Nester, Anderson, Roberts, & Nester, 2007).

Dichos microorganismos dañinos se conocen como patógenos. La patogenicidad del parásito, es decir la capacidad del parásito para causar daño al hospedero, depende del patógeno del que se trate. A sí mismo la relación hospedero-parásito depende tanto de la patogenicidad del parásito como de la resistencia o susceptibilidad, según sea el caso, del hospedero. Por otra parte el, término infección se refiere a cualquier situación en la que un microorganismo se está desarrollando y estableciendo en un hospedero, causando o no en él algún daño (Madigan, Martinko, & Parker, 2006).

De gran importancia es la infección causada por el bacilo Gram positivo, ácido-alcohol resistente *Mycobacterium tuberculosis*. Este microorganismo es el causante de la Tuberculosis, una enfermedad que afecta al sistema respiratorio. La tuberculosis pulmonar activa generalmente produce los siguientes síntomas: tos productiva (a veces con sangre en el esputo), dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudores nocturnos. La tuberculosis es la segunda causa mundial de mortalidad causada por un agente infeccioso al ser responsable de 1.5 millones de muertes al año. El promedio de edad de muerte causada por esta enfermedad es de 54 años, es decir la edad productiva (Madigan, Martinko, & Parker, 2006); (Organizacion Mundial de la Salud, 2013).

Los bacilos de la tuberculosis se transmiten muy fácilmente a través de la vía respiratoria. Una persona infectada al toser expulsa los bacilos que a su vez son inhalados por otra persona, se requieren solo algunos bacilos para producir una infección. Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo del 10% de padecer la enfermedad a lo largo de su vida. Sin embargo este riesgo aumenta cuando las personas tienen sistemas inmunes dañados, como es el caso de personas infectadas con VIH, desnutrición o diabetes y quienes consumen tabaco. La tuberculosis afecta principalmente a adultos jóvenes, es decir personas en la edad productiva (como se mencionó anteriormente), y más del 95% de las muertes se registran en países en desarrollo (Organizacion Mundial de la Salud, 2013).

En México en el 2011 se registraron 19,445 casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas, de los cuales 15,843 (81.5%) corresponde a tuberculosis pulmonar. Las enfermedades que más frecuentemente se asocian a tuberculosis son, como se mencionó arriba, en orden de importancia son: diabetes mellitus (21.4%), porcentaje que se incrementa en mayores de 40 años, desnutrición (15.6%), alcoholismo (6.8%) y VIH/SIDA (6%) (CENAPRECE, 2012); (Secretaria de Salud, 2009).

Dado que los medicamentos antituberculosos se han estado usando durante décadas su mal uso ha desencadenado la aparición de cepas resistentes, las cuales no son susceptibles a los tratamientos de primera línea. En 2011, entre los casos notificados de tuberculosis pulmonar hubo unos 310 000 casos de tuberculosis multirresistente (Organizacion Mundial de la Salud, 2013).

Otro de los patógenos importantes y extendidos es *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram positiva), representa la causa del 15% de las infecciones nosocomiales (infecciones adquiridas en hospitales por un paciente que fue admitido

por razones diferentes a dicha infección). En su mayoría esta cepa se asocia con neumonía e infecciones de la sangre (septicemia, la tercera causa) y constituye un problema especial en las infecciones de los recién nacidos en el hospital. Ciertas cepas con una virulencia desacostumbrada se han asociado ampliamente a las infecciones nosocomiales. Actualmente *S. aureus* y un grupo de otras cepas de *Staphylococcus* spp., constituyen colectivamente la causa más común de la septicemia adquirida en hospitales y son también importantes agentes de las infecciones en heridas (Madigan, Martinko, & Parker, 2006).

El surgimiento de cepas de bacterias resistentes a los antibióticos hace que sea necesario la búsqueda de nuevos agentes antimicrobiales que traten este tipo de infecciones. Una fuente posible de nuevos productos antimicrobianos pueden ser los metabolitos secundarios derivados de plantas.

2.3 Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son derivados naturalmente y/o subproductos de microorganismos, plantas o animales (Baker, Mocek, & Garr, 2000). En general el término se refiere a metabolitos secundarios, los cuales no son esenciales para el desarrollo, reproducción, sobrevivencia o crecimiento normal del organismo productor (Bart, 2011). Estos productos han sido explotados por los humanos durante miles de años debido a sus usos agrícolas, industriales y medicinales (Strobel & Daisy, 2003).

Las plantas son la fuente principal de estos compuestos usados por sus propiedades medicinales. El ejemplo más importante es la aspirina (ácido acetilsalicílico) que tiene su origen natural en el glucósido salicina encontrado en muchas especies de plantas del género *Salix* y *Populus* (Strobel & Daisy, 2003).

A pesar de su probada utilidad en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos muchas compañías decidieron cerrar sus programas de productos naturales durante la pasada década. Entre las razones principales que se enlistan para realizar esa acción están: la percepción del descubrimiento y desarrollo de productos naturales como un proceso lento, debido al número de ciclo de separación necesarios para conseguir un compuesto puro; el pensamiento de que todos los descubrimientos fáciles ya se han realizado; el hecho de que la síntesis de productos naturales es muy complicada, tienen estructuras muy complejas; Tener suficiente material vegetal

puede ser difícil; y la percepción de que la síntesis combinatoria es una mejor fuente de productos naturales (Beutler, 2009).

Por otra parte también existen fuertes razones que hacen de los productos naturales una buena opción para el descubrimiento de nuevos fármacos. Entre las más importantes se destacan las siguientes: los metabolitos secundarios han evolucionado para ser bioactivos, las estructuras no se limitan a la imaginación del químico y la regla de cinco de Lipinski no se aplica a los productos naturales, las cuales se desarrollaron para conducir a químicos sintéticos hacia sustancias con mejores propiedades biofísicas, los productos naturales se excluyen ya que, como se mencionó antes estos han evolucionado para ser bioactivos (Beutler, 2009).

Tomando en cuenta todo lo mencionado con anterioridad se puede concluir que si bien el estudio de los productos naturales sigue siendo muy atractivo es necesario superar varias de sus desventajas para hacerlo factible. Los más grandes obstáculos a vencer son la elección del material vegetal y la forma de obtener suficiente del mismo para hacer posible su uso.

En cuanto a la elección del material vegetal existen varias hipótesis racionales que gobiernan las estrategias de selección de las plantas. Estas son como siguen, las plantas seleccionadas para su estudio deben de ser (Strobel & Daisy, 2003):

1. Plantas de ambientes únicos, especialmente las que tienen biología única, que poseen nuevas estrategias de sobrevivencia.
2. Plantas que tienen historia etnobotánica que se relacionan con usos específicos o aplicaciones de interés seleccionadas para su estudio.
3. Plantas endémicas, con longevidad inusual, o que han ocupado una cierta tierra antigua.
4. Plantas que crecen en áreas de gran biodiversidad.

Dado que los productos naturales presentan una gran diversidad de estructuras, funciones y biosíntesis no se cuenta con ningún sistema de clasificación rígido. Sin embargo, en la práctica los especialistas del campo generalmente hablan de cinco clases generales, las cuales se enlistan a continuación (McMurry, 2008):

- Terpenos y esteroides: son un amplio grupo de sustancias (se conocen más de 35,000) derivadas biosintéticamente del isopentil difosfato. Los terpenos cuentan con una gran variedad de estructuras aparentemente no relacionadas, mientras que los esteroides cuentan

con un esqueleto tetracíclico de carbonos en común y son terpenos modificados que se sintetizan a partir del triterpeno lanosterol. Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que contienen: el isopreno, que a su vez es sintetizado y liberado por las plantas, cuando está formado por una unidad se denomina hemiterpeno; 2 unidades de isopreno se denomina monoterpenos; sesquiterpenos incorporan 3 unidades; diterpenos comprenden 4 unidades; sesterpenos incluyen 5 unidades; triterpenos incorporan 6 unidades y tetreterpenos 8 unidades (Kennedy y Wightman, 2011). Los terpenos son los productos naturales de plantas más numerosos y diversos estructuralmente. Las estructuras de los terpenos incluyen una o más unidades de isopreno (5-carbonos) el cual es producido por todos los organismos a través de dos posibles vías: el mevalonato y la más recientemente identificada vía de deoxy-d-xilosa (Rohmer, 1999). Otros terpenos de importancia incluyen al camfor, el mentol, las piretrinas (insecticidas), limpiadores, agentes antialérgicos y solventes. La rosina (un diterpeno), el limoneno, la carvona, la neptalactona, la hecogenina (un detergente) y la digitoxigenina entre otros (Croteau, *et al.*, 2000). La importancia radica en el incremento de bacterias resistentes a los antibióticos, lo cual está ocurriendo globalmente a un ritmo alarmante. La adición de terpenos a alimento animal puede llegar a reemplazar la adición tradicional de antibióticos, que a su vez disminuiría la resistencia a antibióticos de bacterias. Los terpenos además han sido incorporados a muchos jabones antibacteriales, cosméticos y productos domésticos (Zwenger y Basu, 2008).

- Alcaloides: son una clase amplia y diversa de compuestos, con más de 12,000 ejemplos conocidos hasta ahora. Estos contienen un grupo amino básico en su estructura y se derivan biosintéticamente de los aminoácidos.
- Substancias derivadas de ácidos grasos y policétidos: se conocen más de 10,000, estos se biosintetizan de precursores como el acetil CoA, el propinoil CoA, y al malonil CoA.

- Polipéptidos no ribosomales y compuestos parecidos a los péptidos: se sintetizan a partir de aminoácidos por un complejo enzimático multifuncional sin la transcripción directa de RNA. Las penicilinas son buenos ejemplos de esta clase de compuestos.
- Cofactores enzimáticos: debido a que no entran en ninguna de las otras categorías de productos naturales estos se clasifican por separado.

La complejidad estructural de los metabolitos secundarios activos hace que su síntesis sintética sea o imposible o económicamente poco viable. Esto causa que la fuente principal de los metabolitos sean las plantas. Lo cual no presenta muchos inconvenientes si la planta seleccionada ya es en sí un cultivar (como sería el caso del frijol negro o el maíz), sin embargo esto raramente sucede. En la mayoría de los casos la planta solo se encuentra en un estado silvestre (Rout, Samantaray, & Das, 2000); (Bart, 2011).

La recolección silvestre de plantas con metabolitos activos ha llevado a que un alto número de plantas medicinales están sobre amenaza de extinción debido a su sobreexplotación (Rout, Samantaray, & Das, 2000). Por lo tanto es necesario buscar alternativas de producción de los metabolitos secundarios que sean a la vez altamente productivos y sustentables como viene siendo la Micropropagación de tejidos vegetales (Dagla, 2012).

2.4 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetal es una técnica que permite cultivar células, tejidos y órganos vegetales en medio sintéticos bajo condiciones asépticas y controladas de luz, temperatura y humedad. La habilidad de crecer células y tejidos vegetales y controlar su desarrollo forma las bases de muchas aplicaciones prácticas para la agricultura, la horticultura y la industria química, además de ser un prerequisite de la ingeniería genética vegetal. Esta técnica ha sido empleada exitosamente con el propósito de producir productos naturales de plantas desde los años 1960 (Dagla, 2012).

El cultivo *in vitro* asegura que se tenga una buena disposición de plantas medicinales usando cantidades mínimas de espacio y tiempo. (Prakash & Van Staden, 2007). Con ella se pueden realizar diferentes tipos de cultivos de tejidos y órganos de plantas como: cultivo de células, cultivo de brotes y cultivo de raíces. El cultivo de células vegetales es una alternativa atractiva al cultivo de la planta completa como fuente de metabolitos secundarios de alto valor. Las células vegetales son totipotenciales, lo que significa que cada célula en cultivo retiene la información genética completa y es por lo tanto capaz de producir todo el rango de compuestos químicos producidos por la planta madre. Las ventajas de esta tecnología por sobre la agricultura convencional son como sigue (Rao & Ravishankar, 2002):

- Es independiente de variaciones estacionales y geográficas así como de los factores ambientales.
- Ofrece un sistema definido de producción, lo que asegura un suministro continuo de los productos, así como una calidad y rendimiento uniforme.
- Es posible producir nuevos compuestos que no se encuentran normalmente en la planta madre.
- Es independiente de interferencias políticas.
- Producción rápida.

Por estas razones el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una alternativa viable para la producción sustentable de metabolitos secundarios útiles para los seres humanos.

2.5 Distribución, Descripción y Clasificación de las Especies Estudiadas

Leucophyllum frutescens (Fig. 1) es un arbusto perteneciente a la familia Scrophulariaceae. Recibe varios nombres comunes de acuerdo a la región geográfica: cenizo, Palo de cenizo, hierba de cenizo, sabio púrpura, salvia de Texas, Texas Ranger y Silverleaf. Se distribuye ampliamente en el norte de México (Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Chihuahua) y el sudoeste de los Estados Unidos. Típicamente es un arbusto compacto que crece de 2-5 pies de alto, aunque ocasionalmente pueden llegar a medir 8 pies de altura y de 4 a 6 pies de ancho (TWC, 2009).



Fig. 1 *Leucophyllum frutescens*

El cenizo es una planta comúnmente empleada por sus cualidades ornamentales debido a que es un arbusto siempreviva con flores atractivas y duraderas. Una calidad ecológica muy importante de esta planta es su resistencia, esta planta es capaz de sobrevivir sequías, heladas, fuertes vientos, salinidad, ataques de herbívoros y fuertes calores. Existen múltiples reportes empíricos sobre el uso de esta planta, recientemente varios grupos de investigadores han trabajado con esta planta para verificar sus propiedades antituberculosas, en el año 2011 se descubrió la presencia de una molécula conocida como leubethanol, un diterpeno, con actividad anti tuberculosis en extractos de raíz del cenizo (Molina-Salinas, et al., 2011). Además otro estudio probó el extracto metanólico crudo de las hojas del cenizo es activo contra la cepa de *Staphylococcus aureus* con una concentración mínima inhibitoria de 25.4 $\mu\text{g/mL}$, en el ensayo de *Artemia salina* el mismo extracto presentó una toxicidad con una DL_{50} 196.37 $\mu\text{g/mL}$ y resultó activo sobre líneas celulares VERO encontrándose una IC_{50} de 58.0 $\mu\text{g/mL}$ (Vega Menchaca, et al., 2013).

En las búsquedas bibliográficas realizadas, no se encontraron referencias del cultivo *in vitro* de *L. frutescens*. Sin embargo si se ha reportado cultivo *in vitro*, de géneros de la familia Scrophulariaceae. Se logró el cultivo *in vitro* de *Castilleja tenuiflora* (hierba del cáncer), demostrando que los factores: tipo de explante, concentración de ácido naftalenacético y tipo de medio influyen en la respuesta morfogenética obtenida (Salcedo-Morales, G. et al., 2009). Por otra parte un trabajo realizado sobre *Scoparia dulcis* L. (otro miembro de la familia de Scrophulariaceae) demostró la importancia de las citoquininas en la formación de brotes y la floración en el cultivo *in vitro* de esa misma planta (Premkumar, Sankaranarayanan, Jeeva, & Rajarathinam, 2011).

Los estudios mencionados arriba demuestran que el cenizo cuenta con las cualidades que hacen a una planta atractiva para cultivar *in vitro* con el propósito de

obtener metabolitos secundarios de importancia. Por lo cual fue seleccionado *Leucophyllum frutescens* para la realización de este proyecto.

2.6 Determinación de grupos funcionales

Existen métodos químicos para la detección de metabolitos secundarios como la prueba del Br_2/CCl_4 o del KMnO_4 para insaturaciones; para grupo carbonilo la prueba de 2-4-dinitrofenilhidracina, para oxidrilos fenólicos se menciona la reacción con FeCl_3 , para esteroides y terpenos la prueba de Liebermann-Burchard y la de Salkowski; para la detección de carbohidratos la prueba de Molish, y la de Dragendorff especialmente usada para la detección de muchas clases de alcaloides (Domínguez, 1973).

2.7 Pruebas biológicas

Una prueba biológica es un método para medir los efectos de una sustancia biológicamente activa usando un modelo de intermediario *in vivo* o tejido o célula *in vitro* bajo condiciones controladas. Para lograr resultados aplicables en los estudios de productos naturales es necesario incorporar a las pruebas biológicas para asegurarse de que los metabolitos aislados tengan actividades biológicas útiles. Existen diferentes tipos de ensayos de actividad biológica, que pueden ser específicos para probar una actividad puntual, como la prueba de halos de inhibición para actividad antimicrobiana, o generales, como la prueba de letalidad de *Artemia salina* para probar la toxicidad de los extractos (McLaughlin, Rogers, & Anderson, 1998).

Dado que los compuestos bioactivos tienden a ser tóxicos a dosis altas se considera que son farmacológicos en dosis más bajas. Por lo tanto estudios de letalidad *in vivo* de un organismo simple puede usarse como un monitor conveniente para la selección, fraccionamiento, descubrimiento y monitoreo de productos naturales bioactivos. En el ensayo de letalidad de *Artemia salina* se utilizan nauplios de 48h eclosionados a partir de huevecillos y extractos crudos o fracciones a diferentes concentraciones (McLaughlin, Rogers, & Anderson, 1998).

El ensayo de difusión en agar proporciona datos tanto cuantitativos como cualitativos de la actividad antibacteriana que presenta un extracto al medir el diámetro de inhibición que este causa (Hafidh, et al., 2011). Por otra parte estudios han demostrado que metanol es el mejor solvente para la extracción consistente de

sustancias antimicrobiales provenientes de plantas medicinales, comparándolo con otros solventes como el agua, etanol o el hexano. (Lin, Opoku, & Geheeb-Keller, 1999)

Los radicales libres son subproductos inevitables de los sistemas biológicos y se sabe que causan varios desordenes degenerativos, como mutagénesis, carcinogénesis, etc. (Singh & Singh, 2008) Los antioxidantes son compuestos que combaten los radicales libres al intervenir en cualquiera de los tres pasos del proceso oxidativo mediado por radicales libres; ya sea iniciación, propagación o terminación (Cui & Murthy, 2004). Estos compuestos antioxidantes también son producidos por los sistemas biológicos y el balance entre los oxidantes y antioxidantes es decisivo en la salud y vigor del individuo (Halliwell, 1997).

El 2,2-difenil-1-picrilhidracil o DPPH se utiliza en el método de secuestro de radicales libres, el cual ofrece una primera medida para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, extracto o cualquier otra sustancia biológica. Este es el método más simple y consiste en mezclar el compuesto o extracto con una solución de DPPH y después de un periodo de tiempo definido se mide la absorbancia de la mezcla (Kedare & Singh, 2011).

Al igual que el método DPPH la técnica que utiliza el 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•+) se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes para secuestrar radicales libres. En este ensayo el ABTS es oxidado por radicales de peróxido u otros oxidantes a su radical catiónico ABTS•+ que es de coloración intensa, la actividad antioxidante se mide como la habilidad de los compuestos a prueba de disminuir el color al reaccionar directamente con el radical ABTS•+. Los resultados se expresan relativos al Trolox (Prior, Wu, & Shaich, 2005).

Los polifenoles son buenos antioxidantes, además de ser efectivos en prevenir enfermedades cardiovasculares e inflamatorias y también son agentes quimioprotectores contra el cáncer (Zhang, *et al.*, 2006). El ensayo de Folin-Ciocalteu se ha empleado por muchos años para medir los fenoles totales en productos naturales. El mecanismo principal de esta técnica es de oxidación/reducción basándose en la reacción colorida entre los fenoles o compuestos aromáticos fácilmente oxidables y el ácido fosfotungsteno-polimolibdico (Prior, Wu, & Shaich, 2005), (Zhang, *et al.*, 2006).

3) JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a períodos de estrés. Algunas células vegetales producen metabolitos secundarios importantes en las interacciones de la planta con el medio ambiente (protección frente a depredadores, patógenos o estrés ambiental) o que están relacionadas con la maquinaria reproductiva de la planta (atracción de insectos para la promoción de la polinización). Muchos de estos productos secundarios tienen uso en la industria farmacéutica y en la producción de test de diagnóstico, de fragancias, de aditivos alimentarios y de biocidas en general. Lo anteriormente mencionado explica el interés de la industria en la producción de compuestos naturales cuya calidad y costos no sea afectada por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción. Es en este contexto que los cultivos de células y tejidos vegetales constituyen una alternativa para producir sustancias cuya producción comercial por los métodos convencionales resulta difícil, escasa o económicamente poco viable.

Leucophyllum frutescens, es una planta medicinal de nuestra región, la cual tiene diversos usos empíricos por las poblaciones rurales, recientemente se corroboró su actividad contra la bacteria de la tuberculosis, problema médico a nivel mundial, se reconoció recientemente, que la actividad antituberculosa es debido a la presencia de terpenos, sin embargo no existen trabajos sobre el cultivo *in vitro* de esta especie, lo que representa una oportunidad para la obtención a gran escala de metabolito, sin el deterioro de la especie y con la ventaja de manejar los parámetros que pueden influir en la producción de metabolitos, que a nivel natural sería difícil de controlar, ya que existen mecanismos a nivel *in vitro* como el empleo de elicitores, que nos permiten modular las biosíntesis.. Por lo tanto el trabajo que se propone planea la implementación de un protocolo de propagación *in vitro* para *Leucophyllum frutescens*, empleando semillas, ya que son los mejores explantes para establecer los cultivos *in vitro*, y así establecer las bases para en un futuro desarrollar un sistema de producción de metabolitos secundarios eficaz, sustentable y sin deterioro del medio ambiente.

4) OBJETIVOS

4.1 Objetivo General: Desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* para *L. frutescens* que permita la extracción eficaz de metabolitos de importancia médica, los cuales ya están reportados en la planta silvestre con actividad bactericida.

4.2 Objetivos Específicos:

- Colecta del material vegetal.
- Obtener los explantes.
- Establecer los protocolos de desinfección para lograr su establecimiento aséptico *in vitro*, y los medios para germinación de semillas y desarrollo de hoja.
- Seleccionar el medio y reguladores de crecimiento para el cultivo *in vitro* de *L. frutescens*, para el desarrollo de plántula, callos y brotes.
- Obtener los extractos de los tejidos regenerados y los colectados *in vivo*.
- Determinar el perfil fitoquímico de los extractos obtenidos mediante pruebas de tamizaje.
- Probar la actividad biológica de los extractos con pruebas de toxicidad contra *Artemia salina*, actividad antioxidante y actividad bactericida
- Comparar el perfil de metabolitos secundarios de la planta silvestre con el de los tejidos regenerados por medio de métodos cromatográficos.

5) HIPÓTESIS

Leucophyllum frutescens, bajo un sistema de cultivo *in vitro*, produce los terpenos de importancia para el área de la salud ya reportados en la planta silvestre.

6) MATERIAL Y METODOLOGÍA

6.1 Colecta de material vegetal y obtención de explantes

Se seleccionaron dos zonas de colecta, una en el Municipio de Apodaca donde está localizado el Campo de Golf “Las Cruces” en agosto del 2012. De ahí se colectaron los frutos maduros directamente de la planta, durante la temporada de floración (primavera otoño), estos se trasladaron al laboratorio en bolsas de celofán y en seguida se obtuvieron las semillas, las cuales se almacenaron en viales.

La otra zona fue en la carretera a Laredo en el municipio de Sabinas Hidalgo Nuevo León en el kilómetro 9 (3 de Agosto del 2013). Ahí se recolectaron 5 plantas completas, incluyendo frutos y semillas, de entre 20cm y 1m de altura de El material recolectado fue separado de acuerdo al tipo de explante (hojas, tallos, raíz y frutos).

Otro parámetro de comparación fue el comprar las hojas secas del cenizo comercializada por la Tienda Comercial Pacalli.

6.2 Selección y elaboración de medios de cultivo

El medio que se seleccionó para la inducción del cultivo *in vitro* fue el Murashige y Skoog 1962, (MS, 1962) (tabla 1), al cual se le hicieron diferentes modificaciones (tabla 2) para lograr la respuesta morfogénica deseada.

Tabla 1. Sales básicas y compuestos orgánicos del medio MS (1962) en mg/L		
MACROELEMENTOS		
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650
NO ₃	Nitrato de potasio	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio	370
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170
MICROELEMENTOS		
NA ₂ EDTA	EDTA-disódico	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso	27.8
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.2
MnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc	8.6
KI	Yoduro de potasio	0.83
Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	Molibdato de zinc	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto	0.025
COMPUESTOS ORGANICOS		
Mio-inositol		100
Tiamina		4
Acido nicotínico		1
Piridoxina		1
Ácido Ascórbico		50
Polivinilpirrolidona		150
Reguladores de crecimiento		De acuerdo con tabla 2

Tabla 2. Medios de cultivo y combinación de reguladores			
Nombre Medio	Reguladores	Agente Solidificante	Antioxidantes
M1	N/A	Agar 7g/L	N/A
M2	4 mg/L ANA	Agar 7g/L	N/A
M3	8 mg/L ANA	Agar 7g/L	N/A
M4	0.1 mg/L AIB 0.25 mg/L BAP	Agar 7g/L	N/A
M5	4 mg/L ANA	Agar 7g/L	50 mg/L Ac. Ascórbico 150 mg/L PVP
M6	0.5 mg/L K 1 mg/L BAP	Agar 7g/L	50 mg/L Ac. Ascórbico 150 mg/L PVP
M7	1 mg/L BAP 1 mg/L AIB 0.5 mg/L K 0.5 mg/L GA3 0.5 mg/L AIA	Agar 7g/L	N/A
M8	2 mg/L 2,4 D	Phytigel 2 g/L	N/A
M9	0.5 mg/L BAP 0.5 mg/L ANA	Agar 7g/L	N/A
M10	0.5 mg/L IBA 1 mg/L BAP	Phytigel 2 g/L	N/A
M11	2.5 mg/L BAP 5 mg/L ANA	Agar 7g/L	N/A
M12	2 mg/L BAP 1 mg/L K	Agar 7g/L	N/A
M13	3 mg/L K 0.2 mg/L AIA	Agar 7g/L	50 mg/L Ac. Ascórbico 150 mg/L PVP

6.2.1 Germinación *in vitro*

Para la inducción de la germinación *in vitro* se probaron cuatro medios: M1, M4, M6 y M12.

6.2.2 Subcultivo de plántulas

Para el mantenimiento de las plántulas fueron probados los siguientes medios M1, M4, M6 y M13.

6.2.3 Inducción de Callo

Para la inducción de callogénesis se probaron los medios M2, M3, M7, M8, M9, M10 y M11.

6.3 Establecimiento del cultivo aséptico

Para establecer el cultivo *in vitro* se emplearon semillas y hojas.

Las semillas fueron sometidas a un proceso de desinfección siguiendo el procedimiento siguiente:

1. Lavado en agua corriente con tween 20
2. Inmersión en solución de Cloralex 15% por 15min más 0.1 mL de Tween 20 con agitación.
3. Lavado en agua estéril

Por otra parte las hojas se sometieron al siguiente proceso de desinfección:

1. Remoción de tricomas con bisturí
2. Lavado en agua corriente con tween 20
3. Inmersión rápida (10 seg) en etanol
4. Inmersión en solución cloro 10% por 10min
5. Lavado en agua estéril

6.4 Siembra

Todos los frascos se incubaron en el cuarto de cultivo con temperatura controlada de 22 ± 1 °C y un fotoperíodo de 16 h utilizando lámparas de luz fluorescente a 1239 lux.

6.4.1 Semillas

Se colocaron un mínimo de 10 semillas por frascos, y 10 frascos por tratamiento. Se llevó a cabo un registro diario de la germinación para cada frasco y tratamiento.

6.4.2 Hojas

Las hojas fueron seccionadas a la mitad y se les retiró las partes dañadas u oxidadas. Se colocó una mitad por frasco, y teniendo 10 repeticiones por tratamiento. Se tomó nota de que porción se sembraba si era apical o basal y se hicieron observaciones cada tercer día.

6.4.3 Subcultivo de plántulas

Las plántulas de dos meses de edad fueron subcultivadas: 1) para mantenimiento en medio M1, 2) para brotación en medio M4, M6 y M13. Los subcultivos se realizaron cada mes.

6.4.4 Inducción de callo

Solo se emplearon explantes obtenidos *in vitro* para la inducción de callo. Las plántulas fueron removidas del medio y se cuidó de eliminar todo resto del mismo así como partes oxidadas o dañadas, después se separaron hojas, tallos y raíces y se colocaron por separado en frascos con medio de cultivo para la inducción de callo, estos fueron: M2, M3 o M5. Se realizó el monitoreo cada semana.

6.5 Obtención de extractos

6.5.1 *In vivo*

El material recolectado se separó en hojas, tallo y raíz. Cada una de las partes fueron cortadas al menor tamaño posible, enseguida el material fue pesado y colocado dentro de matraces Erlenmeyer, a los que se les adicionó suficiente metanol como solvente para cubrir el material vegetal. Los matraces se cerraron y colocaron en reposo a temperatura ambiente por 7 días. Después de este tiempo el extracto se filtró y colocó en vasos de precipitado cubiertos con toallas de papel para permitir su evaporación. Se repitió varias veces la extracción hasta que el solvente no presentó color. Al terminar la evaporación el extracto se raspó, se pesó, para obtener el rendimiento y se coloca en un vial en refrigeración hasta su posterior uso.

6.5.2 *In vitro*

El material producido *in vitro* se procesó, primero retirando todos los restos de medio y tejido no desdiferenciado. El material se pesó y se molió con un poco de solvente, una vez macerado se pasó a matraces Erlenmeyer y se le agregó suficiente metanol como solvente para cubrirlo. Los matraces se sellaron y colocaron en reposo

a temperatura ambiente por 7 días. Después de este tiempo el extracto se filtró y colocó en vasos de precipitado cubiertos con toallas de papel para permitir su evaporación. Este paso se repitió hasta que el solvente no presente color. Al terminar la evaporación el extracto se raspó, se pesó, para obtener el rendimiento y se colocó en un vial en refrigeración.

6.6 Pruebas de identificación de grupos funcionales

Se llevaron a cabo para a todos los extractos, las pruebas preliminares de identificación de grupos funcionales (Domínguez 1973).

Prueba del (KMnO₄).

Se prepara una solución de KMnO₄ al 2% en agua. Se aplica una gota a uno de los pozos de la placa y se pone una gota de la solución del extracto. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café, resultado de la formación de dióxido de manganeso.

Prueba del FeCl₃.

Se coloca una gota de la solución del extracto, después se añaden unas gotas de FeCl₃ al 12.5 % en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo.

Prueba de Liebermann-Burchard.

Determina triterpenos y compuestos esteroidales. Se coloca una gota del extracto sobre uno de los doce pozos de la placa de porcelana, se deja evaporar el solvente y se le agrega una gota de cloroformo y una gota del reactivo (1 gota de ácido sulfúrico se agrega a una mezcla de 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo a 0 °C), si hay formación de colores azul, verde, rojo y anaranjado, los que cambian con el tiempo, la prueba será positiva.

Prueba de Salkowski.

Determina esteroides y metilesteroides, parecida a la anterior, la solución del extracto se pone en contacto con una gota de cloroformo y una de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.

Prueba de Molish.

Para determinar carbohidratos. En un tubo de ensayo se colocan 1-2 mL de la muestra se le agrega gota a gota (3 gotas) el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1% en 100 mL de etanol), luego 2 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.

Prueba del NaOH.

Se usa para determinar cumarinas y lactonas Se disuelve 1-2 mL de muestra en NaOH al 10%, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.

Prueba de Baljet.

Para determinar sesquiterpenlactonas. A 2-3 mL. del compuesto se le agregan 3-4 gotas de la solución mezcla (solución A que contiene: ácido pícrico al 1 % en etanol y una B: NaOH al 10 %.), siendo positiva si se torna de color naranja a roja oscura.

Prueba del H₂SO₄

Para flavonoides. Un mL de la muestra, se disuelve en H₂SO₄ y se observa coloración amarilla para flavonoles, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas.

Prueba de Shinoda.

Identifica compuestos tipo flavonoide. A un mL de la muestra se le agregan limaduras de magnesio, se calienta a 60°C, se le agrega unas gotas de HCl por las paredes. Es positiva con la aparición de colores naranja, rojo, rosa, azul o violeta.

Prueba de Dragendorff

Para alcaloides Modificación de Munier y Machelobuf. Se harán 2 soluciones. Solución A se disuelven en 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Solución B se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. El reactivo es estable por un año y la prueba es positiva para alcaloides si se obtiene una coloración, rojo o naranja,

persistentes por 24 h.

Prueba de Saponinas

Se colocaron 2 mL de la muestra en un tubo de ensaye de 13 x 150 se le agrega bicarbonato de sodio, se agita y la aparición de espuma es positivo para la presencia de saponinas.

6.7 Pruebas biológicas

6.7.1 Actividad antibacteriana

6.7.1.1 Tinción Gram

Se colocó una azada de colonia de bacteria en el portaobjetos y se fijó con calor. Enseguida este se cubrió con cristal violeta y se dejó reposar 20seg para después lavarlo con agua bidestilada por 2seg. Luego este se cubrió nuevamente con Lugol por 30seg y se lavó con etanol 95%(v/v) aproximadamente por 20seg hasta que este saliera sin color. Se siguió con un lavado con agua por 2seg y Safranina de 20seg y un lavado final con agua por 2seg. Se retiró el exceso de agua con papel y se dejó secar al aire. Finalmente las muestras fueron observadas en el microscopio.

6.7.1.2 Cinética de crecimiento bacteriano

Se colocó una azada de una colonia de bacterias en tubos de ensaye con 5mL de medio Infusión Cerebro Corazón (ICC) e incubó a 37.5°C por 24h. Después se tomaron 100µL de cultivo para inocular otro tubo de 5ml de medio ICC, el cual se incubó a 37.5°C por 24h. Luego de transcurrido ese tiempo se inocularon tres tubos con 100µL del cultivo de 24h, a estos se les midió la absorbancia a 635nm, la cual se contó como T0, y se incubaron a 37.5°C midiendo la absorbancia cada media hora por 24h. El blanco fue un tubo con 5ml de medio ICC estéril. Los resultados se muestran como el promedio de las absorbancias de los tres tubos a los diferentes tiempos.

6.7.1.3 Ensayo de difusión en agar

Se colocó una azada de una colonia en un tubo con 5ml de ICC e incubó a 37.5°C de 15 a 18h, hasta alcanzar la fase exponencial. Enseguida se ajusta la turbidez a 1.5×10^8 UFC/mL de la escala de McFarland. Se prepararon las cajas Petri

con agar ICC. Las cajas Petri fueron inoculadas con el cultivo estandarizado utilizando un hisopo estéril para realizar el estriado. Los discos de papel filtro estériles se prepararon colocando 20µl de la solución de extracto (100mg extracto en 1ml de metanol) sobre ellos permitiendo la evaporación del solvente antes de colocarlos sobre las cajas Petri inoculadas. Finalmente se incubaron las cajas a 37.5°C y se midieron los halos de inhibición a las 12 y 24h. Se utilizó metanol como control negativo y gentamicina (10mg/mL) como control positivo.

6.7.2 Actividad Antioxidante

6.7.2.1 Técnica de secuestro de radicales libres (DPPH)

La técnica se realizó en microplaca de 96 pozos utilizando como reactivo al 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Primero se realizó un curva de calibración con Vitamina C a concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 y 7.81 µg/mL. Los extractos se disolvieron en metanol al 80% (v/v). Estos se probaron a las mismas concentraciones utilizadas en la vitamina C. Todas las concentraciones se probaron por triplicado. Se usó Metanol al 80% (v/v) como control negativo. Se midió la absorbancia a 517nm. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico Probit para obtener las EC₅₀ de los extractos y controles.

6.7.2.2 Técnica de descolonización del radical catiónico ABTS

El radical catiónico ABTS se preparó mezclando soluciones de ABTS y Persulfato de Potasio (1:1 v/v) con concentraciones finales de 7mM y 2.45mM respectivamente. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente de 12 a 16h y fue estable por dos días después de elaborada. El radical ABTS se diluyó utilizando etanol al 70% (v/v) hasta obtener una absorbancia a 734nm de 0.7(±.02). Se corrió una curva estándar de Trolox utilizando diluciones seriadas partiendo de un stock con concentración de 2.5mM. Se colocaron 20µL de la solución stock de los extractos por triplicado en los pozos de una placa de 96, a continuación se agregaron 180µL del radical ABTS diluido en cada pozo. Se midió la absorbancia a 734nm luego de 1min y antes de 6min. A partir de la curva de trolox se comparan los resultados y estos se expresan como equivalentes de trolox.

6.7.2.3 Técnica de Fenoles Totales Folin-Ciocalteu

Se emplearon placas de 96 pozos para la realización del ensayo, utilizando como estándar al Ácido Gálico. La curva de este se hizo con disoluciones seriadas partiendo de una concentración de 1mg/mL. Los extractos se disolvieron en etanol al 80% 1mg/mL (v/v). Se colocaron 20µL de los stock de extractos por pozo por triplicado, seguido de 100µl del reactivo F-C 1N, después de transcurridos 5min se agregaron 80µL de solución de Carbonato de Sodio 7.5% y se homogenizó. Se dejó incubar a temperatura ambiente en obscuridad por 2h después de las cuales se midió la absorbancia a 750nm. A partir de la curva de Ac. Gálico se compararon los resultados y se expresan como equivalentes de Ac. Gálico.

6.7.3 Bioensayo de letalidad de *A. salina*

Se preparó agua de mar artificial para incubar los huevecillos de *Artemia*. Para cada extracto de las plantas se prepararon diluciones de 1000, 500, 250 y 100 mg/L, cada concentración se corrió por triplicado. Después de 48 h cuando las larvas de *Artemia* crecen aproximadamente 3mm, se tomaron de 10 a 20 larvas con una micropipeta y se depositaron en los pozos de la microplaca, se les añadieron las diluciones de los extractos, como control positivo se empleó dicromato de potasio y como negativo agua de mar. Al cabo de otras 24 h de incubación se contaron los nauplios y se registró el número de muertes. Los datos obtenidos se analizaron por el programa computacional Probit para determinar la DL₅₀. (McLaughlin, Rogers, & Anderson, 1998).

6.8 Cromatografía de Capa Fina

Se realizó la mezcla de solventes (Benceno:Acetona 9:1 ó Cloroformo:Metanol 9:1 según sea el caso) y esta se colocó en la cámara cromatográfica para cubrir menos de 0.5cm del fondo de la cámara, esta se tapó y se mezclaron los solventes con suavidad, para luego dejar reposar la cámara. Las placas se cortaron de 10cm de alto y variaron los anchos dependiendo del número de muestras a correr. Se midieron 2cm desde el fondo de la placa y se marcó con lápiz el origen. Los extractos a probar se disolvieron en metanol dejando una proporción aproximada de 1mg de extracto por 1ml de solvente, estos se colocaron en las placas usando microcapilares. La placa ya preparada se colocó en la cámara, la cual se cubrió y dejó reposar. Se permitió el corrimiento del solvente a través de la placa

hasta una distancia aproximada de 1cm del extremo de la misma. Las placas se revelaron utilizando luz UV y/o cloruro de cobalto. Las bandas de compuestos fueron marcadas en la placa utilizando un lápiz.

7) RESULTADOS

7.1 Colecta de material vegetal y obtención de explantes

Se realizaron dos colectas de material, la primera fue en el fraccionamiento las Cruces, Apodaca N.L. (agosto 2012) consistió de ramas hojas y frutos (Fig. 2), las hojas se separaron de los tallos (las hojas se emplearon para obtener extractos y cultivo *in vitro*, mientras que los tallos solo para extracción), y de los frutos se extrajeron las semillas, para cultivo *in vitro*.



Fig. 2. Tallos, hojas y frutos de *Leucophyllum frutescens* recolectados en el mes de Agosto del 2012 en el municipio de Apodaca Nuevo León.

La segunda colecta fue en agosto del 2013 en el municipio de Sabinas Hidalgo, N.L., (Fig 3) las plantas se colectaron completas, observando que fueran sanas, el tamaño aproximado fue de 1 m de altura, se separaron las hojas, tallos, raíces (para la preparación de los extractos) y frutos (para el establecimiento del cultivo *in vitro*).



Fig. 3. Plantas de *Leucophyllum frutescens* recolectados en el mes de Agosto del 2013 en el municipio de Sabinas Hidalgo Nuevo León.

Los frutos eran cápsulas de color café, dehiscentes, de aproximadamente 5mm de largo (Fig. 4 A), las semillas eran de color café-amarillento, aplanadas y de forma ovalada de aproximadamente 1mm de largo (Fig. 4 B).

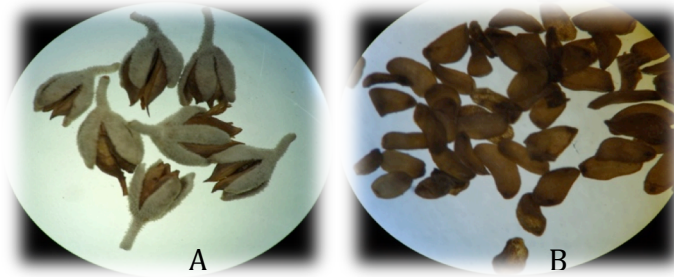


Fig. 4. Frutos (A) y semillas (B) de *Leucophyllum frutescens* vistas a través de un estereoscopio 10X.

7.2 Procedimiento de desinfección

Mediante el proceso de desinfección empleado, las semillas se decoloraban, sin embargo esto no afectó su viabilidad y el procedimiento fue exitoso ya que se tuvo un 100% de asepsia y se logró que germinaran.



Fig. 5. Hojas de *L. frutescens*, donde se observa el daño al remover los tricomas

Por otra parte la desinfección de las hojas no tuvo éxito, diversos factores influyeron en esto, el primero es la presencia de numerosos tricomas que recubren la epidermis foliar, y que resulta imposible removerlos todos, sin maltratar el tejido foliar (Fig. 5), al lesionar el tejido, existe una alta probabilidad de oxidación. Sin embargo la siembra se realizó pero el resultado obtenido fue de un 100% de contaminación por hongos filamentosos (Fig. 6).



Fig. 6. Cultivo *in vitro* de hojas de *L. frutescens* donde se observa la contaminación por hongos

7.3 Cultivo *in vitro*

7.3.1 Germinación

7.3.1.1 Medio MS sin reguladores (M1), (Colecta Apodaca)

Las semillas sembradas en medio MS sin la adición de reguladores presentaron un 39% de germinación. La germinación inició luego de cinco días de realizada la siembra con la aparición de las hojas cotiledonares (Fig. 7). Se obtuvo la mitad de la germinación al día 6 y la germinación máxima se presentó a los 13 días. Las plántulas obtenidas eran pequeñas, de tallo corto, raíz larga y con hojas abundantes a los tres meses de edad (Figura 8).

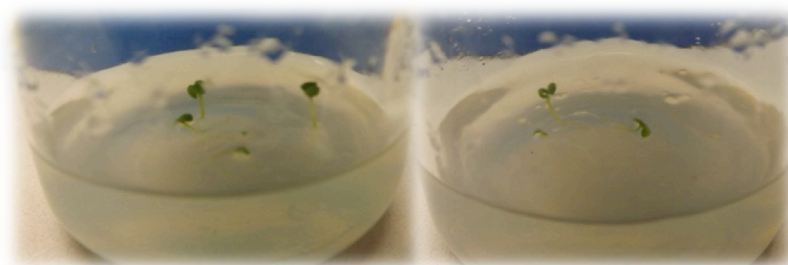


Fig. 7. Inicio de germinación de *L. frutescens* en medio MS sin reguladores.



Fig. 8. Plántulas de *L. frutescens* en medio MS sin reguladores. Tres meses de edad.

7.3.1.2 Semillas sembradas en medio M4 semillas (Colecta Apodaca)

Las semillas sembradas en medio MS adicionado con 0.1 mg/L AIB y 0.25 mg/L BAP presentaron un 31% de germinación. La germinación inició luego de 7 días de realizada la siembra con la aparición de las hojas cotiledonares (Fig. 9).

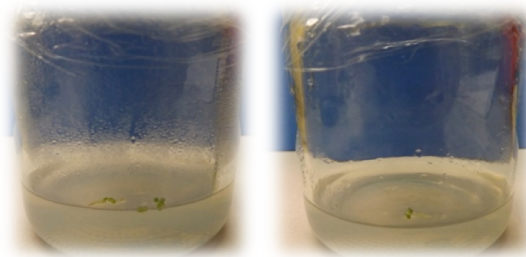


Fig. 9. Inicio de germinación de *L. frutescens* en medio M3.

Las plántulas obtenidas en el medio M4 son pequeñas, de tallo corto, con múltiples hojas, ninguna desarrolló raíz, en su lugar los tallos terminan en una raíz de color café que en algunas ocasiones se eleva al aire. (Figura 10).

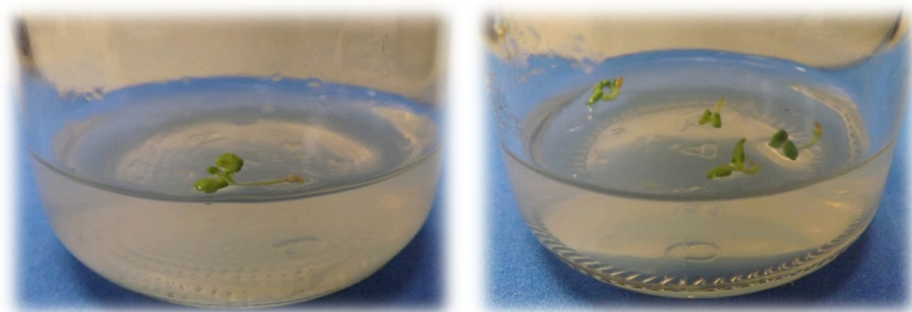


Fig. 10. Plántulas de *L. frutescens* en medio M4. Se puede ver la ausencia de raíz.

A partir del día 22, las plántulas en el medio M4, empezaron a desarrollar callo en la parte inferior al tallo y continuaron formando brotes en la parte superior (Fig. 11). El 70 % de las plántulas germinadas en este medio formaron callo.

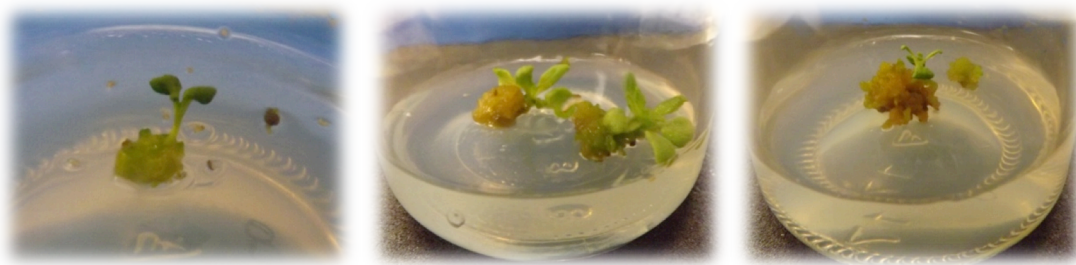


Fig. 11. Plántulas de *L. frutescens* en medio M4. Se puede ver la formación de callo y el crecimiento de brotes a partir de este.

7.3.1.3 Germinación en medio M6 (Colecta Apodaca)

Las semillas provenientes de Apodaca presentaron un 50.83% de germinación en el medio M6. La germinación inició luego de 5 días de realizada la siembra y terminó en el día 20, teniendo como germinación media al día 6. La figura 12 muestra las plántulas luego de quince días de siembra, se pueden notar las hojas cotiledonares de tamaño grande y ausencia de raíz.

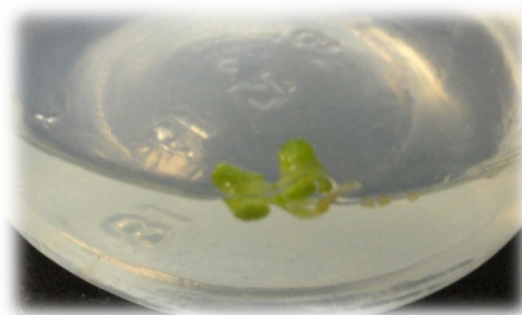


Fig. 12. Plántulas de *L. frutescens* en medio M6. Se puede ver las hojas grandes y ausencia de raíz.

7.3.1.4 Germinación en medio M1 (Colecta Sabinas Hidalgo)

Las semillas recolectadas en Sabinas Hidalgo N.L. sembradas en medio MS sin la adición de reguladores presentaron un 22% de germinación. Los primeros indicios de germinación, con la aparición de las hojas cotiledonares, se dieron luego de cinco días de realizada la siembra (Fig. 13). Al sexto día de sembradas, la mitad de las semillas habían germinado y la germinación máxima al día 21. Las plántulas obtenidas presentan la misma morfología que las plántulas germinadas a partir de semillas recolectadas en Apodaca N.L. (Figura 14).

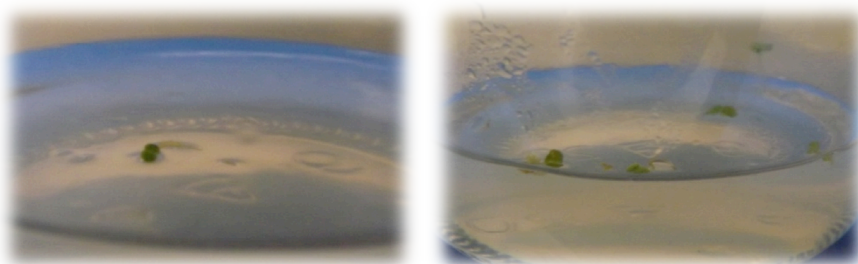


Fig. 13. Inicio de germinación de semillas de *L. frutescens* recolectadas en Sabinas Hidalgo N.L. en medio MS sin reguladores.

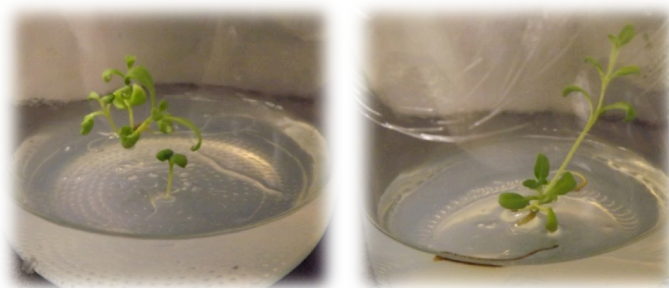


Fig. 14 Plántulas germinadas de semillas de *L. frutescens* recolectadas en Sabinas Hidalgo N.L. en medio MS sin reguladores.

7.3.1.5 Germinación en medio M4 (Colecta Sabinas Hidalgo)

En el medio M4 las semillas de la colecta de Sabinas Hidalgo presentaron un 27% de germinación. La germinación inició a los 5 después de la siembra, alcanzando la máxima el día 20 y la media al día 7. A los quince días de la siembra las plántulas mostraban hojas verdes, tallo corto y raíz corta y café (ver figura 15).

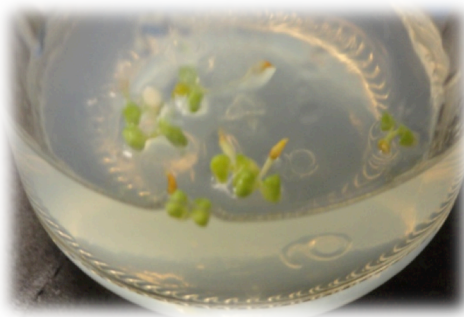


Fig. 15. Plántulas de *L. frutescens* en medio M4. Se puede ver la raíz corta y café.

7.3.1.6 Germinación en medio M6 (Colecta Sabinas Hidalgo)

Las semillas sembradas en medio M6, presentaron un 21% de germinación. La germinación inició luego de 5 días de realizada la siembra, de igual manera que las germinadas en medio sin la adición de reguladores. En la Figura 16 se puede observar los inicios de la germinación y como las plántulas a pesar de tener la misma edad que las germinadas en MS sin reguladores presentan mayor tamaño que estas. La figura 17 muestra como las plántulas en su segunda semana de crecimiento (después del día 10 de realizada la siembra) tienen unas hojas cotiledónares muy grandes, tallo corto y grueso, además de no presentar crecimiento de raíz.

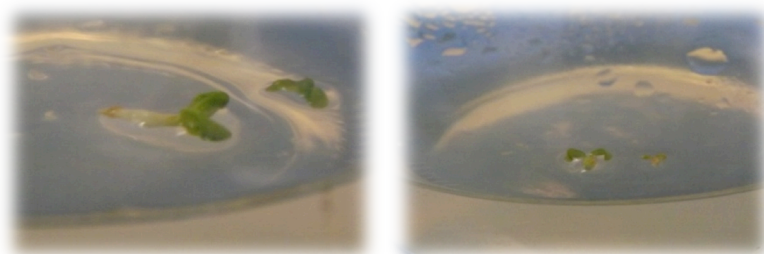


Fig. 16. Inicio de germinación de semillas de *L. frutescens* recolectadas en Sabinas Hidalgo N. L. en medio M6.

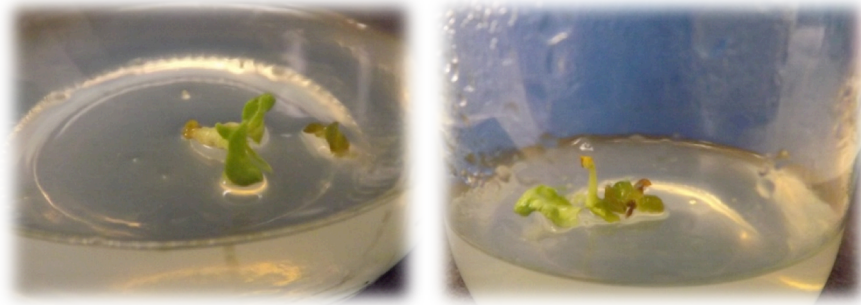


Fig. 17. Plántulas germinadas de semillas de *L. frutescens* recolectadas en Sabinas Hidalgo N.L. en medio M6. Se puede apreciar las hojas grandes y el tallo grueso.

A partir del día 22 de realizada la siembra algunas de las plántulas comenzaron a desarrollar callo verde en la parte del tallo, este comenzó luego a diferenciarse en brotes de hojas, (Fig.18). Al final un 43% de las plántulas germinadas formaron callo.

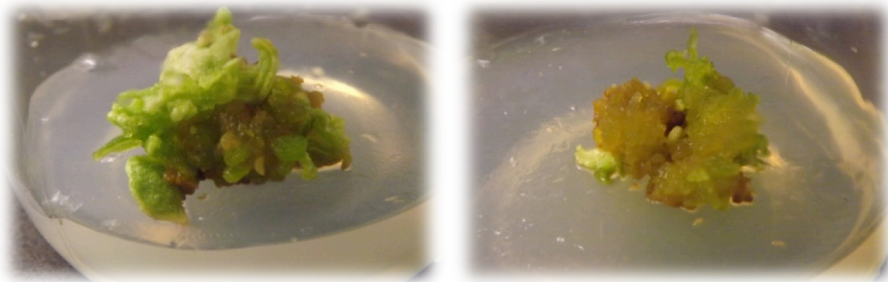
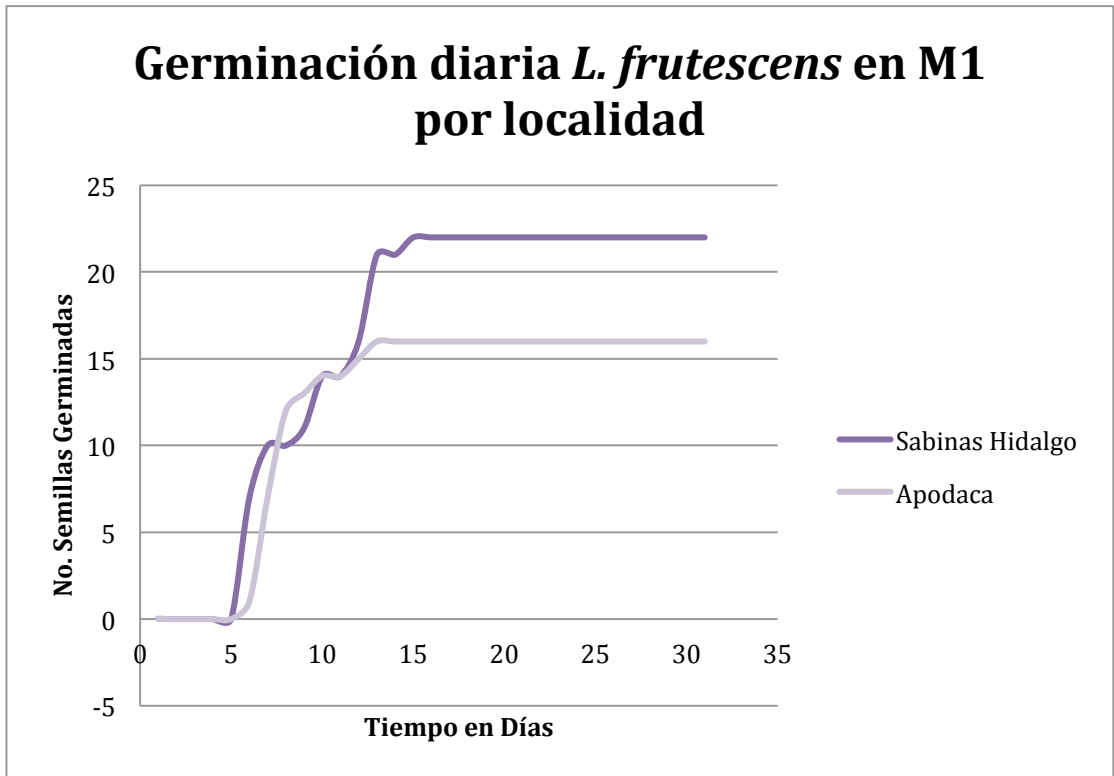


Fig. 18. Plántulas de *L. frutescens* en medio M6. Se puede ver la formación de callo y el crecimiento de hojas a partir de este.

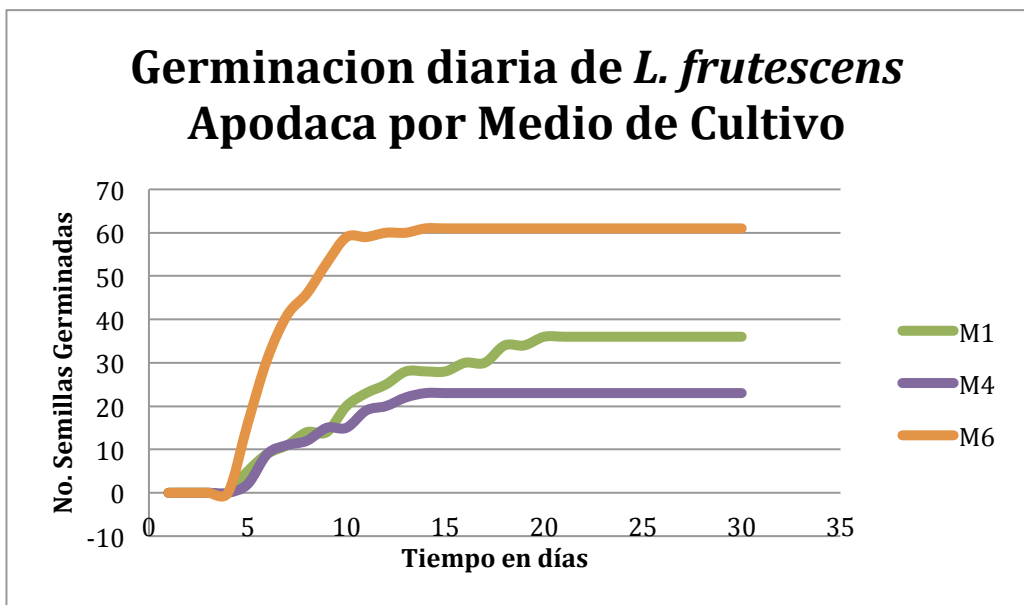
7.3.1.7 Comparación y Análisis estadístico de Germinación.

Para ambas localidades en todos los tratamientos el inició de la germinación fue a los 5 días de realizada la siembra, como se ve en las gráficas 1, 2 y 3. Se considera germinada a la semilla cuando presentan emergencia de la radícula. La germinación media para ambas localidades en T1 se alcanzó al sexto día y la germinación máxima para las semillas de Sabinas Hidalgo fue en el día 15, mientras que para las semillas de Apodaca fue en el día 13 (gráfica 1).



Gráfica 1. Germinación diaria T1 por localidad.

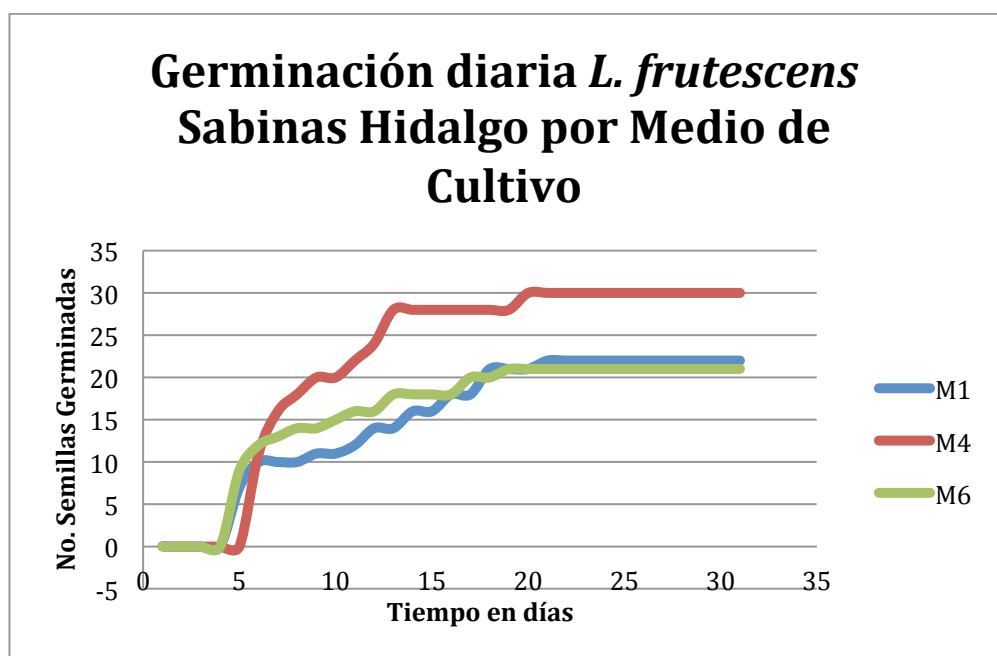
La gráfica 2 muestra como para el T2 las semillas de Apodaca tienen su germinación media en el día 19 y la máxima en el 14. Por otra parte en el T3 se llega a la germinación media en el día 6 y la máxima en el 20.



Gráfica 2. Germinación diaria Apodaca por Tratamiento.

E

En la gráfica 3 se puede ver como para el T2 las semillas de Sabinas Hidalgo tienen su germinación media al día 7 y la máxima al 20. Mientras que para el T3 se llega a la germinación media en el día 10 y la máxima en el 20.



Gráfica 3. Germinación diaria Sabinas Hidalgo por Tratamiento.

La tabla 3 muestra un resumen de los resultados de las pruebas de germinación. Además se calcularon el Índice de Germinación (IG) y la Velocidad de Germinación (M) como se muestra en las fórmulas al termino del párrafo . El IG se define como la medida de tiempo de germinación en relación con la capacidad germinativa, mientras que la M corresponde a la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación (Gozález-Zertuche & Orozco-Segovia, 1996).

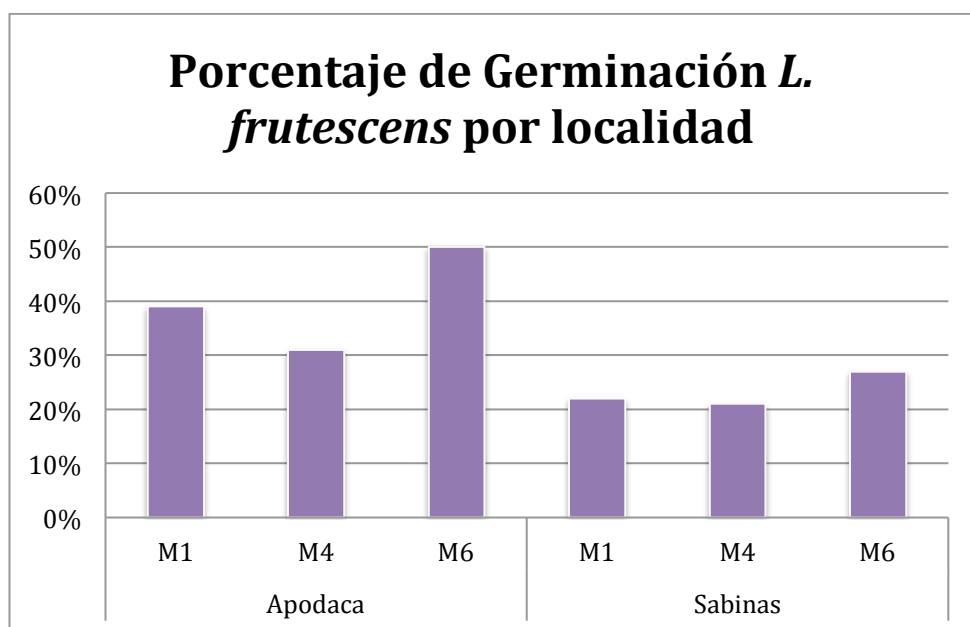
$$IG = \frac{\sum(n_i t_i)}{N}$$

$$M = \sum \frac{n_i}{t}$$

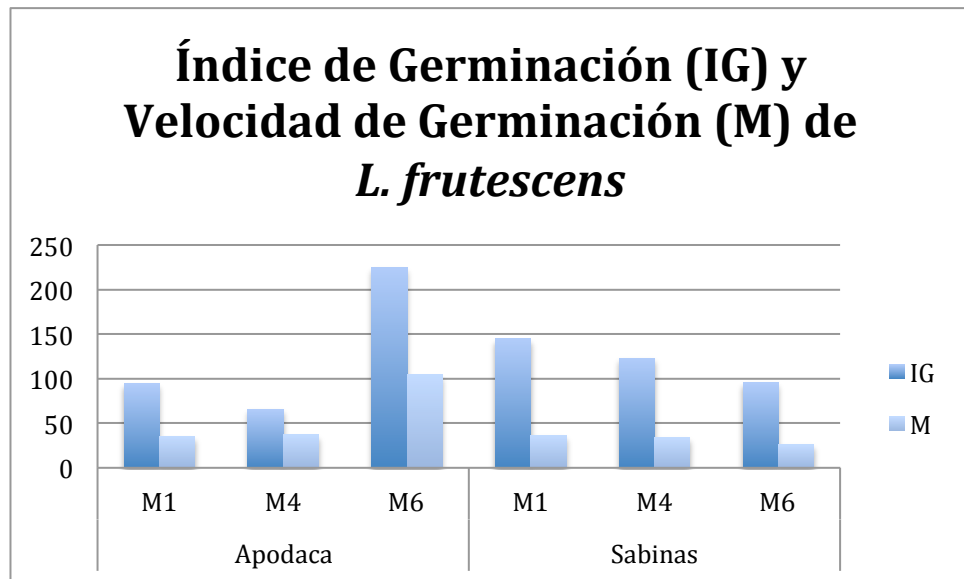
Tabla 3. Resumen resultados de pruebas de germinación							
Localidad	Medio de cultivo	Inicio de Germinación	Germinación máxima	% Germinación	% Calogénesis	IG	M
Apodaca	M1	5d	13	39%	0	94.48	35.57
	M4	5d	14	31%	70%	65.72	36.84
	M6	5d	20	50%	62%	224.59	104.42
Sabinas	M1	5d	15	22%	0	144.71	36.45
Hidalgo	M4	5d	20	21%	70%	123.16	34.35
	M6	5d	20	27%	43%	95.33	26

Donde IG es el índice de germinación, n_i es el número de semillas germinadas en el día i , t_i es el número de días después de la siembra, N es el total de semillas sembradas, M es la velocidad de germinación, t es el tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

Para todos los tratamientos y localidades la germinación se inició al día 5 después de realizada la siembra, mientras que la germinación máxima se logró después de dos semanas entre los días 13 y 20. El mayor porcentaje de germinación lo obtuvo la semilla de Apodaca en el M6, que también presentó el mayor IG y M (ver gráficas 4 y 5).



Gráfica 4. Porcentaje de Germinación



Gráfica 5. Índice de Germinación y Velocidad de Germinación.

Se llevó a cabo un análisis estadístico sobre los datos de germinación total de los tratamientos en el programa SPSS para ver si había diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA tabla 4) concluyeron que si había una diferencia entre los tratamientos, sin embargo no se encontró diferencia entre las dos localidades empleadas. Se concluye que las semillas de Apodaca en M6 es la mejor opción ya que presenta el mayor porcentaje de germinación así como los mayores en el índice y velocidad de germinación.

Tabla 4. ANOVA para datos de germinación diaria.

	Suma de Cuadrados	df	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre Grupos	63.374	5	12.675	3.314	.009
Dentro de Grupos	340.373	89	3.824		
Total	403.747	94			

7.3.2 Brotación *in vitro*

7.3.2 .1 Brotación en medio M6

Algunas de las plántulas germinadas en MS sin reguladores se pasaron a frascos con medio M6. Las plántulas eran pequeñas con pocas hojas, tallo corto y sin raíz (Fig. 19).

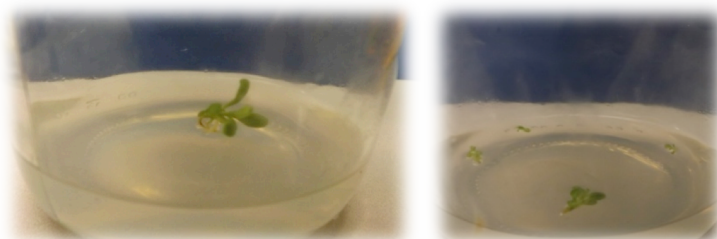


Fig. 19. Plántulas de *L. frutescens* recién puestas en medio M6.

Después de un mes del subcultivo, se logró apreciar cambios morfológicos significativos en el cultivo, las plántulas tenían una apariencia vigorosa, se formaron nuevas hojas, crecieron las ya existentes y se desdiferenció la parte central de la planta para formar tejido calloso de una tonalidad verde. (Fig. 20)

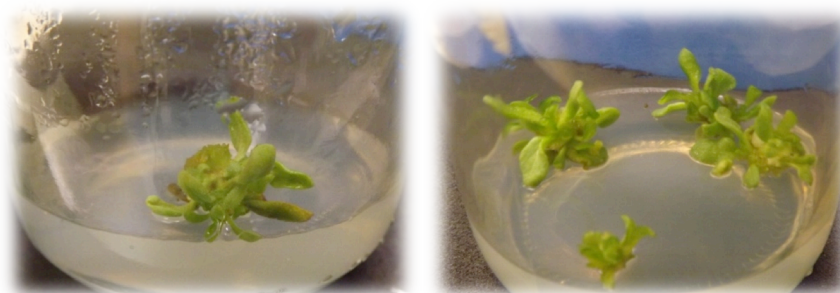


Fig. 20 Plántulas de *L. frutescens* en medio M6. Se pueden ver las hojas verdes y grandes y el callo.

7.3.2.2 Brotación en medio M13

A los tres meses de germinación las plántulas fueron subcultivadas en medio M13. Estas presentaban tallos largos con pocas hojas verdes y raíces largas (Fig. 21).

A la semana de realizado el subcultivo se visualizaron la aparición de tricomas en las hojas y los tallos, así como la aparición de nuevas hojas a partir de las ramas laterales. A las tres semanas del subcultivo las plántulas presentaron tejido calloso en la base (que algunas veces se diferenciaba a brote), así como en la raíz (Fig. 22).

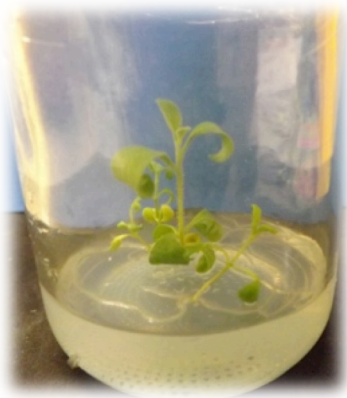


Fig. 21 Plántulas de *L. frutescens* en medio M1.

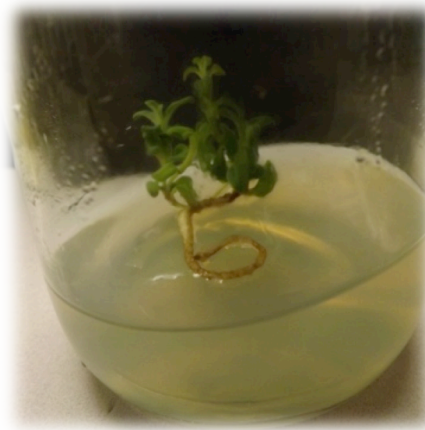


Fig. 22 Plántulas de *L. frutescens* en medio M13. Se puede ver el crecimiento de callo sobre la raíz.

7.3.3 Callogénesis

Se hizo un estudio preliminar para determinar la concentración apropiada de ácido naftalenacético para lograr la inducción de callo utilizando los medios M2 y M3, descritos previamente. Se emplearon explantes de hoja, tallo y raíz cultivados *in vitro*. Los explantes de tallo y hoja se desdiferenciaron completamente a callo, en ambos medios (Fig 23). Sin embargo el medio M2 resulta más conveniente ya que induce la callogénesis en menor tiempo y reduce el riesgo de oxidación de los explantes. Por lo tanto se decidió elegir al medio M2 para la inducción de callo.

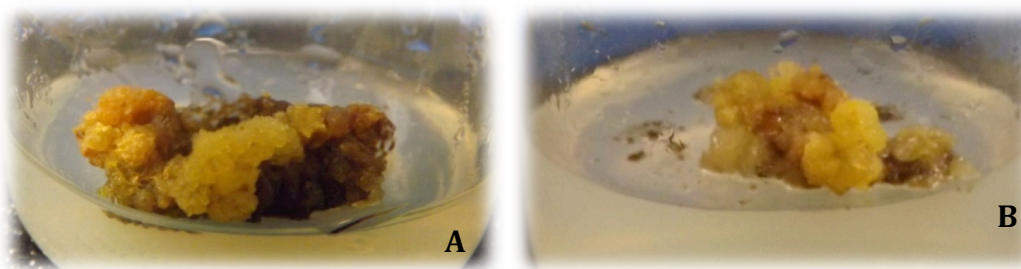


Fig. 23. Callo de *L. frutescens* **A.** Callo de hoja en medio M2. **B.** Callo de tallo en M1.

Los explantes de raíz no generaron respuesta en ninguno de los medios.

Para prevenir la oxidación de los explantes y del callo se decidió añadir ácido ascórbico y polivinilpirrolidona (PVP) al medio M2 creando así el medio M5, en el cual se colocaron los explantes de hoja y tallo.

A los siete días de realizado el subcultivo a este nuevo medio las hojas comenzaron a presentar el proceso de enrulamiento, que es un estado previo a la aparición del callo (Fig. 24 a). Luego de dos semanas las hojas empezaron a producir callo en su superficie (Fig. 24 b). En total se logró un 69% de conversión a callo a partir de las hojas.

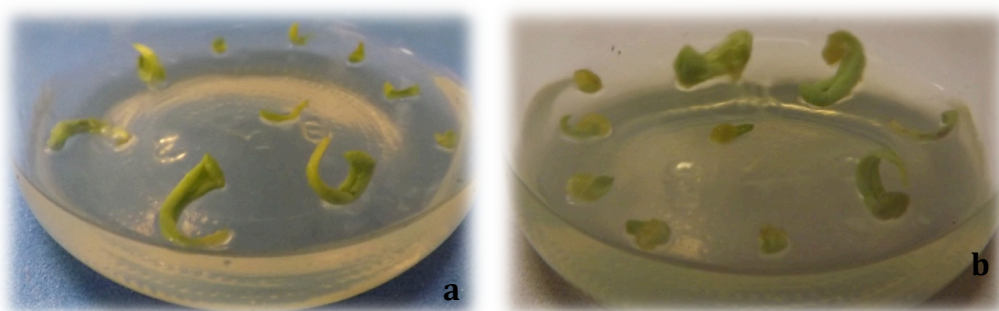


Fig. 24. Hojas de *L. frutescens* en medio M5 **a.** Siete días después de siembra comienza enrulamiento. **b.** Catorce días después de siembra formación de callo.

Por otra parte a la semana de realizado el subcultivo de los tallos al medio adicionado con antioxidantes estos se veían engrosados y con presencia de callo (Fig. 25 a), dos semanas después estos ya estaban cubiertos totalmente de callo (Fig. 25 b). Finalmente el 100% de los tallos se transformaron en callo.

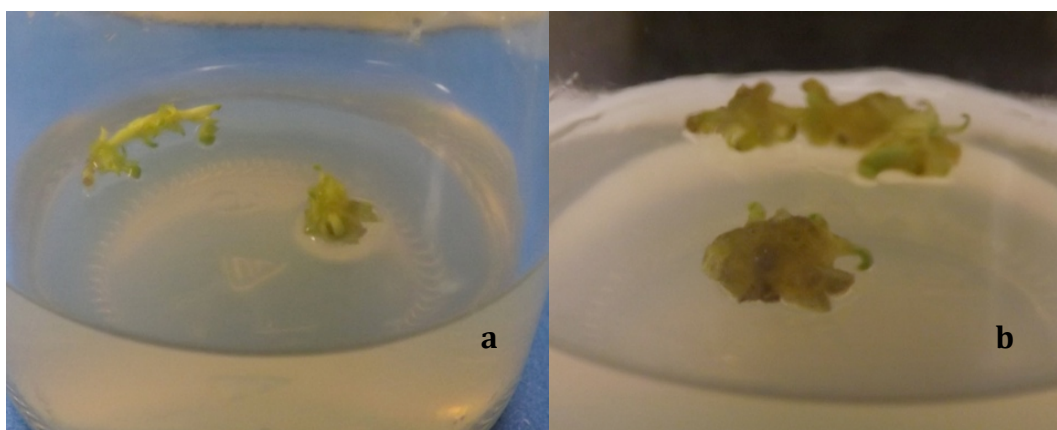


Fig. 25. Tallos de *L. frutescens* en medio M5 **a.** Siete días después de siembra comienza aparición de callo **b.** Catorce días después de la siembra todo el explante se desdiferenció a callo.

7.4 Obtención de extractos

En la tabla 5 se muestra el porcentaje de los rendimientos de los extractos obtenidos del material *in vivo*.

Tabla 5 Rendimientos de extractos material <i>in vivo</i> .	
No. Material Vegetal	%Rendimiento
1. Hojas Sabinas	20.3021
2. Tallo Sabinas	8.1522
3. Raíz Sabinas	11.3057
4. Pacalli	39.583
5. Hojas Apodaca	22.33
6. Tallo Apodaca	8.867

La tabla 6 muestra el porcentaje de los extractos obtenidos del material *in vitro*.

Tabla 6 Rendimientos de extractos material <i>in vitro</i> .	
No. Material Vegetal	%Rendimiento
7. Callo-Hoja	3.25
8. Callo-Tallo	3.573
9. Callo M4	2.81
10. Callo M6	2.201
11. Plántula Apodaca	8.4539
12. Plántula Sabinas	6.4432

7.5 Pruebas de identificación de grupos funcionales

Los resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico se muestran en la tabla 7. Para la mayoría de los extractos los resultados de los extractos de tejidos silvestres coinciden con los de los extractos *in vitro*. Exceptuando las pruebas de taninos que resulto positiva solo *in vitro*, sesquiterpenlactonas solo para callo, flavonoides y saponinas presente solo en los extractos silvestres. Ninguno de los extractos fue positivo para las pruebas de alcaloides.

Es relevante destacar que todos los extractos cuentan con presencia de esteroides. El cual es un grupo funcional notable, ya que a este pertenecen los terpenos de importancia reportados en la planta *in vivo*. También destaca la presencia de flavonoides en los extractos pues estos suelen presentar buena actividad antimicrobiana y anticancerígena.

Tabla 7. Resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico.

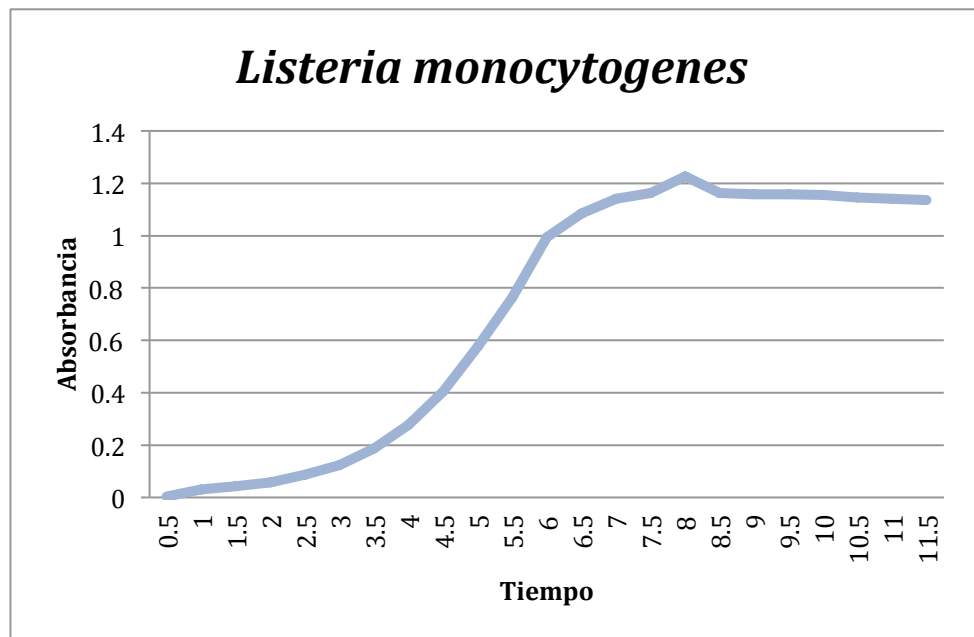
Pruebas Químicas	Determinación de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
KMnO ₄	Insaturaciones	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
2,4-Dinitro fenil hidracilo	Grupo Carbonilo	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
FeCl ₃	Taninos	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Liebermann-Burchard	Esteroides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salkowski	Esteroides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Molish	Carbohidratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Cumarinas		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactonas		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Baljet	Sesquiterpenlactonas	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Ac. Sulfúrico	Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Shinoda	Flavonoides	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianinas	Flavonoides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dragendorff	Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agitación	Saponinas	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Bicarbonato de Na	Saponinas	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Salkowski	Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ac. Sulfúrico-Formol	Aromaticidad	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-

7.6 Pruebas biológicas

7.6.1 Actividad antimicrobiana

7.6.1.1 *Listeria monocytogenes*

La gráfica 6 muestra la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. La fase exponencial comienza a las 2.5 horas después de haber sido inoculados los tubos y concluye a las 7.5 horas, teniendo como duración 5h.



Gráfica 6. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*

Tanto el extracto de raíz del cenizo (figura 26), como el de callo producido en M6 y pasado a M2 presentaron actividad contra *L. monocytogenes* como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Halos de inhibición de extractos de <i>L. frutescens</i> contra <i>L. monocytogenes</i>	
Extracto	Halo en mm
3. Raíz Cenizo Sabinas	9.25mm
10. Callo M6 pasado a M2	8.5mm
Metanol	0
Gentamicina	29.25mm

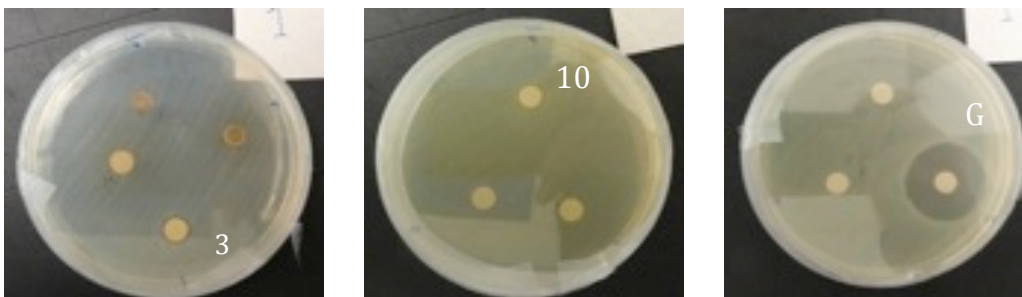
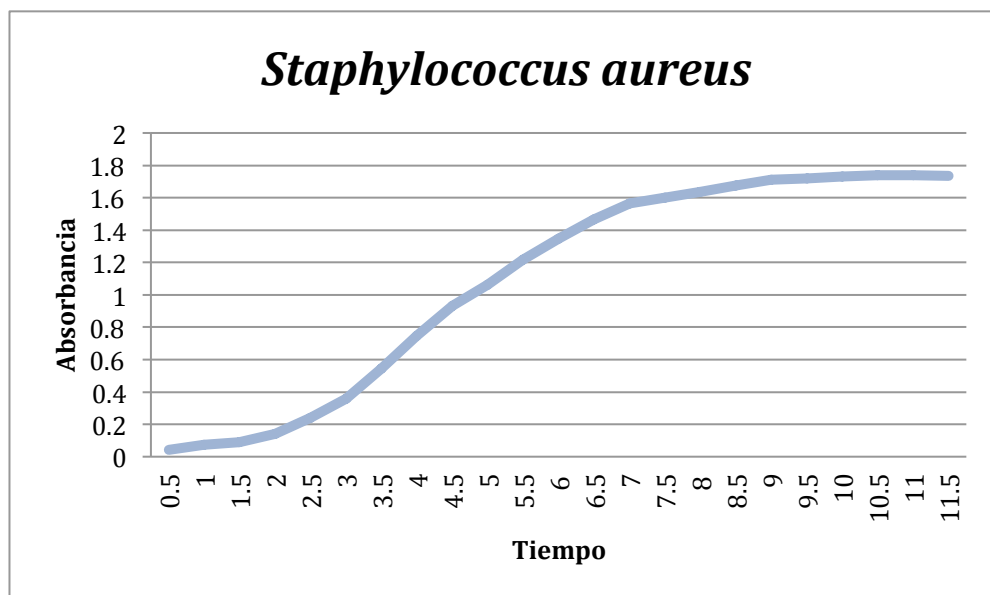


Fig. 26. Extractos de cenizo contra *L. monocytogenes*. Halo presente en los discos numerados.

7.6.1.2 *Staphylococcus aureus*

En la gráfica 7 se puede ver la cinética de crecimiento de *S. aureus*. La bacteria llega a su fase exponencial a la hora de comenzado el experimento y la finaliza cinco horas después, teniendo la fase exponencial 4h de duración.



Gráfica 7. Cinética de crecimiento de *S. aureus*

Solo el extracto de raíz *in vivo* presentó actividad contra *S. aureus*, como se muestra en la tabla 9 y fig. 27.

Tabla 9. Halos de inhibición de extractos de *L. frutescens* contra *S. aureus*

Extracto	Halo en mm
3. Raíz Cenizo Sabinas	8.5mm
Metanol	0
Gentamicina	25.333mm

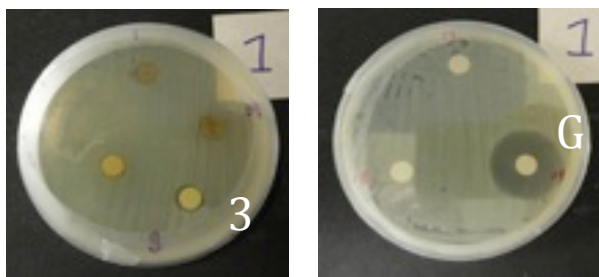
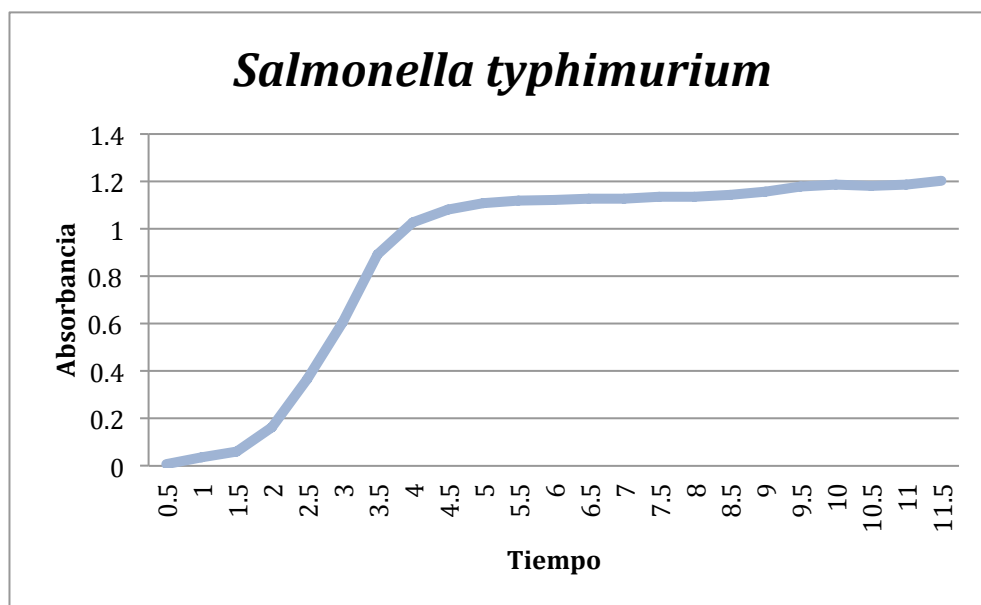


Fig. 27. Extractos de planta silvestre de cenizo contra *S. aureus*. Halo presente en el disco marcado 3.

7.6.1.3 *Salmonella typhimurium*

La cinética de crecimiento de *S. typhimurium* se muestra en la gráfica 8. La fase de crecimiento exponencial se alcanza a las 1.5 horas y termina a las 8.5h, teniendo una duración total de 7h.



Gráfica 8. Cinética de crecimiento de *S. typhimurium*

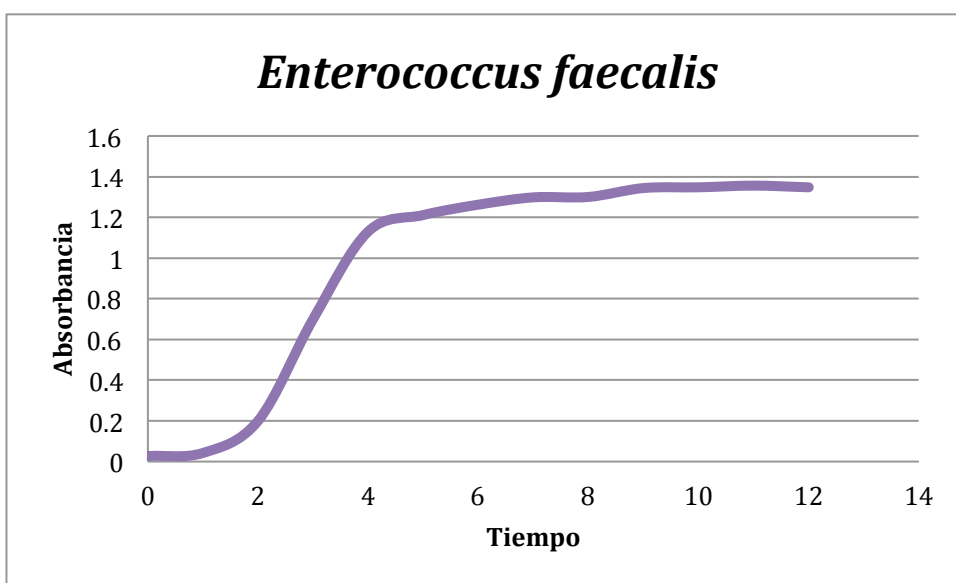
Ninguno de los extractos probados presentó actividad contra *S. typhimurium*, como se puede ver en la tabla 10.

Tabla 10. Halos de inhibición de controles contra *S. typhimurium*

Extracto	Halo en mm
Metanol	0
Gentamicina	19mm

7.6.1.4 *Enterococcus faecalis*

La cinética de crecimiento de *E. faecalis* se muestra en la gráfica 9. La fase de crecimiento exponencial se alcanza a las 2h y termina a las 4h, teniendo una duración total de 2h.



Grafica 9. Cinética de crecimiento de *E. faecalis*

Solo el extracto de Raíz de Cenizo Sabinas logro presentar actividad contra *E. faecalis*, ver tabla 11 y fig. 28.

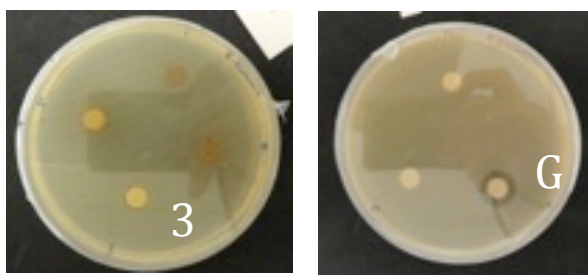


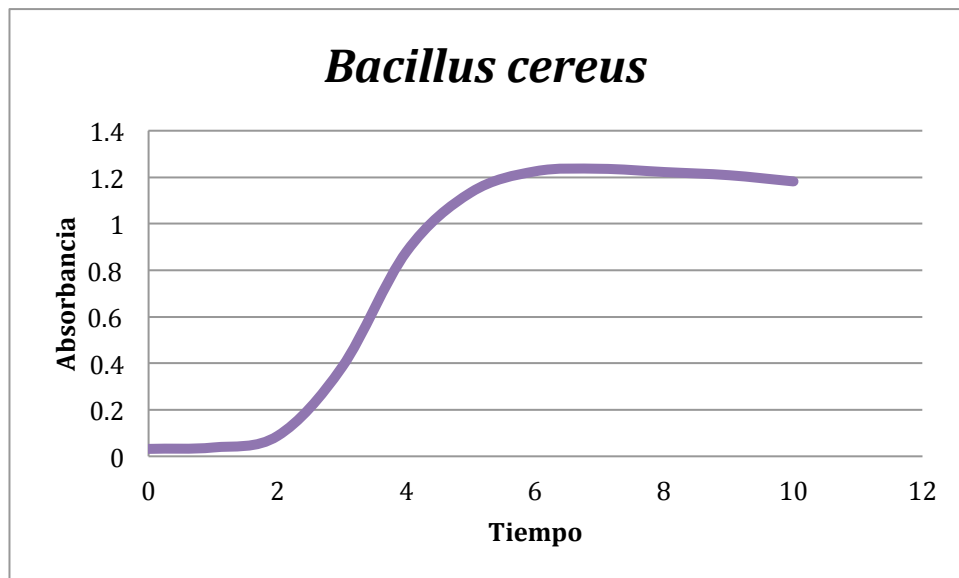
Fig. 28. Extractos de planta silvestre de cenizo contra *E. faecalis*, halo presente en el disco 3.

Tabla 11. Halos de inhibición de extractos de *L. frutescens* contra *E. faecalis*

Extracto	Halo en mm
3. Raíz Cenizo Sabinas	8.25mm
Metanol	0
Gentamicina	12.5mm

7.6.1.5 *Bacillus cereus*

La cinética de crecimiento de *B. cereus* se muestra en la gráfica 10. La fase de crecimiento exponencial se alcanza a las 2h y termina a las 5h, teniendo una duración total de 3h.



Gráfica 10. Cinética de crecimiento de *B. cereus*

Todos los extractos de la planta *in vivo* resultaron activos contra *B. cereus*, mientras que solo el extracto de Callo M4 presentó actividad, como se puede ver en la tabla 12 y figura 29.

Tabla 12. Halos de inhibición de extractos de <i>L. frutescens</i>	
Extracto	Halo en mm
1. Hoja Cenizo Sabinas	8.5mm
2. Tallo Cenizo Sabinas	7.75mm
3. Raíz Cenizo Sabinas	10.5mm
4. Hoja Cenizo Pacalli	9.25mm
8. Callo M4	8.25mm
Metanol (M)	0
Gentamicina (G)	32mm

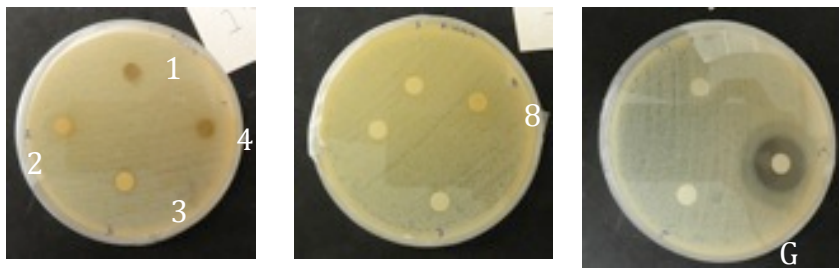


Fig. 29. Extractos de planta silvestre y producidos *in vitro* de cenizo contra *B. cereus* . Halo presente en los discos marcados 1, 2, 3, 4 y 8.

7.6.2 Actividad Antioxidante

7.6.2.1 Ensayo DPPH

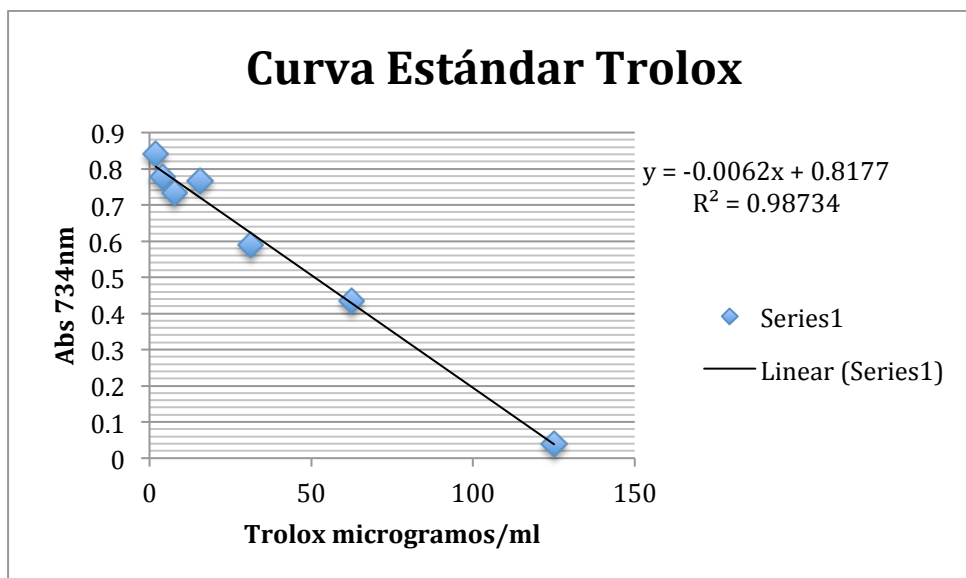
La actividad antioxidante de los resultados más relevantes de los extractos se muestran en la tabla 13 como Concentración Efectiva (EC_{50}). La EC_{50} obtenida para la Vitamina C fue de $14.309 \mu\text{g/mL}$. De los extractos obtenidos de material *in vivo* los extractos de tallo de Sabinas y Apodaca presentaron la menor EC_{50} , siendo estas de 213.225 y $283.274 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. De los extractos obtenidos de material *in vitro* el de Callo Semilla M4 presentó la menor EC_{50} de $378.954 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 13. EC_{50} de Extractos de *L. frutescens*

Extracto	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1. Hoja Cenizo Sabinas	463.225
2. Tallo Cenizo Sabinas	213.963
3. Raíz Cenizo Sabinas	595.629
4. Hoja Cenizo Pacalli	334.604
5. Hoja Cenizo Apodaca	306.602
6. Tallo Cenizo Apodaca	283.274
7. Callo Hoja M1	822.503
8. Callo Tallo M1	1059.84
9. Callo Semilla M4	378.954
10. Callo Semilla M6	546.014
Vit. C	14.309

7.6.2.2 Ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS

La grafica 11 muestra la curva estándar de Trolox. En esta se obtuvo una pendiente de -0.0063 , un intercepto en y de $.8187$ y una R^2 de $.9873$.



Gráfica 11. Curva estándar de Trolox

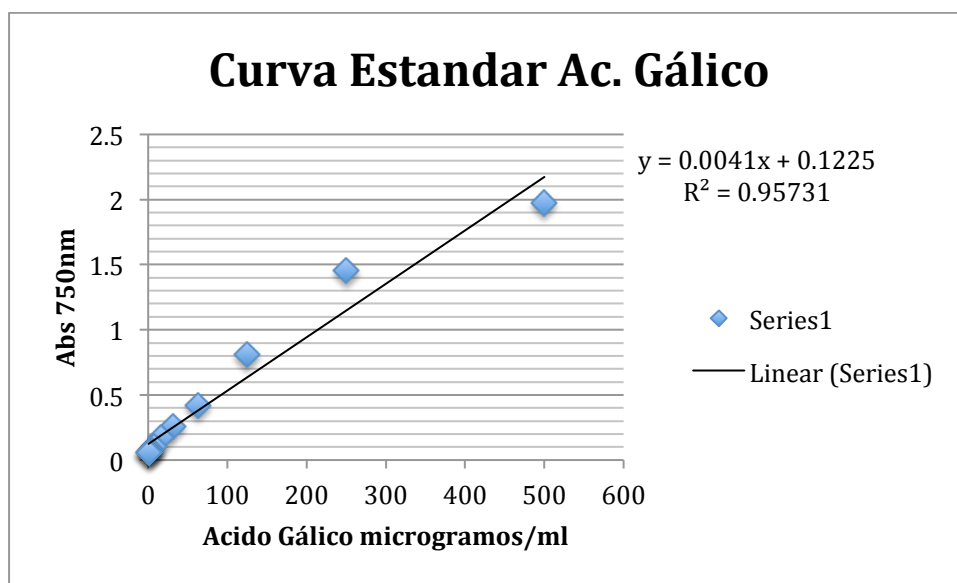
Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox y se toma como estándar a 62.5µg/ml. En la tabla 14 se muestran resultados obtenidos. Los extractos de Hoja y Tallo de ambas localidades presentan actividad antioxidante, destacándose los extractos de Tallo. Mientras que de los extractos producidos *in vitro* el más cercano al estándar de Trolox es el de Callo Semilla M4 con 56.231.

Tabla 14. Eq. de Trolox de Extractos de *L. frutescens*

Extracto	Eq. Trolox (µg/ml)
Hoja Cenizo Sabinas	65.284
Tallo Cenizo Sabinas	97.576
Raíz Cenizo Sabinas	53.69
Hoja Cenizo Pacalli	73.86
Hoja Cenizo Apodaca	71.319
Tallo Cenizo Apodaca	108.269
Callo Hoja M1	14.622
Callo Tallo M1	14.04
Callo Semilla M4	56.231
Callo Semilla M6	26.428
Trolox	62.5

7.6.2.3 Fenoles Totales (Follin-Colcateu)

La grafica 12 muestra la curva estándar de ácido gálico. En esta se obtuvo un pendiente de .0041, un intercepto en y de .1225 con una R^2 de 0.95731.



Gráfica 12. Curva estándar de ácido gálico

Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico. En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos. El resultado más alto se obtuvo en los extractos de Tallo Cenizo Sabinas y de Pacalli con 120.22 y 113.72 respectivamente.

Tabla 15. Eq. de ácido gálico de extractos de *L. frutescens*

Extracto	Eq. Trolox ($\mu\text{g/ml}$)
Hoja Cenizo Sabinas	66.50803
Tallo Cenizo Sabinas	120.2227
Raíz Cenizo Sabinas	72.84653
Hoja Cenizo Pacalli	113.7217
Hoja Cenizo Apodaca	43.99824
Tallo Cenizo Apodaca	78.77871
Callo Hoja M1	9.5428
Callo Tallo M1	17.0189
Callo Semilla M4	20.8383
Callo Semilla M6	7.5112

7.6.3 Letalidad de *Artemia salina*

La tabla 16 muestra la DL_{50} de los extractos. Solo dos de los extractos (Hoja Sabinas y Raíz Sabinas) presentaron toxicidad, siendo el extracto de Raíz Sabinas el más tóxico con una DL_{50} de 296.346 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 16. DL_{50} Extractos de *L. frutescens*

Extracto	DL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Hoja Cenizo Sabinas	989.725
Tallo Cenizo Sabinas	>1000
Raíz Cenizo Sabinas	296.346
Hoja Cenizo Pacali	>1000
Hoja Cenizo Apodaca	>1000
Tallo Cenizo Apodaca	>1000
Callo Hoja M1	>1000
Callo Tallo M1	>1000
Callo Semilla M4	>1000
Callo Semilla M6	>1000
Plántula in vitro Sabinas	>1000

7.7 Cromatografía en Capa Delgada

La tabla 17 muestra la numeración asignada a los extractos empleados en el ensayo.

Tabla 17. Numeración de Extractos de <i>L. frutescens</i>	
1	Hoja Cenizo Sabinas
2	Tallo Cenizo Sabinas
3	Raíz Cenizo Sabinas
4	Hoja Cenizo Pacali
5	Hoja Cenizo Apodaca
6	Tallo Cenizo Apodaca
7	Callo Hoja M1
8	Callo Tallo M1
9	Callo Semilla M4
10	Callo Semilla M6
11	Plántula in vitro Apodaca
12	Plántula in vitro Sabinas

7.7.1 Sistema de elución Cloroformo:Metanol 9:1

7.7.1.1 Revelado por luz UV

En la figura 30 se puede observar la placa cromatográfica revelada mediante luz ultravioleta. Las bandas de color rojo que se observan en los extractos 1, 2, 3, 4, 11 y 12 corresponden a la clorofila.

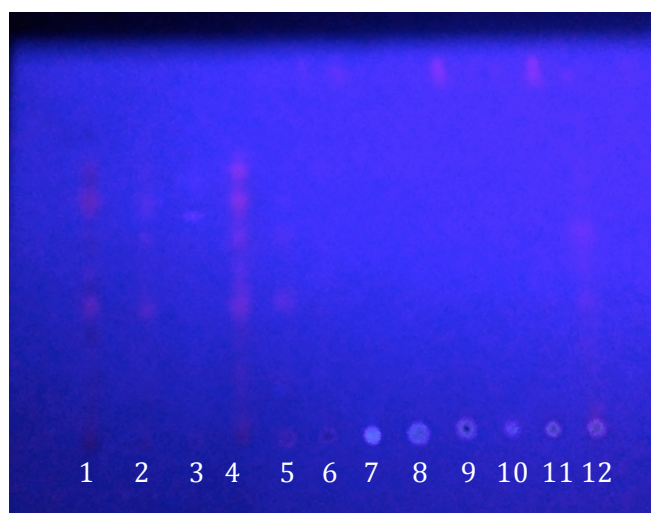


Fig 30. Placa CCD revelada con luz UV (cloroformo:metanol 9:1)

7.7.1.2 Revelado por Cloruro de Cobalto

La figura 31 muestra la placa cromatográfica revelada mediante cloruro de cobalto. Los extractos del 1 al 6 presentan una banda con Rf de .14285 que cuenta con una coloración morada-café. Este tipo de banda corresponde a posibles triterpenos o esteroides.

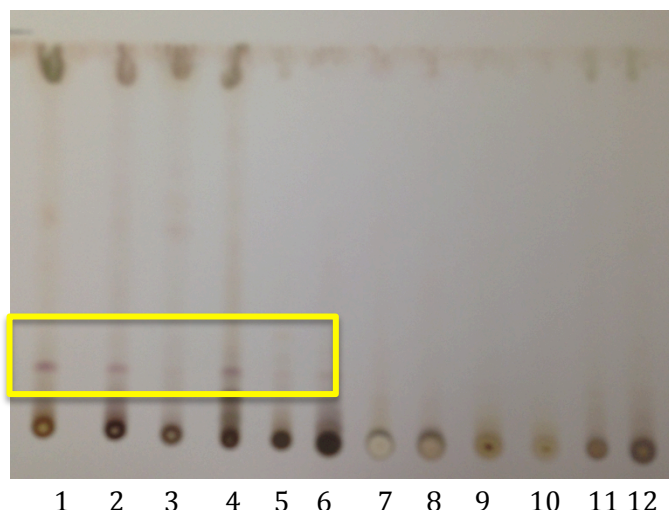


Fig 31. Placa CCD revelada con cloruro de cobalto (cloroformo:metanol 9:1)

7.7.2 Sistema de elución Benceno:Acetona 9:1

7.7.2.1 Revelado por luz UV

En la figura 32 se muestra la placa cromatográfica bajo luz UV. Los extractos 1, 2, 4, 5 y 12 presentan bandas de coloración rojas que corresponden a clorofila y el extracto 3 tiene una banda de color blanco que representa la posible presencia de compuestos aromáticos.

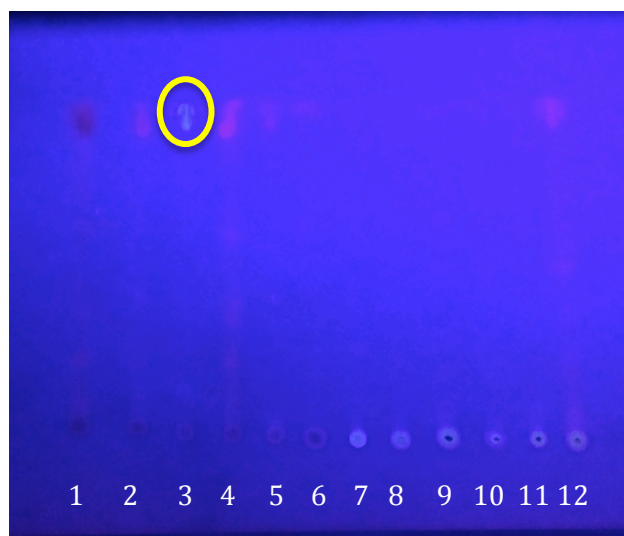


Fig 32. Placa CCD revelada con luz UV (beceno:acetona 9:1)

7.7.2.2 Revelado por Cloruro de Cobalto

La figura 33 muestra la placa cromatográfica revelada por medio de Cloruro de Cobalto. Los extractos del 1 hasta el 8 presentan bandas de coloración morada-café que representan posibles triterpenos o esteroides. La banda con Rf de 0.56716 se conserva en los extractos del 1-8 y el 11, mientras que la banda con Rf de 0.4029 se presenta tanto en el extracto 3 como en el 7 y 8, otra banda con un Rf de 0.71641 en los extractos 4, 7 y 8 y una banda en el extracto 3 de coloración café rojiza con Rf de 0.86567 correspondiente a un posible compuesto esteroide.

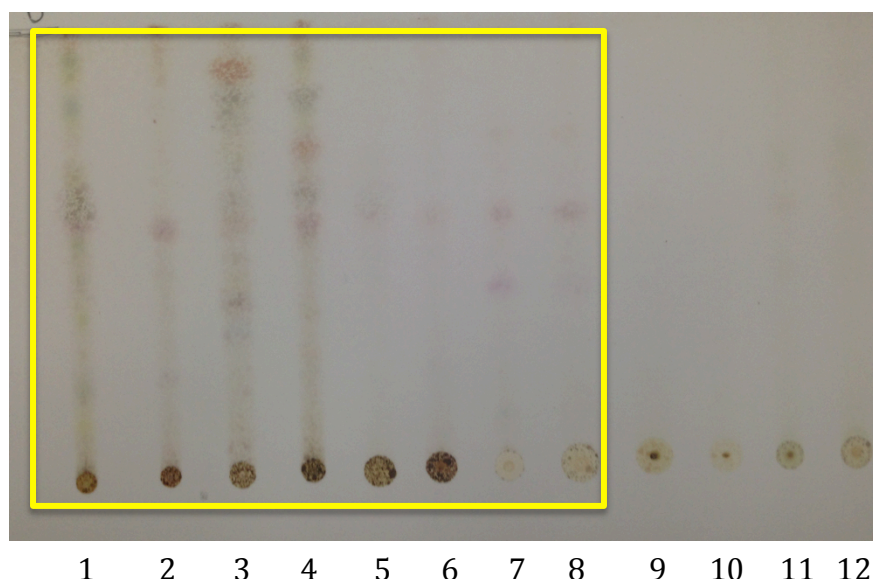


Fig 33. Placa CCD revelada con luz Cloruro de Cobalto (beceno:acetona 9:1)

7) DISCUSIÓN

Leucophyllum frutescens fue seleccionada para realizar su cultivo *in vitro* debido a las propiedades medicinales que presenta la planta (Molina-Salinas, et al., 2011), (Vega Menchaca, et al., 2013), así como, por la falta de referencias de su cultivo aséptico. Las localidades de colecta fueron seleccionadas debido a la diferencia climatológica de humedad y temperatura presentes en cada región. La primera localidad de colecta (municipio de Apodaca) presenta clima semicálido subhúmedo con lluvias escasas todo el año y tiene una precipitación anual promedio entre 600 y 800 mm; mientras que la segunda localidad (municipio de Sabinas Hidalgo) se caracteriza por presentar un clima seco, muy cálido con lluvia invernal y tiene un promedio de precipitación anual entre 300 y 600mm (Secretaría de Gobernación , 2014)

No fue posible realizar el cultivo *in vitro* a partir de hojas de cenizo, debido a la gran cantidad de tricomas presentes las cuales dificultaron el proceso de desinfección; sin embargo en el caso de las semillas el proceso de desinfección si fue exitoso con lo cual se logró la obtención de plantas libres de fuentes de contaminación y el establecimiento del cultivo aséptico (Alcántara, Brondani, Gonçalves, de Almeida, & Azevedo, 2011).

Los porcentajes de germinación obtenidos para el cenizo fueron comparables con los resultados de Flores y Juado (1998), quienes determinaron que el cenizo presentó un 30 % de germinación *in vivo* en semillas sin escarificación, por métodos tradicionales, el inicio de la germinación en este estudio se dio a mayor tiempo que el inicio de la misma en las condiciones *in vitro* establecidas en este trabajo. Las diferencias entre la germinación de las semillas *in vitro* y las germinadas *in vivo* puede explicarse debido a la diferencia en los sustratos y condiciones de germinación. Un estudio realizado sobre semillas de otra especie vegetal concluyó que las condiciones de germinación *in vitro* aceleran el proceso y lo vuelven más uniforme, que el *in vivo* (Bhattacharya y Khuspe, 2001). Por otra parte un estudio realizado sobre semillas de *Digitalis purpurea* L. (perteneciente a la familia Scrophulariaceae, al igual que el cenizo) encontró que el porcentaje de germinación se incrementaba con las concentraciones y tipos de auxinas y citocininas adicionadas. (Patil et al., 2012).

La diferencia entre los resultados de germinación de las semillas de ambas localidades para el T3 pudo ser causada por las diferencias de condiciones ambientales de humedad y temperatura a las que fueron sometidas las plantas madres durante el periodo de formación de las semillas (Pérez G & Pita V, 2000). Siendo las semillas del lote Sabinas Hidalgo las que se formaron bajo condiciones de mayor sequedad y temperatura, y por lo tanto las que tienen menor porcentaje de germinación.

Por otra parte la presencia de citocininas (BAP y K) en T2 y T3 produce una inhibición en la elongación de la raíz, concordando con lo visto por (Cary, Liu, & Howell, 1995). La diferencia en tamaño de las plántulas del tratamiento 3 para ambos lotes con el resto de los tratamientos se explica ya que el medio de cultivo utilizado contiene una mezcla de citocininas. Este grupo de reguladores de crecimiento actúa una vez que las reservas de almidón de las semillas se han desdoblado, promoviendo el crecimiento de los cotiledones y la diferenciación de hojas y tallos (Riefler, Novak, Strnad, & Schmulling, 2006), (Heyl, Riefler, Romanov, & Schmulling, 2012).

La aparición de callo en los tratamientos con presencia de BAP concuerda con lo encontrado por Bhattacharya y Khuspe (2001), quienes determinaron que los tratamientos adicionados con BAP favorecían la aparición de callo, probablemente debido a la acción conjunta de los reguladores endógenos de las plántulas con los adicionados en los medios de cultivo. Así mismo la formación de callo por los explantes en contacto con medios con ANA concuerda con lo visto por Salcedo-Morales *et al*, (2009) quienes encontraron que ANA inducía callogénesis en la hierba del cáncer. Resultado esperado dado que ANA pertenece al grupo de las auxinas, fitohormonas responsables de la producción de callo.

Todos los rendimientos de extractos procedentes del mismo tipo de material (tallos, hojas, callo o plántula) son comparables entre ellos, lo cual era esperado ya que el rendimiento de los extractos es la medida de la eficiencia del solvente para extraer componentes del material original (Murugan & Parimelazhagan, 2014).

Para la mayoría de los metabolitos secundarios se obtuvieron los mismos resultados tanto para los extractos de la planta silvestre como para el cultivo *in vitro*, exceptuando los taninos y las sesquiterpenlactonas presentes en el material *in vitro* y en los callos respectivamente, esto se explica dado que el estrés nutricional tiene un marcado efecto en los niveles de fenoles en tejidos vegetales. Además de que las

concentraciones de varios metabolitos secundarios dependen fuertemente de las condiciones de crecimiento de las plantas y tienen un impacto en las rutas metabólicas responsables de la acumulación de los productos naturales relacionados (Ramakrishna & Gokare, 2011).

Los resultados de la actividad antibacteriana y tóxica de los extractos del cenizo difieren con lo visto por Vega-Menchaca, *et al.* 2013, quienes encontraron que el extracto de hojas de cenizo eran activos contra cepa de *Staphylococcus aureus* y tóxicos contra *Artemia salina*, mientras que los resultados encontrados por este estudio demuestran que solo los extractos de raíz presentaban actividad tanto antimicrobiana como tóxica. La presencia de metabolitos activos en la raíz de cenizo coincide con lo visto por (Molina-Salinas, *et al.*, 2011) quienes encontraron que los compuestos con capacidad antimicrobiana se encontraban en los extractos de raíz de cenizo. Las diferencias entre lo encontrado para los extractos de hoja puede explicarse ya que las plantas empleadas para ambos estudios diferían en región de colecta y edad.

Además los resultados de la actividad antioxidante y el conteo de fenoles totales mostraron una correlación, al igual que lo encontrado por otros estudios (Ozcan, *et al.*, 2011). Ya que los compuestos fenólicos otorgan una alta contribución a la capacidad antioxidante de los extractos (Sun, *et al.*, 2002) (Gonçalves, *et al.*, 2015).

Existe una diferencia entre la capacidad antioxidante de los compuestos producidos en la planta silvestre y los tejidos regenerados *in vitro*. Tanto en la determinación de la capacidad antioxidante (por DPPH y ABTS) como en el contenido de fenoles totales los extractos de planta silvestre presentaron mayor actividad que los extractos de callo. Estos resultados coinciden con lo reportado para *Hovenia dulcis*, cuyos extractos de planta silvestre presentaban una mayor concentración de compuestos fenólicos que su contraparte de callo producido *in vitro*, igual que lo presentado por el cenizo (Bhagyan & Chandrashekar, 2013). La diferencia entre el tipo y la concentración de compuestos producidos *in vitro* y en la planta silvestre se puede atribuir a la diferencia en los niveles de estrés a los que fueron sometidas las plantas, siendo estos más elevados en la planta silvestre. Estudios sobre los extractos de callo de *Justicia gendarussa* producidos en medio sólido encontraron que estos presentaban mayor cantidad de fenoles totales que los extractos de callo en suspensión, estando bajo más estrés los cultivos en medio sólido

en términos de nutrientes y disponibilidad de oxígeno, de la misma forma en la que las plantas silvestres están bajo mayor estrés que el cultivo *in vitro* en términos de disponibilidad de agua, temperatura y nutrientes (Gonçalves, *et al.*, 2015).

8) CONCLUSIONES

- Mediante los métodos de desinfección empleados se logró el establecimiento del cultivo aséptico a partir de semillas de cenizo.
- Se obtuvieron plántulas completas, las cuales fueron empleadas como explantes
- En base al tipo y combinación de reguladores de crecimiento empleados en medio MS, se indujo la formación de callo a partir de explantes de plántulas germinadas *in vitro* y a partir de semilla.
- La presencia de triterpenos y esteroides fue corroborada tanto en extractos de la planta silvestre como en los tejidos regenerados *in vitro*.
- El extracto con mejor actividad bactericida, fue el de raíz de la localidad de Sabinas, al ser activa contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus cereus*.
- Los extractos de Tallo para ambas localidades presentan compuestos fenólicos y actividad antioxidante, los fenoles totales 120.22 y 78.78 $\mu\text{g/mL}$ de equivalentes de ácido gálico, CE_{50} de 213.96 y 283.27 $\mu\text{g/mL}$ y 97.58 y 108.27 $\mu\text{g/mL}$ de equivalentes de Trolox.
- El extracto de Raíz de Cenizo localidad Sabinas Hidalgo es tóxico contra *Artemia salina* con una DL_{50} de 296.346 $\mu\text{g/mL}$.

10) BIBLIOGRAFÍA

- Alcântara, B. K., Brondani, G. E., Gonçalves, A. N., de Almeida, M., & Azevedo, R. A. (2011). Methods of asepsis for *in vitro* establishment and germination of *Eucalyptus grandis*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* , 2 (3), 7-13.
- Baker, D., Mocek, U., & Garr, C. (2000). Natural Products vs. Combinatorials: A case study. In M. Wrigley, *Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries* (pp. 66-72). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Bart, H.-J. (2011). Extraction of Natural Products from Plants- An Introduction. In H.-J. Bart, & S. Pilz, *Industrial Scale Natural Products Extractions* (pp. 1-25). Weinheim: Wiley-VCH.
- Beutler, J. A. (2009). Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* , 46 (9), 1-30.
- Bhagyan, N., & Chandrashekar, K. R. (2013). Evaluation of plant and callus extracts of *Justicia gendarussa* Burm. F. for phytochemicals and antioxidant activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* , 5 (2), 82-85.
- Bhattacharya, J., & Khuspe, S. S. (2001). *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Scientia Horticulturae* , 91, 39-49.
- Cary, A. J., Liu, W., & Howell, S. H. (1995). Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol* , 107, 1075-1082.
- Castillo-Nava D., Camacho-Corona MR., Lozano-Garza HG., Alvarez-Mendoza FJ., Tamez-Cantú EM., Fuentes-Pensamiento R., Balderas-Rentería I. 2004. Comparación del efecto anticirrótico del extracto metanólico del cenizo (*Leucophyllum frutescens*), la silimarina y un preparado comercial sobre ratas intoxicadas con CCl₄ como modelo experimental de cirrosis hepática. RESPYN 10.
-
- Cui, L. K., & Murthy, M. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress

- an nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* , 28, 771-799.
- Dagla, H. R. (2012). Plant Tissue Culture: Historical developments and applied aspects . *Resonance* , 759-767.
 - Domínguez, X. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Limusa.
 - Editorial Nature. (2008). A golden age for microbial ecology. *Nature* , 6 (1), 566.
 - Flores, J., & Juado, E. (1998). Germination and early growth traits of 14 plants species native to northern Mexico. *The southwestern naturalist* , 43 (1), 40-46.
 - Gonçalves Ribeiro, I., Machado Gayer, C. R., Carvalho de Castro, T., Pinto Coelho, M. G., & Albarello, N. (2015). Compact callus cultures and evaluation of the antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) under *in vivo* and *in vitro* culture conditions. *Journal of Medicinal Plants Research* , 9 (1), 8-15.
 - Gozález-Zertuche, L., & Orozco-Segovia, A. (1996). Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda Brachystachya*. *Bol. Soc. Bot. México* , 58, 15-30.
 - Hafidh, R. R., Abdulmir, A. S., Vern, L., Abu Bakar, F., Abas, F., Jahanshiri, F., *et al.* (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by natural products. *The Open Microbiology Journal* , 5 (1), 96-106.
 - Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* , 5, 544-552.
 - Heyl, A., Riefler, M., Romanov, G., & Schmulling , T. (2012). Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *Europ J Cell Biol* , 91, 246-256.
 - Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* , 48 (4), 412-422.
 - Kennedy, D. O., & Wightman, E. L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *American Society of Nutrition Adv. Nutr.* , 2, 32-50.

- Lin, J., Opoku, A., & Geheeb-Keller, M. (1999). Preliminary screening of some traditional zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *J Ethnopharmacol* , 68, 267-274.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2006). *Brock biología de los microorganismos*. España: Pearson-Prentice Hall.
- McLaughlin, J. L., Rogers, L. L., & Anderson, J. E. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal* , 32, 513-524.
- McMurry, J. (2008). Secondary metabolites: an introduction to natural products chemistry. In J. McMurry, *Organic Chemistry* (pp. 1016-1046). Mexico D.F.: Thompson Nelson.
- Molina-Salinas, G., Rivas-Galindo, V., Said-Fernández, S., Lankin, D., Joseph-Nathan, P., Pauli, G., *et al.* (2011). Stereochemical analysis of leubethanol, an anti-TB-active serrulatane, from *Leucophyllum frutescens*. *J Nat Prod* , 74 (9), 1842-1850.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* , 15, 473-497.
- Murugan, R., & Parimelazhagan, T. (2014). Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn.-An *in vitro* approach. *Journal of King Saud University* , 26 (4), 267-275.
- Nester, E. W., Anderson, D. G., Roberts, J. C., & Nester, M. T. (2007). *Microbiology a human perspective*. New York: McGraw Hill.
- Ozcan, B., Esen, M., Caliskan, M., Mothana, R., Cihan, A., & Yolcu, H. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of the various extracts of *Verbascum pinetorum* Boiss O. Kuntze (*Scrophulariaceae*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* , 15, 900-905.
- Patil, J. G., Ahire, M. L., & Nikman, T. D. (2012). Influence of plant growth regulators on *in vitro* seed germination and seedling development of *Digitalis purpurea* L. *The asian and australasian journal of plant science and biotechnology* , 6 (1), 12-18.
- Pérez G, F., & Pita V, J. (2000). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. *Hojas divulgadoras* , 2112, pp. 2-15.

- Prakash, S., & Van Staden, J. (2007). Micropropagation of *Hoslundia opposita* Vahl- a valuable medicinal plant. *South African Journal of Botany* , 73 (1), 60-63.
- Premkumar, G., Sankaranarayanan, R., Jeeva, S., & Rajarathinam, K. (2011). Cytokinin induced shoot regeneration and flowering of *Scoparia dulcis* L. (Scrophulariaceae)-an ethnomedicinal herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* , 169-172.
- Prior, R. L., Wu, X., & Shaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53, 4290-4302.
- Ramakrishna, A., & Gokare, R. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* , 6 (11), 1720:1731.
- Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* , 20, 101-153.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., & Schmulling, T. (2006). Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development and cytokinin metabolisms. *Plant Cell* , 18, 40-54.
- Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* , 16, 565-574.
- Rout, G. R., Samantaray, S., & Das, P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* , 18 (1), 91-120.
- Salcedo-Morales, G., Rosas-Romero, G., Nabor-Correa, N., Bermúdez-Torres, K., López-Laredo, A. R., & Trejo-Tapia, G. (2009). Propagation and conservation of *Castilleja tenuiflora* Benth. ('Hierba del Cáncer') through *in vitro* culture. *Polibotánica* , 28, 119-137.
- Singh, S., & Singh, R. (2008). *In vitro* methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Rev Int* , 24 (4), 392-415.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting of microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews* , 97 (4), 491-502.

- Sun, J., Chu, Y., Wu, X., & Liu, R. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50 (25), 7449-7454.
- Vega Menchaca, M. C., Verde Star, J., Oranday Cárdenas, A., Morales Rubio, M. E., Núñez González, M. A., Rivera Guillén, M. A., (2013). Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnston del Norte contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44 (2), 24-30.
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. A., & Barrow, C. J. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18, 445-450.
- Zwenger, S., & Basu, C. (2008). Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3 (1), 1-7.

MATERIAL ELECTRÓNICO

- CENAPRECE. *Cifras oficiales tuberculosis* (2012).. from Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades: [internet] Disponible en el sitio de red: http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/microbacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html Revisado en la página de Internet el 30 de septiembre del 2015
- Asociación Argentina de Fitomedicina. (2011). Fitomedicina: Pasado y Presente. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.biomanantial.com/fitomedicina-pasado-presente-a-7-es.html> Revisado en la página de Internet el 30 de septiembre del 2015
- OMS. (2002). World Health Organization: *Prevention of hospital-acquired infections. A practical guide*. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.who.int/csr/resources/publications/whocdscsreph200212.pdf> Revisado en la página de Internet el 30 de septiembre del 2015
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2013). *Tuberculosis*. . [Internet] Disponible en el sitio de red:

<http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs104/es/> Revisado en la página de Internet el 30 de septiembre del 2015

- Secretaría de Gobernación . (2014). *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México, Nuevo León*. INAFED:[Internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/EMM19nuevoleon/mediofisico.html> Revisado en la página de Internet el 30 de septiembre del 2015
- Secretaría de Salud. (2009). *Estandares para la atención de la tuberculosis en México*. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/descargas/pdf/estatenbmx.pdf> Revisado en la página de Internet el 30 de septiembre del 2015
- TWC. (2009). *Native Plant Database*. [Internet] Disponible en el sitio de red: http://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=LEFR3 Revisado en la página de Internet el 30 de septiembre del 2015

11) RESUMEN BIOGRÁFICO

Claudia Aurora Espinosa Leal

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias

con Acentiación en Química de Productos Naturales

Tesis: ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE CULTIVO *IN VITRO* DE *Leucophyllum frutescens* Berl. (i.m. Johnston), PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE IMPORTANCIA EN EL ÁREA DE LA SALUD.

Campo de Estudio: Química de Productos Naturales

Datos Personales: Nacida en la ciudad de Monterrey N.L. el 17 de Octubre de 1988

Educación: Egresada del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey con el grado de Ingeniero en Biotecnología en 2009 obteniendo mención honorífica de excelencia; y en el año 2011 con el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biotecnología.

Experiencia Profesional: Maestra por horas de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Autónoma de Nuevo León desde Agosto 2015.