



PRODUCCION DE HIDROXICUMARINAS E INTERMEDIARIOS BIOSINTÉTICOS EN CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Sphaeralcea Angustifolia* (CAV.) G. DON.

Pérez Hernández Juanita¹, González Cortazar Manasés¹, Meckes Fischer Mariana², Nicasio Torres Ma. del Pilar¹. Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS). Argentina No. 1 Centro, 62790 Xochitepec, Morelos¹, Tel o Fax: 7773612155. Centro para el diagnóstico de metabolismo energético y medicina mitocondrial², kika_juanita@yahoo.com.mx, pisaliva@yahoo.com.mx.

Palabras clave: *antiinflamatorio, hidroxicumarinas, estimulación*

Introducción. El efecto antiinflamatorio de *Sphaeralcea angustifolia*, especie comúnmente conocida como hierba de vara de San José, ha sido demostrado en modelos de inflamación aguda y crónica, atribuyéndose el efecto a la interacción de la escopoletina (hidroxicumarina) con otros constituyentes en la planta (1). *S. angustifolia* es una planta medicinal cuya colecta se encuentra restringida (SEMARNAT) (2), lo que ha llevado a la aplicación de métodos biotecnológicos y a la producción de los compuestos activos en cultivos de células en suspensión. Considerando que la escopoletina como fitoalexina está asociada a condiciones de estrés (3), se diseñaron modelos de señalización inter e intracelular a través del cultivo de células en suspensión.

Objetivo. Establecer cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* para estimular la producción de las hidroxicumarinas escopoletina y esculetina, o bien detectar compuestos intermediarios que participan en la ruta biosintética (ácido cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico).

Metodología. El cultivo de células en suspensión se inició con biomasa de callos derivados de explantes de hojas en medio de cultivo MS (Murashige and Skoog) líquido (80 mL) complementado con sacarosa 30 g/L, 1 mg/L de ANA en combinación con 0.1 mg/L de CN. Los cultivos se incubaron a 26 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas luz (intensidad luminosa de 32 μM/seg.m²) por 8 de oscuridad en un agitador orbital a 110 rpm. Durante el desarrollo de las suspensiones se evaluaron características como el color, disgregación del callo y crecimiento. Posteriormente, se realizaron cinéticas de crecimiento en cultivos tipo lote evaluando los pesos frescos y secos de las biomásas desarrolladas en 3 matraces cada 3 días durante 30 días. Con el fin de favorecer el metabolismo secundario de las células en suspensión se disminuyó la concentración total de nitratos en el medio de cultivo de 27.4 a 2.74 y 0.274 mM. Para el análisis químico, las biomásas celulares se extrajeron exhaustivamente con CH₃OH a temperatura ambiente, el extracto obtenido fue particionado con CHCl₃ y la fase orgánica se recuperó para su análisis por HPLC. Asimismo, el medio de cultivo se particionó con CHCl₃ para analizar la fase orgánica mediante HPLC. La

cuantificación de los compuestos se realizó por medio de curvas de calibración utilizando referencias comerciales.

Resultados y discusión. Los cultivos celulares desarrollados con las distintas concentraciones de nitratos en el medio mostraron diferencias de coloración y textura. En el medio 27.4 mM las células conservaron su color verde y textura friable, en tanto que con niveles reducidos de nitratos, se observó coloración beige (oxidación) y formación de agregados celulares. Estos cultivos no presentaron diferencias significativas en la velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación (ANOVA, p>0.05); sin embargo, el índice de crecimiento (ANOVA, p<0.05) y las fases de adaptación fueron menores (2 días) con las concentraciones disminuidas de nitratos. Los cultivos celulares acumularon en las células ácido ferúlico (0.15 mg totales/L) y escopoletina (0.006 mg totales/L), la cual se excretó también al medio (0.15 mg totales/L) a los 4 días. La excreción de escopoletina (1.56 mg totales/L) se favoreció al día 2 al disminuir a 2.74mM la concentración de NO₃⁻, posteriormente la liberación disminuyó y se mantuvo constante sin que fuera detectado en el cultivo un fenilpropanoide. La mayor limitación de nitratos (0.274 mM) no incrementó la acumulación de escopoletina (0.029 mg totales/L) ni su liberación al medio (0.009 mg totales/L) y en estos cultivos se determinó la presencia del ácido *trans*-cinámico (0.065 mg totales/L) en la biomasa celular.

Conclusiones. Los cultivos celulares de *S. angustifolia* producen únicamente la hidroxicumarina escopoletina, la cual es liberada al medio de cultivo. La deficiencia de nitratos a 2.74 mM estimuló la biosíntesis y liberación de este compuesto; por el contrario, la reducción de nitratos a 0.274 mM incrementó su acumulación únicamente en las células; detectándose además ácido *trans*-cinámico en el medio de cultivo.

Bibliografía.

1. Meckes M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jiménez A (2004). *Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema*. *Phytomedicine*, 11(5): 446-51.
2. <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/SphaeralceaAngustifolia.htm>
3. García-Mateos R. y Pérez-Leal R. 2003. *Fitoalexinas: mecanismo de defensa en las plantas*. Revista Chapingo (Serie Ciencias Forestales y del ambiente). Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 5-10.