

## PRODUCCIÓN DE GALFIMINA B POR CULTIVOS EN SUSPENSIÓN EN DOS FASES TIPO LOTE DE *Galphimia glauca* Cav. (MALPHIGHIACEAE)

Lidia Osuna<sup>1</sup>, Rogelio Pereda-Miranda<sup>2</sup> y María Luisa Villarreal<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS. Argentina No. 1. Xochitepec, Morelos. 62790. México (osunalidia@yahoo.com).<sup>2</sup>Depto. de Farmacia. Fac. de Química.(UNAM) .04510. México.<sup>3</sup>Centro de Investigación en Biotecnología. UAEM, Cuernavaca, Morelos. 62260. México

**Palabras clave:** cultivo en dos fases, *Galphimia glauca*, GB.

**Introducción.** *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae) es una planta medicinal mexicana de la que se han aislado dos terpenos con actividad sedante: galfimina B (**1**), y 6,acetoxigalfimina-B(**2**). Actualmente se conoce el mecanismo de acción de **1** a nivel del área ventral tegmental en el cerebro de rata (1,2). Recientemente se reportó el establecimiento de cultivos *in vitro* de esta especie en donde se indujo la producción de los terpenos **1** (0.154 mg/g PS) y **2** (0.057 mg/g PS.) por efecto de la auxina 2,4-D, a partir de callos derivados de hipocótilo. Posteriormente se establecieron cultivos de células en suspensión donde se logró la acumulación de **1** (0.06 mg/g PS) y de **2** (0.112 mg/g PS) en medio MS adicionado con 2mg/l de ANA + 2mg/l CN. Adicionalmente se observó que la producción de los terpenos bioactivos fue independiente del crecimiento celular; en vista de que la presencia de ANA favoreció el incremento de la biomasa, en tanto que el ácido 2,4-D indujo la producción de los terpenos sedantes (3). En base a estos resultados el objetivo del presente trabajo de investigación consistió en utilizar un cultivo en suspensión tipo-lote en dos fases, empleando un medio de crecimiento celular para la primera fase y un medio de producción en la segunda con el propósito de incrementar la producción del compuesto **1**.

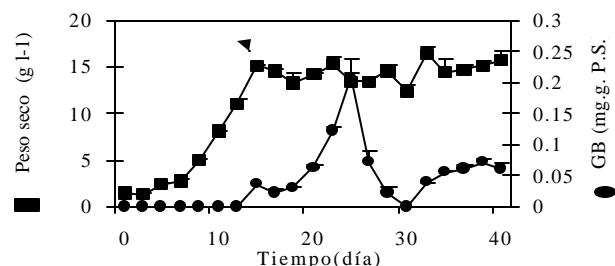
**Metodología.** Para el cultivo en dos fases se utilizó la línea celular *gxl* de *Galphimia glauca* previamente establecida en medio MS1:ANA:CN (2:2 mg/l) cultivada en matraces Erlenmeyer agitados (115 rpm) conteniendo 100ml de medio adicionados con 30 g/l de sacarosa, y mantenidos a  $28 \pm 2$  °C, utilizando fotoperiodo de 16 hr. luz a una intensidad luminosa de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los medios se ajustaron a un pH de 5.6 y se esterilizaron por 17 min a 1.5 lb. de presión a 120°C. En la primera fase el cultivo se mantuvo durante 14 días en MS1 y posteriormente las biomásas fueron filtradas y transferidas al medio MS2: 2,4-D 4 mg/l, durante 26 días. Los productos bioactivos **1**

y **2** se cuantificaron por triplicado a partir de un gramo de peso seco, tomando muestras cada tercer día durante 40 días de experimentación. Para ello se utilizó Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, mediante la técnica de estándar externo, con un sistema de gradientes: acetonitrilo:agua (38:62, 39:61, 40:60, 43:57, 45:55, 50:50, y 70:30 en 5,10, 15,20,25,30 y 33 min), flujo de 1 ml/min. Columna de fase reversa RP<sub>18</sub>. Detector de diodos (232 nm)

**Resultados y Discusión.** En la Figura 1 se muestra el crecimiento celular y la producción del compuesto **1** en

cultivo en dos fases. Se obtuvo una biomasa máxima de 15 g/l PS en la primera fase del cultivo al tiempo 14 de la cinética, con un tiempo de duplicación de 4.3 días. En la segunda fase del cultivo se obtuvo una producción del compuesto **1** (0.22 mg/g PS) al tiempo 10 de la cinética, lo cual representa un incremento de 1.4 veces con respecto a los valores reportados previamente para callos cultivados en esta misma combinación hormonal, y 3.5 veces con respecto a los cultivos en suspensión en una sola fase. Estos valores son del mismo orden de magnitud que los valores reportados para la planta silvestre utilizando el mismo procedimiento analítico (2). En estas condiciones no fue posible detectar la presencia del compuesto **2**

**Figura 1.-** Cinética de crecimiento y producción de galfimina B en cultivos tipo lote en dos fases, de la línea *gxl* de *Galphimia glauca* Cav. n = 6  $\pm$  D.E.



**Conclusión.** Utilizando un cultivo de células en suspensión en dos fases de *Galphimia glauca*, se logró incrementar la producción de galfimina B con respecto a los cultivos de callos y células en suspensión en una sola fase.

**Agradecimientos.** Parte de este trabajo fue financiado por ECOS-ANUIES Proyecto M98-SO1 UAEM.

### Bibliografía.

- 1) Tortoriello J., Ortega A., Herrera-Ruiz M., Trujillo J., Reyes-Vázquez C. (1998) Galphimine-B modifies electrical activity of ventral tegmental area neurons in rats. *Planta Med* 64:309-313.
- 2) Osuna L., Pereda-Miranda R., Tortoriello J., Villarreal M.L. (1999) Production of the Sedative Triterpene Galphimine B in *Galphimia glauca* Tissue Culture. *Planta Med* 65: 149-152
- 3) Osuna L., Pereda-Miranda R., Villarreal ML. (2001) *In vitro* production of the sedative galphimine B by cell suspension cultures of *Galphimia glauca*. *Plant Cell Reports* (Enviado).