

1992 - B

084510254

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

---

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION  
DE UN COLORANTE OBTENIDO A PARTIR DE CELULAS EN  
SUSPENSION DE (Stenocereus queretaroensis (Web.) Buxbaum)

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

SERGIO EDUARDO ALATORRE GOMEZ

GUADALAJARA, JAL. AGOSTO DE 1995

# Universidad de Guadalajara



## Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias División de Ciencias Biológicas y Ambientales Biología

0426/95

C. SERGIO E. ALATORRE GOMEZ  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "SELECCION DE UN MODELO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE UN COLORANTE OBTENIDO A PARTIR DE CELULAS EN SUSPENSION DE (*Stenocereus queretaroensis*)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis la Q.F.B. Lilia de Anda Trujillo.

C.U.C.B.A.



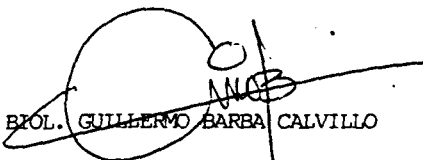
A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal. 2 de Marzo de 1995  
EL DIRECTOR

*Fernando Alfaro Bustamante*

DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

EL SECRETARIO

  
BIOL. GUILLERMO BARBA CALVILLO

c.c.p.- La Q.F.B. Lilia de Anda Trujillo, Director de Tesis.-pte.  
c.c.p.- El expediente del alumno

FAB/GBC/cglr.

C. Dr. Alfonso E. Islas Rodríguez.  
Director de la División de Ciencias  
Biológicas y Ambientales.  
Centro Universitario de Ciencias  
Biológicas y Agropecuarias.

P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante Sergio Eduardo Alatorre Gómez. Código número 084510254 con el título SELECCIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN COLORANTE OBTENIDO A PARTIR DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE (*Stenocereus queretaroensis* (Web.) Buxbaum) Consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

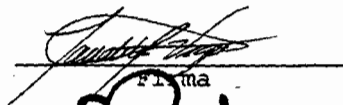
Guadalajara, Jal. Julio de 1995

El director de Tesis

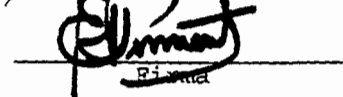


SINODALES

- 1.-Ana Lilia Viguera Guzmán.
- 2.-Dr. Eulogio Pimienta Barrios.
- 3.-M en C Alejandro Muñoz Urias.



Firma



Firma

Alejandro Muñoz Urias  
Firma

SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE UN  
COLORANTE OBTENIDO A PARTIR DE CELULAS EN SUSPENSION DE  
(Stenocereus queretaroensis (Web.) Buxbaum)

C. SERGIO EDUARDO ALATORRE GÓMEZ.

*Ab aeterno,  
Abyssus Abyssum invocat,  
Ad infinitum...  
Ecce homo.*

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., (CIATEJ), en los departamentos de fermentaciones, microbiología, química analítica y cultivo de tejidos, de la División de Biotecnología, con la dirección de la Q. F. B. Lilia de Anda Trujillo.

## **AGRADECIMIENTOS:**

### **A mis padres...**

Por sus consejos, amor y paciencia.

### **A mis hermanos...**

Por su apoyo y perseverancia para que termine lo que empiezo.

### **A mis compañeros...**

Quienes creyeron en mí y con quienes compartí muchos momentos que ahora son recuerdos mutuos. En especial a Olga, Rosalba y Ma. Elena.

### **A Laura, Pedro y Alex**

Quien en las buenas o en las malas siempre conté con ellos he hicieron que esos momentos fuesen especiales.

### **A mis maestros...**

Por compartir sus conocimientos y por elegir esta difícil profesión.

### **Al personal de CIATEJ...**

En especial a J. Abraham Agraz, Javier Gonzalez, Esther Leos, Martha Vargas, Susana Gil, Ma. del Socorro Morales, Antonia Gutiérrez, Laura Torres, Carlos Ramírez, Rafael Soltero y Fernando.

### **A Lilia De Anda Trujillo...**

Por su dedicación en la elaboración del presente trabajo y por permitirme aprender y trabajar a su lado.

### **A mis sinodales...**

Biól. Ana Lilia Viguera Guzmán, Dr. Eulogio Pimienta Barrios y M. en C. Alejandro Muñoz Urias, por su contribución en este escrito.

### **A PERSE...**

DEDICADA A  
LA MEMORIA  
DE MI MADRE.



## INDICE

1.-RESUMEN	10
2.-ANTECEDENTES	11
3.-INTRODUCCION	12
4.-JUSTIFICACION	32
5.-HIPOTESIS	33
6.-OBJETIVOS GENERALES	33
7.-OBJETIVOS PARTICULARES	33
8.-MATERIALES Y METODOS	34
9.-RESULTADOS	51
10.-DISCUSIONES	64
11.-CONCLUSIONES	66
12.-RECOMENDACIONES	67
13.-APENDICES	68
14.-BIBLIOGRAFIA	98

## RESUMEN

Este trabajo especifica algunas de las condiciones mediante las cuales, se puede lograr una mejor propagación de las células de pitayo y al mismo tiempo los parámetros óptimos para lograr la acumulación de un colorante, así mismo valuar algunas de las propiedades que presente este pigmento.

En el laboratorio se compararon dos medios de cultivo distintos: MS y B5; del medio denominado como MS (Murashige y Skoog, 1962) se probaron 3 variedades (MS2, MS9, MS11), con la finalidad de identificar en cual de los medios el crecimiento de Stenocereus queretaroensis (Web.) Buxbaum. (pitayo), es el más viable; del grupo de medios probados, el medio denominado MS-9, fue en el que mejores resultados se obtuvieron con respecto a la multiplicación celular y el medio llamado B5 proporciono mayor concentración de colorante tanto intra como extracelularmente.

Para registrar las condiciones de crecimiento celular y apreciar el comportamiento de las células cultivadas fueron como sigue: Las células se cultivaron en matraces Erlen Meyer de 250 ml., en ensayos de 8 días, manteniendo una temperatura de  $28 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , con agitación de 120 revoluciones por minuto (RPM), con un pH inicial de los medios de  $5.8 \pm 0.5$ , aplicando a los medios de cultivo iluminación constante.

Después de establecer las líneas celulares y conocer las mejores condiciones de extracción del colorante, se procedió a la realización de algunos análisis, para tratar de identificar el colorante obtenido. Tales pruebas químicas consistieron, primeramente en la extracción seguida de la purificación y posteriormente medición espectrofotométrica, así como la utilización de electroforesis en papel y poliacrilamida; finalizando con algunas pruebas fisicoquímicas, basadas en las características de los pigmentos antocianínicos y betalámicos.

## 1.-ANTECEDENTES:

Desde el siglo pasado, en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, la cual consiste en cultivar medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y tallo, o partes inmaduras de flores y frutos.(1)

Los primeros intentos en esta técnica fueron realizados por Sacks (1860) y Knops (1861), quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas, y prepararon una solución nutritiva que las contenía, la cual ha sido utilizada por muchos investigadores desde entonces.(1)

En un principio los medios de cultivo eran relativamente simples, pero conforme transcurrieron las investigaciones, se observó que algunas especies vegetales requieren de otros nutrientes especializados para su mejor desarrollo; así por ejemplo, White (1934), quien cultivo ápices de raíz de (*Lycopersicum esculentum* L.) en un medio líquido conteniendo sales inorgánicas, extracto de levadura y sacarosa, en donde obtuvo un crecimiento activo. (1)

En síntesis todas las investigaciones acerca del cultivo de tejidos vegetales avanzaron lentamente hasta los años 70's donde se incrementaron los estudios al respecto, tales como de diferenciación celular, la producción de metabolitos secundarios, investigación genética, citológica y embriológica. (1,32,41)

Hasta la fecha los progresos obtenidos han permitido el estudio de algunas enfermedades de las plantas, determinando el origen genético, bacterial o viral de las mismas (1,31). Pero el enfoque se ha dirigido principalmente a la obtención de metabolitos vegetales, los cuales están tomando vital importancia en la industria alimenticia, esto se debe a que las plantas superiores acumulan sustancias muy variadas, algunas de las cuales han sido explotadas por el hombre desde hace milenios, como los ácidos grasos, aceites y carbohidratos. (2,6,7,30)

## 2.-INTRODUCCION:

La principal cualidad que deben tener los alimentos para su mejor aceptación, por los consumidores, esta generalmente basado en el color, sabor, textura y valor nutritivo. Pero sin lugar a dudas, uno de los más importantes atributos cualitativos es el color, característica que está influenciada por diversos factores como el cultural, geográfico y los aspectos sociológicos de la población. De esta forma, el hombre se ha preocupado en obtener colorantes para adicionarlos a los alimentos que ingiere, logrando así, primeramente sean atractivos a su vista; tal es el caso de las carnes frías, gelatinas, distintos tipos de bebidas, repostería, dulces, etcétera.

Muchos colorantes se obtenían de plantas, y actualmente se consiguen en forma sintética, aunque la tendencia al naturismo es cada día más evidente.

Los metabolitos primarios, son los primeros productos elaborados por los vegetales y a partir de estos confeccionan los metabolitos secundarios, que se encuentran en menor cantidad; en la planta en pequeñas cantidades, lo que hace que su extracción sea muy costosa (2). Actualmente, a pesar de los progresos de la química orgánica que han permitido, por síntesis o por hemisíntesis, la obtención de productos idénticos a los de la planta, pero aún así, el reino vegetal es aún utilizado como fuente principal de algunos compuestos químicos.(2,4)

Entre los metabolitos secundarios más utilizados por el hombre, se encuentran los colorantes para alimentos, que inicialmente se obtuvieron de forma natural, pero debido a la gran demanda comercial tuvieron que ser reemplazados, durante el siglo pasado, por productos sintéticos. (3,8)

En términos generales, los pigmentos naturales se pueden dividir en:

- 1.-Carotenoides.
- 2.-Clorofilas.
- 3.-Antocianinas.
- 4.-Flavonoides.
- 5.-Betalaínas.
- 6.-Taninos.
- 7.-Mioglobina y hemoglobina.
- 8.-Otros.

Los seis primeros se encuentran fundamentalmente en productos vegetales, aún cuando llegan a estar presentes en derivados de origen animal; por citar un ejemplo, que correspondería al colorante que se extrae de la grana o cochinilla del nopal.

En el séptimo grupo sólo se encuentran los productos de origen animal.

En el octavo grupo se incluye un gran número de compuestos que también implican el color tanto de los tejidos vegetales como animales; en él se incluyen quinonas; xantonas, la vitamina riboflavina como tal y en sus diferentes formas de coenzimas, los citocromos, etc. (3)

Aunque la producción de aditivos alimenticios, obtenidos mediante la utilización de microorganismos es de uso frecuente, se ha buscado el incremento en el uso del cultivo de tejidos vegetales, como otra alternativa, en la obtención de tales compuestos. Obviamente, el manejo del cultivo microbiano y el cultivo de células vegetales tienen ventajas y desventajas, pero cada organismo tiene ciertas características (tabla 1) que permiten reconsiderar el uso de microorganismos y plantas para obtener por diversos métodos, la materia prima, en la cual se tiene interés comercial.

Hasta la fecha la tecnología para el cultivo de células a escala industrial está en desarrollo, el costo y tiempo entre cada factor de producción de las plantas y el cultivo celular podrían en lo futuro, indudablemente estrecharse, especialmente por el alto valor químico que se puede obtener del dominio de esta técnica (Curtin 1983) (33).



BIBLIOTECA CENTRAL

Tabla 1 Comparación de algunas características entre las células microbianas y vegetales

Característica	cel. microbiana	cel. vegetal
Tamaño	$2\mu^3$	$>10^5 \mu^3$
Contenido de Agua	75%	90%
Tiempo de duplicación	1 hr.	días
Tiempo de cultivo	días	2-3 semanas.
Productos obtenidos	extracelulares	intracelulares
Mutación	posible	se requiere de células haploides

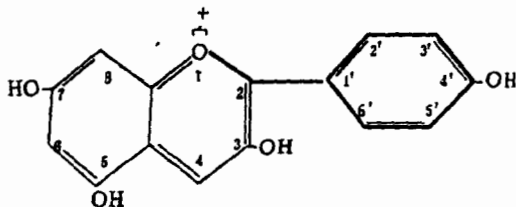
La consideración de las características de las células bacterianas en relación a las células vegetales, nos da una perspectiva de las ventajas de cada material de trabajo (Tomado de Ciencia y Desarrollo Vol. XVII No. 99).

#### ANTOCIANINAS

Las antocianinas, se encuentran ampliamente distribuidas en las gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Esto es respaldado por los trabajos de investigación realizados en *Tradescantia* (Yoshitama, 1978), en la familia bromeliaceae (Saito y Harbone, 1983), y también en las Comelinaceae, Compositaceae, Gentianaceae, Leguminosae, Liliaceae, Lobeliceae (Harborne, 1988), (Tabla 2).<sup>(21)</sup> La principal función de las antocianinas es la pigmentación de flores, hojas y frutos. De este tipo de colorante las formas más comunes son: la pelagordina, cianidina, delphinina, feonidina, pentunidina y malvidina. Además de caracterizarse por ser solubles en agua y su almacenaje en la savia vacuolar de las células maduras, esto permite que su localización sea común en la capa subdérmica de la corteza vegetal. (3,17,18,19, 26)

Generalmente, las antocianinas son de color rojo, azul y violeta. Su estructura química consiste en un grupo flavilio, que a su vez, está formado por una molécula de benzopirano unido a un anillo fenílico, esterificada con uno o más azúcares de los cuáles los más comunes encontrados junto con el colorante son D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-arabinosa y D-xilosa. (fig. 1)

Las antocianinas también pueden ser aciladas, esto es que al colorante se le puede unir un tercer componente a la molécula, ya sea una o mas moléculas de ácido p-cumárico, ferúlico, cafeínico, malónico, vinílico o ácido acético los cuales se unen a la molécula de azúcar. Estos datos sobre los flavonoides acilados y las antocianinas se encuentran registrados por Harborne y Boardley (1985), quienes examinaron 81 especies en 27 familias con incidencia en antocianinas, indicando los resultados, la acilación de la molécula del pigmento en el ácido dicarboxílico. Estudios análogos sobre la acilación de las antocianinas, confirmaron cierto grado de estabilidad, en los colorantes vegetales a consecuencia de la formación de este complejo acilado, tal es el caso de los pigmentos en el cultivo de *Ipomoea batatas* L., resultados que reportaron Bassa y Francis (1987).<sup>(22)</sup> En los cultivos de *Patroselinum sativum* L., la malonización de las mitades de glucosa está asumida a el último paso en la biosíntesis de los flavonoides glucósidos (Ebel y Hahlbrock, 1977). (3,5,17,18)



Pelargonidina (antocianidina)

Fig. 1 Una antocianina típica es la pelargonidina. Con la glucosa unida por un enlace glucósido en las posiciones 3 y 5, se convierte en la antocianina pelargonidina. (Tomado de Edwin T. Mertz.)

El color de cada antocianina depende de su estructura química, del pH y de la presencia de sales con las que interaccione. (3) Esta característica fue sugerida en 1931 por Robinson y Robinson, donde se intuye que la variación en el color de flores y frutos podría ser causada por la co-pigmentación de las antocianinas con flavonoides y las substancias relacionadas. (19) Su uso como colorantes en la fabricación de alimentos no se ha implementado ya que son poco estables y difíciles de purificar para su uso como aditivos. (3,19)

Las antocianinas se destruyen fácilmente al interactuar con los peróxidos provenientes de la degradación de vitamina C, por lo que la oxidación del ácido ascórbico puede implicar una pérdida de pigmentos; Aunque los mecanismos de esta reacción no son completamente claros. (3,17)

Una forma generalizada de identificación de las antocianinas se ha valido de los espectros de absorción, los cuales oscilan entre 400 y 500 nm, pero esta característica colorimétrica varía de acuerdo al pH en que se encuentra la substancia a probar; como es el caso de las antocianinas en arándanos realizado por Servadio et al., (1963), en donde utiliza un rango de absorción de 535/415, en otra investigación para el jugo arándano dirigida por Francis et al., (1963), el rango utilizado en el espectro de absorción es de 515/415, en similares investigaciones pero con distintos frutos como para el jugo de fresa se requirió unas medidas de absorción que se encuentran entre 440/500 nm (Lukton et al., 1956), para uva y jugos de bayas 420/520 (Pointing et al., 1960) , así también la investigación realizada por Ribereau - Gayon, en 1964, en la cual se utilizó en vino de uva y se basó en el mismo parámetro de absorbancias, 420/520 nm, y para el caso del vino de cereza se empleó medición de absorbancia entre 520/430 (Fuleki, 1965). Contrariamente a las variantes del pH, Teh y Francis (1988), confirmaron la estabilidad de los pigmentos antocianinicos, a distintos valores de pH, en la bebida preparada con Zebrina pendula Schn. (17,20,21,23)

La incidencia de antocianinas y flavonoides en muchas especies de plantas sugieren que este colorante y los flavonoides estén cercanamente relacionados con respecto a sus vías biosintéticas (Ebel y Hahlbrock, 1982). (18)



**Tabla 2 ALGUNOS CULTIVOS DE CELULAS VEGETALES QUE MUESTRAN FORMACION DE ANTOCIANINAS**

VEGETAL	CULTIVO	MEDIO	PIGMENTO
<u>Zea mays</u> L.	Callo	?	Cianidina pelagordinidin
<u>Daucus carota</u>	cultivo en suspensión	Lin and Staba (1961)	Cianidina
<u>Populus</u> ( <u>hibridis</u> )	cultivo en suspensión	LS*	Cianidina
<u>Catharanthus</u> <u>roseus</u>	Cultivo en suspensión	MS**	Malvidina petunidina

\* LS, Linsmainer and Skoog (1965) (Esta tabla fue tomada y modificada de Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plant; Vol. 5; 1988)

\*\* MS, Murashige and Skoog (1962)

#### FLAVONOIDES:

Los flavonoides amarillos y naranjas comprenden un diverso grupo de pigmentos, con la estructura química similar a la de las antocianinas, pero son mas estables que las antocianinas al calor y a las reacciones de oxidación; entre los flavonoides más comunes tenemos el kaempferol, quercitina y miricetina. Los cuales están presentes en casi un 50% de las plantas. (3,17)

Los flavonoides existen en forma glicosada (fig. 2), junto con la glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa, xylosa o el ácido gluconico. Los sitios de substitución son variados pero las posiciones 3, 4, 5 y 7 son las más usuales. En contraste con las antocianinas la posición 7 es el sitio mas frecuente de las substituciones por que es el que presenta acidificación de los grupos hidroxil. (17)

En otro aspecto, los flavonoides en los alimentos no han sido extensamente investigados. Posiblemente por la falta de buenos métodos analíticos. Los métodos que se utilizan están basados sobre la medición de la absorción de los compuestos flavonoides, en un rango de 300 a 400 nm. (17)

Sin embargo, algunos flavonoides y sus derivados tienen efectos fisiológicos en el hombre, ya que se ha encontrado que forman parte de los principios activos de varios fármacos que se utilizan desde hace tiempo. Por ejemplo una supuesta vitamina P, la que en realidad es un flavonoide cítrico y se le atribuyó una función de mantener la adecuada permeabilidad capilar del sistema circulatorio humano. Encontrándose en mayor concentración en la cáscara de los limones y naranjas que en su jugo. En otro aspecto, se ha visto que los flavonoides pueden actuar como inhibidores de la oxidación del ácido ascórbico en algunos alimentos. (3,17)

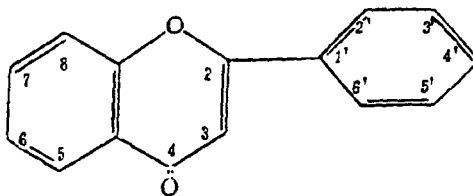


Fig. 2 Estructura general de los flavonoides (Tomado de Edwin T. Mertz).

### BETALAINAS

De la clasificación anterior, uno de los pigmentos más utilizados comercialmente, es el que se encuentra en el quinto grupo (betalainas); las cuales constituyen aproximadamente un conjunto de 70 pigmentos hidrosolubles, con estructuras de glucósidos, conteniendo dentro de sí por lo menos un átomo de nitrógeno heterocíclico (fig. 3)(9), son derivados de la 1,7-diazoheptametina, y se han dividido en dos grandes clases; los rojos-púrpura o betacianinas y los amarillos-naranja o betaxantinas. En los trabajos que se realizaron en el cultivo de células de *Opuntia microdasys* (Lehm.) (29); se confirmó que el espectro de absorción de las fracciones principales del colorante son para las betaxantinas (480 nm) y para las betacianinas (540 nm). Este compuesto se encuentra en tallos, frutos y flores, entre la que destaca con mayores concentraciones el betabel (*Beta vulgaris* L.), además de encontrarse también en otras 5 o 10 familias del orden centrospermae. (Tabla 3) (3,5,9,10,11,17,26,29,44)

Las betalainas se localizan específicamente en las vacuolas de los tejidos vegetales (Mabry y Dreiding, 1968). Algunos autores (Tabbata, 1977, Berlín et al., 1986; Böhm et al., 1987, Sakuta M, et al., 1986), han observado que la máxima concentración de estos pigmentos en el cultivo de tejidos, puede alcanzarse en la fase estacionaria del proceso de crecimiento o por lo contrario se presenta en la

fase logarítmica del desarrollo celular, como se observó en cultivos realizados con *Phytolacca americana* L. (Sakuta et al., 1986). (6,7,9,11,29,44)

Intervienen en el proceso de biosíntesis de betalainas muchos factores y condiciones; como la luz, que es eficaz en algunas especies para incrementar e inducir igualmente la síntesis y acumulación del pigmento, de igual forma se ha observado que el proceso es controlado por influencia de la temperatura, pH; y el ciclo DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) el cual, se implica como un importante precursor de metabolitos secundarios. (7,9,47)

Algunos otros estudios sobre pigmentos betalámicos, se han realizado en semillas de *Amaranthus tricolor* L. (Elliot, et al., 1983); esto se debe a que la estructura del pigmento asemeja a la de la betanina y ha sido utilizada para colorear diversos alimentos (3,36). Pero principalmente, los datos más extensos obtenidos sobre las betalainas son los obtenidos en los estudios realizados en los cultivos del betabel. (3)

Entre otras características de las betalainas es el de ser sensible a cambios de pH, altas temperaturas, oxígeno, luz y actividad acuosa (3,6,36); esto último significa, que las betaninas presentan inestabilidad debido a la cantidad de humedad existente en el alimento; por esa razón se debe de almacenar el producto con la menor cantidad de agua posible. (3)

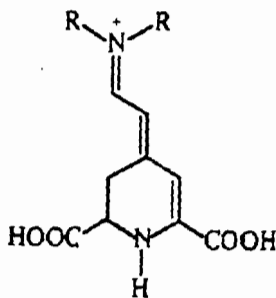


Fig. 3 Fórmula general de las betalainas (Tomado de T. J. Mabry "Betalains"; revisión bibliográfica No. 10).

**Tabla 3 CULTIVOS DE CELULAS VEGETALES QUE MUESTRAN FORMACION DE BETALAINAS**

VEGETAL	EXPLANTE	CULTIVO	MEDIO	PIGMENTO
<u>Amarantus caudatus</u> L.	?	Callo	B5* modificado	Betalainas
<u>Myrtillocactus geometrizans</u> (Mart.)	Segmento de tallo	Callo	LS**	Betaninas filocactina indicaxantinas
<u>Beta Vulgaris</u> L.	semillas	Cultivo en suspensión	B5 modificado	Betaninas Betaxantina
<u>Phytolacca americana</u> L.	Segmento de tallo	Cultivo en suspensión	MS*** modificado	Betacianina Betaninas
<u>Portulaca grandiflora</u> Hook.	Segmento del internodo	Callo	White, MS modificado	Betaninas

\* B5, Gabor et al., (1968)

\*\* LS, Linsmainer and Skoog (1965)

\*\*\* MS, Murashige and Skoog (1962)  
White (1963)

(Esta tabla fue tomada y modificada de Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plants Vol. 5, capitulo 26, 1988)

#### IMPORTANCIA DEL METABOLISMO CELULAR Y LOS METABOLITOS SECUNDARIOS:

Se considera al metabolismo celular como el conjunto de procesos físicos y químicos, por virtud de los cuales se produce y conserva la substancia viva organizada; con transformaciones que permiten la utilización de la materia y de la energía por parte del propio organismo.

La importancia del metabolismo de las células vegetales, en el cultivo de tejidos, es notable, ya que todo proceso metabólico se ve afectado por el ambiente que circunda a las células mismas; así pues, encontramos una gran variedad de publicaciones las cuales tratan con ahínco este tema en el cual se denotan las observaciones de los efectos de la composición de los medios en la producción celular o acumulación de metabolitos secundarios. (3, 7, 8, 11, 16, 19, 47, 50, 51, 23)

Los metabolitos secundarios son sintetizados a partir de metabolitos primarios. Por lo tanto, un número de alcaloides, saborizantes y otros aromáticos son compuestos obtenidos de metabolitos primarios tales como: fenilalanina, tirosina y triptofano. Esta relación se representa en una red morfológica, bioquímica y de reguladores genéticos quedando como una clave para la producción de los metabolitos secundarios. (33)

#### SINTESIS METABOLICA DE ANTOCIANINAS Y FLAVONOIDES:

Actualmente, los procesos metabólicos para la producción de colorantes, no son bien conocidos, pero se tiene idea de parte de este proceso. Por ejemplo, el ciclo DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina), es considerado como el principal precursor de metabolitos secundarios, y a partir del cual se establecen dos vías alternativas para la formación de tales compuestos; en el caso de la configuración de antocianinas y flavonoides, pigmentos que están cercanamente relacionados en cuanto a su origen y características fisicoquímicas. (18,26)

Las vías que conducen a los flavonoides o antocianinas, como se mencionó anteriormente, pueden ser subdivididas en dos partes: (1) la vía general fenilpropano, que inicia con la fenilalanina y nos conduce a la hidroxicinamol-CoA tioesteres, y (2) la vía flavonoide- (acyl)- glucósidos, permitiendo la formación de la chalcona posteriormente conduciéndonos a los conjugados flavonoides. (18)

Considerando los reportes sobre la regulación de las actividades enzimáticas responsables de la biosíntesis de los flavonoides, entonces, dos han sido las posibles llaves enzimáticas: la fenil-amonía-liasa (PAL) y la chalcona sintetasa, ambas empiezan a situarse en los extremos de la vía metabólica; PAL conduce generalmente a la vía fenilpropano (vía I) y la chalcona sintetasa a la vía flavonoide (vía II). (18)

Además, se ha propuesto que en las enzimas y las reacciones de la vía del fenilpropano, es necesaria la biosíntesis de la chalcona (Chalcona sintetasa), para la formación de antocianinas y de los flavones se ocupa de la (chalcona isomerasa). Y en algunos reportes recientes, mencionan que los productos primarios de la chalcona sintetasa son las chalconas y no los flavonoides (fig. 4), como se demuestra en la investigación de las enzimas de *Patroselinum sativum*, realizada por (Heller and Hahlbrock, 1980) y un ensayo de las influencias de los bajos valores del pH (Sütfeld and Wiermann, 1980). (18)

Posteriores investigaciones puntualizan la importancia de los dihidroflavonoides, (dihidrokaemferol, dihidroquercetina) como los precursores de la biosíntesis de las antocianinas (Fritsch et al., 1971; Fritsch and Gresebach, 1985). Sugiriendo de esta forma que los dihidroflavonoides son la última etapa durante la biosíntesis de antocianinas y es el lugar donde el 3'-hidroxy puede ser introducido para concretar la creación del pigmento (Heller et al., 1985). (7,9,18,47,51)

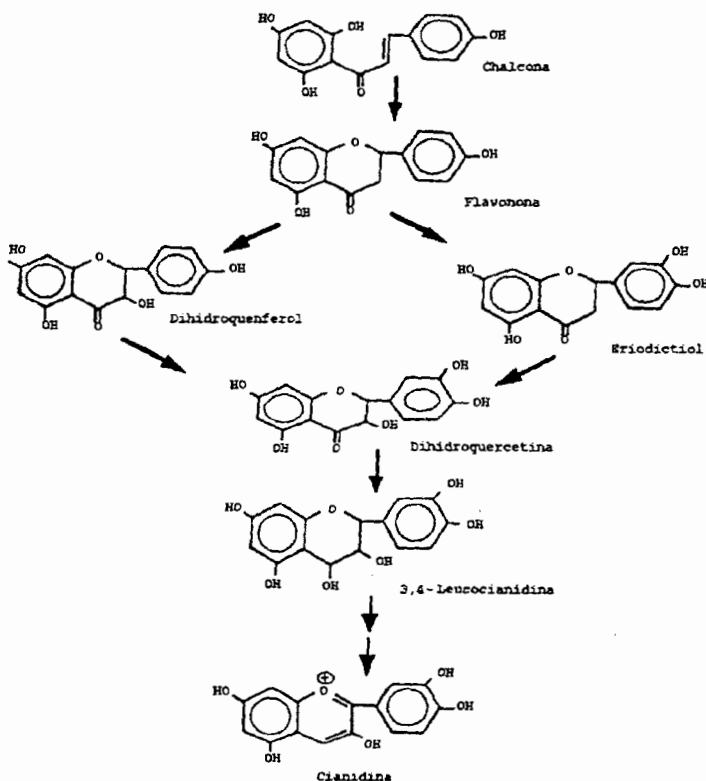


Fig. 4 Esquema de la posible vía enzimática de la cianidina (Tomado de H. U. Seitz y W. Hinderer "Antocyanins").

## REGULACION Y FORMACION DE BETALAINAS:

Las betalainas pueden darse naturalmente en la forma acyl, de una manera similar a la creación de las antocianinas y flavonoides, pero el modelo es más complicado. (17)

En forma general, los detalles acerca de las enzimas y cofactores que controlan la biogénesis de las betalainas no son aún totalmente comprendidas (Piatelli, 1976). (10)

El proceso de biosíntesis puede ser controlado por muchos factores y condiciones, al respecto de este punto, algunos autores consideran necesaria la síntesis de catecolaminas para permitir la viabilidad de DOPA, como se describe en la investigación realizada en los callos de *Portulacca grandiflora* (Endress, 1977; Endress et al., 1984). (9) En contraparte, en muchos experimentos se ha propuesto, que la incorporación de tirosina a DOPA permite su hidrolización (fig. 5), la cual se sabe ocurre entre la cuarta y quinta posición, intuyendo la existencia de una enzima responsable para consumir esta reacción, la cual, fue indirectamente caracterizada en los experimentos realizados por Endress (1977, 1979). A partir de este momento, en la vía metabólica, se tienen dos moléculas una de las cuales sufre una reciclación (ácido estizolobico) y en la otra se origina primeramente una acilación y posteriormente se puede suceder una glicolización, resultando de esta última reacción en la formación del ácido betalámico y a su vez de una larga variedad de pigmentos púrpuras. Pero si en el mismo ácido betalámico se adicionan aminoácidos o aminas, el producto final serán las denominadas betaxantinas; este proceso solamente se ha observado en las centrospermas y los hongos. (9,10)

Debido a que existen pocos datos sobre la síntesis de betalainas, los datos pueden parecer vagos, pero si los pasos de la biosíntesis y su regulación de antocianinas, flavonoides y betalainas se conocieran con más detalle, así como el aislamiento de las enzimas responsables, la obtención de los pigmentos sería más eficiente. Además como se describió, la formación de tales compuestos esta determinada por el ciclo DOPA, siendo la base que permite la formación tanto de un pigmento como el de otro, esto no significa que los dos colorantes (antocianinas y betalainas) se puedan encontrar en la misma especie o en distintas especies de la misma familia (Kimler et al., 1970).

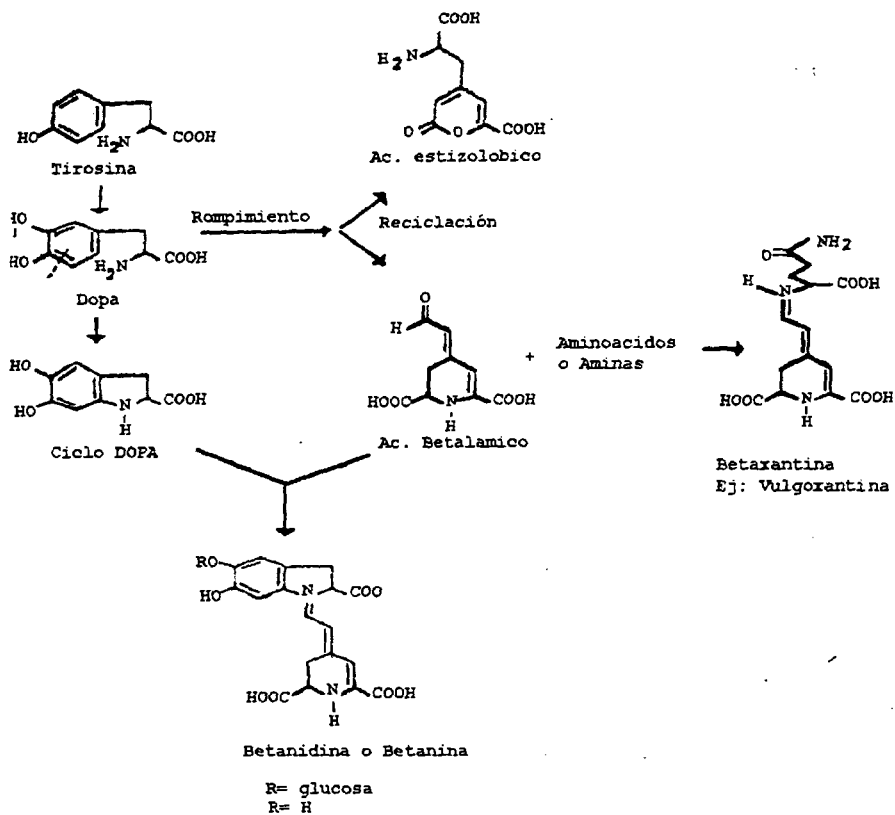


Fig. 5 Esquema probable para la biosíntesis de betalainas (tomado de "Betalains", H Böhm y É Rink).



## IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS:

Lo que ha incrementado el estudio de los cultivos de tejidos y la obtención de colorantes naturales, es que en los últimos años se han eliminado del mercado varios colorantes rojos sintéticos por considerarlos tóxicos; ejemplo de ello, el rojo número 40, se clasifica como CI 16035, es un polvo rojo oscuro, estable a pH ácido, soluble en agua (22 g/100 ml.) y en etanol al 50% .

La consecuencia de lo anterior, es que en varios países industrializados se ha incrementado la demanda de los pigmentos naturales; debido a la creciente atención que dispensan los consumidores a los productos llamados " de origen natural".(3,6,23)

Para satisfacer la demanda industrial, es necesario pues establecer en bases sólidas las técnicas de los cultivos de tejidos; con el propósito de solucionar los desafíos impuestos por el reino vegetal en la producción química. Considerando que la producción agrícola está determinada de un incontrolable factor ambiental tales como sequías, calor, frío y pestes que pueden afectar grandemente la cantidad y calidad de los químicos deseados.(14)

En muchas instancias será necesario desarrollar un medio de cultivo específico para la producción química; ya que la optimización del medio no puede ser estandarizada por los distintos requerimientos nutricionales de las plantas, esto viene a convertirse en un factor crítico en la escala de productividad de los cultivos celulares (Tabla 4).

**Tabla 4 COMPUESTOS OBTENIDOS A TRAVES DEL CULTIVO DE TEJIDOS**

COMPUESTOS	ESPECIES	UTILIZACION
Antraquinonas	<u>Galium aparine</u> <u>Morinda citrifolia</u>	Colorantes
Berberina	<u>Coptis japonica</u> <u>Thalictrum minus</u>	Tónico colerético antipalúdico
Cafeína	<u>Coffea arabica</u>	Tónico cardíaco
Ginsengósido	<u>Panax ginseng</u>	Tónico amargo
Ácido rosmarinico	<u>Coleus blumei</u>	antioxidante, colerético
Shikonina	<u>Lithospermum</u> <u>erythrorhizon</u>	Cicatrizante colorante
Tripdiólido	<u>Tripterygium</u> <u>wilfordii</u>	Anticanceroso
Ubiquinona 10	<u>Nicotiana tabacum</u>	cofactor enzimático

Esta tabla da algunos ejemplos de cultivo *in vitro* de células; donde en todos los cultivos se acumulan metabolitos en cantidad igual o superior a la de la planta original. (Tomada de Mundo científico "La Recherche" versión castellano No. 2).

#### COMPOSICION DE LOS MEDIOS:

En el aspecto de los elementos constituyentes del medio de cultivo es necesario considerar que aunque todas las plantas tienen requerimientos simples para su crecimiento, el cultivo de tejidos vegetales es más complejo, ya que las células son rara vez autotróficas, bajo estas condiciones de crecimiento. (15, 1, 12, 32) Dichos nutrientes de acuerdo a distintas investigaciones como las de: Piatelli 1976, Constabell & Nassif - Makki 1971, Koehler 1972, Nicola et al., 1973, 1974, Biddington & Thomas 1977, Stobart & Kinsman 1977, Eliot 1979, Kochhar et al., 1981, entre otros, determinaron que los compuestos químicos que constituyen un medio de cultivo celular que delimitan en gran parte la producción bioquímica. Es decir, que los medios de cultivo para células vegetales se clasifican en medios de crecimiento y medios de mantenimiento. Y los componentes principales de un medio de cultivo son los siguientes: (4)

#### A) SALES INORGANICAS:

Las células requieren de soluciones isotónicas para su crecimiento óptimo. En este grupo encontramos principalmente sulfatos, nitratos, fosfatos, cloruros y carbonatos en concentraciones de g/L; que varían de acuerdo al medio que se esté utilizando. (4)

#### FUENTES DE NITROGENO:

Entre las fuentes establecidas de nitrógeno se utilizan principalmente el amonio y los nitratos. De los medios complejos se han empleado el agua de coco, extractos de levadura, de maíz o de malta. Sin embargo el amonio puro, ha comprobado en algunos cultivos ser poco efectivo para el crecimiento celular y se le usa preferencialmente en las primeras etapas de los cultivos (Dougall, 1980). (1,4,12,15,26,32)

Los efectos de la concentración de amonio y nitrato de los medios B5 y MS, en las investigaciones reportadas, nos muestran que la velocidad de crecimiento del cultivo se puede ver afectada (Berlín et al., 1986), pero no se inhibe la cantidad de betacianinas en los cultivos de Beta vulgaris como lo dieron a conocer Constabel y Nassif-Makki en 1971; con iguales resultados fue lo reportado por Dougall et al., (1983), Yamakawa et al., (1983) y Tal et al., (1982) para la producción de antocianinas. (9,18, 26)

No obstante, en los cultivos de Portulacca grandiflora se reemplazó el amonio y el nitrato de los medios MS, y en los cuales se observó un incremento de betacianinas. (9)

#### FOSFATOS:

Con relación al fósforo como sal inorgánica, se tiene que está claramente implicada su concentración, como factor de crecimiento, ésta afirmación la encontramos en los estudios hechos en los cultivos de Phytolacca americana y Agrostema githago; donde el resultado se constituyó por un incremento celular y su consecuente acumulación de betacianinas, el cultivo de Phytolacca. (11,26) En los cultivos celulares de Catharanthus roseus L. (Knobloch et al., 1982) y Vitis (Yamakawa et al., 1983) las altas concentraciones de sacarosa y las pequeñas cantidades de fosfatos y nitratos indujeron a la formación de las antocianinas; lo contrario ocurrió en los cultivos de Dimorphoteca sinuata, Ball y Arditte (1974), y Petunia hybrida Hort. (Colijn et al., 1981). (18,26)

## TRAZAS DE ELEMENTOS:

Para satisfacer los requerimientos de algunos iones se adicionan yoduros, boratos, manganeso, zinc, molibdeno, cobre y cobalto, en concentraciones que van de 2.5 a 20 mg/L. (4)

Dentro de los elementos inorgánicos que son más utilizados en los medios de cultivo está el cobre, el cual, tuvo una respuesta inhibitoria en los cultivos celulares de Portulacca grandiflora, pero su actuación fue distinta cuando se adicionó al medio MS y White respectivamente. (9) De la misma manera como ocurrió en los estudios donde se pretendió mejorar la acumulación de shikonina en las células en suspensión de Lithospermum erythrohizon (Yamada y Fujita, 1983), donde el cobre, los nitratos y sulfatos fueron componentes críticos para lograr los objetivos deseados. (4,15)

En algunos estudios se ha observado que la presencia de iones puede mantener la estabilidad de algunos alcaloides, pero con la condición de que los valores del pH sean bajos. (17) Principalmente los pigmentos de las flores se caracterizan por contener cationes como el aluminio, potasio, hierro, cobre, calcio y estaño, así como también se tuvo la presencia de aminoácidos, proteínas, pectinas y carbohidratos. Atribuyéndose en algunos estudios, que la formación de estos complejos alcaloides proporcionan estabilidad o producen algunos cambios, en mayor o menor grado, de las características cualitativas de algunos colorantes. (3,27,28,29)

## B) COMPUESTOS ORGANICOS:

La adición de carbón orgánico, tal como la sacarosa, fructuosa, lactosa o maltosa, en los cultivos vegetales, es necesaria para casi todos los cultivos de tejidos; ya que hay evidencia que la producción de algunos metabolitos se ve afectada por la presencia o ausencia de la fuente de carbono en el medio nutritivo. (4,15,26,27,32,51)

Por ejemplo, una reducción de la concentración de la sacarosa y sales incrementa la inducción de raíces adventicias en el crecimiento celular *in vitro*. (15) En caso contrario la presencia de sacarosa nos suministra de un óptimo crecimiento de las células vegetales, pudiendo ser variables los resultados cuando se utilizan mono o disacáridos. (17,39) Sólo ocasionalmente se emplea la glucosa en los cultivos de monocotiledóneas, así como la fructuosa y el almidón para otras especies. (1,26)

En lo que respecta al mio-inositol comúnmente se agrega a los medios como un factor de crecimiento utilizando una concentración de 100 mg/L. (12)

### C) SUSTANCIAS HORMONALES:

Las hormonas en las plantas intactas actúan para regular y coordinar los procesos que conducen a su normal desarrollo. El crecimiento, así como su diferenciación de tejidos celulares y metabolitos secundarios está afectada por estas hormonas. (12,27,51) Aún así, también un número de reguladores se implican como promotores de cambios genéticos, especialmente en ciertos cultivos. (14)

Las hormonas utilizadas en los cultivos de tejido vegetal se pueden clasificar en dos básicamente. Primeramente las auxinas, las cuales son una clase de componentes que estimulan la elongación celular; y todas las hormonas semejantes a las auxinas que son aplicadas a la técnica de cultivo de tejido celular son parecidos al ácido indol-3-acético [IAA], en su actividad espectral. (12,17,51)

El ácido indol-3-acético (IAA) es el que generalmente se usa para los cultivos celulares, por el hecho de que tiene pocos efectos adversos sobre la organogénesis con respecto a otro tipo de auxinas. Pero también el IAA puede sustituirse por otras auxinas, las cuales son más estables como el ácido naftalen-acético (NAA) y el 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), ésta última es de uso frecuente, ya que tiene la característica de que es un fuerte supresor de la organogénesis y promotor de la división celular. (12,25,26,31,50) En algunos cultivos si se reemplaza el 2,4-D por la hormona ácido naftalenacético (ANA), conduce a la formación de betacianinas en los cultivos de algunas variedades de Beta vulgaris; de igual forma es el procedimiento realizado en la obtención de serpentina en los cultivos de C. roseus. (9,37) No obstante, existen reportes en los cuales se especifica la presencia de alguna auxina para la acumulación de antocianinas. (18,26,47,53) De igual manera otras investigaciones reportan que para la formación de los metabolitos secundarios y antocianinas no es necesaria la presencia de auxinas en el medio de cultivo sino simplemente el uso de la luz (Alfermann y Reinhard, 1971; Sugano y Hayashi, 1967; Ozeki y Komamine 1981, 1982). (18,26,27,51)

La otra clase de regulador de crecimiento muy utilizado en los cultivos de tejidos son las citocininas las de mayor actividad son la N6-Isopentalaldenina y la N6-Bencilaldenina (BA). Estos compuestos particularmente promueven la división celular en los cultivos de tejido bajo

ciertas condiciones de bioensayo, además de ayudar en la regulación del crecimiento y el desarrollo celular; actuando de la misma manera que la cinetina (6-furfurylamino purina). (12) El tratar de simular la actividad de la cinetina está relacionada por el hecho que a la hormona se le ha implicado en la síntesis de betalainas y de antocianinas en los cultivos de Daucus carota L., al estar estos cultivos ausentes las auxinas (Ozeki y Komamine, 1982). En contra parte, muchas especies vegetales, han arrojado resultados donde la cinetina, actúa marcadamente con un efecto inhibitorio sobre la promoción de las antocianinas, en los cultivos en suspensión de Populus (Matsumoto et al., 1973), y sin embargo, los detalles reales acerca de las enzimas y cofactores que controlan la biosíntesis de colorantes no son aún completamente entendidas. (Piatelli, 1976), (12, 18, 51)

De cualquier forma, no se puede mecanizar bajo un modelo los requerimientos de hormonas en los cultivos de tejidos, porque estos dependen de la especie, pero es importante denotar que las sustancias reguladoras del crecimiento juegan un papel importante en la diferenciación morfológica y metabólica de los cultivos vegetales, esto ha dado lugar a la realización de muchos trabajos sobre los efectos de los reguladores de crecimiento en los vegetales, Por ejemplo los trabajos realizados por Dougall (1980). (26)

#### D) VITAMINAS:

Las vitaminas tienen una función catalítica en los sistemas enzimáticos celulares y se requieren solamente en pequeñas cantidades. Algunos investigadores consideran que la tiamina (vitamina B1) puede ser la única en la que parece hay un requerimiento constante para el crecimiento de los tejidos *in vitro*, pero otras vitaminas pueden ayudar a simular el crecimiento tal como el ácido nicótico (niacina), la piridoxina (vitamina B6), riboflavina y el ácido pantoténico; los cuales se adicionan en concentraciones que van de 0.01 a 4 mg/L. (Gamborg et al., 1976; Kao, 1977) (1, 4, 12, 31, 32).

#### E) AGUA:

El agua empleada en el cultivo de tejidos incluyendo el agua usada durante el proceso del cultivo deberá ser bidestilada o desmineralizada y posteriormente destilada; en cualquier caso, es obligatoria la destilación como paso final. Es recomendable que el agua para el cultivo de tejidos no se almacene durante muchos días (15 días aproximadamente); y menor deberá ser el tiempo de conservación, si el agua es colocada en contenedores de

polietileno, porque estos recipientes tienden a conservar residuos de elementos en sus paredes, los cuales, se incorporan a las aguas destiladas que se guarden en el mismo recipiente posteriormente, aumentando de esta manera la cantidad de sustancias que pudiera tener el nuevo líquido a almacenar; en consecuencia convertirse en compuestos tóxicos a los cultivos (Robinnis & Harvey, 1974,)(4, 12).

#### FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO CELULAR:

##### ILUMINACION:

Otro de los factores tal vez de no menor importancia, está en la consideración de los efectos que ocasiona la luz sobre el medio de cultivo vegetal; ya que de acuerdo a los datos experimentales (e.g., Rast et al., 1972) la luz no se considera como un requisito general para la síntesis de betalainas en las plantas superiores. Y sin embargo, otras investigaciones de muestran que la acumulación de los pigmentos parecen insinuarse a mayor velocidad bajo la iluminación que en la obscuridad; como fue el caso de los cultivos de tejidos de Portulacca grandiflora (Leibisch & Böhm, 1981; Böhm et al., 1987) y Beta vulgaris (Girod y zrijd, 1985), reportes en los cuales se observó una intensa pigmentación de las células bajo la influencia de la luz, y esos mismos cultivos se fueron decolorando durante los subcultivos en la obscuridad. Ejemplos de acumulación de pigmentos en la obscuridad han sido las investigaciones llevadas a cabo en los cultivos de Strobilathes dyeriana M. T. Mast (Smith et al., 1981) Vitis hybrida L. (Yamakawa et al., 1983), y muchos de los cultivos de Daucus carota (Alfermann y Reinhard, 1971; Schmitz y Seitz, 1972; Noé et al., 1980; Ozeki y Komamine, 1981; Harborne et al., 1983). (9, 18, 23, 30, 51)

Otros estudios proponen que la formación de colorantes (antocianinas) puede ser el efecto de la luz azul en particular, ya que ésta tiene una gran cantidad de energía, pero el mismo efecto de acumulación no se logra con la aplicación de luz roja (Reinert et al., 1964); Este mismo efecto fue observado en el cultivo de Populus hybrida, donde la luz azul fue más efectiva (Matsumoto et al., 1973). (18)

La luz también es objeto de muchas observaciones en lo que se refiere a la estabilidad de los colorantes, por Ejemplo, en los trabajos realizados en los cultivos de Rosella (Hibiscus sabdariffa L.), se observó una buena estabilidad a la luz, aunque el sabor del colorante obtenido fue desagradable. (24) De la misma forma, en los experimentos realizados a partir de soluciones a base de cianidina, la luz constituyó un factor importante en la degradación del colorante. (23)

## **pH:**

Además, el pH es otro elemento que determina el éxito de muchos medios de cultivo, ya que se considera puede afectar la promoción del crecimiento y la selectividad de los mismos medios de cultivo vegetal, por eso muchos de los medios usualmente están ajustados a un pH que oscila entre 5.0 a 6.0. (3,15,51)

## **AMORTIGUADORES:**

La selección del amortiguador adecuado para cada cultivo es crítica para los parámetros operacionales particulares del sistema que se trabaje. Generalmente se emplean mezclas de fosfatos alcalinos y bicarbonatos, succinato de sodio/ácido succínico y barbituratos.(4)

De esta manera generalizada pretendemos reiterar la importancia de que el medio en sí puede ser un factor crítico en el desarrollo del cultivo celular.

## **3.-JUSTIFICACION:**

El hombre ha buscado siempre los mejores medios de multiplicar las plantas que utiliza o de crear variedades más adecuadas a sus necesidades. Las técnicas clásicas de propagación de especies son generalmente muy lentas; el hecho de lanzar una nueva variedad al mercado requiere de mucho tiempo dinero y esfuerzo. Aspecto que actualmente, con las técnicas de cultivos celulares se puede realizar más rápida y eficazmente, pudiendo reducir drásticamente tiempo y costos de producción.

La técnica de cultivo de tejidos, además de lograr una mayor producción de materia prima, nos abre campos en el ámbito ecológico, al permitir la producción en masa sin la destrucción de hábitats o especies tanto animales como vegetales.

Como se ha logrado con la producción de la shikonina, el cual es un producto utilizado como colorante principalmente en la industria del vestido y en la de cosméticos. Además se ha utilizado este metabolito secundario, como principio activo para la elaboración de algunos fármacos auxiliares en el tratamiento de heridas, quemaduras y hemorroides (Curtin, 1983). (4,14,53)



La técnica de cultivo celular ha despertado mucho mayor interés, principalmente por sus múltiples ventajas, entre algunas de las cuales destacan:

- 1.-Independencia de los factores ambientales.
- 2.-Mayores posibilidades de control genético.
- 3.-Mayor uniformidad en cuanto a calidad y rendimiento.
- 4.-Mejores rendimientos en la obtención de la materia prima.
- 5.-Pigmentos con menor cantidad de sabor y olor.(4,6)

Las investigaciones del cultivo celular además de procurar satisfacer la demanda de materia prima natural, pretende abarcar aspectos tales como el mejoramiento de la tolerancia de las plantas, a condiciones adversas del medio ambiente, que pueden ocasionar modificaciones del color, sabor, aroma y textura, del producto químico requerido. Finalmente, se pretende alcanzar los objetivos propuestos, desde una perspectiva económica, donde se intenta que la producción química agrícola, se vea aumentada por la conducción biotecnológica de las cosechas; mejorando además la situación ambiental, al evitar la extinción de distintos tipos de especies vegetales altamente explotados.

#### 4.-HIPOTESIS:

Por medio del cultivo en suspensión de las células de pitayo es posible obtener un colorante en donde no se dependa de las condiciones ambientales y dicho colorante pueda tener interés en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmetológica.

#### 5.-OBJETIVO GENERAL:

Seleccionar un medio de cultivo para la producción de un colorante a partir del cultivo de células en suspensión de Stenocereus queretaroensis.

#### 6.-OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.-Probar distintos medios de cultivo reportados en la literatura para la producción de colorantes.
- 2.-Seleccionar el medio de cultivo de mayor rendimiento en la propagación celular.
- 3.-Observar el efecto de la agitación sobre la viabilidad en el medio seleccionado.

## 7.-MATERIALES Y METODOS:

### MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizaron las semillas de Stenocereus queretaroensis (pitayo). Planta candelabroforme hasta de 9 m, ramas erectas, con tronco bien definido y corto, con 6-8 costillas, espinas de 8-13, areolas distantes como 1 cm; fruto muy espinoso, espinas claras; flores con tubo receptacular relativamente corto y más o menos tubular, las flores de 7-8 cm. Su ubicación geográfica: Querétaro, Jalisco, Aguascalientes, Michoacán y Guerrero. (28)

### SELECCION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:

Los compuestos básicos nutricionales de los medios seleccionados, fueron adaptados, con respecto a la especie vegetal usada; esto es debido a que ningún tipo de cultivo tiene los requerimientos únicos de uno o más nutrientes, para llevar a cabo los resultados deseados (Gamborg y Wetter 1975; Thorpe, 1981; Evans et al., 1981; Hughes et al., 1978). (31,32)

El medio sugerido por Murashige y Skoog (MS) (1962), fue elegido ya que la composición de las sales que propone, ha sido utilizada con muy buenos resultados en la proliferación de diversos tipos de cultivos de células vegetales, lo que sugiere que es un medio versátil, particularmente si el objetivo deseado es la regeneración de la planta. El segundo medio seleccionado B5 Gamborg et al., (1968); se utilizó por recomendación de un grupo de investigación el CEPROBI (Centro para el desarrollo de productos bióticos) que obtuvo buenos resultados en la extracción de betalainas, a partir del cultivo de células de betabel. Este medio originalmente es designado, para los cultivos de callos, pero también ha sido efectivo en métodos de regeneración vegetal. La mayor distinción entre el medio MS y el B5 es la baja cantidad de nitratos y especialmente de amonio que tiene el medio B5 (31,32,35,38,51).



Fig. 6 La preparación de los medios requiere que la mezcla de las soluciones Stock sean en cantidades exactas y que sigan un orden riguroso.

#### ELABORACION DE LOS MEDIOS:

Las soluciones Stock, por conveniencia, fueron preparadas en series de concentración final 10x. (fig. 6) Estableciendo grupos de soluciones nutrientes, denominados como: soluciones mayores, menores, solución del cloruro de calcio, solución del sulfato férrico, vitaminas y hormonas. A partir de la solución de cloruro de calcio los grupos fueron mantenidos bajo refrigeración. (30,31,32, 51)

**Tabla 5 MEDIOS DE CULTIVO**

MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG (1962)	CANTIDAD EN ml	MEDIO B5 GAMBORG (1968)	CANTIDAD EN ml
PREPARACION DE UN LITRO		PREPARACION DE UN LITRO	
SOLUCIONES MAYORES	10	SOLUCIONES MAYORES	10
SOLUCIONES MENORES	5	SOLUCIONES MENORES	5
CaCl <sub>2</sub>	22	CaCl <sub>2</sub>	22
VITAMINAS	10	FeSO <sub>4</sub>	10
SACAROSA	30	VITAMINAS	10
		SACAROSA	20

La tabla 5 nos muestra los grupos de soluciones ya preparados, y los cuales van a servir como constituyentes finales del medio de cultivo, su separación por grupos es debida a las características físico-químicas que los constituyen lo que permite, facilitar su almacenamiento. (31,37)

De esta forma, para la preparación de solución Stock de elementos mayores, tanto para el medio MS y B5, se almacenaron en frascos ámbar, este grupo no ocupó de refrigeración. (tabla 6) Para pesar los reactivos, se emplearon dos tipos de balanzas una granataria y una balanza analítica. Y para la constitución del medio a partir de soluciones Stock se utilizó una micro pipeta de capacidad 200-1000  $\mu$ l y otra micropipeta con capacidad de 1000-10000  $\mu$ l.

**Tabla 6 SOLUCION DE ELEMENTOS MAYORES PARA LA PREPARACION DE MEDIOS**

COMPUESTO	CANTIDAD MEDIO MS	MEDIO B5	AFORAR
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650	---	mg/L
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	---	134	mg/L
$\text{KNO}_3$	1900	2500	mg/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	mg/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	---	mg/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	---	150	mg/L

En el caso de la solución Stock de elementos menores (tabla 7), por las características de los reactivos ocupó de guardarse en frasco oscuro y se mantuvo a temperatura ambiente.

**Tabla 7 SOLUCION DE ELEMENTOS MENORES PARA LA PREPARACION DE MEDIOS**

COMPUESTO	CANTIDAD MEDIO MS	MEDIO B5	AFORAR
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	3.0	mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3	---	mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	---	10	mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	2.0	mg/L
KI	0.83	0.75	mg/L
$\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	mg/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	mg/L

En la tabla 8, se muestra el grupo que comprende a las vitaminas, pero en la última fila correspondiente al  $\text{CaCl}_2$ , el compuesto se preparó como una solución aislada, esto es, que no lo agregamos a las vitaminas, si no que lo encontramos como único constituyente de un frasco matriz. Pero las vitaminas, se guardaron bajo congelación y en cambio de cloruro de calcio, se conservó bajo refrigeración a  $-4^\circ\text{C}$ . Las mismas condiciones se tuvieron para el grupo de la tabla 9, en donde encontramos la solución de hierro-EDTA.

**Tabla 8 SOLUCION DE VITAMINAS Y  $\text{CaCl}_2$ , PARA LA PREPARACION DE MEDIOS**

COMPUESTO	CANTIDAD		AFORAR
	MEDIO MS	MEDIO B5	
Thiamina · HCl	0.1	10	mg/L
Piridoxina · HCl	0.5	1.0	mg/L
Myo-inositol	100	100	mg/L
$\text{CaCl}_2$	440	150	mg/L

**Tabla 9 SOLUCION DE HIERRO · EDTA PARA LA PREPARACION DE MEDIOS**

COMPUESTO	CANTIDAD		AFORAR
	MEDIO MS	MEDIO B5	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8	mg/L
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$	33.6	33.6	mg/L

Con respecto a la tabla 10, en la cual se indica la cantidad de hormonas utilizadas en cada medio; se muestran tres combinaciones del medio MS, las cuales, como se puede apreciar, varían solo en la concentración de hormonas, esto es debido a que tales concentraciones de hormonas son los que mejores resultados dieron en la propagación de células.

Además, las soluciones de hormonas, al igual que las precedentes se guardaron en frascos opacos y bajo refrigeración; pero para lograr su preparación en 100 ml, fueron pesados 100 mg de cada hormona, y en cada caso el regulador de crecimiento fue previamente disuelto en 0.5 ml de NaOH 1N, aforando con agua destilada a 100 ml. (51)

**Tabla 10 CONCENTRACION DE HORMONAS**

MEDIO	2,4-D (*)	CINETINA(*)	ANA(*)
MS-2	0.3 ml	0.2 ml	0.2 ml
MS-9		0.2 ml	0.2 ml
MS-11	0.15 ml	0.3 ml	
B5	0.5 ml	0.1 ml	

\*(2,4-D) Acido 2,4-diclorafenoxiacético [Cl<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H]

\*(ANA) Acido 1-naftalenacético [C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>CO<sub>2</sub>H]

\*Cinetina (6-furfurilaminopurina) [C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O]

Para dejar el medio homogeneizado, la mezcla de soluciones Stock, se colocó sobre una placa-agitadora, conteniendo el recipiente un agitador magnético, esto facilitó en gran parte, la operación final, que consiste en ajustar el pH del medio a  $5.8 \pm 0.5$ , con NaOH o HCl en una concentración del 1% (44,51); para esto se utilizó un potenciómetro Beckman 50 pH Meter. (15) Después de este proceso, en los matraces de 250 ml, se colocaron 100 ml del medio. Y para mantener estéril el contenido se cerraron los matraces, colocando en la boca de los mismos tapones de algodón y gasa no absorbentes y una capucha de aluminio, con el fin de evitar que se mojen los tapones de los contenedores. (35,41,45)

En el siguiente paso los medios fueron esterilizados a 120°C durante 15 minutos para lo cual se empleó una autoclave. Después de este procedimiento, los matraces fueron removidos para refrescarlos tan pronto como fue posible. (31,32,35,41,45,46)

Al medio nutritivo preparado para iniciar los callos del meristemo, se le adicionaron de 1 a 0.5 gr de agar bacteriológico o agar-agar, por cada 100 ml de medio, después se esterilizó y subsecuentemente se vertió en contenedores estériles; utilizando un campo estéril, (Fig. 7) o una campana de flujo laminar. (1,12,41,44)

## INICIACION DE LOS CALLOS:

Para iniciar los callos, se separaron las semillas del fruto de pitaya, se limpiaron con agua, y se colocaron, en distintas soluciones de HCl c u y a concentración fue de 0.25% a 1%, por un período de 30 segundos a 3 minutos, esto fue con el fin de ablandar la testa de la semilla y facilitar su germinación.

(44,52)



Fig. 7 El utilizar campos estériles para la elaboración de los medios de cultivo es un factor determinante para la obtención de los resultados deseados.

Para el sembrado de las semillas sobre el medio sólido, se esterilizaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (blanqueador comercial), después se enjuagaron con agua destilada y esterilizada; dejando las semillas entre los 28 a 30°C de temperatura en un cuarto con iluminación de fotoperiodo controlado. (fig. 8) (1,12,30,41,44,52)

Los tejidos obtenidos de las semillas (raíces) fueron propagados vegetativamente, por el subcultivo de los meristemas apicales cada cuatro semanas, dentro de un medio libre de reguladores, los primeros callos que se transfirieron a un medio que contenía pocos reguladores de crecimiento, especialmente se utilizó una auxina (2,4-D), con la finalidad de evitar la organogenesis. (44)

Como precaución, para evitar contaminación, tanto en el trabajo con medios sólidos como en el manejo de los cultivos en suspensión, se procedió al lavado de las manos con un jabón antibacteriano seguido de un enjuague con alcohol al 70%, para lograr un ambiente aséptico durante las manipulaciones. (1, 12, 41)



#### **OBTENCION DEL CULTIVO EN SUSPENSION:**

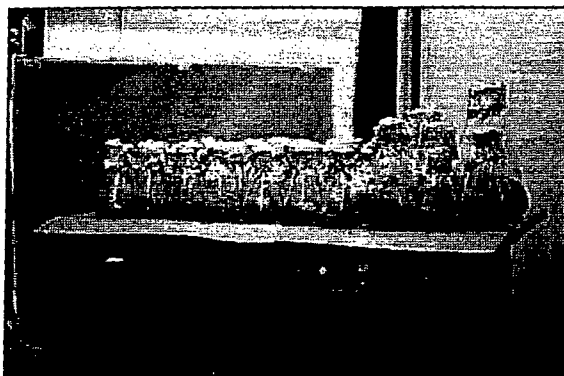
Quando se tuvieron los conglomerados de células (Callos), en el medio sólido, estos se transfirieron a un medio líquido, en forma aséptica y se colocaron en un orbital utilizando una velocidad de agitación de 150 RPM durante un período de 8 a 15 días. El objetivo de esta velocidad consiste en aprovechar la expansión y división celular que predomina sobre los callos, permitiendo a los agregados celulares su separación, para producir, de esta forma células libres. (35,41,42,45)

#### **MANTENIMIENTO DEL CULTIVO EN SUSPENSION:**

Quando los medios de cultivo, obtenidos de la agitación de los callos muestran crecimiento, estas células se cambian a un medio fresco, se añade un 20% del inóculo de células de pitayo y se acomodan en la orbital donde se mantiene en funcionamiento a 150 RPM; con temperatura de 28 a 30°C. (Hussey 1983) (30) El cuarto de cultivo utilizado, fue iluminado continuamente con lámparas de filamento de tungsteno, dándonos una intensidad aproximada de 1000 -2000 lux sobre la plataforma giratoria; por un período de 8-15 días. (fig. 8) (1,12,16,30,35,42,45, 51)

#### **MEDICION DEL CRECIMIENTO CELULAR:**

En muchas investigaciones se ha observado, que la cantidad de crecimiento celular depende en gran parte de los intervalos de subcultivo y la cantidad de inóculo (NaHS y Davies 1972; Ozeki and Komamine, 1985). (26)



**Fig. 8** Los matraces se aseguraron en un agitador, con la finalidad de permitir la aeración de los medios con las células en suspensión.

Para la obtención de parámetros que proporcionen un panorama sobre el crecimiento celular; se hicieron varias mediciones, las cuales consistieron en la determinación del peso fresco, peso seco, pH, espectrofotometría, conductividad y microscopía. (12, 26, 35, 40, 43, 46)

Posteriormente se muestreo la totalidad del contenido del matraz (100 ml de cultivo) para la obtención de los resultados.



**Fig. 9** La exactitud en la de medición del peso fresco y seco, permite conocer el desarrollo de nuestro cultivo celular.

#### **DETERMINACION DE PESO FRESCO:**

Los discos de papel Whatman No 3, se colocaron en una estufa a 70°C durante 24 hrs, consecuentemente se acomodaron en un desecador por espacio de 20 min, para mantenerlos a peso constante. Previamente se peso en seco; después el papel filtro con unas pinzas y se colocó en un embudo de cristal, impregnado el papel con agua, se filtró con vacío para eliminar el exceso de agua ocupando para esto una bomba de vacío. Nuevamente se pesó el papel húmedo en una balanza analítica, y por último se hizo pasar todo el contenido del matraz (100 ml) por el papel filtro, con la ayuda de vacío una vez eliminado el exceso de agua se volvió a pesar pero en esta ocasión conteniendo las células de pitayo (fig. 9). La diferencia de peso del papel + agua + células - papel+ agua nos da el peso fresco expresado en gramos por 100 ml de cultivo. (35,45)

#### **PESO SECO:**

Las células que fueron separadas del medio de cultivo por filtración a vacío, se dejaron secar en el mismo disco por 12 horas a 80°C. Después de este período, los contenedores de células se transfirieron a un desecador; para ser pesados y por la siguiente diferencia se obtiene el resultado del peso seco celular.

Peso de las células + peso del papel - peso del papel igual al peso seco en gr/ 100 ml de cultivo. (12,35,45,46,12,51)

#### **MEDICION DEL pH:**

La medición del pH se realizó en el mismo medio filtrado, utilizando como soluciones de calibración del potenciómetro Buffers de pH 7 y 4.

#### **MEDICION DE LA CONDUCTIVIDAD:**

La calibración de los conductímetros fue de la siguiente manera se sumergieron los electrodos, en una solución de NaCl al 0.1 % (pesando 0.25 gr de NaCl, en 250 ml de agua destilada), tomando lectura de la solución en 2K, a una temperatura de 25°C, teniendo que establecerse la medición en 1990 (35,46)

Después de remover el material celular por filtración al vacío, la conductividad del medio fue determinada usando dos conductímetros de marca y modelos distintos; haciendo uso del mismo medio filtrado para la medición del pH.(42, 43)

La medición de conductividad en el medio, se utilizó como parámetro, por el hecho que en algunas investigaciones se obtuvieron buenos resultados en la determinación del crecimiento celular, tal es el caso de los cultivos de: Coffea arabica, Nicotiana tabacum, Withania somnifera y Catharanthus roseus . (35,45)

La conductividad de los cultivos se ha reportado como conveniente para calcular el crecimiento celular, por medio de la medición de la concentración de nitratos contenidos en el cultivo de tejidos; sin el recurso directo del muestreo celular, ya que se considera que el crecimiento de los cultivos esta estrictamente correlacionado con la utilización de el nitrógeno (Hahlbrock & Kuhlen 1972; Bayley et al., 1972; Hahlbrock et al., 148: 75-84, 1974; Taya et al., 1989a; 1989b; Ryu et al., 1990,) (33,34,38,46).

#### **CENTRIFUGACION:**

La centrifugación del medio de cultivo se realizó durante 10 minutos a 10,000 RPM, con la finalidad de separar las impurezas suspendidas y realizar la medición espectrofotométrica correspondiente. (33,38)

#### **ESPECTROFOTOMETRIA:**

La mayoría de los autores proponen que los colorantes afines a las betalaínas, deben ser estimados por absorbancias cercanas a los 535 nm; aunque es importante para diferenciar a las betalaínas de otros tipos de colorantes, tener presente que las betalaínas no absorben a 270 nm y que las betaxantinas lo hacen a 485 (tabla 13). (11,18,20, 21,22,40, 42,49)

Las absorbancias de 480 y 535 nm, que fueron elegidas por las características de los probables pigmentos (tabla 12 y 13), nos permitieron observar desde otro punto de vista el comportamiento de nuestro cultivo celular, dado que al graficar pudimos constatar que los picos de absorción mas altos, en muchos de los casos, correspondían de forma similar a las variaciones que se observaron en otras mediciones.

Con un espectrofotómetro, se efectuaron las mediciones de absorbancia del colorante contenido en el medio de cultivo (colorante extracelular).

En otro espectrofotómetro se hicieron los barridos espectrofotométricos abarcando desde el espectro visible y parte del ultravioleta de las siguientes muestras: Pitaya fruto, betanina (Testigo), betabel y Colorante extraído de las células cultivadas (antes y después de pasarlo por el proceso de purificación). El objetivo de esta medición consistió en la apreciación de los picos de absorbancias.

#### **MICROSCOPIA:**

Se verificó el estado de desarrollo de los cultivos, utilizando una pequeña muestra de las células frescas; añadiendo diacetato de fluorseína, para observar e identificar la cantidad de células vivas y muertas por la observación en un microscopio de fluorescencia.(48)

El diacetato de fluorseína se fijó en las células vivas exclusivamente cuando se examinaron después de 5 min. Después de este período de tiempo se hicieron las observaciones correspondientes, a seco débil y fuerte para advertir la presencia de las células coloreadas y sin colorear.

La preparación del diacetato de fluorseína se efectuó como sigue: para obtenerlo en una concentración 0.01% se pesaron 5 mg/ml y se aforo con acetona a 100 ml, la solución fue almacenada posteriormente bajo refrigeración antes de su uso; y desechándose después de transcurrir 24 hrs. de su preparación. (48,43)

El diacetato de fluorseína fue usado con éxito para detectar las células animales vivas; en las investigaciones realizadas por Rotman and Papermaster 1966, y en las observaciones de polen de varias especies vegetales (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970). Por esa razón se pensó en su utilización.

#### **EXTRACCION:**

Para identificar el colorante obtenido, nos basamos en las características de las betalainas y de las antocianinas, ya que por la diferencia en sus estructuras químicas son fácilmente diferenciadas ya sea por su absorbancia, al igual que por la afinidad a los disolventes; en el caso de las antocianinas son fácilmente extraídas con metanol y pobremente con agua. En las betalainas es totalmente a la inversa (Apéndice I y tabla 12).(17)

En la extracción de los pigmentos se mencionan todo tipo de solventes, polares y no polares, predominando la utilización de los polares. (22,23,27,44)

Para la extracción del colorante acumulado en las células de pitaya, se empleó metanol a distintas concentraciones y las mezclas de metanol-ácido clorhídrico, metanol-Hidróxido de sodio, para facilitar la extracción.

#### **TECNICAS PARA LA RUPTURA DE CELULAS:**

Debido a que después de someter las células en diluyentes los resultados no fueron completamente satisfactorios, porque se tuvieron que aplicar otras técnicas, para intentar recobrar los metabolitos almacenados en las vacuolas, estos métodos consistieron en el daño o destrucción de las células; esperando que fuera la solución, en la obtención del pigmento. (47)

#### **SONICACION:**

Las células en suspensión, se colocaron en un vaso de precipitado, el cual estaba depositado en un contenedor con hielo, para continuar con el proceso de sonicación durante 15 minutos. (21)

#### **CONGELACION:**

Se congelaron las células a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente, se sometieron a la extracción con agitación y con maceración. La finalidad, de esto fue el desactivar la enzima dentro de las células y aumentar la estabilidad del color. (10,44)

#### **SEPARACION Y PURIFICACION:**

Para separar y purificar las distintas sustancias que constituyen los colorantes de betabel, pitaya y células de pitayo obtenidas por el cultivo de células, se hizo pasar el colorante por columnas de sílica gel, Sephadex e intercambio iónico (fig. 10).

#### SILICA GEL No. 60:

Se empacó una columna de 20 cm de longitud y diámetro de 1 cm con gel de sílice. Se puso 1 ml de muestra y se diluyó con metanol seguido de gradiente de metanol-agua. Las alícuotas recogidas fueron de 1 ml. (10)

#### SEPHADEX G-10:

Esta matriz tiene un rango de efectividad en partículas menores de 1000 de peso molecular y como la cianidina tiene un peso molecular de 287 y la betanina de 561, se seleccionó este tipo de Sephadex, para separar las impurezas y realizar un fraccionamiento parcial en base a diferencias de tamaño, así como para preparar la muestra para su paso por la columna de intercambio iónico. (10)

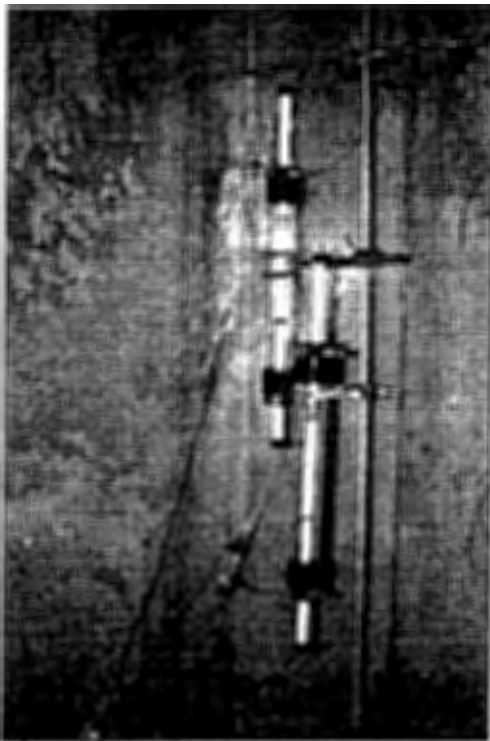


Fig. 10 Después de la extracción, se hizo pasar el colorante obtenido por las columnas, para la purificación del mismo.

Para introducir en la columna el colorante extraído de las células de pitayo, se utilizó una jeringa de 5cc (21); pero la sustancia coloreada se oxidó rápidamente y manchó la parte superior del sephadex y ya no se recuperaba al lavarlo, se tuvo que anteponer un filtro milipore de 0.45 micras de poro después de la centrifugación y antes de las columnas. (10)

Los pasos que se efectuaron fueron los siguientes:

- Se lavó varias veces la matriz con agua desionizada y filtrada.
- Se llenó la columna con agua y ésta fue desplazada por la matriz.
- Se estabilizó la columna haciendo pasar 20 volúmenes de buffer de fosfatos de pH 5.7.
- Se pusieron 5 ml de muestra y se eluyeron con el mismo buffer.
- Se recogieron las alícuotas de 20 gotas.
- se hicieron las lecturas espectrofotométricas.

#### **COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO:**

Con esta columna se pretendió separar las sustancias que constituyen el colorante, aprovechando sus diferentes afinidades por la columna:

- Se lavó dos veces con un volumen de solución salina al 1%.
- Se llenó la columna con agua y esta fue desplazada por la matriz.
- Se estabilizó la columna haciéndole pasar la solución salina (dos volúmenes).
- Se pusieron 5 ml de muestra y se eluyeron con buffer de citratos de pH 5.8.
- Se recogieron alícuotas de 20 gotas
- Se hicieron las lecturas espectrofotométricas de las alícuotas que contenían color.

(10,21)

#### **ELECTROFORESIS:**

Se plantea la electroforesis en papel Whatman No.1, usando como testigos betanina para las betalaínas y malvidina 3,5 diglucósido y rutina para las antocianinas. Las condiciones de la electroforesis: pH de 4.5, empleando un buffer (0.5M) y 300 volts por 40 min., para que las betaninas migren hacia el ánodo 3 cm, mientras que la mayoría de las antocianinas lo harán hacia el cátodo unos 0.2 cm y los compuestos no ionicos permanecerán en el origen.(10,22,52)

Aprovechando las diferencias de carga de las antocianinas y las betalaínas, se pretendió lograr identificar cualitativamente por cual de estos grupos está constituido el colorante analizado.



## ELECTROFORESIS EN PAPEL:

Equipo de electroforesis horizontal y papel Whatman No.1, las soluciones reguladoras utilizadas, Piridina Formato 0.5 M; pH 4.5 y Citratos 0.1 M, pH 5; las muestras de colorantes purificados y originales obtenidos a partir de pitaya roja:

- Betanina comercial (testigo)
- Betabel
- Rutina comercial (testigo)
- Jamaica
- Células de pitayo
- Pitaya amarilla

## CONDICIONES DE OPERACION:

### PARA PIRIDINA:

SET VOL. 450 V.  
SET CORR 150 m Amp.  
SET POWER 30 Watts

### PARA CITRATOS:

SET VOL. 250 V.  
SET CORR 75 m Amp.  
SET POWER 20 Watts

Tiempo de preelectroforesis 20'  
electroforesis 1 hrs.

## ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA: (PAGE)

Se utilizó un equipo de electroforesis horizontal como solución reguladora se utilizaron fosfatos 0.2 M, pH 5.7 y citratos 0.5M; pH 5.

## COMPOSICION DEL GEL:

Glicerol al 87%..... 2.30 ml  
Agua desionizada..... 30.00 ml  
Buffer de Fosfatos..... 14.28 ml  
Poliacrilamida al 30%..... 23.20 ml  
PSA\* 30%..... 0.40 %  
Temed \*\*..... 0.06 ml

Los pasos que se siguieron para la separación del gel fueron los siguientes: Se mezclaban todos los componentes menos el Temed, se aireaban, se añadió posteriormente el Temed, se coloca la mezcla entre las placas y se dejó gelificar.

---

\*PSA= ácido periódico de Schiff, se utiliza, para marcar a los carbohidratos, ya que tiñe el ácido sialico, de esta forma puede observarse mejor el lugar que ocupan las proteínas glucosiladas.

\*\*Temed= nnn'n' Tetrametiletildiamina se encarga de establecer una red entre la poliacrilamida y los fosfatos.

### **PRUEBAS QUIMICAS:**

Se realizaron las pruebas químicas que mencionan (Dieter y Strack, et al); utilizándose rutina como testigo de las antocianinas, y betanina como testigo de las betalainas, y se compararon estos resultados con los obtenidos para el colorante, con la finalidad de verificar con cual de estos grupos testigo se asemejaba el colorante obtenido de células de pitayo en suspensión.

Las muestras de los colorantes antes mencionados se sometieron a un pH alcalino y se les aplicó HCl diluido caliente tanto en solución alcohólica, como acuosa. Se observaron sus coloraciones tanto a pHs ácidos como básicos. Se hicieron comparaciones entre su solubilidad en agua y en metanol absoluto.

## **8.-RESULTADOS:**

### **I.-OBTENCION DEL CALLO:**

Con la utilización de los distintos tiempos y concentraciones de HCl, se observó que no se puede definir una concentración ideal para el ablandamiento de la testa; esto es debido a que no todas las semillas germinaron en la misma concentración de ácido y tiempos de inmersión. Puede que el grosor de la testa en las semillas varié aun siendo estas provenientes del mismo fruto.

Al colocar las semillas en el agar sin hormonas, se tuvo un desarrollo más activo que con la utilización del agar con sustancias hormonales. Pero el mantenimiento de los callos requirió de la presencia de las hormonas.

### **II.-OBTENCION DEL CULTIVO EN SUSPENSION:**

Inicialmente, cuando los callos se colocaron en el medio líquido a una velocidad de agitación de 150 RPM, después de 15 días, se logró un aceptable cultivo en suspensión; pero al intentar mantener el cultivo en suspensión, con la misma velocidad de agitación y al cambiar el medio por uno nuevo, denotamos que las células experimentaban una respuesta, que se reflejó en el peso celular, el cual disminuyó hasta el punto de perder nuestro trabajo. Dado lo anterior, procedimos a bajar la velocidad de agitación de 110 a 120 RPM de los matraces, dependiendo del tamaño de los contenedores, así pues, la velocidad mas baja (110 RPM) para los matraces de 1 Litro y la agitación de 120 RPM quedó establecida para los matraces de 250 ml; resultando de estos cambios, una mejoría en el crecimiento de las células en los medios en suspensión.

(51)

### **III.-CINETICAS DE CRECIMIENTO:**

#### **TEMPERATURA**

La temperatura, como factor externo en el cultivo de células de pitaya, tuvo su influencia en el crecimiento celular, esto es, que en un principio, dejamos los matraces expuestos a temperatura ambiente, no tuvimos problemas hasta que fueron los meses de Octubre y Noviembre, donde la mayoría de los cultivos tuvieron poco crecimiento y otros no se desarrollaron por las bajas temperaturas climáticas.

## PESO CELULAR:

El peso celular, claramente fue regido por las condiciones que predominaron en el medio nutritivo, por ejemplo se puede comparar en las gráficas (1 y 2) que al siguiente día de la inoculación, el pH del medio baja, esto se observa en todos los medios utilizados; de igual manera descende el peso fresco y seco de las células, debido posiblemente al rompimiento de las mismas, como un mecanismo de defensa para restablecer un pH ventajoso para su mejor desarrollo.

Además el máximo de densidad de peso seco varía grandemente con respecto a la del peso fresco, esto puede deberse a la alteración en el contenido de agua, por parte de las células vegetales. (43) Este fenómeno se observó en el momento de tomar las mediciones que servirían de parámetro para el presente trabajo; De ésta forma, cuando se filtró la muestra pudimos constatar que dependiendo del crecimiento fresco, la cantidad de medio líquido excedente fue disminuyendo de 100 ml, hasta llegar a 15 ml; esto fue apreciable en el medio MS 9. De la misma forma distinguimos, en algunos filtrados un comportamiento reológico del medio, y en donde, se sugiere que este fenómeno es el resultado de la elongación celular y la disponibilidad de los nutrientes. (43)

Con respecto a los resultados en las 12 cinéticas realizadas, el comportamiento fue más o menos similar, por lo cual se eligieron los mejores resultados para exponer por medio de las gráficas aquí presentadas, cuyos datos proceden de la tabla 16 para MS2; de la tabla 18 son los datos graficados para el medio MS9; la tabla 21, representa los datos del medio MS11, y los datos del medio B5 corresponden a la tabla 23). Los resultados restantes quedaron registrados en las demás tablas del apéndice I.

En general, los datos obtenidos de las corridas en al utilizar el medio MS2, muestran que el peso seco final que se pudo obtener de este medio fue de 5.7 a 10.38 g/100 ml, los cuales expresados en peso fresco equivalen a 10.08- 34.40 g/100 ml y en promedio se puede esperar .3021 g/100 ml de crecimiento diario del medio MS2 (gráfica 1 y 2; sus datos corresponden a la tabla 16).

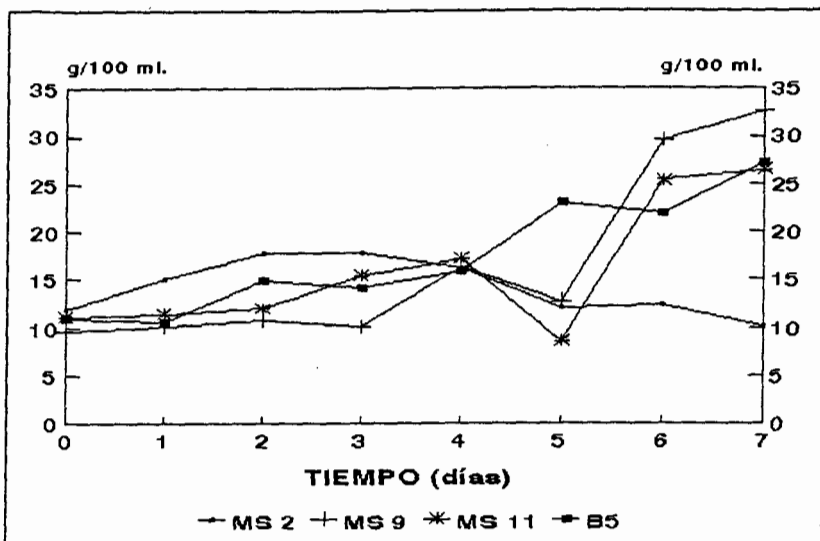


Gráfico 1 Peso fresco de *S. queretaroensis* en cuatro medios de cultivo.

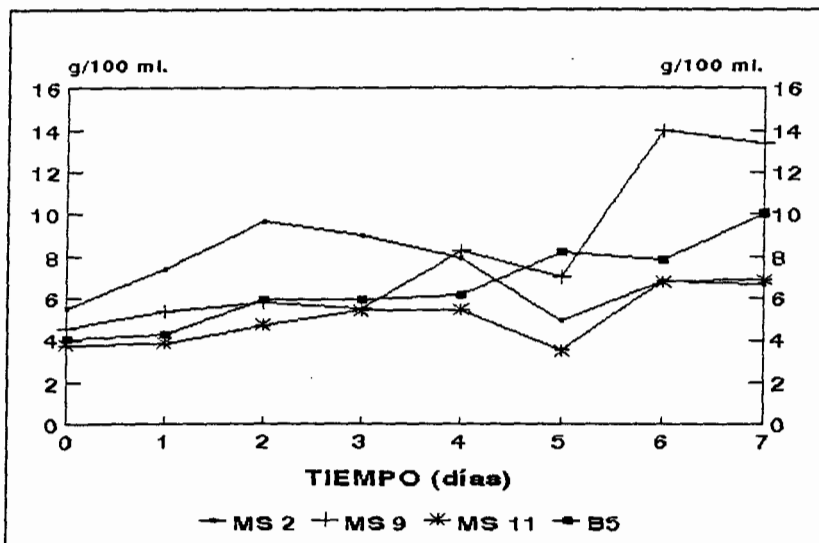


Gráfico 2 Peso seco de las cinéticas de crecimiento de los distintos medios aplicados en *S. queretaroensis*.

Los resultados conseguidos con el medio MS9 fueron como sigue, el peso seco final fue de 11.12 a 13.41 g/100 ml, equiparándolo con el peso fresco que fue 27.37 - 32.71 g/100 ml, mostrando aproximadamente un crecimiento diario de 1.05 g/100 ml (gráfica 1 y 2, tabla 18).

En el medio MS11, el producto alcanzado en peso seco varió desde 5.06-11.38 g/100 ml, valores que traducidos en peso húmedo son de 9.4 a 28.91 g/100 ml, logrando un crecimiento de .4279 g/100 ml diario. (gráficas 1 y 2 tabla 21) Y por último en el medio B5 la ganancia en el peso seco se reflejo desde 2.2 a 10.07 g/100 ml, valores que representados en células hidratadas corresponden de 5 a 27.3 g/100 ml, generando un crecimiento por día cercano a .0920 g/100 ml. (gráfica 1 y 2, tabla 23)

#### ANALISIS ESTADISTICO:

El peso final en la producción celular es de vital importancia; ya que la investigación de *S. queretaroensis* se realizo nivel matraz, y si en ella no se obtenía un peso celular de por lo menos 13 a 14 grs/100 ml en peso seco, esto significa que el costo en la producción del pigmento a nivel industrial no es factible.

De esta forma para validar lo anterior se procedió a realizar un analisis de varianza, en los medios probados, del cual se obtuvo como resultado una significancia de 0.0014. Además del analisis de varianza se aplico a los mismo datos la prueba de Duncan, cuyos resultados indican que los medios MS2, MS9 y B5 no tienen diferencia significativa, en cambio el medio MS11, resulto inferior estadísticamente a los anteriores.

Pero el medio MS2, tiene la particularidad de contaminarse fácilmente de hongos y levaduras, especialmente en los últimos días de la cinética, motivo por el cual debe su peso; en cambio el MS9 permite el crecimiento de las células pero no la acumulación del colorante. Y el medio B5 si facilita la acumulación del pigmento, al proporcionar condiciones de tensión celular, esto provoca que el crecimiento celular se vaya reduciendo llegando a un punto donde se pierde el cultivo en suspensión. En cambio en el medio MS11, las condiciones del medio son tan severas que el paquete celular se comprima que la extracción del metabolito sea difícil.

pH:

El potencial de hidrógeno (pH), demostró ser significativo en la obtención de los resultados, debido a que en las variaciones del mismo se observaron, incrementos y descensos tanto, en los pesos como en las mediciones espectrofotométricas.

Un comportamiento característico observado fue que al ajustar el pH en el medio, este se afectó por la esterilización, el pH se redujo de forma distinta dependiendo del medio trabajado y su consecuencia culminó en el acidificado de los medios.

En el medio MS2, el ajuste del pH fue difícil al igual que en el medio MS11. Los parámetros obtenidos de el pH en el MS2 después de la esterilización permanecieron de 3.23 a 5.95 U.P. (Unidades potenciométricas), teniendo una variación promedio de 1.06 U.P. con respecto al pH de  $5.8 \pm 0.5$ ; y el pH final se mantuvo entre 3.92 y 4.26 U.P. (gráfica 3 y tabla 16).

Para el medio MS9, nuestro pH inicial englobó desde un 4.64 a un 4.99 U.P., dándonos una variación (con respecto al ajuste antes del esterilizado) de .96 U.P., quedando como el menor cambio registrado comparado con los medios, confiriéndole al medio MS9 una mayor estabilidad. Además el pH final de los medios fue de 3.9 a 5.55 U.P., advirtiéndose que este medio fue el que mejores condiciones proporcionó a las células para su crecimiento (Gráfica 3 y tabla 18). En el medio MS11, los datos registrados de el pH inicial se mantuvieron entre 4.53 y 5.8 U.P., permitiendo un cambio de .47 U.P., con respecto al valor del ajuste antes de aplicar el procedimiento de asepsia; y el pH final alcanzado en este medio fue de 2.74 hasta 4.9 U.P. (gráfica 3 y tabla 21).

Los parámetros registrados para el B5, circundaron de 3.66 a 5.54 U.P., ofreciendo un valor de transición de 1.43 U.P., evidentemente vinculado al pH ajustado antes de la introducción del medio en la autoclave; y el pH final alcanzado en este medio se estableció entre 2.81 y 6.84 U.P. (gráfica 3 y tabla 23)

Los datos anteriores, nos sugieren que al inocular los medios con un grupo celular a un medio nuevo con un pH bajo, provoca que las células más sensibles se rompan, con la finalidad de moderar el cambio de pH. Pero este parámetro no se estabiliza sino que llega a cambiar con la utilización de los nutrientes por parte de las células, llegando a provocar más modificaciones en la concentración de hidrógenos dentro

del medio y como consecuencia más destrucción celular y liberación de nutrientes contenidos en células susceptibles.

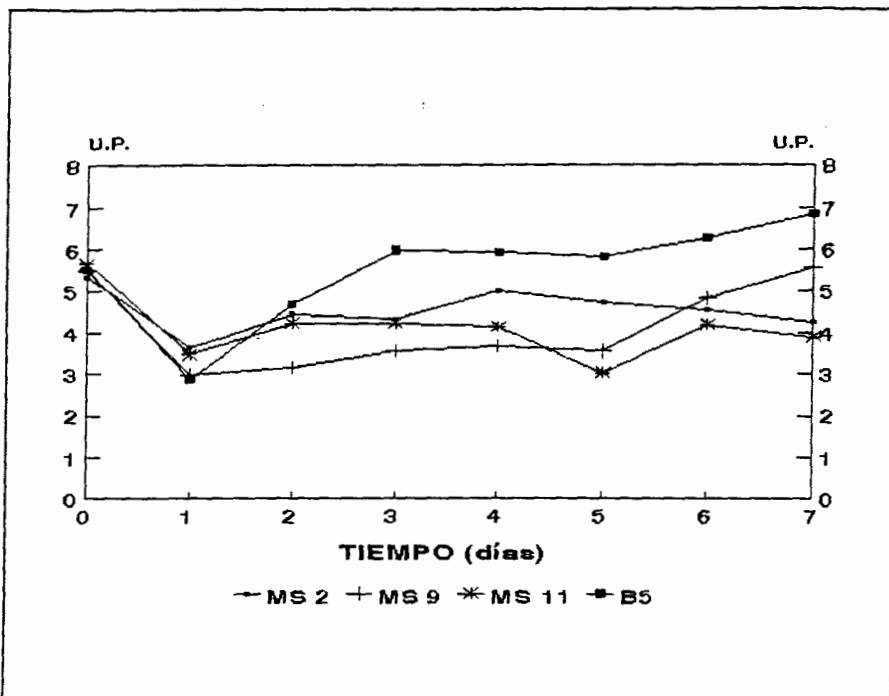


Gráfico 3 Ejemplos representativos del potencial de hidrógeno en los 4 medios utilizados.

#### ABSORBACIAS:

En el caso de las mediciones de absorción que se obtuvieron de el medio MS2, en todas ellas podemos observar que los picos de absorbancia los encontramos muy pronunciados en los días 2 y 6 (gráficas 4 y 5 tabla 16). Para el MS9 tenemos un comportamiento similar, presentándose un retraso en la aparición de el pico en el séptimo día de la cinética numero III y como dato adicional en la cinética II en la segunda muestra que se tomo, en vez de resgitrarse un ascenso en la absorción se efectuó lo contrario (gráficas 4 y 5 Tabla 18).



El comportamiento de las absorbancias de los medio MS11 y B5 fue básicamente irregular, solo coincidiendo en que el segundo día la absorción tuvo un ascenso significativo, pero posteriormente presentan más incrementos; permitiéndome suponer que prácticamente solo se presentó rompimiento celular y posiblemente poco o nulo crecimiento celular (gráficas 4 y 5).

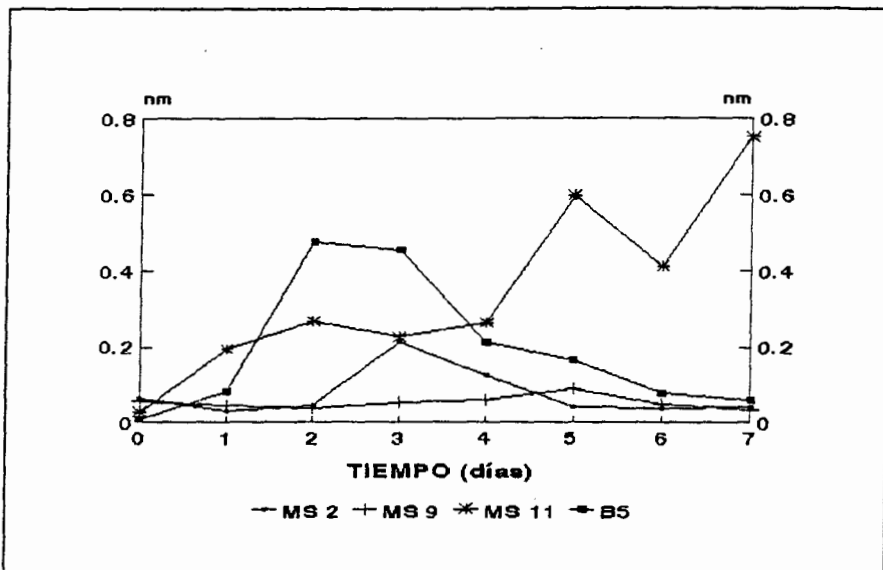


Gráfico 4 Absorbancias a 480 nm, de las células en suspensión de *S. queretaroensis* en los cuatro medios de cultivo.

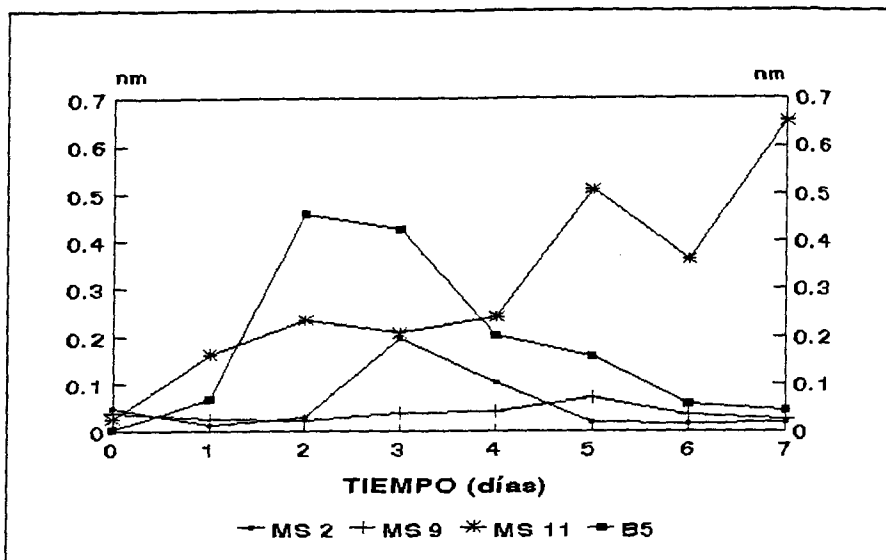


Gráfico 5 Puntos de absorbancia del colorante extracelular obtenido a partir de las células de *S. queretaroensis*.

#### CONDUCTIVIDAD:

No en todos los medios estudiados la aplicación de la conductividad, resultó constante para determinar el rango de densidad celular de los cultivos. (34) Pero esto nos dio la pauta para la aplicación de este sistema con miras en su utilización en bioreactores, para la producción en masa de células de *S. queretaroensis*.

El comportamiento de la conductividad en el medio MS2, presentó un incremento en la medición hacia el segundo día, disminuyendo gradualmente para volver a incrementarse en el cuarto y séptimo día, aunque este incremento no es de la misma intensidad que en un principio (gráfica 6 y tabla 18). Para el MS9, las mediciones se enmarcan igualmente en un ascenso de conductividad en el segundo día, descendiendo hasta entre el sexto y séptimo día de cultivo (gráfica 6 y tabla 18).

Los medios MS11 y B5 son regulares, el medio MS11 presenta un descenso en el primer día y posteriormente una elevación de conductancia en el segundo día, manteniendo su incremento; el medio B5 se comporta de constante indicando un continuo y ligero descenso en las mediciones realizadas (gráfica 6 y tablas 21, 23).

Además de medir la conductividad; en las gráfica 7 se observa, la correlación lineal de las conductancias con respecto al peso seco de las pruebas realizadas.

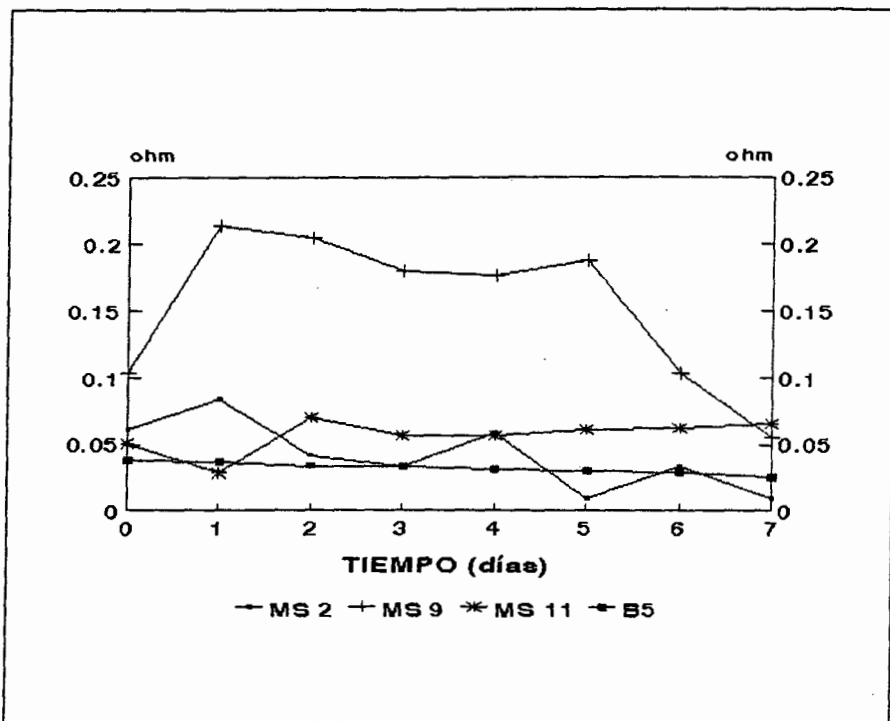


Gráfico 6 Esta gráfica muestra los datos de las conductancias obtenidas de los cuatro medios de cultivo de *S. queretaroensis*.

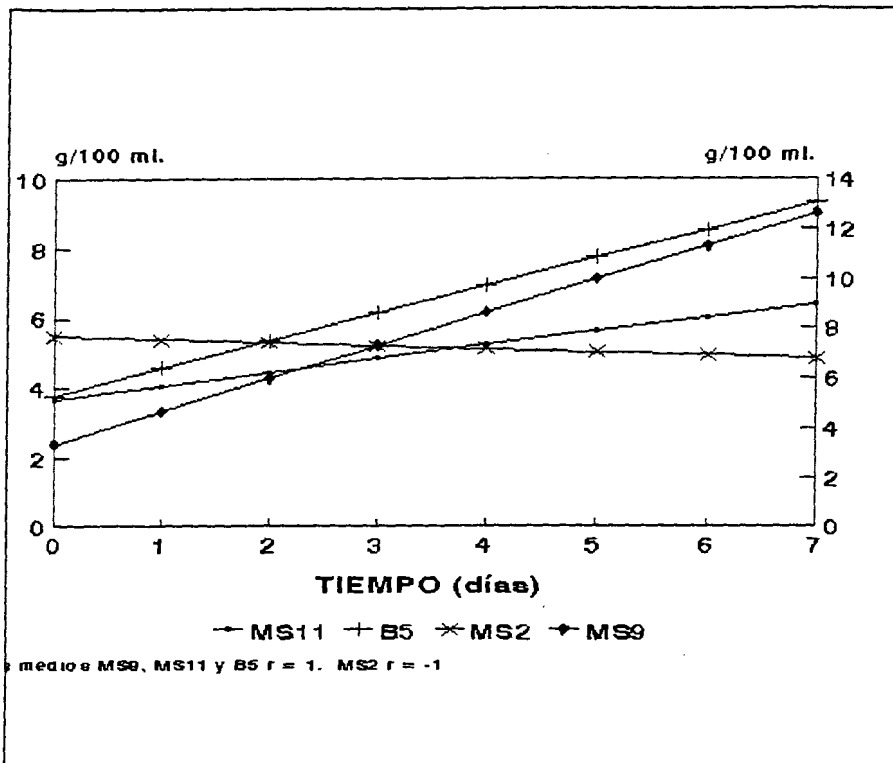


Gráfico 7 Al efectuar las correlaciones lineales de los pesos secos contra las conductancias, se pudo apreciar que el único medio de cultivo (MS2), fue el que presentó una tendencia negativa como se esperaba ocurriera con los demás.

#### MICROSCOPIA:

En el trabajo se pretendió medir la viabilidad celular, con la utilización de la técnica de fluorescencia y el conteo del mismo utilizando un hemocímetro; pero no se contó con el agrupamiento celular y el tamaño de las mismas, cuya dimensión generalmente fue de .1 mm a .15 mm (100- 150 $\mu$ ), lo cual impidió su ingreso al área de conteo del hemocímetro (fig. 11).

Con respecto a las observaciones diarias en las células, se puede constatar por apreciación, al utilizar la técnica de teñido por fluorescencia, y la utilización del contraste de fases, donde las células vivas presentaron un brillo fluorescente, en contraste con las células destruidas de las cuales no emanó brillo alguno. (48)

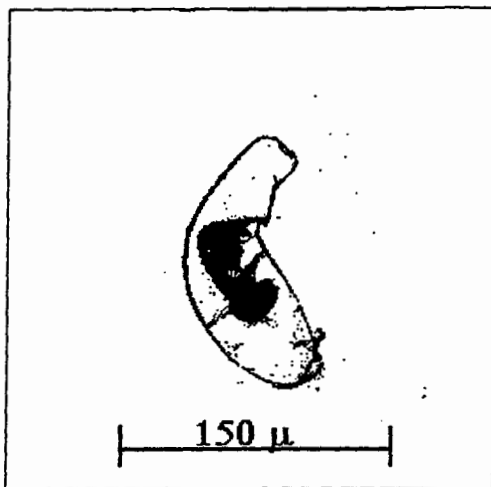


Fig. 11 Las células de *S. queretaroensis* Vista bajo el microscopio óptico.

#### IV.-ANALISIS DEL COLORANTE:

##### EXTRACCION:

Al realizar la extracción con metanol al 5 %, hubo ocasiones en que no se obtuvo color y otras en que el color fue amarillo, quedando siempre un remanente de colorante rojo dentro de las células, que no lograba ser extraído.

Otro problema que se presentaba, era que este colorante era bastante inestable y en un plazo de 12 hrs. se oxidaba.

Al probar con otros solventes, se encontró que las extracciones con metanol y etanol absoluto siempre daban una coloración amarilla y que por medio de extracciones exhaustivas con metanol absoluto, se lograba finalmente la decoloración total de las células liberándose todo el colorante.

Este extracto metanólico tiene dos características interesantes; una de ellas es que es mucho más estable que el colorante rojo extraído con metanol al 5% y la otra es que al alcalinizarse vira a rojo (tabla 11).

Al cotejar las observaciones hechas al microscopio con las extracciones con metanol al 5% se encontró que a mayor número de células muertas, se obtendría mayor cantidad de color y otro tanto ocurría cuando el número de células coloreadas rebasaba el 60%, pero siempre referido a extracciones incompletas.

Durante la sonicación y congelación los resultados fueron negativos, pues no se logró mejorar la extracción del colorante.

#### SEPARACION Y PURIFICACION

Al realizar las lecturas espectrofotométricas de las alicuotas que contenían el color rojo, obtenidas al pasar por la columna de sílica gel las muestras de pitaya fruto y betabel, se observó que los picos ubicados alrededor de 535 y 580 nm continuaban sin ser simétricos, de dichos resultados supusimos que la existencia de interferencias (otros productos). Con la columna de sephadex, el colorante obtenido del cultivo de células de pitaya se decoloro casi totalmente, durante su trayecto por esta columna.

Por tratar de estabilizar el colorante por medio de la desactivación de una posible enzima, se procedió con calentamientos de corta duración, y en los cuales no se tuvo éxito, porque al rebasar los 40°C el colorante se deteriora rápidamente.

Al añadir EDTA como antioxidante al hacer la extracción, y como buffer citratos en lugar de fosfatos, se logró que el colorante de células de pitaya pasara por la columna de Sephadex sin oxidarse significativamente y sin decolorarse, quedando preparado para pasarlo por la columna de intercambio iónico. Después de eluirlo por ésta columna, sus alicuotas coloreadas muestran un espectro bastante simétricos.

Durante la electroforesis los colorantes de betabel, pitaya fruto y betanina testigo, migran hacia el ánodo, mientras que la jamaica y la rutina lo hacen hacia el cátodo y el colorante de células de pitaya se queda en el origen o migra hacia el cátodo (Tabla 11).

Los resultados de los espectros de los colorantes sin pasar por las columnas fueron:\*

---

\* Las gráficas tanto de las lecturas antes y después de su purificación de los pigmentos, se encuentran en el apéndice IV.

El espectro de la betaninas (testigo) tiene una ligera absorbancia a 280 nm y su máxima expresión a los 535 nm (gráfica 8). De igual forma se observó en la absorción a los 535 nm del extracto de betabel (gráfica 9).

El espectro de la rutina sí presenta picos de absorción a 270 nm (gráfica 10).

El colorante obtenido de células da picos de absorción alrededor de los 280 nm y 360 nm (gráfica 11). En cambio en el fruto de la pitaya la mayor cantidad de absorción se verifica a los 485 y 535 nm (gráfica 12).

El colorante pasado por las columnas:

En la betanina y rutina continua dando el mismo rango de absorción. Para el betabel obtenemos un espectro más simétrico a 535 nm (gráfica 13). Y para el colorante obtenido de células de pitaya da un espectro bastante simétrico, con absorción máxima de 470 nm (gráfica 14).

#### **V.-PRUEBAS FISICOQUIMICAS**

De acuerdo a las características de los pigmentos antocianínicos y betalámicos, se realizaron algunas pruebas físico-químicas; las cuales se basan en los cambios cualitativos del producto al encontrarse en condiciones de alcalinidad, acidez y la facilidad de solubilidad en dos tipos de solventes (agua y metanol), y cuyos resultados se muestran en la Tabla 11.

**Tabla.-11 COMPARACION DE EL COLORANTE OBTENIDO CON PRODUCTOS TESTIGO**

PRUEBA QUIMICA	ANTOCIANINAS (Rutina)	BETALAINAS (Betanidina)	COLORANTE DE CELULAS DE PITAYA
Solución acuosa, pH alcalino	verde-azul	amarillas	rojo
Solución acuosa, pH Acido	amarillo	rojo	amarillo
Solución ácida, diluida y calentada	color estable	desaparece	desaparece
Solución alcohólica, pH alcalino	rojo	amarillo	rojo
Solución alcohólica, pH Acido	amarillo	lila	amarillo
Solubilidad de las muestras	>alcohol	>agua	>alcohol
Electroforesis *	Cátodo	Ánodo	Origen/Cátodo

\* Nota: incluimos los resultados de la electroforesis, como apoyo en la comparación de las sustancias testigo con el colorante obtenido de *S. queretaroensis*.

#### 9.- DISCUSION:

Absolutamente en todo cultivo de tejidos, la formulación del medio y las condiciones (pH, temperatura, luz, velocidad de agitación, etcétera) afectan significativamente los resultados en el desarrollo de las células de *S. queretaroensis*; pero tal vez uno de los factores que no se tomó en cuenta en este trabajo fue la consideración del tipo de metabolismo que presenta la planta de trabajo, que en éste caso es el ciclo metabólico CAM' (vía metabólica del ácido crasuláceo); (Mabry, 1977), y que en poco o mucho condicione la respuesta celular.

\* La vía CAM o del ácido crasuláceo, se encontró en las plantas de la familia de las crasuláceas y este metabolismo implica la acción de los ciclos C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>.



La acumulación de los metabolitos secundarios, no está formado generalmente, como un resultado directo de la división activa de la célula; en el caso de S. queretaroensis, la acumulación del colorante se verifica en la fase lag del crecimiento o al aplicar condiciones de estrés al cultivo celular.

Por conveniencia se recomienda la utilización de dos medios de cultivo, uno de los cuales permita el crecimiento de las células (MS9) y el segundo la acumulación del pigmento o en otras palabras que produzca la lisis de las células (B5), procedimiento descrito por Fujita et al., 1981 y Alfermann & Reinhard, 1978. (26,51)

Es posible que al controlar los cambios de pH, obtengamos más producción de la obtenida, ya que como se pudo observar en los datos graficados las variaciones en las condiciones del cultivo afectaron notablemente la reproducción celular. Además de que se esperaba poder identificar claramente las fases estacionaria y logarítmica dentro de las mediciones hechas; éstas posiblemente no se aprecian por las condiciones aplicadas al cultivo celular trabajado.

En las mediciones de conductancia, se pueden apreciar los cambios del medio pero la respuesta esperada al realizar una correlación de la conductividad y el peso seco, solamente el caso de el medio MS2 se observa una disminución de la conductividad.(35,42,45)

Con relación al colorante y su purificación, cuando se pasó por la columna de sílica gel no se logró la separación deseada. Al añadir el EDTA como secuestrador de metales, tal como lo señala la bibliografía (7), se obtuvo un tiempo de conservación más duradero de nuestro colorante.

En los resultados de la electroforesis reportados por Mabry, T. J, donde se indica que "las betalainas de las pitayas fruto y betabel migran hacia el ánodo" los resultados obtenidos en este trabajo coincidieron al utilizar como testigo betanina (comercial). Y por lo tanto, se verificó que las antocianinas de la jamaica y la rutina, migraran hacia el cátodo (10).

En la bibliografía se indica que para las betacianinas su pico de absorción es de 535 nm, mientras que el de 480 nm coincide con el de las betaxantinas (9,10). Al realizar barridos sobre el colorante obtenido de las células el pico difiere a los mencionados anteriormente, lo cual puede ser indicativo de que contiene sustancias que no son betalainas.

Al analizar el espectro de las antocianinas testigo (rutina) la máxima absorción se encuentra en los 270 nm mientras que el colorante de células no lo hace, parece ser que este último tampoco contiene esas sustancias.

Por último en las pruebas químicas, se aprecia como tampoco coincide el colorante ni con las antocianinas ni con las betalainas plenamente.

#### 10.-CONCLUSIONES:

- 1.-*S. queretaroensis*, puede presentar un metabolismo fotosintético distinto, al de las plantas reportadas en la bibliografía.
- 2.-Es posible que al controlar adecuadamente el pH y la administración de los nutrientes en el medio, se incremente notablemente el peso celular.
- 3.-La acumulación del colorante no es el resultado de la división activa sino de la gradual lisis celular; ocasionado por las condiciones adversas del medio.
- 4.-Para obtener el colorante, es recomendable la utilización de dos medios distintos.
  - a) el medio que permita el crecimiento (MS9).
  - b) y el medio de cultivo que facilite la acumulación del pigmento (B5).
- 5.-El colorante obtenido por sus características físico-químicas tiende establecerse en el grupo de los flavonoides.

## 11.-RECOMENDACIONES:

Dado que son los primeros estudios sobre el cultivo de esta especie *S. queretaroensis*, es necesaria la utilización de otras variables para comprender mejor los procesos, tales podrían ser:

- 1.-la aplicación de distintos tipos de Amortiguadores, con la finalidad de lograr mayor masa celular al evitar los cambios bruscos del pH. (4)
- 2.-La utilización de dos medios de cultivo (segunda fase de cultivo), uno especializado en la propagación y otro en la concentración del colorante. (26,51)
- 3.-Intentar una reducción en el contenido de agua celular, ya sea elevando la presión osmótica del medio para realzar el peso seco (43,51).
- 4.-Establecer las condiciones óptimas del crecimiento de *S. queretaroensis* y adaptarlas para su aplicación al Bioreactor.
- 5.-Lograr la identificación absoluta del colorante obtenido del cultivo de *Stenocereus queretaroensis*; ya sea utilizando otras técnicas analíticas no utilizadas en el presente trabajo. Con la finalidad de evaluar su posible utilización en la industria alimenticia o farmacéutica.



**A P E N D I C E 1**

**Tabla 12.- CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS PIGMENTOS**

PIGMENTO	COLOR	ABSOR_BANCIAS	SOLUBI LIDAD	ESTABILIDAD
ANTOCIA-NINAS	NARANJA ROJO (pH ACIDO), AZUL (pH ALCALINO)	420-516 nm	SOLUBLE EN AGUA	SENSIBLE AL pH ALCALINO, METALES Y ES TERMO-LABIL
FLAVONOIDES	SIN COLOR AMARILLO NARANJA	300-400 nm	SOLUBLE EN AGUA	CON CIERTA ESTABILIDAD AL CALOR
BETALAINAS	AMARILLO, NARANJA (betaxant inas) ROJAS A PURPURAS (betacian inas)	480-540 nm	SOLUBLE EN AGUA	SENSIBLES, CAMBIOS DEL pH, PRESENCIA DE OXÍGENO, LUZ Y AL CALOR

**Tabla 13.-RELACIONES ENTRE LA ABSORCION DE LUZ Y EL COLOR COMPLEMENTARIO.**

LONGITUD DE ONDA ABSORBIDA (Mμ*)	COLOR ABSORBIDO	COLOR COMPLEMENTARIO
400-435	Violeta	Amarillo-Verde
435-480	Azul	Amarillo
480-490	Azul-Verde	Naranja
490-500	Verde-Azul	Rojo
500-560	Verde	Púrpura
560-580	Amarillo-Verde	Violeta
580-595	Amarillo	Azul
595-605	Naranja	Verde-Azul
605-750	Rojo	Azul-verde

\*Nota: 1 Mμ = 1nm = 10 Å. (Tabla tomada de C. W. Wu Química Organica Moderna. Volumen 2, Ed. C.E.S.A., 1983, impreso en México, capítulo 26).

**TABLA 14.- CINETICA DE CRECIMIENTO No. I DEL MEDIO MS2 \***

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
3.924	8.8141	5.8	.025	.029	.087
5.447	12.2923	3.04	.042	.028	.206
7.698	18.017	4.04	.039	.031	.151
5.589	12.8440	4.18	.036	.025	.146
8.169	19.3180	4.19	.033	.025	.114
10.117	24.4096	4.28	.058	.048	.110
11.38	28.9127	4.90	.047	.038	.121

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 15.- CINETICA DE CRECIMIENTO No. II DEL MEDIO MS2\***

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
4.346	11.1838	5.21	.034	.025	.37
4.7646	12.2209	3.16	.097	.068	.37
5.7873	13.8996	4.04	.070	.063	.014
6.2103	15.0379	4.19	.08	.072	.013
7.8216	22.6177	4.77	.174	.056	.08
8.9566	26.2342	4.69	.081	.076	.031
9.5686	27.5821	4.42	.084	.082	.038
10.3766	34.4044	4.21	.060	.053	.016

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

---

\* Nota: El medio MS2 fue muy susceptible de contaminación por levaduras y hongos; aunque no se omitieron los datos estas 2 tablas (I y II), por el hecho que la contaminación por hongos en la tabla I, tuvo lugar en el sexto día de muestreo; para la tabla II la contaminación de levaduras se apreció a partir del tercer día, razón por la cual el crecimiento fue notable no se tomaron en cuenta solo la tercera, la cual fue la única que no presento contaminación.

**TABLA 16.- CINETICA DE CRECIMIENTO NO. III DEL MEDIO MS2**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
5.4946	11.8226	5.35	.065	.049	.061
7.4163	15.0112	3.63	.029	.014	.084
9.6953	17.8586	4.45	.045	.031	.042
8.9936	17.7513	4.32	.212	.196	.033
7.904	16.2324	5.03	.126	.103	.059
4.9433	11.9818	4.72	.04	.02	.009
6.8096	12.2909	4.54	.039	.018	.033
6.64	10.0843	4.26	.041	.02	.010

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 17.- CINETICA DE CRECIMIENTO NO. I DEL MEDIO MS9**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
6.5453	14.3213	4.64	.071	.05	.112
7.829	18.5513	2.85	.092	.073	.218
7.7753	16.5657	3.04	.1	.084	.206
9.325	20.0726	3.43	.112	.094	.183
8.4573	17.7221	3.07	.238	.198	.199
8.874	17.6838	3.65	.273	.233	.169
10.9556	34.2607	3.77	.091	.077	.163
12.493	32.4496	4.15	.232	.209	.139

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 18.- CINETICA DE CRECIMIENTO No. II DEL MEDIO MS9**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
4.558	9.6386	5.49	.055	.038	.103
5.338	10.1152	2.96	.044	.025	.214
5.794	10.8305	3.15	.037	.024	.205
5.532	10.0649	3.55	.053	.04	.18
8.272	16.3281	3.66	.06	.042	.176
7.003	12.7415	3.54	.089	.07	.188
13.973	29.6551	4.82	.048	.036	.103
13.41	32.7122	5.55	.034	.026	.055

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 19.- CINETICA DE CRECIMIENTO No. III DEL MEDIO MS9**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
3.8193	10.0241	4.89	.048	.038	.96
4.9633	10.635	2.60	.091	.068	.218
5.206	11.1526	3.43	.109	.097	.176
6.4356	13.2846	3.21	.096	.085	.175
6.5966	13.7831	3.3	.157	.152	.170
8.1593	18.1382	3.50	.144	.136	.170
9.068	22.1836	4.14	.202	.192	.135
11.1216	27.3685	3.9	.170	.154	.149

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad



**TABLA 20.- CINETICA DE CRECIMIENTO No. I DEL MEDIO MS11**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
6.502	17.0189	3.23	.12	.089	.171
6.4615	12.654	2.98	.138	.095	.171
5.193	9.9207	2.86	.195	.138	.175
6.0065	14.6145	3.18	.137	.099	.169
9.494	29.1622	3.41	.154	.135	.149
6.5435	15.3102	2.91	.197	.151	.178
5.7945	10.8730	3.92	.209	.149	.178

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 21.- CINETICA DE CRECIMIENTO No. II DEL MEDIO MS11**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
3.7803	11.1234	5.66	.028	.026	.051
3.8376	11.4354	3.48	.195	.162	.284
4.7276	12.0466	4.22	.268	.235	.07
5.403	15.4443	4.23	.226	.208	.056
5.4513	17.1838	4.14	.264	.241	.056
3.498	8.5621	3.02	.598	.509	.061
6.7866	25.4113	4.19	.412	.362	.062
6.9	26.4950	3.9	.752	.652	.065

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 22.-CINETICA DE CRECIMIENTO No. III DEL MEDIO MS11**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
9.0966	8.3563	4.53	.120	.101	.170
3.7396	8.9698	3.49	.543	.433	.080
3.384	7.2863	3.25	.513	.387	.07
3.811	8.6392	3.01	.576	.489	.019
4.1786	9.8064	2.9	.602	.51	.017
4.0126	8.6700	3.04	.553	.473	.015
4.262	9.4035	3	.576	.502	.011
5.062	9.3723	2.74	.527	.494	.012

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 23.-CINETICA DE CRECIMIENTO No. I DEL MEDIO B5**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
4.07	10.9408	5.54	.01	.005	.038
4.2693	10.6676	2.86	.082	.069	.037
5.9236	14.8964	4.68	.0475	.459	.034
5.944	14.0543	5.98	.454	.425	.033
6.149	15.8893	5.94	.212	.203	.031
8.178	23.0260	5.82	.164	.159	.03
7.824	21.9480	6.26	.077	.060	.029
10.069	27.2832	6.84	.058	.047	.025

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 24.- CINETICA DE CRECIMIENTO No. II DEL MEDIO B5**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
5.8426	6.1874	3.66	.068	.057	.151
3.6286	6.6945	3.34	.083	.067	.184
4.5136	7.6404	2.87	.145	.125	.072
4.6793	7.7207	2.97	.290	.269	.056
4.4603	6.7288	2.81	.327	.289	.043
4.9716	8.3251	2.86	.343	.303	.061
5.1663	8.7908	2.87	.382	.340	.065
4.6186	7.3109	2.81	.294	.253	.070

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 25.- CINETICA DE CRECIMIENTO No. III DEL MEDIO B5**

PESO SECO g/100 ml	PESO HUMEDO g/100 ml	pH	ABS 480 nm	ABS 535 nm	COND Ohms
2.4156	4.223	3.93	.162	.148	.65
2.1566	4.8545	3.97	.144	.129	.101
2.5936	5.3813	3.96	.150	.132	.106
2.6566	5.5796	4.016	.263	.244	.100
1.999	3.7223	3.92	.158	.136	.101
2.7613	5.3659	3.71	.109	.086	.103
2.5716	5.3594	3.70	.110	.091	.105
2.1813	4.8335	3.77	.138	.118	.103

ABS = Absorbancias  
Cond = Conductividad

**TABLA 26.-CINETICA DE CRECIMIENTO No. II DEL MEDIO MS9  
"EXTRACCION DEL COLORANTE"**

ABS 480 nm	ABS 535 nm
.397	.223
.859	.508
.772	.449
.239	.109
.354	.202
.351	.189
.256	.143
.151	.079

ABS = Absorbancias

**TABLA 27.- CORRELACION DE PESOS Y CONDUCTANCIA**

PESO SECO MS2 g/100 ml	PESO SECO MS9 g/100 ml	CORR. MS2	CORR. MS9
5.4946	4.558	7.668808	3.338917
7.4163	5.338	7.545459	4.666369
9.6953	5.794	7.422111	5.993821
8.9936	5.532	7.298762	7.321274
7.904	8.272	7.175413	8.648726
4.9433	7.003	7.052064	9.976178
6.8096	13.973	6.928715	11.30363
6.64	13.41	6.805367	12.63108

ABS = Absorbancias

CORR = Correlación

Valor de la  $r=1$  en los medios MS9, MS11 y B5.

Valor de la  $r=-1$  en el medio MS2.

**TABLA 28.- CORRELACION DE PESO SECO Y CNDUCTANCIA**

PESO SECO MS11 g/100 ml	PESO SECO B5 g/100 ml	CORR. MS 11	CORR. B5
3.7803	4.07	3.67545	3.77275
3.8376	4.2693	4.067621	4.567211
4.7276	5.9236	4.459793	5.361672
5.403	5.944	4.851964	6.156132
5.4513	6.149	5.244136	6.950593
3.498	8.178	5.636307	7.745054
6.7866	7.824	6.028479	8.539514
6.9	10.069	6.42065	9.333975

ABS = Absorbancias

CORR = Correlación



**A P E N D I C E 2**

## DESCRIPCIONES DE ALGUNAS PLANTAS MENCIONADAS EN EL TEXTO:

### Agrostema githago:

Género de plantas herbáceas de la familia de las Cariofiláceas, cuya especie más conocida es *A. githago*, llamada también nequillón. Es una hierba anual, común y nociva, infestante de los campos de los cereales, de hasta 1 m de altura con flores grandes, violáceas o rojizas, provistas de sépalos más largos que los pétalos. Las semillas contienen un principio acre y venenoso.

### Amaranthus caudatus: L.

También conocida en México, como flor de seda y moco de pavo en el estado de Chiapas; estas son plantas dicotiledoneas con hojas opuestas y alternas, sin estípulas con hojas muy pequeñas, de colores vivaces o verduscas, solitarias, comúnmente en inflorescencias en cabezuela o en espiga compacta, con frutos en utrículo o pixidio. Comprende varios géneros, de los que son más conocidos son *Amaranthus*, *Celosia* (las crestas de gallo de los jardines), *Achyranthes* y *Gomphrena*.

### Amaranthus tricolor: L.

Conocida como ala de perico en Jalisco, perteneciente a la familia de las amarantáceas

### Beta vulgaris: L.

Perteneciente a la familia de las Quenopodiáceas, se le conoce en lengua maya (Yucatán) como Chak-mtos, y en el resto del país, como remolacha y betabel. La especie *Beta vulgaris* es una planta bianual originaria de las costas mediterráneas y cultivada en Europa y América. De raíz gruesa, carnosa, pivotante; hojas ovales; flores pequeñas, verdes, glomérulos dispuestos en espiga o panoja; frutos en aquenio globoso con semillas pequeñas y oscuras. Son sus principales variedades: *Beta vulgaris* *Cycla*, cultivada por sus hojas con gruesa nervadura media, usada como hortaliza (acelga); *B. vulgaris* rapa, con raíces blancas, rojas y amarillas (remolacha); la *B. vulgaris* *sacharifera* proporciona también azúcar. Algunas especies se han espontaneizado en los lugares salobres (*Beta marítima*), donde constituyen una vegetación característica y se conocen con el nombre de bledas boscanas o acelgas silvestres.

Catharanthus roseus: L.

Especie vegetal perteneciente a la familia de las pocinaceae, conocida también como perteneciente al genero Vinca; procedente de Java o Brasil, conocida como margarita de Madagascar, son plantas erectas con hojas oblongas lustrosamente verdes con una vena clara central, flores vistosas de rosas a rojas, con un cuello púrpura.

La rosa margarita, tiene hábitos compactos, es muy prolífica, florece con bonitas flores blancas, las cuales tienen un anillo rojo al centro. En México a esta planta se le conoce como "Teresita".

Coffea arabica: L.

Planta perteneciente a la familia de las Rubiáceas, conocida generalmente como cafeto, en lengua Tarahumara (Chihuahua) caje; en la lengua huasteca, (sureste de San Luis Potosí) capé; en dialecto mexicano de Tetelcingo, Morelia, Cafie y en la lengua totonaca de la sierra norte de Puebla, Capij.

Coleus blumei:

Plantas herbáceas, perteneciente a la familia de las Labiadas o Lamiáceas, originarias del Africa o de las regiones cálidas del Asia. Tiene el tallo tetragonal, hojas opuestas, ovales, oval-puntiagudas, dentadas, verdes, amarillentas o rojizas, unicolores o variadas; flores pequeñas reunidas en inflorescencias. Se cultivan con fines ornamentales en macetas, especies: C. blumei de Java. La C. edulis y otras tienen tubérculos comestibles.

Coptis japonica:

De la familia de las ranulaceas, existen 10 especies de estas hierbas pequeñas procedentes de el hemisferio norte, específicamente de las zonas templadas, tienen delgados rizomas, las hojas son basales, siempre verdes, ternariamente divididas, flores pequeñas blancas o amarillas, sobre escapos, los sepalos de 5 a 7, con pétalos caducos, pequeños y anchos; el ápice tubular, estambres de 15 a 25 y pistilos de 3 a 9 sobre un tallo delgado; los frutos son folículos o bayas.



Daucus carota: L.

Plantas herbáceas de la familia Umbelíferas con una gran raíz pivotante, que comprende a la zanahoria. Y es conocida en la lengua zapoteca (Oaxaca), Guu-xñaá.

Dimorphoteca sinuata:

Planta herbáceas de la familia de las compositaceas; este género comprende cerca de siete especies, todas ellas son anuales o vivaces, muy rústicas y todas ellas originarias de Africa meridional. de 25-30 cm de altura, de tallos delgados, ramificados, rastreros poco erectos. Las hojas radicales o alternas, frecuentemente estrechas, enteras, dentadas. Las flores de color naranja fuerte, blanco, morado, poseen un círculo negro alrededor del botón central.

Galium aparine:

Plantas de la familia de las Rubiáceas, hierbas anuales o perennes, en parte cosmopolitas. Especies indígenas: Galium verum (Gallium mexicanum H.B.K.) (V. cuajaleche, pegarropa, presera, hierba de la pulga en el valle de México) y G. aparine, llamado amor de hortelano, común en los bosques pequeños y matorrales; sus frutos torrefactos, dan un sucedáneo del café. Con el nombre de galio blanco se conoce el G. mollugo.

Hibiscus sabdariffa L.

Conocida en el país como Flor de Jamaica, Jamaica, Rosa Jamaica. Es una planta que pertenece a la familia de las Malváceas; son hierbas, arbustos o árboles de regiones cálidas; cultivadas como ornamentales y para extraer fibras textiles; se usan también para infusiones tónico-digestivas, La especie rosa sinesis o rosa de China es un arbusto de grandes flores campanuladas blancas, rojizas o lilas.

Ipomoea batatas: Lam.

Plantas herbáceas volubles de la familia de las Convolvuláceas de las regiones tropicales con hojas acorazonadas, flores con corola gamopétala, infundibuliforme; cultivadas como ornamentales (comúnmente convólulos o correhuelas) o por sus tubérculos comestibles (v. batata), conocida en México como camote.

Lycopersicum esculentum: Mill:

Planta herbácea vellosa, de hojas irregularmente divididas; flores monopétalas, amarillas, pequeñas; fruto esférico o subsférico de 6-8 cm, liso, rojo, con pulpa rojiza comestible; semillas aplanado-reniformes. perteneciente a la familia de las solánaceas, y a la cual se le conoce con el nombre de Jitomate

Lithospermum erythrorhizon:

Plantas de la familia de las Borragináceas, con flores muy pequeñas, con corola pálida. Son especies comunes: L. officinale, de los campos, llamada mijo de sol o granos del amor, usada en medicina popular como diurético, y L. purpúreo-caeruleum, que ha dado origen a muchas variedades ornamentales de jardín. En México tenemos el L. angustifolium (Mich.), conocida como hierba de las perlas.

Morinda citrifolia:

Árboles o arbustos tropicales de la familia de las Rubiáceas; flores en capítulos; infrutescencia parecida a una mora de morera; de las raíces se extrae una sustancia colorante roja.

En México tenemos las siguientes especies: M. panamensis (Stand) y M. yucatanensis (Greenm).

Myrtillocactus geometrizans: (Mart.) Cons.

Pertenecientes a la familia de las cactáceas; de forma candelabriforme, con las ramas encorvadas; flores estrelladas, blanco verdosas de 2 cm.; fruto globoso de 7 mm, rojo oscuro, comestible; se le encuentra en los estados de Oaxaca, Durango; Hidalgo; Querétaro.

Nicotiana tabacum: L.

Planta herbácea hasta de 2 m.; con hojas alternas grandes, elípticas a oblongas, viscosas; flores monopétalas tubulosas, rosadas o rojas; fruto capsular con semillas numerosas y pequeñas, cultivada principalmente en lugares de clima cálido.

Panax ginseng: L.

Planta herbácea perenne de la familia de las araliáceas; procedente del Japón y de la China; hojas ovales borde aserrado; flores amarillas, perfumadas; raíces principales fusiformes con raíces secundarias dispuestas de modo que forman a veces grotescas figuras humanas de sabor al principio amargo y luego dulzón; en los países de origen tiene fama de panacea universal y de afrodisíaco.

En México contamos con el *Panax quinquefolium* L., la cual es nativa de Canadá y el norte de los Estados Unidos, y es cultivada escasamente en el país.

Patroselium sativum L.

Planta herbácea, de hojas olorosas, la cual se usa como condimento en comidas, pertenece a las Umbelíferas, es una planta de cultivo. Conocida comúnmente como perejil.

Petunia hybrida: Hort.

Conocida con los nombres vulgares de petunia o betunia. Es una planta herbácea de hojas blandas, flores monopétalas de diversos colores. Planta venenosa. y cultivada principalmente como ornamental.

Phytolacca americana: L.

Plantas dicotiledóneas de la familia de la fitolacáceas, llamadas así por el color de sus frutos, que comprende plantas herbáceas, arbustivas o grandes árboles, con hojas enteras, flores hermafroditas o bien unisexuales por aborto (*Ph. dioica*); entre ellas destaca la *Ph. decandra* o hierba carmín, de flores y frutos rojos, usada contra la sífilis y para la adulteración de vinos tintos. En México se puede encontrar la *Ph. dioica* L., *Ph. icosandra* L., *Ph. octandra* L..

Populus hybrida:

Plantas de la familia de las salicáceas árboles de gran porte que crecen en los lugares húmedos y a lo largo de los cursos de agua en las regiones templadas y frías del hemisferio septentrional; hojas ovales y casi triangulares, dentadas en los bordes; flores dioicas, aclamídeas, en amentos; fruto en cápsula con numerosas semillas pilosas en la base. Proporcionan madera blanca, ligera, tierna, usada para contraplacados, cerillas, embalajes y pasta de madera. En nuestro país (México), el género es mejor conocido como Álamo; y las variedades que podemos encontrar son: P. alba L., P. arizonica Sarg., P. Brandegeei Scheid., P. canadensis Moench., P. dimorpha Brand., P. nigra L., P. tremula L., P. tremuloides Michx. y P. Wislizeni (Wats) Sarg..

Portulacca grandiflora:

Plantas herbáceas de la familia de las Portulacáceas de las regiones cálidas, entre las cuales la especie P. grandiflora se cultiva por sus bellas flores variopintas. En España crece espontánea la P. oleracea (v. Verdolaga).

En la región central y sur de México, podemos encontrar la P. halimoides L., la P. oleracea L. (verdolaga), P. pilosa L. y P. grandiflora L. (amor de un rato, Nayarit, Jalisco).

Stenocereus queretaroensis: Weber, Buxbaum.

Planta candelabriforme hasta de 9 m, ramas erectas, con tronco bien definido y corto, con 6-8 costillas, espinas de 8-13, areolas distantes como 1 cm; fruto muy espinoso, espinas claras; flores con tubo receptacular relativamente corto y más o menos tubular, las flores de 7-8 cm. Su ubicación geográfica: Querétaro, Jalisco, Aguascalientes, Michoacán y Guerrero.

Strobilathes dyeriana: M. T. Mast.

(Perilepta dyerana (M. T. Mast) Brebeck). Conocida como escudo de Persia, es un arbusto con hojas ovalo-lanceoladas, de 15 cm de longitud y dentadas, de un púrpura débil, casi iridiscente, las flores es espiga, la corola violeta de 3.22 centímetros de longitud con un atractivo follaje.

Thalictrum minus: L.

Planta herbácea de hojas temado-partidas, con lóbulos cortamente agudos; inflorescencia axilar; flores apétalas, con pedúnculos filiformes; fruto de 5 mm; Se le conoce en Chihuahua con el nombre vulgar de Tanito.

Tripterygium wilfordii: Hook. f.

Es un arbusto trepador, de 9 a 12 metros de longitud, sus hojas son oblongas y elípticas a ovaladas de 15.24 cm de largo finamente dentadas, muchas veces con una vellosidad blanca o púrpura; los panículos de 30 cm de longitud, los frutos cercanos a 1 cm de diámetro, de color purpurino, rojo a café. Originarias de Taiwán y China. Utilizándose como una planta con propiedades insecticidas.

Vitis hybrida: L.

Plantas leñosas, lianosas de la familia de las vitáceas, al que pertenece la Vid.

Withania somnifera: Miers.

Se le conoce también como *Salphichroa chomboidea*; perteneciente a la familia de las solanáceas, existen cerca de 25 especies, procedentes de Sur América y el suroeste de los Estados Unidos, los tallos son divergentes a flexuosos con una vellosidad blanca o pubescente; hojas alternantes o cercanamente opuestas; simples y muchas veces con pelos, el peciolo estrecho, las flores solitarias en las hojas axilares o cimosas; el cáliz tubular, hendido y escasamente amplio en el ovario, la corola es blanca o amarilla tubular a ucerolado, con 5 lobulos, torcidos, 5 estambres en pimpinela en la corola; el fruto con 2 cavidades ovoides o oblongas y las semillas muy comprimidas.

Zebrina pendula: Schn.

Plantas herbáceas de la familia de las Commelináceas; la especie más conocida es la *Z. pendula*, cultivada generalmente en macetas con fines de ornato.

El nombre vulgar por el que se le conoce en México es el de hoja de plata, matal, moradilla y Zebrina. (En Jalisco, su nombre común es el de "Sin vergüenza").

Zea mays: L.

De nombre vulgar, Maíz. Esta conocida planta, de la familia de las Gramíneas, ha tenido enorme importancia en México desde tiempos muy remotos. Es originaria de América y no se encuentra en estado silvestre. Se han reconocido 25 razas las cuales incluye gran número de formas que se distinguen por el color, tamaño, etc.



**A P E N D I C E 3**

## GLOSARIO:

### Acetato:

Sal o éster del ácido acético.

### Ácido nicotínico (niacina):

Interviene en la constitución de una vitamina del grupo B. Es un constituyente de las coenzimas NAD y NADP; su fórmula es  $C_5H_4N - COOH$  (Ácido piridín-3-carboxílico).

### Anodo:

Electrodo positivo de una celda electrolítica.

### Antocianinas:

(Gr. anthos, flor + kyanos, azul oscuro). Pigmento glucósido de las plantas superiores, solubles en agua, responsables del color rojo, púrpura y azul de las flores, hojas, frutos y yemas.

### Asépsia:

(Gr. a, privación y sepsis, putrefacción) Conjunto de procedimientos para impedir el acceso de gérmenes o esporas a un organismo sin defensas.

### Auxinas:

(Gr. auxein, crecer). Un grupo de reguladores del crecimiento que estimula la elongación de las células y también tiene otros efectos.

### $C_3$ :

Denominado también ciclo de Calvin o el ciclo del difosfato de ribulosa; el cual no es mas que el

ciclo fotosintético.

### $C_4$ :

En diversas plantas de climas calurosos, tienen la característica de que los ácidos dicarboxílicos de carbono cuatro, oxaloacetato, malato y aspartato quedan marcados después de su incubación con  $CO_2$ . A este proceso se le conoce como vía  $C_4$  o metabolismo de Kranz.

### CAM:

Conocida como la vía metabólica del ácido Crasuláceo, y el cual se caracteriza por incluir dentro de sus procesos metabólicos las vías  $C_3$  y  $C_4$ .

### Caroteno:

Hidrocarburo amarillo, liposoluble, asociado con la clorofila en el proceso fotosintético.

### Cátodo:

Electrodo negativo que recibe o almacena cargas eléctricas.

### Centrospermas:

Orden de plantas dicotiledoneas (Centrospermae). Llamado también centrospermales, caracterizado por la disposición de las semillas de placentación central; ovario supero. Planta herbácea con flores de perianto doble a excepción de las familias más primitivas. Familias principales: Quenopodiaceas,



Amaranthaceas, Cactaceas y  
Cariofiláceas.

**Citocinesis:**

División  
citoplásmatica que sigue a  
la división nuclear. Forma  
parte de la mitosis y la  
meiosis.

**Citocromos:**

(Gr. kytos, vasija  
hueca+ chroma, color). Grupo  
de importantes enzimas  
respiratorias.

**Citoquinesis:**

(Gr. kytos, vasija  
hueca + kinesis,  
movimiento). División del  
citoplasma (en contraste con  
la del núcleo), durante la  
división celular.

**Citocininas:**

(de cytokinesis). Un  
grupo de sustancias  
reguladoras del crecimiento  
que estimulan la división  
celular.

**Cofactor:**

Es un regulador natural  
con acción catalítica y  
regulatoria en el  
metabolismo. Su acción no es  
suficiente por sí misma para  
determinar fenómenos de  
desarrollo, si no que actúa  
a manera de coenzima.

**Colorante:**

Es el termino general  
que se refiere a cualquier  
químico o compuesto que  
imparte color.

**Crasuláceas:**

Familia de plantas  
Dicotiledóneas

(Crassulaceae), herbáceas, a  
veces arbustivas,  
ornamentales o medicinales.  
Presentan hojas suculentas,  
simples, flores regulares,  
en inflorescencias cimosas;  
frutos en cápsula. Se trata  
generalmente de especies  
rupícolas, Xerófilas.  
Géneros más importantes:  
*Sedum*, *Sempervivum*, *Crassula*  
y *Echeveria*.

**Cultivos Continuos:**

Cultivos en suspensión  
que se multiplican por  
períodos de tiempo largos,  
sin subcultivarse y que se  
utilizan en la industria  
para la producción de  
productos secundarios.

**Cultivo en suspensión:**

Cultivo de células,  
tejidos u órganos sumergidos  
en un medio nutritivo  
líquido que requiere  
agitación.

**Diferenciación:**

Fase de crecimiento  
durante la cual las células  
no especializadas se  
especializan en funciones  
particulares (por ejemplo el  
meristemo).

**Elongación:**

(del Lat. elogatio,  
onis). Es el alargamiento de  
toda la estructura que  
conforma a las células,  
siendo una característica  
previa a la división  
celular.

**Espectro de absorción:**

Un área de  
probabilidades de absorción  
a lo largo de la región  
donde una sustancia absorbe  
la luz.

**Expansión:**

Es el momento en que las células tienden a dilatarse en todas sus dimensiones. Siendo una etapa de preparación para el inicio de la mitosis.

**Fase estacionaria:**

Es la etapa donde la actividad celular es de reposo, después de la actividad mitótica.

**Fase G1: (Fase de intervalo I)**

Es la fase que se efectúa en el tiempo de la división mitótica y el comienzo de la duplicación de DNA.

**Fase G2:**

Ocurre después de completada la fase "S", (segunda fase de Intervalo), esto es porque la célula no esta dispuesta para dividirse inmediatamente.

**Fase lag:**

Es el momento en que las células que están en la etapa estacionaria inician un proceso de expansión o elongación.

**Fase log: (logarítmica)**

Etapa del ciclo celular donde se desarrolla una activación de la mitosis.

**Fase M:**

Inicia al término de la G2, marcando una el comienzo de la división mitótica.

**Fase S:**

Es el período de

réplica de DNA durante la interfase.

**Fluorescencia:**

Luz visible que puede ser remitida cuando una molécula absorbe un fotón. Siempre es de longitud de onda mayor que la absorbida, y por tanto de menor energía.

**Fotoperiodo:**

Número de horas de luz en cada ciclo de 24 horas; duración relativa del día y la noche (luz oscuridad), especialmente en relación con la iniciación de la floración.

**Glucósido:**

Substancia orgánica compleja, obtenida de ciertos fermentos se desdobra en glucosa y otro cuerpo distinto para cada glucósido.

**Hemi:**

(Gr. Hemi, medio, mitad)

**Hidrólisis:**

(gr. hydor, agua + lisis, aflojamiento). La desintegración química de moléculas más grandes en moléculas más pequeñas por inserción de los componentes del agua en el punto de ruptura.

**In vitro:**

Designa a los procesos biológicos o a las investigaciones que se realizan fuera de los organismos vivos, tradicionalmente en tubos de ensaye.

**In vivo:**  
(Lat. en vida) Se refiere a experimentos desarrollados en un organismo vivo.

**Iridiscente:**  
(del lat. iris, idis, iris) adjetivo que muestra o refleja los colores del iris.

**Longitud de onda:**  
Distancia entre una posición dada en una onda y la misma posición en la onda siguiente. Generalmente se simboliza con la letra griega lambda ( $\lambda$ ).

**Medio básico:**  
Medio de cultivo formulado con macro y micronutrientes (sin reguladores del crecimiento).

**Medio nutritivo:**  
Medio de cultivo empleado para iniciar, desarrollar o enraizar diferentes inóculos; está formulado con macro y micronutrientes, azúcar y reguladores del crecimiento.

**Metabolismo:**  
(Gr. metabole, cambio). Es la suma de los cambios físicos y químicos que tienen lugar constantemente en los organismos vivos; estos cambios incluyen la construcción de los constituyentes del organismo (anabolismo) y la degradación de moléculas que proveen energía para procesos anabólicos (catabolismo).

**Mol:**  
Unidad de cantidad en química. Cantidad de sustancias en gramos (Mol gramo) o en libras (Mol libra) que corresponde a la suma de los pesos atómicos de todos los átomos que aparecen en la fórmula molecular.

**Molar:**  
(M) Dícese de una solución que contiene un Mol de soluto en 1 000 mililitros de solución.

**Organogénesis:**  
Formación de órganos (la caulogénesis es la iniciación de los brotes y la rizogénesis es la iniciación de raíces).

**pH:**  
Logaritmo negativo de la concentración efectiva del ion hidrógeno. Se usa para expresar tanto la acidez como la alcalinidad de una sustancia, en una escala 0 a 14. El 7 representa el valor para el agua pura a 25°C (neutralidad); los valores por debajo del 7 representan acidez creciente y aquéllos por arriba del 7, alcalinidad creciente.

**Pigmentos:**  
Son los constituyentes normales de las células o tejidos que les imparten color.

**Piridoxina (Vitamina B6):**  
Hidro soluble. Interviene como coenzima en el metabolismo de los aminoácidos.

**Proliferación:**

Crecimiento por multiplicación rápida de nuevas células.

**Reología:**

Designa una ciencia que comprende ciertos capítulos de la física como la viscosidad, plasticidad, elasticidad, fluidez de la materia en general.

**Reómetro:**

Instrumento que sirve para medir la corriente eléctrica. // aparato con que se determina la velocidad de una corriente de agua.

**Subcultivo:**

Transferencia del inóculo a un medio fresco (nuevo).

**Tanino:**

Substancia astringente que sirve para curtir pieles. Se encuentra en muchos tallos y raíces.

**Tejido:**

Conjunto de células de estructura semejante y que desempeñan la misma función.

**Testa:**

Envoltura externa de la semilla.

**Tiamina (vitamina B1):**

Es un catalizador del metabolismo de los glúcidos en forma de pirofosfato; es la coenzima de la descarboxilación de los ácidos  $\alpha$ -cetónicos, la cocarboxilasa.  $C_{12}H_{17}ClN_4OS$ .

**Tintura:**

Son aquellos colorantes sintéticos que se utilizan en la industria textil, y no tienen lugar en el uso alimentario.

**Totipotencial:**

(Lat. totus, todo y de potencial). Capaz de todo.

**Vacuola:**

(diminutivo del Lat. vacuus, vacío). Una vesícula acuosa dentro de un protoplasto, relativamente inactiva químicamente y generalmente considerada como no viviente.

**Viscosidad:**

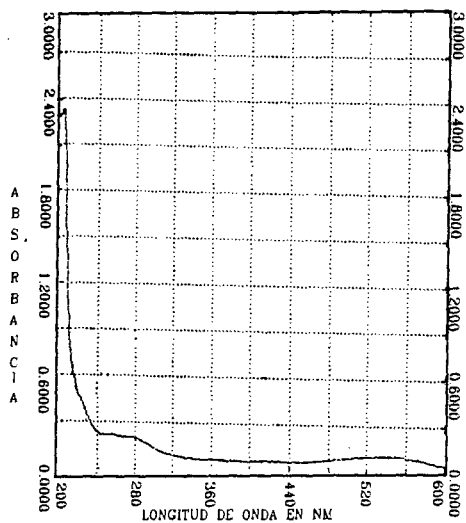
Propiedad de los líquidos o gases que oponen resistencia al movimiento uniforme de dichos fluidos.

**Xantofila:**

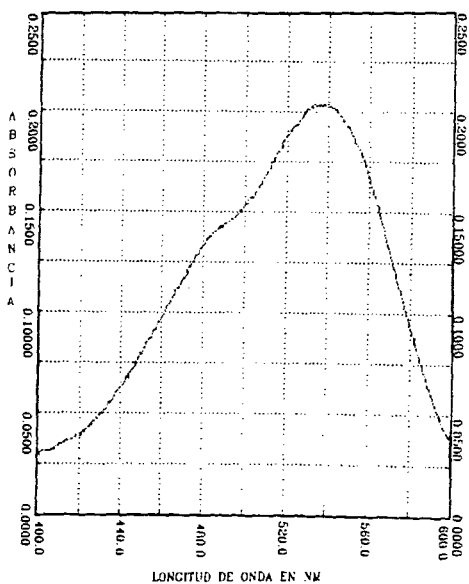
(Gr. xanthos, amarillo + phyllon, hoja). Un pigmento carotenoide amarillo que contiene algo de oxígeno además de carbono e hidrógeno.



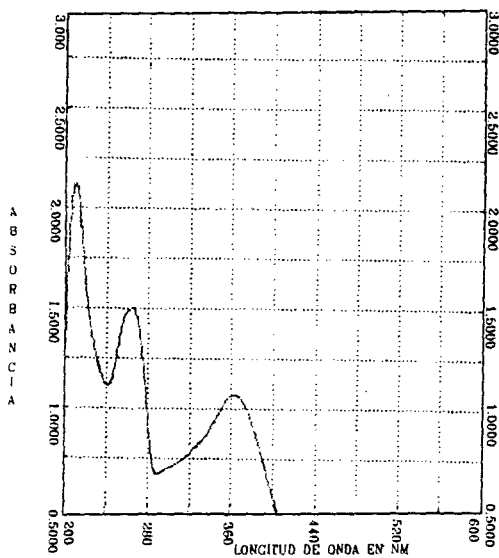
**A P E N D I C E 4**



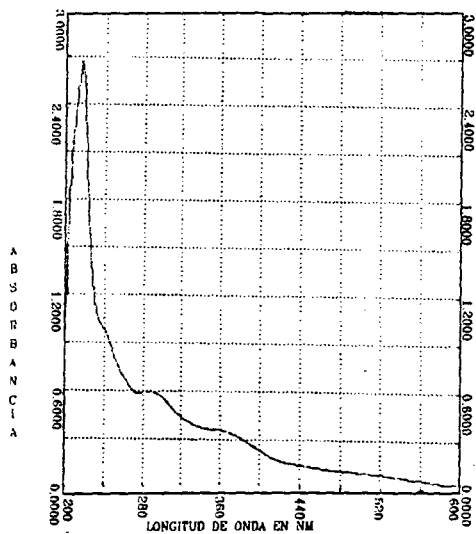
**Gráfica 8** Espectro de basorbancia en betanina comercial, en la cual se pueden apreciar dos puntos de absorbancia uno a los 280 y el otro a los 535 nm.



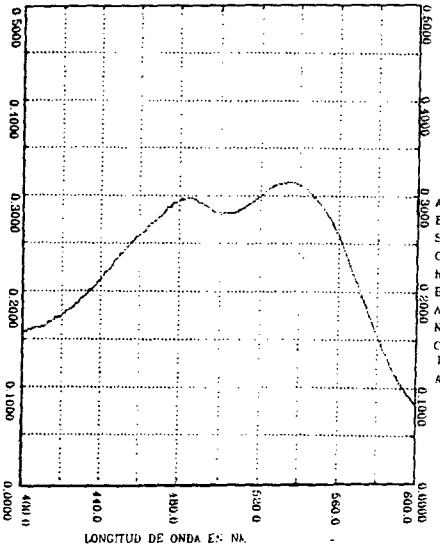
**Gráfica 9** Espectro de absorción del extracto de betabel sin purificar.



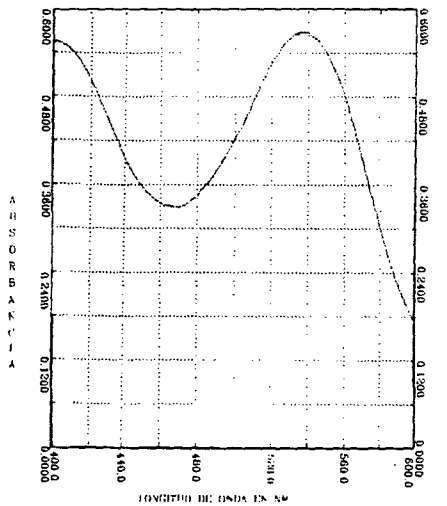
Gráfica 10 Espectro de absorción de la rutina (antocianina sintética).



Gráfica 11 Espectro de absorción obtenido del colorante de células de *S. queretaroensis*.

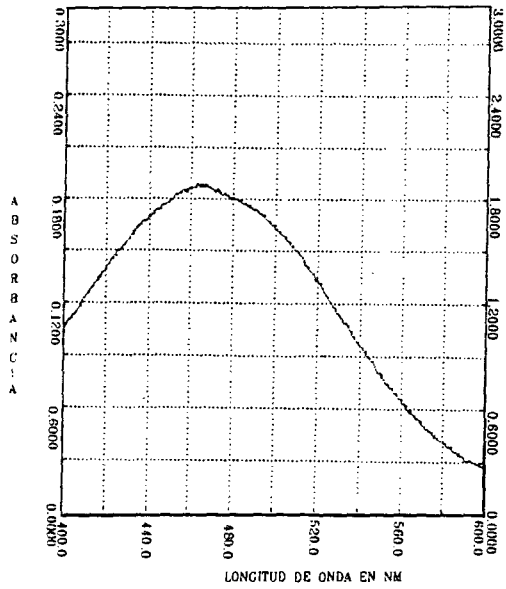


**Gráfica 12** Espectro de absorción del extracto de pitaya roja (Fruto) sin purificar.



**Gráfica 13** Espectro de absorbancias del betabel después de pasar por las columnas de purificación.





**Gráfica 14** Espectro de absorción del colorante obtenido de las células en suspensión.

## BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Hurtado D., Merino M. E., (1987). "Cultivo de Tejidos Vegetales". Ed. Trillas, Primera edición, México. pp 15-39.
- 2.- Pétiard V. y Bariaud-Fontanel A. , (1985). "El Cultivo de Células". Mundo Científico (la Recherche, Versión en castellano) E. fontalba, S.A., Vol. 7, Núm. 71, pp 730-736
- 3.- Badui S., (1990). "Química de los Alimentos". Ed. Alhambra Mexicana, Segunda edición, México. pp 380,401-403, 490-492.
- 4.- Topete M., Torres L. G., Ramírez M. E., Herrera M. y Galindo E., "Avances en los Sistemas de Cultivo Masivo de Células Vegetales". Ciencia y Desarrollo, Vol XVII, Núm. 99, pp 73-85.
- 5.- Mertz E. T., (1980). "Bioquímica". Publicaciones Cultural, S.A., quinta reimpresión, México. pp 315-320.
- 6.- Agraz J. A., (1993). Anteproyecto de Investigación, "Separación y Purificación de Betalainas obtenidas del Cultivo en Suspensión de Células de Pitaya".
- 7.- Rivera C., Protocolo de Tesis, (1993). "Estudio Preliminar sobre la Extracción de un Colorante Obtenido a partir de Células en Suspensión de 'Stenocereus queretaroensis' "
- 8.- Cronquist A., (1984). "Introducción a la Botánica". Ed. C.E.S.A., Séptima impresión, México, 1984. pp 695-696.
- 9.- Böhm H. & Rink E., (1988). "Betalains", Institute of Plant Biochemistry, GDR Academy of Sciences, Halle, German Democratic Republic, cap. 26, pp 449-463.
- 10.- Mabry, T.J., (1980). "Betalains", Enciclopedia of Plant Physiology, Berlin Heidelberg , Ed. E.t. Bell, New York, Vol. 8, Cap. 11. pp 513-533.
- 11.- Sakuta M., Takagi T. & Komamine A., (1986). "Growth Related Accumulation of Betacyanin in Suspensión Cultures of Phytolacca americana L.", J. Plant Physiol., Vol 125, pp 337-343.

- 12.-Dodds J., Roberts L., (1990). "Experiments in Plant Tissue Culture". Ed. Cambridge University Press, Primera edición, 1a. reimpresión, E.U. 1983. pp 1-6, Cap. 3 y 5; segunda edición, 1990 pp 16-20.
- 13.-Elliot D., Shultz C., Cassar R., (1983). "Betacyanin Decolorizing Enzyme in Amaranthus tricolor Seedlings", Phytochemistry, Vol. 22, No 2, Printed in Great Britain, pp 383-387.
- 14.-Whitaker R. & Evans D., (1987). "Plant Biotechnology and the Production of Flavor Compounds", Food Technology, Vol. 41, No. 9, Printed E.U., 1987. pp 86-101.
- 15.-Staba J. E., (1982). "Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals", Segunda impresión, Ed. CRC Press inc., E.U. 1982. pp 6-9, 23-24.
- 16.-Yokoi H., Koga J., Yamamura K., Seike and Tonaka H., (1993). "High Density Cultivation of Plant Cell in a New Aeration - Agitation Type Fermentor Maxblend Fermentor", Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 75, No. 1, pp 48-52.
- 17.-Francis F. J. , (1990). "Pigments and Other Colorants", University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, Cap. 8, pp 545-582.
- 18.-H. U. Seitz, Hinderer W. , (1988). "Anthocyanins", Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 5, Chapter 3, pp 49-69.
- 19.-Scheffeldt P. and Hrazdina G. , (1978). "Co-Pigmentation of Anthocyanins under Physiological Conditions", Journal of Food Science, Vol. 43, pp. 517-520.
- 20.-Fuleki T. and Francis F. J. , (1968). "Quantitative Methods For Anthocyanins. 2 Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice", Journal of Food Science, Vol. 33, pp. 78-83.
- 21.-Lin M., Shi Z. and Francis F. J., (1992). "A Simple Method of Analysis for *Tradescantia* Anthocyanins", Journal of Food Science, Vol. 57, No 3, pp 766-767.
- 22.-Shi Z. , Bassa I. A. , Gabriel S. L. and Francis F. J., (1992). "Anthocyanin Pigments of Sweet Potatoes-Ipomoea batatas", Journal of Food Science, Vol. 57, No. 3, pp 755-757.

- 23.-Dr. Timberlake C. F. and Bridle P., (1966). "Espectral Studies of Anthocyanin and Anthocyanidin Equilibria in Aqueous Solution", University of Bristol, Department of Agriculture and Horticulture, Research Station, Long Ashton, Bristol, Vol. 212, pp 158-159.
- 24.-Clydesdale F. M., Main J. H. and Francis F. J., (1979). "Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Anthocyanins as Colorants for Beverages and Gelatin Desserts", Journal of Food Protection Vol. 42, No. 3 ,pp 204-207.
- 25.-Neuman K. H., (1988). "Phytohormones in Cell and Tissue Cultures", Cell Culture and Somatic Cell, Genetics of Plants, Academy Press, Inc., Vol. 5, Chapter 34, pp 587-598.
- 26.-Sakuta M., Komamine A., (1987). "Cell Growth and Accumulation of Secondary Metabolites", Cell Culture and Somatic Cell, Genetics of Plants, Academy Press, Inc., Vol. 4, Chapter 5, pp 97-114.
- 27.-Ozeki Y. and Komamine A., (1985). "Effects of Inoculum Density, Zeatin and Sucrose on Anthocyanin Accumulation in Carrot Suspensión Culture", Plan Cell Tissue Organ Culture, Vol. 5, pp 45-53.
- 28.-Bravo H. H. y Sánchez M. Hernando, (1989). "Claves para la Identificación de las Cactaceas de México", Compiladas por L. Ulises Guzmán y A. Salvador Arias A.; pp. 27-28.
- 29.-Jiménez-Aparicio, Dávila-Ortiz, Villegas-Garrido, T. L. y Del Villar-Martínez, A., (1992). "Obtención de Betalainas Colorantes de Interés Alimentario por Cultivo de Células de *Opuntia microdasys* (Lehm.) Pfeiff." Rev. Latinoamericana de Química 23/4 y 22/4, pp 5-8.
- 30.-Fowler M. W. , (1986). "Application of Biotechnology in Plant Science", Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology, Edit by Dahan I. Elsevier Applied Science Publishers London and New York in cooperation With Arab Bureau of Education for the Gulf States, pp 295-315.
- 31.-Gamborg O. L., Murashige T., Thorpe T. A. and Vasil I. K., (1976). "Plant Tissue Culture Media", In Vitro, Vol 12, No 7, pp 473-478.

- 32.-Gamborg O. L., (1984). " Plant Cell Cultures: Nutrition and Media", Plant Cell Cultures: Nutrition and Media, Chapter 3, pp 18-25.
- 33.-Hahlbrock K., (1975). "Further Studies on the Relationship Between the Rates of Nitrate Uptake, Growth and Conductivity Changes in the Medium of Plant Cell Suspension Cultures", Biologisches Institut II der Universität, Schünzlestr. Federal Republic of Germany, by Springer Verlag, pp 311-318.
- 34.-Kwok K. H. , Tsoulpha P. and Doran P.M., (1992). "Limitations Associated with Conductivity Measurement for Monitoring Growth in Plant Tissue Culture" Plant Cell, Tissue and Organ Culture Vol 29, pp 93-99.
- 35.-Tayaa M., Hegglin M., Prenosil J. E. and Bourne J. R., (1989). "On-Line Monitoring of Cell Growth in Plant Tissue Cultures by Conductometry" Enzyme Microbiology Technology, Vol. 11, pp 170-176.
- 36.-Havlikova L., Mikova K. and Kyzlink V., (1985). "Red Beet Pigments as Soft Drink Colorants", Prague Institute of Chemical Technology, Department of Food Preserving Technology, Prague, Czechoslovakia; Die Nahrung, pp 723-730.
- 37.-Scragg A. H., Ashton S., York A., Bond P., G. , and Stepan-Sarkissian D. G., (1990). "Growth of Cantharanthus roseus Suspensions for Maximun Biomass and Alkaloid Accumulation", Enzyme Microbiology Technology, Vol. 12, pp 292-298.
- 38.-Hahlbrock K., Ebel J. and Oaks A., (1974). "Determination of Specific Growth Stages of Plant Cell Suspension Cultures by Monitoring Conductivity Changes in the Medium", Planta (Berlin), Vol. 118, pp 75-84.
- 39.-Widholm J. M., (1989). "Initiation and Characterization of Photoautotrophic Suspension Cultures", Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures, Ed. By W. G. W. Kurz, pp 1-13.
- 40.-Blom T. J. M., Kreis W., Van Iren F. and Libbenga K. R., (1992). " A Non-invasive Method for the Routine-estimation of Fresh Weight of Cell Grown in Batch suspension cultures", Plant Cell Reports, Vol 11, pp 146-149.

- 41.-Brown D. C. W. , Thorpe T. A. , (1984).  
 "Organization of Plant Tissue Culture Laboratory",  
 Ottawa Research Station Agriculture, Canadá, Chapter  
 1, pp 1-12.
- 42.-Hahlbrock K. and Kuhlen E., (1972). "Relationship  
 Between Growth of Parsley and Soybean Cells in  
 Suspension Cultures and Changes in the Conductivity of  
 the Culture Medium", *Planta* (Berlin). Vol. 108, pp 271-  
 278.
- 43.-Curtis W. R., Emery A. H., (1993). "Plant Cell  
 Suspension Culture Rheology", *Biotechnology and  
 Bioengineering*, Vol. 42, pp 520-526.
- 44.-Girod Pierre-Alain and Zyrd Jean-Pierre, (1991).  
 "Secondary Metabolism in Cultured Red Beet (Beta  
 vulgaris L.) Cells: Differential regulation of  
 Betaxanthin and Betacyanin Biosynthesis", *Plant Cell,  
 Tissue and Organ Culture*, Vol. 25, pp 1-12.
- 45.-Henshaw G. G., Jha K. K., Mehta A. R., Shakeshaft D. J.  
 and Street H. E. , (1966). "Studies on the Growth in  
 Culture Of Plant Cells", *Journal Of  
 Experimental Botany*, Vol. 17, No 51, pp 362-77.
- 46.-Ryu D. D. Y. and Lee S. O., (1990). "Determination of  
 Growth Rate for Plant Cell Cultures: Comparative  
 Studies", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 35, pp  
 395-311.
- 47.-Fowler M. W., (1985) " Plant Cell Culture-Future  
 Perspectives", *Primary and Secondary Metabolism of  
 Plant Cell Cultures*, ed. by Neumann et al., pp 362-370.
- 48.-Widholm J. M. , (1972) "The use of Fluorescein  
 Diacetate and Phenosafranine For Determining Viability  
 of Culture Plant Cells", *Stain Technology*, Vol. 17, No  
 4., pp 189-194.
- 49.-Shi Z., Francis F. J. and Daun H., (1992).  
 "Quantitative Comparison of the Stability of  
 Antocyanins from Brassica oleracea and Tradescantia  
 pallida in Non sugar Drink Model and Protein Model  
 Systems", *Journal of Food Sciencie*, Vol. 57, No 3, pp  
 768-770.

- 50.-Neumann K. H., (1988). " Phytohormones in Cell and Tissue Cultures", Chapter 34 Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plants Ed. Indra Vasil, Academic Press, Inc (San Diego), pp.587-598.
- 51.-Antell S. H. and Smith H.,(1983)."Cultural Factors that Influence Secondary metabolite Acumulations in Plant Cell and Tissue Cultures", Plant Biotechnology, Cambridge University Press. London; pp 76-108.
- 52.-Brisson L., Ibrahim R. K. and Rideau M., (1988) "Tissue Culture of Chrysosplenium americanum and it's Potential for Flavonoid Production", Plant Cell Reports, Springer-Verlag pp 130-133.
- 53.-Whitaker R. J. and Evans D. A. , (1987) Food Technology, "Plant Biotechnology and the Production of Flavor Compounds", vol. 41, No 9, pp 86-101.