



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Producción de metabolitos secundarios alcaloideos por cultivos *in vitro* de *Datura spp.*”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

DIANA KAREN CASTRO ESTRADA

**ASESOR ACADÉMICO
DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE**

**ASESOR ADJUNTO
DRA. MARÍA DOLORES HERNÁNDEZ NAVARRO**

**ASESOR EXTERNO
DRA. MARÍA ELENA ESTRADA ZUÑIGA**



OCTUBRE 2014



Datura spp.

“O pensamento lógico pode levar você de A a B, mas a imaginação te leva a qualquer parte do Universo”.

A. Einstein

“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe pra ele. Por isso o Universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber”.

A. Einstein

“Na minha opinião, nós ainda não desenvolvemos pesquisas científicas suficientes para encontrar a cura dos ignorantes”.

B. Watterson

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

No puedo decir que ha sido un proceso fácil, pero en definitiva puedo afirmar que es altamente satisfactorio.

Primero, ¡gracias Dios! por iluminar mi camino y permitirme culminar este paso tan significativo para mí.

Gracias a todos los profesores que estuvieron conmigo en este proceso, porque es su experiencia, sus retroalimentaciones y comentarios los que dieron forma a este trabajo; en especial, al Dr. Juan Orozco, por todo su apoyo desde la elección de tema hasta la colocación del punto final, siempre con bromas entre uno y otro. A la Dra. Lolita Hernández, porque con su enfoque detallado y su calidez siempre se logran trabajos profesionales y satisfactorios. A la Miss Cynthia Enríquez, porque sin importar sus ocupaciones siempre se dio un tiempo para ayudarme con una cálida sonrisa.

Gracias a mis amigos, porque sin su ayuda probablemente me hubiera rendido en el primer round, son los chistes y bromas compartidos los que impulsan a terminar las metas. Gracias Dany, porque sé bien que sin ti me hubiera vuelto más loca de lo que ya estoy. Fern, siempre siempre serás mi mejor amigo. Y a mis demás amigos que estuvieron ahí, gracias, porque los momentos a su lado son simplemente inolvidables.

Gracias Beto, porque siempre has demostrado ser un apoyo incondicional, posees el corazón y las ganas que siempre añoraré tener. Te amo hermano.

Gracias abuelita, eres y serás mi inspiración.

Y al final los más importantes, **GRACIAS A MIS PAPÁS**, porque tal vez no escribieron la tesis pero la vivieron conmigo, es su apoyo incondicional, sus consejos, sus regaños, sus sacrificios, todo lo que hacen, todo lo que me dan, lo que hizo posible que esto sucediera. Este trabajo se los dedico a ustedes; nadie lo merece más, porque no conozco a mejores personas y ojalá logre en algún momento hacerlos sentir tan orgullosos como ustedes me hacen sentir todos los días. Los amo infinitamente.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
MÓDULO UNO	
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL	3
1.1. APLICACIÓN DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL	3
MÓDULO DOS	
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	5
2.1. EL ÉXITO DEPENDE DEL EXPLANTE	6
2.2. EXPRESIÓN GENÉTICA: FUNCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	8
2.3. ORGANOGÉNESIS Y MICROPROPAGACIÓN	9
MÓDULO TRES	
METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO DE PLANTAS	11
3.1. METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	12
3.1.2 LA DIVERSIDAD DE FUNCIONES	15
3.2. PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS	16
3.2.1. TERPENOS	16
3.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS	17
3.2.3. COMPUESTOS SECUNDARIOS NITROGENADOS	21
3.2.3.1. GLICÓSIDOS	22
3.3 ALCALOIDES	23
3.3.1. GENERALIDADES	23
3.3.2. FUNCIÓN DE LOS ALCALOIDES EN LAS PLANTAS	25
3.3.3. PROPIEDADES DE LOS ALCALOIDES	26
3.3.4. CLASIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES	27
3.3.4.1. ALCALOIDES DERIVADOS DE LA ORNITINA (PIRROLIDÍNICOS)	28
3.3.4.2. ALCALOIDES DERIVADOS DEL NÚCLEO TROPÁNICO	29
3.3.4.2.1. BIOGÉNESIS DEL NÚCLEO TROPÁNICO	30
3.3.4.2.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	31

ANTECEDENTES	
4. PLANTAS MEDICINALES	32
4.1. FITOTERAPIA	33
5. DATURA	34
5.1. GENERALIDADES	34
5.2. ORIGEN Y ESTRUCTURA	35
5.3. UTILIZACIÓN TERAPÉUTICA DE LOS ALCALOIDES TROPÁNICOS	37
5.4. INTOXICACIONES POR <i>Datura</i>	38
5.4.1. MECANISMO DE ACCIÓN	39
5.4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	39
5.4.2.1. CUADRO CLÍNICO	40
5.5. LABORATORIO	40
5.6. TRATAMIENTO	41
5.7 DATURA STRAMONIUM	43
5.7.1. TOXICIDAD	44
5.7.2. CUADRO CLÍNICO	45
5.7.3. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN	45
5.8. DATURA INOXIA	45
5.8.1. GENERALIDADES	46
5.8.2. TOXICIDAD	47
JUSTIFICACIÓN	48
OBJETIVO	49
HIPÓTESIS	50
MATERIALES, EQUIPOS Y MÉTODOS	
EQUIPOS	51
MATERIALES Y REACTIVOS	54
DISEÑO EXPERIMENTAL	55
METODOLOGÍA	
TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN PARA SEMILLAS DE <i>Datura spp</i>	56
ENSAYO DE GERMINACIÓN PARA SEMILLAS DE <i>Datura spp</i> .	58
CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS DE <i>Datura spp</i> .	58
ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLO DE PLÁNTULAS DE <i>Datura spp</i> .	60
CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO DE CALLO DE PLÁNTULAS DE <i>Datura spp</i> .	61
IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	63
MARCA FITOQUÍMICA PARA METABOLITOS SECUNDARIOS	64
PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN PARA ALCALOIDES REALIZADAS	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN PARA SEMILLAS DE <i>Datura spp</i>	68
ENSAYO DE GERMINACIÓN PARA SEMILLAS DE <i>Datura spp</i>	71

CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS DE <i>Datura</i> spp.	73
ENSAYO DE ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLO DE PLÁNTULAS DE <i>Datura</i> spp	74
CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO DE CALLO DE PLÁNTULAS DE <i>Datura</i> spp.	79
IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	84
PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN PARA ALCALOIDES REALIZADAS	86
CONCLUSIONES	90
RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	91
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1. Planta <i>Datura</i> spp.	2
FIGURA 2. Imagen representativa del metabolismo primario y secundario de las plantas.	11
FIGURA 3. Imagen representativa del metabolismo secundario de las plantas	13
FIGURA 4. Imagen representativa de algunos Terpenos, su uso y plantas que los contienen.	16
FIGURA 5. Grupo fenol.	17
FIGURA 6. Ruta del Ácido Mevalónico.	18
FIGURA 7. Ruta del Ácido Shikimico.	19
FIGURA 8. Estructura Principal de las Cumarinas.	19
FIGURA 9. Imagen representativa de los principales flavonoides vegetales.	20
FIGURA 10. Clasificación de los Taninos.	21
FIGURA 11. Estructura Principal de un Glicósido.	22
FIGURA 12. Aspectos biogénéticos para la clasificación de los alcaloides.	24
FIGURA 13. Configuración de los alcaloides en forma de base y de sal.	26
FIGURA 14. Núcleo tropánico.	29
FIGURA 15. Cis-tropanol.	29
FIGURA 16. Ácido orgánico: trópico.	29
FIGURA 17. Biosíntesis de alcaloides con el núcleo tropánico.	30
FIGURA 18. <i>Datura</i> spp.	34
FIGURA 19. Representativa del tropano y sus derivados.	35
FIGURA 20. <i>Datura</i> spp.	36
FIGURA 21. Representación de los usos tradicionales de <i>Datura</i> spp.	37
FIGURA 22. <i>Datura Stramonium</i> .	43
FIGURA 23. <i>Datura inoxia</i> .	45
FIGURA 24. Uso cotidiano de <i>Datura</i> .	48
FIGURA 25. <i>Datura</i> spp.	50
FIGURA 26. Exterior de cámara para crecimiento de plantas Lumistell ICP-30.	51
FIGURA 27. Interior de cámara para crecimiento de plantas Lumistell ICP-30.	51
FIGURA 28. Exterior de incubadora Barnstead/ Lab- line.	51
FIGURA 29. Interior de incubadora Barnstead/ Lab- line.	51
FIGURA 30. Autoclave Uamoto. Sterilizer SM510. Automática.	52
FIGURA 31. Autoclave Uamoto. Sterilizer SM510. Manual.	52
FIGURA 32. Balanza BOECO Germany CE06.	52
FIGURA 33. Exterior de campana de flujo laminar LABCONCO Purifier classb II Biosafetu Cabinet. Delta series.	53
FIGURA 34. Interior de campana de flujo laminar LABCONCO Purifier classb II Biosafetu Cabinet. Delta series.	53
FIGURA 35. Equipo UV-VIS. Equipo NICOLET AVATAR 360 FT-IR. Con celda de NaCl.	53

FIGURA 36. Aditamentos de equipo UV-VIS. Equipo NICOLET AVATAR 360 FT-IR. Con celda de NaCl.	53
FIGURA 37. Plántula de <i>Datura</i> spp. sembrada en medio MS-Modificado que presentó un crecimiento notable.	58
FIGURA 38. Plántula de <i>Datura</i> spp. sembrada en medio de cultivo MS-Modificado que presentó un crecimiento de raíces muy notable.	59
FIGURA 39. Plántula de <i>Datura</i> spp. sembrada en medio de Cultivo MS-Modificado que presentó crecimiento de un callo en el tallo.	59
FIGURA 40. Plántulas de <i>Datura</i> spp. que presentaron pigmentación magenta en los tallos.	60
FIGURA 41. Medios de cultivo con partes de plántulas de <i>Datura</i> spp. Resembradas.	61
FIGURA 42. Callo de <i>Datura</i> spp. de gran tamaño.	61
FIGURA 43. Comparación de callo de <i>Datura</i> spp. (húmedo) que por su crecimiento presentó gran cantidad de agua dentro de su masa.	62
FIGURA 44. Comparación de callo de <i>Datura</i> spp. (seco) que por su crecimiento presentó gran cantidad de agua dentro de su masa.	62
FIGURA 45. Callo de <i>Datura</i> spp. con presencia de pigmentación magenta.	62
FIGURA 46. Imagen de las diversas muestras que fueron seleccionadas.	63
FIGURA 47. Trituración para la preparación de las diversas muestras para su identificación por medios de pruebas fitoquímicas.	64
FIGURA 48. Calentamiento para la preparación de las diversas muestras para su identificación por medios de pruebas fitoquímicas.	64
FIGURA 49. Muestras preparadas para su identificación por medios de pruebas fitoquímicas.	64
FIGURA 50. Prueba de Dragendorff positiva.	64
FIGURA 51. Prueba de Wagner positiva.	65
FIGURA 52. Trituración para la preparación de los extractos.	65
FIGURA 53. Filtración para la preparación de los extractos.	65
FIGURA 54. Corrimiento de las placas de gel silice que fueron corridas en Cloroformo: acetona: Dietilamina (5:4:1).	66
FIGURA 55. Placas de gel silice que fueron corridas en Cloroformo: acetona: Dietilamina (5:4:1).	66
FIGURA 56. Placas de gel silice que fueron corridas en Cloroformo: acetona: Dietilamina (5:4:1) reveladas con reactivo de Dragendorff.	66
FIGURA 57. Placa revelada con luz UV a corta longitud de onda.	66
FIGURA 58. Placa revelada con luz UV a larga longitud de onda.	66
FIGURA 59. Placa revelada con reactivo de Dragendorff.	67
FIGURA 60. Muestras que se sometieron al espectro UV-Vis.	67
FIGURA 61. Preparación de las muestras para someter al espectro UV-Vis.	67
FIGURA 62. Aditamentos para la preparación de las muestras para someter al espectro UV-Vis.	67
FIGURA 63. Cultivo axénico de <i>Datura</i> spp. sometido al tratamiento de 40% de NaClO durante 15 min.	69
FIGURA 64. Imagen de semillas de <i>Datura</i> spp. antes de germinar.	70
FIGURA 65. Imagen de semillas de <i>Datura</i> spp. después de germinar.	70

FIGURA 66. Imagen de cultivo para semillas contaminado fúngicamente (Hemeroteca propia).	71
FIGURA 67. Imagen comparativa de dos cultivos de <i>Datura</i> spp.	71
FIGURA 68. Cultivo con características específicas de tamaño de plántula de los cultivos de <i>Datura</i> spp. en medio MS.	73
FIGURA 69. Cultivo con características específicas de tamaño de plántula de los cultivos de <i>Datura</i> spp. en medio MS modificado.	73
FIGURA 70. Cultivo con características específicas de tamaño de raíz de los cultivos de <i>Datura</i> spp. en medio MS.	73
FIGURA 71. Cultivo con características específicas de tamaño de raíz de los cultivos de <i>Datura</i> spp. en medio MS modificado.	73
FIGURA 72. Cultivo con características específicas de presencia de semicallo de los cultivos de <i>Datura</i> spp. en medio MS.	73
FIGURA 73. Cultivo con características específicas de presencia de semicallo de los cultivos de <i>Datura</i> spp. en medio MS modificado.	73
FIGURA 74. Cultivo con características específicas de presencia de pigmentación de los cultivos de <i>Datura</i> spp. en medio MS.	73
FIGURA 75. Cultivo con características específicas de presencia de pigmentación de los cultivos de <i>Datura</i> spp. en medio MS modificado.	73
FIGURA 76. Imágenes representativas de los cultivos sembrados de las diferentes partes de las plántulas en los dos medios de cultivos utilizados.	78
FIGURA 77. Cultivo sembrado en Medio MS-Modificado 1mg/L BAP + 1g/L 2,4-D.	78
FIGURA 78. Imagen de cultivo sembrado en Medio MS-Modificado 1mg/L BAP + 1g/L 2,4-D.	78
FIGURA 79. Imagen de cultivo de <i>Datura</i> spp. Con presencia de callogénesis.	84
FIGURA 80. Identificación de alcaloides de la muestra 1 por métodos de Dragendorff y Wagner.	84
FIGURA 81. Identificación de alcaloides de la muestra 2 por métodos de Dragendorff y Wagner.	84
FIGURA 82. Identificación de alcaloides de la muestra 3 por métodos de Dragendorff y Wagner.	84
FIGURA 83. Identificación de alcaloides de la muestra 4 por métodos de Dragendorff y Wagner.	85
FIGURA 84. Identificación de alcaloides de la muestra 5 por métodos de Dragendorff y Wagner.	85
FIGURA 85. Identificación de alcaloides de la muestra 6 por métodos de Dragendorff y Wagner.	85
FIGURA 86. Identificación de alcaloides de la muestra 7 por métodos de Dragendorff y Wagner.	85
FIGURA 87. Identificación de alcaloides de la muestra 8 por métodos de Dragendorff y Wagner.	85
FIGURA 88. Identificación de alcaloides de la muestra 9 por métodos de Dragendorff y Wagner.	85
FIGURA 89. Manchas reveladas de la placa corrida con Cloroformo: acetona: Dietilamina (5:4:1).	86
FIGURA 90. Espectro IR de extracto clorofórmico de <i>Datura</i> spp	87
FIGURA 91. Espectro IR de extracto etanólico de <i>Datura</i> spp	88

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
TABLA 1. Clasificación de los alcaloides.	27
TABLA 2. Relación entre las partes de la planta y la cantidad de alcaloides tropánicos totales presentes en esa planta sobre material seco, alcaloides por ciento.	39
Tabla 3. Tratamientos de desinfestación para semillas procedentes del estado de Oaxaca.	56
Tabla 4. Tratamientos de desinfestación para semillas procedentes del sur del estado de México (Apaxco).	57
Tabla 5. Tratamientos de desinfestación para semillas procedentes de Toluca, Estado de México.	57
Tabla 6. Variaciones de concentración de los RCV para la formación de callos.	60
Tabla 7. Porcentajes de contaminación encontrados en los diferentes tratamientos de desinfestación ensayados para las semillas de Oaxaca.	68
Tabla 8. Porcentajes de contaminación encontrados en los diferentes tratamientos de desinfestación ensayados para las semillas del Sur del Estado de México (Apaxco).	69
Tabla 9. Porcentajes de contaminación encontrados en los diferentes tratamientos de desinfestación ensayados para las semillas de Toluca, Estado de México.	70
Tabla 10. Porcentajes de germinación de las semillas en los diferentes medios de cultivo.	71
Tabla 11. Frecuencia de las características específicas de los cultivos de <i>Datura</i> spp. diferenciando entre los medios de cultivo en que fueron sembradas.	73
Tabla 12. Porcentajes de formación de callo a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS estándar.	74
Tabla 13. Porcentajes de formación de callo a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS estándar.	74
Tabla 14. Porcentajes de formación de callo a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS estándar.	75
Tabla 15. Porcentajes de formación de callo a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS modificado	75
Tabla 16. Porcentajes de formación de callo a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS modificado.	76
Tabla 17. Porcentajes de formación de callo a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS modificado.	76
Tabla 18. Cantidad de callo formado a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS estándar.	79
Tabla 19. Cantidad de callo formado a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS estándar.	79
Tabla 20. Cantidad de callo formados a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS estándar.	80
Tabla 21. Cantidad de callo formado a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS modificado.	80
Tabla 22. Cantidad de callo formados a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS modificado.	80

Tabla 23. Cantidad de callo formados a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS modificado.	80
Tabla 24. Análisis del peso de los callos formados a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS estándar	81
Tabla 25. Análisis del peso de los callos formados a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS estándar.	81
Tabla 26. Análisis del peso de los callos formados a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS estándar.	81
Tabla 27. Análisis del peso de los callos formados a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS modificado.	82
Tabla 28. Análisis del peso de los callos formados a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS modificado.	82
Tabla 29. Análisis del peso de los callos formados a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS modificado.	82
Tabla 30. Análisis de la presencia de pigmentación magenta/morada en los callos formados a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS estándar.	83
Tabla 31. Análisis de la presencia de pigmentación magenta/morada en los callos formados a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS estándar.	83
Tabla 32. Análisis de la presencia de pigmentación magenta/morada en los callos formados a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS modificado.	83
Tabla 33. Análisis de la presencia de pigmentación magenta/morada en los callos formados a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS modificado.	83
Tabla 34. Picos obtenidos relacionados con presencia de escopolamina.	87
Tabla 35. Picos obtenidos relacionados con presencia de atropina.	87
Tabla 36. Picos obtenidos relacionados con presencia de escopolamina.	88
Tabla 37. Picos obtenidos relacionados con presencia de atropina.	89

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO 1. Formulación y preparación de una solución STOCK de macronutrientes MS x 10.	100
ANEXO 2. Formulación y preparación de una solución STOCK de micronutrientes MS x 100.	100
ANEXO 3. Formulación y preparación de una solución STOCK de hierro MS x200.	101
ANEXO 4. Formulación y preparación de una solución STOCK de vitaminas y MYO-inositol MS x200.	101
ANEXO 5. Formulación y preparación del medio de cultivo MS (En agua destilada, para un litro).	101
ANEXO 6. Formulación del medio de cultivo MS-modificado (Para un litro de agua destilada).	102
ANEXO 7. Formulación y preparación de la solución de regulador del crecimiento 2,4-D.	103
ANEXO 8. Elaboración de una solución de digestión con material vegetal.	103
ANEXO 9. Elaboración de una extracción etanólica de callo.	103
ANEXO 10. Elaboración de una extracción clorofórmica de callo.	103
ANEXO 11. Métodos de identificación de alcaloides utilizados.	103
ANEXO 12. Elaboración del reactivo y prueba de Dragendorff.	104
ANEXO 13. Elaboración del reactivo y prueba de Wagner.	104
ANEXO 14. Separación e identificación de alcaloides por TLC.	105
ANEXO 15. Identificación de alcaloides por espectrofotometría IR.	106
ANEXO 16. Descripción de pruebas toxicológicas de laboratorio para determinar agentes anticolinérgicos a partir de orina.	106

ABREVIATURAS

- 2,4-D; Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
- BAP; Benciladenino purina.
- CCF; Cromatografía de capa fina.
- CTV; Cultivo de tejido vegetal.
- FTIR; Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier.
- MEP; Metileritritol fosfato.
- MS; Medio Murashige y Skoog.
- NaClO; Hipoclorito de sodio.
- PVP; Polivinil pirrolidina.
- RCV; Reguladores del crecimiento vegetal.
- Rf; Relación entre las distancias recorridas por el soluto y el diluyente en CCF (Ratio of Front).
- SNC; Sistema Nervioso Central.

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos de vegetales es una de las áreas de crecimiento de la Biotecnología; gracias a su potencial para generar compuestos de alto valor agregado.

Los compuestos alcaloideos son metabolitos secundarios producidos por las plantas, los cuales han sido objeto de investigación en años recientes, pues se han evidenciado sus propiedades; en especial la de los alcaloides de tipo tropánico y su efecto anestésico, por lo que es necesario desarrollar metodologías que permitan su explotación comercial. Tal es el caso del cultivo *in vitro*, técnica empleada para obtener cultivos celulares capaces de sintetizar diferentes metabolitos secundarios bioactivos.

Este trabajo tuvo como objetivo el establecer cultivos *in vitro* de *Datura* spp. Dicho género es bien conocido por su capacidad de producir una alta concentración de alcaloides de tipo tropánico.

Se generó un protocolo para el establecimiento de cultivos asépticos de *Datura* spp, utilizando semillas como explantes. Las semillas fueron sembradas en diferentes medios de cultivo. Se utilizó medio MS estándar como control, medio MS suplementado con diferentes reguladores del crecimiento vegetal y medio MS suplementado con una alta concentración de micronutrientes. En cada tratamiento se registró el porcentaje y tiempo de germinación, la morfología de las plántulas obtenidas, así como el porcentaje de formación de callo.

A partir de las plántulas generadas, se tomaron diferentes explantes (raíz, hojas e hipocótilos), con la finalidad de inducir la formación de callo en los mismos. Obteniéndose los mejores resultados en los medio de cultivo suplementados con 1.0 mg/L de 2,4-D y 1.0 mg/L de BAP (92.63%), siendo los fragmentos de hipocótilo y hoja los mejores explantes para este fin.

La biomasa obtenida (callos), fue subcultivada en varias ocasiones con la finalidad de generar suficiente para ser utilizada en los análisis fitoquímicos programados. La biomasa fue secada en una estufa y posteriormente se sometió a una extracción sólido-líquido con dos diferentes solventes, etanol y cloroformo. Una vez obtenidos ambos extractos, fueron sometidos a una serie de pruebas fitoquímicas encaminadas a la identificación de alcaloides. Lográndose observar en todas las muestras analizadas la presencia de alcaloides del tipo tropánicos. Se llegó a la conclusión de que los cultivos de callo de *Datura* spp retienen su característica natural de producir compuestos alcaloideos, por lo que la técnica de cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa importante en la generación y producción de este tipo de metabolitos secundarios.

ABSTRACT

The *in vitro* culture of cells, tissues and organs of plants is one of the growth areas of Biotechnology; due to its potential for high-value compounds.

The alkaloid compounds produced by plants are secondary metabolites, which have been investigated in recent years because their properties have been demonstrated; especially the tropane alkaloids type and their anesthetic effect, so it is necessary to develop methodologies for commercial exploitation. Such as *in vitro* culture technique used for cell culture can synthesize different bioactive secondary metabolites.

This study aimed to establish *in vitro* cultures of *Datura* spp. This genus is well known for its ability to produce a high concentration of tropane alkaloids.

A protocol for the establishment of aseptic cultures of *Datura* spp, using seed explants were generated. Seeds were sown in different culture media. Standard MS media was used as a control, MS medium supplemented with various plant growth regulators and MS medium supplemented with a high concentration of micronutrients. In each treatment and the percent germination time, the morphology of the plantlets obtained, and the rate of callus formation was recorded.

From the generated seedlings different explants (roots, leaves and hypocotyls) were taken, in order to induce callus formation therein. Best results obtained in culture medium supplemented with 1.0 mg / L 2,4-D and 1.0 mg / L BAP (92.63%), with the fragments of hypocotyl and leaves explants best for this purpose.

The biomass obtained (callus) was subcultured repeatedly in order to generate enough to be used in phytochemicals procedures. The biomass was dried in an oven and then subjected to a solid-liquid extraction with two different solvents, ethanol and chloroform. After obtaining the two extracts underwent a series of tests to phytochemical determining alkaloids. Achieving seen in all samples analyzed for the presence of type tropane alkaloids. And concluded that callus cultures of *Datura* spp. retain their natural characteristic to produce alkaloid compounds, so the technique of plant tissue culture is presented as an important alternative method in the generation and production of secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

La vida del hombre está íntimamente unida a la de las plantas pues desde hace varios cientos de años, la humanidad ha dependido de los vegetales como fuente de carbohidratos, proteínas y ácido grasos, entre otros. En adición a esto, las plantas dan origen a una amplia gama de metabolitos secundarios los cuales son utilizados como fármacos, fragancias, sabores, colores, agroquímicos y aditivos alimenticios. Se estima que el 80% de los productos naturales conocidos, son producidos por plantas (Vanisree y Tsay, 2004).

A partir de la década de los noventa se observó un fenómeno cultural en el cual la sociedad comenzó a utilizar con mayor frecuencia productos de origen natural, las encuestas realizadas indican que en América del Norte el uso de este tipo de productos se incrementó de forma sustancial, pues en 1991 solo el 3% de la población los utilizaba, y para 1998 el 37% de los Estadounidenses ya los consumía de forma regular. Con esto, el mercado de los productos naturales en Estados Unidos alcanzó ventas de 3 billones de dólares al año (Ramachandra y Ravishanka, 2002).

Actualmente de las más de tres mil especies vegetales conocidas, el hombre depende principalmente de veinte, ocho de las cuales son cereales y a los que se les dedica aproximadamente un tercio de las tierras cultivables a nivel mundial. Sustancias como las vitaminas son obtenidas de alrededor de treinta frutas y vegetales (Chawla, 2004). De esta forma las plantas son y continuarán siendo una fuente de nuevos compuestos, ya que actualmente no se ha caracterizado completamente el metabolismo de una gran cantidad de especies. Sin embargo, los sistemas de producción tradicionales no son capaces ni convenientes para la producción de derivados vegetales, ya que estos utilizan grandes extensiones de terreno y una gran cantidad de recursos hídricos e incluso forestales. Aunado a esto, el crecimiento poblacional y el aumento de las necesidades alimentarias, requiere que cada vez se haga un mejor aprovechamiento agrícola (Altman, 2002).

La Biotecnología ofrece a oportunidad para explotar las células, tejidos órganos e incluso organismos completos haciéndolos crecer *in vitro* y manipulándolos para lograr la producción de los compuestos de interés. Esto no ha dado origen a nuevas industrias, sino que ha modificado a las tradicionales estructuralmente para volcarse al desarrollo de sectores específicos. De hecho, los productos biotecnológicos que actualmente se encuentran en el mercado pertenecen a las grandes e históricas compañías que han sabido y podido dedicar esfuerzos humanos y económicos a la investigación no clásica, el ejemplo más claro de esto es la industria farmacéutica.

Se han reportado numerosos procesos exitosos para la producción de metabolitos secundarios mediante el cultivo de tejidos (Vanisree y Tsay, 2004), es por eso que alrededor del mundo se estudia la posibilidad de elaborar, mediante esta tecnología, compuestos como: colorantes, antioxidantes, aceites esenciales, fármacos, bioplaguicidas, entre muchos otros productos de interés humano. México posee una enorme diversidad de especies, por lo que la

aplicación de este tipo de técnicas resulta sumamente importante y al mismo tiempo beneficioso en cuanto a desarrollo científico y tecnológico se refiere.



FIGURA 1. *Datura* spp. (Hemeroteca propia).

Desde la antigüedad el género *Datura* (ver figura 1) ha tenido una larga historia en ambos hemisferios como género botánico utilizado con propósitos medicinales (en la medicina tradicional) e intoxicantes (en ritos mágicos-religiosos).

Las daturas con sus diferentes especies poseen la misma utilidad terapéutica debido a que sus principios básicos esencialmente son los mismos. Tal utilidad se debe a propiedades anticolinérgicas (midriáticas, antiespasmódicas, entre otras) y a su función como antagonistas competitivos de las sustancias que estimulan el sistema nervioso parasimpático.

La agricultura surgió durante el Neolítico en varios lugares de la tierra hace alrededor de 10,000 años. En el curso de los siguientes 5,000 años fueron domesticadas plantas silvestres (Barceló y Cabrera, 2001; Gasser y Fraley, 1992), las cuales han llegado a ser la base alimenticia de la población en el mundo. Al haberse domesticado, seleccionado y usado estos cultivos como alimento desde hace muchos años, se puede decir que el mejoramiento genético es tanto fitomejoramiento viejo como la agricultura misma (Molina, 1993). Puede considerarse al fitomejoramiento como un proceso evolutivo, ya que en él se dan todos los elementos de la evolución; esto es, generación de variación, recombinación, selección y aislamiento de los tipos deseados para su uso con fines productivos (Ortiz, 1985).

En lo que a Biotecnología se refiere, se tienen evidencias, que entre los años 6000 a 2000 a.C., el hombre para satisfacer sus necesidades alimenticias, creó técnicas para la fabricación de pan, elaboración de cerveza, fermentación del vino, las cuales se consideran técnicas biotecnológicas (Bioxamara, 2001; El Mansouri y Quesada, 2001; Gutiérrez-Correa, 2001; lañez, 2001).

Por lo anterior, se deduce que tanto la Biotecnología como el mejoramiento genético de las plantas, no son ciencias nuevas, ya que ambas se practicaban en forma empírica mucho tiempo antes de la era Cristiana (Castañón, 2001).

1.1. APLICACIÓN DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL

El mejoramiento genético vegetal o fitomejoramiento tradicional ha sido aplicado en forma empírica por los agricultores desde que éste se hizo sedentario. Esto se apoya, en lo que hace tiempo alguien anotó que la genética vegetal y animal nacieron cuando el hombre primitivo mezcló las semillas para lograr especies de mayor rendimiento, y cruzó animales para obtener ejemplares más fuertes y vigorosos (Gilleta, 2000).

Esta bien documentado que el mejoramiento genético convencional o clásico (selección e hibridación), han permitido obtener nuevas especies de plantas o híbridos con mejores rendimientos o con características agronómicas más favorables (Antón y Lizaso, 2001).

Se dice que los fitomejoradores son también ingenieros genéticos, pues ellos conjugan grupos de genes de tal manera que maximizan la producción de los cultivos (Gardner, 1984). Con técnicas biotecnológicas como la hibridación somática es posible crear nuevos tipos de plantas con capacidad para fijar más nitrógeno y carbono atmosférico y con ello romper las citadas barreras de rendimiento (Hurtado y Merino, 1994).

El mejoramiento genético se practica hoy en día en tres formas que son: la tradicional, la biotecnología y mediante el uso de la ingeniería genética e hibridación del ADN (Molina, 1993).

Es necesario e indispensable que se desarrollen nuevas tecnologías con las cuales, en corto tiempo se generen más y mejores variedades. Bajo esta premisa, la biotecnología y en particular la manipulación genética o transgenia, toma mayor importancia que aquella que hasta hoy día se le ha dado (IBT, UNAM, 2000; Langridge, 2000).

Los métodos biotecnológicos son también de mucha utilidad en la producción de metabolitos secundarios, se sabe que las plantas superiores a través de su metabolismo secundario son una fuente principal de fármacos y otros valiosos productos químicos. La síntesis de metabolitos secundarios en las plantas es una respuesta de defensa de éstas al ataque de patógenos (Wu et al., 2001). Pero estos han sido aprovechados mediante técnicas biotecnológicas para beneficio de la humanidad.

Algunos de los metabolitos obtenidos por Biotecnología son de raíces transformadas de *Datura metel* y un híbrido de *Duboisia* a las que se les insertó el gen pmt, de ellos se puede obtener los alcaloides tropánicos hiosciamina y escopolamina (Moyano et al., 1999).

El avance biotecnológico en la producción de metabolitos ha sido tan rápido, que en 1991, 15 drogas biotecnológicas se encontraban en el mercado de los Estados Unidos, número que se ha incrementado año tras año (Bioxamara, 2001).

MÓDULO DOS

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Calva y Ríos, 1999; Street, 1977). Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul, 2000).

El proceso involucrado en la transformación de una célula a una planta u órgano, en ese entonces lo llamaron diferenciación celular, pero actualmente se denomina organogénesis.

En un principio los investigadores sugerían que las células en las plantas se diferenciaban al retener sólo aquella parte del genoma necesario para el tipo celular del órgano al que estaban destinadas. Se pensaba que debía haber factores externos que provocaban que las células cambiaran tomando gran diversidad de formas y funciones. Al inicio no se sabía si los cambios sufridos por la diferenciación eran permanentes e irreversibles o si sólo eran características temporales para que las células se adaptasen a necesidades funcionales del organismo en general y del órgano en particular. Sin embargo, en experimentos realizados por Vochting en 1878 sobre la polaridad celular, se observó que células de tallos eran capaces de rediferenciarse y formar raíces y brotes, lo que demostró que la diferenciación no era permanente sino que estaba dada por la posición relativa de la célula en la planta (Bhojwani y Razdan, 1983; Ferl y Paul, 2000). Ahora se sabe que la diferenciación celular está regulada por la expresión genética y que no implica la pérdida de material genético (Ferl y Paul, 2000).

En investigaciones desarrolladas sobre el tema de diferenciación celular, Gottlieb Haberlandt en 1898 aisló células y tejidos de plantas superiores y las colocó en soluciones nutritivas para su crecimiento y estudio, dando origen de esta manera a la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales. Así, Haberlandt fue el pionero en el cultivo *in vitro* de células vegetales completamente diferenciadas, habiendo reportado sus estudios y resultados en 1902, (Krikorian y Berquam, 1969). Haberlandt propuso que era posible cultivar juntas células vegetativas libres y túbulos de polen adicionando soluciones nutrientes suplementadas con extractos de ápices vegetativos o con fluidos de sacos embrionarios. Es por ello que ahora se considera a Haberlandt como el padre de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales, la cual se ha convertido en el dogma central de la Biotecnología vegetal.

Después de Haberlandt, no fue sino hasta los años 30's que White en Estados Unidos y Gautheret en Francia, demostraron de forma definitiva la posibilidad de cultivar células vegetales *in vitro*. En ese tiempo hubo dos grandes descubrimientos que repercutieron de manera fundamental sobre el desarrollo de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales: primero, la identificación

de las auxinas como reguladoras naturales del crecimiento vegetal, y segundo, el reconocimiento de la importancia de las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas (Calva y Pérez, 2005).

En 1934, Gautheret cultivó células de *Cambium* de algunas especies en una solución mineral con glucosa y cloruro de cisteína. Encontró que dichas células proliferaban por algunos meses y que adicionando vitaminas y ácido indol acético (AIA) se estimulaba considerablemente su crecimiento. Más tarde, en 1939 White reportó el establecimiento de cultivos similares pero a partir de tejidos tumorales de un híbrido de *Nicotiana glauca* X *N. Langsdorffii*. Estos investigadores junto con Nobecourt, quien reportó en ese mismo año el establecimiento de un cultivo similar a partir de zanahoria, son los tres investigadores considerados los pioneros de la técnica del cultivo de células y tejidos vegetales (Bhojwani y Razdan, 1983; Street, 1977).

Los medios de cultivo y métodos utilizados en la actualidad son por lo general modificaciones de los establecidos por ellos en 1939.

2.1. EL ÉXITO DEPENDE DEL EXPLANTE

El procedimiento general consiste en inocular un medio de cultivo gelificado con un fragmento de tejido u órgano vegetal, llamado explante, previamente tratado para eliminar todo organismo que se encuentre en su superficie (desinfestación).

El cultivo se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden subcultivarse para su mantenimiento y propagación o inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión (Calva y Pérez, 2005).

Los cultivos se mantienen bajo las mismas condiciones físicas y fisicoquímicas usadas para la inducción de callos. Los cultivos de órganos se puede rediferenciar hasta plantas completas (micropropagación) que luego se transfieren a invernadero. La temperatura de los cultivos generalmente se controla entre 25 y 28° C, el pH entre 5.2 y 6.5 y la luz de 0 a 12,000 lux (Calva y Ríos, 1999; Martin, 1980; Seabrook, 1980; Yasuda, et al., 1972).

Las plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de explantes. Aunque en una misma planta se puede encontrar tanto crecimiento juvenil como adulto, el primero se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductoras,

mientras que el adulto es más lento y presenta estructuras sexuales para la reproducción de la planta.

Además, las plantas adultas pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menos células meristemáticas, necesarias para establecer los cultivos *in vitro* (Calva y Ríos, 1999; Seabrook, 1980; Street, 1977).

La desinfección del tejido a usar como fuente de explantes se realiza con agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio o calcio y cloruro mercurioso. La penetración del agente desinfectante en superficies rugosas o vellosas del tejido vegetal se puede incrementar con la adición de agentes tensoactivos como el Tween 20 (Webster, 1966). En las plantas silvestres, el tejido calloso se forma en respuesta a daños mecánicos sufridos por influencia del medio ambiente o por invasión de tejidos por ciertos microorganismos. Sin embargo, en cultivos *in vitro*, el tejido calloso se induce mediante la influencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o fitohormonas adicionadas al medio de cultivo (Crozier, et al., 2000; Tempé y Schell, 1985; Yeoman, 1970).

El éxito en la inducción y establecimiento de cultivos de callos, y en consecuencia la subsiguiente regeneración a tejidos y plantas, son función de la calidad del explante usado, que a su vez depende de la planta madre o del tejido del que se inició el cultivo. De cualquier forma, para el inicio de los cultivos se prefieren utilizar tejidos que contengan células meristemáticas. Estas se diferencian rápidamente en respuesta a estímulos organogénicos como variación en el tipo y concentración de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. Las células meristemáticas se distinguen de otras células por su tamaño relativamente pequeño, citoplasma denso, forma isodiamétrica, pared celular fina, mínima vacuolación y un gran núcleo (Doerner, 2000). En los cultivos *in vitro*, este tipo de células se encuentran en la periferia de los callos o en las suspensiones como masas o nódulos de tejidos preembrionicos, lo que produce una gran variabilidad en la expresión genética entre la población celular de esos cultivos. También es necesaria la presencia de este tipo de células para poder regenerar una planta a partir de un cultivo *in vitro* (Calva y Ríos, 1999).

La variabilidad genética entre y dentro de los cultivos se refleja primero en la morfología de los callos y posteriormente en los cultivos en suspensión o sistemas de cultivo con los que se trabaje. Algunos autores (Petiard y Bariaud, 1985; Wareing y Al Chalabi, 1985) opinan que este fenómeno puede ser consecuencia de la alta frecuencia de división celular que tiene lugar en los cultivos *in vitro*. Otros indican que también pueden ser causadas por alteraciones o cambios de factores epigenéticos originados por la forma en que se establecen los cultivos. Así, hay estudios donde se observa que callos establecidos a partir de diferentes órganos pero de una misma planta varían en apariencia y presentan características únicas (Holdenet, et al., 1988; Petiard y Bariaud, 1985). Pero más aún, callos procedentes de un mismo explante también difieren en su morfología y características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos (Bhom, 1982; Calva y Ríos, 1999 Lindsey y Yeoman, 1983). Respecto a esto último se ha observado que cuando los cultivos se inician de tejidos que

naturalmente presentan la mayor producción de determinados metabolitos, se obtienen cultivos que dan mejores rendimientos respecto a otros provenientes de órganos o tejidos que no producen o lo hacen en muy bajas cantidades (Lindsey y Yeoman, 1983).

No obstante, hay reportes que demuestran que cualquier cultivo *in vitro* puede alcanzar producciones tan altas o más de un determinado compuesto respecto a las que presenta una planta desarrollada en condiciones silvestres, sin importar de qué parte de la planta se haya establecido el cultivo (Petiard y Bariaud, 1985). Así, las condiciones fisicoquímicas y nutricionales actúan sobre los cultivos para orientar la expresión genética de las células a diversos grados de diferenciación que proporciona a los cultivos características propias y únicas, aun cuando éstos provengan de una misma planta y todavía más, de un mismo explante.

2.2. EXPRESIÓN GENÉTICA: FUNCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

De lo anterior, queda claro que es importante encontrar condiciones de cultivo no sólo para que las células crezcan y se dividan rápidamente sino también para que la mayor parte de ellas expresen su capacidad de rediferenciación y biosíntesis para una o varias sustancias de interés. En varios de los estudios sobre cultivos de células y tejidos vegetales esto se ha tratado de resolver variando los componentes de los medios de cultivo (Calva y Ríos, 1999; Martin, 1980; Yasuda, et al., 1972) y las condiciones físicas y fisicoquímicas de los procesos (Fowler, 1982; Rhodes, et al., 1987) aprovechando las ventajas que ofrece la rápida respuesta de las células *in vitro* ante pequeños cambios en su medio ambiente con respecto a las plantas crecidas por métodos tradicionales.

Los primeros medios utilizados en cultivo de células y tejidos vegetales fueron semisintéticos. Frecuentemente contenían extractos o complejos orgánicos como agua de coco, hidrolizado de caseína y extracto de levadura. Actualmente, la mayoría de los medios son de composición conocida, estando constituidos básicamente por cinco grupos de ingredientes: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, vitaminas y reguladores del crecimiento que *in vivo* son sintetizados por una parte u órgano de la planta para luego ser transportados a otros órganos donde se metabolizan y/o acumulan (Seabrook, 1980; Yasuda, et al., 1972). Las fuentes de nitrógeno más comunes son el nitrato y amonio, pero también se han utilizado urea, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y aminoácidos, entre otros. La fuente de carbono más empleada es la sacarosa o glucosa y en menor grado la maltosa, galactosa, almidón y melaza. Los micronutrientes, generalmente adicionados al medio de cultivo en forma de sales, son utilizados por las células como cofactores enzimáticos, como el molibdeno para la nitrato reductasa y el magnesio para algunas cinasas (Murashige y Skoog, 1962; Shenk y Hildebrandt, 1972).

Las fitohormonas y sus inhibidores son sustancias producidas por las plantas y regulan su respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y

humedad, ayudando de esta manera a regular y coordinar los procesos esenciales para el desarrollo normal de las plantas (Crozier, et. al., 2000; Doerner, 2000; Wain, 1980). Este tipo de sustancias se pueden dividir principalmente en auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, poliaminas, ácido jasmónico y el ácido salicílico.

Las auxinas y giberelinas promueven el alargamiento celular pero inhiben la diferenciación, mientras que las citocininas estimulan la división mediante la cual se producen nuevas células y pueden también evitar el envejecimiento celular.

El etileno estimula la maduración principalmente de frutos, el ácido abscísico inhibe la acción de las auxinas, giberelinas y citocininas operando como sistema de defensa natural contra efectos de estrés fisiológicos (Calva y Pérez, 2005).

Las más usadas en cultivos de células vegetales son las auxinas y citocininas. De las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es la más usada para la inducción y mantenimiento de tejido calloso debido a que suprime severamente la organogénesis. De las citocininas, la más activa es la 2-indolaminopurina (2iP); sin embargo, las más utilizadas en cultivo de células vegetales son la bencilaminopurina (BAP) y la cinetina (Cin), una citocinina sintética afectada por la luz en el rango de longitud de onda de 300-800nm (Aitchison, et al. 1977; Crozier, et al., 2000; Street, 1969 y 1977).

2.3. ORGANOGÉNESIS Y MICROPROPAGACIÓN

Las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales son en los campos de micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos e investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica (Carpita y McCann, 2000; Fowler, 1987).

En micropropagación, la embriogénesis y la organogénesis pueden usarse para obtener clones somáticos y regenerar plantas completas con características uniformes y así establecer cultivares de plantas valiosas, libres de microorganismos y difíciles de obtener por métodos de cultivo tradicionales.

Los cultivos *in vitro* también pueden almacenarse por largos períodos de tiempo mediante alguno de los métodos de conservación utilizados para microorganismos como es la refrigeración y criopreservación. Esta es una forma de eliminar los problemas de espacio físico, exceso de mano de obra, contaminación de los cultivos y los efectos de la erosión genética (Calva y Pérez, 2005).

Entre las principales ventajas del cultivo de células y tejidos vegetales en la investigación básica, micropropagación y producción de compuestos con actividad biológica como metabolitos secundarios, proteínas y productos

transgénicos, destaca el hecho de que permiten realizar estudios en un tiempo mucho menor y bajo condiciones más controladas que con plantas cultivadas por métodos tradicionales (Twyman, 2003).

Si los cultivos *in vitro* se incuban o someten a condiciones de estrés fisiológico, pueden expresar características de adaptación y resistencia que en condiciones naturales nunca manifestaron, creciendo selectivamente sólo aquellas células capaces de adaptarse a sus nuevas condiciones. Esta variación genética también se puede inducir por técnicas de mutación, ingeniería genética, fusión de protoplastos y transformación genética por inclusión de DNA foráneo de manera similar a las aplicadas comúnmente en microorganismos (Crozier, et al., 2000; Rhodes, et al., 1987; Yeoman, et. al., 1980). En este último caso se obtienen cultivos o plantas transgénicas en donde el DNA foráneo debe integrarse al genoma vegetal para garantizar una expresión estable en su progenie (Calva y Pérez, 2005).

MÓDULO TRES

METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO DE PLANTAS

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios (Taiz y Zeiger, 2006).

A todas las funciones metabólicas universalmente reconocidas desde hace mucho tiempo como fundamentales para la sobrevivencia de las plantas se les ha llamado en conjunto metabolismo primario. Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales). Las plantas son poseedoras casi exclusivas de estas rutas metabólicas por las que sintetizan una gama extremadamente amplia de estas sustancias. Ambos procesos, tanto el metabolismo primario como el secundario son representados en la figura 2.

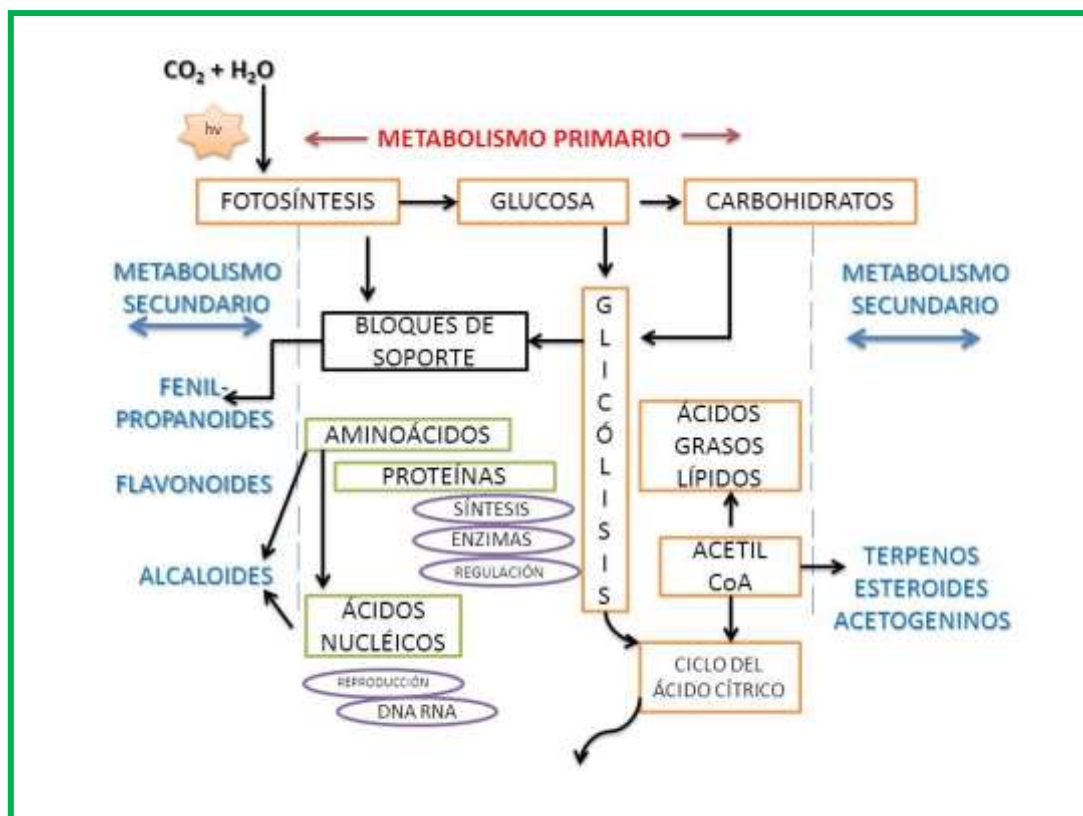


FIGURA 2. Imagen representativa del metabolismo primario y secundario de las plantas (Universidad de Granada, 2004).

La estructura química entre compuestos primarios y secundarios a veces es muy parecida. Es el caso del ácido kaurenico y la prolina, metabolitos primarios, mientras que los ácidos abiético y pipecólico, compuestos muy relacionados estructuralmente con ellos, son metabolitos secundarios.

Por otro lado, la distinción entre ambos tipos es difusa en ocasiones si tenemos en cuenta que la biosíntesis de muchos de ellos comparten numerosos intermediarios que derivan de las mismas rutas metabólicas. Por lo tanto, la diferenciación entre metabolitos primarios y secundarios puede no ser del todo adecuada.

A diferencia de compuestos como la clorofila, los aminoácidos, los ácidos nucleicos y la mayoría de los carbohidratos, todos ellos metabolitos primarios, a los metabolitos secundarios no fue posible asociarlos, durante mucho tiempo, con los procesos fundamentales de la vida de las plantas y se les consideró como errores del metabolismo primario, sustancias de desecho o sobrantes metabólicos (Kutchan, 2001). Fue el médico alemán de origen prusiano Alberto Kossel, quien en 1891 se refirió a ellos como metabolitos secundarios. Este término, erróneamente empleado, se ha mantenido hasta nuestros días. Más recientemente los metabolitos secundarios han sido considerados como productos de desintoxicación, sobreexpresiones del metabolismo primario, productos de degradación y productos de almacenamiento, sin que haya evidencias concretas de que desempeñen esas funciones (Hadacek, 2002).

Prácticamente todas las sustancias que el hombre ha obtenido de las plantas a lo largo de su historia y que ha utilizado con cualquier fin diferente al alimenticio son productos del metabolismo secundario.

3.1. METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos primarios, difieren también en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y Pérez, 2009; Creus, 2013).

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas (Bruneton, 2000).

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como plaguicidas naturales (Segler, 2001).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (ver figura 3).

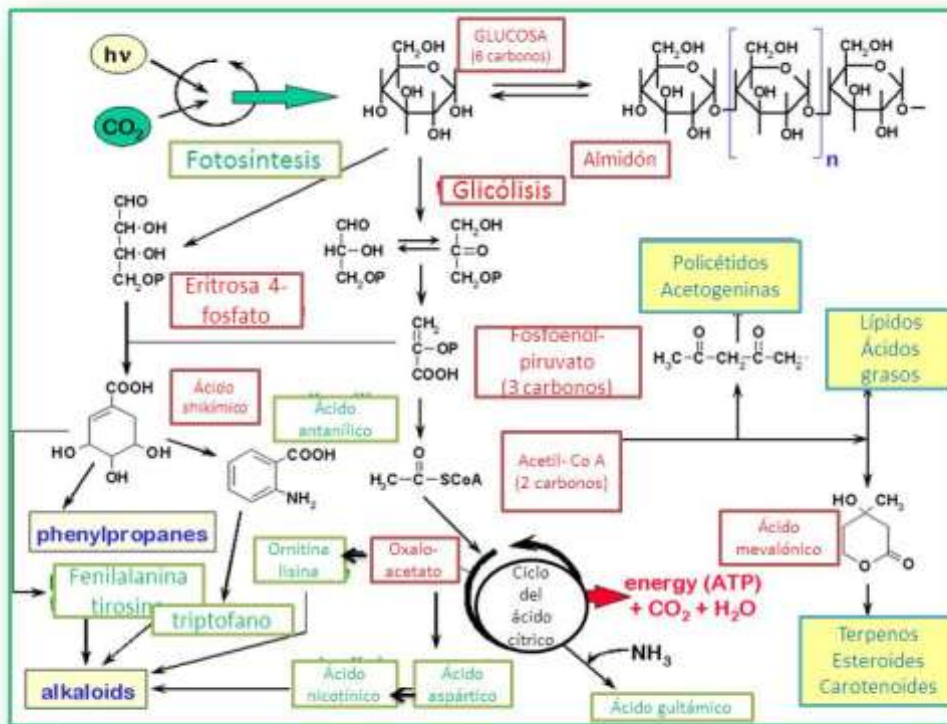


FIGURA 3. Imagen representativa del metabolismo secundario de las plantas (Universidad de Granada, 2004).

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica (Wink, 1999).

Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (Juds W. et Al., 2002).

Se agrupan en cuatro clases principales.

- Terpenos. Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.

- Compuestos fenólicos. Quinonas, cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos. Saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

Desde mediados del siglo pasado se reconoció la enorme diversidad química de los compuestos secundarios pero no se encontró para ellos una participación en los procesos fisiológicos básicos de las plantas. Todavía hace 25 años, a los productos del metabolismo secundario se les consideraba como sustancias de desecho o como errores de las rutas metabólicas primarias. Con la aparición del cultivo de células vegetales en suspensión, que permite el monitoreo del ambiente físico y químico de las células en crecimiento, desarrollo y multiplicación; de técnicas químicas analíticas altamente resolutivas, como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la espectroscopia de masas; de técnicas bioquímicas, como la electroforesis para el análisis de proteínas y; de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha sido posible aislar y caracterizar muchas de las enzimas responsables y establecer las rutas de la biosíntesis de un gran número de compuestos secundarios (Almaraz et al., 2007).

Prácticamente todos los metabolitos secundarios conocidos tienen algún tipo de actividad, ya sea farmacológica, antibacteriana, antioxidante o anticancerígena, entre otras, y esto es el móvil de programas de búsqueda de compuestos naturales con una particular actividad biológica. Muchos de ellos forman parte de mecanismos de defensa contra el ataque de herbívoros y patógenos y el estudio de la interrelación planta-herbívoro permite visualizar en un futuro próximo el desarrollo de vacunas para protección de plantas de interés económico. Por último la distribución de tipos particulares de estos compuestos secundarios dentro de grupos de plantas taxonómicamente relacionados y el lenguaje químico, basado en compuestos secundarios, que se establece entre organismos de varios niveles tróficos tienen interés por parte de los biólogos que buscan encontrar las relaciones evolutivas entre los diferentes organismos que sintetizan estas sustancias y entender el establecimiento del equilibrio ecológico en los ecosistemas (Valares, 2011).

La evidentemente elevada diversidad y extrema abundancia de los metabolitos secundarios en todo el reino vegetal mantuvieron en la mente de algunos fisiólogos vegetales la interrogante sobre si estos compuestos pudieran cumplir un papel fisiológico en las plantas. Esa inquietud llevó a personalidades como Miriam Rothschild y Jeffrey Harborne a estudiar más profundamente los compuestos secundarios de las plantas y fueron ellos quienes encontraron una estrecha relación entre la concentración de los metabolitos secundarios y la capacidad de las plantas para protegerse contra el ataque de herbívoros y patógenos. Esto dio el primer giro a la apreciación que se tenía de esos compuestos y fue cuando entonces se les reconoció un papel importante en el establecimiento de las relaciones de las plantas con su ambiente y se creó una nueva rama de la ciencia que se llamó Ecología Química.

Después de reconocer un papel ecológico para el metabolismo secundario resurgió el interés por el estudio de éste en un número más amplio de especies de plantas. El paso siguiente fue determinar si existían rutas metabólicas exclusivas ya que si era ese el caso, como fue comprobado, el metabolismo secundario estaba muy lejos de representar errores del metabolismo primario. En esa búsqueda se descubrieron enzimas y rutas bioquímicas específicas para la síntesis de los diversos compuestos secundarios (Kutchan, 2001).

3.1.2. LA DIVERSIDAD DE FUNCIONES

Ahora se sabe que los metabolitos secundarios desempeñan funciones muy diversas y fundamentales para las plantas. Su participación es a nivel fisiológico y ecológico. A nivel fisiológico participan ya sea formando parte de la estructura química de sustancias del metabolismo primario como el residuo de fitol (de origen terpénico) de la molécula de clorofila; ya sea actuando como precursores de sustancias del metabolismo primario como algunos compuestos terpénicos a partir de los cuales se sintetizan el ácido absísico y las giberelinas (dos importantes hormonas vegetales); o bien dirigiendo ellos mismos procesos tan importantes para el desarrollo de las plantas como el transporte de auxinas. A nivel ecológico su participación contribuye a garantizar la sobrevivencia de las plantas como individuos pero también como especies y representan la base de un lenguaje químico en el cual se sustenta una parte importante del equilibrio de los ecosistemas.

La gran mayoría de metabolitos secundarios desempeñan funciones de protección. Ésta puede ser de protección contra la radiación ultravioleta (Taiz y Zeiger, 1991), contra posibles daños causados por cambios rápidos de temperatura, contra daño oxidativo (Singsaas y Sharkey, 2000) y contra el ataque de microorganismos (Ryals y et al., 1994) y de herbívoros, ya sean estos últimos insectos, reptiles, aves o mamíferos (Almaraz-Abarca, et al., 1998; Echeverri, et al., 1991; Hadacek, 2002). Muchos isoflavonoides juegan papeles de fitoalexinas y los rotenoides tienen efectos muy poderosos como insecticidas (Dewick, 1993; Williams y Harborne, 1989). Más recientemente, se ha demostrado que existe todo un lenguaje químico, basado en los compuestos secundarios, que involucra tres niveles tróficos, en el cual en parte descansa el equilibrio ecológico de los ecosistemas (Hadacek, 2002; Pare y Tumlinson, 1999; Thaler 1999).

Algunos metabolitos, particularmente compuestos con color como ciertos flavonoides y carotenoides se les asocia con otro tipo de funciones ecológicas en las plantas, como la atracción de polinizadores (Mol, et al., 1998), lo que mejora la fertilización, y como dispersores de semillas (Pichersky y Gang, 2000), lo que asegura la incursión o persistencia en un hábitat dado.

El establecimiento de muchas de las relaciones simbióticas entre plantas y microorganismos está basado en los compuestos secundarios (Bush, et al., 1997). En la fijación simbiótica de nitrógeno participan algunos tipos de flavonoides, como las flavanonas, dihidroflavonoles y dihidrochalconas que son

secretadas en las áreas de rápido crecimiento de las raíces de algunas leguminosas y actúan como inductores y supresores de genes, como los de nodulación (genes nod) de bacterias simbióticas del género *Rhizobium* (Bohm, 1994).

Para compuestos como los alcaloides existe mucha información sobre los efectos farmacológicos, de hecho los alcaloides tradicionalmente han sido de interés debido a su intensa actividad fisiológica en animales y humanos, pero se sabe muy poco sobre los papeles que juegan en la fisiología y en las relaciones de las plantas con su ambiente, se sabe menos sobre cómo las plantas sintetizan alcaloides y se sabe todavía menos sobre cómo esa síntesis es regulada.

3.2. PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS

3.2.1. TERPENOS

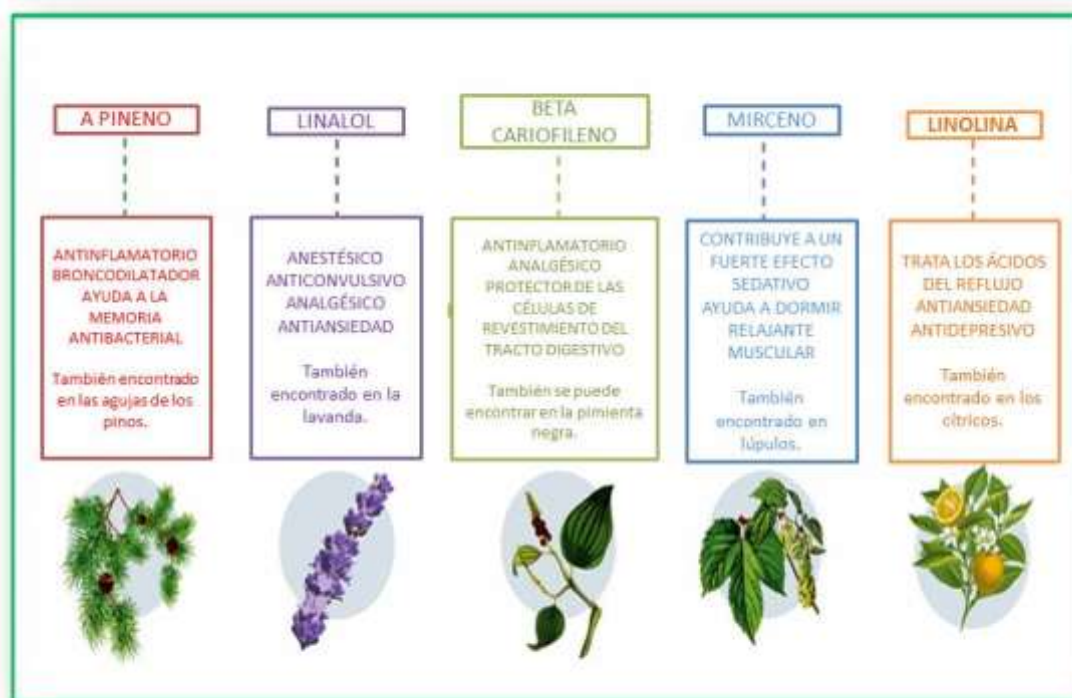


FIGURA 4. Imagen representativa de algunos Terpenos, su uso y plantas que los contienen (Manel, 2013).

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes) (ver figura 4). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de

las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en la estructura de membranas).

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C).

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP (Cseke, et al., 2006).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc.

3.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

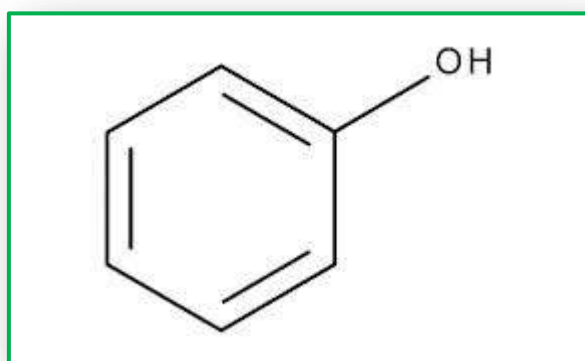


FIGURA 5. Grupo fenol.

En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol (ver figura 5). Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Cseke, et al., 2006).

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides. Muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro.

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shikímico (figura 7) y la ruta del ácido malónico (figura 6).

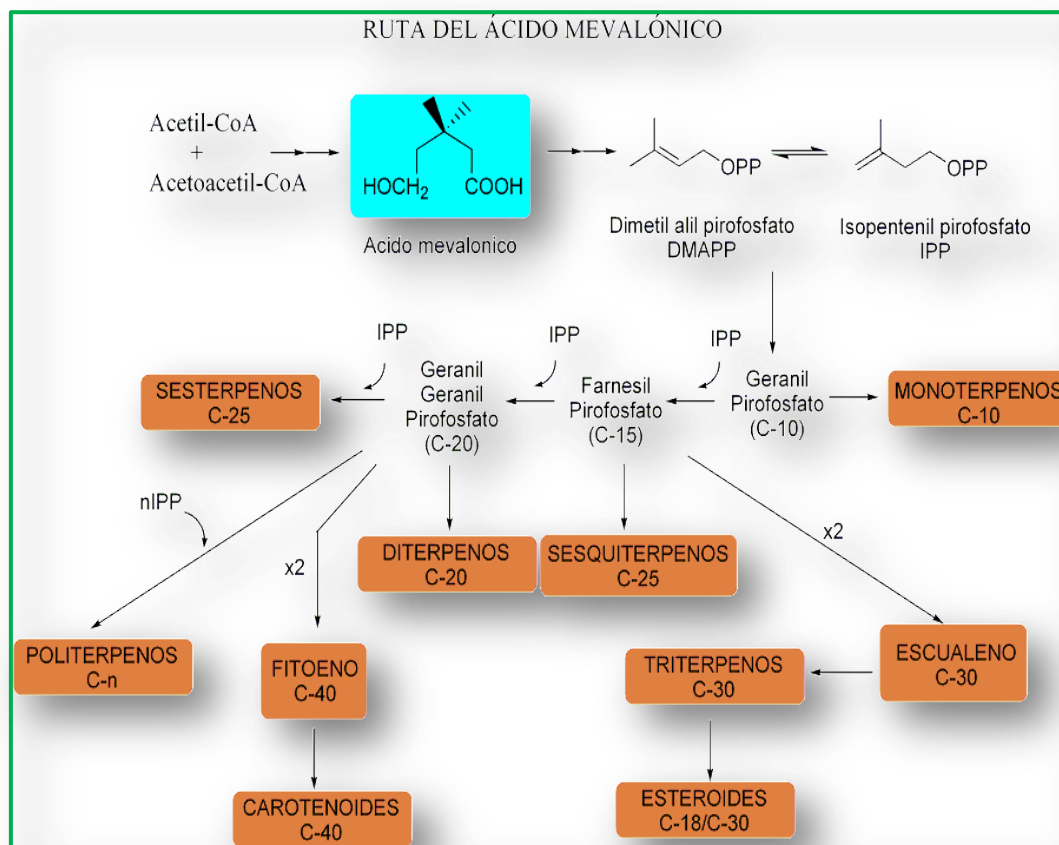


FIGURA 6. Ruta del Ácido Mevalónico (Ruta del ácido shikímico, 2014).

La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina.

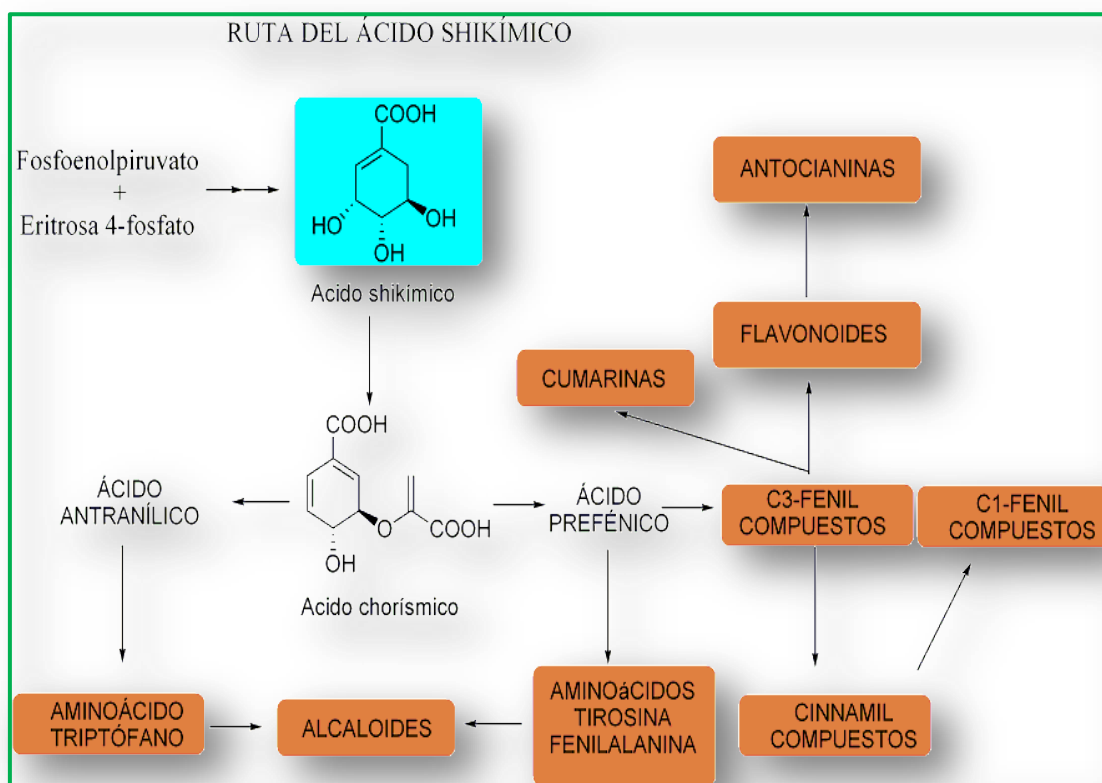


FIGURA 7. Ruta del Ácido Shikimico (Ruta del ácido shikimico, 2014).

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas (figura 8), lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Kunklinski, 2000).

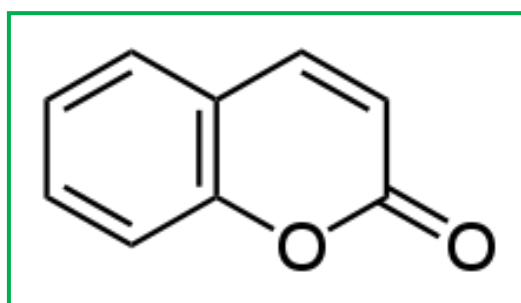


FIGURA 8. Estructura Principal de las Cumarinas.

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los derivados del ácido benzoico que tienen un esqueleto formado por fenilpropanoides que han perdido un fragmento de dos carbonos de la cadena lateral (Cseke, et al., 2006).

La lignina es un polímero altamente ramificado de fenilpropanoides. Se encuentra en la pared celular de varios tejidos de soporte y de transporte, en traqueidas y en los vasos del xilema. Se forma a partir de tres derivados fenilpropanoides: los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico. También tiene función protectora dado que su resistencia mecánica evita que las plantas sean alimento para animales y, además, su naturaleza química hace que sea difícil digerirla por los herbívoros (Bruneton, 2001).

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides. Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos (ver figura 9), siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Willians y Grayer, 2004).

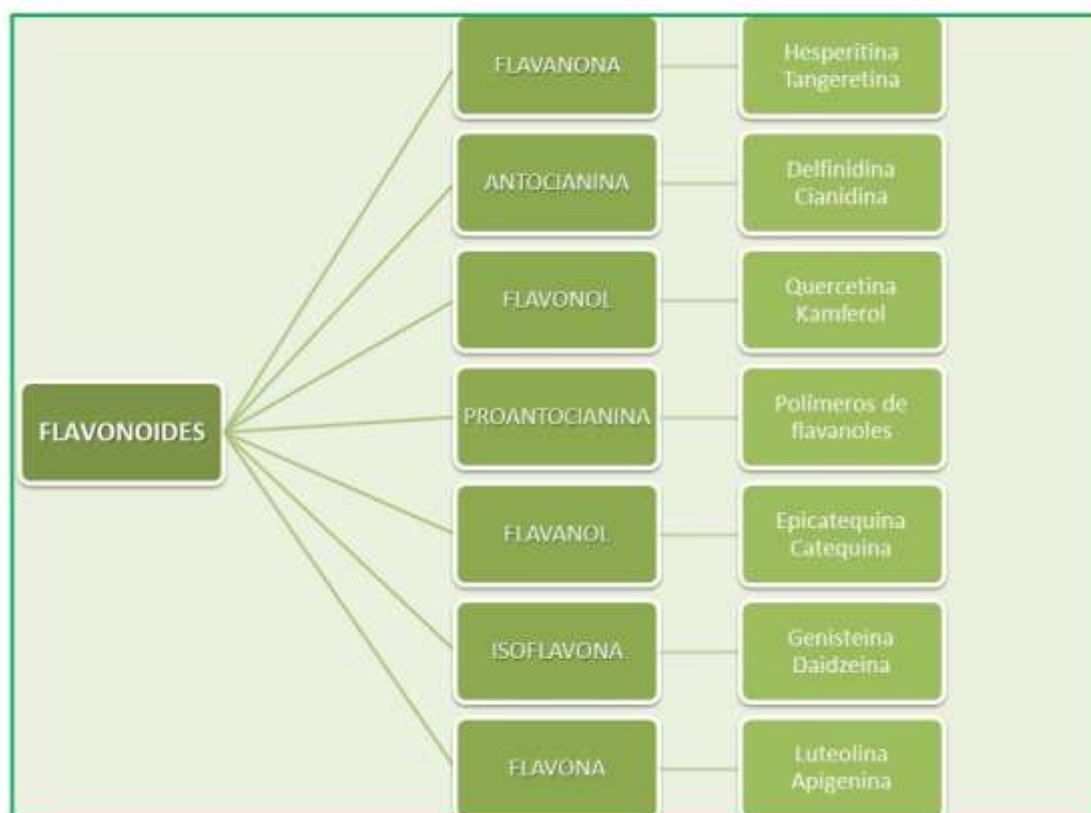


FIGURA 9. Imagen representativa de los principales flavonoides vegetales (Valenzuela, 2007).

Las antocianinas son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos. Por ello son importantes en la polinización y en la dispersión de semillas. Son glicósidos con un azúcar en posición 3. Cuando las antocianinas carecen de azúcar se denominan antocianidinas.

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables (ver figura 10).

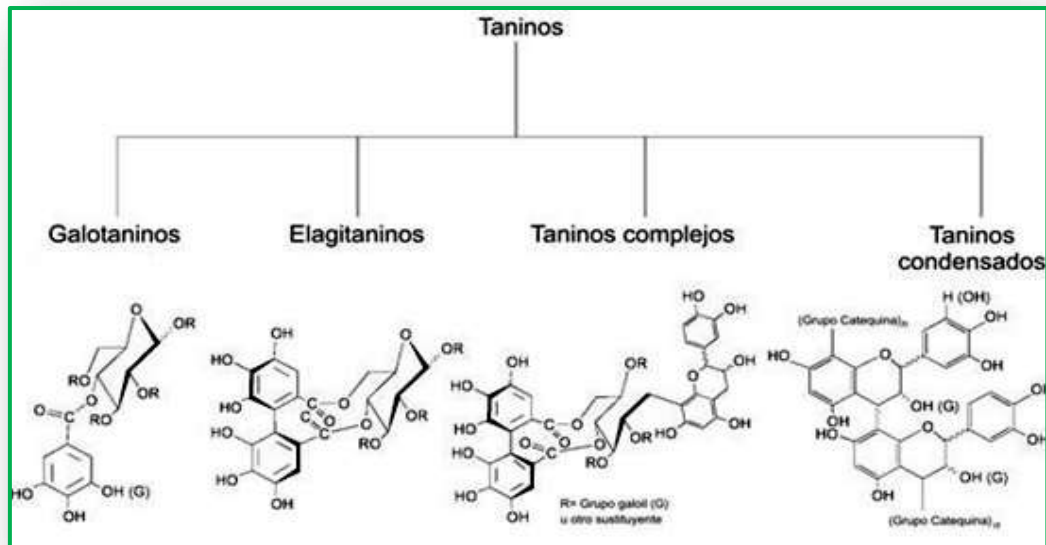


FIGURA 10. Clasificación de los Taninos (Khanbabaee, K. & Van Ree, T. 2001).

Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas. También actúan como repelentes alimenticios de muchos animales que evitan, en el caso de los mamíferos, plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Podemos observar como es que se clasifican los taninos en la figura 10.

3.2.3. LOS COMPUESTOS SECUNDARIOS NITROGENADOS

Este grupo de compuestos secundarios es químicamente muy heterogéneo. La mayoría de ellos son sintetizados en las plantas a partir de aminoácidos comunes. Pertenecen a este grupo de compuestos secundarios los alcaloides, los glicósidos cianogénicos, los glucosinolatos o glicósidos de aceite de mostaza y los aminoácidos no proteicos (Kutchan, 1995).

3.2.3.1. GLICÓSIDOS

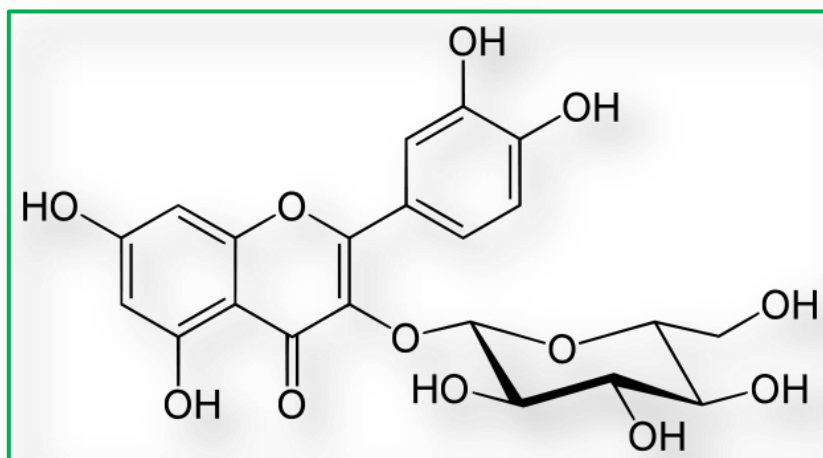


FIGURA 11. Estructura Principal de un Glicósido.

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo (ver figura 11). Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos (Cseke, et al., 2006). Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos n(Taiz y Zeiger, 1991).

3.3. ALCALOIDES

3.3.1. GENERALIDADES

En el siglo XIX se lograron verdaderos adelantos en la farmacología, con el sucesivo aporte de remedios procedentes de plantas, este avance había sido precedido por los trabajos del sueco Carl Scheele, quien logró aislar los ácidos orgánicos de las plantas, y del joven boticario Friedrich Wilhelm Sertürner (1783-1841) que con sus experimentos descubrió en 1816 el principio activo más importante del opio de la amapola, la morfina, cuyos cristales dieron lugar al “principium somniferum”, que revolucionó la lucha contra el dolor; al igual que otros compuestos orgánicos obtenidos de las plantas, fue llamada “alcaloide”, término acuñado en 1818 por Wilhelm Meissner y se aplicó a los compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas, y que recuerdan la reacción de los minerales con carácter básico.

Fueron Pierre Joseph Pelletier (1788-1842) y Joseph Caventou (1795-1877), dos farmacéuticos franceses quienes aislaron un año más tarde otro alcaloide de la ipecacuana, la emetina, y posteriormente lograron aislar la estricnina y la brucina de la Nuez Vómica, la colchicina, la cafeína y posteriormente la quinina -además de la cinchonina-, de las que prepararon sales puras, hicieron los estudios clínicos y construyeron plantas para su aislamiento industrial (Arango, 2008).

La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica, de los alcaloides y los antibióticos, hacen de estos dos grupos, los más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico.

Un gran número de medicamentos se han obtenido de plantas que contienen alcaloides, estos se han aislado principalmente en plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de Fanerógamas (aquellas plantas que se reproducen por semillas producidas en sus inflorescencias), en menor proporción en Criptógamas (Plantas que tienen sus órganos reproductores ocultos) del tipo licopodios, también en microorganismos (ergot) y animales como peces y ranas del género *Phyllobates* cuyos alcaloides constituyen algunas de las sustancias más venenosas para el hombre (Evans, 2000). Su actividad biológica a nivel del sistema nervioso, dio pie a las primeras investigaciones, siendo los alcaloides las primeras sustancias naturales estudiadas.

No existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como: “Un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación” (Evans, 2000; Paris, 1981).

De acuerdo a las características de esta definición, algunos autores han dividido a los alcaloides en cuatro clases (ver figura 12):

- **Alcaloides Verdaderos** cumplen estrictamente con las características de la definición de alcaloide: son formados a partir de aminoácidos, tienen siempre un nitrógeno intracíclico, son de carácter básico y existen en la naturaleza normalmente en estado de sal.
- **Protoalcaloides** son aminas simples con nitrógeno extracíclico, de carácter básico y son productos del metabolismo de los aminoácidos.
- **Pseudoalcaloides** presentan algunas de las características de la definición de alcaloide, pero no son derivados de aminoácidos.
- **Alcaloides imperfectos** son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides.

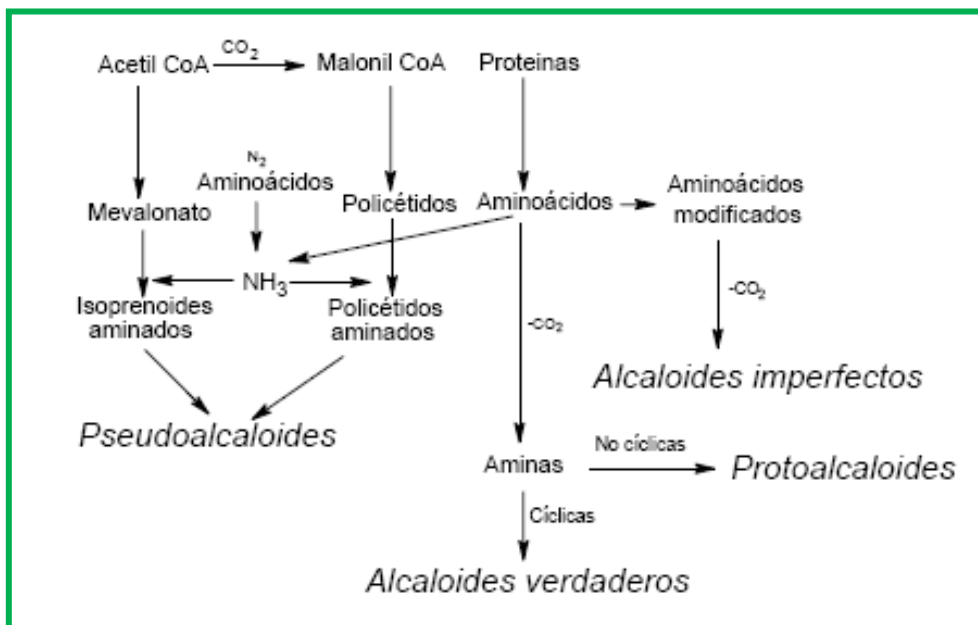


FIGURA 12. Aspectos biogénéticos para la clasificación de los alcaloides (Arango, 2008).

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Cutler y Cutler, 1999).

A los valores normales de pH del citosol y de la vacuola (7,2 y 5-6, respectivamente), el nitrógeno está protonado lo cual confiere el carácter básico o alcalino de estos compuestos en solución.

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos.

Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina.

En cuanto a su estado natural, los alcaloides son esencialmente sustancias presentes en todos los órganos de la planta, pueden encontrarse mayoritariamente en hojas (cocaina, nicotina, pilocarpina), en flores (escopolamina, atropina), en frutos (alcaloides del opio, peletiarina, coniina), en semilla (piperina, arecolina), en corteza (quinina, tubocurarina), en la raíz (emetina y cefalina).

A mediados del siglo XX se habían aislado unos 800 alcaloides y a finales del siglo debido a las nuevas tecnologías, ese número se incrementó a unas 7000 estructuras, los alcaloides se encuentran principalmente en las angiospermas (plantas que tienen sus semillas recubiertas por un epicarpio), sobre todo en ciertas familias como: Apocynaceae (~800), Annonaceae (~350), Loganiaceae (~400), Magnoliaceae (~350), Menispermaceae (~300), Papaveraceae (~550), Renunculaceae (~300), Rutaceae (~250), Rubiaceae (~450), Solanaceae (~150), Fumariaceae, Lauraceae, excepcionalmente en bacterias (Piocianina de *Pseudomonas aeruginosa*); y en hongos (psilocina de los hongos alucinógenos mexicanos y ergopéptidos del ergot del centeno) (Arango, 2008).

3.3.2. FUNCIÓN DE LOS ALCALOIDES EN LAS PLANTAS

La función de los alcaloides en las plantas no es aun clara, existen algunas sugerencias sobre el papel que juegan estas sustancias en los vegetales como:

- Sirven como productos de desecho o almacenamiento del nitrógeno sobrante, esta función es equivalente a la del ácido úrico o de la urea en los animales.
- Debido a que en su mayoría, los alcaloides son asociados con ácidos orgánicos que le facilita el transporte en la planta, pueden servir como productos de almacenamiento del nitrógeno no metabolizado o para transporte del mismo; en el caso de las Solanaceas midriáticas, los ésteres del tropano se forman en las raíces y son transportados a las partes aéreas donde pueden ser hidrolizados.
- La microquímica ha permitido mostrar en forma general, que los alcaloides son localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de la planta, es decir en el recubrimiento de las semillas, corteza del tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja; esto nos permite pensar que los alcaloides cumplen una importante función como es la de proteger a la planta, por su sabor amargo de estos, del ataque de insectos (Arango, 2008).
- Los alcaloides pueden servir de reguladores del crecimiento, se ha demostrado que los alcaloides derivados de la putrescina se incrementan notablemente durante la germinación de algunas plantas como la cebada, cuando se encuentran en suelos deficientes de potasio (Evans, 2000; Robinson, 1983).

- Mediante técnicas biotecnológicas, las plantas que normalmente acumulan alcaloides en las partes aéreas, como es el caso de la Nicotiana y Daturas, se han producido sin alcaloides, la pérdida de alcaloides en el vástago, no impide el desarrollo de la planta, lo cual sugiere que los alcaloides no son esenciales para los vegetales

Si bien, la presencia de alcaloides no es vital para la planta, estos deben de participar en secuencias metabólicas y no son solamente productos de desecho del metabolismo (Arango, 2008).

3.3.3. PROPIEDADES DE LOS ALCALOIDES

Los alcaloides tienen masas moleculares que varían entre 100 y 900; son casi siempre incoloros a excepción de aquellos altamente conjugados como berberina (amarillo), sanguinarina (rojo), urabaina (verde) y oxoaporfina que van de amarillo a rojo; son normalmente sólidos a temperatura ambiente, algunas bases no oxigenadas como laconiina, la nicotina y la esparteina que son líquidas; con algunas excepciones como la arecolina que es oxigenada y líquida; los alcaloides base son poco solubles en agua.

Las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno formando precipitados; estos ensayos preliminares se pueden realizar en el laboratorio o en el campo.

En la práctica, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como: la solución de yodo-yoduro de potasio (Reactivo de Wagner), mercurio tetrayoduro de potasio (reactivo de Mayer), tetrayodo bismuto de potasio (reactivo de Dragendorff), solución de ácido pícrico (reactivo de Hager), ácido sílico túngtico (reactivo de Bertrand), p-dimetilamino benzaldehído (reactivo de Ehrlich); nitración de alcaloides (reacción de Vitali-Morin se usa para alcaloides en estado base) (Arango, 2008).

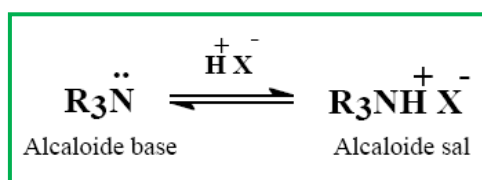


FIGURA 13. Configuración de los alcaloides en forma de base y de sal.

Puesto que los alcaloides son compuestos de carácter básico, su solubilidad en los diferentes solventes varía en función del pH, es decir según se encuentre en estado de base o de sal (ver figura 13):

- En forma de base, son solubles en solventes orgánicos no polares como benceno, éter, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, entre otros.

- En forma de sales, son solubles en solventes polares agua, soluciones ácidas e hidroalcohólicas.

El fundamento de la extracción se basa en el carácter básico de los alcaloides y en el hecho de su existencia en las plantas como sales de ácidos orgánicos o como combinaciones solubles de otras sustancias (Evans, 2000; Paris, 1981).

3.3.4. CLASIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES

TABLA 1. Clasificación de los alcaloides (Bravo-Díaz, 2003)

Compuestos químicos	Producto	Especie vegetal
Alcaloides		
Indólicos	Catarantina, Ajmalicina	<i>Catharanthus roseus</i>
	Quinamina	<i>Cinchona spp.</i>
Isoquinólicos	Berberinas	<i>Berberis spp.</i>
Piridínicos	Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>
Tropánicos	Hyosciamina, Escopolamina	<i>Hyoscyamus tuberosum</i> <i>Duboisia, Atropa, Datura y Scopolia spp.</i>
Purínicos	Cafeína	<i>Coffea arabica</i>

Habitualmente los alcaloides se han clasificado en función de su estructura, distinguiéndose principalmente los compuestos heterocíclicos de los no heterocíclicos, actualmente existen varias formas de clasificarlos (Bruneton, 1993; Paris, 1981):

- De acuerdo a sus propiedades farmacológicas:
 - ✓ Modificadores del sistema nervioso central: Estimulantes nerviosos (alcaloides de la iboga: iboganina; Alcaloides de la nuez vómica: Estricnina; etc.). Alucinógenos (alcaloides del peyote: mescalina; alcaloides del yage: harmalina).
 - ✓ Modificadores del sistema nervioso autónomo: Parasintopatomiméticos (De acción directa: Jaborandi: pilocarpina. Anticolinesterásicos habas de Calabar: eserina;). Parasintopatolíticos (Belladona: atropina; efedras: efedrina), etc.
- De acuerdo a su distribución botánica:
 - ✓ Alcaloides del tabaco: nicotina.
 - ✓ Alcaloides de las Solanaceae midriáticas: atropina, hiosciamina, entre otros.

- De acuerdo a su origen biosintético:
 - ✓ Alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos: cocaína, lobelina, entre otros.
 - ✓ Alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos: morfina, boldina, ergotamina, etc (Arango, 2008).

Adoptando la última clasificación, debido a que esta muestra una gran diversidad estructural en una gran homogeneidad bioquímica, podemos agrupar todos los alcaloides naturales conocidos por ser originados por un restringido número de aminoácidos o de precursores biogénicas. En donde podemos distinguir:

- Alcaloides alifáticos (ver tabla 1)
 - ✓ Derivados de la ornitina (pirrolidinas, tropánicos, pirrolizidínicos)
 - ✓ Derivados de la lisina (piperidinas, quinolizidínicos).
- Alcaloides aromáticos
 - ✓ Derivados del ácido nicotínico (piridinas)
 - ✓ Derivados de la fenil alanina y tirosina (isoquinoleinas)
 - ✓ Derivados del triptofano (indólicos, quinoleinas)
 - ✓ Derivados del ácido antranílico (quinoleinas)
 - ✓ Derivados de la histidina (imidazoles).
- Alcaloides de origen diverso
 - ✓ Alcaloides terpénicos y esferoidales
 - ✓ Alcaloides diversos (purinas, macrociclos, entre otros) (Arango, 2008).

3.3.4.1. ALCALOIDES DERIVADOS DE LA ORNITINA (PIRROLIDÍNICOS)

Los alcaloides derivados de la ornitina llamados alcaloides pirrolidínicos, son menos frecuentes que sus análogos piperidínicos, varios tipos de alcaloides se derivan del aminoácido ornitina, estos son biogénicamente derivados del $\Delta 1$ pirrolidina, algunos adicionan cadenas laterales formadas por unidades de acetato y comprenden:

- Las pirrolidinas simples como las higrinas y los alcaloides tropánicos de ciertas Solanaceae y Erythroxylaceae (coca), los alcaloides del tabaco y la stachidrina de *Stachys officinalis*.
- Las pirrolizidinas de Boraginaceae y de algunas Compuestas.
- Las indolicinas aunque tienen la estructura $\Delta 1$ pirrolidina y $\Delta 1$ piperidina solo los encontrados en los géneros *Eleaocarpus* y *Tylofora*,

son derivadas del metabolismo de la ornitina, en los otros casos como los alcaloides del género *Securinega*, son del metabolismo de la lisina.

De este grupo y por su acción farmacológica, los alcaloides derivados del núcleo tropánico son los de mayor interés (Arango, 2008).

3.3.4.2. ALCALOIDES DERIVADOS DEL NÚCLEO TROPÁNICO

El núcleo tropánico comprende un heterocíclico nitrogenado bicíclico (ver figura 14).

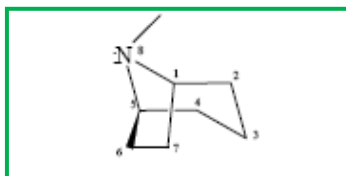


FIGURA 14. Núcleo tropánico (Arango, 2008).

La posición 3 es hidroxilada (tropanol) dando origen a dos isómeros:

- El trans tropanol o el verdadero tropanol tiene el grupo OH en α (OH en posición trans en relación al grupo N-CH₃).
- El cis tropanol o pseudotropanol tiene el grupo OH en β (OH en cis en relación al grupo N-CH₃) (ver figura 15).

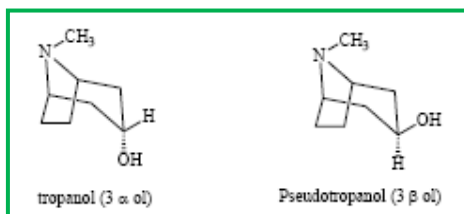


FIGURA 15. Cis-tropanol (Arango, 2008).

El tropanol o sus derivados, son esterificados con ácidos orgánicos. El principal de estos ácidos es el ácido trópico el cual posee un carbono asimétrico y se forma por un reagrupamiento tipo Many de la fenil alamina luego de una transaminación y posterior reducción (ver figura 16).

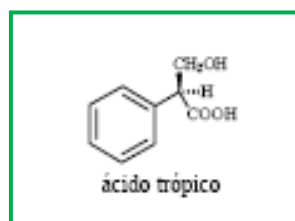


FIGURA 16. Ácido orgánico: trópico (Arango, 2008).

Existen dos importantes grupos con alcaloides conteniendo este núcleo tropánico:

1. Grupo de la atropina (alcaloides derivados del tropanol):

- La hiosciamina = éster del tropanol con el ácido l-trópico.
- La atropina = éster del tropanol con el ácido dl-trópico.
- La escopolamina o hioscina = éster del escopanol con el ácido l-trópico.

Estos alcaloides son midriáticos con propiedades parasimpatolíticas y se encuentran en algunos géneros de la familia *Solanaceae* (*Atropa*, *Datura*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus* y *Duboisias*).

2. El grupo de la cocaína (alcaloides derivados del pseudotropanol) tiene propiedades anestésicas y es el principio activo de la coca (*Erythroxylacea*).

3.3.4.2.1. Biogénesis del núcleo tropánico

La mayoría de los trabajos sobre la biosíntesis de los alcaloides del núcleo tropánico se han realizado sobre diversas especies del género *Datura*, los datos disponibles, evidencian la similitud de las rutas de formación del núcleo tropánico en este género con otras plantas productoras de este tipo de alcaloides (ver figura 17).

El primer trabajo con isótopos radiactivos mostró que al aminoácido ornitina se le incorporaban unidades de acetato para formar el núcleo, luego se demostró que esta incorporación era estereoespecífica dependiendo de la especie (Dewick, 2002; Huang, 1996).

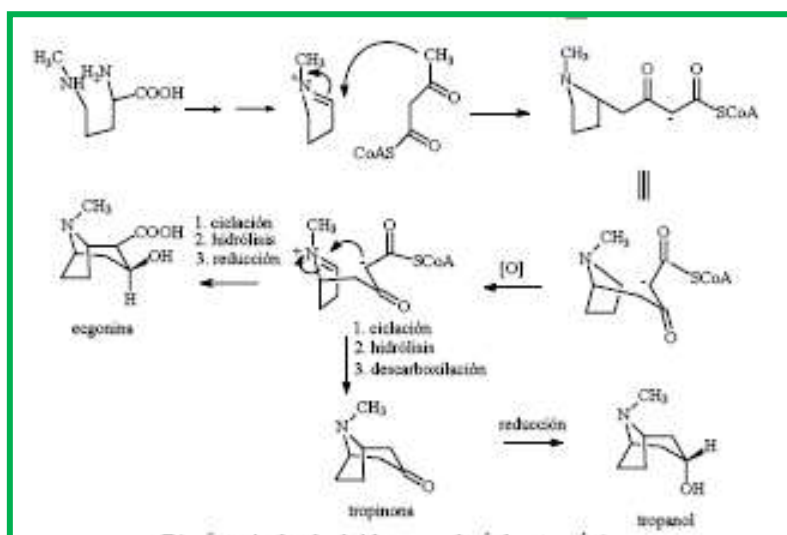


FIGURA 17. Biosíntesis de alcaloides con el núcleo tropánico (Arango, 2008).

Para el caso del tropanol de *Solanaceas* y de la ecgonina de *Erythroxylaceas*, el mecanismo de formación del núcleo, se divide luego de la condensación de la cadena de acetato (Dewick, 2002).

3.3.4.2.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Actividad del grupo Atropina - hiosciamina.

Estos dos alcaloides poseen las mismas propiedades farmacológicas, en general la hiosciamina es entre 10 y 50 veces más activa que la atropina, pero esta es más estable.

- Sobre el Sistema Nervioso Central (SNC).
- A dosis bajas tienen poca acción pero a dosis altas, provocan una excitación que se traduce en delirio llamado “delirio atropínico”.

- Sobre el Sistema Nervioso Autónomo (SNA).

A dosis terapéuticas estos alcaloides son antagonistas de la acetil colina produciendo:

- ✓ A nivel de ojos, midriasis.
- ✓ A nivel de corazón, una aceleración.
- ✓ A nivel de vasos capilares, una vaso constricción.
- ✓ A nivel del tubo digestivo un relajamiento del peristaltismo y un agotamiento de las secreciones.
- ✓ Tienen además, una acción espasmolítica neurotópica.

Acción de la escopolamina

- A dosis terapéuticas es una sustancia sedativa del SNC y antiparkinsoniana.
- Es un parasimpatolítico de acción más débil que los dos alcaloides anteriores.
- Tiene una acción sedativa del SNC con un efecto hipnótico.
- A dosis fuerte la escopolamina es capaz de provocar una intoxicación con narcosis y de vez en cuando alucinaciones (Bravo-Díaz, 2003; Bruneton, 1987; Evans, 2000; Paris, 1981).

ANTECEDENTES

4. PLANTAS MEDICINALES

La práctica de la fitoterapia es casi tan antigua como el hombre. La fitoterapia es la medicina más antigua y probada del mundo. De forma obligada los individuos y sociedades prehistóricas mantenían un fuerte contacto con la naturaleza la cual, al principio, de una forma accidental repercutía en el hombre.

Si bien la medicina moderna está bien desarrollada en la mayor parte del mundo, grandes sectores de la población de los países en desarrollo todavía dependen de los profesionales tradicionales, las plantas medicinales y los medicamentos herbarios para su atención primaria. Es más, durante los últimos decenios, el interés del público en las terapias naturales ha aumentado enormemente en los países industrializados.

Las muchas y diversas formas de los productos medicinales tradicionales han evolucionado frente a entornos ampliamente diferentes en lo etnológico, cultural, climático, geográfico y aun filosófico (Drago-Serrano, 2007; López, 2012).

Evaluar los productos elaborados en base a la fitoquímica y asegurar su inocuidad y eficacia mediante el registro y la reglamentación plantea un importante desafío para cualquiera, ya que su utilización y elaboración raramente se encuentra estandarizada o inclusive escrita; pero, de lograrlo, un avance de innumerables características vendría a beneficiar a la industria farmacéutica y a la población en general.

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos. Por consiguiente, la reglamentación de la explotación y la exportación, junto con la cooperación y la coordinación internacionales, son esenciales para su conservación a fin de asegurar su disponibilidad para el futuro (López, 2012).

Los controles legislativos sobre plantas medicinales no han evolucionado según un modelo estructurado de control. Hay diferentes maneras en las cuales los países definen las plantas o hierbas medicinales o los productos derivados de las mismas, y los países han adoptado diversos enfoques en la autorización, el expendio, la fabricación y la comercialización para asegurar su inocuidad, calidad y eficacia.

A pesar de que los medicamentos herbarios se han usado durante muchos siglos, solo una cantidad relativamente pequeña de especies de plantas se ha estudiado para las posibles aplicaciones médicas. Se dispone de datos sobre la seguridad y la eficacia de un número aún menor de plantas, sus extractos y principios activos y las preparaciones que las contienen.

Aunque en muchas regiones antiguas y aún recientes se ha visto como el uso de las plantas medicinales ha estado asociado a ritos mágicos y religiosos, igualmente hay que destacar que este uso ha estado basado en un buen conocimiento de las plantas, adquirido por la experiencia y transmitido de padres a hijos por muchas generaciones.

4.1. FITOTERAPIA

La fitoterapia (del griego *fyton*, “planta”, “vegetal” y *therapeia*, “terapia”), conocida también como herbolaria (del latín *herba*, “hierba”) es la ciencia del uso extractivo de plantas medicinales o sus derivados con fines terapéuticos, para prevención o tratamiento de patologías (López, 2012). La fitoterapia pertenece al ámbito de la medicina y se relaciona estrechamente con la botánica y el estudio del metabolismo secundario vegetal, es ejercida por médicos y por fitoterapeutas. La farmacéutica tiene su aproximación a la fitoterapia en la farmacognosia, que da cuenta de los constituyentes químicos de las plantas o de sus órganos o partes y de las propiedades farmacológicas de estos.

La Fitoterapia moderna, se basa en el conocimiento de la Farmacología, y considera los aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos de los medicamentos basados en plantas medicinales, en estudios preclínicos y clínicos, aunque tiene su punto de origen en el conocimiento ancestral y la experiencia de prueba y error heredada de las pasadas generaciones.

El uso de plantas como recurso terapéutico natural se remonta a tiempos muy remotos. Actualmente la ciencia confirma la presencia en ellas de compuestos químicos con acciones farmacológicas, denominados principios bioactivos, que constituyen muchas veces los ingredientes primarios utilizados por laboratorios farmacéuticos como punto de partida en el desarrollo de formas comerciales que serán patentadas para su uso terapéutico. Pero también se pueden usar los recursos vegetales con propiedades medicinales para la preparación de extractos estandarizados de plantas o de sus órganos o partes y son denominados fitofármacos. Los fitofármacos alcanzan un papel relevante en la terapéutica moderna y pueden ser utilizados con fines preventivos o de tratamiento de las más diversas patologías y basado en lo que se conoce como la medicina basada en la evidencia

Hoy en día la tendencia en fitoterapia es recomendar o prescribir productos estandarizados, es decir, que nos aseguren cierta cantidad de principios activos que sepamos que van a ser efectivos. De nada nos sirve prescribir una droga sin saber si está correctamente cuantificada en aquellas sustancias que terapéuticamente son efectivas (López, 2012).

5. DATURA

Dentro de la familia *Solanaceae*, el género *Datura* comprende 18 especies, la mayoría de ellas herbáceas, distribuidas principalmente por las regiones tropicales y templadas de América, desde donde fue introducida en Europa por los españoles en la segunda mitad del siglo XVII (Ferrer, 1992). Pero en general se puede decir que la planta es cosmopolita.

La mayoría de las especies del género *Datura*, por sus propiedades paliativas y curativas de múltiples patologías, ocupa un lugar preponderante dentro de la medicina popular, pudiendo ocasionar en oportunidades toxicidad con fatalidades (Salinas, 1999).



FIGURA 18. *Datura* spp. (Hemeroteca propia).

5.1. GENERALIDADES

En las plantas, la formación de alcaloides puede considerarse un proceso metabólico. Estos cumplen en ellas funciones diversas, actuando como depósitos para síntesis proteica, regulando actividades tales como crecimiento, metabolismo, reproducción; constituyen sustancias de reserva capaces de proveer nitrógeno y otros elementos necesarios para la economía, actuando como núcleos de coenzimas y hormonas (Salinas, 1999).

5.2. Origen y Estructura (Albornoz, 1980).

Las plantas de la familia de las Solanáceas son ricas en alcaloides; sus diferentes géneros botánicos los poseen del tipo tropanico. Este grupo de alcaloides tiene como precursor biosintético la Ornitina que forma el anillo pirrolidínico de la tropina y fenil-alanina precursor del ácido trópico.

Estructuralmente, son núcleos heterocíclicos, ésteres de la base cíclica tropina con un ácido orgánico.

El tropano es un anillo bicíclico formado por la condensación de la N-metil pirrolidina con la piperidina.

Forma un derivado 3-OH, llamado tropina o tropanol, que constituye la parte básica de estos alcaloides (ver figura 19).

El ácido trópico se comporta como un ácido BOH carboxílico.

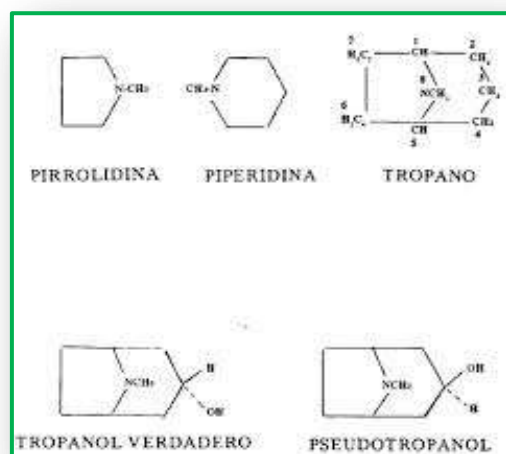


FIGURA 19. Representativa del tropano y sus derivados (BDUC, 2014).

a. Atropina e Hiosciamina

Son respectivamente los ésteres de (+) y (-) del ácido trópico con la tropina. Es decir, que la atropina es la forma racémica de la (-) hiosciamina; en la naturaleza ella se encuentra en esta forma.

La atropina se comporta como una base muy fuerte con pKa 10 ópticamente inactiva. Ambos alcaloides son fácilmente hidrolizados en soluciones acuosas ácidas o alcalinas para formar tropina y ácido trópico.

b. Hiosina Escopolamina

Es el estero-isómero (-) y se obtiene en esta forma esteroquímica a partir de la planta.

Es una base más débil (pka 7,6) que la hiosciamina, aunque ambas muestran una gran similitud en su comportamiento químico. La hidrólisis alcalina produce ácido trópico y la base llamada escopolina.

Los isómeros L (-) de ambos alcaloides son por lo menos cien veces más potentes que los isómeros D (+).

1. **Cocaína:** Químicamente se corresponde a la tropina 2-ácido carboxílico.

2. **Pseudopelleterina:** Amina terciaria derivada de la tropinona, con un oxígeno en un grupo carbonilo.

3. **Alcaloides tropánicos en el género *Datura*.** (Blohm, 1962; Evans y Hofmann, 1973)

En el género *Datura*, los alcaloides tropánicos constituyen los principios activos, siendo los esenciales:

- La escopolamina (C₁₇H₂₁O₄N)
- La hiosciamina (C₁₇H₂₂O₃N)
- La atropina (C₁₇H₂₃O₃N),

Los cuales se encuentran presentes en todas las especies del género.

Con respecto a su contenido en alcaloides tropánicos secundarios su producción es menor en relación con los principios esenciales; Sin embargo la proporción, concentración y formación de estos principios secundarios varía de una especie a otra.



FIGURA 20. *Datura* spp. (Hemeroteca propia).

5.3. UTILIZACIÓN TERAPÉUTICA DE LOS ALCALOIDES TROPÁNICOS.

Generalidades

Desde la antigüedad las *Datura* han tenido una larga historia en ambos hemisferios como género botánico utilizado con propósitos medicinales (en la medicina tradicional) e intoxicantes (en ritos mágicos-religiosos) (ver figura 21).

Característica interesante de ellas ha sido el descubrimiento en diferentes partes del mundo de sus efectos alucinógenos; efectos atribuidos a agentes sobrenaturales o mágicos que han causado en oportunidades temor. El libre uso de sus diferentes especies en el Viejo y Nuevo Continente en ceremonias mágico-religiosas como alucinógeno sagrados en oráculos, en el descubrimiento de propósitos ocultos, comunicación con espíritus, y profecía de eventos, ha causado una sorpresa no menor (Evans, 1979).

Según el Glosario de Términos de la OMS sobre Alcohol y Drogas, planta alucinógena es cada una de las especies de una amplia variedad de vegetales que contienen alucinógenos, utilizadas tradicionalmente por los pueblos indígenas con fines muy diversos: inducir euforia, mejorar la sociabilidad, aliviar la angustia, como medicina o para inducir visiones. Cuando estas plantas están de moda entre personas urbanas y cultas que experimentan con drogas, y que mezclan alguna de ellas con alcohol, cocaína, marihuana y otras sustancias psicoactivas, las reacciones pueden ser graves (OMS, 2008).



FIGURA 21. Representación de los usos tradicionales de *Datura* spp. (Hemeroteca propia).

Podemos concluir, que no hay parte del mundo donde no exista una "abuelita" que no conozca de las propiedades medicinales de las daturas, cuáles han sido transmitidos de generación a generación hasta nuestros días.

A través de una amplia gama de preparaciones (infusiones, tisanas, vapores, ungüentos), técnicas de aplicación (cataplasma, baños, cigarrillos) y composición (otras hierbas, miel, leche) es que se obtienen de estos sus efectos benéficos (Emboden, 1975).

Utilidad terapéutica.

(Arellano y Parra, 1983; Blohn, 1962; Evans, 1979; Evans y Hofmann, 1973; López, 1971; Schavarstman, 1979).

Las daturas con sus diferentes especies poseen la misma utilidad terapéutica debido a que sus principios básicos esencialmente son los mismos.

Tal utilidad se debe a propiedades:

- Anticolinérgicas (midriáticas, antiespasmódicas, entre otras).
- Anestésicas
- Analgésicas
- Sedativas-hipnóticas
- Antiparkinsonianas
- Afrodisíacas.

5.4. INTOXICACIÓN POR *Datura*

Rango de toxicidad.

El rango de toxicidad es altamente variable e impredecible. Todas las partes de las plantas son venenosas (Schavarstman, 1979).

Se puede señalar acertadamente que la intensidad de la intoxicación depende de:

- A. La concentración del principio activo involucrado en un episodio dado.
- B. La sensibilidad particular del paciente a los principios activos más importantes.
- C. La prontitud y efectividad del tratamiento.

La concentración de alcaloides en estas plantas varía años tras años, entre las diferentes especies y aún la misma planta (raíz, tallo, hojas, semillas, etc.), dependiendo de factores que afectan su crecimiento (humedad, tipo de terreno, pluviosidad, etc.). Por este motivo se hace prácticamente imposible asociar la sintomatología con la cantidad y el material vegetal (semilla, hojas, etc.) ingeridos.

Por otra parte el porcentaje de principios activos es más elevado en horas de la mañana que en las de la tarde. La hioscina predomina en las daturas jóvenes y

la hiosciamina en las plantas maduras. En período de lluvia la concentración de alcaloides tropánicos disminuye considerablemente.

Cada especie varía con respecto a su concentración de alcaloides (ver tabla 2), de igual manera la proporción de estos, es diferente para cada uno de los órganos de la planta (Zoghbi, Arellano-Parra, 1979).

TABLA 2. Relación entre las partes de la planta y la cantidad de alcaloides tropánicos totales presentes en esa planta sobre material seco, alcaloides por ciento. (Zoghbi, Arellano-Parra, 1979).

Especie	Semilla	Hoja	Flores
<i>D. stramonium</i>	0.53	0.35	1.12
<i>D. inoxia</i>	0.28	0.63	1.57
<i>D. metel</i>	0.59	1.6	0.52
<i>D. antomi</i>	0.002	-	-
<i>D. candida</i>	0.27	0.15	0.39
<i>D. suaveolens</i>	-	0.45	0.46
<i>D. versicolor</i>	-	0.07	0.41
<i>D. rosea</i>	-	0.03	0.21

5.4.1. Mecanismo de acción.

Los alcaloides tropánicos anticolinérgicos bloquean la acción de la acetilcolina por un mecanismo de inhibición competitiva en el nivel del sitio del receptor.

En el caso de la intoxicación anti-colinérgica cerebral, se acompaña de signos de bloqueo muscarínico periférico. Los ganglios autonómicos son afectados en menor grado; los receptores nicotínicos en el nivel de la placa neuromuscular no son afectados por el agente que bloquea los receptores muscarínicos.

5.4.2. Manifestaciones clínicas.

La toxicidad producida por los principios activos del género *Datura*, corresponde a un síndrome de intoxicación anticolinérgica. Clásicamente se describe con una popular mnemotécnica: "Caliente como el infierno, Ciego como un murciélago, Rojo como una remolacha, Seco como el hueso, Loco como una gallina". Los síntomas pueden aparecer después de 5 a 10 minutos, post-ingesta (Goldfrank, 1990).

5.4.2.1. Cuadro Clínico.

(Arellano -Parra, 1983; Belton, 1979; Blohm, 1968; Dreishabach y Robertson, 1989; Ellenhorn y Barceloux, 1988; Gowdy, 1972; Hall, et al., 1977; Lee, 1990; Mikolich, et al., 1975; Rumack, et al., 1983).

- Dermatológico: Piel enrojecida y seca, particularmente en cara y cuello. Disminución de la sudoración.
- O.R.L.: Midriasis con pérdida de la acomodación para visión cercana.
- Cardiovascular: Taquicardia sinusal, especialmente en niños y adultos jóvenes e hipertensión arterial. El desarrollo de arritmias y paro cardíaco puede ocurrir aunque en forma poco frecuente, comprometiendo la vida del paciente.
- Gastrointestinal: Cavidad bucal seca que dificulta la deglución y el lenguaje, haciéndolo poco comprensible. Disminución tonalidad gastrointestinal, con pérdida de los ruidos hidroaéreos y que pueden llegar a producir íleo intestinal.
- Genitourinario: Retención urinaria que puede ameritar cateterización.
- Neurológico: Ansiedad, delirio, desorientación, alucinaciones, ataxia y amnesia son frecuentes; convulsiones pueden presentar pero no son usuales; movimientos mioclónicos esporádicos, coreoatetosis e hiperreflexiva osteotendinosa están presentes. En intoxicaciones severas puede producirse coma.
- Regulación de la Temperatura: Hiperpirexia que puede llegar a comprometer la vida del paciente, especialmente en niños.

Los síntomas usualmente se resuelven en 24 horas, aunque la dilatación pupilar puede persistir hasta una semana. A menudo los pacientes experimentan amnesia para eventos ocurridos entre la ingestión y el restablecimiento, las complicaciones médicas por sobredosis que pueden conducir a la muerte son muy raras, pero se han reportado especialmente en niños.

5.5. Laboratorio.

(Fábrega, 1988; Lee y Ricardi; 1956).

General (complementarios): Perfil hepático donde pueden registrarse: Aumento de la TGO y LDH, Tiempo de Protombina prolongado, Bilirrubina aumentada.

Toxicológico: Los agentes anticolinérgicos pueden determinarse en orina mediante (las pruebas se encuentran detalladas en el apartado de anexos):

- Ensayo de Ekkert.
- Ensayo de Gulielmo.
- Ensayo con Cloruro de Mercurio.
- Reactivo de Marquis.
- Reactivo de Mandellin.
- Reacción de Vitali.

- Reacción de Wasicky (p-dimetilaminovenzaldehido):
- Ensayo de Brunner.

5.6. Tratamiento.

(Dreisbach y Robertson, 1989; Ellenhorn y Barceloux, 1988; Goldfrank. 1990; Lee, 1990; Rumack, 1983)

- Exposición Oral/Parental: Medidas de Sostén, Mantienen una vía aérea permeable, ventilación asistida, si es necesario sonda vesical (eventual).
- Descontaminación: Dado que existe una disminución de la motilidad intestinal a todo paciente que haya ingerido material vegetal de *Datura* deberá practicársele medidas de descontaminación. Se ha reportado la recuperación de semillas hasta 36 horas después de su ingestión.
- Emesis: Es más efectiva si se induce dentro de los 30 minutos posteriores a la ingestión sustancial. Está indicada en pacientes con reciente ingestión sustancial que no tengan o vayan a desarrollar en poco tiempo convulsiones, o deterioro del estado de conciencia.
- Jarabe de ipeca: Dosis: Adultos: 30 ml. Niños de 1 a 12 años: 15 ml.
- Lavado gástrico: Carbón activado / catártico salino, administrar una suspensión de carbón activado y 30 mm, después la dosis de catártico. Carbón activado: Dosis: Adultos: 30-100 g. Niños: 15-30 g.
- Catártico salino: Sulfato de magnesio o sulfato de sodio. Dosis: Adultos: 30 g. Niños: 250 mg/kg.
- Antídoto y fármacos no específicos:
- Fisostigmina: Antagonista de la Atropina. Dosis: Adulto inicial: 2 mg IV a pasar en 5 mm; una segunda dosis 1-2 mg IV, puede repetirse a los 20 mm. La dosis de 1 mg IV cada 15-20 mm, puede repetirse hasta revertir los efectos o si estos reaparecen. Niños: 0.002 mg/kg. Jamás por infusión continua.
- Indicaciones específicas para su uso: alucinaciones, convulsiones, hipertensión arterial, arritmias, coma. Este último puede revertirse en forma rápida en algunos casos, sin embargo no debe emplearse para mantener al paciente vigil.
- Contraindicaciones: asma, gangrena, enfermedad cardiovascular, obstrucción mecánica del tracto gastrointestinal y genito-urinario; sin embargo, si la vida del paciente se encuentra en peligro, las anteriores pasan a un segundo plano.
- Mecanismo de acción: Es un agente anticolinesterásico, que actúa inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa por una reacción de carbomovilización, incrementando la disponibilidad de la acetilcolina.
- Alternativas terapéuticas antidóticas: La Neostigmina y la Piridostigmina son también agentes anticolinesterásicos, pero poseen un grupo amino cuaternario que no le permite atravesar la barrera hematoencefálica en el sistema nervioso central y por lo tanto no revierten el coma.

Fármacos específicos:

- Propanolol: Debe ser considerado para el tratamiento de las taquiarritmias, sin embargo no es tan efectivo como la fisostigmina. Dosis: Adultos: 1 mg IV c/2-5 minutos máx total 5 mg. Niños: 0.001 a 0.1 mg/kg, dosis IV, máx 1 mg/dosis.
- Dlacepam: En los casos de convulsiones. Dosis: Respuesta.
- Desametasona: En los casos de hiperpirexia que no cede con medios físicos. Dosis: 1 mg/kg IV.
- Vitamina C: Alcaliniza el pH urinario y elimina el "componente malo" del viaje. Esquema: 2 g Ivstat, 1 g c/2 horas durante 12 horas IV. 6 g a infusión continúa en solución glucosalina durante 12 horas.
- Contraindicados por sus propiedades anticolinérgicas: barbitúricos, fenotiazinas y haloperidol.

5.7. *Datura Stramonium*



FIGURA 22. *Datura Stramonium* (Kölher's Medicinal Plants, 1887).

Datura stramonium es una planta de la familia de las solanáceas utilizada por los seres humanos desde la antigüedad por sus propiedades alucinógenas y medicinales (ver figura 22). En la actualidad se describen de forma ocasional casos de utilización con fines recreativos, sobre todo en adolescentes (Gutiérrez, et al., 1999; Jimson, 1995; Tiongson, et. al., 1998).

La planta contiene en todas sus partes gran cantidad de alcaloides ricos en atropina, escopolamina e hioscinamina y los síntomas derivados de su uso consisten en un síndrome anticolinérgico (Gutiérrez, 1999; Vanderhoff, 1992).

Existen muy pocos casos documentados de su uso en nuestro país, probablemente esto se debe a la falta de un interrogatorio dirigido hacia el consumo de la planta, pero los médicos de urgencias deben incluir esta eventualidad en el diagnóstico diferencial del síndrome anticolinérgico ya que su consumo se asocia a la aparición de un síndrome atropínico, cuyo tratamiento es únicamente sintomático en la mayor parte de los casos (Gutiérrez, 1999).

Sinónimos de Estramonio (*Datura stramonium*): Estramónica, hediondo, hierba hedionda, higuera del infierno, higuera loca, mata del infierno, perines, manzana espinosa, berenjena del diablo, matatopos, flor de la trompeta, trompetilla, entre otros.

(En Inglés: Jimson weed. Francés: Stramonie commune. Alemán: Stechapfel)

Datura stramonium se presenta en cuatro variedades que difieren en el color de las flores (blanco y violeta) y el número de espinas en sus cápsulas.

Datura stramonium var. *stramonium* es una hierba anual de hasta 1.5-2 m. de altura, robusta y erguida, lampiña y ramificada con hojas entre ovadas y elípticas, apuntadas y ligeramente dentadas, de 50-180 mm de longitud. Florece desde mayo hasta bien entrado el otoño con flores blancas, tubulares, largamente embudadas, de hasta 10 cm. De longitud con cinco lóbulos cortos y pegados, que salen de forma aislada en el lugar de la ramificación. El cáliz es tubular y ligeramente inflado en la base. Los frutos son cápsulas ovoides de 35-70 mm, generalmente cubiertas de espinas, esbeltas e iguales.

Crece en huertas poco cuidadas, barbechos, bordes de los campos, escombros, graveras, junto a corralizas y construcciones rurales y muy frecuentemente como contaminante de cultivos como el maíz.

Esta planta es altamente tóxica, pudiendo causar la muerte en hombres y animales.

En la bibliografía aparecen referencias a intoxicaciones en humanos, terneros, cabras, caballos, pollos, ovejas y cerdos.

Todas las partes de la planta son tóxicas, pero las hojas y las semillas son la principal fuente de intoxicación. Generalmente, los animales la rechazan debido a su olor y sabor desagradables. No obstante, en situaciones de hambre, o cuando hay poco alimento disponible, puede ser ingerida. También se consume de forma accidental cuando el estramonio se recolecta junto a otras plantas y se suministra como heno o ensilado, o las semillas contaminan los granos de cereal o alimentos procesados (Ferrer, 1992).

5.7.1. TOXICIDAD

El estramonio contiene alcaloides derivados del tropano (atropina, escopolamina o hioscina e hiosciamina), que son antagonistas competitivos de la acetilcolina y originan un síndrome vagal (bloqueo muscarínico) y una acción central estimulante de la corteza cerebral.

El contenido total de alcaloides varía entre 0.25 y 0.7% del peso fresco de las hojas.

Los rumiantes parecen ser que los toleran mejor que otros animales, posiblemente porque sufran transformaciones a nivel de la panza mientras que en ovejas, una dosis de 10 gramos de estramonio verde (hojas y frutos) por kg de peso vivo y día, causa la muerte de los animales en un plazo inferior a 38 días (Ferrer, 1992).

5.7.2. CUADRO CLINICO

La intoxicación por estramonio en ovejas y cabras causa alteraciones de la locomoción, temblores musculares seguidos por un estado depresivo, somnolencia, respiración acelerada seguida de bradipnea, taquicardia seguida de bradicardia, incapacidad para mantenerse en pie y muerte, en las intoxicaciones agudas en un plazo inferior a 12 horas después de la ingestión.

El examen post-mortem en procesos agudos, demuestra gastroenteritis catarral, congestión pulmonar y hepática y hemorragias subpericárdicas; en intoxicaciones más lentas se puede apreciar corazón dilatado e hígado graso con hemorragias. La corteza renal parece pálida y amarillenta y la medular hemorrágica. El estudio histológico del riñón permite observar una degeneración tubular. En cabras se ha podido apreciar además hidroperitoneo e hidropericardias.

5.7.3. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

En el caso de consumo accidental por animales, si éste es reciente, la actuación rápida del veterinario permitirá evacuar gran cantidad de la planta del tracto digestivo, antes de que la intoxicación llegue a ser más grave, y a la vez aplicará un tratamiento a base de carbón activo y purgantes salinos, así como un tratamiento sintomático. Los animales menos afectados, una vez cesa el consumo, se recuperan en uno o dos días, simplemente dejándoles descansar (Estramonio, 2014).

5.8 *Datura innoxia*

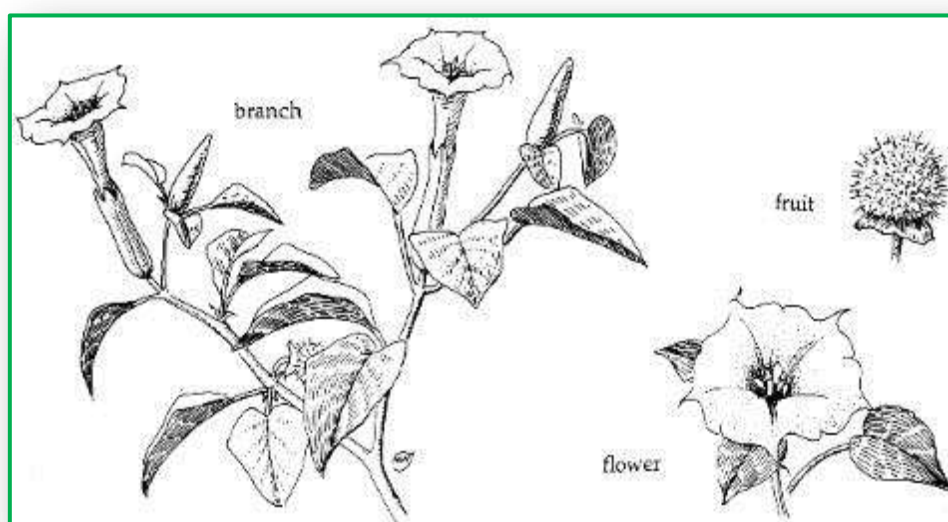


FIGURA 23. *Datura innoxia* (*Datura innoxia*, 2014)

Planta nativa de México, Sur de Estados Unidos y Nicaragua. Algunos autores, debido al extenso uso mundial que dicha planta ha tenido a través de los siglos, reclaman su origen en el Caribe e inclusive China. Su uso por muchas culturas obstaculiza encontrar su verdadera biogeografía.

Al igual que *Datura stramonium* y las otras plantas pertenecientes al género *Datura*, *Datura inoxia* es y ha sido utilizada a lo largo de los siglos con propiedades de chamanismo y brujería, últimamente se han encontrado casos en donde generaciones de jóvenes la utilizan con fines recreacionales, esto sin tomar en cuenta las repercusiones que la planta pueda ocasionar en sus organismos.

Se ha encontrado que en México y en Centro América, los asesinos que la emplean, han administrado dosis no tan elevadas de esta planta a sus víctimas, en donde los efectos que esta causa han provocado las muertes de dichas personas.

La trompeta del ángel, o Toloache; como también es conocida (ver figura 23), es un arbusto semi leñoso con tintes grises que crece entre la hierba y en comunidades semi desérticas. Su crecimiento mejora particularmente después de temporadas de sequía, crece anualmente en el frío. Puede alcanzar alturas de hasta 2 metros, y en la segunda mitad del verano produce flores de un brillante color blanco, y en ocasiones moradas o hasta amarillentas, de hasta 18 centímetros de diámetro. Antes de que las flores abran se tornan en una espiral, que después se convierte en una trompeta que pareciera tener los cinco pétalos unidos, de ahí el nombre de trompeta de ángel. Sus frutos son de un color verde brillante y están cubiertos por unas pequeñas espinas que hacen juego. Los frutos contienen una gran cantidad de semillas que normalmente son de 2 milímetros de diámetro y de color negro. Los tallos pueden ser verdes, grisáceos e inclusive hasta morados (Beal, 2008).

5.8.1. GENERALIDADES

Datura inoxia en México, es conocida como el original “Toloache”, pero debido a que las plantas del género *Datura* son sumamente parecidas entre sí, en especial *stramonium* e *inoxia*, la gente suele confundirlas y pensar que están administrando toloache (*Datura inoxia*) cuando en realidad lo que se está administrando es *Datura stramonium*, que a pesar de causar efectos similares, su toxicidad es mucho mayor, por lo que dichos efectos y síntomas son magnificados y con una dosis de menor cantidad comparada con la de *Datura inoxia* se puede ocasionar la muerte del paciente.

Esta planta es altamente utilizada en prácticas de brujería, así como en remedios tradicionales que requieran de sus efectos antiinflamatorios y anestésicos, como lo son para el tratamiento de la artritis en personas de todas las edades; pero esto por vía tópica, no oral.

5.8.2. TOXICIDAD

Las dos toxinas mayormente asociadas con *Datura inoxia* son la atropina y la escopolamina. en menor cantidad también son asociadas la hiosciamina, hioscina, norescopolamina y meteloidina. Éstos compuestos se asocian con efectos alucinatorios, pueden producir demencia, psicosis, enfermedades cardiovasculares, entre otros síntomas.

Se puede considerar similar al estramonio, solo menos tóxica.

JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional mexicana se ha conservado desde la época prehispánica hasta nuestros días, el uso cotidiano de plantas para el tratamiento de diversas patologías es una práctica habitual de las diversas regiones del país. Al mismo tiempo, se ha iniciado una tendencia a nivel mundial de consumir productos obtenidos de fuentes naturales y reducir el consumo de aquellos sintetizados en el laboratorio.

Tradicionalmente los vegetales han sido las fuentes naturales para la producción de una gran variedad de



componentes bioactivos como alcaloides, terpenoides, esteroides, flavonoides, entre otros. Las principales desventajas de las plantas como materia prima radican en el bajo rendimiento, baja reproductibilidad de su actividad y el riesgo potencial de impacto ambiental que puede causar su escasez. Adicionalmente, la homogeneidad y características de productos derivados de plantas

pueden afectarse debido a las variaciones que ocurren cada año e incluso en cada estación anual (Drago-Serrano, 2007).

Esto ha provocado un mayor estudio de las diferentes especies vegetales, así como de las rutas metabólicas que éstas llevan a cabo, todo esto para lograr aumentar la cantidad y calidad de los metabolitos de interés. Sin embargo, debido a las características de los sistemas de cultivo actual, resulta difícil la producción a gran escala de los productos de interés.

Es por esto que se ha considerado a la biotecnología vegetal como una herramienta clave para el desarrollo de metodologías que permitan la explotación de forma sustentable, para lograr un abasto de este tipo de compuestos y al mismo tiempo reducir el impacto ambiental que se generaría con el uso de los sistemas convencionales de cultivo. Gracias a que los cultivos de tejido se pueden manipular más fácilmente que las plantas para incrementar los rendimientos, y también es posible generar compuestos desconocidos (García, 1999). Con el cultivo *in vitro* se puede lograr una fuente continua y confiable de metabolitos.

El "toloache" (*Datura innoxia*); considerada como una planta originaria de México, así como las plantas de su género, son ampliamente utilizadas dentro del territorio nacional y en muchos otros países por sus propiedades sobre el Sistema Nervioso Central (SNC); sin embargo, debido a la mala información en su uso también son utilizadas en supuestas prácticas de hechicería que datan de tiempos prehispánicos. Debido a su alta concentración en alcaloides de utilidad farmacéutica como anestésicos del SNC pueden ser utilizados correctamente por dicha industria para lograr este tipo de acciones farmacológicas de una forma más regulada.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Establecer cultivos *in vitro* de *Datura* spp, potencialmente productores de metabolitos secundarios del tipo alcaloides.

Objetivos particulares

- Establecer cultivos asépticos de *Datura* spp.
- Evaluar el efecto de diferentes reguladores el crecimiento vegetal sobre la inducción de calogénesis en diferentes explantes de *Datura* spp.
- Subcultivar los cultivos de callo obtenidos para la generación de abundante biomasa.
- Evaluar la producción de alcaloides en los cultivos de callo generados.
- Identificar mediante CCF y espectrometría de UV-Vis los compuestos alcaloides.

HIPÓTESIS

Los cultivos *in vitro* generados conservaran la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios del tipo alcaloides.



FIGURA 25. *Datura* spp. (Hemeroteca propia).

MATERIALES, EQUIPOS Y MÉTODOS

EQUIPOS

CÁMARA PARA CRECIMIENTO DE PLANTAS Lumistell ICP-30 (Figuras 26 y 27)



INCUBADORA Barnstead/ Lab-line (Figuras 28 y 29)



AUTOCLAVES

Uamoto. Sterilizer SM510 (Figuras 30 y 31)



BALANZAS

BOECO Germany CE06 (Figura 32)



CAMPANA DE FLUJO LAMINAR

LABCONCO Purifier classb II Biosafetu Cabinet. Delta series (Figuras 33 y 34)



EQUIPO IR

Equipo NICOLET AVATAR 360 FT-IR.
Con celda de KBr (figuras 35 y 36).

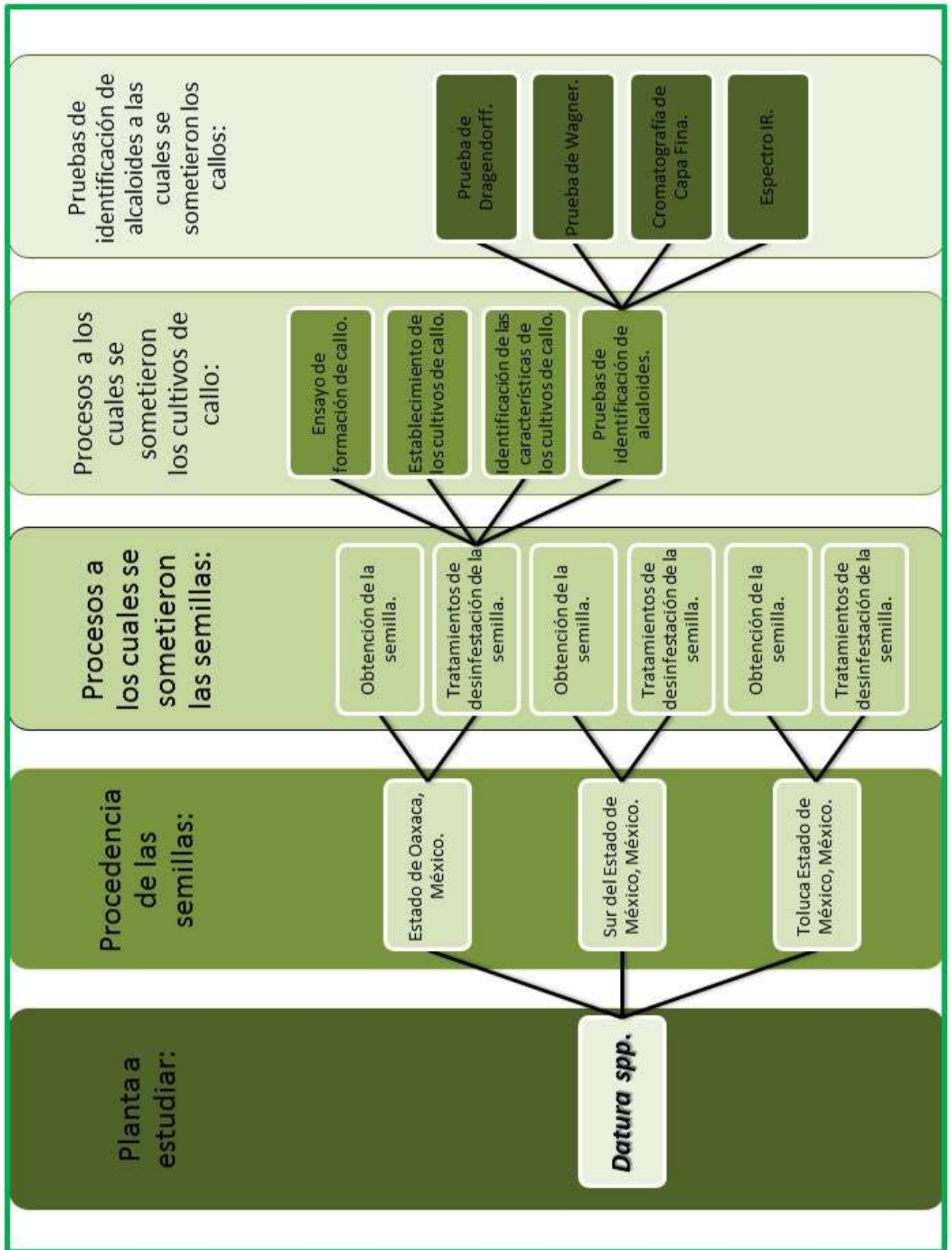


MATERIALES Y REACTIVOS

Se utilizó agua destilada estéril.

Todos los reactivos que se utilizaron fueron de las marcas J. T. Baker o bien Sigma-Aldrich.

DISEÑO EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN PARA SEMILLAS DE *Datura* spp.

Semillas procedentes del Estado de Oaxaca

El primer lote de semillas se obtuvo de una planta de *Datura* spp. colectada en la zona de la ciudad de Oaxaca, México. Una vez seco el fruto, se abrió para extraer las semillas.

El proceso de desinfestación para dichas semillas consistió en recolectar cierta cantidad de estas en sobres de papel filtro (para facilitar su manejo) que se colocaron en un recipiente de boca ancha con agua y jabón común, se lavó el sobre conteniendo las semillas con una solución jabonosa durante 15 minutos. Posteriormente se decantó la solución jabonosa y se enjuagó con agua corriente dos o tres veces (dependiendo de la cantidad de jabón remanente). Ya en el cuarto de cultivo, utilizando la campana de flujo laminar (para asegurar la esterilidad de todos los materiales utilizados) se lavó con una solución de etanol al 70% durante un minuto, se decantó y enjuagó con agua destilada estéril. Posteriormente el sobre se sumergió en una solución de Hipoclorito de sodio® a una determinada concentración por un determinado tiempo (ver tabla 3), el hipoclorito se decantó y se enjuagó el sobre con agua destilada estéril de 4 a 5 ocasiones. Finalmente se procedió a sembrar las semillas en medio de cultivo MS.

Tabla 3. Tratamientos de desinfestación para semillas procedentes del estado de Oaxaca.

Concentración de NaClO® en la solución de lavado	Tiempo de exposición a la 2ª solución de lavado			
	15 minutos	20 minutos	25 minutos	30 minutos
40%	A	K	F	
45%		G	J	I
50%	B	D	H	M
55%		C		
60%	L	E		

Semillas procedentes del Sur del Estado de México

El segundo lote de semillas se obtuvo de una planta de *Datura* spp. colectada en la zona sur del Estado de México (Apaxco). Una vez seco el fruto, se abrió para así poder extraer las semillas que contenía.

El proceso de desinfestación para dichas semillas consistió en recolectar cierta cantidad de estas en sobres de papel filtro (para facilitar su manejo) que se colocaron en un recipiente de boca ancha con agua y jabón común, se lavó el sobre conteniendo las semillas con una solución jabonosa durante 15 minutos. Posteriormente se decantó la solución jabonosa y se enjuagó con agua corriente dos o tres veces (dependiendo de la cantidad de jabón remanente). Ya en el cuarto de cultivo, utilizando la campana de flujo laminar (para asegurar

la esterilidad de todos los materiales utilizados) se lavó con una solución de etanol al 70% durante un minuto, se decantó y enjuagó con agua destilada estéril. Posteriormente el sobre se sumergió en una solución de Hipoclorito de sodio® a una determinada concentración por un determinado tiempo (ver tabla 4), el hipoclorito se decantó y se enjuagó el sobre con agua destilada estéril de 4 a 5 ocasiones. Finalmente se procedió a sembrar las semillas en medio de cultivo MS.

Tabla 4. Tratamientos de desinfestación para semillas procedentes del sur del estado de México (Apaxco).

Concentración de NaClO® en la solución de lavado	Tiempo de exposición a la 2ª solución de lavado			
	15 minutos	20 minutos	25 minutos	30 minutos
40%	A			
45%				
50%	B		G	E
55%		D	F	
60%	H	C		I

Semillas procedentes de Toluca, Estado de México

El tercer lote de semillas se obtuvo de una planta de *Datura* spp. colectada en la ciudad de Toluca Estado de México. Una vez seco el fruto de la planta, se abrió para así poder extraer las semillas que contenía.

El proceso de desinfestación para dichas semillas consistió en recolectar cierta cantidad de estas en sobres de papel filtro (para facilitar su manejo) que se colcaron en un recipiente de boca ancha con agua y jabón común, se lavó el sobre conteniendo las semillas con una solución jabonosa durante 15 minutos. Posteriormente se decantó la solución jabonosa y se enjuagó con agua corriente dos o tres veces (dependiendo de la cantidad de jabón remanente). Ya en el cuarto de cultivo, utilizando la campana de flujo laminar (para asegurar la esterilidad de todos los materiales utilizados) se lavó con una solución de etanol al 70% durante un minuto, se decantó y enjuagó con agua destilada estéril. Posteriormente el sobre se sumergió en una solución de Hipoclorito de sodio® a una determinada concentración por un determinado tiempo (ver tabla 5), el hipoclorito se decantó y se enjuagó el sobre con agua destilada estéril de 4 a 5 ocasiones. Finalmente se procedió a sembrar las semillas en medio de cultivo MS.

Tabla 5. Tratamientos de desinfestación para semillas procedentes de Toluca, Estado de México.

Concentración de NaClO® en la solución de lavado	Tiempo de exposición a la 2ª solución de lavado			
	15 minutos	20 minutos	25 minutos	30 minutos
40%				
45%				
50%	A			D
55%				
60%	C	B		E

ENSAYO DE GERMINACIÓN PARA SEMILLAS DE *Datura spp.*

Semillas procedentes del Estado de Oaxaca

Se probaron dos diferentes medios de cultivo:

- **Medio MS estándar** (formulación estándar, ver anexo 1).
- **Medio MS modificado** (formulación estándar enriquecida con una concentración diez veces más alta de micronutrientes; **10x**, ver anexo 2).

CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS DE *Datura spp.*

Debido a que las semillas fueron sembradas en dos diferentes medios de cultivo y que las plántulas germinadas presentaron en cierta frecuencia características poco comunes en siembras biotecnológicas y con importancia de estudio, se hizo una comparación entre dichas características en ambos medios para determinar cuál de los dos proporciona a las plántulas lo necesario para su germinación y su óptimo crecimiento.

Las características tomadas en cuenta son las siguientes:

- **TAMAÑO DE LA PLÁNTULA.** En ciertas ocasiones las plántulas presentaron un crecimiento tan notable que requería su resiembra inmediata; esto debido a que su tamaño imposibilitaba que se siguieran desarrollando en el espacio sobrante dentro del cultivo (ver figura 37).



○ FIGURA 37. Plántula de *Datura spp.* sembrada en medio MS-Modificado que presentó un crecimiento notable.

- **TAMAÑO DE LA RAÍZ.** En algunas de las plántulas se observó un crecimiento de las raíces mucho más notable que en otras; abarcando por completo el fondo del cultivo (ver figura 38), lo cual les ayuda a tener un mayor soporte dentro de este, una mejor interacción con el medio y en caso de querer aclimatarlas fuera del cultivo, las raíces más grandes aumentan la posibilidad de que las plántulas sobrevivan el proceso.



FIGURA 38. Plántula de *Datura* spp. sembrada en medio de cultivo MS-Modificado que presentó un crecimiento de raíces muy notable.

- PRESENCIA DE CALLO. En ciertas plántulas se presentó un fenómeno poco frecuente dentro de lo que son los cultivos *in vitro* en general; la presencia de un “semicallo” alrededor de los tallos y de las raíces (ver figura 39). Esta característica dio a conocer durante la resiembra de las plántulas un acortamiento en el tiempo de formación de callo.



○ FIGURA 39. Plántula de *Datura* spp. sembrada en medio de Cultivo MS-Modificado que presentó crecimiento de un callo en el tallo.

- PRESENCIA DE PIGMENTACIÓN. Otra característica que presentaron algunas de las plántulas que es poco frecuente dentro de lo que son los cultivos *in Vitro* en general fue la presencia de una pigmentación en tonos magenta en algunos de los tallos (ver figura 40). Esta pigmentación, permitirá que en un futuro sea posible extraer algún tipo de colorante a partir de este género.



FIGURA 40. Plántulas de *Datura* spp. que presentaron pigmentación magenta en los tallos.

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLO DE PLÁNTULAS DE *Datura* spp.

Para el establecimiento de cultivos de callo se utilizaron como fuente de explantes hojas e hipocótilos de las plántulas previamente generadas *in vitro* procedentes del ensayo de germinación. El medio de cultivo utilizado para la inducción de callo fue suplementado con dos diferentes reguladores del crecimiento vegetal (2,4-D y BAP), en diferentes concentraciones y combinaciones (Tabla 6). El medio de cultivo utilizado también fue suplementado con tres diferentes antioxidantes, estos fueron ácido ascórbico y cítrico, así como PVP.

Tabla 6. Variaciones de concentración de los RCV para la formación de callos.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	A		F		H		
0.5		E	C				
1.0	G	D	B				N
1.5				K			
2.0	I		L		J		
2.5						M	
3.0							



FIGURA 41. Medios de cultivo con partes de plántulas de *Datura* spp. resembradas.

CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO DE CALLO DE PLÁNTULAS DE *Datura* spp.

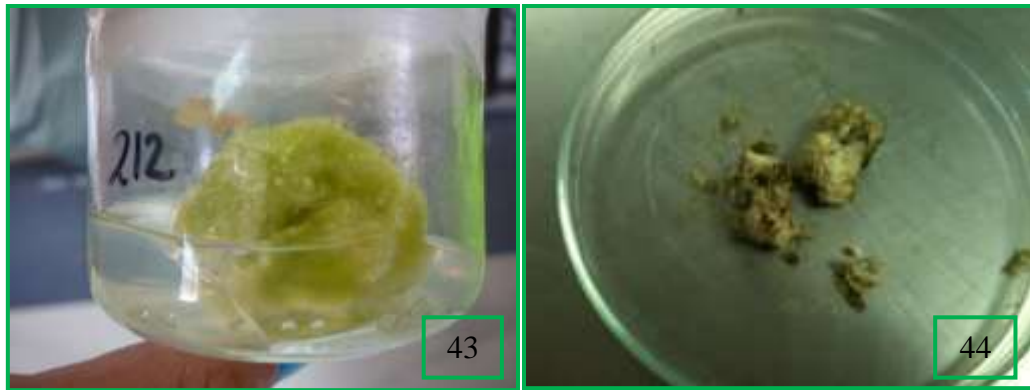
Durante su crecimiento los callos sembrados presentaron ciertas características de notable reconocimientos:

- CANTIDAD DE CALLO. Un crecimiento de notables proporciones (ver figura 42).



FIGURA 42. Callo de *Datura* spp. de gran tamaño.

- PESO DEL CALLO. El peso húmedo del callo (en donde aproximadamente el 97% representa agua) sobrepasaba en muchos de los casos hasta los 15 gramos (ver figuras 43 y 44).



FIGURAS 43 y 44. Callo de *Datura* spp. que por su crecimiento presentó gran cantidad de agua dentro de su masa.

- PRESENCIA DE PIGMENTACIÓN. En algunos de los casos el fenómeno de pigmentación presente en las plántulas continuó hasta la formación de callo (ver figura 45).



FIGURA 45. Callo de *Datura* spp. con presencia de pigmentación magenta.

IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

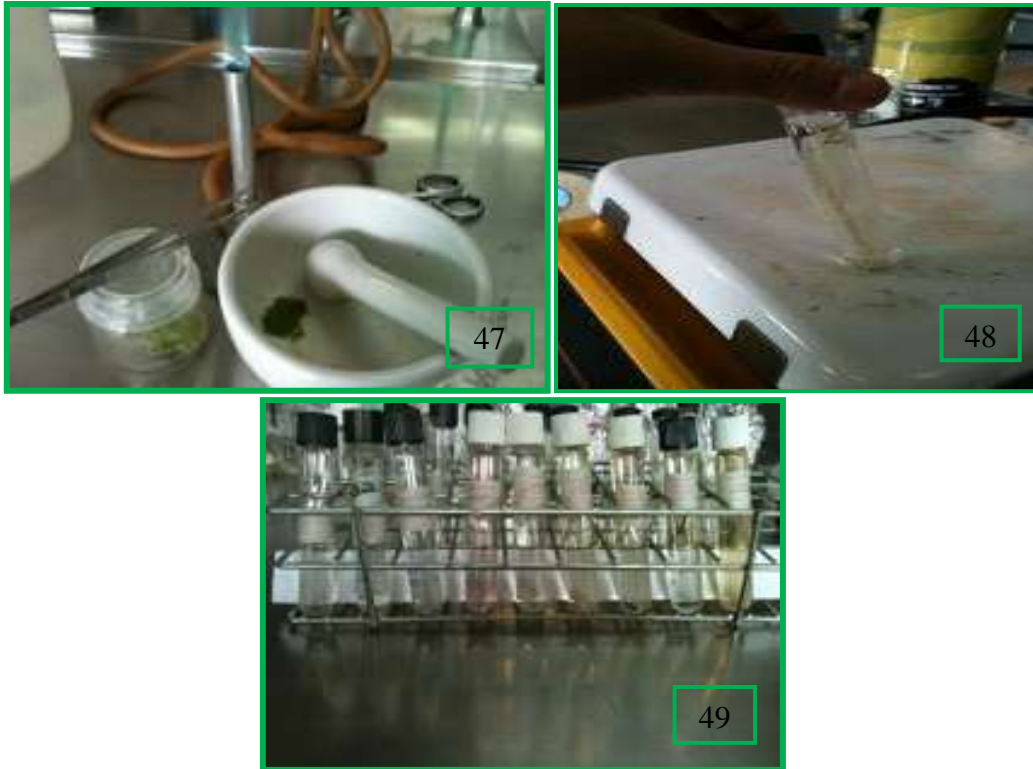
Para la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios de tipo alcaloideo presentes en los cultivos de *Datura spp.* se seleccionaron 9 muestras diferentes (figura 46):

1. Callo de *Datura spp.* con crecimiento excepcional.
2. Callo de *Datura spp.* sembrado en medio MS-Modificado (con micronutrientes 10x).
3. Callo de *Datura spp.* sembrado en medio MS (Micronutrientes en concentración estándar).
4. Callo de *Datura spp.* con pigmentación morada (sembrado en medio con solo 2,4-D como RCV).
5. Callo de *Datura spp.* con una oxidación inicial.
6. Callo de *Datura spp.* con una oxidación moderada.
7. Callo de *Datura spp.* con una completa oxidación.
8. Callo de *Datura spp.* en buen estado almacenado a 4°C.
9. Hoja de *Datura spp.* seca.



FIGURA 46. Imagen de las diversas muestras que fueron seleccionadas.

Las muestras a analizar fueron sometidas a una digestión con HCl al 1%, en un intervalo de temperatura entre 55 y 70°C durante 7 minutos (Figuras 47, 48 y 49).



FIGURAS 48, 49 y 50. Preparación de las diversas muestras para su identificación por medios de pruebas fitoquímicas.

MARCHA FITOQUÍMICA PARA METABOLITOS SECUNDARIOS

PRUEBA DE DRAGENDORFF

Es una prueba específica para la identificación cualitativa de alcaloides. Se adicionan 3 gotas de reactivo de Dregendorff (anexo 12) a un mililitro de las muestra. La presencia de un precipitado café oscuro indica la presencia de alcaloides (ver figura 50).



FIGURA 50. Prueba de Dragendorff positiva.

PRUEBA DE WAGNER

Es una prueba específica para la identificación cualitativa de alcaloides. Se adicionan 3 gotas de reactivo de Wagner (anexo 13) a un mililitro de muestra. La presencia de una precipitado anaranjado indica la presencia de alcaloides (ver figura 51).



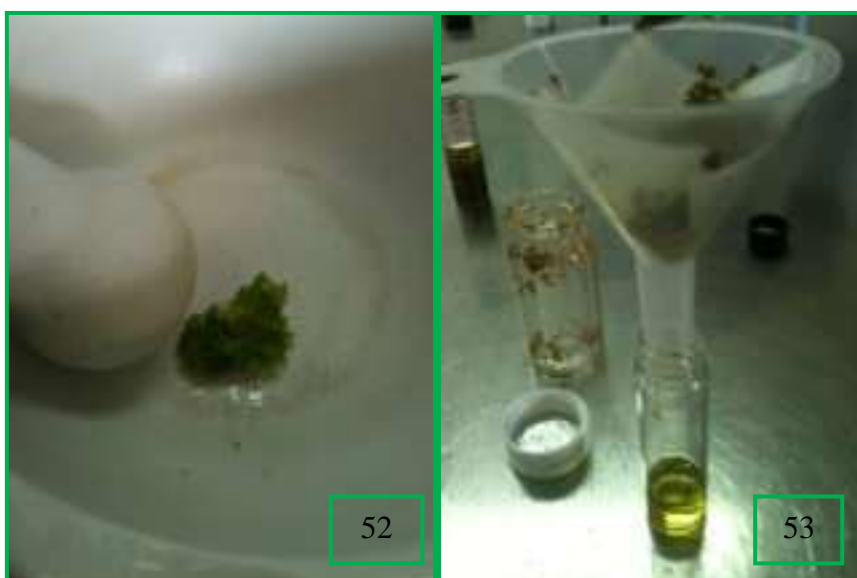
FIGURA 51. Prueba de Wagner positiva (Hemeroteca propia).

PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN PARA ALCALOIDES REALIZADAS

Con el propósito de confirmar los resultados obtenidos con los reactivos de Dragendorff y Wagner, se decidió realizar un análisis de las muestras por cromatografía en capa fina y un análisis IR.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

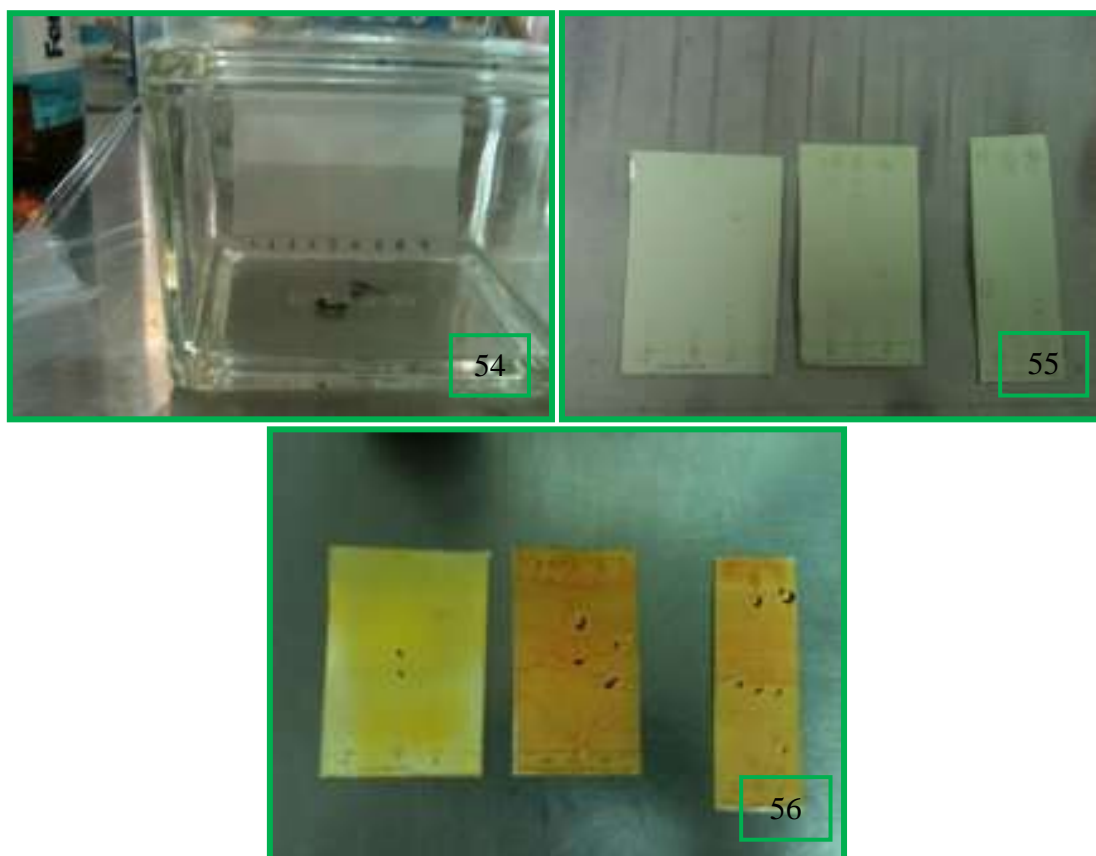
Antes de correr la cromatografía, las muestras se someten a una extracción con etanol o cloroformo, las cuales consisten en pesar un gramo de muestra al cual se le agregan 3 mL de etanol o cloroformo y 5 gotas de HCl al 10%. Las muestras se dejan reposar durante 40 minutos (figuras 52 y 53).



FIGURAS 52 y 53. Imágenes de preparación de los extractos.

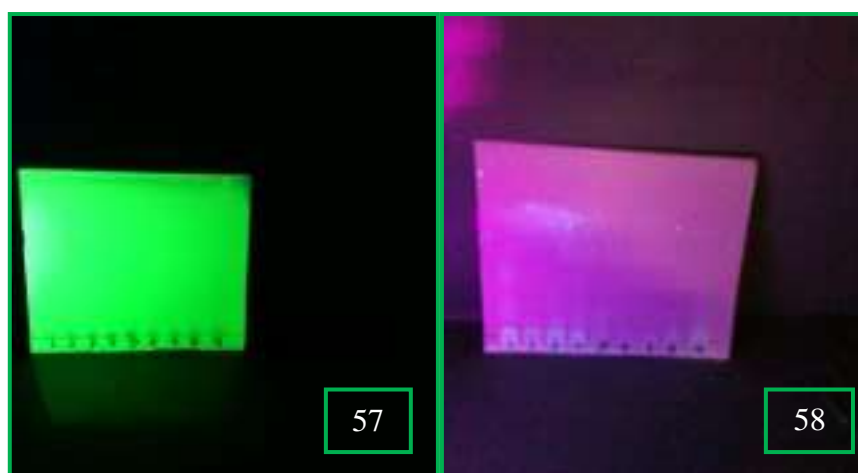
Es importante tomar en cuenta que en promedio el callo húmedo tiene 96.85% de agua.

Los extractos etanólicos y clorofórmicos previamente filtrados se corrieron en placas de sílica gel, utilizando una fase móvil de cloroformo:dietilamina en una proporción de 9:1 y cloroformo:acetona:dietilamina en una proporción de (5:4:1) (figura 54 a la 56).



FIGURAS 54, 55 y 56. Imágenes de las placas de gel sílice que fueron corridas en Cloroformo: acetona: Dietilamina (5:4:1).

Una vez terminada la cromatografía, las placas pueden revelarse y observarse ya sea con una lámpara de luz UV o bien con el reactivo de Dragendorff (figuras 57 a 59).



FIGURAS 57 y 58. Placas reveladas con luz UV a corta y larga longitud de onda respectivamente.



FIGURA 59. Placa revelada con reactivo de Dragendorff.

ESPECTRO IR

Los extractos clorofórmico y etanólico fueron acondicionados (ver figura 60) y se colocaron en una celda KBr para poder ser analizados en el equipo Nicolet Avatar 360 (figuras 61 y 62).



FIGURAS 60, 61 y 62. Preparación de las muestras para someter al espectro IR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN PARA SEMILLAS DE *Datura spp.*

Semillas procedentes del Estado de Oaxaca

Después de realizar los diferentes tratamientos de desinfestación para este lote de semillas, se obtuvieron porcentajes de desinfestación variados (tabla 7) que permitieron ubicar cuales son los más adecuados para estas semillas en específico.

Tabla 7. Porcentajes de contaminación encontrados en los diferentes tratamientos de desinfestación ensayados para las semillas de Oaxaca.

Concentración de NaClO ₂ en la solución de lavado	Tiempo de exposición			
	15 minutos	20 minutos	25 minutos	30 minutos
40%	33.33%	0%	0%	
45%		0%	0%	15.38%
50%	50%	14.29%	0%	0%
55%		35.71%		
60%	0%	5.88%		

Los resultados encontrados indican que una exposición de NaClO de 15 min no es suficiente para eliminar los microorganismos presentes en las semillas, no obstante al probar una concentración del 60% no se presentó contaminación, sin embargo, al ser esta concentración tan alta, disminuyó la germinación y el desarrollo posterior de las plántulas. Por otra parte observamos que un tiempo de exposición por arriba de 20 min y una concentración por arriba del 40% de NaClO son la combinación que arroja los mejores resultados (figura 63). Por todo lo anterior, el tratamiento de desinfestación adecuado para establecer cultivos asépticos a partir de semillas de *Datura* es el comprendido por 50% de NaClO y 30 min de exposición. Cabe resaltar que en varios tratamientos no se presentó contaminación, sin embargo, tampoco hubo germinación y las semillas que lograron germinar presentaron un desarrollo menos notable. Este fenómeno puede obedecer al hecho de que dichas concentraciones de NaClO son suficientes para desinfestar la superficie de las semillas pero a la vez su efecto escarificante no es suficiente y por otro lado una concentración muy alta termina por matar a los microorganismos pero también al embrión presente en las semillas, es decir, disminuyen la viabilidad de las semillas.



FIGURA 63. Cultivo axénico de *Datura* spp. sometido al tratamiento de 40% de NaClO durante 15 min.

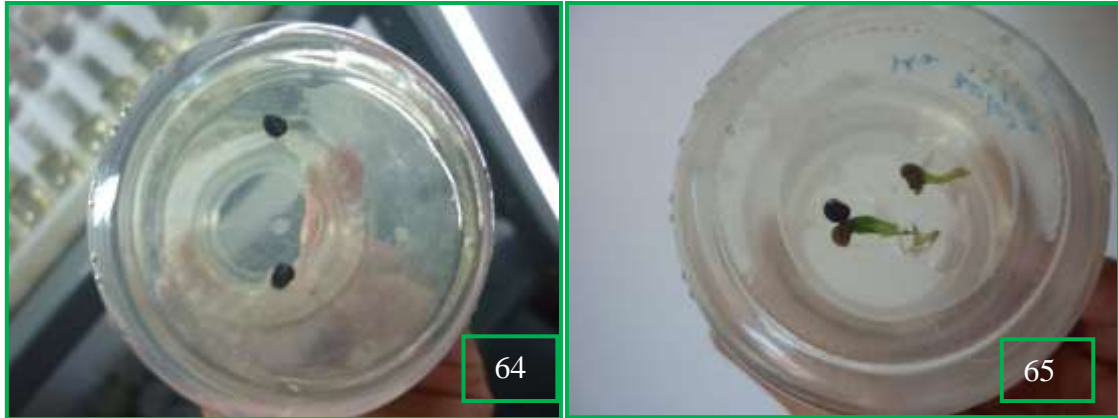
Semillas procedentes del Sur del Estado de México

Después de realizar los diferentes tratamientos de desinfestación para este lote de semillas, se obtuvieron porcentajes de desinfestación variados (tabla 8) que permitieron ubicar cuales son los más adecuados para estas semillas en específico.

Tabla 8. Porcentajes de contaminación encontrados en los diferentes tratamientos de desinfestación ensayados para las semillas del Sur del Estado de México (Apaxco).

Concentración de NaClO® en la solución de lavado	Tiempo de exposición			
	15 minutos	20 minutos	25 minutos	30 minutos
40%	60%			
45%				
50%	93.33%		70%	83.33%
55%		100%	90%	
60%	80%	50%		36.33%

Para el caso de las semillas de Apaxco, hubo la necesidad de probar concentraciones más altas de NaClO, dado que estas presentaron un alto contenido de microorganismos, siendo el tratamiento comprendido por 60% de NaClO durante 30 minutos, el que arrojó los mejores resultados, lográndose obtener solo un 64% de cultivos sin contaminar, además de que el porcentaje de germinación de estas semillas fue muy bajo, el desarrollo de las plántulas fue muy lento (figuras 64 y 65), posiblemente debido a la concentración de NaClO utilizada, por lo que a lo largo de la experimentación se decidió descartar este lote de semillas y utilizar solo las de procedencia oaxaqueña.



FIGURAS 64 Y 65. Imagen de semillas de *Datura spp.* antes y después de germinar.

Semillas procedentes de Toluca, Estado de México

Después de realizar los diferentes tratamientos de desinfestación para este lote de semillas, se obtuvieron porcentajes de desinfestación variados (tabla 9) que permitieron ubicar cuales son los más adecuados para estas semillas en específico.

Tabla 9. Porcentajes de contaminación encontrados en los diferentes tratamientos de desinfestación ensayados para las semillas de Toluca, Estado de México.

Concentración de NaClO ₂ en la solución de lavado	Tiempo de exposición			
	15 minutos	20 minutos	25 minutos	30 minutos
40%				
45%				
50%	80%			9.33%
55%				
60%	90%	75%		14.29%

Los resultados encontrados indican que el tratamiento que consistió de 50% de NaClO₂ a un tiempo de exposición de 30 minutos fue el que presentó el menor porcentaje de contaminación.

Las semillas de esta procedencia presentan una muy alta concentración en contaminantes (figura 66). Sin embargo, el porcentaje de germinación es pobre, de ahí que también se decidió no trabajar con estas semillas y los siguientes experimentos solo utilizar las semillas procedentes del Estado de Oaxaca.



FIGURA 66. Imagen de cultivo para semillas contaminado fúngicamente.

ENSAYO DE GERMINACIÓN PARA SEMILLAS DE *Datura spp.*

Semillas procedentes del Estado de Oaxaca

En la tabla 10 se muestra el porcentaje de germinación de las semillas cultivadas en los diferentes medios de cultivo (figura 67); es importante recordar que los resultados presentados a continuación solo hacen alusión a las semillas de Oaxaca, dado las circunstancias explicadas con anterioridad.

Tabla 10. Porcentajes de germinación de las semillas en los diferentes medios de cultivo.

TIPO DE MEDIO	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN
Medio MS estándar	96.52%
Medio MS modificado	99.37%



FIGURA 67. Imagen comparativa de cultivos mostrando plántulas de *Datura spp.* generadas *in vitro*. Izquierda, medio MS modificado. Derecha, medio MS estándar.

Ambos medios de cultivo presentan excelente porcentaje de germinación; lo que indica la buena viabilidad de las semillas. Sin embargo, el fenotipo de las plántulas obtenidas es considerablemente diferente. En comparación con las plántulas generadas en el medio MS estándar, las plántulas obtenidas en el medio MS modificado, presentan raíces más largas y fuertes, en algunos casos muy engrosadas, los tallos son mucho más anchos y largos y las hojas más grandes, más numerosas y frondosas. El fenotipo presentado por las plántulas obtenidas en el medio MS es mucho mejor para la siguiente parte del proyecto, ya que nos proporciona una cantidad mucho más grande de explantes, los cuales se utilizarán para tratar de establecer cultivos de callo (tabla 11).

CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS DE *Datura* spp.

Tabla 11. Frecuencia de las características distintivas entre los dos fenotipos encontrados en los cultivos de *Datura* spp. como efecto del medio de cultivo utilizado.

Característica	Medio MS estándar	Medio MS modificado
Tamaño de la plántula (>7cm)	++  68	+++  69
Tamaño de la raíz (>7cm)	+  70	+++  71
Presencia de semicallo	+/-  72	+  73
Presencia de pigmentación	+/-  74	++  75

(+++)
Representa el índice más alto de aparición de la característica citada.

ENSAYO DE ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLO DE PLÁNTULAS DE *Datura* spp.

Una vez obtenidas las plántulas *in vitro*, se procedió a tomar fragmentos de tallo, hojas y raíz como fuentes de explantes, esto con la finalidad de establecer cultivos de callo. De la misma forma en que se probaron dos diferentes medios de cultivo en los ensayos de germinación, también los diferentes explantes tomados de las plántulas se sembraron simultáneamente en medio MS estándar y modificado. Los resultados obtenidos se presentan de la tabla 12 a la 17; en donde (+++) indica una cantidad abundante de callo y (-) escasez del mismo:

Tabla 12. Porcentajes de formación de callo a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS estándar.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	0%		78.2%		76.7%		
0.5		69.2%	89.0% ++				
1.0	70.6%	79.7%	89.2% ++				65.9%
1.5				88.1% +++			
2.0	70.1%		76.2%		88.8% +++		
2.5						80.2% +++	
3.0							

Tabla 13. Porcentajes de formación de callo a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS estándar.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	0%		67.9%		72.1%		
0.5		72.0%	80.1% ++				
1.0	84.1% +++	85.2% ++	93.2% +++				52.3%
1.5				92.9% +++			
2.0	82.9% +++		85.1% +++		92.8% +++		
2.5						87.2% +++	
3.0							

Tabla 14. Porcentajes de formación de callo a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS estándar

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	1.6%		69.2%		76.5%		
0.5		70.7%	78.7%				
1.0	86.2% ++	83.2% +	90.2% +				62.8%
1.5				90.1% ++			
2.0	83.1% ++		84.2% ++		94.2% ++		
2.5						82.9% ++	
3.0							

Tabla 15. Porcentajes de formación de callo a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS modificado

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	0.9%		92.1% ++		88.7% ++		
0.5		83.6% ++	93.2% ++				
1.0	84.1% +++	95.6% +++	95.5% +++				72.5%
1.5				88.0% +++			
2.0	86.4% +++		76.2%		83.6% +++		
2.5						80.2% +++	
3.0							

Tabla 16. Porcentajes de formación de callo a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS modificado.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	4.0%		89.3% ++		86.5% +++		
0.5		86.7% +++	79.2%				
1.0	90.3% +++	93.7% +++	97.1% +++				70.9%
1.5				83.7% +++			
2.0	90.1% +++		82.3% +++		89.0% +++		
2.5						86.4% +++	
3.0							

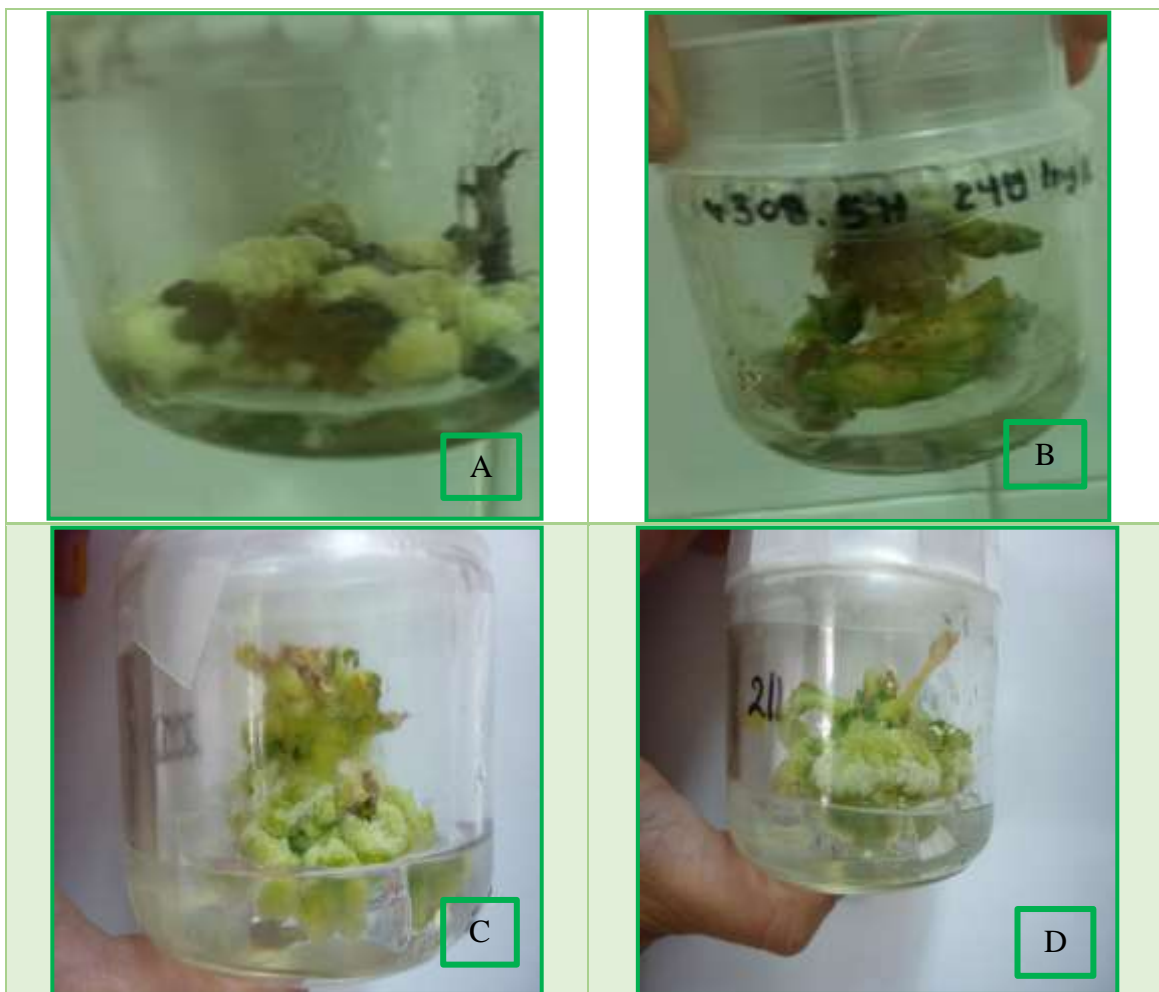
Tabla 17. Porcentajes de formación de callo a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS modificado.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	5.3%		90.2% +		87.1% +		
0.5		88.3% +	78.6%				
1.0	90.7% ++	72.5%	90.6% ++				72.5%
1.5				88.1% ++			
2.0	92.7% ++		83.7% ++		86.2% ++		
2.5						89.3% ++	
3.0							

Como se observa en las tablas de resultados, de manera general la producción de callo generada en los cultivos con medio de cultivo MS estándar fue considerablemente menor a la registrada por los cultivos donde se utilizó el medio MS modificado. Es importante señalar que la generación de callo en los diferentes explantes es promovida por la presencia de los diferentes reguladores del crecimiento vegetal utilizados, siendo en todos los casos la combinación de 1.0 mg/L de 2,4-D y 1.0 mg/L de BAP, la que presentó el mayor porcentaje de explantes con formación de callo. Sin embargo, el efecto sumatorio de una concentración mayor de micronutrientes utilizada en el medio MS modificado, derivó en una producción (gramos de callo por tratamiento) mucho mayor de callo.

Para el caso específico de la producción de callo en los tratamientos con medio MS estándar, se encontró que la aparición de callo fue mayor al 90% en el total de explantes sembrados (tablas 12 a la 17). Las hojas fueron los explantes que produjeron la mayor cantidad de callo (18 gramos en materia húmeda), seguido de las tallos (13 gramos en materia húmeda) y finalmente las raíces (8 gramos en materia húmeda). Las características del callo obtenido en este caso no fueron muy favorables, ya que el callo presentó poca hidratación y tendía a ser compacto, además de presentar una oxidación muy pronta (figura 76).

Por otra parte la producción de callo registrada por los tratamientos sembrados en medio MS modificado fue mayor al 70% (tablas 12 a la 17). El explante con la mayor producción de callo fueron las hojas (21 gramos en materia húmeda), seguido de el tallo (15 gramos en materia húmeda) y finalmente las raíces (10 gramos en materia húmeda). El callo generado en este caso, además de ser considerablemente más abundante, tenía una consistencia friable e hidratada y sus tonalidades van del verde claro al verde fuerte, blanco y transparente (figura 77), siendo estas características deseables en un callo que se desee más adelante utilizar para la implementación de cultivos de células en suspensión.





- A. Callo formado a partir de tallo en medio de cultivo MS estándar.
- B. Callo formado a partir de hoja en medio de cultivo MS estándar.
- C. Callo formado a partir de tallo en medio de cultivo MS-Modificado.
- D. Callo formado a partir de tallo en medio de cultivo MS-Modificado.
- E. Callo formado a partir de hoja en medio de cultivo MS-Modificado.
- F. Callo formado a partir de hoja en medio de cultivo MS-Modificado.

Figura 76. Imágenes representativas de los cultivos sembrados de las diferentes partes de las plántulas en los dos medios de cultivos utilizados.

La presencia de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo demostraron alentar el tiempo de germinación de las semillas, pero estas presentan crecimientos muy particulares. Como lo es el ensanchamiento de los tallos en las plántulas. Inclusive algunas de las plántulas ya germinadas que no poseen reguladores de crecimiento presentan callogénesis sin necesidad de resiembra (figuras 77 y 78).



FIGURAS 77 y 78. Imágenes de cultivos sembrados en Medio MS-Modificado 1mg/L BAP + 1g/L 2,4-D.

CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO DE CALLO DE PLÁNTULAS DE *Datura spp.*

De los diversos tratamientos a los cuales fueron sometidos los explantes, para analizar las características se tomaron en cuenta solo aquellos que presentaron un porcentaje de formación de callo superior al 80%.

Se tomaron 3 muestras aleatorias de cada lote para realizar este análisis (n=3).

CANTIDAD DE CALLO

De las tablas 18 a la 23 se muestra la cantidad de callo obtenido a partir de las diferentes partes de las plántulas sembradas, así como la selección del medio de cultivo; en donde (+++) indica una cantidad abundante de callo y (-) escasez del mismo:

Tabla 18. Cantidad de callo formado a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS estándar.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0							
0.5			++				
1.0			++				
1.5				+++			
2.0					+++		
2.5						+++	

Tabla 19. Cantidad de callo formado a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS estándar.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0							
0.5			++				
1.0	+++	++	+++				
1.5				+++			
2.0	+++		+++		+++		
2.5						+++	

Tabla 20. Cantidad de callo formado a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS estándar.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0							
0.5							
1.0	++	+	+				
1.5				++			
2.0	++		++		++		
2.5						++	

Tabla 21. Cantidad de callo formado a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS modificado.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0			++		++		
0.5		++	++				
1.0	+++	+++	+++				
1.5				+++			
2.0	+++				+++		
2.5						+++	

Tabla 22. Cantidad de callo formado a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS modificado.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0			++		+++		
0.5		+++					
1.0	+++	+++	+++				
1.5				+++			
2.0	+++		+++		+++		
2.5						+++	

Tabla 23. Cantidad de callo formado a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS modificado.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0			+		+		
0.5		+					
1.0	++		++				
1.5				++			
2.0	++		++		++		
2.5						++	

PESO DEL CALLO

De las tablas 24 a la 29 se muestra el peso de los callos obtenidos a partir de las diferentes partes de las plántulas sembradas, así como la selección del medio de cultivo; en donde (+++) representa un peso mayor a 15 gramos, (++) representa un peso mayor a 10 gramos, (+) un peso menor a 10 gramos y (-) un desarrollo nulo:

Tabla 24. Análisis del peso de los callos formados a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS estándar

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0							
0.5			++				
1.0			++				
1.5				++			
2.0					++		
2.5						+	

Tabla 25. Análisis del peso de los callos formados a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS estándar.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0							
0.5			++				
1.0	++	+++	+++				
1.5				+++			
2.0	++		+++		+++		
2.5						+++	

Tabla 26. Análisis del peso de los callos formados a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS estándar.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0							
0.5							
1.0	+	+	++				
1.5				++			
2.0	+		+		++		
2.5						+	

Tabla 27. Análisis del peso de los callos formados a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS modificado.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0			+++		+++		
0.5		++	+++				
1.0	+++	+++	+++				
1.5				+++			
2.0	+++				++		
2.5						++	

Tabla 28. Análisis del peso de los callos formados a partir de hoja de plántula en medio de cultivo MS modificado.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0			+++		+++		
0.5		+++					
1.0	+++	+++	+++				
1.5				++			
2.0	+++		++		+++		
2.5						+++	

Tabla 29. Análisis del peso de los callos formados a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS modificado.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0			++		+		
0.5		+					
1.0	+		++				
1.5				+			
2.0	++		+		+		
2.5						+	

PRESENCIA DE PIGMENTACIÓN

De las tablas 30 a la 33 se muestra la frecuencia de la presencia de pigmentación magenta/morada en los callos formados a partir de tallo y raíz de plántula en medio de cultivo MS estándar; en donde (+++) representa una presencia notable del pigmento y (-) una presencia nula de este:

Tabla 30. Análisis de la presencia de pigmentación magenta/morada en los callos formados a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS estándar.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0			-				
0.5			-				
1.0			+/-				
1.5				+			
2.0					+/-		
2.5						+	

Tabla 31. Análisis de la presencia de pigmentación magenta/morada en los callos formados a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS estándar.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0							
0.5							
1.0	-	-	-				
1.5				-			
2.0	-		-		+/-		
2.5						+/-	

Tabla 32. Análisis de la presencia de pigmentación magenta/morada en los callos formados a partir de tallo de plántula en medio de cultivo MS modificado.

Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0			+/-		+		
0.5		-	+/-				
1.0	-	-	+/-				
1.5				+			
2.0	-				++		
2.5						+	

Tabla 33. Análisis de la presencia de pigmentación magenta/morada en los callos formados a partir de raíz de plántula en medio de cultivo MS modificado.

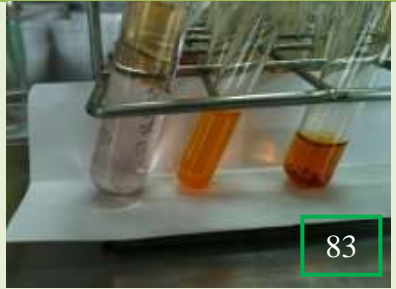
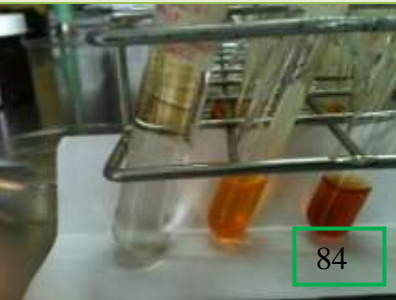




Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0			+		+		
0.5		-					
1.0	-		-				
1.5				-			
2.0	-		-		+/-		
2.5						+/-	



FIGURA 79. Imagen de cultivo de *Datura* spp. Con presencia de calogénesis.

IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

MUESTRA	RESULTADO DE LA PRUEBA DE DRAGENDORFF	RESULTADO DE LA PRUEBA DE WAGNER
1. Callo de <i>Datura</i> spp. con crecimiento excepcional	+++	++
2. Callo de <i>Datura</i> spp. sembrado en medio MS-Modificado (con micronutrientes al 200%).	++	++
3. Callo de <i>Datura</i> spp. sembrado en medio MS (Micronutrientes en concentración normal).	+	+

<p>4. Callo de <i>Datura</i> spp. con pigmentación morada (sembrado en medio con solo 2,4-D como regulador de crecimiento).</p>		+/-	+/-
<p>5. Callo de <i>Datura</i> spp. con una oxidación inicial.</p>		-	-
<p>6. Callo de <i>Datura</i> spp. con una oxidación moderada.</p>		-	-
<p>7. Callo de <i>Datura</i> spp. con una completa oxidación.</p>		-	-
<p>8. Callo de <i>Datura</i> spp. en buen estado almacenado a 4°C.</p>		++	+++
<p>9. Hoja de <i>Datura</i> spp. seca.</p>		+++	+++

PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN PARA ALCALIDES REALIZADAS

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el diluyente (R_f) salieron positivss en los corrimientos con Cloroformo (ver figura 89) (Dominguez X. A. 1973): acetona: Dietilamina (5:4:1). Para atropina $R_f = 37$ (38, reportado en la literatura) y para Escopolamina $R_f = 58$ (56 reportado en la literatura).



FIGURA 89. Manchas reveladas de la placa corrida con Cloroformo: acetona: Dietilamina (5:4:1).

ESPECTRO INFRA ROJO (IR)

EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Datura spp.*

Comparando los picos del espectro obtenido con los de la literatura (Moffat, 1986) podemos ver que:

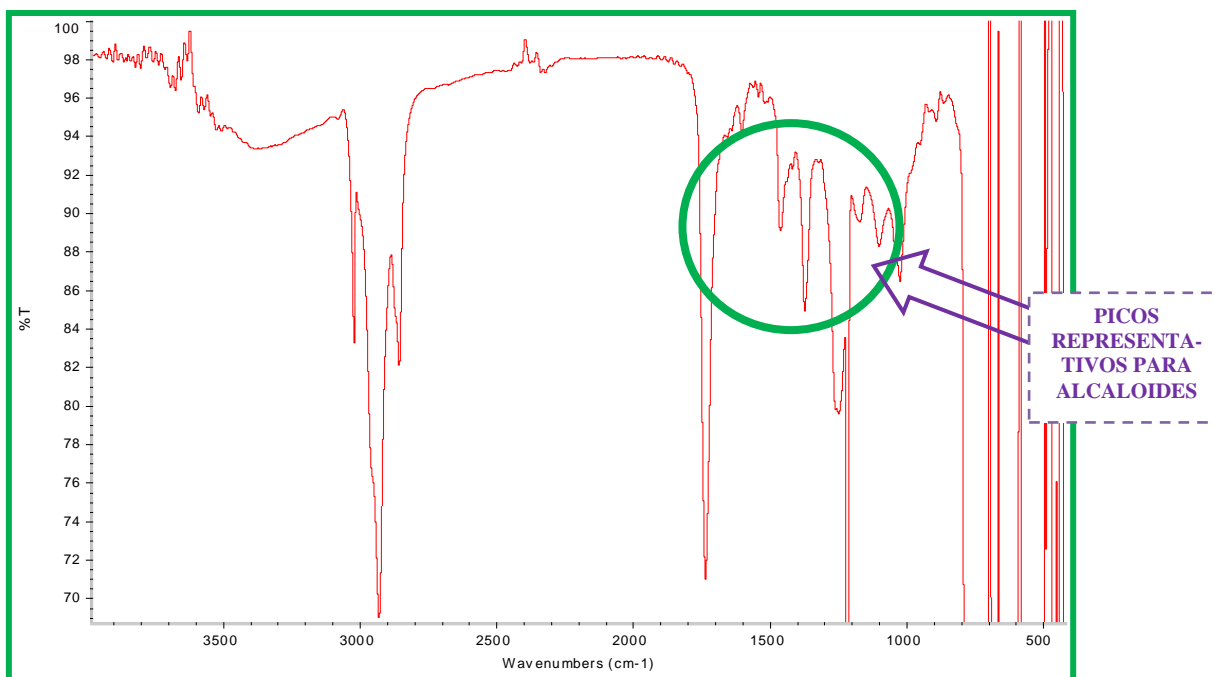


FIGURA 90. Espectro IR de extracto clorofórmico de *Datura* spp.

En la tabla 34 se pueden comparar los picos obtenidos en el análisis por el espectro IR relacionados con los que se presentan en la literatura para la identificación de la escopolamina (ver figura 90):

Tabla 34. Picos obtenidos relacionados con presencia de escopolamina.

Reportados en la literatura	Posición obtenida a partir del Espectro	Intensidad que presenta en el espectro
705	703.76	-71.508
736	733.11	-275.103
750	755.40	-71.562
1160	1218.40	-20.602
1730	1735.56	70.934

En la tabla 35 se pueden comparar los picos obtenidos en el análisis por el espectro IR relacionados con los que se presentan en la literatura para la identificación de atropina (ver figura 90):

Tabla 35. Picos obtenidos relacionados con presencia de atropina.

Reportados en la literatura	Posición obtenida a partir del Espectro	Intensidad que presenta en el espectro
1204	1218.40	-20.602
1720	1735.56	70.934

EXTRACTO ETANÓLICO DE *Datura* spp.

Comparando los picos del espectro obtenido con los de la literatura (Moffat, 1986) podemos ver que:

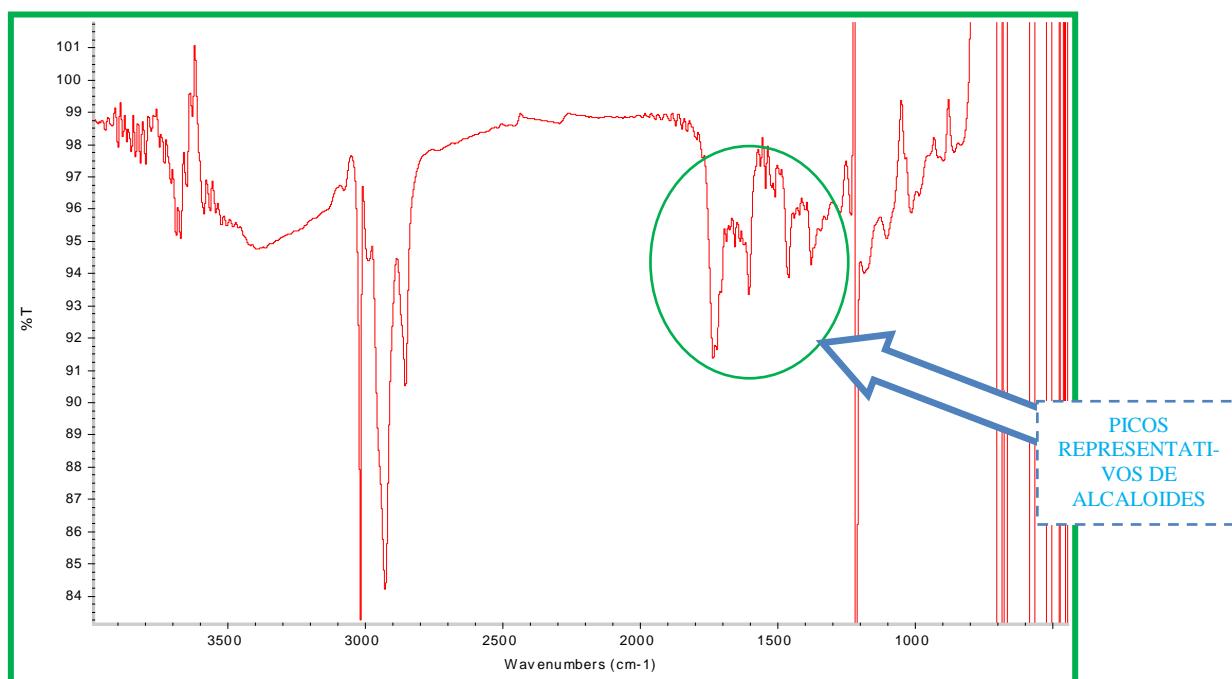


FIGURA 91. Espectro IR de extracto etanólico de *Datura* spp.

En la tabla 36 se pueden comparar los picos obtenidos en el análisis por el espectro IR relacionados con los que se presentan en la literatura para la identificación de la escopolamina (ver figura 91):

Tabla 36. Picos obtenidos relacionados con presencia de escopolamina.

Reportados en la literatura	Posición obtenida a partir del Espectro	Intensidad que presenta en el espectro
705	711.58	109.682
736	738.13	173.679
750	758.90	104.311
1160	1212.60	60.354
1730	1734.01	91.252

En la tabla 37 se pueden comparar los picos obtenidos en el análisis por el espectro IR relacionados con los que se presentan en la literatura para la identificación de atropina (ver figura 91):

Tabla 37. Picos obtenidos relacionados con presencia de atropina.

Reportados en la literatura	Posición obtenida a partir del Espectro	Intensidad que presenta en el espectro
1204	1212.60	60.354
1720	1734.01	91.252

Con los resultados obtenidos de esta prueba podemos notar que lo que se encuentra encerrado en los círculos dentro de las imágenes de los espectros corresponden a los nitrógenos característicos de los alcaloides.

Ya que las muestras son de material orgánico y los solventes y los equipos son diferentes, los resultados presentan ciertas variaciones, pero los picos identificados demuestran la presencia de los alcaloides.

CONCLUSIONES

- Se establecieron cultivos asépticos de *Datura* spp, siendo el tratamiento de desinfección que arrojó los mejores resultados el compuesto de 50% de NaClO y 30 min de exposición.
- De los diferentes tratamientos implementados, el compuesto por 1.0 mg/L de BAP y 1.0 mg/L de 2,4-D, fue el que generó la mayor producción de callo.
- La utilización de una concentración mayor a lo habitual de micronutrientes en los medios de cultivo, coadyuvo de manera importante en el establecimiento y generación de cultivos de callo.
- De los diferentes explantes probados, las hojas resultaron ser el explante que produjo la mayor cantidad de callo. Observándose en este características ideales para su utilización posterior, ya sea para establecer cultivos de células en suspensión o realizar experimentos de morfogénesis.
- Se lograron establecer cultivos de callo o líneas celulares productoras de alcaloides. Por lo que se puede afirmar que los cultivos *in vitro* generados retienen su capacidad natural de biosintetizar alcaloides.
- Los alcaloides obtenidos pueden ser fácilmente identificados por pruebas fitoquímicas, así como pruebas más exactas como lo son las analíticas.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Se recomienda que posteriormente:

- Se prueben diferentes reguladores del crecimiento, así como una serie de variaciones entre los nuevos y los ya analizados, para poder comparar los resultados de crecimiento.
- Se realicen cultivos de elicitación para fomentar una mayor y casi exclusiva producción de alcaloides.
- Se realicen pruebas que permitan cuantificar los alcaloides producidos.
- A parte de las pruebas básicas fitoquímicas que se realizaron para la identificación de alcaloides se lleven a cabo algunas que sean más exactas para alcaloides de tipo tropánico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitchison P. A., Macleod A. J., Yeoman M. M. (1977). Growth patterns in tissue (callus) cultures. En: Street H. E. (Ed.) Plant tissue and cell culture. Blackwell Sci. Publ., Oxford., England. pp.: 267-306.
- Albornoz A. (1980). Productos Naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas. Publicación de la Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Alcaloides del núcleo tropano. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile.
http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmac_euticas/apbot-farm2c/montesm02/13.html. 08/03/2014.
- Almaraz-Abarca N., Ávila-Reyes J., Herrera-Corral J., Naranajo-Jiménez N., González-Valdéz L. y González-Laredo R. (1998). The feeding deterrent affect of a flavonol and a flavonone on the mexican vean beetle (*Epilachna varivestis* Mulsant). UBAMARI. pp.: 44: 33-42.
- Almaraz-Abarca N., Ávila-Reyes J. Delgado-Alvarado E., Naranajo-Jiménez N., Herrera-Corral J. (2007) El Metabolismo Secundario de las Plantas, un nuevo Concepto. Plant Physiology. pp.: 125: 58-60.
- Altman A. (2002) From plant tissue culture to Biothecnology: Schientific Revolutions, Abiotic stress tolerance and forestry. *In vitro* Celular and Developmental Biology. pp.: 39:75-84.
- Antón A. y Lizaso J. (2001) Organismos modificados genéticamente. http://www.fundisa.org/articulos/esp_organismos_modificados_gen.htm. 26/01/2014.
- Arango G. J. (2008) Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia. Pp.:84.
- Arellano Parra MA. (1983). Accidentes por Ingestión de Toxinas Vegetales. Red Toxicológica Nacional. Caracas. Depósito Legal lf. pp.: 3383-3394.
- Ávalos G. A. y Pérez-Urria C. E. (2009) Metabolismo secundario de las plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145. Universidad Complutense. Madrid, España.
- Barceló P. y Cabrera A. (2001) La mejora genética de trigo. Investigación y Ciencia. pp.: 292:75-83.
- Beal W. J. (2008) Angel's trumpets. *Datura inoxia*. Botanical Garden.
- Belton Patrick GD. (1979) *Datura* intoxication in West Cornwall. British Medical Journal (6163) pp.: 585-586.
- Benítez de Rojas C. (1974). Géneros Solanaceae de Venezuela. Rev. Fac. Agro., Maracay. pp.: 7: 81 - 84.
- Bhojwani S. S., Razdan M. K. (1983). Plant tissue culture: Theory and practice. En: Development in Crop Science V. 5. Elsevier Sci., Publ., Co. New York, U.S.A. pp.: 1-10.
- Blohm H. (1962). Poison Plants of Venezuela. Wissenschaftliche Venlagsyesellschaft Stattfort. Germany.

- Bhom H. (1982). The inability of plant cell cultures to produce secondary substances. Plant Tissue Culture. Proc., 5th. Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. pp.: 325- 328.
- Bioxamara (2001) Desarrollo y Aplicaciones de los avances en Biotecnología <http://www.bioxamara.tuportal.com/apuntes.htm>. 26/01/14.
- Bohm B, A. (1994). The minor flavonoids. In the HARBORNE J. (Edotors). The flavonoids. Advances in Research since 1986. Londres. Champman and Hall.
- Bravo-Díaz, L. (2003) Farmacognosia. Editorial Elsevier España S.A. Madrid, España.
- Bruneton, J (1987) Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie. Editorial Technique et Documentation (Lavoisier).- Idem (1993) Pharmacognosie - Phytochimie - Plantes Medicinales. Editorial Technique et Documentation (Lavoisier). Segunda edición.
- Bruneton, J. (2000). Plantas Tóxicas. Acribia. Zaragoza.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Segunda Edición. Acribia. Zaragoza.
- Buchanan, B.B.; Gruissen, W. y Jones, R. (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist. Rockville, Maryland.
- Bu'Lock J. D. y Kristiansen A. (1991) Biotecnología Básica. Editorial Acribia. España.
- Bush L., Wilkinson H., Schardl CH. (1997). Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. Plant Physiology. pp.: 114: 1-7.
- Calva C. G., Pérez V. J. (2005) Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria. UNAM. México. Vol. 6. Número 11. http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf
- Calva C. G., Ríos L. E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp.: 267-301.
- Carpita N., McCann M. (2000). The cell wall. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists. pp.: 52-108.
- Castañón N. G. (2001) La Biotecnología y el Mejoramiento Vegetal. División Académica de Ciencia Biológicas UJAT. Kuxulkab' Revista de Divulgación. Vol. VII Número 14
- Chawla, H. S. (2004) Introduction to plant Biotechnology, USA. Marcel Dekker, Inc. pp.: 14-22; 27-38; 57-33.
- Creus J. A. (2013). El perquè d'alguns comportaments de les plantes. Fisiología Vegetal. Universidad autónoma de Barcelona. España.
- Crozier A., Kamiya Y., Bishop G., Yokota T., (2000). Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists. pp.: 850-929.
- Cseke, L.J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.B.; Warber, S.; Duke, J.A. Y Brielman, H.L. (2006). Natural products from Plants. Second Edition. CRC press. Boca Raton, USA.

- Cutler, S.J. y Cutler, H.G. (1999). *Biologically Active Natural Products: pharmaceuticals*. CRC Press. Boca Raton, USA.
- *Datura innoxia* (2014) <http://www.lycaeum.org/~sputnik/Plants/Datura/innoxia.html>. 26/03/2014.
- Dewick P. M. (1993). Isoflavonoids. In Harbone Editorial. *The Flavonoids; Advances in Research since 1986*. Londres Chapman and Hall.
- Dewick, P.M. (2002) *Medicinal Natural Products -A Biosynthetic Approach-*. Editorial John Wiley & Sons Ltd. Segunda Edición. Reino Unido.
- Doerner P. (2000). Cell division regulation. En: Buchanan B., Grissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists. pp.: 528-567.
- Dominguez X. A. (1973) *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa. México. pp.: 215-228.
- Drago-Serrano, M. E. (2007) Flavonoides Recombinantes de Relevancia Farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. pp.: 004, 42-47.
- Dreishabach R, Robertson W. (1989). *Manual de Toxicología*. 6ta Edición. El Manual Moderno. México D.F.
- Echeverri F., Cardona G., Torres F., Pelaez C., Quiñones W. y Rentería E. (1991). Ermanin: an insect deterrent flavonoid from *Pasiflora foetida* resin. *Phytochemistry*. pp.: 30: 153-155.
- Ellenhorn M, Barceloux DG. (1988). *Medical Toxicology*. Elsevier Science. New York.
- El Mansouri I. y Quesada M. (2001) Una visión general sobre la Biotecnología de las plantas. <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/Bioplan.html>. 26/01/2014.
- Embodem W (1975). *Narcotic Plants*. MacMillan. New York.
- Enriquez-García C. E. (2012) *Fitoquímica: Manual de Prácticas*. UAEMéx. Facultad de Química. México. pp.: 28-30.
- Estramonio. <http://infodrogas.org/inf-drogas/estramonio>. 26/03/2014.
- Evans R. (1979). *Plants of the Gods*. Library of Congress. Washington, D.C.
- Evans R, Hofmann A. (1973). *The Botany and Chemistry of Hallucinogens*. Charles Thomas Publisher. Cambridge. U.S.A.
- Evans, W.C. (2000) *Trease and Evans -Pharmacognosy*. Editorial Saunders. Décimo quinta edición. Edinburgo.
- Fábrega E. (1988). *El Mundo de las Drogas*. Editorial Venezuela. Mérida. Venezuela.
- Facultad de Ciencias. Universidad de Granada (2004) <http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/secundario.htm>. 08/03/2014.
- Ferl, R., Paul A. L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Grissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists. pp.: 312-357.
- Ferrer, L.M., Zaragoza, C. et al. (1992): Intoxicación por Estramonio.
- Fowler M. W. (1982). The large scale cultivation of plant cells. *Progr. Ind. Microb.* pp.: 16: 207-229.

- Fowler M. W. (1987). Products from plant cells. En: Bu'lock J., Kristiansen B. (Eds.) Basic Biotechnology. Academic Press, M., London, England. pp.: 525-544.
- Gaire. B. P. (2008) Monographs on *Datura stramonium* L. The School of Pharmaceutical and biomedical Sciences. Pokhara university. Nepal.
- García Barriga H. (1992). Flora Medicinal de Colombia. 2da Edición. Tercer Mundo. Bogotá.
- García M. (1999) Cultivos de Tejidos en la obtención de metabolitos secundarios. Dintel. UACH. pp.: 8:17-23.
- Gardner C. (1984) Información Genética derivada utilizando el modelo Gardner-Eberhart para medias generacionales. Rev. Fitotec. México. pp.: 6:114-141.
- Gasser CH. S. y Fraley R. T. (1992) Cultivos transgénicos. Investigación y ciencia. pp.: 191:64-70.
- Gilleta F. (2000) Reflexiones sobre transgénicos vegetales. Seminario Internacional. Buenos Aires, Argentina. <http://www.eniacsoluciones.com.ar/terragni/doctrina/transgenicos.htm>. 21/01/2014.
- Goldfrank L. (1990). Toxicology Emergencies. 4th Ed. Appleton & Lange. Norwalk. Connecticut. U.S.A.
- Gowdy J. (1972). *Stramonium* intoxication: Review of symptomatology in two hundred twelve cases. J.A.M.A. pp.: 221: 585-587.
- Gutiérrez A., López G. Lizarralde E., Sanz J. C, Corredera C., Martínez M. (1999) Intoxicación por *Datura stramonium*. Servicios de Urgencias y Medicina Interna. Hospital de Basurto. Bilbao. pp.: 11:240-242.
- Gutiérrez Correa M. (2001) Biotecnología Agroindustrial. <http://www.agroindustrias.org/okl.bioagriconsiste.html> 20/01/2014.
- Hadacek F. (2002) Secondary metabolites as plant Science. pp.: 21: 273-322.
- Hall R, Porkinm, McHenry L. (1977). Angel's trumpet: Psychosis, a central nervous anticholinergic syndrome. Am. J. Psychiatry. pp.: 134: 312-314.
- Harbone, J.B. (1998). Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall. Londres.
- Holden P. R., Aitken M., Lindsey K., Yeoman M. M. (1988). Variability and stability of cell cultures of *Capsicum frutescens*. En: Morris P., Scragg A., Stafford A., Yeoman M. M. (Eds.) Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge Un. Press., England. pp.: 237-243.
- Hoyos J. (1979). Los Árboles de Caracas. 2da Edición. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Caracas.
- Huang, M.N., T.W. Abraham, S.H. Kim and E. Leete (1996) 1 Methylpyrrolidina-2-acetic acid is not a precursor of tropano alkaloids. Phytochemistry. pp.: 767-773.
- Hurtado M. y Merino M. E. (1994) Cultivo de tejidos vegetales. Tercera reimpression. Editorial Trillas. México.
- lañez E. (2001) Biotecnología, ética y sociedad. Instituto d Biotecnología. Universidad de Granada. España.
- Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM (2000) Las plantas transgénicas y la agricultura mundial. <http://www.ibt.unam.mx> 02/01/2014.

- Jimson weed poisoning-Texas, (1995) New York and California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. pp.: 44:41-4.
- Judd, W.S.; Campell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. y Donogue, M.J. (2002). Plant Systematics: a phylogenetic approach. Second Edition. Sinauer. USA.
- Khanbabaee, K. & Van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. Natural Product Reports Articles 18 (6). pp.: 641 - 649.
- Kölher's medicinal plants (1887) *Datura Stramonium*. Libros de Botánica.
- Krikorian A. D., Berquam D. L. (1969). Plant cell and tissue culture: The role of Haberlandt. Bot. Rev. pp.: 35(1):59-88.
- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega. Barcelona.
- Kutchan T. M. (1995) alkaloid biosynthesis: The basis for metabolic engineering of medicinal plants. The Plant cell. pp.: 7: 1059-1070.
- Kutchan T. M. (2001) Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. Plant Physiology. pp.: 125:58-60.
- Langridge W. (2000) Vacunas comestibles. Investigación y ciencia. pp.: 290:57-63.
- Lee B. (1990). Anticholinergics. In: Clinical management of poisoning and drug overdose. Saunders. Philadelphia.
- Lindsey K., Yeoman M. M. (1983). The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. J. Exp. Bot. pp.: 34(145):1055-1065.
- Linko M., Haikara A., Ritala A. y Penttila M. (1998) Recent advances in the malting and brewing industry. Biotechnology. pp.: 65:85-98.
- López M. (2012) Manual de plantas medicinales para Guinea Ecuatorial. Fundación de religiosos para la salud. Primera edición. España.
- López Palacios S. (1991). Usos Médicos de las Plantas Comunes. 4ta Edición. Talleres Gráficos Universitarios. Mérida. Venezuela.
- Manel D. (2013) Los Terpenos Parte II. <http://sensiseeds.com/es/blog/los-terpenos-parte-ii/>. 08/03/2014.
- Martin S. M. (1980). Mass culture systems for plant cell suspensions. En: Staba E. J. (Ed.) Plant tissue culture as a source of biochemicals. C.R.C. Press. Inc. Boca Raton. Florida., U.S.A. pp.: 149-166.
- Mikolich R, Paulson G, Cross J. (1975). Anticholinergics syndromes due to Jimson seed ingestion. Annals of Internal Medicine. pp.: 83:321-325.
- Moffat A.C. (1986) Clark's Isolation and Identification of Drugs. Second Edition. London, The Pharmaceutical Press. pp.: 362-365, 672-675, 1027.
- Mol J., Grotewold E., Koes R. (1998). How genes paint flowers and seeds. Trends in Plant Science. pp.: 3: 212-217.
- Molina G. J. (1993) Comentarios a la plática "El fitomejoramiento como disciplina científica". Ciencia. pp.: 44: 95-97.
- Moyano E., Bentebibel S., Palazón J., Bonfill M. y Piñol M. (1999) Producción de alcaloides tropánicos en cultivos de raíces manipuladas genéticamente. XIII Reunión Nacional de la sociedad Española de fisiología Vegetal. VI Congreso hispano-Luso de fisiología Vegetal. <http://www.cartuja.csis.es/SEFV9/abstracts/biotecnologia.htm>. 10/01/2014.

- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3):473-497.
- OMS (2008) Glosario de Términos de Alcohol y Drogas. Centro de Publicaciones. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Ortíz C. J. (1985) El estado actual del mejoramiento genético de plantas y sus interrelaciones con el cultivo de tejidos. El cultivo de tejidos vegetales en México. M. L. Robert y V. M. Loyola. Comps. Centro de Investigación Científica de Yucatán CICY. Mérida, Yucatán. México.
- Pare P. y Tumlinson J.(1999). Plant volátiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology.* pp.: 121: 325-331.
- Paris, M. ET M. Hurabielle (1981) *Abrégé de Matière Médicale - Pharmacognosie.* Tomo 1 y 2. Editorial Masson. París, Francia.
- Pérez G. (2014) Espectrometría. Espectrometría Ultravioleta- Visible. Series 1 y 2 head party in stock.
- Petiard V., Bariaud Fontanel A. (1985). El cultivo de células vegetales. *Mundo Científico.* 7(71) pp.: 730-736.
- Pichersky E. y Gang D. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science.* pp.: 5: 439-445.
- Ramachandra S. y Ravishankar, G. A. (2002) Plant cell cultures: chemicals factories of secondary metabolites. Elsevier science Inc. *Biothechnology Advances.* 20 pp.: 101-153.
- Repetto M. (1985) Toxicología de la drogadicción. Asociación Española de la Toxicología. Editorial Díaz de Santos. Primera edición. Madrid, España. pp.: 172.
- Ricardi Salinas M. (1956). Análisis Microscópico para Identificar Sistemáticamente Drogas Vegetales en Polvo y Uso Corriente. Gráfica Salesiana. Concepción. Chile.
- Robinson, T. (1983). The organic constituents of Higher Plants. Editorial Cordus press. North Amherst.
- Rhodes M. J. C., Robins R. J., Parr A. J., Hamill J. (1987). Secondary product formation in plant cell cultures. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* pp.: 105S-114S.
- Rumack B, Ig K. (1983). Anticholinergic Poisoning. In: *Clinical management of poisoning and drug overdose.* Saunders Company. Philadelphia.
- Ruta del ácido Shikimico (2014) <http://www.grandesimagenes.com/ruta-del-acido-shikimico/>. 08/03/2014.
- Ryals J., Ukness S., Ward E. (1994). Systemic acquired-resistance. *Plant Physiology.* pp.: 104: 1109-1112.
- Salinas P., Bermúdez M. (1999) Principios activos y utilización terapéutica de las plantas tóxicas del género *Datura*. Facultad de Medicina. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
- Schnee L. (1984). Plantas Comunes de Venezuela. 3era. Edición Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Schavartsman S.L (1979). Plantas Venenudas. Sarvier. Sao Paulo. Brasil.
- Seabrook J. E. A. (1980). Laboratory culture. En: Staba, E. J. (Ed.) *Plant tissue culture as a source of biochemicals.* C.R.C. Press, Inc, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp.: 1-20

- Segler, D.S. (2001). Plant Secondary Metabolism. Kluwer. Nueva York.
- Shenk R. A., Hildebrandt (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. pp.: 50:199-204.
- Singas E. L. y Sharkey T. D. (2000) The effects of high temperatura on isoprene synthesis in oak leaves. Plant Cell and Enviroment. pp.: 23: 751-757.
- Strauch M. M. (1989) Historia de la Biotecnología. Ciencia y Desarrollo XIV. pp.: 884: 19-32.
- STreet H. E. (1969). The induction of cell division in plant cell suspension cultures. En: Colloq. Int. C.N.R.S. (Ed.) Les cultures de tissues de plants. Paris., France. pp.: 177-93
- Street H. E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp.: 61-102.
- Taiz L. y Zeiger E. (1991) Plant Physiology. California. Benjamin Cimungs.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates. USA.
- Tempé J., Schell J. (1985). La manipulación de las plantas. Mundo Científico pp.: 7(71):792-801.
- Tiongson J, Salen P. (1998) Mass ingestion of Jimson Weed by eleven teenagers. Del Med J. pp.: 70:471-6.
- Thaler J. S. (1999) Jasmonate- inducible plant defences cause increased parasitism of hervivores. Nature. pp.: 399: 686-688.
- Twyman R. M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. Trends in Biotechnology. pp.: 21(12): 570-578.
- UNODC Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (2012) Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados. Manual para uso de los laboratorios nacionales de análisis de estupefacientes. Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos. Naciones Unidas. Nueva York, Estados Unidos. pp.: 35-36.
- Valares M. C. (2011) Variación del Metabolismo Secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Universidad de Extremadura. Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la tierra. Área de Ecología. Badajoz, Ezpaña.
- Valenzuela A. (2007) El Chocolate, un placer saludable. Rev. chil. nutr. v.34 n.3 Santiago.
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000300001. 08/03/2014.
- Vanderhoff BT, Mosser KH. (1992) Jimson weed toxicity: management of anticholinergicplant ingestion. Am Fam Physician pp.: 46:526-30.
- Vanisree, M. N. y Tsay, H. S. (2004) Plant cell cultures-an alternativeand efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engieneering. pp.: 1, 29-48.

- Wain R. L. (1980). El control químico del crecimiento de las plantas. En: Ondarza N. R. (Ed.) Los reguladores de las plantas y los insectos. CONACyT, México. pp.: 13-27
- Wareing P. F., AL Chalabi T. (1985). Determination in plant cells. Biol. Plant. pp.: 27(4-5): 241-248.
- Webster J. M. (1966). Production of oat callus and its susceptibility to a plant parasitic nematode. Nature. pp.: 212(5069):1472.
- Willians, C.A. y Grayer, R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. Natural Products Reports. pp.: 21: 539-573.
- Williams CH. y Harborne J. (1989) Isoflavonoids. In DEY P., Harnorne J (Eitors). Methods in Plant Biochemistry. Volume 1. Londres. Academic Press.
- Wink, M. (1999). Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Wu J., Wang CH. Y Mei X. (2001) Simulation of taxol production and excretion in *Taxus spp.* Cell Cultures by rare earth chemical lanthanum. J. of Biotechnology. pp.: 85:67-73.
- Yasuda S., K. Satoh T., Ishii, Furuya T. (1972). Studies on the cultural conditions of plant cell culture. En: Terui G. (Ed.) Ferment. Technol. Today. Proc. Int. Ferm. Symp. 4th. Soc. Ferm. Tech. Kyoto, Japan. pp.: 697-703.
- Yeoman M. M. (1970). Early development in callus cultures. Int. Rev. Cytol. pp.: 29: 383-409.
- Yeoman M. M., Mledzybrodska M. B., Lindsey K., McLauchlan W. R. (1980). The synthetic potential of cultured plant cells. En: Sala F., Parisi B., Cella R., Cifferri O. (Eds.) Plant cell cultures: Results and perspectives. Elsevier/North Holland Biomedical. Press. Amsterdam. pp.: 327-343.
- Zoghbi VC, Arellano Parra MA. (1979). Contribución al estudio de las Daturas en Venezuela. Red Toxicológica Nacional. Caracas.

ANÉXOS

ANEXO 1

FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN STOCK DE MACRONUTRIENTES MS x 10

Para obtener un litro de dicha solución, llénesse un matraz Erlenmeyer de 2 litros con 500 mililitros de agua destilada. A continuación, añádase cada uno de sus componentes (Tabla 1) uno a uno, disolviéndose totalmente antes de añadir el siguiente:

SUSTANCIA	PESO (en gramos)
NH_4NO_3	16.5
KNO_3	19.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7
KH_2PO_4	1.7

Tabla 1. Componentes para Solución STOCK de Macronutrientes.

Para finalizar, bastará con verter el contenido en un matraz aforado de un litro, aforar con agua destilada, trasladar la solución a su recipiente definitivo; de preferencia de vidrio ámbar y agitarlo. Esta solución debe guardarse a 4°C.

ANEXO 2

FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN STOCK DE MICRONUTRIENTES MS x 100

Para obtener un litro de dicha solución: llenar un matraz Erlenmeyer de un litro con 500 mililitros de agua destilada. A continuación, añadir cada uno de los componentes (Tabla 2) uno a uno, disolviéndose totalmente antes de añadir el siguiente:

SUSTANCIA	PESO (en miligramos)
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230.0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860.0
H_3BO_3	620.0
KI	83.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25.0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5

Tabla 2. Componentes para solución STOCK de Micronutrientes.

Para terminar, proceder del mismo modo que con la solución STOCK de Macronutrientes; especificada en el Anexo 1. Esta solución también debe almacenarse a 4°C.

ANEXO 3

FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN STOCK DE HIERRO MS x200

Para obtener 100 mililitros de dicha solución deben seguirse los pasos siguientes:

1. Calentar aproximadamente 50 mililitros de agua destilada en una parrilla eléctrica.
2. Cuando el agua esté templada, añadir 556 miligramos de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
3. Una vez que se haya disuelto el producto anterior, agregar 744 miligramos de $\text{NaEDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$.
4. A continuación, añadir una lenteja de NaOH .

Ya disueltos todos los componentes, verter el contenido en un matraz aforado de 100 mililitros, aferrar con agua destilada, trasladar la solución a su envase definitivo; de vidrio color ámbar, y etiquetar debidamente.

Esta solución se almacena a 4° C.

ANEXO 4

FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN STOCK DE VITAMINAS Y MYO-INOSITOL MS x200

Para obtener 100 mililitros de dicha solución, llenar un matraz Erlenmeyer de 100 mililitros con aproximadamente 50 mililitros de agua destilada y añadir uno a uno, hasta su total disolución, los componentes presentados en la Tabla 3.

SUSTANCIA	PESO (en miligramos)
Myo-inositol	2000.0
Ácido nicotínico	10.0
Piridoxina •HCl	10.0
Tiamina •HCl	2.0
Glicina	40.0

Tabla 3. Componentes para solución STOCK de vitaminas y Myo-inositol.

A continuación, verter el contenido en un matraz aforado de 100 mililitros, aforar con agua destilada, llenar el recipiente definitivo con la solución; de vidrio color ámbar, y etiquetarlo correctamente.

La solución STOCK de Vitaminas debe almacenarse a -20 °C.

ANEXO 5

FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MS (En agua destilada, para un litro)

Para obtener un litro de este medio de cultivo, disolver uno a uno los componentes especificados en la Tabla 4 en aproximadamente 500 mililitros de agua destilada colocada en un matraz Erlenmeyer de 2 litros, excepto por el Phytigel.

SUSTANCIA	CANTIDAD
Solución STOCK de Macronutrientes MSx10 (Anexo 1)	100 mL
Solución STOCK de Micronutrientes MSx100 (Anexo 2)	5 mL
Solución STOCK de Hierro MSx200 (Anexo 3)	5 mL
Solución STOCK de Vitaminas y Myo-inositol MS x 200 (Anexo 4)	5mL
Sacarosa	30 g
Phytigel	2.5 g

Tabla 4. Componentes para Medio de cultivo MS

Es importante establecer el pH del medio entre 5.7 y 5.8.

Después de establecido el pH, verter el contenido en un matraz aforado de un litro y aforarlo con agua destilada. Posteriormente, regresar el volumen aforado al matraz Erlenmeyer de 2 litros y calentar en parrilla eléctrica y poner en continua agitación, en ese momento añadir el Phytigel. Después de dos minutos de ebullición del medio, que deberá tener una apariencia transparente, retirar del calor y verter en los recipientes definitivos, que posteriormente se deberán esterilizar en autoclave o esterilizar el medio de cultivo y al salir de la autoclave verter en los recipientes definitivos estando en zona estéril.

ANEXO 6

FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MS-MODIFICADO (Para un litro de agua destilada)

La forma de preparación de este medio es igual que la forma de preparación del Medio de Cultivo MS, disponible en el anexo 6, los únicos cambios se incluyen en los componentes indicados en la tabla 5.

SUSTANCIA	CANTIDAD
Solución STOCK de Macronutrientes MSx10 (Anexo 1)	100 mL
Solución STOCK de Micronutrientes MSx100 (Anexo 2)	50 mL
Solución STOCK de Hierro MSx200 (Anexo 3)	5 mL
Solución STOCK de Vitaminas y Myo-inositol MS x 200 (Anexo 4)	5mL
Sacarosa	30 g
Phytigel	2.5 g

Tabla 5. Componentes para Medio de cultivo MS-Modificado.

ANEXO 7

FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE REGULADOR DEL CRECIMIENTO 2,4-D

El compuesto es soluble en alcohol.

Para realizar una solución con una concentración de 100 mg/L:

Pesar 10 miligramos del regulador de crecimiento, disolver en un poco de etanol y posteriormente adicionar un poco de agua.

Aforar el volumen a 100 mililitros con agua destilada. Verter en frascos de cristal color ámbar y etiquetar apropiadamente.

ANEXO 8

ELABORACIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE DIGESTIÓN CON MATERIAL VEGETAL

Pesar un gramo de la muestra de callo húmeda (muestra).

Se tritura y se macera en 5 mililitros de solución de ácido clorhídrico al 1% durante 30 minutos.

Se filtra la muestra y se concentra por evaporación a una temperatura de entre 55°C a 70 °C.

ANEXO 9

ELABORACIÓN DE UNA EXTRACCIÓN ETANÓLICA DE CALLO

Pesar 2 gramos de la muestra de callo previamente seca (en estufa).

Agregar 3 mililitros de etanol y 5 gotas de HCl al 10% para acidular.

Reposar 40 minutos.

Filtrar la muestra y condensar por evaporación a baño maría.

ANEXO 10

ELABORACIÓN DE UNA EXTRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE CALLO

Pesar 2 gramos de la muestra de callo previamente seca (en estufa).

Añadir 3 mililitros de cloroformo y 5 gotas de HCl al 10% para acidular.

Dejar reposar 40 minutos.

Filtrar la muestra y condensar por evaporación a baño maría.

ANEXO 11

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES UTILIZADOS

PRUEBAS FITOQUÍMICAS ESPECÍFICAS PARA ALCALOIDES

Las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno formando precipitados; estos ensayos preliminares se pueden realizar en el laboratorio o en el campo (Arango, 2008).

En la práctica, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como: la solución de yodo-yoduro de potasio (Reactivo de Wagner), tetrayodo bismuto de potasio (reactivo de Dragendorff), entre otros. Los procedimientos de estas técnicas que se utilizaron se encuentran disponibles en la sección de anexos.



FIGURAS 98 y 99. Imágenes que representan los reactivos de Dragendorff y Wagner, así como sus pruebas con resultado positivo.

ANEXO 12

ELABORACIÓN DEL REACTIVO Y PRUEBA DE DRAGENDORFF

Mezclar 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30% con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua.

Dejar en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 100 ml.

La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona este reactivo a una solución ácida de alcaloides.

De los precipitados lavados se puede recuperar los alcaloides con una solución saturada de carbonato de sodio.

ANEXO 13

ELABORACIÓN DEL REACTIVO Y PRUEBA DE WAGNER

Mezclar 1.27 g de Yodo y 2 g de yoduro de potasio.

Disolver en 100 mL de agua.

Colocar una pequeña cantidad de muestra en un tubo de ensayo, añadir 5 gotas de agua y agitar el tubo durante pocos segundos, añadir dos gotas del reactivo de Wagner.

La presencia de un precipitado café indica la presencia de alcaloides.

ANEXO 14

SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES POR TLC.

Las especies que contienen alcaloides rara vez contienen un solo alcaloide. Habitualmente contienen varios así como sustancias relacionadas. Hay alcaloides que son muy específicos y solo se encuentran en individuos de una sola especie, en cambio, hay alcaloides que son inespecíficos y se pueden encontrar en varias especies e incluso en varias familias. Pueden hallarse en la planta los alcaloides libres (raramente), en forma de sal (es lo más habitual debido a su carácter básico) o unidos a taninos o ácidos orgánicos (Enriquez-García, 2012).

En el ensayo, se utilizan cromatoplasmas de gel de sílice como fase fija y como fase móvil una mezcla de Cloroformo-Acetona-Dietilamina (5:4:1), otra de Cloroformo-Dietilamina (9:1) y como revelador reactivo de Dragendorff. Se determinan los R_f de cada compuesto y se comparan con los citados en la literatura. El procedimiento se encuentra disponible en los anexos.

PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES POR TLC.

Realizar un extracto clorofórmico como lo indica el anexo 10.

Aplicar muestra de cada uno de los extractos de los vegetales utilizados, sobre la placa de gel de sílice.

Preparar la fase móvil, saturar la cámara y correr el cromatograma.

Revelar con reactivo de Dragendorff.



FIGURAS 100 Y 101. Imágenes que representan los compuestos utilizados para correr las cámaras para cromatografía, así como una placa de gel sílice que está siendo sometida a dicha prueba.

ANEXO 15

IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES POR ESPECTOFOTOMETRÍA IR

La identidad de una sustancia puede confirmarse por Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Puede conseguirse la identificación inequívoca de los alcaloides a partir de cada espectro único. En el caso de la materia pulverizada, considerada razonablemente puro a partir de un análisis cromatográfico previo, el espectro infrarrojo del polvo puede introducirse directamente en un disco de KBr para su comparación con los de base libre o sales de clorhidrato.

El método del disc de KBr consiste en moler una mezcla seca hasta obtener un polvo muy fino, mezclar después 2 mg de polvo fino de la muestra homogeneizada con 200 mg de KBr seco y cuidadosamente molido. Después, con la mezcla se elabora mediante presión un disco fino transparente.

El KBr debe ser de calidad para infrarrojos y ha de secarse a 105°C durante una hora por lo menos. Puede almacenarse en un recipiente que contenga un fuerte desecante (gel sílice) o puede dejarse en el horno y retirarse cuando se necesite.

En los resultados, los principales picos se registran en números de onda, que se enumeran por orden de magnitud de la absorbencia. Conviene tener presente que la secuencia puede variar de una muestra a otra (UNODC, 2012).



FIGURAS 102 y 103. Imágenes de preparación de muestra orgánica de callo de *Datura* spp. para prueba de espectrometría en IR.

ANEXO 16

DESCRIPCIÓN DE PRUEBAS TOXICOLÓGICAS DE LABORATORIO PARA DETERMINAR AGENTES ANTICOLINÉRGICOS A PARTIR DE ORINA

- Ensayo de Ekkert: Añadir a 20 ml de la muestra 3-4 gotas de reactivo de Ekkert; en presencia de atropina y escopolamina se obtiene una coloración rojo violácea.

- **Ensayo de Gulielmo:** A miligramos de la muestra sospechosa, se le agregan 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, se desarrolla un color marrón que al diluir en agua produce un intenso olor floral.
- **Ensayo con Cloruro de Mercurio:** Colocar los miligramos de la muestra sospechosa y adicionar 20 gotas de solución de cloruro de mercurio al 2% en etanol al 50%, lentamente. Se obtendrá un color rojo.
- **Reactivo de Marquis:** En presencia de atropina suministra los colores marrón y verde parduzco al calentar.
- **Reactivo de Mandellin:** Color rojo pasa a amarillo.
- **Reacción de Vitali:** al residuo etéreo de 1 gramo de muestra obtenido con la reacción general de alcaloides, se le trata con gotas de ácido nítrico fumante, se evapora a sequedad y se dejan escurrir unas gotas de potasa alcohólica; aparece una coloración violeta fugaz, que pasa al pardo.
- **Reacción de Wasicky (p-dimetilaminovenzaldehído):** Al residuo alcaloide, obtenido con la reacción de Vitali, se agrega en caliente una gota de S.R. de Wasicky, con lo cual aparecerá una coloración roja que empieza por los bordes de la gota.
- **Ensayo de Brunner:** Se coloca la muestra en una cápsula de porcelana y se adiciona uno o dos cristales de ácido crómico, calentando suavemente hasta que el color que se observa es verde. Se produce una fragancia floral característica.