

TALLER PLANTAS COMO BIOREACTORES

ANTRAQUINONAS A PARTIR DE RAÍCES DE *MORINDA ROYOC* L.

Janetsy Borroto^{1*}, Reinaldo Trujillo¹, Yudelsy Tandrón², María de los Angeles Blanco¹, Maribel Rivas¹, Josep Coll². *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas. UNICA. Carretera a Morón km. 9. CP 69 450. Ciego de Ávila. Cuba e-mail: jborroto@bioplantas.cu

²Instituto de Investigaciones químicas y Ambientales de Barcelona "Josep Pascual Vila, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain.

RESUMEN

Las antraquinonas son un importante grupo de productos naturales que se han aislado a partir de bacterias, hongos, líquenes y plantas superiores. Estos compuestos presentan diversas actividades biológicas: antimicrobiana, antifúngica, antimalarial, antitumoral y antimutagénica. En plantas superiores se encuentran en un gran número de familias. Las plantas que pertenecen a la familia *Rubiaceae* contienen grandes cantidades de antraquinonas principalmente en sus raíces. *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*) conocida en Cuba como Garañón se emplea en la elaboración de un producto que tiene acción estimulante, revitalizadora, antiestrés e incrementa la libido. Este producto se emplea en Cuba como suplemento dietético y se produce a partir de sus raíces. El objetivo de este estudio fue aislar, purificar y elucidar la estructura química de las antraquinonas presentes en las raíces de *Morinda royoc* L. Las mismas se aislaron a partir de un extracto diclorometánico y se purificaron por columna de sílica gel y cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa con detector de arreglo de diodo (HPLC-DAD). La estructura de las antraquinonas se estableció basada en estudios espectrales (RMN-H1). Se aislaron e identificaron seis antraquinonas, dos de ellas por primera vez descritas en esta planta: Lucidina -1- metiléter and Lucidina -1,3- dimetiléter. Además se aislaron e identificaron el nordamnacantal, damnacantal, morindona y rubiadina -1 ó 3- metiléter. Se identificó el nordamnacantal como antraquinona mayoritaria en el extracto.

Palabras clave: Antraquinonas, *Morinda royoc* L., productos naturales

ANTHRAQUINONES FROM *MORINDA ROYOC* L. ROOTS

ABSTRACT

Anthraquinones are an important group of natural products occurring in bacteria, fungi, lichens and higher plants. These compounds have been reported to exhibit some interesting *in vitro* biological activities: antimicrobial, antifungal, antimalarial, antitumour and antimutagenic. In higher plants, they are found in a large number of plant families. Plants belonging to the family *Rubiaceae* are known to contain substantial amounts of anthraquinones, especially in the roots. *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*) known in Cuba as Garañón, is used to make a product with stimulating, revitalizing and antistress activity that also increases the libidum. This product is produced from roots and used in Cuba as a diet supplement. The objective of this study was to isolate, purificate and elucidate chemical structures of anthraquinones from roots of *Morinda royoc* L. The anthraquinones were isolated from the dichloromethane extract and purified by silica gel column and using a reverse phase high performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection (HPLC-DAD). The structures of the anthraquinones were established based on spectral studies (H1-NMR). From roots of *Morinda royoc* L. six anthraquinones were isolated and identified. Two of them, namely Lucidin -1- methylether and Lucidin -1,3- dimethylether, constitute the first report of their occurrence from *Morinda royoc* L. and four known anthraquinones: nordamnacantal, damnacantal, morindone, rubiadin -1 ó 3- methylether. Nordamnacantal was identified as a major anthraquinone in the extract.

Key words: Anthraquinones, *Morinda royoc* L., natural products

EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE INMERSIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y EL CONTENIDO DE GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS EN BROTES DE *DIGITALIS PURPUREA* L. CULTIVADOS EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Naivy Pérez^{1*}, Elio Jiménez¹, Dirk Wilken², André Gerth², Annett Jähn³, Horst-Michael Nitzsche³, Gerd Kerns⁴, Alina Capote¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: naivy@ibp.co.cu

²BioPlanta GmbH. Deutscher Platz 5. 04103 Leipzig, Germany.

³Instituto de Química No Clásica (INC). Permosestraße 5, Leipzig, Germany.

⁴Instituto de Sajonia de Biotecnología Aplicada. Permosestraße 5, Leipzig, Germany.

RESUMEN

Digitalis purpurea, es un ejemplo de droga cardio-activa o cardiotónica. La digoxina y digitoxina son glicósidos producidos por esta planta, los cuales ejercen una acción muy eficaz en músculos cardíacos y han sido usados ampliamente en tratamientos del corazón. El propósito de esta investigación fue estudiar el efecto de diferentes frecuencias de inmersión (cada 12, 6, 4, 3 y 2 horas), en la producción de biomasa así como en el contenido de glicósidos cardiotónicos (digitoxina y digoxina) como metabolitos secundarios de gran interés en la industria farmacéutica, determinados mediante Cromatografía Líquida. La producción de biomasa se vio favorecida a medida que se incrementó la frecuencia de inmersiones, obteniéndose los mayores valores cuando se emplean inmersiones de 2 minutos de duración cada 4 horas, con un promedio de 6 brotes por planta, con 11 cm de altura y un incremento de biomasa de 92.1g. La calidad de los brotes fue también superior al emplear inmersiones cada 4 horas, donde se observó un 27% de brotes hiperhídricos, mientras que en el tratamiento con inmersiones cada 2 horas hubo un 60% brotes hiperhídricos. El contenido de digoxina fue siempre menor que el de digitoxina. No obstante, la concentración de este metabolito aumentó con el empleo de inmersiones cada 4 y 3 horas, mientras la producción de digitoxina fue muy estable en todos los tratamientos evaluados. El efecto de la inmersión temporal sobre la acumulación de glicósidos no había sido descrito hasta el momento.

Palabras clave: digitoxina, digoxina, inmersión temporal, metabolitos secundarios

EFFECT OF FREQUENCY IMMERSION ON BIOMASA PRODUCTION AND CONTENT OF CARDIOTONIC GLYCOSIDES IN SHOOTS OF *DIGITALIS PURPUREA* L. CULTIVATED IN TEMPORARY IMMERSION SYSTEMS

ABSTRACT

Digitalis purpurea, is an example of cardiotonic or cardio-active drug. Digoxin and digitoxin are glucosides produced by this plant which are cardiac stimulants with a wide use in the treatment of heart problems. The objective of this investigation was to study the effect of different immersion frequencies (every 12, 6, 4, 3 and 2 hours) on biomass production and the content of cardiotonic glycosides (digitoxin and digoxin), determined by Liquid Chromatography. Biomass production was favoured by increasing the frequency of immersions. The highest values were obtained with 2 immersions of 2 minutes every 4 hours, with an average production of 6 shoots per explant, 11 cm in length and 92.1 g biomass increase. Quality of the shoots was affected by immersion frequency, with immersions every 4 hours 27% of hyperhydric shoots were observed, while with immersions every 2 hours 60% of the shoots showed hyperhydricity. The content of digoxin was always lower than digitoxin. However, the concentration of digoxin increases with immersions every 4 and 3 hours, while the accumulation of digitoxin was stable in all treatments. The effect of temporary immersion on glycosides accumulation in shoots of *Digitalis* presented in this paper has not been described in the literature until now.

Key words: digitoxin, digoxin, temporary immersion, secondary metabolites

MUPLICACIÓN *IN VITRO* DE LA PLANTA MEDICINAL *MORINDA ROYOC* L.

Elio Jiménez^{1*}, Carlos Reyes², Pablo Peña², Naivy Pérez¹, Alina Capote¹, Anabel Pérez¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Martar Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

²Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Villa Clara.

RESUMEN

Morinda royoc L. es una planta que pertenece a la familia de las rubiáceas y es reconocida por sus propiedades medicinales. El presente trabajo describe el desarrollo de protocolos para la regeneración de plantas vía organogénesis en *Morinda royoc* L. y su multiplicación en sistemas de inmersión temporal. Se logró el establecimiento *in vitro* de brotes de *M. royoc* a partir de yemas apicales y axilares de plantas cultivadas en casa de cultivo. Los mayores coeficientes de multiplicación (6.8) se obtuvieron en un medio de cultivo MS con 1mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.5mg.l⁻¹ de AIA. Se logró un 71% de brotes enraizados *in vitro* con una altura promedio de 2.8 cm y 4.2 entrenudos en un medio de cultivo MS con 0.5 mg.l⁻¹ de AIB. Las plantas regeneradas alcanzaron un 100% de supervivencia cuando se transfirieron a la fase de aclimatización. Se demostraron las ventajas de los sistemas de inmersión temporal (SIT) para la multiplicación de brotes *in vitro*, al obtenerse un incremento promedio en la producción de biomasa de 49.7 g por frasco de 1 litro de capacidad y un coeficiente de multiplicación de 5.4 en comparación con 2.1 g de incremento de biomasa y 3.3 de coeficiente de multiplicación que se logra en medios de cultivo semisólidos. No se observaron síntomas de hiperhidricidad en las plantas propagadas en los SIT. Los resultados permiten definir un protocolo de regeneración vía organogénesis de *M. royoc* que podrá emplearse para la propagación comercial de la especie y como base de futuros trabajos para la obtención de metabolitos secundarios de uso farmacológico.

Palabras clave: inmersión temporal, propagación comercial, regeneración

IN VITRO MULTIPLICATION OF THE MEDICINAL PLANT *MORINDA ROYOC* L.

ABSTRACT

Morinda royoc L. is a plant species belonging to the *Rubiaceae* family with demonstrated medicinal properties. The present work describes the development of a regeneration protocol via organogenesis in *Morinda royoc* and the multiplication in temporary immersion systems. *In vitro* shoot cultures of *M. royoc* were established from apical and axillary buds of greenhouse grown plants. Best multiplication rate (6.8) was obtained when shoots were cultured in modified MS medium supplemented with 1mg.l⁻¹ 6-BAP and 0.5mg.l⁻¹ of AIA.. Rooting was induced in 71% of the shoots with an average of 2.8 cm in height and 4.2 internodes per plant when 0.5 mg.l⁻¹ AIB was added to the culture medium. Regenerated plants showed 100% survival when transferred to acclimatization phase. The advantages of temporary immersion systems (TIS) for *in vitro* multiplication of shoots were demonstrated, with an average increase in biomass production of 49.7 g per TIS (1 liter capacity) and 5.4 multiplication rate, compared with 2.1 g biomass increase and 3.3 multiplication rate in semisolid culture medium. No symptoms of hyperhydricity were observed in the plants multiplied in TIS. A regeneration protocol for *M. royoc* was developed, this protocol could be used either for the commercial propagation of the species and as a base for future studies on the production of secondary metabolites for pharmaceutical use given by the medicinal properties of the species.

Key words: commercial propagation, regeneration, temporary immersion

PINEAPPLE PROTEASE OBTAINED AND PURIFIED FROM DIFFERENT SOURCES

Martha Hernández^{1*}, Carol Carvajal¹, Aurora Pérez¹, Ramón Santos¹, María Chávez². *Autor para correspondencia.

¹Bioplantas Centre, UNICA, CP 69450, Cuba. e-mail: mherandez@bioplantas.cu.

²Proteins Studies Centre. Havana University, Cuba.

ABSTRACT

Pineapple plants (*Ananas comosus*) contain several cysteine proteinases, of which the major component in stem extracts is the so-called «stem bromelain» (EC 3.4.22.32). In recent years, industrial applications of plant proteases have reached high levels. Bromelain, in particular, exhibits different therapeutic effects: anti-

inflammatory, digestive, anti-metastases and anti-tumoral activities. It is including in the drug group modifiers of the biological answer. Therefore, considerable attention has been focused on the possibility of applying efficient plant tissue culture methods to physiologically active enzymes isolation. Bromelain crude extract was obtained through an original procedure. The isolated product was afterward purified by using Sephadex G-100 gel filtration chromatography (yields ranging 87.81%, 3.1 pure). Alternative purification procedure based on Carboxymethyl cellulose (CMC-52) cationic exchanger provided similar results as well as higher yields (50%). The purification until homogeneity by combination of chromatographic methods made possible the molecular characterization of the enzyme. These results were verified through a SDS- PAGE electrophoresis band close to 25 000 Da. The enzymatic product partially purified by ion exchange chromatography (IEC) in CMC-52, was submitted to toxicological and pharmacological studies. Other bromelain isolation schedule was carried out, consisting of enzyme precipitation from liquid media used as temporary immersion bioreactors (TIB) for pineapple plant propagation, leading to specific activity values of 0.590 U/mg proteins. In addition, electrophoresis studies and HPLC chromatograms showed few protein contaminants in liquid media. The obtained enzyme by this procedure have a similar isolated enzyme has a similar purity than former chromatographically obtained sample. The optimization proteases production as metabolites in TIB can be used for cellular level studies to relate bromelain with defense mechanisms in plants.

Key words: bromelain, liquid media, metabolites, temporary immersion bioreactors

PROTEASAS DE PIÑA OBTENIDAS Y PURIFICADAS A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES

RESUMEN

Las plantas de piña (*Ananas comosus*) contienen varias cisteino proteasas, el mayor componente proteolítico en extractos de tallos se llama «bromelina de tallo» (EC 3.4.22.32). Los niveles de aplicaciones industriales de las proteasas de plantas se han incrementado considerablemente en años recientes. En particular, la bromelina exhibe diferentes efectos terapéuticos: actividad anti-inflamatoria, digestiva, antimetástasis y anti-tumoral. Está incluida entre las drogas modificadoras de la respuesta biológica. Por eso, se presta considerable atención a la posibilidad de aplicar métodos eficientes de cultivo de tejidos de plantas para aislar enzimas fisiológicamente activas. Se obtuvo extracto crudo de bromelina a través de un proceso original. El producto aislado fue purificado por cromatografía de filtración en geles de Sephadex G-100 (87.81% de rendimiento, 3.1 grado de pureza). Un proceso alternativo de purificación por intercambio catiónico en carboximetil celulosa (CMC-52) rindió resultados similares y más bajos rendimientos (50%). La purificación hasta homogeneidad por la combinación de métodos cromatográficos posibilitó la caracterización molecular de la enzima. La verificación de los resultados por electroforesis (SDS- PAGE) mostraron una banda cercana a 25 000 Da. El producto enzimático parcialmente purificado por intercambio iónico en CMC-52 fue utilizado en estudios toxicológicos y farmacológicos. Se usó otro esquema de aislamiento de bromelina, precipitando la enzima a partir del medio de cultivo líquido empleado para la propagación de piña en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT), los valores de actividad específica fueron de 0.590 U/mg de proteínas. Los estudios electroforéticos y los cromatogramas de HPLC mostraron pocos contaminantes proteicos en el medio líquido. La enzima obtenida por este procedimiento tiene una pureza similar a la cromatográficamente purificada. La optimización de la producción de proteasas como metabolito en los BIT puede ser usada para estudios a nivel celular que relacionen la bromelina con los mecanismos de defensa en plantas.

Palabras clave: biorreactores de inmersión temporal, bromelina, medio de cultivo líquido, metabolitos

SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE LA EXPRESIÓN EN PLANTAS DE MOLÉCULAS DE INTERÉS FARMACÉUTICO

Gil A. Enríquez*, Merardo Pujol, Carlos Borroto. *Autor para correspondencia.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31/158 y 190, Playa, PO Box 6162, Havana 1600, Cuba. e-mail: gil.enriquez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Las plantas son una alternativa potencial para la expresión de proteínas de interés, tales como anticuerpos, antígenos y un gran número de otras moléculas de uso farmacéutico e industrial. Varias compañías han derivado su trabajo hacia el tema de expresión de este tipo de moléculas, desarrollando sus propias plataformas y estrategias para potenciar esta nueva alternativa. Dentro de las variantes que más se han explorado están: tipo de cultivo, moléculas, condiciones de cultivo, localización celular de las proteínas, entre otras. En estos momentos existen varios resultados interesantes, los cuales reafirman las reales posibilidades de esta

tecnología para resolver problemas que existen en la obtención de moléculas de alto valor agregado, por ejemplo anticuerpos. Se presenta un resumen de los resultados obtenidos por el CIGB, así como las perspectivas y potencialidades que se avizoran para el desarrollo de esta tecnología.

Palabras clave: anticuerpos, antígenos, expresión en plantas

ABSTRACT

Plants are a potential alternative for the expression of a large number of different proteins like antibodies, antigens and some other pharmaceutical and industrial molecules of interest. There are several companies are working in the expression of these kind of molecules, developing its own platform in order to validate this alternative. Some of the variants which are presently been explored are: plant specie, molecule, conditions of culture, protein cellular compartments, and so on. At this moment, there are several interesting results, showing the real possibilities of this technology to solve part of the presents problems in the current technology to obtain highly valuable molecules, for example the monoclonal antibodies. We are presenting a summary of the results obtained by the CIGB, as well as the perspectives and potentials foreseen for the new developments of this technology.

Key words: antibodies, antigen, plant expression

BIOTECHNICAL METHODS FOR THE PRODUCTION OF PLANT SECONDARY METABOLITES

André Gerth¹, Elio Jimenez², Dirk Wilken¹

¹BioPlanta GmbH, Deutscher Platz 5, D-04103, Leipzig, Germany.

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

ABSTRACT

A wide range of pharmaceutically used compounds are derived from plants. Usually, these compounds are extracted from plants grown in the field or collected in nature. However, the concentration of the desired metabolites varies according to environmental factors. Infestation, diseases and the application of pesticides additionally decrease the quality of the raw materials. Thus, much research has been done to establish plant cell and suspension cultures for metabolite production. Most of these attempts failed due to very low concentrations of the desired metabolites in undifferentiated cells. On the other hand, *in vitro* cultured fully differentiated plant organs exhibit a high and reliable production capacity for plant secondary metabolites. *In vitro* propagation of whole plants and plant organs using Temporary Immersion Systems allows optimization and automation of gas and nutrients exchange. A low cost bioreactor system based on this principle has been developed that allows automated large scale *in vitro* culture of differentiated plant organs. These bioreactors have been used to propagate various plant organs, e.g. shoots, roots and tubers of different plant species. It was demonstrated, that the production capacity of secondary metabolites in these systems was much higher compared to undifferentiated cell cultures. Moreover, the control of environmental parameters *in vitro* has been used successfully to modify the content as well as the spectrum of the produced metabolites. This is a very promising strategy for production of pharmaceutically highly active plant biomass *in vitro*.

DETECTION IN PROGENIES OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS A MURINE MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST THE HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN (ANTI-HBSAG)

Meilyn Rodríguez*, Alejandro Fuentes, Fidel Corrales, Maribel Espino, Marta Ayala, Jorge V. Gavilondo, Marlene Pérez, Osmany Ramos, Rudy Peral, Osvaldo Oliva, Margarita Simón, Carlos Borroto, Merardo Pujol.
*Autor para correspondencia.

Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB). P.O. Box 6162, Havana 10600, Cuba. *e-mail: meilyn.rodriguez@cigb.edu.cu.

ABSTRACT

The instability of transgene expression in genetically engineered plants is often claimed as a constraint to deal with for the practical use of this technology. It is particularly important in the case of transgenic plants for the expression of pharmaceutical, veterinary and industrial compounds. A line of transgenic tobacco plants

expressing a murine monoclonal antibody against the hepatitis B virus surface antigen under the constitutive CaMV 35 promoter, using the sporamin prepeptide and KDEL retention signal was generated. The stability of the transgenes was demonstrated by Southern blot and protein accumulation levels in the progenies from HCLC-23 transgenic tobacco clone were assessed. Similar pattern in the segregation tests of the transgenic seed progenies indicated that silencing has not occurred in the HCLC-23 clone. All analyzed generations from anti-HBsAg expressing transgenic tobacco plants produce active antibodies, as interpreted from their positive recognition of the recombinant antigen in ELISA. This result confirms that potential limitations of transgenic plants for plant-made pharmaceuticals could be properly addressed. Besides, it complies with one of the requirements for sanitary registration and practical use of this transgenic event in large-scale production.

Key words: antibody against the hepatitis B virus surface antigen (anti-HBsAg), bioreactors, transgenic plants

IN VITRO PROPAGATION AND GENETIC TRANSFORMATION STUDIES IN MEDICINAL TREE *TERMINALIA CHEBULA* RETZ

Barampuram Shyamkumar

Centre for Plant Molecular Biology (CPMB) Osmania University, Hyderabad –500076 Andhra Pradesh. India.
e-mail: shyambaram@yahoo.co.in

ABSTRACT

Terminalia chebula Retz. of the family Combretaceae is an important tree of pharmaceutical and trade value. In Indian pharmacopoeia, fruit of *T. chebula* is extensively used as adjuvant to other medicines for almost all diseases. It contains anti-cancer, anti-HIV, anti-bacterial activity. The natural regeneration in *Terminalia chebula* is very poor due to low germinating capacity of seed. Survey of forest resources and identification of elite clone of *T. chebula* was done based on agronomic characteristics like seed yield, quality, disease resistance and height of the plant. Recently it is found that it contains anti-cancer, anti-HIV properties and remedial effect against arthritis. A protocol for multiple shoot induction from cotyledonary node explants of *T. chebula* has been developed for the first time. The shoots were rooted, acclimatized and transferred to the field conditions. Study was carried out to identify specific organogenic proteins during multiple shoot formation by SDS-PAGE analysis. Characterization of micropropagated plants for testing clonal fidelity was done using protein isozyme marker (esterase). Besides this the further work has been carried out for induction of transgenic hairy roots and shooty teratomas using wild strains of *Agrobacterium rhizogenes* and specialized strains of *Agrobacterium tumefaciens*. The transformed roots induced were used as starting explants for plant regeneration. The transformed callus induced on cotyledon explants subsequent to infection with C58 was confirmed for nopaline by paper electrophoresis. The induced transformed callus was used to study the secondary metabolite production in *T. chebula*. The callus was analyzed for the presence of tannic acid as its presence in the pulp of the seed. In addition to my Ph.D work, hairy roots and shooty teratomas were induced in important medicinal plants like *Withania somnifera* and *Hyoscyamus muticus*. Secondary metabolites were also isolated from from such transformed cultures. Further the protocol for the multiple shoot induction in *T. chebula* is being used for genetic transformation studies for transforming chimeric genes like *gus* and *bar* using disarmed strains of *Agrobacterium tumefaciens*. Presently, I am working on tannin biosynthetic pathway in *T. chebula* using C-58 induced transformed callus.

AISLAMIENTO DE FITOPROEASAS A PARTIR NUEVAS FUENTES DE PLANTAS DE LA FAMILIA BROMELIACEAE

Aurora Pérez^{1*} Carol Carvajal¹ Reinaldo Trujillo¹ Danilo Pina² Oscar Concepción² Fernando Sagarra² Martha Hernández¹.

¹Laboratorio de Ing. Metabólica. Centro de Bioplasmas. UNICA. Carretera a Morón m. 9. Ciego de Ávila. Cuba.
e-mail: aperez@bioplasmas.cu

²Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. UNICA. Carretera a Morón km. 9. Ciego de Ávila. Cuba.

RESUMEN

Las cisteino proteasas están presentes en todos los organismos vivos y constituyen el grupo enzimático mejor caracterizado dentro de las proteasas. Las plantas de la familia *Bromeliaceae* son una fuente natural de cisteino proteasas. Estas enzimas son frecuentemente utilizadas en la industria alimentaria, biotecnológica y medico-farmacéutica. Estudios recientes informan del efecto antiinflamatorio, antimetastazante, anti-trombótico y anti-tumoral de las cisteino proteasas. Sin embargo, el número de proteasas vegetales que se han aislado y caracterizado es aún muy bajo, ya que hasta la fecha solo se han estudiado en este sentido menos del 1% de las especies vegetales conocidas. De ahí el marcado interés en la búsqueda de nuevas fuentes naturales y vías alternativas para la obtención de fitoproteasas. El presente trabajo tuvo como objetivos determinar la actividad proteolítica de extractos crudos obtenidos a partir de diferentes órganos de plantas de la familia *Bromeliaceae* y establecer el pH adecuado para la extracción de estas enzimas. Se identificaron seis grupos de plantas de la familia *Bromeliaceae*: cuatro grupos son del género *Tillandsia*, uno es del género *Guzmania* y otro del género *Hohenbergia*. Los mayores índices de actividad específica (1.33 U/mg de proteínas) se obtuvieron para los preparados obtenidos de tallos de *Hohenbergia penduliflora* Mez al realizar la extracción a pH 3.

Palabras clave: *Bromeliaceae*, pH de extracción, proteasas

PHYTOPROTEASES ISOLATION FROM NEW SOURCE OF BROMELIACEAE FAMILY PLANTS**ABSTRACT**

Cysteine proteases are present in all living organisms and they are the best characterized of all proteases. Plants of *Bromeliaceae* family are a natural source of cysteine proteases. These enzyme are frequently used in pharmaceutical, biotechnological and food industries. In recent years, their effect as anti-inflammatory, antimetastatic, antithrombotic and anti-tumoral have been reported. However, the number of plant proteases isolated and characterized is still very low. To date, proteases have been studied in less than 1% of the already known plant species. We hoped to evaluate proteolytic activity of crude extract obtained from different *Bromeliaceae* plants source and to establish adequate enzymes extraction pH. We identify six plants group of *Bromeliaceae* family: Four group are *Tillandsia* genera, one group is *Guzmania* genera and another is of *Hohenbergia* genera. Specific protease activity was highest (1.33 U/mg of protein) with *Hohenbergia penduliflora* Mez. stems and pH 3 for extraction.

Key words: *Bromeliaceae*, extraction pH, proteases

DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS EN PLANTAS DE MORINDA ROYOC L: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Maribel Rivas*, Aurora Pérez, Martha Hernández, Janetsy Borroto, Reinaldo Trujillo, María A. Blanco. *Autor para correspondencia.

Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas. UNICA. Carretera a Morón Km. 9. CP 69450. Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: mrivas@bioplantas.cu

RESUMEN

Las plantas producen una amplia variedad de los llamados metabolitos secundarios. Los compuestos secundarios de las plantas se clasifican usualmente por sus vías biosintéticas. Hay tres grandes familias que se consideran generalmente: fenólicos, terpenos y esteroides y alcaloides. Debido a su gran actividad biológica, los metabolitos secundarios se han usado por siglos en la medicina tradicional. La actividad oxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, la cual juega un papel importante en la adsorción y neutralización de radicales. El propósito de este estudio fue determinar el contenido fenólico (equivalentes de ácido clorogénico), antraquinonas y actividad antioxidante (ensayo del ácido tiobarbitúrico) a partir de raíces, tallos, ramas y hojas de plantas de *Morinda royoc* L. Se llevaron a cabo análisis de regresión de actividad antioxidante contra el contenido de fenólicos y antraquinonas. Los resultados mostraron que el contenido de fenoles fue mayor en las hojas, con diferencias significativas con el resto de los órganos analizados (ramas, tallos y raíces). Se demostró que el metabolito mayoritario (de los evaluados) son las antraquinonas y el órgano en el que se acumula en mayores concentraciones son las raíces de plantas adultas. Los coeficientes de correlación de los compuestos fenólicos (midiendo su carácter antioxidante) resultaron entre (0.61-0.74 unidad) para el malondialdehído (MDA). Las correlaciones con otros aldehídos (OAD) se ajustaron perfectamente al modelo de regresión cuadrática con coeficientes de correlación (R²) entre 0.85-0.98.

Palabras clave: fenoles, antraquinonas, *Morinda royoc*, radicales libres

ABSTRACT

Plants produce a wide variety of so called secondary metabolites. Plant secondary compounds are usually classified according to their biosynthesis pathways. Three large molecule families are generally considered: phenolics, terpenes and steroids, and alkaloids. Due to their large biological activities, plant secondary metabolites have been used for centuries in traditional medicine. The antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which can play an important role in adsorbing and neutralizing free radicals. The purpose of this study was to determine the phenolic content (chlorogenic acid equivalent), anthraquinones and antioxidant activity (thiobarbituric acid test) from roots, stem, branch and leaf of plant *Morinda royoc* L. Regression analyses of antioxidant activity versus the phenolic content and anthraquinones were carried out. Results reveal that the levels of phenolic compounds (chlorogenic acid equivalent), were higher in leaves with differences significantly. However, the roots extract contained the most anthraquinone compounds which is significantly more than that found in the other organs of the same plant. The correlation coefficients of phenolic compounds for the malondialdehyde (MDA) (non-oxidative character) were between 0.61 and 0.74 unit. In other hand the correlations with other aldehydes (OAD) were adjusted perfectly to the quadratic regression model with correlation coefficients (R²) between 0.85 and 0.98.

Key words: anthraquinones, *Morinda royoc*, phenolics, free radicals

EFFECTO DE ELICITORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS SOBRE EL CONTENIDO DE DIGOXINA Y DIGITOXINA EN BROTES DE *DIGITALIS PURPUREA* L. CULTIVADOS *IN VITRO*

Franklyn Arana^{1*}, Naivy Pérez², Alina Capote², Anabel Pérez², Rafael Sosa³, Angel Mollineda⁴, Elio Jiménez². *Autor para correspondencia.

¹Centro Universitario de Las Tunas, Las Tunas. Cuba.

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

³Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

⁴Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.

RESUMEN

Digitalis purpurea L. contiene metabolitos secundarios de interés farmacológico, entre los más importantes se destacan la digitoxina y la digoxina de marcada actividad cardiotónica. Los rendimientos de glicósidos obtenidos mediante el cultivo de células son muy bajos y durante las sucesivas transferencias de cultivos celulares la cantidad de cardenólidos ha disminuido o desaparecido completamente. El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar la influencia de elicitores bióticos y abióticos en la multiplicación *in vitro* de brotes de *D. purpurea* en medio de cultivo semisólido así como cuantificar, mediante HPLC, el contenido de digoxina y digitoxina en la biomasa producida. Los elicitores evaluados fueron: ChitoPlant (0.001; 0.01; 0.1 g.l⁻¹); SilioPlant (0.01; 0.1; 1.0 g.l⁻¹) y Metil Jasmonato (0.014; 0.018; 0.022 g.l⁻¹). La adición de ChitoPlant provocó una disminución en la altura de los brotes y no produjo afectaciones en las demás variables evaluadas, a excepción de la concentración de 0.1 g.l⁻¹ que indujo un incremento significativo de la masa seca. El SilioPlant, a medida que se incrementó su concentración en el medio de cultivo, provocó disminuciones en la altura, número de brotes y la masa fresca con respecto al control; mientras que el Metil Jasmonato provocó disminuciones en todas las variables evaluadas, excepto en la masa seca donde las concentraciones de 0.018 g.l⁻¹ y 0.022 g.l⁻¹ no mostraron diferencias con el control. Con respecto al contenido de metabolitos, el ChitoPlant incrementó el contenido de digoxina y digitoxina. Se logró con 0.1 g.l⁻¹ triplicar el contenido de digoxina e incrementar en 2.4 veces el contenido de digitoxina, en comparación con el control. El SilioPlant incrementó el contenido de glicósidos en los brotes, las mayores concentraciones se lograron en el tratamiento con 0.01 g.l⁻¹ con incrementos de 3.3 y 6.9 veces en el contenido de digoxina y digitoxina respectivamente, en comparación con el control. Los mejores resultados integrales se alcanzaron en el tratamiento con 0.01 g.l⁻¹ de SilioPlant, en el cual se logra un rendimiento neto por frasco de cultivo de 4.7 g de digoxina y 87.9 g de digitoxina, seguido del tratamiento con 0.1 g.l⁻¹ de ChitoPlant, que alcanzó una producción neta por frasco de cultivo de 4.9 g de digoxina y 35.6 g de digitoxina.

Palabras clave: ChitoPlant, metabolitos secundarios, SilioPlant

EFFECT OF BIOTIC AND ABIOTIC ELICITORS ON CONTENT OF DIGOXIN AND DIGITOXIN IN SHOOTS OF *DIGITALIS PURPUREA* L CULTIVATED *IN VITRO***ABSTRACT**

Digitalis purpurea L. has secondary metabolites of pharmacological interest, such as digitoxin and digoxin of cardiotoxic activity. The yields of glycosides in plant cell cultures are very low and during the successive subcultures the quantity of cardenolides has decreased or disappeared completely. The aim of this study was to evaluate the influence of the biotic and abiotic elicitors on multiplication *in vitro* of shoots of *Digitalis purpurea* on semisolid media, as well as the content of digoxin and digitoxin determined by HPLC. The elicitors evaluated were: ChitoPlant (0.001; 0.01; 0.1 g.l⁻¹); SiliioPlant (0.01; 0.1; 1.0 g.l⁻¹) and Metyl jasmonate (0.014; 0.018; 0.022 g.l⁻¹). ChitoPlant induced a decrease in the shoots length and did not produce affectations in the rest of variables evaluated, but 0.1 g.l⁻¹ induced a significant increase of the dry weight. The increase of the concentration of SiliioPlant, caused decrease in the number and length of shoots and the fresh weight comparing with control; while the Metyl jasmonate favored only the dry weight, the concentrations of 0.018 g.l⁻¹ and 0.022 g.l⁻¹ did not show statistical significant differences with control. Respect of content of metabolites, the yields of digoxin and digitoxin in shoots treated with ChitoPlant were enhanced. The increase in digoxin and digitoxin contents with ChitoPlant (0.1 g.l⁻¹) were about 3-fold and 2.4-fold, respectively, compared to control culture. The content of glycosides in shoots increased 3.3-fold (digoxin) and 6.9-fold (digitoxin) when 0.01 g.l⁻¹ of SiliioPlant was used. The best integral results were reached with 0.01 g.l⁻¹ of SiliioPlant, which induced the highest net yields per culture flask (4.7 ñ g of digoxin and 87.9 ñ g of digitoxin), followed by the treatment with 0.1 g.l⁻¹ of ChitoPlant (4.9 ñ g of digoxin and 35.6 ñ g of digitoxin).

Key words: ChitoPlant, secondary metabolites, SiliioPlant

ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *ARTEMISIA LUDOVICIANA* SUB. MEXICANA, ESPECIE MEDICINAL DEL CENTRO-NORTE DE MÉXICO

Escareño Piña Ernesto*¹ Capote Alina² Jiménez Elio². *Autor para correspondencia.

¹Área Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Zacatecas, México. e-mail: escareno@uaz.edu.mx

² Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, carretera a Camajuaní km. 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

RESUMEN

La especie de *Artemisia ludoviciana* sub. *mexicana*, es una planta medicinal de tipo silvestre, dicotiledónea, con amplio uso por la población mexicana en diversos padecimientos, como: antidiarreico, antiemético, antiespasmódico, artritis, diurético, laxante, antimalaria, psoriasis y anticancerígeno. El objetivo de este trabajo fue lograr el establecimiento *in vitro* y la multiplicación de brotes de *A. ludoviciana* sub. *mexicana* a partir de semillas. Las semillas se lavaron con jabón líquido por 10 min, luego en etanol al 70% por 5 min, y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% por 7 min. Posteriormente se enjugaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en medio de cultivo base Murashige y Skoog con 3% de sacarosa, y 3.5g de gelrite a pH de 5.6. La tasa de contaminación microbiana osciló entre 0 y 16.2 % en los diferentes experimentos realizados. A los 45 días se logró el desarrollo de brotes completos los cuales fueron transferidos a medio de multiplicación Murashige y Skoog con 0.50 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Los brotes obtenidos fueron empleados para estudiar el efecto de las diversas concentraciones de 6-BAP (0.0, 0.25, 0.50, 1.0, y 2.0 mg.l⁻¹) sobre la multiplicación de los brotes, evaluándose la altura y número de brotes por explante, el peso fresco y el peso seco.

Palabras clave: desinfección dicotiledónea, establecimiento

IN VITRO* ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF *ARTEMISIA LUDOVICIANA* SUB. MEXICAN, MEDICINAL SPECIES FROM THE CENTER-NORTH OF MEXICO*ABSTRACT**

The species of *Artemisia ludoviciana* sub. *mexican* is a wild type medicinal plant, dicotyledonous, widely use by Mexican population to attack several sufferings, such as: diarrheas, emetic, spasms, arthritis, diuretics, laxative, malaria, psoriasis and cancer. The objective of this work was to achieve the *in vitro* establishment and the multiplication of buds of *A. ludoviciana* sub. *Mexican* from seeds. Seeds were washed with soap during 10 min., then in ethanol (70%) 5min. and after disinfected with hypochlorite of sodium to 2% during 7

min. Later, they were rinsed three times with distilled sterile water and were seeded in base culture medium Murashige and Skoog with 3% of sucrose, 3.5 g of gelrite and pH of 5.6. The rate of microbe contamination oscillated between 0 and 16.2 % in the different experiments carried out. The complete development of buds was obtained to the 45 days and then they were transferred to the Murashige and Skoog multiplication medium with 0.5 mg.l⁻¹ of 6-BAP. The obtained buds were used to study the effect of the different concentrations of 6-BAP (0.0, 0.25, 0.50, 1.0, and 2.0 mg.l⁻¹.) on the multiplication of the buds, evaluating the height and number of buds by explants, and the fresh and dry weight.

Key words: dicotyledonous, disinfection, establishment

PERFIL METABÓLICO DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE CULTIVOS *IN VITRO* DE *MORINDA ROYOC* L., *PSIDIUM GUAJAVA* L. VAR EEA18-40 Y *MORUS ALBA* L. VAR CRIOLLA

Alina Capote^{1*}, Naivy Pérez¹, Anabel Pérez¹, Raúl Barbón¹, Enrique Salas¹, Dirk Wilken², André Gerth², Lutz Müller-Kuhrt³, Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

²BioPlanta GmbH, Leipzig, Alemania.

³AnalytiCon Discoveries GmbH, Potsdam, Alemania.

RESUMEN

El cultivo de células y tejidos *in vitro*, es una de las alternativas para la identificación de nuevos compuestos o para incrementar la producción de compuestos ya conocidos que sean de utilidad para la humanidad. El objetivo del trabajo fue producir biomasa de las especies *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L. var. EEA18-40 y *Morus alba* L. var. Criolla empleando distintos sistemas de regeneración *in vitro* para determinar el perfil de producción de metabolitos en la biomasa producida *in vitro* y plantas en campo mediante la técnica combinada de cromatografía líquida-espectrofotometría de masa. Se pudo comprobar en todas las especies en estudio que el contenido de agua es mayor en el material vegetal obtenido en los sistemas de cultivo *in vitro* en relación con las muestras obtenidas de plantas cultivadas en campo o invernadero. En la especie *Morinda royoc* el cultivo de brotes es el sistema de cultivo *in vitro* más factible para la producción de biomasa con mayor contenido de materia seca comparado con el cultivo de callos y células. Los rendimientos de los extractos en todas las especies en estudio fueron siempre mayores en los sistemas de cultivo *in vitro* en comparación con los obtenidos en plantas en campo o invernadero y fueron mayores a medida que la diferenciación fue menor (brotes, callos y suspensiones celulares en ese orden). En la especie *Morinda royoc* se obtuvo el más amplio espectro de compuestos en el cultivo de callos y suspensiones celulares, en comparación con las muestras de hojas de plantas en invernadero y brotes multiplicados *in vitro*. En esta especie los perfiles de compuestos detectados en plantas de invernadero y brotes *in vitro* fueron similares, mientras que en *Psidium guajava* y *Morus alba* los perfiles de expresión entre muestras de hojas de campo y brotes *in vitro* fueron distintos, lo que demuestra que cada genotipo reacciona de forma distinta al cultivo *in vitro* y por tanto los compuestos que se sintetizan como respuesta a estas condiciones "anormales" de crecimiento es distinta. Se pudo demostrar que el cultivo *in vitro* es una fuente potencial para la identificación y producción de nuevos compuestos.

Palabras clave: biomasa, cultivo de tejidos, cromatografía líquida, espectrofotometría de masa, metabolitos secundarios

METABOLIC PROFILE OF EXTRACTS OBTAINED FROM *IN VITRO* CULTURE OF *MORINDA ROYOC* L., *PSIDIUM GUAJAVA* L. VAR EEA18- 40 Y *MORUS ALBA* L. VAR CRIOLLA

ABSTRACT

The plants cell and tissue *in vitro* culture are one of the alternatives for the identification of new compounds or to already increase the production of compound well-known that are utility for the humanity. The aim of this work was to produce biomass of *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L. var. EEA18-40 and *Morus alba* L. var. Criolla species using different regeneration systems to determine the profile of metabolites production in the biomass cultivated *in vitro* and plants in field by means of the combined techniques of liquid chromatography and mass spectrophotometer. In all the species the content of water was bigger in the vegetable material obtained in the *in vitro* culture systems compare with the biomass obtained from fields and green house

plants. In *Morinda royoc* the shoots culture was the *in vitro* culture system more feasible for the production of biomass with bigger content of dry matter compared with cells and callus system. In all the species the yields of the extracts were always bigger in the *in vitro* culture systems in comparison with those obtained from field or green house plants. It was bigger as the differentiation was smaller (shoots, callus and cells suspension). In *Morinda royoc* the widest spectrum of compound was obtained in the callus and cells suspension in comparison with the samples of leaves of green house plants and shoots *in vitro* culture. In this species the profiles of compounds detected in green house plants and shoots *in vitro* culture were similar, while in *Psidium guajava* and *Morus alba* the expression profiles between samples of leaves from field plants and shoots *in vitro* culture were different, which demonstrate that each genotype reacts in way different to the *in vitro* culture and therefore the compounds that are synthesized as answer to these abnormally conditions of growth are different. It was demonstrated that the *in vitro* culture is a potential source for the identification and production of new compounds.

Key word: biomass, liquid chromatography, mass spectrophotometer, secondary metabolites, tissue culture

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *CYMOPOGON CITRATUS* STAPF., UNA PLANTA MEDICINAL, MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS

Elisa Quijala*, Raúl Barbón, Elio Jiménez, Manuel de Feria, Maité Chávez, Alina Capote, Naivy Pérez, Lester Morejón. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: equiala@ibp.co.cu

RESUMEN

La Caña Santa (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf.) es una planta medicinal, la cual es cultivada para la obtención de citral. El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar una metodología para propagar y producir biomasa *in vitro*. A partir de ápices meristemáticos de plantas cultivadas en condiciones de campo se establecieron plantas *in vitro* y se formaron callos. Con posterioridad se establecieron suspensiones celulares y se evaluó a escala de agitador orbital el efecto de la densidad de inóculo (20, 40 y 60 gMF l⁻¹) sobre la masa fresca, la masa seca y el pH. Se evaluó además, la formación o no de raíces en los agregados celulares en dos medios de cultivo, así como la posible multiplicación de dichos agregados celulares a escala de biorreactores. Por otra parte, se determinó el efecto de la frecuencia de inmersión diaria (2, 4 y 6 horas) sobre la producción de biomasa en sistemas de inmersión temporal (SIT). Se determinó el contenido de á y â citral en la biomasa producida a partir de callos, agregados celulares, brotes producidos en medio de cultivo semisólido, en SIT y en plantas de campo. El mayor incremento tanto de la masa fresca como seca de las suspensiones celulares se obtuvo con una densidad de inóculo de 20 gMF l⁻¹. La presencia de raíces solo se apreció en los agregados celulares cultivados en medio de cultivo sin agua de coco. Se logró la multiplicación de los agregados celulares en biorreactores y se alcanzó en nueve días un incremento de 5.6 veces con respecto a la masa fresca y seca inicial (20 gMF l⁻¹ y 8.0 gMS l⁻¹). En los SIT la mayor producción de biomasa se obtuvo cuando se utilizó una frecuencia de cuatro (62.2 gMF) y seis (66.2 gMF) inmersiones por día. La presencia de á y â citral solo se obtuvo en la biomasa obtenida a partir de brotes, durante el cultivo *in vitro* el contenido de estos metabolitos fue mayor en los brotes obtenidos en SIT, aunque inferiores a los producidos por las plantas de campo.

Palabras clave: Caña santa, cultivo *in vitro*, citral, metabolitos secundarios

BIOMASS PRODUCTION OF *CYMOPOGON CITRATUS* (D.C) STAPF., A MEDICINAL PLANT, BY TISSUE CULTURE TECHNIQUES

ABSTRACT

Lemmon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf.) is a medicinal plant, which is cultivated for the citral obtaining. The objective of this work consisted on the development of a methodology to spread and to produce biomass *in vitro* of this species. Shoot and callus cultures were established from stem apexes from field grown plants. Cell suspensions cultures were established from callus cultivated in a rotary shaker. The effect of the inoculation density (20, 40 and 60 gMF l⁻¹) on fresh mass, dry mass and pH variation was evaluated. The presence of roots in the cellular aggregate cultivated in two culture medium, as well as the multiplication of the same ones to biorreactores scale up was also evaluated. On the other hand, the effect of the frequency of daily immersion was determined (each 2, 4 and 6 h) on the production of biomass in temporary immersion systems (TIS). The contents of á y â citral in the biomass produced from calli, cellular aggregated and shoots

cultivated in semisolid culture medium and TIS was determined. The biggest increment so much in the fresh as dry mass of the cell suspensions was obtained when 20 gMF l⁻¹ inoculation density was used. The pH in the three densities diminished during the first eight days and it was stable starting from this moment. The presence of roots was appreciated only in the cellular aggregated cultivated in a culture medium without coconut water. The multiplication of the cellular aggregated was achieved in bioreactors and in nine days an increment of 5.6 times was reached with regard to the fresh and dry initial mass (20 gMF l⁻¹ and 8.0 gMS l⁻¹) respectively. In the TIS the biggest production of biomass was obtained when a frequency of four (62.2 gMF) and six (66.2 gMF) immersions per day was used. The presence of citral was obtained only in the biomass obtained starting from buds, during the *in vitro* culture the content of these metabolites was bigger in the buds obtained in SIT, although inferior to those taken place by the field plants.

Key words: citral, *in vitro* culture, Lemmon grass, secondary metabolites

CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES TOTALES PRESENTES EN LAS HOJAS DE *CAPRARIA BIFLORA* L.

Arelys López Sacerio*, Yanelis Colina. *Autor para correspondencia.

Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5, 5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: arelysls@uclv.edu.cu

RESUMEN

La *Capraria biflora* L. es una *Serophulariaceae* utilizada por la población para el tratamiento de diversas afecciones, se encuentra ampliamente distribuida en Cuba y presenta un gran número de acciones terapéuticas entre las que se destaca: antiinflamatorio, analgésico y diurético. Por tanto, resulta muy valioso el desarrollo de técnicas analíticas que garanticen la seguridad y eficacia de las formas farmacéuticas que se desarrollen a partir de esta planta. Además la biotecnología constituye una herramienta que permite la obtención de grandes cantidades de material vegetal a partir de una planta seleccionada en corto tiempo. En el presente trabajo se cuantificaron los flavonoides totales en base a quercetina presentes en las hojas de *Capraria biflora* L. a través de Espectrofotometría UV-Vis. Dicha técnica analítica fue previamente validada. La técnica analítica evaluada para la determinación de flavonoides totales en las hojas de la planta resultó lineal, precisa y exacta, bajo las condiciones establecidas. El material vegetal cuenta con un 0.1 % de flavonoides totales calculados en base a quercetina.

Palabras clave: *Capraria biflora* L., espectrofotometría UV-Vis, flavonoides

DESARROLLO DE TECNICAS ANALITICAS PARA LA CUANTIFICACION DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN EL *ALLIUM SATIVUM* L. (AJO)

Arelys López Sacerio*, Luis Bravo Sánchez, Mario Sueiro Oyarzún. *Autor para correspondencia.

Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5, 5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: arelysls@uclv.edu.cu

RESUMEN

El *Allium sativum* L. (Ajo) constituye una planta de probada actividad farmacológica en patologías comunes asociadas a procesos trombóticos, cardiovasculares e infecciosos. Dichas propiedades se relacionan con su compleja química, especialmente la presencia de tiosulfatos y alicina. Teniendo en cuenta lo anterior, resulta muy valioso el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas a partir de esta planta sobre bases estrictamente científicas. Se obtuvo la droga seca de *Allium sativum* L. en forma de sólidos pulverulentos con la calidad requerida. Fue desarrollada y validada una Técnica semicuantitativa y una cuantitativa por Cromatografía de Capa Fina y Espectrofotometría Ultravioleta-Visible, respectivamente, para la determinación de tiosulfatos totales y el contenido (%) de tiosulfatos en base a alicina en los sólidos pulverulentos de *Allium sativum* L., obteniéndose concentraciones en el rango de 1.98 a 2.21 mM para la Técnica semicuantitativa y 2.14 mM como resultado medio, con la Técnica cuantitativa. Ambas resultaron ser fiables. Se demostró la sensibilidad de la Técnica semicuantitativa; y se obtuvo una medida de la exactitud de ambas por comparación.

Palabras clave: ajo, *Allium sativum* L., tiosulfatos, validación

ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA A UNA BIOMASA OBTENIDA POR MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS A PARTIR DE UNA PLANTA DE INTERÉS PARA LA INDUSTRIA DE COSMÉTICO

Remigio Cortes Rodríguez*¹, Daniel Agramonte², Tania Betancourt Purón¹, Jorge A. Pérez Donato¹, Roberto Machado Pérez¹, Ervelio Olazábal Manso¹. *Autor para correspondencia.

¹Centro Bioactivos Químicos. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. Teléfonos: 281117. e-mail: toxivig@capiro.vcl.sld.cu

²Instituto Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

RESUMEN

Investigadores del Instituto de Biotecnología de las Plantas y el Centro de Bioactivos Químicos, ambos, de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, tienen dentro de sus objetivos desarrollar nuevas tecnologías para la producción de biomasa a partir de órganos y células de plantas de gran demanda en las industrias farmacéuticas, alimentaria y de cosméticos. En este caso se obtuvo una biomasa que fue sometida a ensayos tales como: tamizaje fitoquímico, efectividad, toxicidad, y control de la calidad microbiológica, donde se determinó una correspondencia entre los metabolitos presentes en esta biomasa (flavonoides, taninos, quinonas, triterpenos, aceites esenciales, alcaloides, etc) con los expresados por la planta en su ecosistema natural. A lo anterior se agrega que los estudios de bioequivalencia demostraron una elevada eficacia, baja toxicidad y alta estabilidad y calidad microbiológica. En todos los casos los estudios fueron realizados según lo establecido por las principales agencias regulatorias, incluida la Cubana, en lo referente a metodologías empleadas, instalaciones, procedimientos y competencia de los investigadores. Los resultados obtenidos permitieron trazar una estrategia dirigida a registrar y posteriormente comercializar metabolitos con un alto valor agregado y múltiples propósitos.

Palabras clave: calidad microbiológica, metabolitos, tamizaje fotoquímico

EVALUACIÓN DEL INSECTICIDA DEL NEEM EN EL SECTOR AGRÍCOLAS DE SINALOA MÉXICO

Nidia Araiza Lizarde

Universidad Politécnica de Sinaloa. México.

RESUMEN

En la naturaleza existe una gran diversidad de plantas que poseen principios activos que han contribuido de forma importante en los avances de la medicina, cosmetología y agricultura. El sector agrícola constantemente se ve afectado por plagas que atacan a los cultivos en el campo ocasionado con esto grandes pérdidas agrícolas. Una de las plagas que ha causado severos daños en el estado de Sinaloa ha sido la mosquita blanca, la cual si no se controla de manera adecuada puede ocasionar pérdidas totales en las cosechas. Para combatir dichas plagas, se han empleado insecticidas artificiales que contaminan al ambiente y provocan daños a la salud como leucemia. En el sector agrícola de Culiacán, Sin., por ser uno de los más productivos del país en cuanto al sector agrícola se aplican constantemente insecticidas, provocando intoxicación en el ser humano. Debido a dichos inconvenientes con los insecticidas artificiales, se han buscado nuevas alternativas naturales que nos permitan combatir a plagas de impacto agrícola sin ocasionar daños al ambiente y a la salud. Por ello se investigaron las propiedades bioinsecticidas del árbol del neem y venadillo como una alternativa para el control de la mosquita blanca, arrojando como resultado dos aceites con propiedades bioinsectivas muy eficaces que aun en dosis del 1% fueron eficaces para controlar la mosquita blanca.

Palabras clave: bioinsectivas, mosca blanca, plagas

HIGH ACCUMULATION OF LEVAN ALTERS LEAVES PHENOTYPE IN TRANSGENIC TOBACCO

Alexander Banguela*, Juan G. Arrieta, Raisa Rodríguez, Luis E. Trujillo, Margarita Simón, Lázaro Hernández. *Autor para correspondencia.

Laboratorio de Interacciones Planta-Microorganismos. División de Plantas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Ciudad Habana, Cuba. e-mail: alexander.banguela@cigb.edu.cu

ABSTRACT

A limited number of plant species accumulate fructans as a carbohydrate reserve. Plant fructans with polymerization degree (DP) below 100 fructose units are synthesized in the vacuole by the concerted action of at least two fructosyltransferases. Levansucrase (LsdA) from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* synthesizes the polyfructan levan (DP>10000) directly from sucrose. Here we report the production of levan in tobacco, a non-fructan storing plant, by expression of the mature LsdA fused to the putative vacuolar targeting signal of the onion sucrose:sucrose fructosyltransferase. The levan content in leaves increased with age reaching up to 70% (dry weight) in the transgenic plant of the highest expression level. The gradual accumulation of the polyfructan in the leaves led to a proportional bleaching phenotype.

Key words: Levan, levansucrase, LsdA, tobacco

MOLECULAR STRATEGIES TO USE OF PLANTS SECONDARY METABOLITES ON SKIN DISEASES

Rafael Sosa Martínez^{1*}, Aminael Sánchez-Rodríguez², Jorge L. Enríquez González³, Elio Jiménez². *Autor para correspondencia.

¹Centro Bioactivos Químicos. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. Teléfonos: 281117. e-mail: toxivig@capiro.vcl.sld.cu

²Instituto Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

ABSTRACT

Psoriasis is a very common, non-infectious, inflammatory skin disease characterized by well defined, distinctive erythematous plaques yielding adherent silvery white scales. Psoriasis may affect any cutaneous surface, but the commonest sites are the extensor surfaces of the elbows and knees, scalp and sacral areas. Many factors such as genetic features, immunological disorders, biochemical changes, environmental effects, trauma, infection, endocrine features, stress, drugs and alcohol play an important role in the pathogenesis of psoriasis. New psoriasis treatments aim to correct the body's defective genetic processing, and therefore attack psoriasis at the root of the problem in order to control the inflammation, scaling, flaking and discomfort. To combat these destructive process, a number of herbs which appear to have an antitumoral activity and anti-psoriatic effects can be used. The possibility to combine several plants secondary metabolites agents on tissue distribution of inorganic ion and inhibit of UVB-induced Transcriptional Activator Protein-1 (AP-1) activity offer some improvement by helping to gently exfoliate the plaques without causing an additional irritation. These agents help remove the skin's armor making the skin more available for other anti-psoriasis drugs.