

Efecto del cultivo *in vitro* en el perfil metabólico de *Psidium guajava* L.

Alina Capote¹, Naivy Pérez-Alonso¹, Anabel Pérez¹, Dirk Wilken², André Gerth², Lutz Müller-Kuhr³, Elio Jiménez¹

¹Instituto 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

²BioPlanta GmbH, Leipzig, Germany

³AnalytiCon Discoveries GmbH, Potsdam, Germany

RESUMEN

El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico se ha incrementado ampliamente. El cultivo de órganos representa una alternativa interesante para la identificación de nuevos compuestos o para incrementar la producción de compuestos ya conocidos que sean de utilidad para la humanidad. El presente trabajo tuvo como objetivo producir *in vitro* biomasa de *Psidium guajava* mediante el cultivo de brotes y determinar el efecto del cultivo *in vitro* en el perfil metabólico de esta especie. Se comprobó que el contenido de agua fue mayor en el material vegetal obtenido en el cultivo de brotes *in vitro* con relación a las muestras obtenidas de plantas cultivadas en campo. Los rendimientos de los extractos resultaron mayores en los brotes cultivados *in vitro*. En esta especie los perfiles de expresión entre muestras de hojas de plantas en campo y brotes *in vitro* fueron distintos, siendo mayor la gama de compuestos obtenidos en el cultivo de brotes. Se detectaron 23 nuevos compuestos. Este es el primer trabajo que muestra el perfil metabólico de *Psidium guajava* en brotes cultivados *in vitro* demostrando que el cultivo *in vitro* es una fuente potencial para la identificación y producción de nuevos compuestos.

Palabras clave: cultivo de órganos, espectrometría de masa, guayaba, metabolitos secundarios

ABSTRACT

The use of *in vitro* techniques for the production of secondary metabolites in the pharmaceutical industry has increased widely. The organ culture is one of the alternatives for the identification of new compounds or to increase the production of already known compound useful for the humanity. The aim of this work was to produce biomass of *Psidium guajava* L var 'EEA18-40' using shoot culture and to determine the effect of the *in vitro* culture in the metabolic profile of this species. Water content was higher in the plant material obtained in the shoots cultured *in vitro* compared to samples collected from plants grown in field. Yields of extracts were greater in shoots cultured *in vitro*. Expression profiles among leaves samples of plants grown in field were different in this species, obtaining a higher rate in the shoots culture. A number of 23 new compounds was detected. This is the first work that shows the metabolic profile of *Psidium guajava* in shoots cultured *in vitro*. It was demonstrated that the *in vitro* culture is a potential source for identification and production of new compounds.

Key words: guava, mass spectrometry, organs culture, secondary metabolites

INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios de plantas debido a su gran actividad biológica se usan a través de siglos en la medicina natural y tradicional (Bourgaud *et al.*, 2001). Aproximadamente, 50 000 compuestos diferentes han sido encontrados en las plantas y se estima que en el futuro este valor supere los 200 000 (Fiehn *et al.*, 2000).

Diversas propiedades medicinales se le atribuyen a la guayaba (*Psidium guajava* L.), entre ellas, como antibiótica, astringente, desinflamante, expectorante, sedante y sudorífica. Además, contiene valores extraordinarios de vitamina A, ácido ascórbico, azúcares, taninos, flavonoides y fibras (Laguado *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2008). Igualmente, ha

despertado gran interés en el fortalecimiento del sistema inmunológico por su contenido en vitamina C (Suntornsuk, 2002).

Los extractos de frutas y ramas verdes se usan para neutralizar el efecto de las diarreas. En general, se le ha atribuido un efecto significativo en la disminución de las enfermedades gastrointestinales (Wei, 2000; Mitchell y Ahmad, 2006a,b). Según Arima (2002) las ramas tiernas debilitan el desarrollo bacteriano que altera el tracto intestinal. Otra ventaja de los componentes de la guayaba es el fortalecimiento del sistema cardiovascular (Yamashiro *et al.*, 2003).

No obstante, la calidad y la cantidad de los compuestos obtenidos a partir de plantas colectadas

en ambientes naturales son muy variables y están influenciadas por condiciones ambientales tales como el clima, la época del año y el suelo. Adicionalmente, las afectaciones por enfermedades o plagas y la aplicación de pesticidas reduce la calidad de los compuestos obtenidos (Bhojwani y Razdan, 1996). Sin embargo, el cultivo *in vitro* permite independizar la producción de metabolitos de estos factores externos y disponer de condiciones controladas en el proceso de producción y extracción. Además, posibilita la obtención de nuevos compuestos no presentes en la planta madre (Massot *et al.*, 2000).

La deducción del contexto biológico en que una planta dada produce determinados compuestos, a partir de datos obtenidos por la medición de las concentraciones de metabolitos, requiere de una estrategia que integre la extracción óptima de la muestra, separación, detección, identificación del metabolito y cuantificación de estos con gran fiabilidad. Técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masa se utilizan para la detección e identificación de compuestos en mezclas orgánicas y permiten el descubrimiento de más y más moléculas y el estudio de compuestos naturales (Verpoorte y Alfermann, 2000; Weekwerth *et al.*, 2004; Le Gall *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2009).

El presente trabajo tuvo como objetivo producir *in vitro* biomasa de *Psidium guajava* mediante el cultivo de brotes y determinar el efecto del cultivo *in vitro* en el perfil metabólico de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de biomasa in vitro

Para la producción de la biomasa *in vitro* de la especie en estudio se siguió el protocolo propuesto por Caballero (2001) para el establecimiento y la multiplicación de brotes en medio de cultivo semisólido.

Se emplearon como explantes iniciales segmentos nodales de plantas crecidas en casa de cultivo.

Para la fase de establecimiento se utilizó el medio de cultivo compuesto por las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS), 0.5 mg.l⁻¹ de tiamina, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol, 1.0 mg.l⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y 3.0% de sacarosa.

Los explantes se multiplicaron en un medio de cultivo compuesto por las sales MS, 0.5 mg.l⁻¹ de tiamina, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol, 2.0 mg.l⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), 3.0% de sacarosa y Agar (SIGMA) a razón de 7.0 g.l⁻¹. Se colocaron 10 explantes por frasco de cultivo de 250 ml de capacidad con 30 ml de medio de cultivo. Los subcultivos se realizaron cada 28 días.

El material vegetal en fase de establecimiento y multiplicación se colocó en cámaras de crecimiento con luz solar con una intensidad luminosa de aproximadamente 100-125 μmol.m⁻².s⁻¹ y 26±2°C. Se colectaron hojas de las plantas en tercer y cuarto subcultivo hasta obtener 10g de masa fresca.

Obtención de biomasa de plantas crecidas en campo

Se seleccionaron plantas de seis años de cultivo en campo para la toma de las muestras. Estas procedieron de la Estación Experimental Pedro Lantigua ubicada en el municipio de Remedios, perteneciente al Instituto de Biotecnología de las Plantas, a las cuales se le realizaron atenciones culturales según Instructivo técnico de la guayaba (MINAGRI, 1985).

De las plantas cultivadas en campo se colectaron hojas de ramas jóvenes hasta alcanzar 10g de masa fresca.

Determinación del contenido de agua

A las muestras provenientes de las plantas en campo y del cultivo *in vitro* se les determinó la masa fresca y seca. Para esto último se sometieron a un proceso de secado en estufa a 40°C hasta lograr un peso constante (g). Además, se determinó el contenido de agua mediante la fórmula siguiente:

$$CA (\%) = \frac{PF-PS}{PF} \times 100$$

Donde:

CA- contenido de agua

PF- masa fresca (g)

PS- masa seca (g)

Análisis del contenido de metabolitos

Las muestras secadas en estufa se maceraron mediante el empleo de un mortero y posteriormente se empaquetaron en sobres de papel y se conservaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

La determinación de metabolitos secundarios en las distintas muestras se realizó en la compañía AnalytiCon (Potsdam, Alemania), mediante técnicas de cromatografía líquida y espectrometría de masa (HPLC-ESI-MS) según los protocolos establecidos.

Los extractos de las muestras de material vegetal cultivado *in vitro* y en campo se obtuvieron a partir de 1.5 g de masa seca. Se utilizó como tampón de extracción éter metil terbutil/metanol (MTB-Ether/Metanol) y posteriormente 10mg.ml⁻¹ del extracto se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Las muestras se inyectaron automáticamente y se separaron utilizando una columna de fase reversa (C18, Phenomenex, USA) y un gradiente de 5 a 50% de

acetonitrilo. Los compuestos eluidos de la columna se detectaron mediante un detector de diodo (Diode Array Detector) a 210-600nm. La masa molecular se determinó por espectrometría de masa en modo de ionización por nebulización eléctrica (*Electro spray ionization*).

Se realizó la comparación de la masa molar relativa del compuesto detectado con un base de datos que contiene cerca de 12 000 sustancias de plantas (MEGABOLITE®). Posteriormente se determinaron los grupos químicos a los que pertenecen la mayoría de las sustancias encontradas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del contenido de agua

En la biomasa obtenida se pudo comprobar que el contenido de agua fue mayor en el material vegetal obtenido mediante el cultivo *in vitro* de brotes 82.1% en relación con las muestras de plantas cultivadas en campo (40%). Por consiguiente, la relación masa fresca y masa seca en las plantas cultivadas *in vitro* fue mayor (5.6). Esto se debe a que el ambiente *in vitro* se caracteriza por presentar una alta humedad relativa (HR) que provoca la saturación de la atmósfera interna del frasco de cultivo y esto trae aparejado malformaciones a nivel de tejido como la carencia de la capa epicuticular de cera en la epidermis y por consiguiente un incremento del contenido de agua en los tejidos (Piqueras y Debergh, 1999).

Se plantea que el ambiente *in vitro* difiere del ambiente *ex vitro* en el cual se desarrollan las plantas normalmente, es por eso que frecuentemente se observan cambios fisiológicos y morfológicos en las plantas (Ziv, 1999).

Adicionalmente, la intensidad y calidad de la luz son diferentes (Miyashita *et al.*, 1996; Piqueras y Debergh, 1999), lo cual tiene una influencia fuerte en el desarrollo morfológico. La presencia de sales, reguladores del crecimiento y fuentes de carbono en el medio de cultivo condiciona el crecimiento heterotrófico o mixotrófico de los tejidos (Nguyen y Kozai, 1998; Kozai, 1999).

Se conoce que la producción de metabolitos secundarios no es uniforme en todas las partes de la planta y en la mayoría de los casos se produce en un órgano o tejido específico, de ahí la importancia de poder cultivar y producir biomasa de estos tejidos como fuente para la purificación de metabolitos de interés (Verpoorte y Alfermann, 2000).

Análisis del contenido de metabolitos

En los extractos obtenidos el rendimiento fue siempre mayor en las muestras procedentes del cultivo de brotes en comparación con las muestras de plantas cultivadas en campo, como se muestra en la tabla 1.

Los mayores rendimientos en el proceso de extracción de la biomasa producida *in vitro* pudieran estar asociados a las condiciones controladas en que se desarrolla el proceso, lo cual trae consigo una mayor homogeneidad y calidad del material vegetal.

Una de las grandes ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo en campo es que se pueden obtener sustancias de gran utilidad (metabolitos secundarios) en condiciones controladas independientemente de cambios climáticos, condiciones de suelo y libres de patógenos. Además, es posible reducir los costos e incrementar la productividad mediante el control automatizado del crecimiento celular y la regulación de los procesos metabólicos, contar con un sistema de producción definido, calidad uniforme y rendimiento constante del producto, así como la posibilidad de establecer sistemas estrictos de control de la calidad, para disponer de un producto independiente de los cambios ambientales (Morgan y Shanks, 2000; Vanisree y Tsay, 2004).

Las diferencias observadas en los perfiles pueden explicarse por las distintas fases de desarrollo y organización de tejido entre estos tipos de muestras, lo que implica una regulación diferencial de la expresión génica y por consiguiente diferencias en los compuestos identificados.

Al realizar una comparación individual de cada uno de los compuestos detectados en estas muestras con la base de datos MEGABOLITE® se observaron diferencias en cuanto a la presencia y concentración de los compuestos identificados y no identificados. Los compuestos identificados son aquellos que, basados en los tiempos de retención y datos de masa molecular, mostraron similitud con compuestos en la base de datos. Los compuestos no identificados son aquellos donde no se encontró coincidencia con la base de datos.

El número de compuestos detectados (identificados y no identificados) en las muestras de las hojas de plantas en campo fue superior al de las hojas de brotes cultivados *in vitro*.

En las muestras de hojas de plantas en campo, se encontraron entre los compuestos identificados flavonas tales como: miricitrina, catequina y prunina. Esta última es de todo este grupo la que se encontró en mayor concentración (348.6mg/10g). Otros compuestos encontrados fueron flavonoides con equidad en la masa molar y en la concentración. Estos aparecieron en menor concentración que las flavonas. Se observó que varios de los compuestos no identificados eran isómeros de los compuestos identificados (catequina, esteposido, pircantosido, myricitrina, prunina) ya que coinciden en el tiempo de retención y en equidad molar.

Tabla 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de las muestras de hojas de plantas de *Psidium guajava* cultivadas en campo y de las muestras provenientes de los brotes cultivados *in vitro*.

Sistemas de cultivo	Masa seca (g)	Extracto (mg)	Rendimiento (%)
Plantas en campo	1.7	202.53	11.9
Brotes <i>in vitro</i>	1.1	248.51	22.6

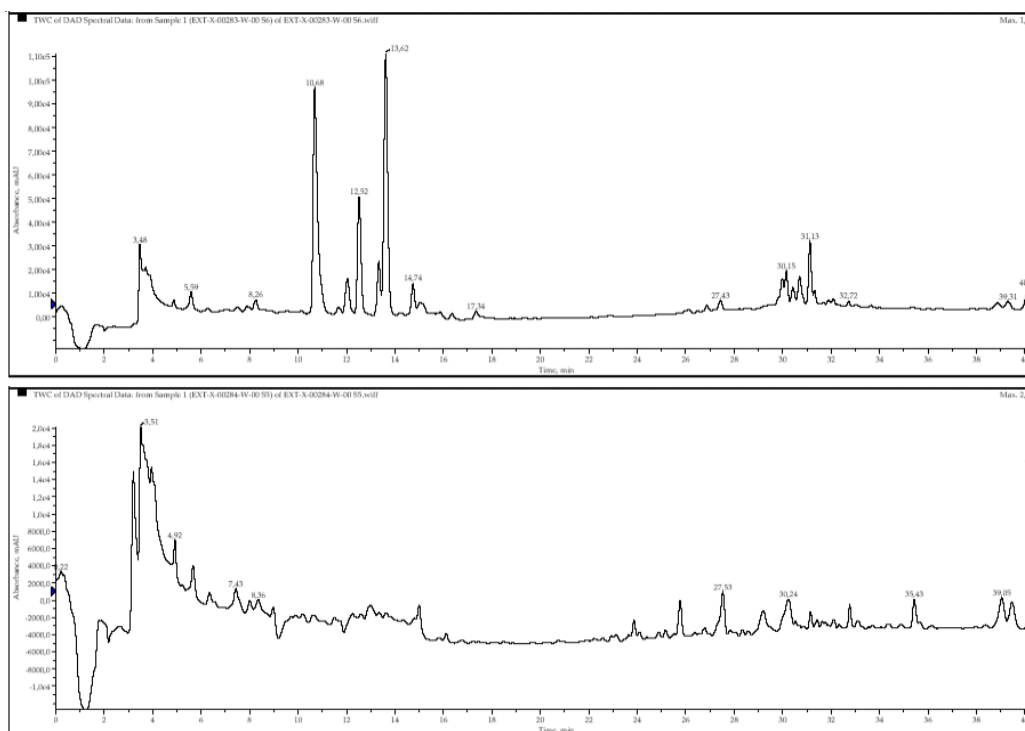


Figura 2. Cromatogramas de análisis por HPLC de biomasa de *Psidium guajava*. (1) Hojas de plantas cultivadas en campo, (2) hojas brotes cultivados *in vitro*.

En las muestras de hojas de brotes cultivados *in vitro* se aislaron 23 nuevos compuestos que no se encontraron en las hojas de plantas en campo. Los compuestos identificados pertenecen al grupo de los triterpenos, saponinas y ácidos.

La mayoría de los compuestos identificados en muestras de brotes cultivados *in vitro* y en las hojas de plantas en campo son sustancias antioxidantes y pudieran tener un efecto en el fortalecimiento del sistema inmunológico y disminuir el riesgo de tumores malignos (Jiménez, 2001; Suntornsuk, 2002).

Autores como Dicosmo y Misawa (1995), Wilken *et al.* (2003) han hecho mención a las diferencias existentes en el perfil de los compuestos aislados en el material vegetal cultivados *in vitro* respecto a las plantas cultivadas en campo en diversas especies de plantas y señalan que este resultado es debido a alteraciones en la parte funcional de genes que ocurren debido a la exposición de estímulos químicos y físicos, por lo que el cultivo de tejidos de plantas producen compuestos que no son encontrados en

plantas intactas, lo que representa una alternativa para investigar nuevas sustancias.

Los compuestos que se detectaron y no fue posible identificar constituyen una fuente importante de nuevas moléculas con posible función biológica.

Estos resultados reafirman la hipótesis de que el cultivo *in vitro* es una fuente potencial para la identificación y producción de nuevos compuestos.

CONCLUSIONES

Se comprobó que el cultivo *in vitro* influye en el perfil metabólico *Psidium guajava*. Los perfiles de expresión entre muestras de hojas de plantas cultivadas en condiciones de campo y hojas de brotes cultivados *in vitro* fueron distintos. En estas últimas se identificaron nuevos compuestos que no fue posible identificar en muestras de planta en condiciones de campo y que constituyen una fuente importante de nuevas moléculas con posible función biológica de aplicación en la industria farmacéutica.

REFERENCIAS

- Arima, H (2002) Isolation of antimicrobial compounds from guava (*P. guajava* L.) and their structural elucidation, Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(8): 1727-30
- Bhojwani, SS, Razdan MK (1996) Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition. Elsevier, Amsterdam
- Bourgaud, F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161: 839-851
- Caballero, I (2001) Propagación *in vitro* por organogénesis de la guayaba (*Psidium guajava*) var enana roja cubana EEA18-40. Tesis para optar por el grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV, Santa Clara, Cuba
- Dicosmo, F, Misawa M (1995) Plant Cell and Tissue culture: alternatives for metabolite production. Biotechnology advances 13 (3): 425-453
- Fiehn O, Mejía, K Rengifo E (2000) Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana, 2da ed. Tarea Asociación Gráfica Educativa, Lima Perú
- Jiménez, A (2001) Guava fruit (*P. guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. J. Agric. Food Chem. 49(11): 5489-93
- Kozai, T (1999) Environmental control and its effects in transplant production under artificial light. J.Kor. Soc. Hort. Cont. Sci. 114(2): 12-16
- Laguado, N, Marín M, Arenas L, Castro C (1998) Relationship among ripen indexes of guava (*Psidium guajava* L.) var. Dominicana Roja fruits, Rev. Fac. Agron. 15: 422-428
- Le Gall G, Metzdzorff S, Pedersen J, Bennett R, Colquhoun (2005) Metabolite profiling of *Arabidopsis thaliana* (L.) plants transformed with an antisense chalcone synthase gene. Metabolomics 1(2):181-198
- Massot, B, Milesi S, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A (2000) Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 62: 11-19
- MEGABOLITE@ Base de Datos Compañía Analyticon Alemania
- MINAGRI (1985) Instructivo técnico del cultivo de la guayaba. Dirección de cítricos y otros frutales. La Habana
- Mitchell, SA, Ahmad MH (2006a) A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948–2001. West Indies Medical Journal 55: 243–269
- Mitchell, SA, Ahmad, MH (2006b) Protecting our medicinal plant heritage: the making of a new national treasure. West Indies Medical Journal 29: 28–33
- Miyashita, Y, Kitaya Y, Kubota C, Kozai T (1996) Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explant leaf area, fresh weight and stem length. Scientia Horticulturae 65: 199-202
- Morgan, J, Shanks J V (2000) Determination of metabolic rate-limitations by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. J.Biotechnol.79:137-145
- Murashige, T, F Skoog (1962) A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479
- Nguyen, Q, Kosai T (1998) Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. Environ: Control. Biol. 36 (2):59-75
- Pérez, R, Mitchell S, Vargas R (2008) *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology 117: 1–27
- Peters, S, van Velzen E, Janssen HG (2009) Parameter selection for peak alignment in chromatographic sample profiling: objective quality indicators and use of control samples. Anal Bioanal Chem 394:1273–1281
- Piqueras, A, Debergh P (1999) Morphogenesis in micropropagation. En: Woong-Young, Sant S Bhojwan (eds) Morphogenesis in plant tissue cultures, pp. 443-462. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Suntornsuk, L (2002) Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. J. Pharm. Biomed. 28(5): 849-55
- Vanisree, M, Tsay S (2004) Plant Cell Cultures- An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int. J. Appl. Sci. Eng.2(1): 29-48
- Verpoorte, R, Alfermann A W (2000) Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Weekwerth, W, Wenzel K, Fiehn O (2004) Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. Proteomics 4: 78-83
- Wei, L (2000) Clinical study on treatment of infantile rotaviral enteritis with *P. guajava* L. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 20(12): 893-895
- Wilken, D, Jiménez E, Hohe A, Jordan M, Kosky RG, Schmeda G, Gerth A (2003) Production of plant active compounds applying temporary immersion systems. En: T. Hvos- Elf, W. Preil (eds). Liquid systems for *in vitro* mass propagation of plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Yamashiro, S, Noguchi K, Matsuzaki T, Miyagi K, Nakasone J, Sakanashi M, Sakanashi M, Kukita I, Aniya Y, Sakanashi M (2003) Cardioprotective effects of extracts from *Psidium guajava* L and *Limonium wrightii*, Okinawan medicinal plants, against ischemia-reperfusion injury in perfused rat hearts. Pharmacology 67(3):128-35
- Ziv, M (1999) Developmental and structural patterns of *in vitro* plants. En: Woong Y y Sant B (eds) Morphogenesis in plant tissue cultures, pp. 235-253. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht