



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
MAESTRÍA EN CULTIVOS INTENSIVOS**

Estudios agronómicos y bioquímicos para incrementar la
obtención de fitoquímicos de importancia económica
producidos por el metabolismo secundario de
Catharanthus roseus (L.) G. Don

Alumna: Ing. Agr. Norma Hortensia Alvarez

Director: Dr. Marcos Gabriel Derita

Co- Director: Dr. Carlos Alberto Bouzo

Esperanza, Octubre de 2019

“La vida no es lo que uno vivió, sino la que recuerda
y cómo la recuerda para contarla”

Gabriel García Márquez.

A mis padres, Tomasa y Eduardo

A mis hermanas María y Mónica

A mis sobrinas Juliana y Francesca.

AGRADECIMIENTOS

A Marcos Derita por su presencia y acompañamiento en todo momento a lo largo de la realización de esta tesis tanto a nivel personal como profesional, mi más sincero agradecimiento.

A Susana Bolini y Marianela Pietrobón por su incondicional amistad.

A Ileana Verrocchi por su ayuda en la obtención y procesamiento de datos.

A los alumnos, quienes me motivan a continuar en el camino de la docencia, así como también en la investigación.

Y al grupo de trabajo de la Cátedra de Cultivos Intensivos María Inés Stegmayer, Carlos Bouzo, Damián Castro, Juan Carlos Favaro, Marcela Buyatti, Paola Gabriel y Norberto Gariglio de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral.

RESUMEN

El interés por especies vegetales bioactivas se acrecentó en los últimos años principalmente para el estudio y aislamiento de moléculas útiles en la elaboración de medicamentos. En este sentido, una especie que en Argentina se conoce más ampliamente por su uso como planta ornamental es Vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don., syn. *Vinca rosea*], pero también desde hace muchos años se la utiliza como planta medicinal. Reconocida por sus más de 150 alcaloides indólicos terpénicos que ofrecen actividad antitumoral, siendo los más usados vincristina y vinblastina que son dímeros de la condensación de catarantina y vindolina. Estudios realizados hace más de cuarenta años atrás ya indicaban que la concentración de estos alcaloides era en gran medida afectada por las condiciones de crecimiento de las plantas. El relativamente bajo rendimiento (0,05 %) de estos compuestos, al momento de su procesamiento representa una gran desventaja que desafía a agrónomos, botánicos y químicos con el fin de aumentar la producción de los mismos sometiendo a la planta a diferentes estímulos estresantes. Por lo tanto, la importancia de estudiar a esta especie se acrecienta considerando que *C. roseus* es en la actualidad una de las únicas fuentes de estos alcaloides, que, en el caso de vincristina y vinblastina se encuentran presentes principalmente en las hojas. Estos alcaloides han alcanzado un papel de gran relevancia en los tratamientos quimioterapéuticos del cáncer, presentando un amplio espectro de acción en diferentes tipos de cánceres. Al respecto, en Argentina no existen trabajos científicos desarrollados para lograr una producción de biomasa estable durante el año en estos sistemas de producción. Por otra parte, se desconocen los efectos que el estrés, principalmente abiótico, podría tener sobre un incremento en la concentración de los alcaloides.

En este trabajo de tesis se propuso desarrollar el cultivo de dos variedades de Vinca: Paraná y Holanda que se sometieron a estrés hídrico y a tratamientos hormonales con el fin de evaluar su respuesta en la biosíntesis de los monómeros catarantina y vindolina. Se evaluaron las variables morfológicas área foliar, altura de la planta y número de hojas según los distintos tratamientos y se compararon con las plantas control. Además, se evaluó el contenido de materia seca una vez

cosechadas y procesadas como también el rendimiento obtenido de sus extractos procesados de manera de obtener los alcaloides bioactivos. Finalmente se analizaron de manera cualitativa por la técnica de Cromatografía en Capa Delgada, la presencia de catarantina y vindolina en las diferentes muestras, utilizando como testigos a los compuestos puros.

Los resultados mostraron que ambas variedades de Vinca se vieron afectadas por el factor estrés hídrico reduciendo las variables morfológicas; mientras que el factor orientación en el invernadero no afectó significativamente. Además, el factor variedad presentó diferencias significativas de las variables estudiadas dadas las características propias, independientemente de los niveles de estrés hídrico y orientación en el invernadero. Para cada variedad, el contenido de materia seca y porcentajes de extractos (excepto la fracción que contenía los alcaloides de interés) fueron significativamente superiores en las plantas control. Los estudios fitoquímicos demostraron la presencia de catarantina y vindolina solamente en las plantas sometidas a estrés hídrico, pero no en las plantas control. Para ambas variedades existió una clara relación entre la disminución significativa del área foliar y número de hojas con el aumento en la biosíntesis de los alcaloides catarantina y vindolina. Asimismo, la variedad Paraná sometida al nivel bajo de estrés hídrico presentó un mayor contenido de la fracción alcaloidal, siendo la combinación más apropiada para lograr mayor contenido de catarantina y vindolina.

Por otra parte, las plantas que recibieron el tratamiento hormonal combinado presentaron valores significativamente superiores de las tres variables morfológicas estudiadas, porcentaje de extractos y contenido de alcaloides de interés, independiente de la variedad. Esto sugirió un comportamiento distinto a lo que ocurrió con el estrés hídrico: frente a tratamientos hormonales, el aumento significativo de las variables morfológicas, fue acompañado del aumento en el contenido de materia extraída y alcaloides. Además, las variables fueron significativamente superiores para la variedad Paraná respecto de la Holanda, por lo que se concluye que los tratamientos hormonales podrían inducir la biosíntesis de los monómeros alcaloidales vindolina y catarantina especialmente es esta variedad.

PALABRAS CLAVES:

CATHARANTHUS ROSEUS, ESTRÉS HÍDRICO, TRATAMIENTO HORMONAL,
FITOQUÍMICA, ALCALOIDES.

ABSTRACT

The interest in bioactive plants has been increased in recent years mainly for the study and isolation of molecules useful in the preparation of medicines. Vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don., Syn. *Vinca rosea*] is widely known in Argentina as an ornamental plant, but it has also been used as a medicinal plant for many years. It is recognized for possessing more than 150 terpenic indole alkaloids that offer antitumoral activity, being vincristine and vinblastine which are dimers of the condensation of catharantine and vindoline, the most used. Previous studies indicated that the concentration of these alkaloids was greatly affected by the growth conditions of the plants. The relatively low yield (0.05%) of these compounds at the processing time represents a great disadvantage that challenges agronomists, botanics and phytochemists in order to increase their production by submitting the plant to different stress stimuli. Therefore, the importance of studying this species is increased considering that nowadays is one of the only sources of these alkaloids that have reached a great relevance in the chemotherapeutic treatments of cancer. In Argentina there are no scientific works developed to achieve a stable biomass production during the year in these production systems. On the other hand, the effects that mainly abiotic stress could have on the concentration of alkaloids are unknown.

In this thesis, it was proposed to develop the crop of two varieties of Vinca: Paraná and Holanda, submitted to water stress and hormonal treatments in order to evaluate their response in the biosynthesis of the monomers catharantine and vindoline. The morphological variables evaluated were the foliar area, the plant height and the number of leaves, according to different treatments and compared with the control plants. In addition, the dry matter content was evaluated once harvested and processed as well as the yield of the extracts enriched with the bioactive alkaloids obtained from its chemically processed. Finally, the presence of catharantine and vindoline in the different samples was analyzed qualitatively by Thin Layer Chromatography technique, using pure compounds as controls.

Results showed that both varieties of Vinca were affected by water stress factor reducing the morphological variables; while the greenhouse orientation factor did not significantly affect. In addition, the variety factor showed significant differences on the variables studied given their own characteristics, regardless of the levels of water stress and orientation in the greenhouse. For each variety, dry matter content and percentages of extracts (except for the fraction containing the alkaloids of interest) were significantly higher in the control plants. Phytochemical studies demonstrated the presence of catharantine and vindoline only in plants subjected to water stress, but not in control ones. There was a clear relationship between the significant decrease in leaf area and number of leaves with the increase in the biosynthesis of catharantine and vindoline alkaloids for both varieties. Likewise, Paraná variety subjected to the low level of water stress presented a higher content of the alkaloidal fraction, being the most appropriate combination to achieve higher content of catharantine and vindoline.

On the other hand, plants that received the combined hormonal treatment showed significantly higher values of the three morphological variables studied, percentage of extracts and content of alkaloids of interest, independent of the variety. This suggested a different behavior from what happened with water stress: compared to hormonal treatments, the significant increase in morphological variables was accompanied by the increase in the content of extracted matter and alkaloids. In addition, variables were significantly higher for Paraná variety compared to Holanda, so it is concluded that hormonal treatments could induce the biosynthesis of vindoline and catharantine alkaloidal monomers, especially in this variety.

KEY WORDS:

CATHARANTHUS ROSEUS, WATER STRESS, HORMONAL TREATMENTS,
PHYTOCHEMISTRY, ALCALOID.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Resúmenes presentados en Congresos

- Incidence of water stress in the concentration of anticancer secondary metabolites present in *Catharanthus roseus* (VINCA). XXXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal- XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Córdoba, Año 2018.
- Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de *Catharantus roseus* (VINCA) contra el patógeno de poscosecha de frutilla *Botrytis cinerea*. IV Congreso Bioquímico del Litoral y III Congreso Bioquímico del NEA. Santa Fe, Año 2017.
- Estudio agronómico y fitoquímico para mejorar la obtención de metabolitos secundarios bioactivos de *Catharantus roseus*. XX Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Año 2016.
- Determinación del efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo de *Catharantus roseus* y la biosíntesis de alcaloides activos. 39º Congreso Argentino de Horticultura. Santa Fe, Año 2016.
- Desarrollo de biofungicidas a partir de especies vegetales autóctonas para el control de hongos en poscosecha de frutas. 38º Congreso Argentino de Horticultura. Bahía Blanca, Año 2015.

Dirección de tesina de grado

- Estudio agronómico y fitoquímico para mejorar la obtención de metabolitos secundarios bioactivos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don y determinación de la capacidad antifúngica contra patógenos de poscosecha. Tesinista: Ileana Ludmila Verrocchi. Año 2017.

Participación en subsidio CAI+D

- Valorización de la poscosecha de cultivos de interés nutracéutico y medicinal (brócoli y vinca) mediante tratamientos precosecha. Director: Dr. Carlos Alberto Bouzo. Año 2017-2018.

Mención Especial

- INNOVAR Concurso Nacional de Innovaciones. Optimización del cultivo de una planta medicinal (vinca) utilizando estrés nutricional, hormonal e hídrico. Décimo segunda Edición. Año 2016.

INDICE

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	II
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE ANEXOS	X
ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1 Metabolismo primario y secundario en los vegetales</i>	2
<i>1.1.1 Una clase particular de metabolitos secundarios: los alcaloides y su historia</i>	3
<i>1.1.2 Alcaloides derivados del triptófano</i>	11
<i>1.1.3 Alcaloides indólicos terpénicos</i>	12
<i>1.1.4 Los fitoquímicos como productos beneficiosos para la salud</i>	14
<i>1.1.5 Mecanismo de Acción de los Alcaloides de Vinca</i>	15
<i>1.1.6 Antecedentes del uso medicinal de Vinca</i>	16
<i>1.1.7 Productos comerciales naturales o semisintéticos obtenidos de Vinca</i>	18
<i>1.1.8 Antecedentes del cultivo de plantas medicinales sometidas a distintos tipos de estrés y su repercusión en la biosíntesis de metabolitos secundarios activos</i>	21
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS E DE TRABAJO	23
<i>2.1 Hipótesis de trabajo</i>	24
<i>2.2 Objetivo general</i>	24
<i>2.3 Objetivos específicos</i>	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
<i>3.1- Estrés Hídrico</i>	26
<i>3.1.1 Características del sustrato, siembra y trasplante</i>	26

3.1.2	<i>Condiciones del cultivo y medición de las variables morfológicas (AF, AP y NH)</i>	28
3.1.3	<i>Cosecha y procesamiento del material vegetal</i>	30
3.1.4	<i>Extracción de alcaloides: Metodología química</i>	31
3.1.5	<i>Análisis fitoquímico de la presencia de los alcaloides catarantina y vindolina en los extractos de Vinca sometidos a estrés hídrico</i>	33
3.1.6	<i>Análisis estadístico</i>	34
3.2	<i>Tratamiento Hormonal</i>	34
3.2.1	<i>Características del sustrato, siembra y trasplante</i>	34
3.2.2	<i>Condiciones del cultivo y medición de las variables morfológicas (AF, AP y NH)</i>	34
3.2.3	<i>Cosecha y procesamiento del material vegetal</i>	35
3.2.4	<i>Extracción de alcaloides: Metodología química</i>	35
3.2.5	<i>Análisis fitoquímico de la presencia de los alcaloides catarantina y vindolina en los extractos de Vinca sometidos a tratamiento hormonal</i>	36
3.2.6	<i>Análisis estadístico</i>	36
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1	<i>Estrés hídrico</i>	38
4.1.1	<i>Condiciones ambientales</i>	38
4.1.2	<i>Efecto del estrés hídrico sobre las variables morfológicas de dos variedades de Vinca y según dos orientaciones en el invernadero</i>	38

4.1.3 Efecto del estrés hídrico sobre las variables MS y porcentaje de extractos obtenidos de dos variedades de Vinca y según dos orientaciones en el invernadero.....	48
4.1.4 Análisis cualitativo de la presencia de los alcaloides catarantina y vindolina en FC1, FC2 y liofilizados obtenidos de plantas de Vinca sometidas a estrés hídrico	54
4.1.4.1 Vinca Variedad Paraná.....	55
4.1.4.2 Vinca Variedad Holanda.....	57
4.2 Tratamiento Hormonal.....	62
4.2.1 Condiciones ambientales.....	62
4.2.2 Efecto del tratamiento hormonal sobre las variables morfológicas de dos variedades de Vinca en el invernadero.....	62
4.2.3 Efecto del tratamiento hormonal sobre las variables MS y porcentaje de extractos obtenidos de dos variedades de Vinca en condiciones de invernadero.....	67
4.2.4 Análisis cualitativo de la presencia de los alcaloides catarantina y vindolina en FC2 obtenidos de plantas de Vinca sometidas a tratamiento hormonal.....	79
4.2.4.1 Vinca Variedad Paraná.....	79
4.2.4.1 Vinca Variedad Holanda.....	80
5. CONCLUSIONES.....	84
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características del sustrato utilizado en el ensayo. Datos correspondientes a los resultados del análisis de suelos.....	27
Tabla 2: Valores medios \pm desvío estándar correspondientes al área foliar (AF, en cm ²), altura de planta (AP, en cm) y número de hojas (NH), luego de aplicar los tratamientos de estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto) para ambas variedades de Vinca (Paraná y Holanda) en las dos orientaciones (Norte y Sur) del invernadero.....	39
Tabla 3: Contrastes ortogonales de la variable área foliar (AF) para la interacción entre los factores variedad y estrés hídrico.....	40
Tabla 4: Valores medios \pm desvío estándar correspondientes a materia seca (MS), extracto etanólico total (EET), fracción clorofórmica 1 (FC1), fracción clorofórmica 2 (FC2) y liofilizado (L), luego de aplicar los tratamientos de estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto) para ambas variedades de Vinca (Paraná y Holanda) en las dos orientaciones (Norte y Sur) del invernadero.....	48
Tabla 5: Contrastes ortogonales de la variable materia seca (MS) para la interacción entre los factores variedad y estrés hídrico.....	49
Tabla 6: Contrastes ortogonales de la variable fracción clorofórmica 1 (FC1) para la interacción entre los factores variedad y orientación.....	52
Tabla 7: Valores medios \pm desvío estándar correspondientes al área foliar (AF, en cm ²), altura de planta (AP, en cm) y número de hojas (NH), luego de aplicar los tratamientos hormonales (control, ABA, MeJa, ABA+MeJa) para ambas variedades de Vinca (Paraná y Holanda) en invernadero.....	64
Tabla 8: Valores medios \pm desvío estándar correspondientes a materia seca (MS), extracto etanólico total (EET), fracción clorofórmica 1 (FC1), fracción clorofórmica 2 (FC2) y liofilizado (L), luego de aplicar los 4 niveles del factor tratamiento hormonal (control, ABA, MeJa y ABA+MeJa) para ambas variedades de Vinca (Paraná y Holanda) en invernadero.....	68

Tabla 9: Contrastes ortogonales para la interacción entre los factores variedad y tratamiento hormonal de la variable materia seca (MS).....	69
Tabla 10: Contrastes ortogonales de extractos etanólicos totales (EET) para la interacción entre los factores variedad y tratamiento hormonal.....	71
Tabla 11: Contrastes ortogonales de la variable fracción clorofórmica 2 (FC2) para la interacción entre los factores variedad y tratamiento hormonal.....	74
Tabla 12: Contrastes ortogonales de la variable liofilizado (L) para la interacción entre los factores variedad y tratamiento hormonal.....	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distintos tipos de alcaloides.....	4
Figura 2: Principales plantas que presentan alcaloides.....	5
Figura 3: Estructura de la molécula de morfina aislada del Opio (<i>Papaver somniferum</i>)....	5
Figura 4: Estructuras químicas de los alcaloides más comunes.....	6
Figura 5: Estructura química del alcaloide reserpina aislado de la especie <i>Rauwolfia serpentina</i>	7
Figura 6: Esquema de biosíntesis de los alcaloides indólicos terpénicos por condensación.....	12
Figura 7: Estructura de origen biosintético común a todos los alcaloides indólicos terpénicos: la strictosidina.....	13
Figura 8: Estructura de los dímeros vincristina y vinblastina, provenientes de la condensación de los monómeros catarantina y vindolina.....	13
Figura 9: Mecanismo de acción de los alcaloides de <i>Vinca</i> como anticancerígenos.....	16
Figura 10: Flores de <i>Vinca</i> en colores rosa, púrpura y blanco.....	17
Figura 11: Siembra y trasplante	26
Figura 12: Método de determinación inglés para el análisis de suelos.....	28
Figura 13: Estimación del área foliar para un ejemplar control de cada variedad.....	29
Figura 14: Estimación del área foliar para todos los ejemplares pertenecientes a los distintos tratamientos.....	29
Figura 15: Protocolo de extracción y purificación de alcaloides por sus propiedades ácido-base según método de Stas-Otto.....	32
Figura 16: Extracción de alcaloides.....	33
Figura 17: Condiciones de cultivo: Temperatura (T.; °C) y humedad relativa (HR; %) durante el ciclo de cultivo.....	38
Figura 18: Valores de área foliar (AF, en cm ²) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los tres niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés	

alto).....	41
Figura 19: Valores de altura de planta (AP, en cm) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H).	42
Figura 20: Valores de Altura de planta (AP, en cm) considerando únicamente los tres niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto).....	43
Figura 21: Valores de número de hojas (NH) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H)....	44
Figura 22: Valores de NH, según los 3 niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto).....	45
Figura 23: Foto de plantas de Vinca variedad: A) Paraná y B) Holanda.....	46
Figura 24: Valores de materia seca (MS, en g) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto).	50
Figura 25: Valores de extractos etanólicos totales (EET, en %) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H).....	51
Figura 26: Valores de extractos etanólicos totales (EET, en %), según los 3 niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto).....	52
Figura 27: Valores de fracción clorofórmica 2 (FC2, en % respecto del EET) para los niveles control, estrés bajo y estrés alto.....	53
Figura 28: Cromatogramas obtenidos para las FC1 correspondientes a la variedad Paraná.....	55
Figura 29: Cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad Paraná....	56
Figura 30: Cromatogramas obtenidos para los liofilizados correspondientes a la variedad Paraná.....	57
Figura 31: Cromatogramas obtenidos para las FC1 correspondientes a la variedad Holanda	58
Figura 32: Cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad Holanda	59
Figura 33: Cromatogramas obtenidos para los liofilizados correspondientes a la variedad Holanda.....	60
Figura 34: Condiciones de cultivo: Temperatura (T.; °C) y humedad relativa (HR; %)	

durante la estación de crecimiento.....	62
Figura 35: Valores de área foliar (AF, en cm ²) considerando únicamente los 4 niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa).....	65
Figura 36: Valores de altura de planta (AP, en cm) considerando únicamente los 4 niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa).....	66
Figura 37: Valores de número de hojas (NH) considerando únicamente los 4 niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa).....	67
Figura 38: Valores de materia seca (MS, en g) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los 4 niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa).....	70
Figura 39: Valores de la variable extractos etanólicos totales (EET, en % respecto a MS) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los 4 niveles del factor tratamiento hormonal: C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa).....	72
Figura 40: Valores de la variable fracción clorofórmica 1 (FC1, en % respecto de EET) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H).....	73
Figura 41: Valores de la variable fracción clorofórmica 2 (FC2, en % respecto de EET) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los 4 niveles del factor tratamiento hormonal: C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa).....	75
Figura 42: Valores de la variable liofilizado (L, en % respecto de EET) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los 4 niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa).....	77
Figura 43: Cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad Paraná...	80
Figura 44: Cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad Holanda.	81

INDICE DE ANEXOS

Anexo I: Riego de los tratamientos de las variedades Paraná y Holanda.....	100
--	-----

ABREVIATURAS

- cm^2 : centímetro cuadrado
- %: porcentaje
- $^{\circ}\text{C}$: grado centígrado
- μL : microlitro
- A: tratamiento hormonal con ácido abscísico
- ABA: ácido abscísico
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AF: área foliar
- AM: tratamiento hormonal con ácido abscísico + metiljasmonato
- ANOVA: análisis de varianza
- AP: altura de planta
- ATP: adenosín trifosfato
- BTH: Benzothiadiazol
- C: tratamiento control
- CCD: Cromatografía en Capa Delgada
- CHCl_3 : cloroformo
- cm: centímetro
- cm^3 : centímetro cúbico
- cmolc: centimol de carga
- D3H: 3-desacetilindolina hidroxilasa
- dS: deciSiemens por metro
- EA: tratamiento estrés alto (referente a estrés hídrico)
- EB: tratamiento estrés bajo (referente a estrés hídrico)
- EET: extracto etanólico total
- FC1: fracción clorofórmica 1
- FC2: fracción clorofórmica 2

- g: gramo
- H: variedad Holanda
- HA: variedad Holanda estrés alto (referente a estrés hídrico)
- HA: variedad Holanda, tratamiento con ácido abscísico (referente a tratamiento hormonal)
- HAM: variedad Holanda, tratamiento con ácido abscísico + metiljasmonato
- HB: variedad Holanda estrés bajo (referente a estrés hídrico)
- HC: variedad Holanda, tratamiento Control
- HMJ: variedad Holanda, tratamiento con metiljasmonato
- HN: variedad Holanda orientación norte (referente a estrés hídrico)
- HR: humedad relativa
- HS: variedad Holanda orientación sur (referente a estrés hídrico)
- JA: ácido jasmónico libre
- Kc: coeficiente de cultivo
- Kg: kilogramo
- KOH: hidróxido de potasio
- L: liofilizado
- LSD: Least significant difference
- m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar
- M: molar
- MeJa: metiljasmonato
- MF: materia fresca tn: tonelada
- mg: miligramo
- MJ: tratamiento hormonal con metiljasmonato
- mL: mililitro
- mM: milimolar
- MO: materia orgánica

- MPa: megapascal
- MS: materia seca
- N: norte
- NH: número de hojas
- NH₄Ac: acetato de amonio
- nm: nanometro
- p: valor p (probabilidad correspondiente al estadístico).
- P: variedad Paraná
- PA: variedad Paraná estrés alto (referente a estrés hídrico)
- PA: variedad Paraná, tratamiento con ácido abscísico (referente a tratamiento hormonal)
- PAM: variedad Paraná, tratamiento ácido abscísico + metiljasmonato
- PB: variedad Paraná estrés bajo (referente a estrés hídrico)
- PC: variedad Paraná, tratamiento Control
- PG: poder germinativo
- PMJ: variedad Paraná, tratamiento con metiljasmonato
- PN: variedad Paraná orientación norte (referente a estrés hídrico)
- ppm: partes por millón
- PS: variedad Paraná orientación sur (referente a estrés hídrico)
- PS: variedad Paraná orientación sur (referente a estrés hídrico)
- Rf: relación de frente
- S: sur
- SA: ácido salicílico
- SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- T: temperatura
- TDC: triptófano descarboxilasa
- tn: tonelada
- UV: ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo primario y secundario en los vegetales

Todos los organismos necesitan transformar e interconvertir un gran número de compuestos orgánicos que les permiten vivir, crecer y reproducirse. Necesitan proveerse de energía en forma de ATP y el suministro de bloques de construcción para desarrollar sus propios tejidos. Para este fin se utiliza una red integrada de reacciones químicas mediadas por enzimas y cuidadosamente reguladas, denominadas colectivamente metabolismo intermedio, y las vías implicadas se denominan vías metabólicas. Algunas de las moléculas importantes para la vida son los carbohidratos, proteínas, grasas y ácidos nucleicos (Dalton, 1991). Las plantas varían ampliamente en su capacidad para sintetizar y transformar estas moléculas y a pesar de las características extremadamente variadas que puedan presentar entre ellas, las vías para modificar y sintetizar estos compuestos son esencialmente similares en todas, exceptuando variaciones menores (Herbert, 2001). Estos procesos demuestran la unidad fundamental de toda la materia viva y se describen colectivamente como metabolismo primario, denominándose a los compuestos involucrados en estas vías, metabolitos primarios. A diferencia de las vías metabólicas primarias que sintetizan, degradan y por lo general interconectan compuestos comúnmente encontrados en todos los organismos (carbohidratos, proteínas, grasas y ácidos nucleicos), también existe una zona del metabolismo relacionada con compuestos que tienen una distribución mucho más limitada en la naturaleza (Cordell, 1981). Tales compuestos, llamados metabolitos secundarios, se encuentran solamente en organismos específicos o grupos de organismos, y son una expresión de la individualidad de las especies o familias. Los metabolitos secundarios no se producen necesariamente en todas las condiciones ambientales, y en la inmensa mayoría de los casos, la función de estos compuestos y su beneficio para el organismo aún no se conoce (Mothees *et al.*, 1981). Algunos se producen por razones fácilmente entendibles, por ejemplo, como productos tóxicos que proporcionan defensa contra depredadores, como atrayentes de polinizadores para favorecer el entrecruzamiento entre la

misma u otras especies, o como agentes colorantes para atraer o advertir a otros seres vivos (Misra *et al.*, 1999). Pero es lógico asumir que todos los metabolitos secundarios juegan un rol vital para el bienestar de la especie que los produce. El metabolismo secundario, es el área que proporciona la mayor parte de los productos naturales farmacológicamente activos (Dewick, 2009).

1.1.1 Una clase particular de metabolitos secundarios: los alcaloides y su historia

Uno de los tipos de compuestos producidos mediante el metabolismo secundario son los alcaloides y el término fue introducido por W. Meisner a principios del siglo XIX para designar a las sustancias naturales que reaccionan como base, es decir, como los *álcalis*. En un principio se definieron como sustancias nitrogenadas, básicas, de origen natural, de distribución restringida y estructura compleja. Su átomo de nitrógeno forma parte de un sistema heterocíclico, poseen una actividad farmacológica significativa y según algunos autores, provienen únicamente del reino vegetal (Waterman, 1993; Zenk *et al.*, 1985). Pueden encontrarse en estado de sales y se puede afirmar que biosintéticamente se forman a partir de un aminoácido. Estos elementos caracterizan a lo que se puede denominar alcaloides verdaderos. Por otra parte, algunos autores distinguen además los pseudoalcaloides y los protoalcaloides (Figura 1). Los pseudoalcaloides poseen normalmente todas las características de los alcaloides verdaderos, pero no derivan de aminoácidos. En la mayoría de los casos conocidos se trata de isoprenoides y se habla entonces de alcaloides terpénicos (monoterpénicos, sesquiterpénicos o diterpénicos) (Dalton, 1979). También se conocen sustancias nitrogenadas heterocíclicas que provienen del metabolismo del acetato, como es el caso de la conina, principio tóxico de la cicuta. Los protoalcaloides son aminas simples cuyo nitrógeno no se encuentra incluido en un sistema heterocíclico, poseen reacción básica y también se forman a partir de aminoácidos. Diversas sustancias responden a esta definición: aminas sencillas como la serotonina, la mezcalina del peyote, así como las betaínas (que resultan de la cuaternarización del nitrógeno de los aminoácidos) (Amiya y Bando, 1998; Rahman y Choudhary, 1998).

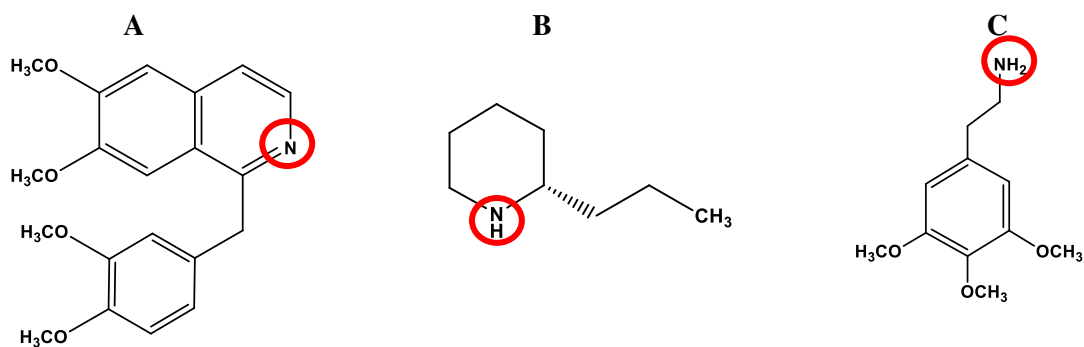


Figura 1: Distintos tipos de alcaloides: A) Alcaloide verdadero, se muestra como ejemplo la molécula de papaverina con el átomo de N heterocíclico que deriva del aminoácido tirosina. B) Pseudoalcaloide, se muestra como ejemplo la molécula de conina con el átomo de N heterocíclico, pero en este caso no deriva de un aminoácido. C) Protoalcaloide, se muestra como ejemplo la molécula de mezcalina con el átomo de N no heterocíclico. Las estructuras químicas fueron realizadas utilizando el programa chemdraw Ultra 11.0.

Aunque la distinción entre alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides puede parecer sencilla, no siempre es fácil de aplicar. Se puede, por tanto, decir que un alcaloide es un compuesto orgánico de origen natural (normalmente vegetal), nitrogenado, más o menos básico, de distribución restringida y dotado, a bajas dosis, de importantes propiedades farmacológicas. El agrupamiento de tal conjunto, se confirma por otra parte mediante reacciones comunes de precipitación con los “reactivos generales para alcaloides”.

Si bien la noción de alcaloide es bastante reciente, el conocimiento de la toxicidad y las propiedades de las plantas y de las drogas que poseen alcaloides es muy antiguo: opio (*Papaver somniferum*), coca (*Erythroxylon coca*), acónito (*Aconitum napellus*), belladona (*Atropa belladonna*), colchico (*Colchicum autumnale*), quina (*Cinchona spp*), ipecacuana (*Cephaelis ipecacuanha*) se utilizan desde hace siglos, incluso según algunos autores, desde hace milenios (Figura 2) (Bruce-Chwatt, 1988).

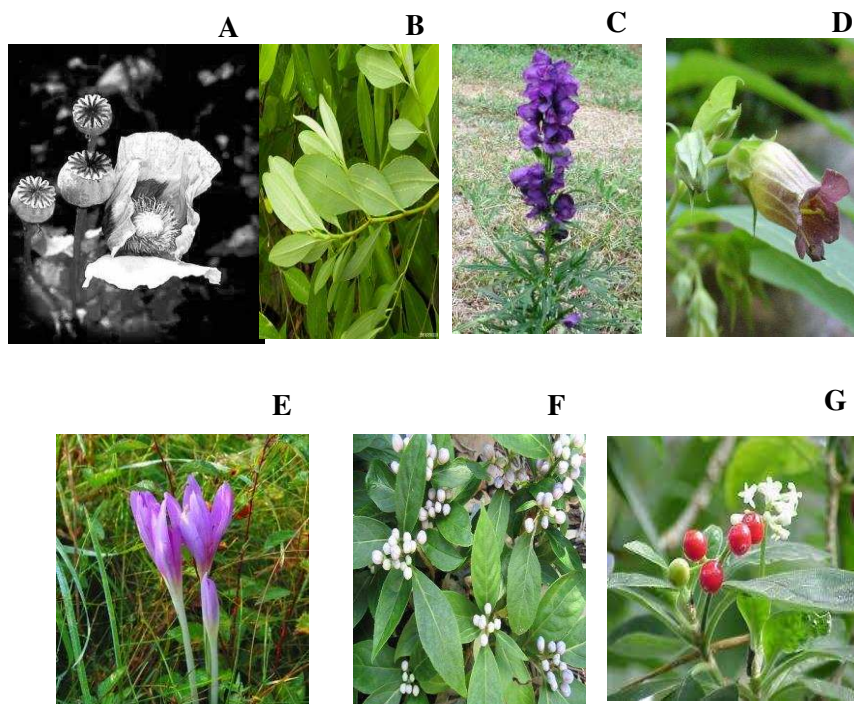


Figura 2: Principales plantas que producen alcaloides: A) opio (*Papaver somniferum*), B) coca (*Erythroxylon coca*), C) acónito (*Aconitum napellus*), D) belladona (*Atropa belladonna*), E) cólchico (*Colchicum autumnale*), F) quina (*Cinchona spp*), G) ipecacuana (*Cephaelis ipecacuanha*). Fuente: libro Dewick 2009.

Parece ser que el químico Derosne en 1803 fue el primero en aislar un álcali vegetal a partir de una mezcla de narcotina y morfina del opio (Figura 3).

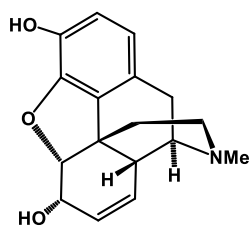


Figura 3: Estructura de la molécula de morfina aislada del Opio (*Papaver somniferum*).

En 1806, el médico Serturmer demostró la naturaleza alcalina del principio somnífero del opio al que una decena de años más tarde, denominó morfina haciendo referencia a Morfeo,

el Dios griego del sueño. Poco tiempo después, dos farmacéuticos franceses, Pelletier y Caventou, descubrieron una importante serie de compuestos activos: entre 1817 y 1820 fueron aisladas cafeína de varias familias vegetales, emetina de la ipecacuana, estricnina de la nuez vómica, quinina y cinconina de la corteza de quina (Figura 4) (Boshc *et al.*, 1996; Quetin-Leclercq *et al.*, 1990).

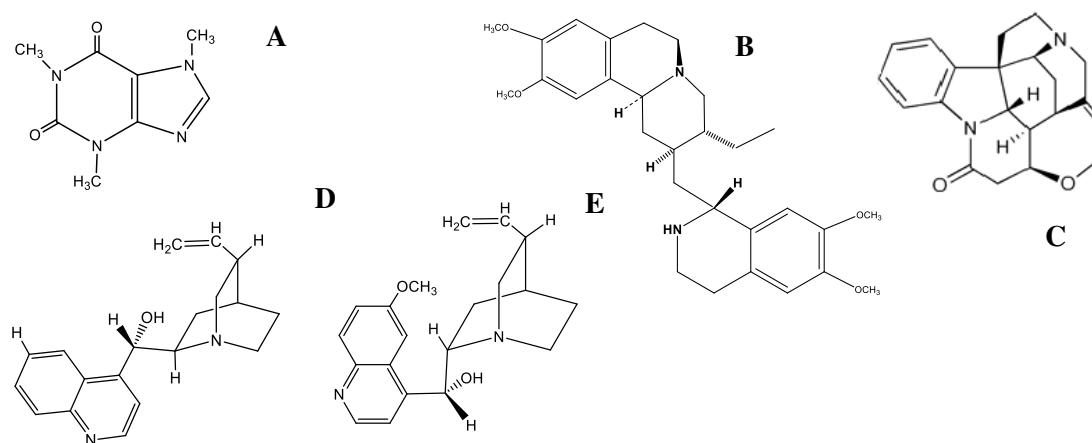


Figura 4: Estructuras químicas de los alcaloides más comunes: A) cafeína, B) emetina, C) estricnina, D) quinina, E) cinconina.

Los químicos intentaron enseguida determinar la elucidación estructural de estas moléculas, lográndolo en los casos más sencillos, mientras que en otros casos hubo que esperar hasta la segunda mitad del siglo XX cuando aparecieron las tecnologías más sofisticadas. En la actualidad, las avanzadas técnicas de resonancia magnética nuclear (de protón y carbono) y la espectrometría de difracción de rayos X, permite abordar las estructuras químicas más complejas. La síntesis de estos compuestos constituyó muy pronto un desafío para los químicos: desde la síntesis de la conína (Figura 1B) a final del siglo pasado hasta la morfina (Figura 3), este desafío ha significado un importante papel en el desarrollo de la química orgánica. El aislamiento de la reserpina (Figura 5), a principios de los años 50, y el éxito en terapéutica de esta molécula, han incitado a los fitoquímicos a realizar la exploración sistemática del amplio campo de los alcaloides.

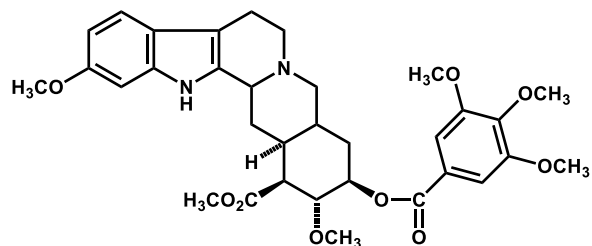


Figura 5: Estructura química del alcaloide reserpina aislado de la especie *Rauwolfia serpentina*.

El número de estructuras descritas no deja de aumentar y los datos estructurales biosintéticos, sintéticos o farmacológicos son en la actualidad considerables. En algunos casos, las moléculas originales han sido introducidas en clínica (como los alcaloides binarios de *Catharanthus roseus*) y en muchos otros casos se han sintetizado y comercializado análogos estructurales. También se han puesto a punto actividades farmacológicas potenciales, lo que conlleva desarrollos en las direcciones más variadas: síntesis química, relaciones estructura/actividad y estudio de receptores entre otros (Rahman y Choudhary, 1999).

Durante mucho tiempo los alcaloides han sido considerados como productos del metabolismo únicamente vegetal, pero también existen estructuras alcaloídicas en los animales. A veces se trata de productos formados a partir de alcaloides contenidos en los vegetales de la dieta alimenticia del animal: es el caso de la castoramina, que proviene de la metabolización de los alcaloides de los nenúfares que consume el castor, o bien el de los alcaloides pirrolizidínicos que se encuentran en algunas mariposas. Otras veces los alcaloides aislados parecen ser productos del metabolismo animal: este es el caso especial de los anfibios urodelos (salamandras) o de los anuros (*Bufo*, *Phyllobates*, *Dendrobates*) (Hartmann, 1999).

Las estructuras alcaloídicas son frecuentes en los artrópodos que las secretan en cantidades muy pequeñas a través de sus glándulas exócrinas. Son muy conocidos en los himenópteros, pero también son elaborados y utilizados en coleópteros, neurópteros y algunos miriápodos. Las pirrolidinas, piperidinas, pirroles, indolizidinas y pirazinas, de bajo peso molecular, son lo suficientemente volátiles como para constituir señales químicas, elementos de

defensa (alomonas) y de comunicación (feromonas) entre estos insectos (O'Hagan, 2000; Schneider, 1996; Michael, 2000).

Los alcaloides se encuentran excepcionalmente en las bacterias (piocianina en *Pseudomonas aeruginosa*), son muy raros en los hongos (psilocina en los hongos alucinógenos de América Central; ergolinas en los *Claviceps* y otros Actinomicetos). Las Pteridófitas (helechos) raramente poseen alcaloides, su principal excepción la constituyen las Lycopodiaceae que poseen alcaloides derivados de la lisina. Idéntica observación puede aplicarse a las Gimnospermas que presentan alcaloides en el género *Cephalotaxus*. Los alcaloides son, por tanto, compuestos que se encuentran esencialmente en las Angiospermas y algunos autores estiman que entre un 10 y 15% de ellas sintetizan este tipo de moléculas. Algunas familias de esta clase poseen una marcada tendencia a biosintetizar alcaloides: esto ocurre tanto en las Monocotiledóneas (Amaryllidaceae y Liliaceae) como en las Dicotiledóneas (Annonaceae, Apocynaceae, Fumariaceae, Lauraceae, Loganiaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae y Solanaceae) (Hoshino, 1998; Lewis, 2001; Scott y Goa, 2000). En estas familias algunos géneros contienen alcaloides mientras que otros se encuentran desprovistos de ellos; en pocos casos existen alcaloides en todos los géneros (Papaveraceae). Algunos alcaloides existen en varios géneros pertenecientes a diferentes familias a veces muy alejadas taxonómicamente (cafeína), más comúnmente en familias próximas (reticulina y yohimbina). Otros alcaloides son característicos de un número limitado de géneros pertenecientes a una sola familia (hiosciamina) o de un grupo de especies de un mismo género (tebaína); otros alcaloides son altamente específicos (morfina exclusivamente presente en el opio) (Browntein, 1993; Chiara y North, 1992).

El contenido de alcaloides en una planta, varía entre límites muy amplios: desde algunas ppm, como en el caso de los alcaloides de vinca cuyo contenido alcanza tan sólo tres g de vinblastina por tn/MF, hasta más de 15% de la MF en el caso de cortezas del tronco de quina (*Cinchona ledgeriana*) (Hunter, 1988). Las plantas con alcaloides casi nunca contienen un único alcaloide. Si bien a veces existe un compuesto muy mayoritario por ejemplo la hiosciamina en

las hojas de belladona, generalmente las plantas producen una mezcla compleja de alcaloides, dominada por un compuesto mayoritario. No es extraño que en una misma droga vegetal se encuentren presentes varias decenas de alcaloides. Por regla general, todos los alcaloides de una misma planta poseen el mismo origen biogénico, incluso cuando sus estructuras puedan parecer bastante diferentes. Además, en una determinada planta, el contenido de alcaloides puede ser muy desigual según los órganos y hasta algunos pueden carecer de ellos. Tal es el caso de la quinina, que se acumula en las cortezas del tronco de las especies de *Cinchona*, pero que no se encuentra en las hojas de las mismas; al igual que la conesina, que se acumula solamente en las semillas y las cortezas de kurchi (*Holarrhena pubescens*) mientras que no aparece en sus hojas (Verpoorte *et al.*, 1988).

En el reino vegetal, los alcaloides se encuentran en forma soluble como sales o en combinación con taninos. La histoquímica permite comprobar que los alcaloides se localizan generalmente en tejidos periféricos: capas externas de las cortezas de tallo y raíz, tegumento de las semillas, etc. Normalmente la síntesis de estos alcaloides se realiza a nivel de determinadas partes de la planta (raíz en crecimiento, células especializadas de los laticíferos, cloroplastos) y posteriormente son transportados a su lugar de almacenamiento.

Como ocurre con otros metabolitos secundarios, se sabe muy poco sobre el rol de los alcaloides en los vegetales, pero se cree que algunos podrían intervenir en las relaciones plantas-depredadores a modo de protección. Si se admite que la diversidad estructural es el reflejo de una adaptación constante, esta última sería una hipótesis probable. Los alcaloides poseen masas moleculares que varían entre 100 y 900 g mol⁻¹. Aunque la mayoría de los no oxigenados (nicotina, esparteína, coníina) son líquidos a temperatura ambiente, los que contienen oxígeno en su fórmula (como ocurre en casi todas las estructuras conocidas) son normalmente sólidos cristalizables y raramente coloreados. Casi siempre son capaces de desviar el plano de la luz polarizada, es decir que presentan actividad óptica. Una vez cristalizados, dan puntos de fusión netos, sin descomposición por debajo de los 200 °C. Por regla general, los alcaloides en su estado natural son insolubles o muy poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos

apolares o poco polares y solubles en alcoholes de elevada graduación. La basicidad de los alcaloides es muy variable y esta propiedad se encuentra estrechamente ligada a la disponibilidad de los electrones libres disponibles del átomo de nitrógeno. Los agrupamientos electro-atrayentes adyacentes al átomo de nitrógeno disminuyen la basicidad mientras que los grupos electro-donadores, la exaltan. La basicidad también se encuentra influida por los impedimentos estéricos (al menos en moléculas policíclicas complejas) y es un factor de inestabilidad en estas, que al estado de base y en disolución, son sensibles al calor, la luz y el oxígeno. La basicidad de los alcaloides les permite formar sales con ácidos minerales (clorhidratos, sulfatos, nitratos) u orgánicos (tartratos, maleatos). Las sales de alcaloides son generalmente solubles en agua y en alcoholes diluidos mientras que, salvo raras excepciones, son insolubles en disolventes orgánicos. Las sales cristalizadas se conservan bastante bien y constituyen habitualmente la forma comercial de estas moléculas (Manske, 1950; Bruneton, 1993). En el caso de los alcaloides verdaderos, el precursor es un aminoácido como ornitina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina o ácido antranílico. La formación de un alcaloide puede necesitar la intervención de una única o de varias moléculas de aminoácido. Los acoplamientos oxidativos, la oxidación de los núcleos aromáticos, las esterificaciones, etc., justifican la existencia de numerosas variaciones estructurales. Finalmente, los alcaloides son sustancias que poseen especial interés por sus actividades farmacológicas a nivel del sistema nervioso central y del sistema nervioso autónomo. Funcionan también como anestésicos locales (cocaína), antifebriles (quinidina), antitumorales (vinblastina, elipticina), antipalúdicos (quinina) y amebicidas (emetina) (Johnson y Emcho, 1994; Pelletier, 1983).

Estas diferentes actividades farmacológicas, conducen a una importante utilización de las drogas con alcaloides. Una parte de los alcaloides extraídos puede ser transformada: la mayoría de la codeína se obtiene por metilación de la morfina; la quinina se puede convertir en quinidina; la serpentina en ajmilicina y la tabersonina en vincamina. En algunos casos, la industria prefiere producir directamente estos productos por síntesis química como es el caso de teofilina y papaverina, que se obtienen fácilmente de este modo. La preocupación por mejorar la

eficacia terapéutica, conduce a veces a transformaciones más profundas, incluso a síntesis totales de moléculas análogas, utilizando o no materias primas de origen natural, vegetal o productos de fermentación (sobre todo los derivados de los alcaloides del cornezuelo de centeno y de los alcaloides binarios de los *Catharanthus*) (Bruneton, 1993; Lounasmaa y Tolvanen, 1992). Las hojas de Jaborandi son la única fuente conocida de pilocarpina, un alcaloide de imidazol probablemente derivado de la histidina (Maat y Beyerman, 1983). La aplicación farmacéutica más importante de pilocarpina es para reducir la presión intraocular en el tratamiento del glaucoma (Migdal, 2000; Webster *et al.*, 1993). También es un estimulante de la salivación y la transpiración y recientemente se ha prescrito para el tratamiento de la xerostomía, que es la reducción de la producción de saliva, muy común en pacientes sometidos a radioterapia (Davies *et al.*, 2001; Wynn, 1996).

1.1.2 Alcaloides derivados del triptófano

El grupo de los alcaloides derivados del metabolismo del triptófano es muy numeroso. El interés terapéutico de estas estructuras se ha confirmado por la comprobación de propiedades antitumorales en los alcaloides binarios de Vinca de Madagascar, *Catharanthus roseus*. Además del interés farmacológico y terapéutico de este grupo de alcaloides se añade el interés químico evidente: la variedad estructural que ofrece, los interrogantes biosintéticos que provoca y los retos sintéticos que suscita, son temas de lo más estimulantes (Ihara y Fukumoto, 1996; Verpoorte *et al.*, 1997).

El triptófano es el precursor de estos alcaloides, pero no es el único: acetato, mevalonato, secologanósido y otras moléculas pueden combinarse con la triptamina, producto de la descarboxilación del triptófano, de lo que resulta la variedad estructural mencionada anteriormente, dando lugar a los alcaloides indólicos terpénicos (Figura 6) (Bruneton, 1993).

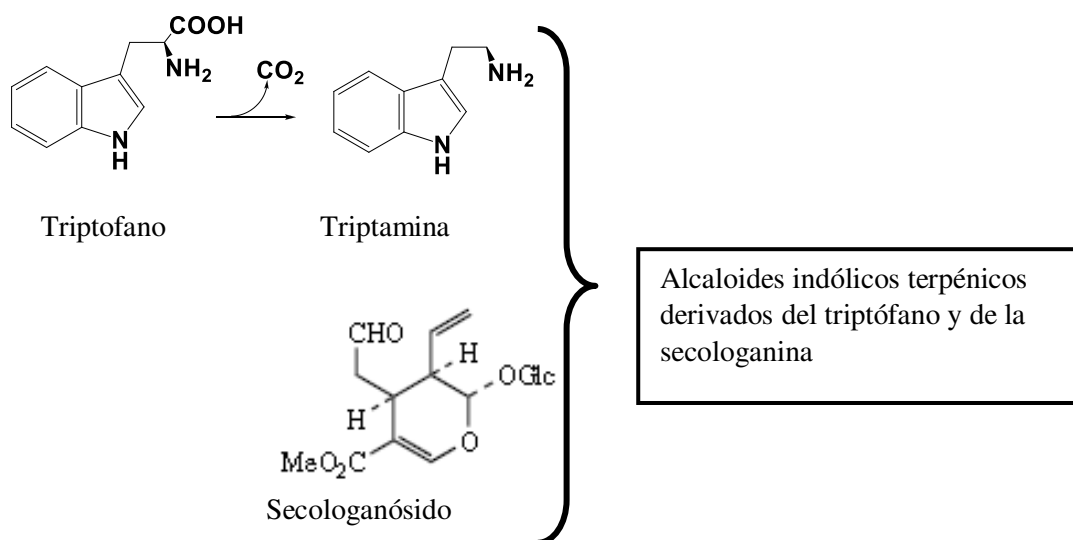


Figura 6: Esquema de biosíntesis de los alcaloides indólicos terpénicos por condensación de una molécula de triptamina (proveniente de la descarboxilación del triptófano) y una molécula de secologanósido (proveniente de la vía del mevalonato).

1.1.3 Alcaloides indólicos terpénicos

Pertenecen a uno de los grupos de alcaloides derivados del triptófano y la distribución de ellos está limitada a tres familias vegetales del orden de las Gentianales: Apocynaceae, Loganiaceae y Rubiaceae, siendo la familia Apocynaceae la más importante en cuanto al número de alcaloides aislados, al número de los que se encuentran comercializados en la actualidad y a sus potencialidades farmacológicas, utilizadas o no (Hibino y Choshi, 2001; Kutchan, 1993; Leonard, 1999; Stöckigt y Ruppert, 1999; Toyota y Ihara, 1998).

La característica más notable de los alcaloides de este grupo es sin duda su origen biosintético común: todos los compuestos conocidos provienen de un precursor único, la estrictosidina (Figura 7). Esta molécula heterosídica (glucosídica) procede de la condensación de una molécula de triptamina y de un aldehído monoterpénico, el secologanósido, que proviene de la vía del ácido mevalónico (Figura 6) (Bruneton, 1993; Verpoorte *et al.*, 1998).

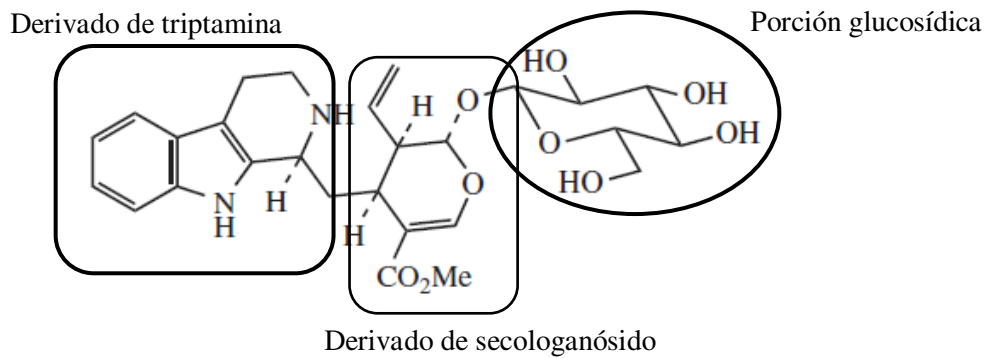


Figura 7: Estructura de origen biosintético común a todos los alcaloides indólicos terpénicos: la strictosidina (molécula glucosídica proveniente de la condensación de triptamina y secologanósido).

Los alcaloides indólicos terpénicos de interés farmacológico presentes en *Catharanthus* (vincristina y vinblastina) son de tipo binarios, compuestos por los monómeros catarantina y vindolina (Figura 8) (Kutney, 1990; Saxton, 1994).

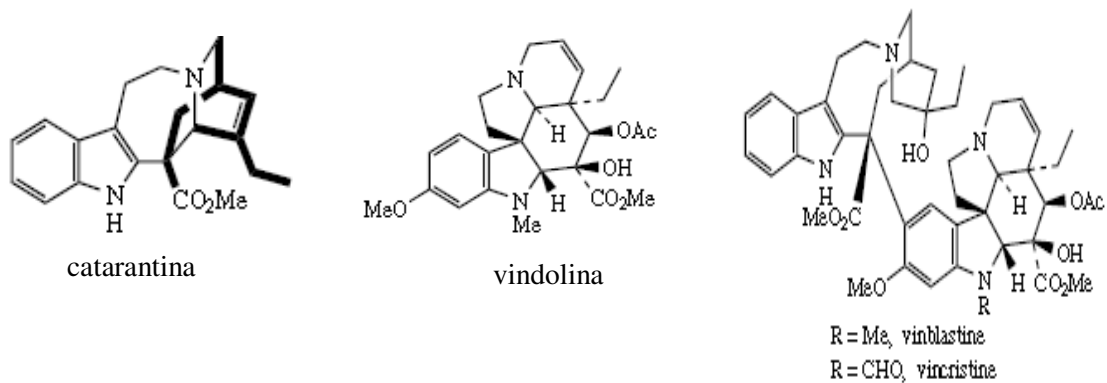


Figura 8: Estructura de los dímeros vincristina y vinblastina, provenientes de la condensación de los monómeros catarantina y vindolina. Fuente: libro Dewick 2009.

1.1.4 Los fitoquímicos como productos beneficiosos para la salud

Mediante el término “fitoquímicos” se definen básicamente a compuestos terpenoides, fenólicos y polifenólicos, alcaloides y compuestos azufrados, los cuales pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud humana (Crozier *et al.*, 2006), como así también para su uso en la agricultura (Ribera y Zuniga, 2012). Desde el punto de vista del consumo humano, la mayoría de éstos compuestos no ejercen un rol nutricional, puesto que no se trata de sustancias indispensables para el organismo (Davies y Espley, 2013). Sin embargo, suponen una protección adicional contra la acción nociva de sustancias provenientes de la dieta y del entorno ambiental y que afectan a la salud de la población (Chandra, 2013).

A este efecto de retardar y/o suprimir procesos dañinos como la carcinogénesis, se lo denomina en conjunto quimio-prevención, a través de los alimentos que contienen carotenoides, polifenoles, vitaminas, antioxidantes y otros fitoquímicos de efectos comprobados (Murakami *et al.*, 1998). Este amplio espectro de acción de los fitoquímicos presentes en las plantas, origina el concepto de alimentos “funcionales” y “nutracéuticos” (Silveira Rodriguez *et al.*, 2003). En el primer caso, el efecto beneficioso para la salud humana se ejerce a través de su consumo; en el segundo caso y dado su frontera etimológica con el concepto de medicamento, su valor está dado por la posibilidad de aislar algunas de sus moléculas para la elaboración de fármacos. Así, un producto nutracéutico, es aquel que fue aislado o purificado de fuentes vegetales para su uso como aditivos alimentarios o directamente para la fabricación de fármacos con el fin de proteger o inhibir el desarrollo de ciertas enfermedades (Jacobo-Velázquez *et al.*, 2009).

El interés por especies vegetales que produzcan nutracéuticos aumentó en los últimos años principalmente debido al estudio y aislamiento de moléculas útiles para la elaboración de medicamentos. En este sentido, una especie que en Argentina se conoce más ampliamente por su uso como planta ornamental, es Vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don., syn. *Vinca rosea*) (Acosta y Rodríguez, 2002). Reconocida por sus más de 150 alcaloides indólicos terpénicos que ofrecen actividad antitumoral, siendo los más usados vincristina y vinblastina (Kutney, 1993; Noble, 1990; Vázquez-Flota y De Luca, 1998). La importancia de estos fitoquímicos está dada

en que son insumos farmacéuticos esenciales para la elaboración de fármacos oncológicos, siendo los diferentes tipos de cáncer, una de las diez principales causas de muerte en el mundo según la Organización Mundial de la Salud. Por lo tanto, la importancia de estudiar a esta especie se acrecienta considerando que *C. roseus* es en la actualidad una de las únicas fuentes de estos alcaloides (Costa *et al.*, 2008) que han alcanzado un papel de gran relevancia en los tratamientos quimioterapéuticos, presentando un amplio espectro de acción, en diferentes tipos de cánceres (Dong *et al.*, 1995; Koul *et al.* 2013).

1.1.5 Mecanismo de Acción de los Alcaloides de Vinca

Las secuencias básicas que conducen a la división celular están bien establecidas, pero muchos aspectos específicos de la mitosis y de la replicación del ADN son poco comprendidos por los biólogos moleculares. Se sabe que la implicancia de una fibra dinámica de tipo tubular constituida por proteínas (α y β tubulina), conocida como microtúbulo, es esencial para que los procesos de división celular se produzcan. Entre las funciones conocidas de los microtúbulos está la de soporte celular, actuando como una forma de andamio interno, otorgándole a la célula forma y estructura organizada. Sin embargo, posiblemente el papel más importante de los microtúbulos es la formación del huso mitótico que está íntimamente involucrado en la replicación celular. Durante este proceso, la célula debe duplicar completamente sus componentes internos incluyendo el conjunto de su ADN, de modo que pueda formar dos células hijas idénticas. Una vez que se ha completado la duplicación de los componentes internos, la célula debe ordenar su ADN en dos conjuntos idénticos de cromosomas y separarlos en los extremos opuestos y de esta manera estará lista para formar los núcleos de las células hijas. Esta ordenación y reubicación del material genético se conoce como mitosis, que es un proceso constituido por cinco fases: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. En todas estas fases los microtúbulos ejercen un rol fundamental y, por lo tanto, si se evitara su formación en una célula tumoral, los cromosomas no podrían separarse, la célula no se reproduciría y por lo tanto el tumor no se propagaría. En este sentido, los agentes que interfieren

con la dinámica de la polimerización de la tubulina, pueden actuar como inhibidores de la división celular. De hecho, se ha demostrado que los alcaloides de Vinca usados clínicamente, actúan como agentes anticancerígenos a través de este mecanismo (Figura 9) (Jordan *et al.*, 1998).

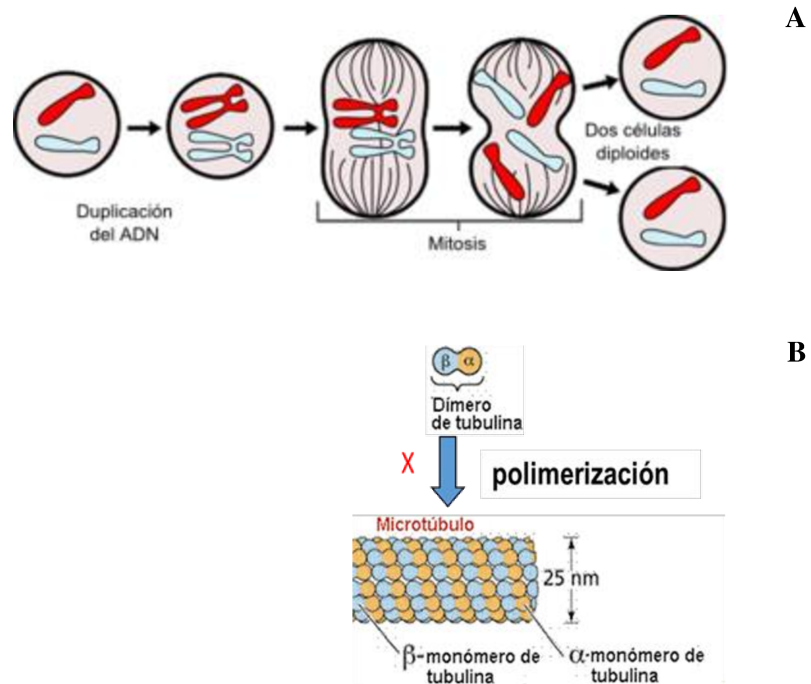


Figura 9: Mecanismo de acción de los alcaloides de Vinca como anticancerígenos. A) Etapas del proceso de mitosis que produce la proliferación celular. B) Inhibición de la polimerización del dímero de tubulina que forma los microtúbulos esenciales en el huso mitótico. Modificado de Dewick, 2009.

1.1.6 Antecedentes del uso medicinal de Vinca

C. roseus pertenece a la familia Apocynaceae. Es un subarbusto con tallos leñosos en su base, hojas opuestas con limbo oval y entero, generalmente con el ápice redondeado. Las flores son muy decorativas y de colores rosa, púrpura o blanco. Es originaria de Madagascar, pero se cultiva actualmente en muchas partes del mundo incluyendo Estados Unidos, Europa, India, Australia y América del Sur. Se utiliza en numerosas regiones como planta con fines

ornamentales, así como también para abastecer a la industria farmacéutica (Figura 10).



Figura 10: Flores de Vinca en colores rosa, púrpura y blanco.

La planta fue investigada originalmente por la potencial actividad hipoglucémica y se la usaba en forma de infusión para pacientes diabéticos. Aunque los extractos de plantas no tuvieron efectos comprobables sobre los niveles de azúcar en sangre en conejos, los animales en ensayo sucumbieron a una infección bacteriana debido a leucopenia (disminución de los glóbulos blancos), entonces se sugirió un potencial citotóxico de la planta que posteriormente fue demostrado este efecto en su extracto alcaloidal (Dewick, 2009).

Por todo lo mencionado anteriormente, Vinca es una planta de gran interés farmacéutico ya que se considera que es una fábrica de productos químicos, particularmente de alcaloides indólicos terpénicos que presentan importantes actividades farmacológicas. En cuanto a los compuestos anticancerígenos vinblastina y vincristina, que derivan de la unión de los monómeros catarantina y vindolina (Figura 8), se sabe que es extremadamente pequeño el porcentaje de ellos en las plantas de Vinca y la obtención de los mismos es un proceso muy costoso. Los bajos niveles se asocian a la separación espacial de los sitios biosintéticos en dónde se producen estos compuestos, así como también debido al alto grado de especialización de algunas células foliares en dónde se produce la unión de los monómeros (Almagro *et al.*, 2015).

La catarantina se acumula casi exclusivamente en la cera de los exudados de la superficie foliar, mientras que la vindolina se produce en células foliares especializadas internas, lo que sugiere la necesidad de los procesos de transporte para que el ensamble de ambas moléculas se logre. Los bajos niveles de alcaloides indólicos terpénicos con actividad anticancerígena encontrados en las plantas, han estimulado el esfuerzo de investigación con el

objetivo de obtener cultivos de *C. roseus* en invernaderos con una mayor producción de estos (Roepke *et al.*, 2010).

Las partes aéreas de esta planta contienen entre 0,2 y 1% de alcaloides de interés. Éstos forman una mezcla compleja, todos ellos poseen estructura indólica o dihidroindólica y los compuestos farmacológicamente activos son alcaloides formados por el acoplamiento de dos alcaloides monómeros. Esta estructura especial ha llevado a denominar a estos alcaloides dímeros o alcaloides bisindólicos pero químicamente no se trata de dímeros, por lo que es preferible hablar de alcaloides binarios (Brossi y Suffness, 1990; Kutney, 1990).

1.1.7 Productos comerciales naturales o semisintéticos obtenidos de Vinca

Los alcaloides binarios de Vinca se comercializan en forma de liofilizado o en disoluciones salinas destinadas solamente a la vía intravenosa en los siguientes casos:

Sulfato de vincristina: está indicado en monoterapia de leucemias agudas. En quimioterapia de asociación, está especialmente indicado en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin (cáncer de una parte del sistema inmunitario llamado sistema linfático). La enfermedad puede diseminarse a los ganglios cercanos, también puede diseminarse a los pulmones, el hígado o la médula ósea), en linfomas no Hodgkinianos (cáncer del tejido linfático: éste tejido se encuentra en los ganglios linfáticos, el bazo y otros órganos del sistema inmunitario), en cánceres de mama y de cuello de útero, en cánceres de pulmón de células pequeñas, en rhabdomyosarcomas (tumores cancerosos malignos en los músculos que van adheridos a los huesos que afecta principalmente a niños) y en diversos sarcomas (Nirmala *et al.*, 2011).

Otra característica del sulfato de vincristina que se ha descrito, es en el tratamiento de varios trastornos hematológicos no malignos tales como la trombocitopenia refractaria autoinmune (trastorno autoinmune adquirido caracterizado por una disminución transitoria o persistente del recuento de plaquetas con riesgo incrementado de sangramiento, fundamentalmente en los adultos y niños), en el síndrome urémico hemolítico (infección en el aparato digestivo que produce sustancias tóxicas, éstas destruyen los glóbulos rojos causando

lesión en los riñones) y en la púrpura trombocitopénica trombótica (trastorno de la sangre que provoca la formación de coágulos de sangre en pequeños vasos sanguíneos alrededor del cuerpo y lleva a un bajo conteo plaquetario) (Moudi *et al.*, 2013).

Sulfato de vinblastina: está indicado en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y de linfomas no Hodgkinianos, en cánceres de testículo de avanzado estadio, en epiteloma de mama y de ovario, en el sarcoma de Kaposi (tumor canceroso del tejido conectivo y a menudo está relacionado con el SIDA), en coriocarcinomas (cáncer de crecimiento rápido que ocurre en el útero de la mujer) y en algunos casos de histiocitosis (grupo de trastornos o "síndromes" que involucran un incremento anormal en el número de glóbulos blancos especializados). Posee actividad antitumoral, además de linfosarcoma (tumores malignos de los ganglios y tejido linfóide de diversos órganos), coriocarcinoma, neuroblastoma, carcinoma de mama, pulmones y otros órganos en la leucemia aguda y crónica (Nirmala *et al.*, 2011; Junaid *et al.*, 2010).

Vindesina (derivado semisintético de vinblastina) que inhibe la función de la tubulina durante la metafase del ciclo de división celular y comercializada como sulfato. Se encuentra indicada en el tratamiento de leucemias agudas linfoblásticas y en linfoma maligno. También se encuentra indicada en el tratamiento de algunos tumores sólidos de mama, esófago, vías aerodigestivas superiores, cáncer pulmonar, enfermedad de Hodgkin, eritremia aguda (enfermedad que se produce cuando el exceso de glóbulos rojos es resultado de una anomalía en la médula ósea) y panmielosis aguda (cicatrización o fibrosis progresiva de la médula ósea que deteriora su capacidad para producir células sanguíneas, causando síntomas tales como anemia y agrandamiento del hígado y del bazo) (Zhu *et al.*, 2014).

Vinorelbina (derivado semisintético de vinblastina) y comercializado como ditartrato para disolución inyectable que actúa preferentemente sobre los microtúbulos mitóticos y poco sobre los microtúbulos axonales lo que la hace menos tóxica que las anteriores. Sus indicaciones actuales son el cáncer de mama metastásico o cáncer de próstata y el de bronquios que no sea de células pequeñas. Además, la vinorelbina fue aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos para tratar a pacientes con cáncer de pulmón avanzado en los Estados Unidos

(Gregory y Smith, 2000). La toxicidad neurológica es limitada, pero causa estreñimiento y pérdida de reflejos osteotendinosos (reflejos obtenidos en la exploración neurológica clínica por percusión con un martillo de reflejos del tendón de un músculo para provocar su contracción refleja). La frecuencia de efectos indeseables es menor que con otros productos como la vindesina, pero la toxicidad hematológica (disminución de los leucocitos granulosos en la sangre) es importante, lo que limita su posología. Es más eficaz que la vindesina para el tratamiento de cáncer de bronquios que no sea de pequeñas células y que sea inoperable, mejora además significativamente la supervivencia media de los enfermos. El establecimiento de la posología y la administración de estos alcaloides tanto como el comportamiento y vigilancia del tratamiento, así como la prevención de efectos secundarios, imponen la competencia de servicios especializados. En la mayoría de los casos, la vincristina y la vinblastina se encuentran incluidas en protocolos complejos de poliquimioterapia.

Como la mayoría de las moléculas que ejercen actividad antitumoral, los alcaloides binarios de *Catharanthus* poseen una elevada toxicidad: la vinblastina es fuertemente leucopeniante (disminución del número de leucocitos en la sangre), lo que también limita su posología. Induce trastornos gastrointestinales (náuseas, vómitos, estreñimiento de tipo oclusivo, etc.). También pueden observarse trastornos neurológicos, cefaleas, neuritis (inflamación de un nervio y de sus ramificaciones que suele ir acompañada de atrofia muscular y de dolor a lo largo del recorrido del nervio), pérdida de reflejos osteotendinosos, depresión, trastornos respiratorios, así como alopecia (ausencia o caída del cabello en las zonas que normalmente lo poseen). La vincristina ejerce sobre todo efectos neurotóxicos centrales (posibles crisis convulsivas) y periféricos como dolores neuríticos, mialgias (sensación de dolor aguda, convulsiva y tirante en un músculo) y efectos digestivos (estreñimiento). Pueden observarse otros efectos indeseables: alopecia, disnea (dificultad en la respiración), broncoespasmo (contracción anormal del músculo liso de los bronquios que puede provocar un estrechamiento u obstrucción aguda de las vías respiratorias), cefaleas, ceguera transitoria, ulceración bucal, amenorrea (ausencia de la menstruación), azoospermia (alteración del semen que afecta a su

calidad e impide el embarazo), etc. Estos alcaloides están contraindicados en el embarazo y lactancia. Ambas moléculas son muy irritantes (Bruneton, 1993; Wall y Wani, 1993).

1.1.8 Antecedentes del cultivo de plantas medicinales sometidas a distintos tipos de estrés y su repercusión en la biosíntesis de metabolitos secundarios activos

Se sabe desde hace tiempo que la biosíntesis de moléculas orgánicas derivadas del metabolismo secundario se incrementa cuando las plantas se encuentran sometidas a algún tipo de estrés (Bartwal *et al.*, 2013). Varios estudios han demostrado que los metabolitos secundarios de las plantas aumentan según diferentes condiciones estresantes y tal es el caso de los alcaloides. Por ejemplo, el contenido de alcaloides del tropano en *Datura innoxia* y alcaloides de pirrolizidina en *Senecio longilobus* y *Phalaris tuberosa* ha sido aumentado como resultado del estrés hídrico (Brachet y Cosson, 1986; Briske y Camp, 1982; Kennedy y Bush, 1983). En el caso de *C. roseus* que produce los alcaloides vinblastina y vincristina, existe mundialmente un gran interés en mejorar su rendimiento.

Algunas plantas medicinales (entre ellas Vinca) necesitan ser cultivadas comercialmente ya sea porque son requeridas por la industria farmacéutica o por distintos sistemas médicos no tradicionales, pero la salinidad del suelo y otras formas de estrés abiótico plantean amenazas a la producción vegetal. Por ello, se considera valioso evaluar las plantas medicinales por su capacidad de tolerancia al estrés abiótico, siendo la sequía el principal factor limitante que afecta seriamente el crecimiento y el rendimiento de las plantas. Existen algunos artículos en la literatura que han informado sobre problemas de estrés hídrico y lesiones de estrés por sequía en *C. roseus*. Se ha encontrado que el estrés de humedad y la fertilización nitrogenada está influenciado por factores tales como la etapa de crecimiento de las plantas (Kennedy y Bush, 1983).

En otro trabajo se extrajo el alcaloide ajmalicina de raíces de *C. roseus* y se cuantificó tanto en plantas controles como en plantas sometidas a sequía, obteniéndose un mayor contenido de este alcaloide en las plantas bajo sequía en comparación con las plantas controles.

Se determinó que las áreas con déficit hídrico pueden ser utilizadas para el cultivo de plantas medicinales como es el caso de *C. roseus* y la producción de alcaloides económicamente importantes puede ser mejorada (Jaleel *et al.*, 2008).

Por lo explicado anteriormente y según el estado de arte del conocimiento de estos temas, se puede inferir que la concentración de los metabolitos secundarios alcaloidales de *C. roseus* se podría ver afectada teniendo en cuenta el estrés hídrico y el agregado de hormonas del tipo de los Jasmonatos. De todas maneras, el momento de la aplicación de estos tratamientos, las etapas del desarrollo de las plantas en el momento de la cosecha, como también los diferentes órganos estudiados, son variables a tener en cuenta a la hora de recopilar los resultados.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

2.1 Hipótesis de trabajo:

C. roseus es una planta de gran interés farmacéutico dado que produce compuestos anticancerígenos. Por esto, la biomasa de *C. roseus* para la obtención de los alcaloides monómeros vindolina y catarantina son demandados por una importante industria farmacéutica de la ciudad de Paraná, ya que la provisión de plantas actualmente limita seriamente su producción de fármacos oncológicos. Sin embargo, la concentración de estos compuestos es muy baja y su distribución en la planta es altamente específica; ambos alcaloides monoméricos se encuentran en células especializadas de las hojas.

Dado que las condiciones del ambiente tienen efecto sobre el metabolismo secundario, el incremento de la producción de estos monómeros es posible lograr por exposición controlada de las plantas a situaciones de estrés abiótico (hídrico) o mediante tratamientos hormonales.

2.2 Objetivo general:

Incrementar la oferta de fitoquímicos de importancia económica para la elaboración de fármacos oncológicos producidos por *C. roseus* mediante la generación de estrés hídrico y aplicaciones hormonales durante su cultivo.

2.3 Objetivos específicos:

- Determinar el efecto del estrés hídrico sobre la producción de biomasa, la partición de asimilados y la concentración de los alcaloides vindolina y catarantina en plantas de *C. roseus*.
- Medir el efecto de la aplicación de reguladores hormonales sintéticos involucrados en las respuestas al estrés ambiental en *C. roseus*, sobre el cambio en la concentración de los alcaloides vindolina y catarantina.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estrés Hídrico

3.1.1 Características del sustrato, siembra y trasplante

Se trabajó con dos variedades de Vinca: P y H. Las semillas fueron provistas por la empresa ERIOIMAGEN S.A. (Paraná, Entre Ríos), que adquirió las plantas madres del Vivero Miyama (Buenos Aires). En cuanto a las características de las semillas, el PG en la variedad P fue de 83% mientras que en la variedad H fue de 80%.

Las semillas de Vinca se colocaron en bandejas en una cámara de crecimiento acondicionada entre 19 y 27 °C hasta el momento de emisión de raicillas. Luego se realizó la siembra de las semillas recientemente germinadas en bandejas de 40 cm³ de capacidad de alvéolos individuales, rellenas con sustrato Dynamics 3 (Sustrato Dynamics tipo 3; pH: 6,0-6,5; estructura: media; fertilización: 1,5 g/L; microelementos: sí; MO: 94 a 99% del peso; capacidad de absorción de agua: 800-1000 g/100 g turba). Cuando las plantas desarrollaron entre tres y cuatro hojas, se trasladaron a macetas de 10000 cm³, previamente rellenas con resaca de río, tierra fértil y perlita (25%: 25%: 50%) y mantenidas en invernaderos climatizados a una temperatura superior a los 20 °C (Figura 11).

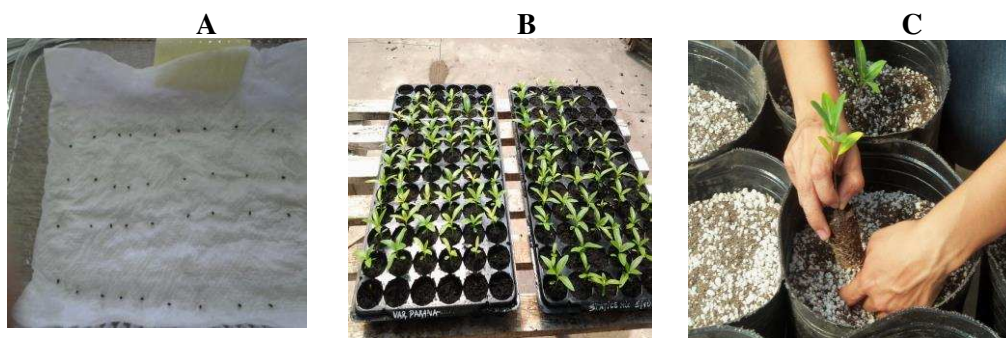


Figura 11: Siembra y trasplante: A) semillas dispuestas en bandejas, B) plántulas con tres ó cuatro hojas desarrolladas, C) trasplante a macetas.

El trabajo se realizó en invernaderos situados en el Centro Experimental de Cultivos Intensivos y Forestales (CECIF) de la UNL, en la Facultad de Ciencias Agrarias (ruta 6, km 7,5) (31° 26' S; 60° 56' W) a 8 m.s.n.m. El sustrato utilizado consistió en la mezcla de resaca de río, tierra fértil y perlita (25%: 25%: 50%) (Tabla 1).

Tabla 1: Características del sustrato utilizado en el ensayo. Datos correspondientes a los resultados del análisis de suelos.

Características	Sustrato
Nitrógeno Total (Kjeldahl) (g/100g)	1,518
(mg/L)	15180
Fósforo Extraíble (ppm) (Bray y Kurtz N° 1)	54,3
pH actual (Relación suelo:agua: 1:2,5)	7,5
Conductividad eléctrica extracto de saturación (dS/m)	0,5
Ca²⁺ intercambiable (cmol/kg) (Extracción con NH ₄ Ac, titulación con EDTA)	136
Mg²⁺ intercambiable (cmol/kg) (Extracción con NH ₄ Ac, titulación con EDTA)	21,8
Na⁺ intercambiable (cmol/kg) (Extracción con NH ₄ Ac, Fotometría de llama)	27,1
K⁺ intercambiable (cmol/kg) (Extracción con NH ₄ Ac, Fotometría de llama)	101

El muestreo se realizó directamente de la materia prima. Las características del sustrato fueron obtenidas utilizando el método inglés, mediante el cual se extrae el sustrato con agua en una relación de volúmenes de 1:6 (Figura 12) (Miner Ansorena, 1994).



Figura 12: Método de determinación inglés para el análisis de suelos.

3.1.2 Condiciones del cultivo y medición de las variables morfológicas (AF, AP y NH)

Se realizó un diseño factorial $2 \times 3 \times 2$ en bloques al azar. El primer factor corresponde a la variedad (niveles: P y H), el segundo factor corresponde al estrés hídrico (niveles: C, EB y EA) y el tercer factor, a la orientación (niveles: N y S). Cada nivel de los factores variedad, estrés hídrico y orientación, estuvo conformado por tres bloques constituidos por tres unidades experimentales cada uno (Esquema 1).

Los tres niveles del factor estrés hídrico, consistieron en utilizar diferentes Kc a saber: C (Kc: 1); EB (Kc: 0,5) y EA (Kc: 0,2). En función de la evaporación (cuantificada mediante el cálculo del valor medio registrado en tres probetas distribuidas en el invernadero) se realizó el riego correspondiente, afectando el valor evaporado con el Kc de acuerdo a cada tratamiento (Anexo I).

Durante todo el ciclo de cultivo se registró la T y HR utilizando un datalogger (Figura 17 del apartado Resultados).

Se estimó el AF de un ejemplar de cada variedad, utilizando el programa Image J (Figura 13).

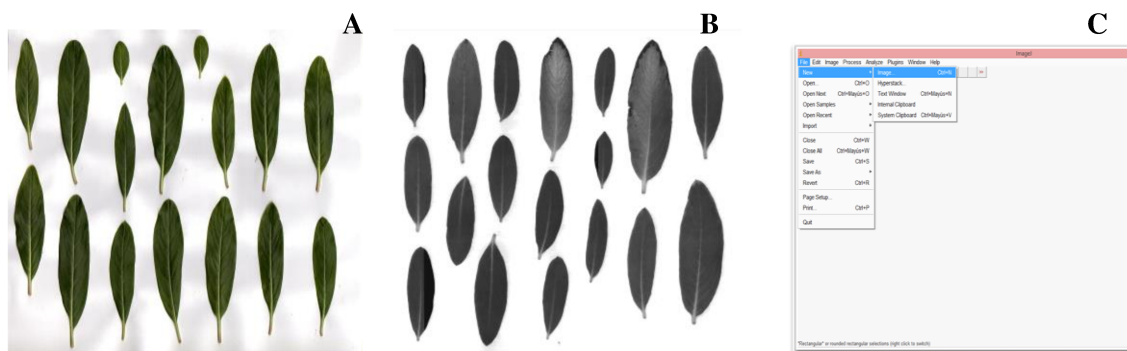


Figura 13: Estimación del área foliar para un ejemplar de cada variedad: A) hojas de Vinca variedad Holanda; B) hojas de Vinca variedad Paraná; C) software Image J.

Una vez determinada el AF de ambos ejemplares, se estimó mediante una ecuación de regresión, los valores de AF para todas las unidades experimentales del ensayo. Dicha estimación se realizó según las ecuaciones que se muestran en la Figura 14. Estas mediciones se efectuaron en tres momentos diferentes del ciclo de cultivo (17/05/2015; 12/08/2015 y 04/09/2015).

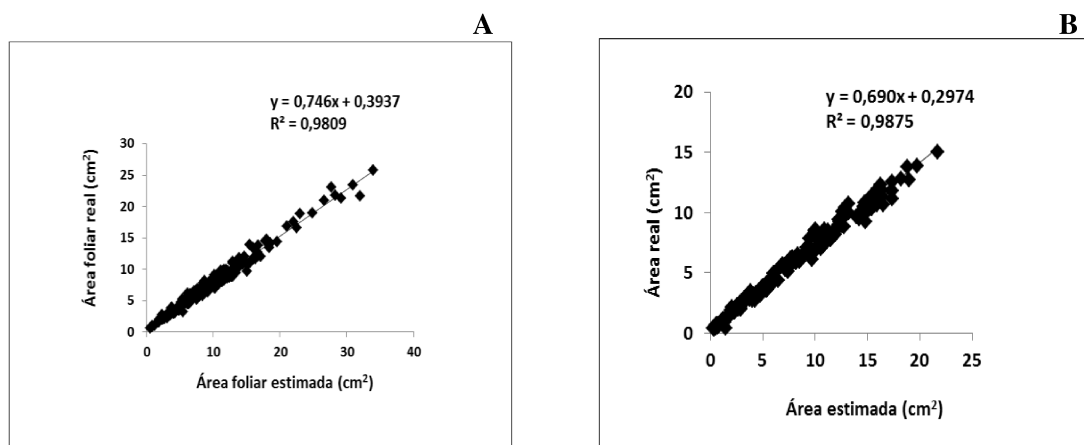


Figura 14: Estimación del área foliar de todas las unidades experimentales del ensayo: A) Variedad Paraná B) Variedad Holanda.

Además, en las mismas fechas en las que se registró el AF, también se midió la AP utilizando una cinta métrica y se contabilizó el NH para todas las unidades experimentales.

3.1.3- Cosecha y procesamiento del material vegetal

Cuando las plantas se encontraban en 50% de floración se realizó la cosecha de todos los ejemplares del ensayo. Se cosecharon las plantas completas, tanto partes aéreas como radiculares en conjunto y luego se las secó en una sala cerrada preparada para este fin, con T y HR controlada ubicada en el Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Se tomó un ejemplar de cada uno de los niveles de cada factor que fueron destinados a herborización. Para esto, las plantas recién cosechadas se rociaron con alcohol (70%) y se colocaron en prensas con papel de diario utilizándolos como separadores. De esta manera permanecieron en las prensas durante 30 días y, una vez transcurrido este periodo, se colocaron en freezer. Luego se depositaron en los casilleros correspondientes del Herbario “Arturo E. Ragonese” de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Litoral).

Una vez logrado el punto de secado, se procedió a la separación de partes aéreas y radiculares. Luego se realizó la molienda de las partes aéreas de las plantas sometidas a cada tratamiento, para la posterior obtención de los EET. De acuerdo con el esquema 1, se obtuvo MS correspondiente a los tres bloques de cada nivel de los factores. Cabe aclarar que el estudio de la variable orientación N/S se realizó con el objetivo de contemplar el efecto de la radiación solar que pudiera incidir según la ubicación de las plantas dentro del invernadero.

A

B

Variedad Holanda						Variedad Paraná					
Tratamientos (orientación Norte)						Tratamientos (orientación Norte)					
Control		Estrés bajo		Estrés alto		Control		Estrés bajo		Estrés alto	
HB1T1	Herborizada	HB151	Herborizada	HB121	Herborizada	PB1T1	Herborizada	PB151	Herborizada	PB121	Herborizada
HB1T2	Bloque 1	HB152	Bloque 1	HB122	Bloque 1	PB1T2	Bloque 1	PB152	Bloque 1	PB122	Bloque 1
HB1T3		HB153		HB123		PB1T3		PB153		PB123	
HB1T4		HB154		HB124		PB1T4		PB154		PB124	
HB2T1	Bloque 2	HB251	Bloque 2	HB221	Bloque 2	PB2T1	Bloque 2	PB251	Bloque 2	PB221	Bloque 2
HB2T2		HB252		HB222		PB2T2		PB252		PB222	
HB2T3		HB253		HB223		PB2T3		PB253		PB223	
HB3T1	Bloque 3	HB351	Bloque 3	HB321	Bloque 3	PB3T1	Bloque 3	PB351	Bloque 3	PB321	Bloque 3
HB3T2		HB352		HB322		PB3T2		PB352		PB322	
HB3T3		HB353		HB323		PB3T3		PB353		PB323	
Tratamientos (orientación Sur)						Tratamientos (orientación Sur)					
Control		Estrés bajo		Estrés alto		Control		Estrés bajo		Estrés alto	
HB1T1	Herborizada	HB151	Herborizada	HB121	Herborizada	PB1T1	Herborizada	PB151	Herborizada	PB121	Herborizada
HB1T2	Bloque 1	HB152	Bloque 1	HB122	Bloque 1	PB1T2	Bloque 1	PB152	Bloque 1	PB122	Bloque 1
HB1T3		HB153		HB123		PB1T3		PB153		PB123	
HB1T4		HB154		HB124		PB1T4		PB154		PB124	
HB2T1	Bloque 2	HB251	Bloque 2	HB221	Bloque 2	PB2T1	Bloque 2	PB251	Bloque 2	PB221	Bloque 2
HB2T2		HB252		HB222		PB2T2		PB252		PB222	
HB2T3		HB253		HB223		PB2T3		PB253		PB223	
HB3T1	Bloque 3	HB351	Bloque 3	HB321	Bloque 3	PB3T1	Bloque 3	PB351	Bloque 3	PB321	Bloque 3
HB3T2		HB352		HB322		PB3T2		PB352		PB322	
HB3T3		HB353		HB323		PB3T3		PB353		PB323	

Esquema 1: Diseño experimental del estudio de estrés hídrico en Vinca: A) Variedad Holanda, B) Variedad Paraná.

3.1.4 Extracción de alcaloides: Metodología química

Para el proceso de extracción de los alcaloides se siguió el protocolo de extracción ácido-base Stas-Otto (Figura 15) (Stas-Otto, 2015).

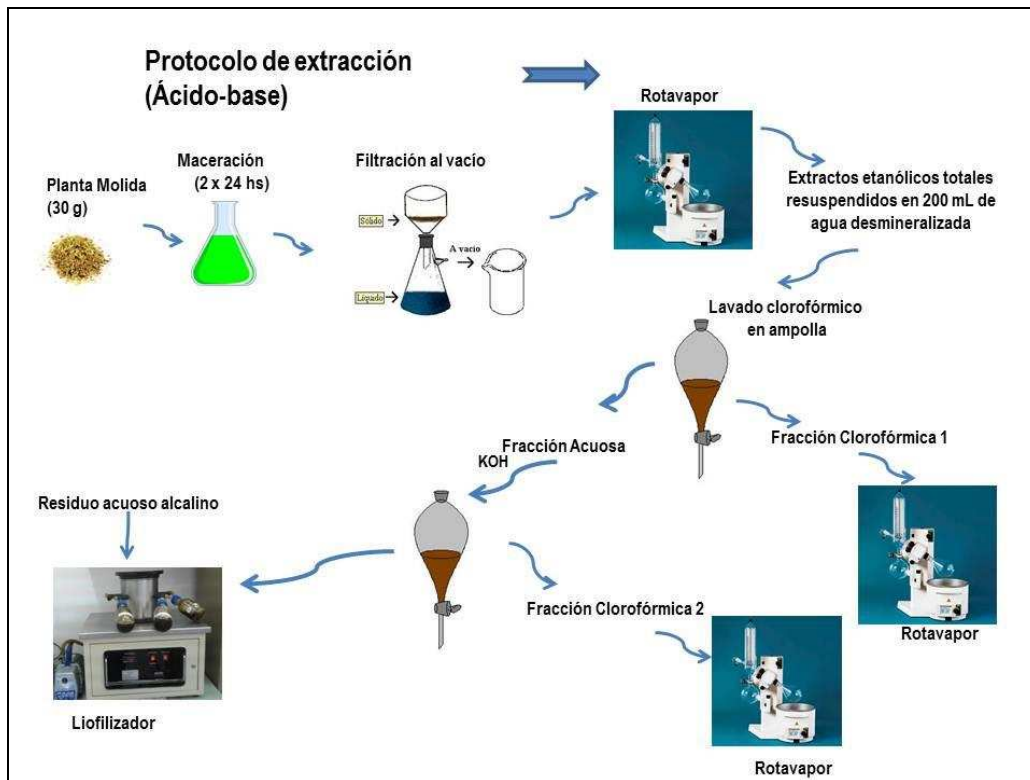


Figura 15: Protocolo de extracción y purificación de alcaloides por sus propiedades ácido-base según método de Stas-Otto.

Se pesaron 30 g de MS de cada uno de los bloques (Esquema 1) y se realizaron los extractos etanólicos acidificados por maceración (2 x 24 horas) que luego fueron filtrados al vacío para separar el residuo vegetal. Las soluciones extractivas se evaporaron a presión reducida con el fin de obtener los EET, que fueron resuspendidos en 200 mL de agua desmineralizada. La separación de los alcaloides se realizó utilizando las propiedades ácido/base de los mismos, que se manifestaron por el agregado de soluciones acuosas ácidas y básicas, haciéndolos selectivamente solubles en solventes polares y apolares respectivamente. Para ello, cada EET resuspendido fue sometido a extracción con CHCl_3 en ampolla de decantación (3 x 100 mL), obteniéndose una FC1 que fue concentrada a presión reducida. La fracción acuosa ácida residual fue alcalinizada con solución 5M de KOH y nuevamente sometida a extracción con CHCl_3 en ampolla de decantación (3 x 100 mL) para obtener una FC2 que fue concentrada a presión reducida (Figura 16). Finalmente, la solución alcalina acuosa residual fue L. La fracción rica en alcaloides es la correspondiente a la FC2. Se calcularon los rendimientos de los

EET como porcentajes referidos a los 30 g de MS de partida y los rendimientos de las FC1, FC2 y L, como porcentajes referidos a la masa de EET obtenida en cada caso.

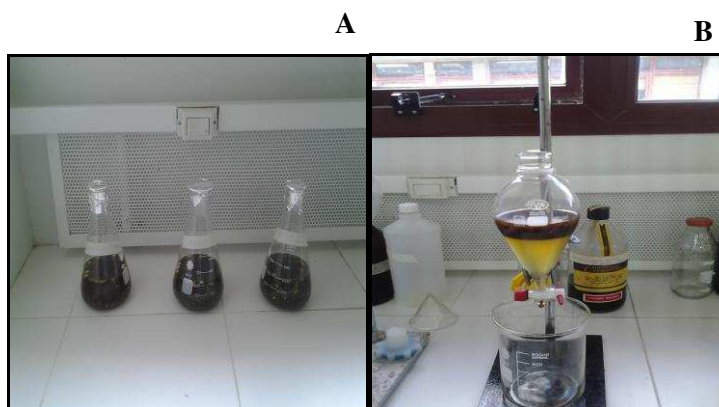


Figura 16: Extracción de alcaloides: A) Maceración de muestras con etanol acidificado y B) Proceso de extracción con cloroformo en ampollas de decantación.

3.1.5 Análisis fitoquímico de la presencia de los alcaloides catarantina y vindolina en los extractos de Vinca sometidos a estrés hídrico

Para el análisis fitoquímico y determinación de la presencia de los alcaloides monómeros catarantina y vindolina en los extractos de Vinca obtenidos según los distintos niveles de los factores evaluados, se utilizó la técnica de CCD. Esta técnica permite la separación de los componentes químicos presentes en una mezcla compleja (extracto) y por comparación de la distancia de corrida de los compuestos puros (catarantina y vindolina), se puede estimar cualitativamente la presencia de los mismos en el extracto.

Se utilizaron cromatofolios Merck con soporte de aluminio y fase estacionaria Sílica gel 60F 254. Las corridas se realizaron con una fase móvil apropiada para alcaloides descrita en la literatura (Wagner y Bladt, 1996), constituida por butanol: ácido acético: agua en las proporciones 40: 10: 10. La distancia de corrida efectiva fue de 7,5 cm; la distancia entre siembras de 0,5 cm y la longitud de siembra fue de 0,8 cm. Se utilizaron tres sistemas de revelado: 1) Luz UV de 254 nm; 2) luz UV de 365 nm y 3) Reactivo de Dragendorff específico para el revelado de alcaloides (Wagner y Bladt, 1996). La concentración de las soluciones de las

muestras a evaluar fue de 6 mg mL⁻¹ en metanol y la concentración de las soluciones de los testigos catarantina y vindolina fue de 1 mg mL⁻¹. El volumen de siembra, tanto de las muestras como de los testigos, fue de 10 µL y se utilizaron capilares aforados para tal fin.

3.1.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2008). Los efectos de los factores sobre las variables estudiadas, se evaluaron mediante ANOVA y la comparación de medias mediante Test LSD de Fisher, con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Por otro lado, cuando se observó un efecto significativo de la interacción entre los factores (Variedad, Estrés hídrico y Orientación), se realizaron contrastes ortogonales.

3.2 Tratamiento Hormonal

3.2.1 Características del sustrato, siembra y trasplante

Ídem sección 3.1.1.

3.2.2 Condiciones del cultivo y medición de las variables morfológicas (AF, AP y NH)

Se realizó un diseño factorial 2*4 en bloques al azar. El primer factor corresponde a la variedad (niveles: P y H) y el segundo factor corresponde al tratamiento hormonal [niveles: C (sin aplicación de compuestos sintéticos), A (aplicación de ABA 1,1 mM Sigma-Aldrich®), MJ (aplicación de MeJa 50 mM, Sigma-Aldrich®) y AM (aplicación de una combinación de ABA 1,1 mM + MeJa 50 mM)]. Cada nivel de ambos factores estuvo conformado por tres bloques constituidos por tres unidades experimentales cada uno (Esquema 2). En este caso, el factor orientación no fue estudiado dado que, como se explica en el apartado resultados, no se encontraron diferencias significativas de las variables estudiadas que dependieran de la orientación de las plantas en el invernadero durante el ensayo de estrés hídrico.

La aplicación de los tratamientos fue realizada en tres fechas diferentes (30/12/2015; 09/01/2016; 19/01/2016). Durante todo el ciclo de cultivo se registró la T y HR utilizando un datalogger (Figura 34 del apartado Resultados).

El AF se estimó como se mencionó en la sección 3.1.2. Las mediciones se efectuaron en tres momentos diferentes del ciclo de cultivo y en estas fechas, también se registraron las variables AP y NH para todas las unidades experimentales.

3.2.3 Cosecha y procesamiento del material vegetal

Ídem sección 3.1.3.

Una vez logrado el punto de secado, se procedió a la separación de partes aéreas y radiculares. Luego se realizó la molienda de las partes aéreas de las plantas sometidas a cada tratamiento, para la posterior obtención de los EET. De acuerdo con el esquema 2, se obtuvo MS correspondiente a los tres bloques de cada nivel de los factores tratamiento hormonal [C, A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+ MeJa)] y variedad (H y P).

Variedad Holanda								Variedad Paraná							
Tratamientos (orientación Norte)								Tratamientos (orientación Norte)							
Control (T)		A (ABA)		MJ (MeJa)		AM (ABA+ MeJa)		Control (T)		A (ABA)		MJ (MeJa)		AM (ABA+ MeJa)	
HB1T1	Herborizada	HB1A1	Herborizada	HB1M1	Herborizada	HB1AM1	Herborizada	PB1T1	Herborizada	PB1A1	Herborizada	PB1M1	Herborizada	PB1AM1	Herborizada
HB1T2	Bloque 1	HB1A2	Bloque 1	HB1M2	Bloque 1	HB1AM2	Bloque 1	PB1T2	Bloque 1	PB1A2	Bloque 1	PB1M2	Bloque 1	PB1AM2	Bloque 1
HB1T3		HB1A3		HB1M3		HB1AM3		PB1T3		PB1A3		PB1M3		PB1AM3	
HB1T4		HB1A4		HB1M4		HB1AM4		PB1T4		PB1A4		PB1M4		PB1AM4	
HB2T1	Bloque 2	HB2A1	Bloque 2	HB2M1	Bloque 2	HB2AM1	Bloque 2	PB2T1	Bloque 2	PB2A1	Bloque 2	PB2M1	Bloque 2	PB2AM1	Bloque 2
HB2T2		HB2A2		HB2M2		HB2AM2		PB2T2		PB2A2		PB2M2		PB2AM2	
HB2T3		HB2A3		HB2M3		HB2AM3		PB2T3		PB2A3		PB2M3		PB2AM3	
HB3T1	Bloque 3	HB3A1	Bloque 3	HB3M1	Bloque 3	HB3AM1	Bloque 3	PB3T1	Bloque 3	PB3A1	Bloque 3	PB3M1	Bloque 3	PB3AM1	Bloque 3
HB3T2		HB3A2		HB3M2		HB3AM2		PB3T2		PB3A2		PB3M2		PB3AM2	
HB3T3		HB3A3		HB3M3		HB3AM3		PB3T3		PB3A3		PB3M3		PB3AM3	

Esquema 2: Diseño experimental del estudio de los tratamientos hormonales en Vinca: A) Variedad Holanda, B) Variedad Paraná.

3.2.4 Extracción de alcaloides: Metodología química

Ídem sección 3.1.4.

3.2.5 Análisis fitoquímico de la presencia de los alcaloides catarantina y vindolina en los extractos de Vinca sometidos a tratamiento hormonal

Ídem sección 3.1.5.

3.2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2008). Los efectos de los factores sobre las variables estudiadas, se evaluaron mediante ANOVA y la comparación de medias mediante Test LSD de Fisher, con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Por otro lado, cuando se observó un efecto significativo de la interacción entre los factores (Variedad y Tratamiento hormonal), se realizaron contrastes ortogonales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estrés hídrico

4.1.1 Condiciones ambientales

El registro de la T y la HR durante el ciclo de cultivo se presenta en la Figura 17.

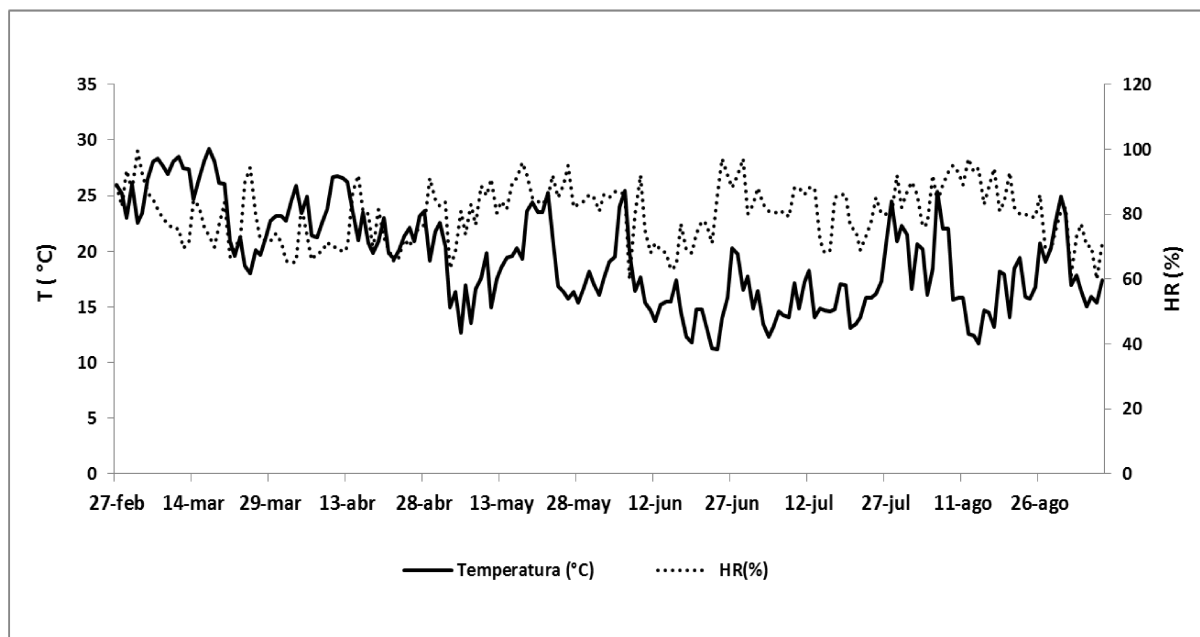


Figura 17: Condiciones de cultivo: Temperatura (T.; °C) y humedad relativa (HR; %) durante el ciclo de cultivo.

4.1.2 Efecto del estrés hídrico sobre las variables morfológicas de dos variedades de *Vinca* y según dos orientaciones en el invernadero

El agua es la molécula esencial para la vida y en las plantas representa entre el 80 y el 95% de la masa de los tejidos en crecimiento, desempeñando así varias funciones únicas. Teniendo en cuenta la gran importancia del agua en las plantas, se puede considerar que una cantidad limitada o excesiva de ella, constituye un factor inductor de situaciones adversas o estresantes (Moreno, 2009).

El estrés por déficit hídrico o por sequía se produce en las plantas como respuesta a un ambiente escaso de agua, en donde la tasa de transpiración excede a la toma de agua. El déficit hídrico no solo ocurre cuando hay poca agua en el ambiente, sino también por temperaturas

elevadas y por alta salinidad en el suelo. Estas condiciones, capaces de inducir una disminución de agua disponible en el citoplasma de las células, también se conocen como estrés osmótico.

Las respuestas de las plantas dependen del genotipo y del estadio de desarrollo de la misma en el momento del estrés, de la duración y la severidad del mismo y de los factores ambientales que lo provoquen (Cattivelli, *et al.*, 2008). Las plantas han desarrollado diferentes respuestas y adaptaciones como cambios en su morfología o en la producción de metabolitos secundarios, que les permiten sobrevivir en condiciones de constante déficit hídrico (Nilsen y Orcutt, 1996).

Los resultados obtenidos en referencia a los cambios en la morfología vegetal que produjo el estrés hídrico (C, EB y EA) sobre las variedades de Vinca (P y H) teniendo en cuenta dos ubicaciones en el invernadero (N y S), se describen a continuación. En la tabla 2 se presentan los valores medios de las variables AF, AP y NH para los distintos niveles de cada uno de los factores mencionados (estrés hídrico, variedad y orientación).

Tabla 2: Valores medios \pm desvío estándar correspondientes al área foliar (AF, en cm^2), altura de planta (AP, en cm) y número de hojas (NH), luego de aplicar los tratamientos de estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto) para ambas variedades de Vinca (Paraná y Holanda) en las dos orientaciones (Norte y Sur) del invernadero.

Variedad	Tratamiento	Orientación	Área foliar (AF, cm^2)	Altura de planta (AP, cm)	Número de Hojas (NH)
Paraná	control	S	1269,11 \pm 18,16	31,78 \pm 1,68	192,11 \pm 10,81
Paraná	control	N	1226,78 \pm 18,16	31,11 \pm 1,68	189,89 \pm 10,81
Paraná	estrés bajo	S	514,89 \pm 18,16	25,67 \pm 1,68	141,11 \pm 10,81
Paraná	estrés bajo	N	512,44 \pm 18,16	27,78 \pm 1,68	133,00 \pm 10,81
Paraná	estrés alto	S	765,56 \pm 18,16	25,89 \pm 1,68	141,22 \pm 10,81
Paraná	estrés alto	N	744,78 \pm 18,16	25,33 \pm 1,68	119,00 \pm 10,81
Holanda	control	S	852,22 \pm 18,16	67,44 \pm 1,68	134,11 \pm 10,81

Holanda	control	N	847,22± 18,16	68,11±1,68	114,67±10,81
Holanda	estrés bajo	S	419,11± 18,16	60,78±1,68	93,67±10,81
Holanda	estrés bajo	N	394,78± 18,16	57,67±1,68	93,67±10,81
Holanda	estrés alto	S	388,33± 18,16	57,78±1,68	92,67±10,81
Holanda	estrés alto	N	339,78± 18,16	62,00±1,68	94,00±10,81

Para la variable AF, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los tres factores variedad*estrés hídrico*orientación ($p=0,3779$). Tampoco existieron interacciones dobles entre los factores estrés hídrico*orientación ($p=0,7103$) y variedad*orientación ($p=0,8450$), mientras que si se observó interacción significativa ($p<0,0001$) entre los factores variedad*estrés hídrico para los que se presentan los contrastes ortogonales en la tabla 3.

Tabla 3: Contrastes ortogonales de la variable área foliar (AF) para la interacción entre los factores variedad y estrés hídrico.

Área Foliar (AF)		
Variedad*estrés hídrico	Contraste	p-valor
PC vs PA	492,78±18,16	<0,0001
PC vs PB	734,28±18,16	<0,0001
PB vs PA	-241,50±18,16	<0,0001
HC vs HA	485,67±18,16	<0,0001
HC vs HB	442,78±18,16	<0,0001
HB vs HA	42,89±18,16	0,0202

PC: variedad Paraná tratamiento control, PB: variedad Paraná estrés bajo, PA: variedad Paraná estrés alto, HC: variedad Holanda tratamiento control, HB: variedad Holanda estrés bajo, HA: variedad Holanda estrés alto.

Como se observa en la tabla 3, al fijar cada nivel del factor variedad, la variable AF presentó diferencias significativas para cada nivel del factor estrés hídrico (Figura 18).

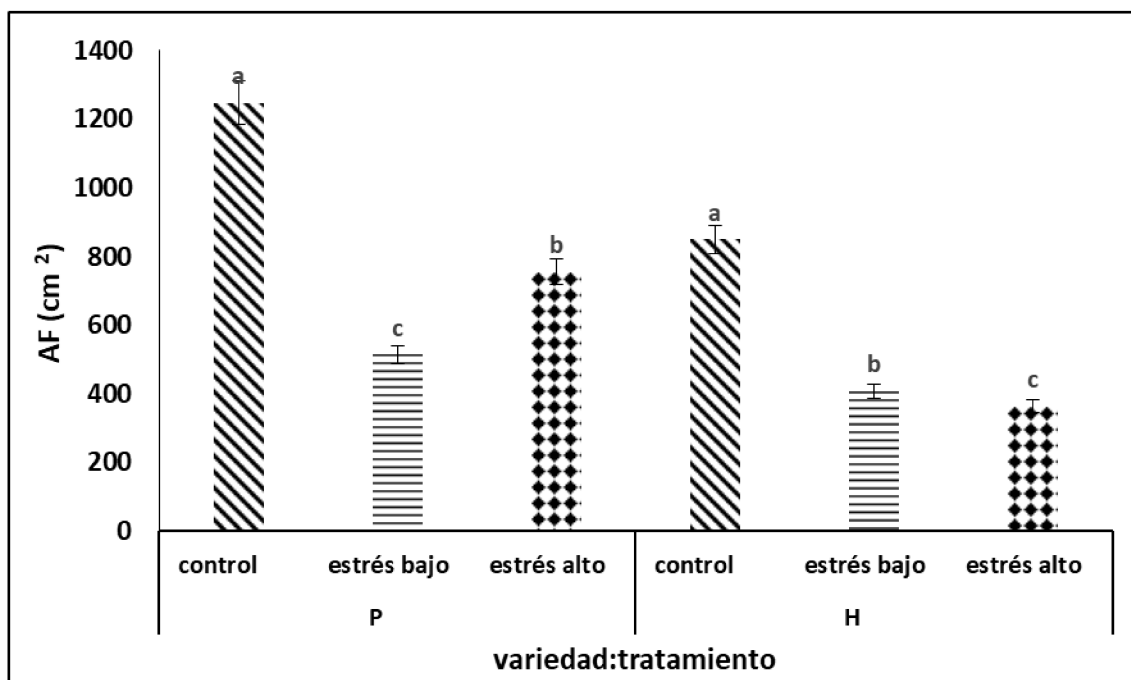


Figura 18: Valores de área foliar (AF, en cm²) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los tres niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Para la variable AP, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los tres factores variedad*estrés hídrico*orientación ($p=0,1071$). Tampoco existieron interacciones dobles entre los factores estrés hídrico*orientación ($p=0,5874$), variedad*orientación ($p=0,8789$) y variedad*estrés hídrico ($p= 0,2760$).

Considerando únicamente el factor variedad, se presentaron diferencias significativas entre sus dos niveles ($p<0,0001$), indicando que la variable AP fue significativamente superior en un 123% para la variedad H respecto de la variedad P (Figura 19).

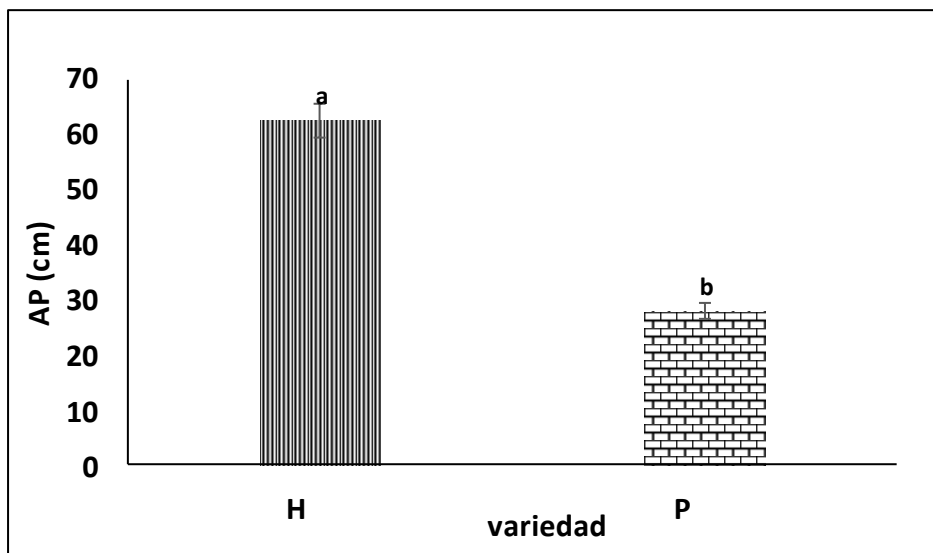


Figura 19: Valores de altura de planta (AP, en cm) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Considerando únicamente el factor estrés hídrico, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre sus tres niveles, indicando que la variable AP fue significativamente superior en un 15,75% para el C respecto a los niveles EA y EB (Figura 20).

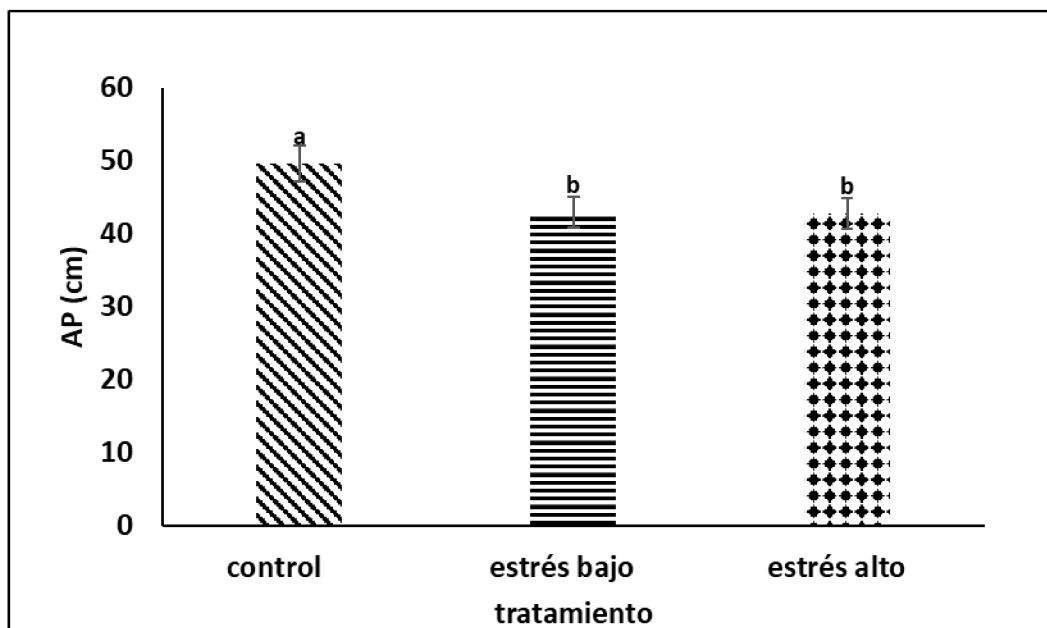


Figura 20: Valores de Altura de planta (AP, en cm) considerando únicamente los tres niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Para la variable NH, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los tres factores variedad*estrés hídrico*orientación ($p=0,4070$). Tampoco existieron interacciones dobles entre los factores estrés hídrico*orientación ($p=0,8835$), variedad*orientación ($p=0,7005$) y variedad*estrés hídrico ($p=0,1278$).

Considerando únicamente el factor variedad, se presentaron diferencias significativas entre sus dos niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable NH fue significativamente superior en un 47,13% para la variedad P respecto de la variedad H (Figura 21).

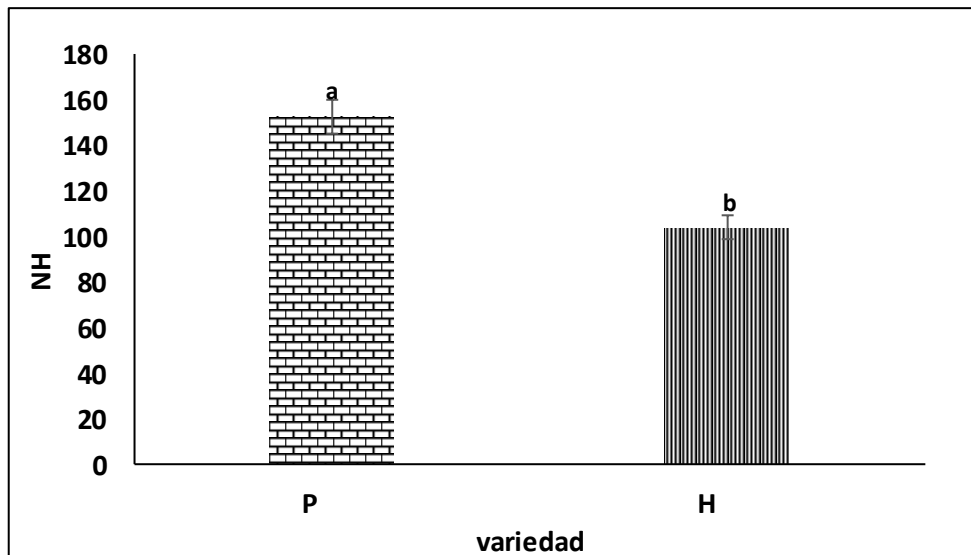


Figura 21: Valores de número de hojas (NH) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Considerando el factor estrés hídrico, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre sus tres niveles, indicando que la variable NH fue significativamente superior en un 38,9% para el C respecto a los niveles EA y EB (Figura 22).

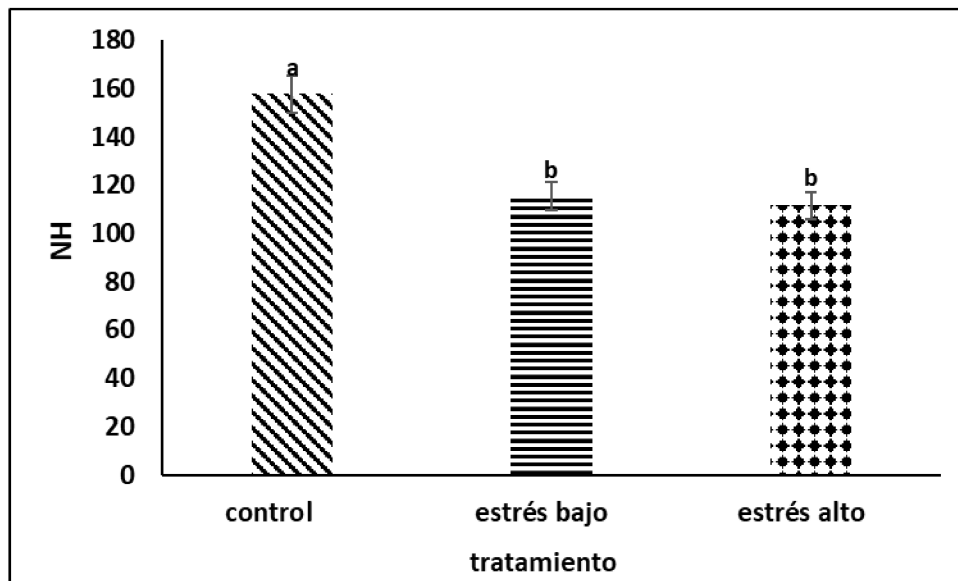


Figura 22: Valores de NH, según los tres niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Los resultados anteriores manifestaron que las plantas no estresadas (C) presentaron valores significativamente superiores de las tres variables estudiadas (AF, AP y NH), independiente de las orientaciones en el invernadero y de la variedad. De acuerdo a diferentes trabajos, cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular (Potters *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008). Considerando lo mencionado en estos artículos, los resultados obtenidos en este estudio respecto de la disminución del AF, AP y NH frente a los niveles de estrés hídrico aplicados, son coincidentes.

En cuanto a los valores obtenidos para la variable AP, las mediciones registradas en este trabajo se encuentran acordes a la descripción botánica de Vinca (Acosta y Rodríguez, 2002.) en la cual se manifiesta que la altura máxima de la planta alcanza los 80 cm. La diferencia de AP entre los niveles del factor variedad (H: 62,30 cm y P: 27,93 cm), se debe a características propias de los varietales. H es una variedad de mayor altura, mayor distancia de entrenudos y

presenta menor número de hojas; mientras que la variedad P presenta menor altura, entrenudos cortos y un mayor número de hojas (Figura 23).



Figura 23: Foto de plantas de Vinca variedad: A) Paraná y B) Holanda.

Estudios realizados en cultivo de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill), han detectado que una elongación de las raíces rápida y temprana es un indicador importante de resistencia a este tipo de estrés. La disponibilidad de agua afecta la relación entre el crecimiento de la parte aérea y de la raíz; esta continúa su desarrollo mientras que la parte aérea deja de crecer por causa del estrés. Así, las plantas son capaces de continuar el desarrollo de sus raíces en búsqueda de agua en zonas más profundas del suelo, pero deteniendo el crecimiento de las partes aéreas (Potters *et al.*, 2007). Aunque en este trabajo de tesis no se estudió el comportamiento radicular, se pudo observar que las partes aéreas fueron afectadas por el déficit hídrico en cuanto a las variables AF, AP y NH.

Otros artículos revisados en la literatura, manifiestan que el estrés por sequía reduce el tamaño de las hojas, la extensión del tallo y la proliferación de raíces, perturba las relaciones hídricas de las plantas y reduce la eficiencia en el uso del agua (Farooq *et al.*, 2009).

Una de las principales respuestas al estrés hídrico es la modificación de la expresión génica relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico (Florido Bacallao, y Bao Fundora, 2014). Durante el estrés hídrico también se induce la expresión de varios factores de transcripción que median la respuesta de genes al estrés (Ashraf y Foolad, 2007). En el campo de la genética molecular, diferentes estudios relacionados con la transcripción y la expresión génica, identificaron la activación y regulación de diferentes genes en condiciones de sequía. La manipulación de estos genes, relacionados con el mantenimiento de la estructura y función de los componentes celulares, es una de las vías para obtener plantas tolerantes al estrés por sequía (Pireivatlou y Yazdarsepas, 2008). Entre los efectos generales más obvios de estrés hídrico figuran: las dificultades en la germinación, la reducción en la AP, AF y rendimiento del cultivo (Kaya *et al.*, 2006). Estos resultados nuevamente concuerdan con los obtenidos en este estudio, más allá de que los mecanismos moleculares por los cuales disminuyó el crecimiento aéreo de las plantas, no fueron objeto de estudio en esta tesis. Es posible que estas alteraciones en la expresión génica, factores de transcripción y producción de enzimas en situaciones de estrés hídrico, estén relacionadas con la biosíntesis de fitoquímicos que se describe a continuación.

De los resultados anteriores se puede concluir que: Tanto la variedad P como H de la especie Vinca, se vieron afectadas por el factor estrés hídrico reduciendo el AF, la AP y el NH; mientras que el factor orientación en el invernadero no afectó significativamente a las variables estudiadas. Además, el factor variedad presentó diferencias significativas de las variables estudiadas dadas las características propias de cada nivel (P y H).

4.1.3 Efecto del estrés hídrico sobre las variables MS y porcentaje de extractos obtenidos de dos variedades de Vinca y según dos orientaciones en el invernadero

Para completar con éxito su ciclo de vida, las plantas deben hacer frente a las limitaciones ambientales que incluyen el ataque de patógenos, las fluctuaciones extremas de temperatura, el déficit de agua y la alta intensidad de luz. Este cambio en las condiciones ambientales, conduce a una tasa de crecimiento reducida, a una menor productividad y, en circunstancias extremas, puede resultar letal. Las tensiones ambientales causan pérdidas por miles de millones de dólares en el rendimiento de los cultivos, lo que afecta la magnitud de la productividad de un año a otro (Apel y Hirt, 2004).

Los resultados obtenidos en referencia a los cambios en peso de MS y materia extraída que produjo el estrés hídrico (C, EB y EA) sobre las variedades de Vinca (P y H) teniendo en cuenta dos ubicaciones en el invernadero (N y S), se describen a continuación. En la tabla 4, se presentan los valores medios de las variables MS, EET, FC1, FC2 y L para los distintos niveles de cada uno de los factores mencionados (estrés hídrico, variedad y orientación). Los porcentajes de EET se refieren al 100% de materia seca, mientras que los porcentajes de las fracciones clorofórmicas y liofilizados, se refieren al 100% de EET.

Tabla 4: Valores medios \pm desvío estándar correspondientes a materia seca (MS), extracto etanólico total (EET), fracción clorofórmica 1 (FC1), fracción clorofórmica 2 (FC2) y liofilizado (L), luego de aplicar los tratamientos de estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto) para ambas variedades de Vinca (Paraná y Holanda) en las dos orientaciones (Norte y Sur) del invernadero.

Variedad	Tratamiento	Orientación	MS (g)	EET (%)	FC1 (%)	FC2 (%)	L (%)
Paraná	control	S	55,45 \pm 1,37	34,53 \pm 0,94	6,09 \pm 0,15	0,32 \pm 0,04	28,12 \pm 0,87
Paraná	control	N	56,61 \pm 1,37	34,46 \pm 0,94	5,64 \pm 0,15	0,38 \pm 0,04	28,44 \pm 0,87
Paraná	estrés bajo	S	34,54 \pm 1,37	30,47 \pm 0,94	6,08 \pm 0,15	0,75 \pm 0,04	23,64 \pm 0,87
Paraná	estrés bajo	N	32,78 \pm 1,37	29,80 \pm 0,94	6,14 \pm 0,15	0,78 \pm 0,04	22,88 \pm 0,87

Paraná	estrés alto	S	32,41±1,37	28,87±0,94	6,17±0,15	0,68±0,04	22,02±0,87
Paraná	estrés alto	N	33,05±1,37	28,57±0,94	6,02±0,15	0,61±0,04	21,94±0,87
Holanda	control	S	52,13±1,37	28,24±0,94	5,52±0,15	0,35±0,04	22,37±0,87
Holanda	control	N	54,84±1,37	28,62±0,94	6,66±0,15	0,40±0,04	21,56±0,87
Holanda	estrés bajo	S	33,87±1,37	21,02±0,94	6,13±0,15	0,68±0,04	14,14±0,87
Holanda	estrés bajo	N	34,95±1,37	21,97±0,94	6,47±0,15	0,73±0,04	14,77±0,87
Holanda	estrés alto	S	36,21±1,37	22,08±0,94	5,51±0,15	0,75±0,04	15,89±0,87
Holanda	estrés alto	N	37,23±1,37	22,98±0,94	6,22±0,15	0,70±0,04	16,06±0,87

Para la variable MS, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los tres factores variedad*estrés hídrico*orientación ($p=0,8182$). Tampoco existieron interacciones dobles entre los factores estrés hídrico*orientación ($p=0,5104$) y variedad*orientación ($p=0,3241$), mientras que si se observó interacción significativa ($p=0,0094$) entre los factores variedad*estrés hídrico para los que se presentan los contrastes ortogonales en la tabla 5.

Tabla 5: Contrastes ortogonales de la variable materia seca (MS) para la interacción entre los factores variedad y estrés hídrico.

Materia Seca (MS)		
Variedad*estrés hídrico	Contraste	p-valor
PC vs PA	23,30±1,37	<0,0001
PC vs PB	22,37±1,37	<0,0001
PB vs PA	0,93±1,37	0,5030
HC vs HA	16,77±1,37	<0,0001
HC vs HB	19,08±1,37	<0,0001
HB vs HA	-2,31±1,37	0,1042

PC: variedad Paraná tratamiento control, PB: variedad Paraná estrés bajo, PA: variedad Paraná estrés alto, HC: variedad Holanda tratamiento control, HB: variedad Holanda estrés bajo, HA: variedad Holanda estrés alto.

Como se observa en la tabla 5, al fijar cada nivel del factor variedad, la variable MS presentó diferencias significativas para cada nivel del factor estrés hídrico (Figura 24).

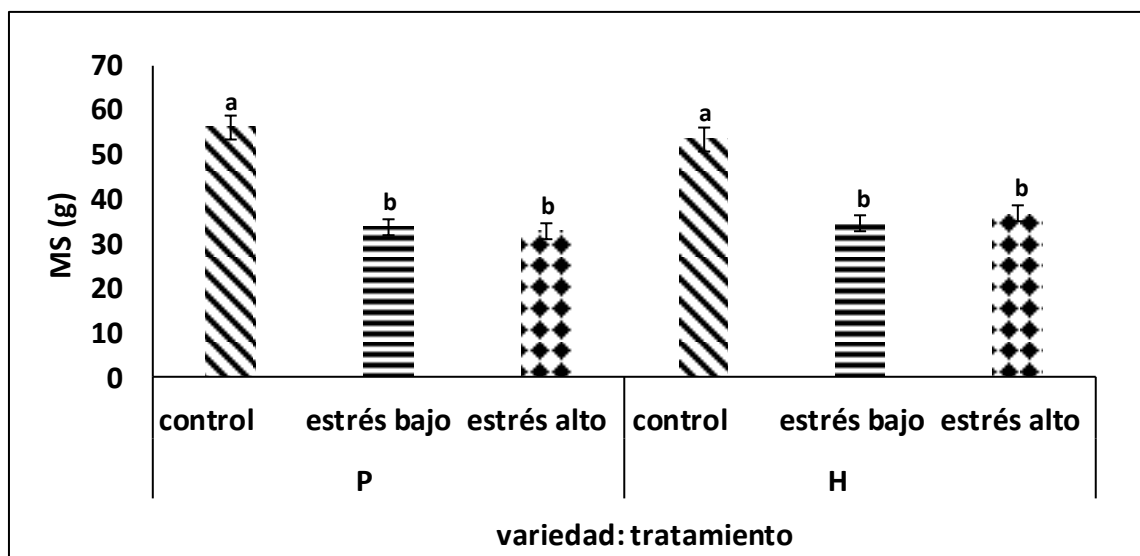


Figura 24: Valores de materia seca (MS, en g) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Considerando solamente el factor estrés hídrico, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre sus niveles, indicando que la variable MS fue significativamente superior en un 59,25% para el control respecto a los niveles de EA y EB.

Para la variable EET, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los tres factores variedad*estrés hídrico*orientación ($p = 0,9051$). Tampoco existieron interacciones dobles entre los factores estrés hídrico*orientación ($p = 0,9911$), variedad*orientación ($p = 0,3236$) y variedad*estrés hídrico ($p = 0,1119$).

Considerando únicamente el factor variedad, se presentaron diferencias significativas entre sus dos niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable EET fue significativamente superior en un 28,9% para la variedad P respecto de la variedad H (Figura 25).

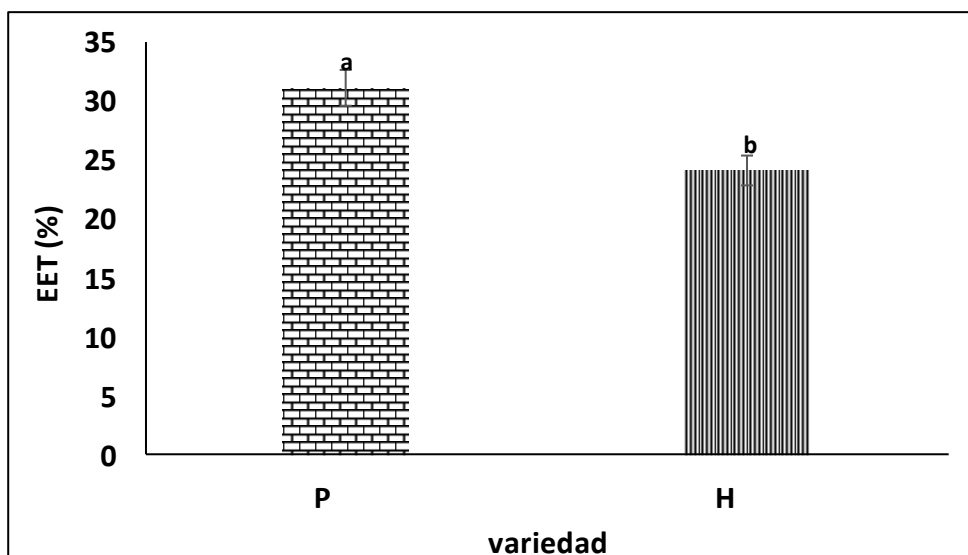


Figura 25: Valores de extractos etanólicos totales (EET, en %) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H). Letras diferentes indican diferencias entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Considerando únicamente el factor estrés hídrico, se presentaron diferencias significativas entre sus niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable EET fue significativamente superior en un 22,3% para el control respecto a los niveles de EA y EB (Figura 26).

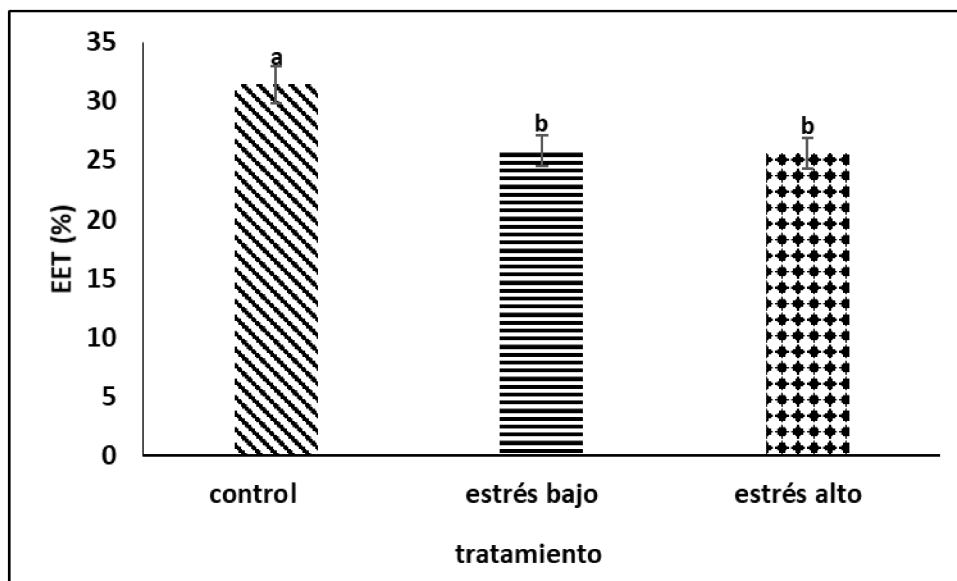


Figura 26: Valores de extractos etanólicos totales (EET, en %), según los tres niveles del factor estrés hídrico (control, estrés bajo y estrés alto). Letras diferentes indican diferencias entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Para la variable FC1, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los tres factores variedad*estrés hídrico*orientación ($p=0,204$). Tampoco existieron interacciones dobles entre los factores estrés hídrico*orientación ($p=0,7951$) y variedad*estrés hídrico ($p=0,0836$), mientras que si se observó interacción significativa ($p<0,0001$) entre los factores variedad*orientación para los que se presentan los contrastes ortogonales en la tabla 6.

Tabla 6: Contrastes ortogonales de la variable fracción clorofórmica 1 (FC1) para la interacción entre los factores variedad y orientación.

FC1 (%)		
Variedad* orientación	Contraste	p-valor
HN vs HS	$0,73 \pm 0,12$	$<0,0001$
PN vs PS	$-0,18 \pm 0,12$	0,1594

HN: variedad Holanda, orientación Norte; HS: variedad Holanda, orientación Sur; PN: variedad Paraná, orientación Norte; PS: variedad Paraná, Orientación sur.

Para la variable FC2, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los tres factores variedad*estrés hídrico*orientación ($p=0,4070$). Tampoco existieron interacciones dobles entre los factores estrés hídrico*orientación ($p=0,1440$), variedad*orientación ($p=0,8425$) y variedad*estrés hídrico ($p=0,0892$).

Considerando únicamente el factor estrés hídrico, se presentaron diferencias significativas entre sus niveles ($p<0,0001$), indicando que la variable FC2 fue significativamente superior en un 91,67% para los niveles de EA y 105,55% para el EB respecto al nivel C (Figura 27).

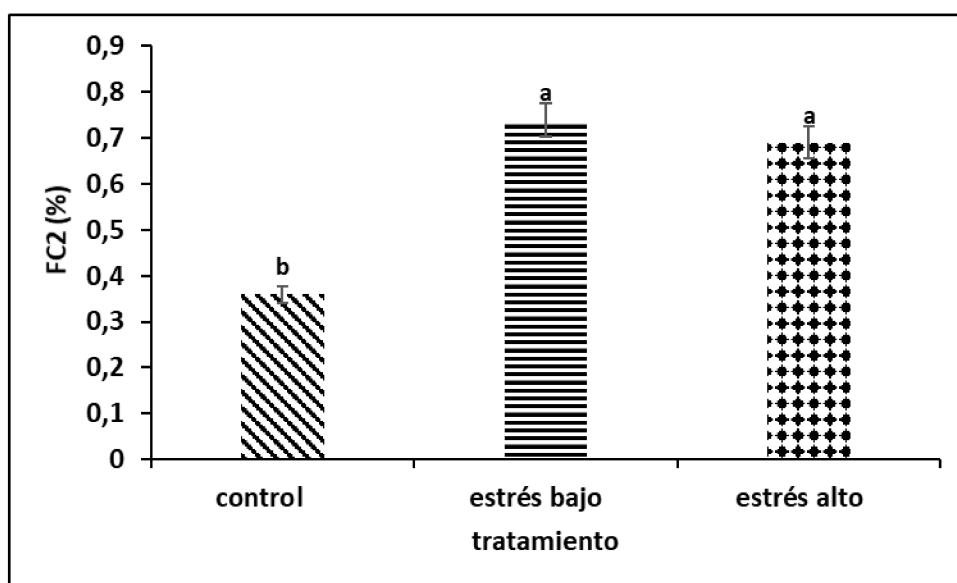


Figura 27: Valores de fracción clorofórmica 2 (FC2, en % respecto del EET) para los niveles control, estrés bajo y estrés alto. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor estrés hídrico según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Para la variable L, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los tres factores variedad*estrés hídrico*orientación ($p=0,6016$). Tampoco existieron interacciones dobles entre los factores estrés hídrico*orientación ($p=0,9724$), variedad*orientación ($p=0,8686$) y variedad*estrés hídrico ($p=0,643$).

Considerando únicamente el factor variedad, se presentaron diferencias significativas entre sus dos niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable L fue significativamente superior en un 40,3% para la variedad P respecto de la variedad H.

Considerando únicamente el factor estrés hídrico, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre sus tres niveles, indicando que la variable L fue significativamente superior para el C respecto a los niveles EA (32,64%) y EB (33,19%).

Estos resultados indicaron que, para cada variedad, el contenido de MS y los porcentajes de EET, FC1 y L fueron significativamente superiores en el nivel C que en los dos niveles de estrés hídrico; mientras que el porcentaje de FC2 resultó mayor en los niveles EB y EA respecto al C. Esto indicaría que el mayor porcentaje de FC2 (que es donde se concentran los alcaloides de interés) en ambos niveles de estrés hídrico respecto al C, estaría relacionado con una producción mayor de estos compuestos en esas situaciones. Por otra parte, el contenido de MS y porcentaje de extractos para los tres niveles del factor estrés hídrico, fue superior en la variedad P dada las características morfológicas propias de esta variedad (retomar la figura 23).

Estos resultados se pueden relacionar con lo descrito en un estudio de tomate (*Solanum lycopersicum*), que presentó disminuciones en el número de flores, frutos, en la masa promedio de los frutos, las masas fresca y seca de las plantas, del porcentaje de fructificación, cuando se encontraba en condiciones de estrés hídrico. La tolerancia a la sequía de las plantas de tomate, se ha expresado generalmente como la disminución en el rendimiento a un nivel dado de estrés hídrico en comparación con las plantas no estresadas (Wahb-Allah *et al.*, 2011).

4.1.4 Análisis cualitativo de la presencia de los alcaloides catarantina y vindolina en FC1, FC2 y L obtenidos de plantas de Vinca sometidas a estrés hídrico

Las plantas han desarrollado estrategias de defensa alternativas que involucran una gran variedad de metabolitos secundarios que sirven como herramientas para superar las restricciones de estrés, adaptarse al entorno cambiante y, por lo tanto, ayudan a sobrevivir en condiciones subóptimas (Edreva *et al.*, 2008). La producción de metabolitos secundarios por las plantas se

ha convertido en un campo de estudio activo debido a su potencial como fuente de compuestos farmacéuticos valiosos (Jaleel, 2007).

Briske y Camp estudiaron la influencia del estrés hídrico en las concentraciones de alcaloides en Senecio (*Senecio longilobus* Benth.) y observaron que la concentración total de alcaloides en la planta aumentó al incrementar la severidad del estrés hídrico. Estos resultados indican la importancia de considerar la influencia del estrés hídrico en las plantas cuando se investiga la producción de compuestos secundarios (Briske y Camp, 1982). Estudios realizados señalan la importancia de *C. roseus* como importante planta medicinal, que presenta potenciales antioxidantes en condiciones de estrés por sequía (Jaleel *et al.*, 2008).

4.1.4.1 *Vinca Variedad Paraná*

En la Figura 28 se muestran los cromatogramas obtenidos para las FC1 correspondientes a la variedad P. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas del nivel C, las calles 3 y 4, a plantas expuestas al nivel EB; y las calles 5 y 6, a plantas sometidas al nivel EA. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 7 y 8 respectivamente. Como se mencionó en la parte experimental, los sistemas reveladores usados fueron: A) reactivo de Dragendorff, B) luz UV 254 nm y C) luz UV 365 nm. Tanto catarantina como vindolina no absorben a 365 nm, por lo que su presencia no se evidencia con este sistema de revelado.

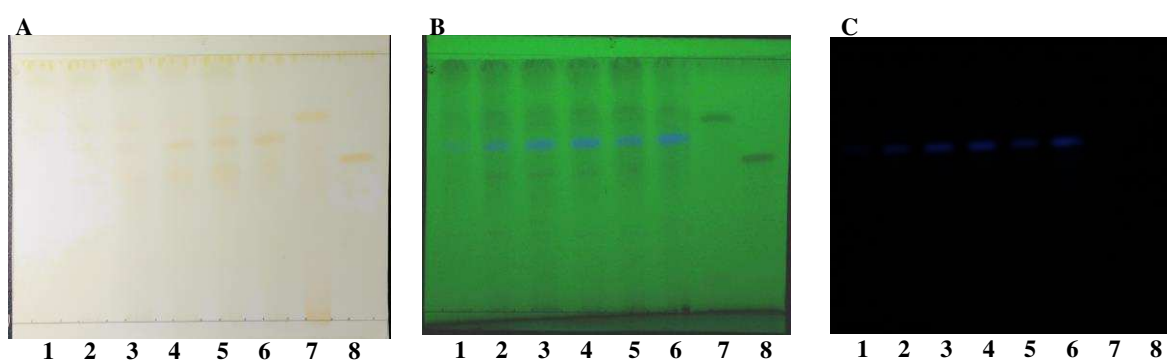


Figura 28: Cromatogramas obtenidos para las FC1 correspondientes a la variedad Paraná. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas controles; las calles 3 y 4, a plantas sometidas a estrés bajo; y las calles 5 y 6, a plantas sometidas a estrés alto. Los testigos puros de catarantina y vindolina

fueron sembrados en las calles 7 y 8 respectivamente. Reveladores: A) reactivo de Dragendorff, B) luz UV 254 nm y C) luz UV 365 nm.

Se puede observar que en las calles 1-6 de las FC1 no se evidencia la presencia de catarantina y vindolina dado que no hay bandas con la misma coloración y Rf que las que presentan los testigos. En la placa B, se pueden observar bandas de similar coloración a catarantina, pero la posición en la placa es de una distancia apenas mayor al testigo (mayor Rf).

En la figura 29 se muestran los cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad P.

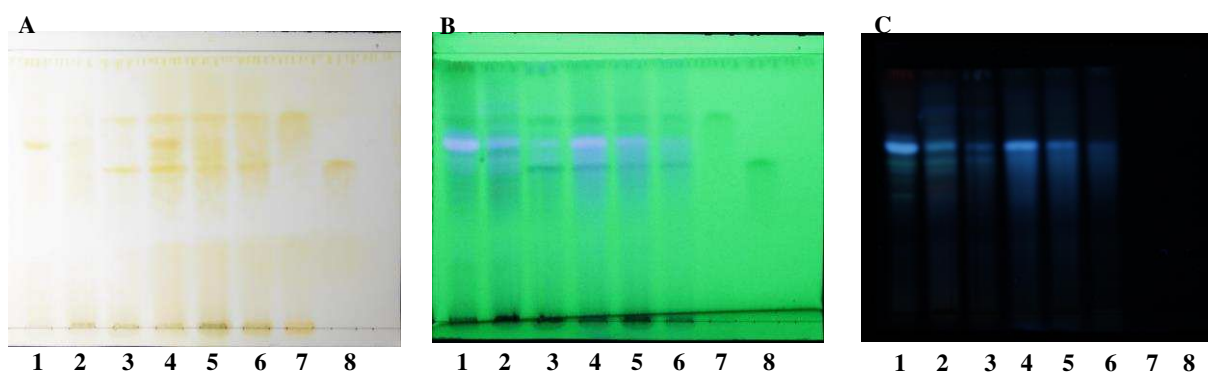


Figura 29: Cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad Paraná. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas controles; las calles 3 y 4, a plantas sometidas a estrés bajo; y las calles 5 y 6, a plantas sometidas a estrés alto. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 7 y 8 respectivamente. Reveladores: A) reactivo de Dragendorff, B) luz UV 254 nm y C) luz UV 365 nm.

Se puede observar que las FC2 son mucho más ricas en alcaloides que las FC1 (ver coloraciones marrones en las placas A, cuyo revelador es específico para este tipo de moléculas). Por otra parte, en las FC2 correspondientes a las plantas C no se evidencia la presencia de los testigos catarantina y vindolina mientras que, en las FC2 de las plantas sometidas a estrés hídrico, es clara la presencia de ambos compuestos. Con esta técnica

cromatográfica, es difícil determinar cuál de los dos niveles de estrés hídrico produce mayor cantidad de catarantina y vindolina.

En la Figura 30 se muestran los cromatogramas obtenidos para los L correspondientes a la variedad P.

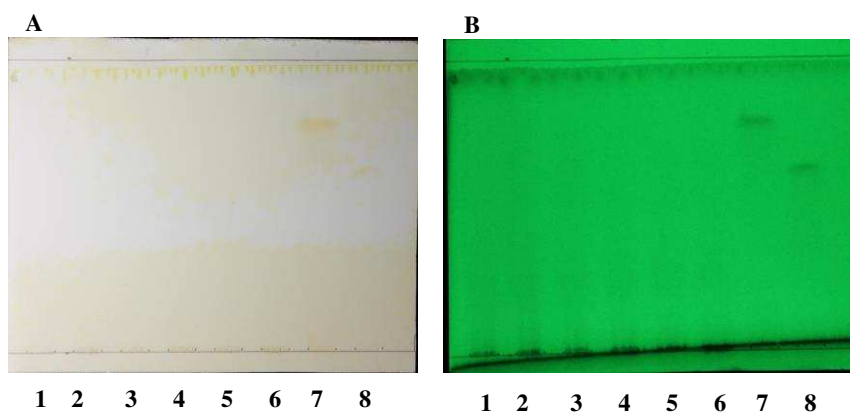


Figura 30: Cromatogramas obtenidos para los liofilizados correspondientes a la variedad Paraná. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas controles; las calles 3 y 4, a plantas sometidas a estrés bajo; y las calles 5 y 6, a plantas sometidas a estrés alto. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 7 y 8 respectivamente. Reveladores: A) reactivo de Dragendorff y B) luz UV 254 nm.

Se puede observar que en los L tanto de las plantas C como de las sometidas a estrés hídrico, no se evidencia la presencia de catarantina y vindolina. Además, dada la ausencia de coloración marrón en la placa revelada con Dragendorff, se concluye que no existen alcaloides en los productos de liofilización. Este resultado era esperable, ya que el método de separación de alcaloides elegido (Stas Otto), concentra sobre todo estos productos en la FC2.

4.1.4.2 Vinca Variedad Holanda

En la figura 31 se muestran los cromatogramas obtenidos para las FC1 correspondientes a la variedad H. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas C, las calles 3 y 4, a plantas expuestas a

EB; y las calles 5 y 6, a plantas sometidas a EA. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 7 y 8 respectivamente. Los sistemas reveladores usados fueron: A) reactivo de Dragendorff, B) luz UV 254 nm y C) luz UV 365 nm. Tanto catarantina como vindolina no absorben a 365 nm, por lo tanto, su presencia no se evidencia con este sistema de revelado.

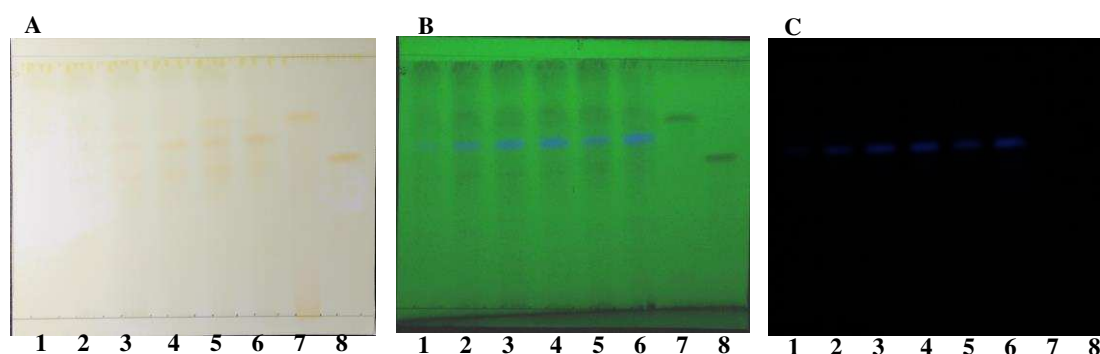


Figura 31: Cromatogramas obtenidos para las FC1 correspondientes a la variedad Holanda. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas controles; las calles 3 y 4, a plantas sometidas a estrés bajo; y las calles 5 y 6, a plantas sometidas a estrés alto. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 7 y 8 respectivamente. Reveladores: A) reactivo de Dragendorff, B) luz UV 254 nm y C) luz UV 365 nm.

De igual manera que para la variedad P, se puede observar que en las calles 1-6 de las FC1 no se evidencia la presencia de catarantina y vindolina dado que no hay bandas con la misma coloración y Rf que las que presentan los testigos. En la placa B, se pueden observar bandas de similar coloración a catarantina, pero la posición en la placa es de una distancia apenas mayor al testigo (mayor Rf).

En la Figura 32 se muestran los cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad H.

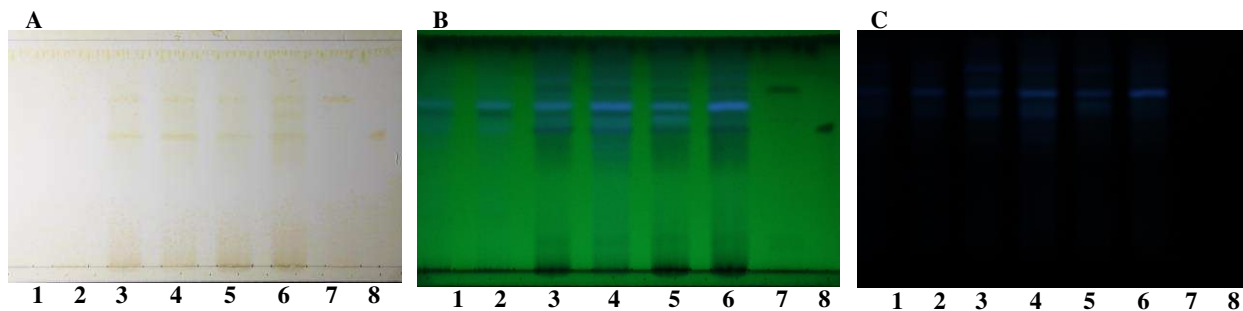


Figura 32: Cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad Holanda. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas controles; las calles 3 y 4, a plantas sometidas a estrés bajo; y las calles 5 y 6, a plantas sometidas a estrés alto. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 7 y 8 respectivamente. Reveladores: A) reactivo de Dragendorff, B) luz UV 254 nm y C) luz UV 365 nm.

De igual manera que para la variedad P, se puede observar que las FC2 son mucho más ricas en alcaloides que las FC1 (ver coloraciones marrones en las placas A, cuyo revelador es específico para este tipo de moléculas). Por otra parte, en las FC2 correspondientes a las plantas C no se evidencia la presencia de los testigos catarantina y vindolina mientras que, en las FC2 de las plantas sometidas a estrés hídrico, es clara la presencia de ambos compuestos. Con esta técnica cromatográfica, es difícil determinar cuál de los dos tratamientos de estrés hídrico produce mayor cantidad de catarantina y vindolina.

En la Figura 33 se muestran los cromatogramas obtenidos para los L correspondientes a la variedad H.

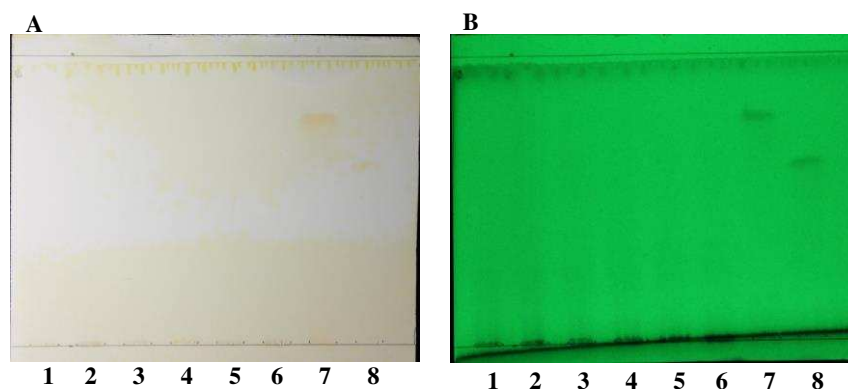


Figura 33: Cromatogramas obtenidos para los liofilizados correspondientes a la variedad Holanda. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas controles; las calles 3 y 4, a plantas sometidas a estrés bajo; y las calles 5 y 6, a plantas sometidas a estrés alto. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 7 y 8 respectivamente. Reveladores: A) reactivo de Dragendorff y B) luz UV 254 nm.

De igual manera que en la variedad P, se puede observar que en los L tanto de las plantas C como de las sometidas a estrés hídrico, no se evidencia la presencia de catarantina y vindolina. Además, dada la ausencia de coloración marrón en la placa revelada con Dragendorff, se concluye que no existen alcaloides en los productos de liofilización. Este resultado era esperable, ya que el método de separación de alcaloides elegido (Stas Otto), concentra a estos productos en la FC2.

En lo que se refiere a los estudios fitoquímicos, se puede concluir que tanto la variedad P como la H se comportaron de la misma manera frente al estrés hídrico generado en las condiciones de este trabajo: 1) En las FC1 no se evidenció la presencia de catarantina y vindolina tanto en las plantas C como en las plantas tratadas, pero sí se observó la presencia de otros alcaloides que se manifestaron por el sistema de revelado específico (Dragendorff). En las FC1 de las plantas sometidas a estrés hídrico, se observó mayor cantidad de alcaloides que en las C. 2) En las FC2 se evidenció la presencia de los testigos catarantina y vindolina solamente en las plantas sometidas a estrés hídrico, pero no en las plantas C. Si bien no se puede concluir cuál de los dos niveles de estrés hídrico influyó más en el aumento de la concentración de estos

alcaloides debido a que la técnica analítica utilizada no lo permite, es claro que el estrés hídrico es determinante en la producción de estos metabolitos secundarios en Vinca. 3) En los L no se evidenció la presencia de estos compuestos ni en las plantas C ni en las tratadas, como tampoco se observó presencia de cualquier otro tipo de alcaloide según el revelador Dragendorff. Esto era esperable dado que la metodología extractiva utilizada (Stas-Otto), concentra a este tipo de alcaloides en las fracciones clorofórmicas.

Nuestros resultados referidos a la incidencia del estrés hídrico en la concentración de catarantina y vindolina para las variedades P y H de Vinca, se corresponden con un estudio realizado bajo condiciones de estrés hídrico en otras dos variedades (rosa y alba) de *C. roseus*, donde se estimaron los perfiles de actividad antioxidante y de contenido de alcaloides en raíces, tallos, hojas, flores y vainas. Tanto la concentración de alcaloides como la actividad antioxidante de las enzimas fueron altas en condiciones de déficit hídrico en todas las partes de las plantas. Respecto al contenido de alcaloides totales, fueron mayores en las raíces y follaje de la variedad rosa respecto a la variedad alba. A partir de este estudio, se pudo concluir que la variedad rosa de *C. roseus* resultaría más adecuada para el cultivo en función de su producción de alcaloides en raíz, debido al aumento de estos metabolitos secundarios bajo estrés hídrico (Jaleel *et al.* 2008).

En otro estudio más amplio, se evaluó el efecto del estrés hídrico y la aplicación de ABA sobre el contenido de alcaloides. Se observó que cuando se redujo el potencial hídrico de -1,9 MPa a -4 MPa, el contenido de alcaloides aumentó un 130% respecto de las plantas control. En cuanto a la aplicación de ABA (1 mM) resultó en el cierre estomático y en un aumento del 40% (sobre una base de MS) en el contenido de alcaloides de las hojas tratadas (Saenz *et al.*, 1993).

A partir de estos resultados que se citan en la literatura y el aporte realizado en esta tesis, se puede inferir que las plantas bajo estrés por sequía están altamente reguladas por componentes del sistema antioxidante y componentes del metabolismo secundario. Los resultados de estos trabajos indicaron que el cultivo de plantas de *C. roseus* en zonas deficitarias

de agua aumentaría su metabolismo antioxidante y el nivel de sus principios activos (Jaleel *et al.*, 2008).

4.2 Tratamiento Hormonal

4.2.1 Condiciones ambientales

El registro de la T y la HR durante el ciclo del cultivo se presenta en la Figura 34.

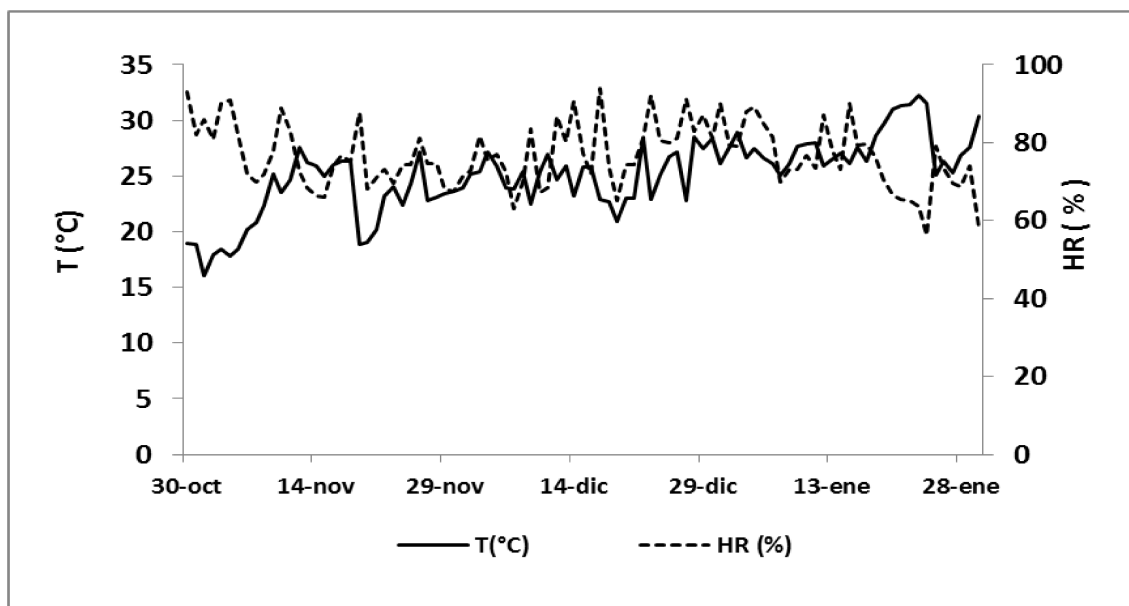


Figura 34: Condiciones de cultivo: Temperatura (T.; °C) y humedad relativa (HR; %) durante el ciclo de cultivo.

4.2.2 Efecto del tratamiento hormonal sobre las variables morfológicas de dos variedades de Vinca en el invernadero

Las hormonas vegetales regulan el metabolismo secundario afectando su producción (El-Sayed y Verpoorte, 2002). Los jasmonatos actúan como intermediarios de la transducción de señales cuando las plantas están sometidas a tensiones ambientales como la radiación UV, el choque osmótico y el calor. Presentan actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo*, como también inducen la inhibición del crecimiento de las células cancerosas, mientras dejan intactas las células no transformadas. Por lo tanto, los jasmonatos son agentes anticancerígenos que exhiben

citotoxicidad selectiva hacia cierto tipo de células (Cohen y Flescher, 2009). El MeJa es un inductor químico de plantas que se ha utilizado para inducir artificialmente respuestas de defensa química y resistencia contra herbívoros en muchas especies durante las últimas décadas (Moreira *et al.*, 2009). Además, el MeJa inicia la transcripción de *novó* de genes, como el de la fenilalanina amoníaco liasa, que se demostró que están involucrados en los mecanismos de defensa química de las plantas (Gundlach *et al.*, 1992). Por otra parte, el ABA desempeña un papel esencial frente a una variedad de tensiones como el estrés por metales pesados, sequía, estrés térmico, alto nivel de salinidad, baja temperatura y estrés por radiación. También interviene en varios procesos de desarrollo como la germinación y latencia de semillas y el cierre de estomas, además de poseer funciones claves en numerosos procesos como el crecimiento vegetativo, brotación y reacción al estrés ecológico (Xiong y Zhu, 2003 ; Tuteja, 2007). El ABA también interviene en el daño por estrés mediante la activación de muchos genes sensibles que codifican enzimas para la biosíntesis de osmolitos compatibles y proteínas, que conjuntamente aumentan la tolerancia al estrés de las plantas (Hasegawa *et al.*, 2000). ABA se conoce comúnmente como la "hormona del estrés" que responde a una variedad de tensiones ambientales, incluyendo estrés biótico y abiótico (Zhang, 2014). En condiciones no estresantes, el ABA en las células vegetales se mantiene en niveles bajos (Xiong, y Zhu, 2003).

Las concentraciones de alcaloides en las plantas pueden responder tanto a estrés biótico y abiótico como a variaciones de temperatura (Frischknecht y Baumann, 1985), concentraciones de MeJa (Aerts *et al.*, 1996), estrés osmótico (Godoy-Hernández y Loyola-Vargas, 1991), concentraciones de ABA (Saenz *et al.*, 1993) y estrés nutricional (Mazzafera, 2000). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los estudios realizados hasta el momento, utilizaron cultivos celulares y sólo algunos se llevaron a cabo con plantas intactas. Por eso, el objetivo del presente apartado, fue investigar el efecto del tratamiento hormonal en la producción de alcaloides en Vinca. En este caso, no se consideró el factor orientación en el invernadero, y por lo tanto el tratamiento estadístico resultó ser un factorial 2x4 en el cual los dos niveles del factor

variedad correspondieron a P y H y los cuatro niveles del factor tratamiento hormonal, a C, A, MJ y AM.

Los resultados obtenidos en referencia a los cambios en la morfología vegetal luego del tratamiento hormonal: C, A, MJ, AM sobre las variedades de Vinca (P y H) cultivadas en invernadero, se describen a continuación. En la tabla 7 se presentan los valores medios de las variables AF, AP y NH para los distintos niveles de cada uno de los factores mencionados (tratamiento hormonal y variedad).

Tabla 7: Valores medios \pm desvío estándar correspondientes al área foliar (AF, en cm^2), altura de planta (AP, en cm) y número de hojas (NH), luego de aplicar los tratamientos hormonales para ambas variedades de Vinca (Paraná y Holanda) en invernadero.

Variedad	Tratamiento	Área foliar (AF, cm^2)	Altura de planta (AP, cm)	Número de hojas (NH)
Paraná	C	1332,15 \pm 134,37	25,7 \pm 0,99	46,7 \pm 2,64
Paraná	A	1330,81 \pm 134,37	25,6 \pm 0,99	46,6 \pm 2,64
Paraná	MJ	1262,35 \pm 134,37	23,3 \pm 0,99	50,5 \pm 2,64
Paraná	AM	1966,36 \pm 134,37	36,2 \pm 0,99	72,5 \pm 2,64
Holanda	C	1354,25 \pm 134,37	21,8 \pm 0,99	43,8 \pm 2,64
Holanda	A	1351,02 \pm 134,37	21 \pm 0,99	39,9 \pm 2,64
Holanda	MJ	1379,52 \pm 134,37	21,1 \pm 0,99	46,1 \pm 2,64
Holanda	AM	2042,66 \pm 134,37	35,8 \pm 0,99	67,3 \pm 2,64

C: tratamiento control; A: tratamiento hormonal con ácido abscísico; MJ: tratamiento hormonal con metiljasmonato; AM: tratamiento hormonal con ácido abscísico+metiljasmonato.

Para la variable AF, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los dos factores variedad*tratamiento hormonal ($p=0,9801$). Tampoco existió diferencias significativas entre los dos niveles del factor variedad ($p=0,5408$), mientras que si se observó diferencia significativa ($p<0,0001$) entre los niveles del factor tratamiento hormonal (Figura 35).

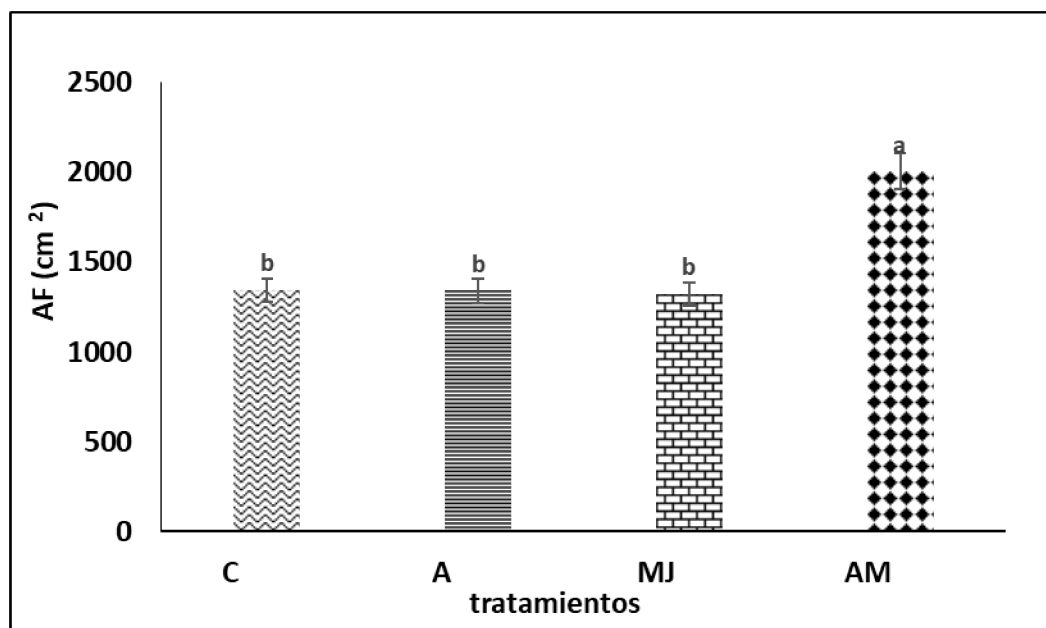


Figura 35: Valores de área foliar (AF, en cm²) considerando únicamente los 4 niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa). Letras diferentes indican diferencias entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Para la variable AP, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los dos factores variedad*tratamiento hormonal ($p=0,1548$).

Considerando el factor tratamiento hormonal, se presentaron diferencias significativas entre sus cuatro niveles ($p<0,0001$), indicando que la variable AP fue significativamente superior en el tratamiento AM respecto a los demás tratamientos (Figura 36).

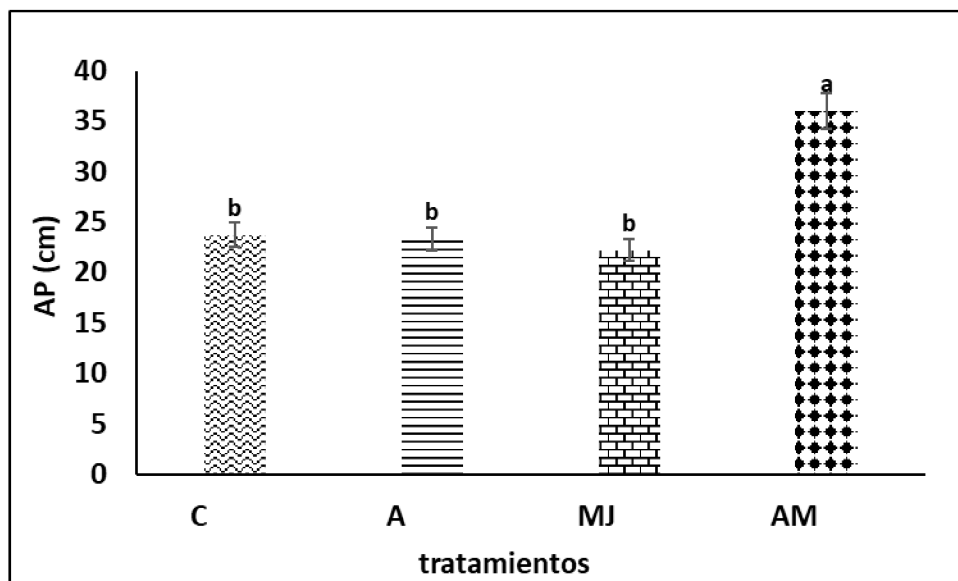


Figura 36: Valores de altura de planta (AP, en cm) considerando únicamente los cuatro niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa). Letras diferentes indican diferencias entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Para la variable NH, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los dos factores variedad*tratamiento hormonal ($p=0,9094$).

Considerando el factor variedad, se presentaron diferencias significativas entre sus dos niveles ($p=0,0122$), indicando que la variable NH fue significativamente superior en un 9,74% para la variedad P respecto de la variedad H.

Considerando el factor tratamiento hormonal, se presentaron diferencias significativas ($p<0,0001$) entre sus cuatro niveles, indicando que la variable NH fue significativamente superior para el nivel AM respecto a los niveles de C, A y MJ (Figura 37).

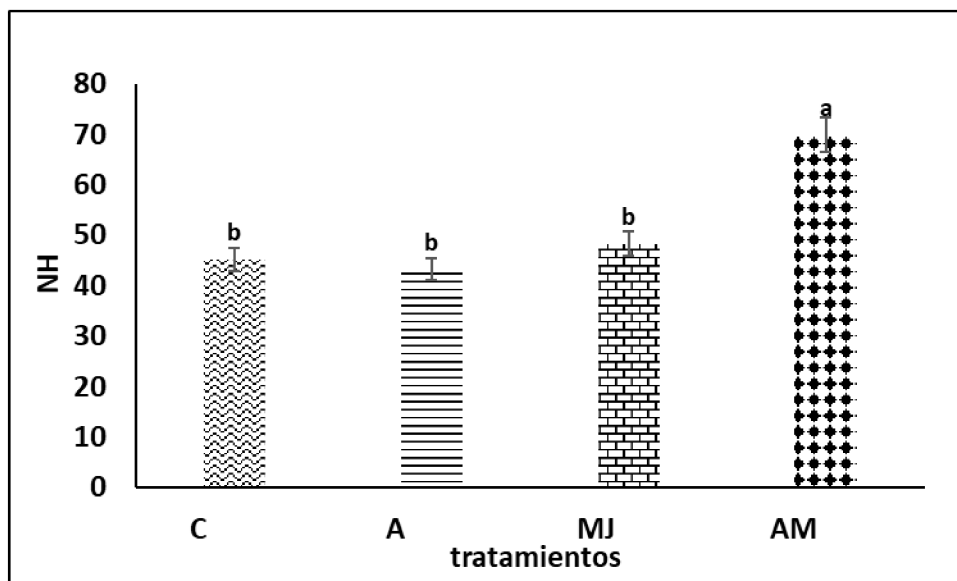


Figura 37: Valores de número de hojas (NH) considerando únicamente los cuatro niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa). Letras diferentes indican diferencias entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Los resultados anteriores manifestaron que las plantas que recibieron el tratamiento hormonal combinado AM presentaron valores significativamente superiores de las tres variables estudiadas (AF, AP y NH), independiente de la variedad. Estos resultados se pueden relacionar con lo descrito en un estudio de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en el cual se aplicó MJ o BTH que aumentó la densidad de tricomas glandulares relacionados con la defensa en hojas nuevas (Boughton *et al.*, 2005). También se puede relacionar con un estudio realizado en las plántulas de Jaborandi (*Pilocarpus sp.*) que fueron sometidas a diferentes tratamientos para estudiar la inducción de pilocarpina (otro tipo de alcaloide) en las hojas. El SA y el MJ indujeron un aumento de pilocarpina cuatro veces mayor respecto a los controles, este aumento dependió de la concentración y el tiempo después de la exposición a las hormonas mencionadas (Avancini *et al.*, 2003).

4.2.3 Efecto del tratamiento hormonal sobre las variables MS y porcentaje de extractos obtenidos de dos variedades de Vinca en condiciones de invernadero.

Los resultados obtenidos en referencia a los cambios en peso de materia seca y materia extraída que produjo el tratamiento hormonal (C, A, MJ y AM) sobre las variedades de Vinca (P y H) cultivadas en invernadero, se describen a continuación. En la tabla 8, se presentan los valores medios de las variables MS, EET, FC1, FC2 y L para los distintos niveles de cada uno de los factores mencionados (tratamiento hormonal y variedad). Los porcentajes de EET se refieren al 100% de MS, mientras que los porcentajes de las FC1, FC2 y L, se refieren al 100% de EET.

Tabla 8: Valores medios \pm desvío estándar correspondientes a las variables materia seca (MS), extracto etanólico total (EET), fracción clorofórmica 1 (FC1), fracción clorofórmica 2 (FC2) y liofilizado (L), luego de aplicar los cuatro niveles del factor tratamiento hormonal (control, ABA, MeJa y ABA+MeJa) para ambas variedades de Vinca (Paraná y Holanda) en invernadero.

Variedad	Tratamiento	MS (g)	EET (%)	FC1 (%)	FC2 (%)	L (%)
Paraná	C	25,30 \pm 0,87	13,24 \pm 0,52	6,16 \pm 0,15	0,23 \pm 0,01	6,85 \pm 0,5
Paraná	A	25,70 \pm 0,87	16,79 \pm 0,52	5,83 \pm 0,15	0,22 \pm 0,01	10,74 \pm 0,5
Paraná	MJ	26,33 \pm 0,87	33,34 \pm 0,52	5,84 \pm 0,15	0,25 \pm 0,01	8,93 \pm 0,5
Paraná	AM	38,23 \pm 0,87	15,02 \pm 0,52	5,89 \pm 0,15	0,52 \pm 0,01	26,93 \pm 0,5
Holanda	C	41,13 \pm 0,87	10,39 \pm 0,52	4,79 \pm 0,15	0,10 \pm 0,01	5,50 \pm 0,5
Holanda	A	44,03 \pm 0,87	10,59 \pm 0,52	5,21 \pm 0,15	0,11 \pm 0,01	5,27 \pm 0,5
Holanda	MJ	52,23 \pm 0,87	10,46 \pm 0,52	5,05 \pm 0,15	0,14 \pm 0,01	5,26 \pm 0,5
Holanda	AM	58,07 \pm 0,87	12,51 \pm 0,52	5,19 \pm 0,15	0,25 \pm 0,01	7,08 \pm 0,5

C: tratamiento control; A: tratamiento hormonal con ácido abscísico; MJ: tratamiento hormonal con metiljasmonato; AM: tratamiento hormonal con ácido abscísico+metiljasmonato.

Para la variable MS, el análisis estadístico determinó interacción significativa entre los dos factores variedad*tratamiento hormonal ($p=0,0002$) para los que se presentan los contrastes ortogonales en la tabla 9.

Tabla 9: Contrastes ortogonales para la interacción entre los factores variedad y tratamiento hormonal de la variable materia seca (MS).

Materia Seca (MS)		
Variedad*tratamiento hormonal	Contraste	p-valor
PC vs PA	-0,40±1,24	0,7506
PC vs PMJ	-1,03±1,24	0,4158
PC vs PAM	-12,93±1,24	<0,0001
PA vs PMJ	-0,63±1,24	0,6156
PA vs PAM	-12,53±1,24	<0,0001
PMJ vs PAM	-11,90±1,24	<0,0001
HC vs HA	-2,90±1,24	0,0323
HC vs HMJ	-11,10±1,24	<0,0001
HC vs HAM	-16,93±1,24	<0,0001
HA vs HMJ	-8,20±1,24	<0,0001
HA vs HAM	-14,03±1,24	<0,0001
HMJ vs HAM	-5,83±1,24	0,0002

PC: variedad Paraná, tratamiento Control; PA: variedad Paraná, tratamiento con ácido abscísico; PMJ: variedad Paraná, tratamiento con metiljasmonato; PAM: variedad Paraná, tratamiento ácido abscísico+metiljasmonato; HC: variedad Holanda, tratamiento Control; HA: variedad Holanda, tratamiento con ácido abscísico; HMJ: variedad Holanda, tratamiento con metiljasmonato; HAM: variedad Holanda, tratamiento ácido abscísico+metiljasmonato.

Como se observa en la tabla 9, al fijar cada nivel del factor variedad, la variable MS presentó diferencias significativas entre los distintos niveles del factor tratamiento hormonal (Figura 38).

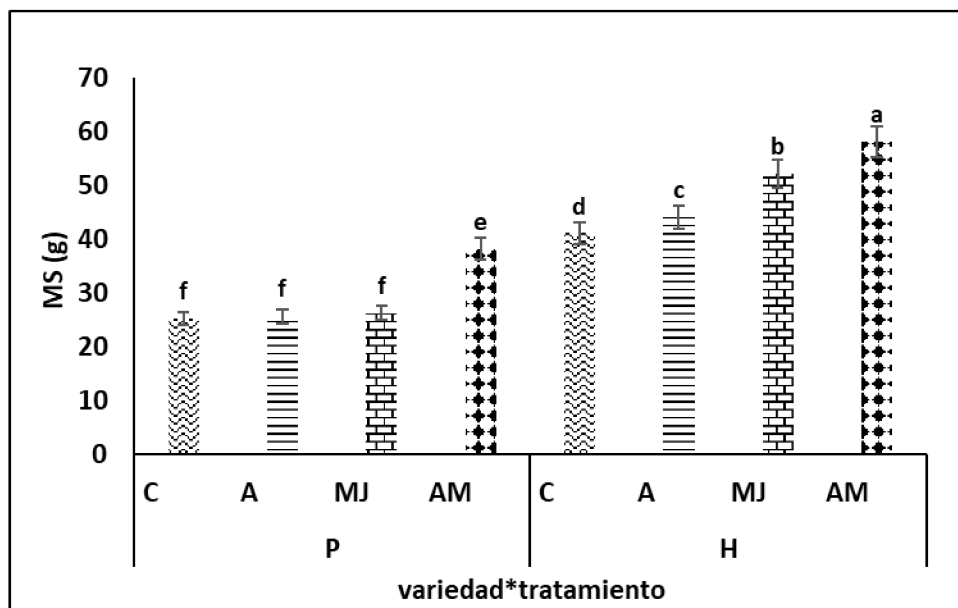


Figura 38: Valores de materia seca (MS, en g) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los cuatro niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Los valores más altos de MS (figura 38) se obtuvieron para el tratamiento hormonal combinado AM en cada una de las variedades de Vinca. En el caso de la variedad H, todos los niveles del factor resultaron significativamente diferentes, siendo el nivel AM el que presentó mayor diferencia respecto al C. Además, el valor de la variable MS para el tratamiento hormonal combinado AM en esta variedad resultó significativamente mayor al correspondiente para la variedad P. También cabe mencionar que en el caso de la variedad P no existieron diferencias significativas entre los demás tratamientos C, A y MJ.

Considerando únicamente el factor tratamiento hormonal, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre sus cuatro niveles, indicando que la variable MS fue significativamente superior en un 34,53% para el nivel AM respecto a los niveles C, A y MJ.

Considerando únicamente el factor variedad, se presentaron diferencias significativas entre sus dos niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable MS fue significativamente superior en 69,15% para la variedad H respecto de la variedad P.

Para la variable EET, el análisis estadístico determinó que hay interacción significativa entre los dos factores variedad*tratamiento hormonal ($p < 0,0001$) para los que se presentan los contrastes ortogonales en la tabla 10.

Tabla 10: Contrastes ortogonales de extractos etanólicos totales (EET) para la interacción entre los factores variedad y tratamiento hormonal.

Variedad*tratamiento hormonal	EET (%)	
	Contraste	p-valor
PC vs PA	-3,55±0,74	0,0002
PC vs PMJ	-1,78±0,74	0,028
PC vs PAM	-20,09±0,74	<0,0001
PA vs PMJ	1,77±0,74	0,029
PA vs PAM	-16,55±0,74	<0,0001
PMJ vs PAM	-18,31±0,74	<0,0001
HC vs HA	-0,20±0,74	0,7895
HC vs HMJ	-0,07±0,74	0,929
HC vs HAM	-2,12±0,74	0,0109
HA vs HMJ	0,13±0,74	0,8587
HA vs HAM	-1,92±0,74	0,0191
HMJ vs HAM	-2,05±0,74	0,0132

PC: variedad Paraná, tratamiento Control; PA: variedad Paraná, tratamiento con ácido abscísico; PMJ: variedad Paraná, tratamiento con metiljasmonato; PAM: variedad Paraná, tratamiento ácido abscísico+metiljasmonato; HC: variedad Holanda, tratamiento Control; HA: variedad Holanda, tratamiento con ácido abscísico; HMJ: variedad Holanda, tratamiento con metiljasmonato; HAM: variedad Holanda, tratamiento ácido abscísico+metiljasmonato.

Como se observa en la tabla 10, al fijar cada nivel del factor variedad, la variable EET presentó diferencias significativas entre los distintos niveles del factor tratamiento hormonal (Figura 39).

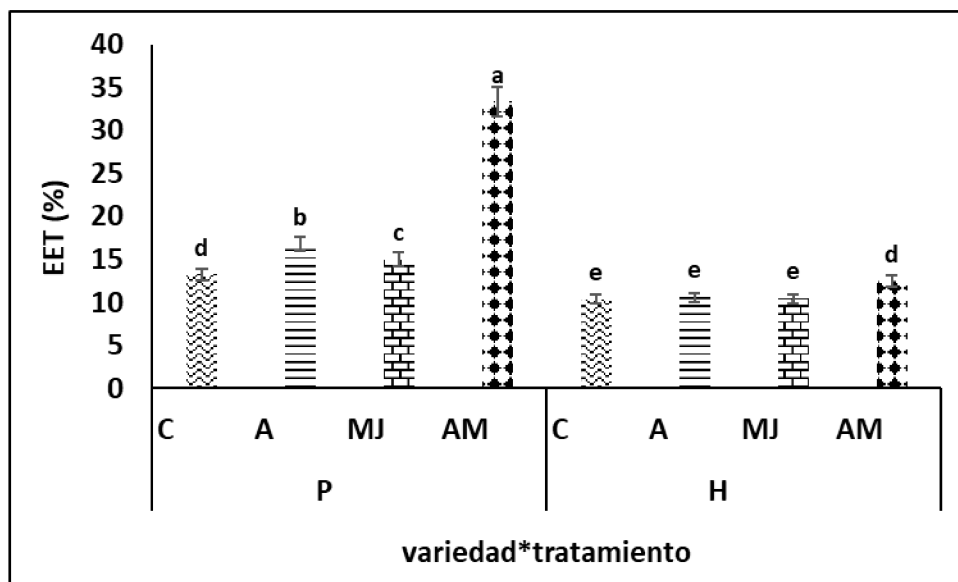


Figura 39: Valores de la variable extractos etanólicos totales (EET, en % respecto a MS) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los cuatro niveles del factor tratamiento hormonal: C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Los mayores valores para la variable EET (en % respecto a MS) se obtuvieron en el tratamiento AM, en ambas variedades. En el caso de la variedad P, existieron también diferencias significativas entre los demás niveles C, A y MJ. En la variedad H, no existieron diferencias entre los demás niveles C, A y MJ.

Considerando únicamente el factor tratamiento hormonal, se presentaron diferencias significativas entre sus cuatro niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable EET fue significativamente superior en un 79,76% para el tratamiento AM respecto a los niveles de tratamiento hormonal C, A y MJ.

Considerando únicamente el factor variedad, se presentaron diferencias significativas entre sus dos niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable EET fue significativamente superior en 78,34% para la variedad P respecto de la variedad H.

Para la variable FC1, el análisis estadístico determinó que no hay interacción significativa entre los dos factores variedad*tratamiento hormonal ($p = 0,0900$).

Considerando únicamente el factor tratamiento hormonal, no se presentaron diferencias significativas entre sus cuatro niveles ($p = 0,9274$).

Considerando únicamente el factor variedad, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre sus dos niveles, indicando que la variable FC1 fue significativamente superior en 17,19% para la variedad P respecto de la variedad H (Figura 40).

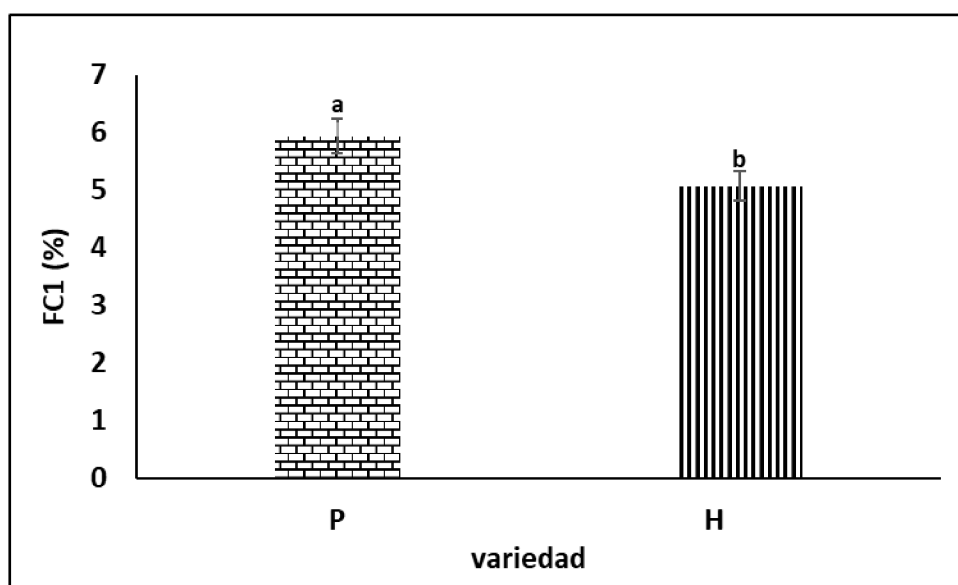


Figura 40: Valores de la variable fracción clorofórmica 1 (FC1, en % respecto de EET) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H). Letras diferentes indican diferencias entre los niveles del factor variedad según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Para la variable FC2, el análisis estadístico determinó que hay interacción significativa entre los dos factores variedad*tratamiento hormonal ($p < 0,0001$) para los que se presentan los contrastes ortogonales en la tabla 11.

Tabla 11: Contrastes ortogonales de la variable fracción clorofórmica 2 (FC2) para la interacción entre los factores variedad y tratamiento hormonal.

FC2 (%)		
Variedad*tratamiento hormonal	Contraste	p-valor
PC vs PA	0,01±0,02	0,7342
PC vs PMJ	-0,02±0,02	0,2441
PC vs PAM	-0,29±0,02	<0,0001
PA vs PMJ	-0,03±0,02	0,1395
PA vs PAM	-0,3±0,02	<0,0001
PMJ vs PAM	-0,27±0,02	<0,0001
HC vs HA	-0,01±0,02	0,6113
HC vs HMJ	-0,04±0,02	0,0755
HC vs HAM	-0,14±0,02	<0,0001
HA vs HMJ	-0,03±0,02	0,1859
HA vs HAM	-0,13±0,02	<0,0001
HMJ vs HAM	-0,11±0,02	<0,0001

PC: variedad Paraná, tratamiento Control; PA: variedad Paraná, tratamiento con ácido abscísico; PMJ: variedad Paraná, tratamiento con metiljasmonato; PAM: variedad Paraná, tratamiento ácido abscísico+metiljasmonato; HC: variedad Holanda, tratamiento Control; HA: variedad Holanda, tratamiento con ácido abscísico; HMJ: variedad Holanda, tratamiento con metiljasmonato; HAM: variedad Holanda, tratamiento ácido abscísico+metiljasmonato.

Como se observa en la tabla 11, al fijar cada nivel del factor variedad, la variable FC2 presentó diferencias significativas para diferentes niveles del factor tratamiento hormonal (Figura 41).

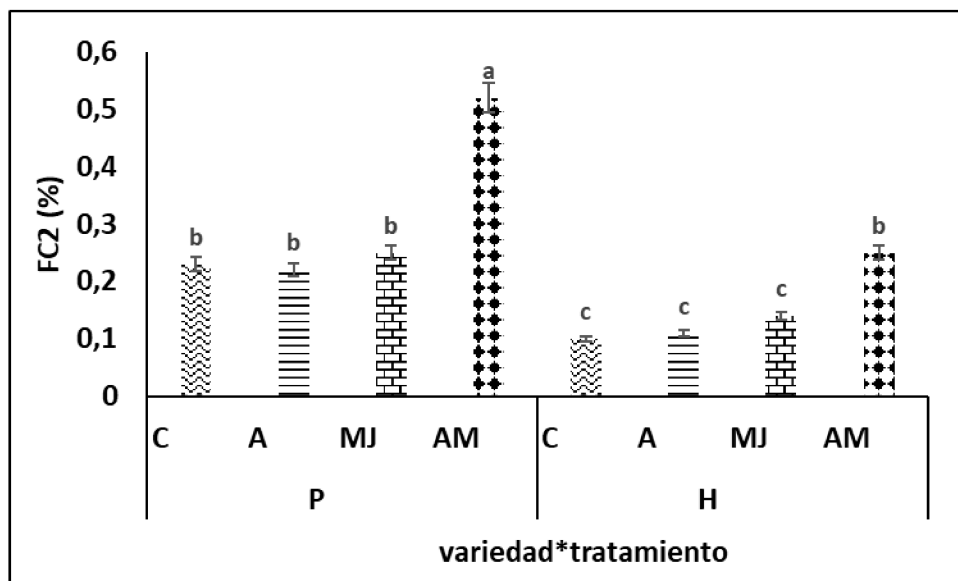


Figura 41: Valores de la variable fracción clorofórmica 2 (FC2, en % respecto de EET) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los cuatro niveles del factor tratamiento hormonal: C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

En cuanto a los valores de FC2, ambas variedades obtuvieron diferencias significativas para el tratamiento AM respecto a los demás (C, A y MJ). La variedad P presentó el mayor valor de FC2 y, además, tanto para la variedad P como para la H no existieron diferencias significativas entre los demás niveles de tratamiento.

Considerando únicamente el factor tratamiento hormonal, se presentaron diferencias significativas entre sus niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable FC2 fue significativamente superior en un 111,11% para AM respecto a C, A y MJ.

Considerando únicamente el factor variedad, se presentaron diferencias significativas entre sus dos niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable FC2 fue significativamente superior en un 100% para la variedad P respecto de la variedad H.

Para la variable L, el análisis estadístico determinó que hay interacción significativa entre los dos factores variedad*tratamiento hormonal ($p < 0,0001$) para los que se presentan los contrastes ortogonales en la tabla 12.

Tabla 12: Contrastes ortogonales de la variable liofilizado (L) para la interacción entre los factores variedad y tratamiento hormonal.

Variedad*tratamiento hormonal	L (%)	
	Contraste	p-valor
PC vs PA	-3,89±0,71	<0,0001
PC vs PMJ	-2,08±0,71	0,0094
PC vs PAM	-20,08±0,71	<0,0001
PA vs PMJ	1,81±0,71	0,0207
PA vs PAM	-16,19±0,71	<0,0001
PMJ vs PAM	-18±0,71	<0,0001
HC vs HA	0,23±0,71	0,7485
HC vs HMJ	0,24±0,71	0,7415
HC vs HAM	-1,58±0,71	0,0396
HA vs HMJ	0,01±0,71	0,9926
HA vs HAM	-1,81±0,71	0,0207
HMJ vs HAM	-1,82±0,71	0,0203

PC: variedad Paraná, tratamiento Control; PA: variedad Paraná, tratamiento con ácido abscísico; PMJ: variedad Paraná, tratamiento con metiljasmonato; PAM: variedad Paraná, tratamiento ácido abscísico+metiljasmonato; HC: variedad Holanda, tratamiento Control; HA: variedad Holanda, tratamiento con ácido abscísico; HMJ: variedad Holanda, tratamiento con metiljasmonato; HAM: variedad Holanda, tratamiento ácido abscísico+metiljasmonato.

Como se observa en la tabla 12, al fijar cada nivel del factor variedad, la variable L presentó diferencias significativas para diferentes niveles del factor tratamiento hormonal (Figura 42).

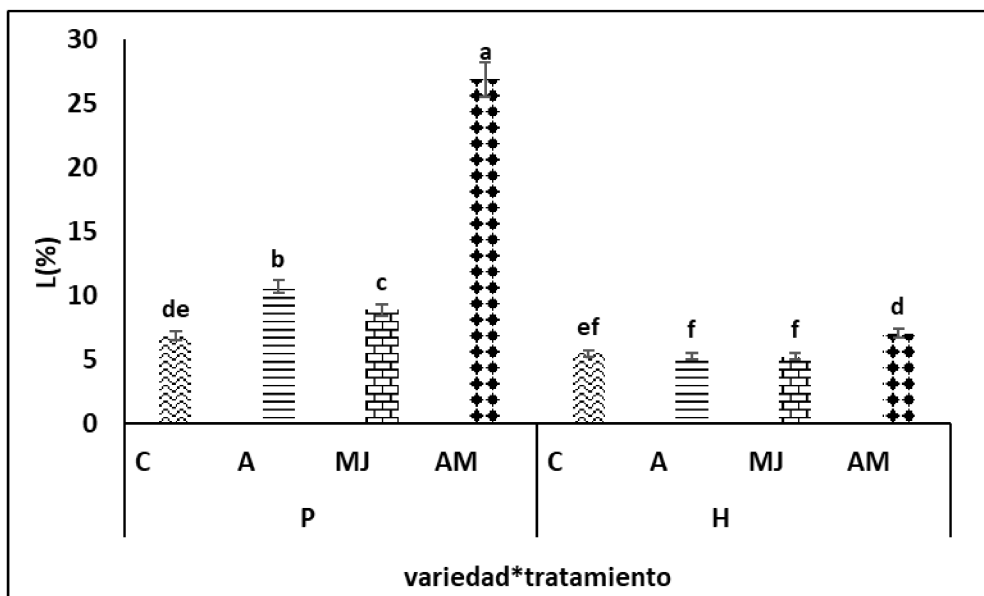


Figura 42: Valores de la variable liofilizado (L, en % respecto de EET) para la variedad Paraná (P) y Holanda (H) según los cuatro niveles del factor tratamiento hormonal C (Control), A (ABA), MJ (MeJa), AM (ABA+MeJa). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles del factor según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Respecto a la variable L, ambas variedades presentaron diferencias significativas para el nivel de tratamiento AM respecto a los demás (C, A y MJ). Considerando las variedades, P obtuvo el mayor valor de L para el nivel AM.

Considerando únicamente el factor variedad, se presentaron diferencias significativas entre sus dos niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable L fue significativamente superior en un 40,3% para la variedad P respecto de la variedad H.

Considerando únicamente el factor tratamiento hormonal, se presentaron diferencias significativas entre sus cuatro niveles ($p < 0,0001$), indicando que la variable L fue significativamente superior en 139,7% para AM respecto de C, A y MJ.

Estos resultados indicaron que, para cada variedad, el contenido de MS y los porcentajes de EET, FC2 y L fueron significativamente superiores en el nivel AM respecto a los demás tratamientos hormonales C, A y MJ; mientras que el porcentaje de FC1 presentó diferencias significativas únicamente según la variedad, siendo P la que obtuvo mayor

porcentaje de FC1. En cuanto al porcentaje de FC2 (que es donde se concentran los alcaloides de interés) en el tratamiento AM se obtuvieron los mayores porcentajes para ambas variedades, siendo la variedad P la que presentó el mayor valor de esta variable.

Estos resultados pueden relacionarse con un estudio donde se evaluó el efecto de la aplicación exógena de MJ a diferentes concentraciones sobre el crecimiento, la producción de defensas químicas y la resistencia contra el gran gorgojo del pino (*Hylobius abietis* L.) en plantas de *Pinus pinaster* Ait. La aplicación exógena de MJ indujo la acumulación de resina en los tallos y mejoró la resistencia contra *H. abietis* (Moreira *et al.*, 2009). También se ha informado que MJ induce resistencia contra insectos herbívoros y patógenos (Moreira *et al.*, 2009). Por otro lado, el MJ y su JA que colectivamente son llamados jasmonatos, activan los mecanismos de defensa de las plantas en respuesta a heridas causadas por insectos, diversos patógenos y factores ambientales como la sequía, baja T y salinidad (Cheong y Do Choi, 2003; Creelman y Mullet 1997; Pérez y Goossens, 2013; Shahzad *et al.*, 2015).

También se demostró que MJ es un inductor químico del metabolismo secundario, promoviendo la biosíntesis de tabersonina (otro alcaloide bisindólico pero que no posee interés farmacéutico) en la raíz de *C. roseus* (Rodríguez *et al.*, 2003). La formación de inhibidores de proteinasas inducida por heridas es un ejemplo bien estudiado, en el que el JA se combina con ABA y etileno para proteger a la planta de la depredación (Wasternack y Parthier, 1997). Es importante destacar que manipular los niveles de ABA cambiando la expresión de genes biosintéticos clave, proporciona un medio eficaz para aumentar la resistencia (Xiong y Zhu, 2003). El estudio de la influencia de los genes inducidos por ABA en la tolerancia al estrés bajo la combinación de múltiples condiciones, dará una visión detallada sobre el funcionamiento de ABA (Vishwakarma *et al.*, 2017).

Del análisis bibliográfico y con los resultados de esta tesis, se concluye que los tratamientos hormonales podrían inducir la biosíntesis de los monómeros alcaloidales vindolina y catarantina, aumentando su concentración en las plantas tratadas. En este estudio, el

tratamiento hormonal que presentó mayores valores de FC2 (que es donde se encuentran los alcaloides), fue el combinado AM; y la variedad que mayor cantidad de FC2 acumuló, es la P.

4.2.4 Análisis cualitativo de la presencia de los alcaloides catarantina y vindolina en las FC2 obtenidos de plantas de Vinca sometidas a tratamiento hormonal

En trabajos previos, se investigaron los efectos de las fitohormonas asociadas a la producción de alcaloides utilizando cultivos de múltiples brotes de *C. roseus*. Se observó un nivel alto y equilibrado de vindolina y catarantina (765 y 552 μg respectivamente por gramo de brotes frescos cultivados en un medio con agregado de hormonas bajo irradiación con luz intensa, 20 W/m^2) que son materiales útiles para la síntesis química o enzimática de alcaloides bisindólicos antineoplásticos (Hirata *et al.*, 1990). A continuación, se presentarán los resultados obtenidos en nuestro caso de estudio. Para el análisis fitoquímico de las plantas sometidas a tratamientos hormonales, sólo se mostrarán las FC2 ya que son las que contienen los alcaloides de interés.

4.2.4.1 Vinca Variedad Paraná

En la Figura 43 se muestran los cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad P. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas C; las calles 3 y 4, a plantas tratadas con ABA; las calles 5 y 6, a plantas tratadas con MeJa y las calles 7 y 8, a plantas tratadas con la combinación AM. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 9 y 10 respectivamente. Como se mencionó en la parte experimental, los sistemas reveladores usados fueron: A) reactivo de Dragendorff, B) luz UV 254 nm y C) luz UV 365 nm. Tanto catarantina como vindolina no absorben a 365 nm, por lo que su presencia no se evidencia con este sistema de revelado.

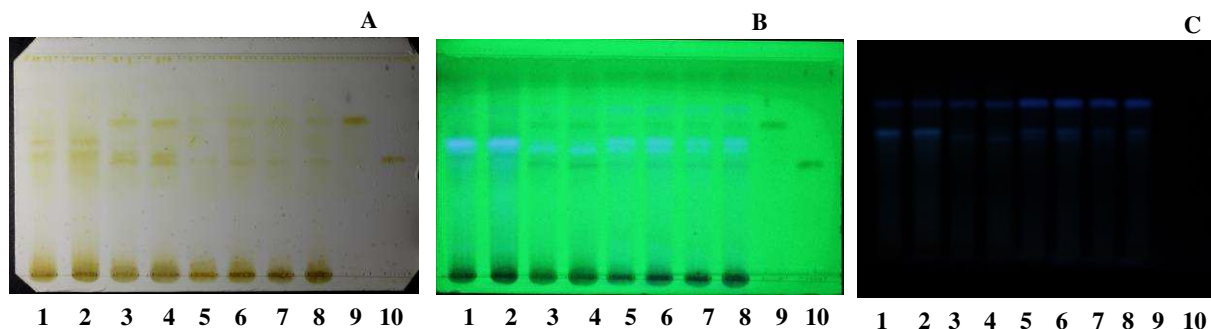


Figura 43: Cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad Paraná. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas control; las calles 3 y 4, a plantas tratadas con ABA; las calles 5 y 6, a plantas tratadas con MeJa y las calles 7 y 8, a plantas tratadas con la combinación ABA+MeJa. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 9 y 10 respectivamente. Reveladores: A) reactivo de Dragendorff, B) luz UV 254 nm y C) luz UV 365 nm.

En las FC2 correspondientes a las plantas C no se evidenció la presencia de los testigos catarantina y vindolina mientras que, en las FC2 de las plantas tratadas, es clara la presencia de ambos compuestos. Si bien con esta técnica cromatográfica es difícil determinar cuál de los tratamientos hormonales produce mayor cantidad de catarantina y vindolina, se puede deducir que el tratamiento con ABA y el combinado AM presentaron mayor intensidad en las bandas correspondientes a los testigos catarantina y vindolina. Por otra parte, se puede observar que en las plantas C aparecen otras bandas correspondientes a alcaloides (por el tipo de coloración marrón frente al revelado) que no están presentes en las FC2 de las plantas tratadas.

4.2.4.2 *Vinca Variedad Holanda*

En la Figura 44 se muestran los cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad H. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas C; las calles 3 y 4, a plantas tratadas con ABA; las calles 5 y 6, a plantas tratadas con MeJa y las calles 7 y 8, a

plantas tratadas con la combinación ABA+MeJa. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 9 y 10 respectivamente.

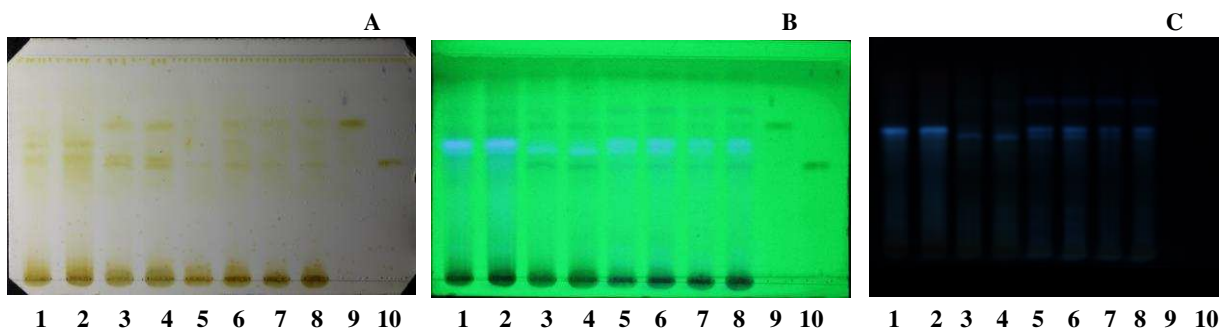


Figura 44: Cromatogramas obtenidos para las FC2 correspondientes a la variedad Holanda. Las calles 1 y 2 corresponden a plantas control; las calles 3 y 4, a plantas tratadas con ABA; las calles 5 y 6, a plantas tratadas con MeJa y las calles 7 y 8, a plantas tratadas con la combinación ABA+MeJa. Los testigos puros de catarantina y vindolina fueron sembrados en las calles 9 y 10 respectivamente. Reveladores: A) reactivo de Dragendorff, B) luz UV 254 nm y C) luz UV 365 nm.

Del mismo modo que para la variedad P, en las FC2 correspondientes a las plantas C no se evidenció la presencia de los testigos catarantina y vindolina mientras que, en las FC2 de las plantas tratadas, es clara la presencia de ambos compuestos. Si bien con esta técnica cromatográfica es difícil determinar cuál de los tratamientos hormonales produce mayor cantidad de catarantina y vindolina, se puede deducir que el tratamiento con ABA y el combinado ABA+MeJa presentó mayor intensidad en las bandas correspondientes a los testigos catarantina y vindolina. Por otra parte, se puede observar que en las plantas control aparecen otras bandas correspondientes a alcaloides (por el tipo de coloración marrón frente al revelado) que no están presentes en las FC2 de las plantas tratadas.

A partir de estos resultados se podría inferir que el tratamiento con ABA y el combinado con ABA+MeJa, tanto en la variedad P como en la H, aumentarían la producción de

los alcaloides monómeros catarantina y vindolina que son los precursores de los farmacológicamente activos vincristina y vinblastina.

En este sentido, se revisaron algunos trabajos en la literatura donde se ha demostrado que MeJa, es un inductor químico del metabolismo secundario, promueve la biosíntesis de vindolina en el desarrollo de las plántulas como resultado de la inducción de TDC y D3H. (Vázquez-Flota y De Luca, 1998). La aplicación externa de la molécula de señalización de las plantas MeJa, aumenta significativamente en las plántulas la acumulación de los alcaloides monoméricos. Estos efectos fueron más pronunciados cuando MeJa fue aplicado durante el proceso de germinación, ejerciendo así su efecto sobre la acumulación de alcaloides a través de una ampliación del grupo de precursores de alcaloides y una mejora de varias actividades enzimáticas en la biosíntesis de los mismos. La aplicación externa de MeJa puede ejercer un efecto notable en la síntesis de alcaloides en las plántulas de *Catharanthus*, también es evidente el hecho de que la biosíntesis de alcaloides en las plántulas es influenciada por MeJa sólo durante un intervalo de tiempo, después de lo cual MeJa apenas afecta el contenido de alcaloides (Aerts *et al.*, 1996).

Otro trabajo realizado mediante el tratamiento con MeJa en plántulas de *C. roseus* durante su desarrollo, generó como resultado la duplicación de la acumulación de algunos alcaloides. Las actividades de ciertas enzimas involucradas en la biosíntesis de alcaloides fueron fuertemente inducidas después de la aplicación de MeJa y se demostró que promovió la biosíntesis de vindolina en las plántulas como resultado de la inducción de las enzimas involucradas. Aunque las hojas jóvenes presentaron un contenido mucho mayor de catarantina y vindolina comparado con las hojas maduras, el catabolismo de estos monómeros a los alcaloides bisindol (dímeros) fue mayor en hojas viejas y se obtuvo un doble aumento en el rendimiento de anhidrovinblastina tras este tratamiento (El-Sayed y Verpoorte, 2005).

Del análisis bibliográfico y con los resultados de esta tesis, se concluye que los tratamientos hormonales podrían inducir la biosíntesis de los monómeros alcaloidales, aumentando su concentración en las plantas tratadas. Parece ser que el momento de la

aplicación de los mismos es fundamental, por lo que se abre un abanico de posibilidades para seguir investigando.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Durante este trabajo de tesis se logró desarrollar favorablemente el cultivo en condiciones de invernadero de dos variedades de la planta medicinal *C. roseus* (Vinca), que normalmente crece en regiones tropicales. Se observó la incidencia del estrés hídrico y de tratamientos hormonales en tres parámetros morfológicos (AF, AP y NH) como también en el rendimiento de MS y extractos (EET, FC1, FC2 y L) y en la presencia de los alcaloides marcadores catarantina y vindolina de la FC2.

De los resultados anteriores se puede concluir que: Tanto la variedad P como H de la especie Vinca, se vieron afectadas por el factor estrés hídrico reduciendo el AF, la AP y el NH; mientras que el factor orientación en el invernadero no afectó significativamente a las variables estudiadas. Además, el factor variedad presentó diferencias significativas de las variables estudiadas dadas las características propias de cada nivel (P y H). La diferencia de las variables AF, AP y NH entre las variedades de Vinca (H: 62,30 cm y P: 27,93 cm) independientemente de los niveles de estrés hídrico y orientación en el invernadero, se debe a características propias de los varietales. H es una variedad de mayor altura, mayor distancia de entrenudos y presenta menor número de hojas; mientras que la variedad P presenta menor altura, entrenudos cortos y un mayor número de hojas.

Para cada variedad, el contenido de MS y los porcentajes de EET, FC1 y L fueron significativamente superiores en el nivel C que en los dos niveles de estrés hídrico; mientras que el porcentaje de FC2 resultó mayor en los niveles EB y EA respecto al C. Esto indicaría que el mayor porcentaje de FC2 (que es donde se concentran los alcaloides de interés) en ambos niveles de estrés hídrico respecto al C, estaría relacionado con una producción mayor de estos compuestos en esas situaciones. Por otra parte, el contenido de MS y porcentaje de extractos para los tres niveles del factor estrés hídrico, fue superior en la variedad P dada las características morfológicas propias de esta variedad. En lo que se refiere a los estudios fitoquímicos, se puede concluir que tanto la variedad P como la H se comportaron de la misma manera frente al estrés hídrico generado en las condiciones de este trabajo: en las FC2 se

evidenció la presencia de los testigos catarantina y vindolina solamente en las plantas sometidas a estrés hídrico, pero no en las plantas C. Si bien no se puede concluir cuál de los dos niveles de estrés hídrico influyó más en el aumento de la concentración de estos alcaloides debido a que la técnica analítica utilizada no lo permite, es claro que el estrés hídrico es determinante en la producción de estos metabolitos secundarios en Vinca.

Para ambas variedades, existe una clara relación entre las variables morfológicas, de MS y materia extraída y contenido de alcaloides de interés frente al estrés hídrico. La disminución significativa de AF y NH va acompañada del aumento en la biosíntesis de los alcaloides catarantina y vindolina. Asimismo, la variedad P sometida al nivel bajo de estrés hídrico presentó un mayor contenido de MS, EET y FC2, siendo la combinación más apropiada para lograr mayor contenido de catarantina y vindolina.

Por otra parte, las plantas que recibieron el tratamiento hormonal combinado (AM) presentaron valores significativamente superiores de las tres variables morfológicas estudiadas (AF, AP y NH), materia extraída (EET, FC1, FC2 y L) y contenido de alcaloides de interés, independiente de la variedad. Esto sugiere un comportamiento distinto a lo que ocurrió con el estrés hídrico: frente a tratamientos hormonales, el aumento significativo de las variables morfológicas, va acompañado del aumento del contenido de materia extraída y alcaloides en la FC2. Además, las variables EET y FC2 fueron significativamente superiores para la variedad P respecto de la variedad H, por lo que se concluye que los tratamientos hormonales podrían inducir la biosíntesis de los monómeros alcaloidales vindolina y catarantina, aumentando su concentración en las plantas tratadas. En este estudio, el tratamiento hormonal que presentó mayores valores de FC2 (y por lo tanto mayor contenido de vindolina y catarantina), fue el combinado AM; y la variedad que mayor cantidad de FC2 acumuló, fue la P.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Acosta, L. y Rodríguez, C. 2002. Instructivo técnico para el cultivo de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Vicaria. Revista Cubana de Plantas Medicinales 7:1-6.
- ✓ Aerts, R. J., Schäfer, A., Hesse, M., Baumann, T. W. y Slusarenko, A. 1996. Signalling molecules and the synthesis of alkaloids in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry* 42(2):417-422.
- ✓ Almagro, L., Fernández-Pérez, F. y Pedreño, M.A. 2015. Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and their effect on human health. *Molecules* 20(2):2973-3000.
- ✓ Amiya, T. y Bando, H. 1998. Aconitum alkaloids: The Alkaloids. *Chemistry and Pharmacology*. Academic, San Diego. pp95-179.
- ✓ Apel, K. y Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- ✓ Ashraf, M. F. y Foolad, M. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59(2):206-216.
- ✓ Avancini, G., Abreu, I., Saldaña, M., Mohamed, R. y Mazzafera, P. 2003. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry* 63(2):171-175.
- ✓ Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K. y Arora S. 2013. Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation* 32(1):216-232.
- ✓ Boshc, J., Bonjoch, J. y Amat, M. 1996. The Strychnos alkaloids. *The Alkaloid. Chemistry and Pharmacology* 48:75-189.
- ✓ Boughton, A. J., Hoover, K., y Felton, G. W. 2005. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology* 31(9):2211-2216.
- ✓ Brachet, J. y Cosson, L. 1986. Changes in the Total Alkaloid Content of *Datura*

- innoxia* Mill. Subjected to Salt Stress. *Journal of Experimental Botany* 37(5): 650-656.
- ✓ Briske, D. D. y Camp, B. J. 1982. Water stress increases alkaloid concentrations in threadleaf groundsel (*Senecio longilobus*). *Weed Science Society of America* 30(1):106-108.
 - ✓ Brossi, A. y Suffness, M. 1990. The Alkaloids- Antitumor Bisindoles Alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.). Academic Press, San Diego. 37 p.
 - ✓ Brownstein, M.J. 1993. A brief history of opiates, opioid peptides and opiate receptors. *Proceedings of the National Academy USA* 90:5391-5393.
 - ✓ Bruce-Chwatt, L.J. 1988. Cinchona and its Alkaloids: 350 Years. *Journal of Medicinal Chemistry* 06:318-322.
 - ✓ Bruneton, J. 1993. Farmacognosia. Fitoquímica Plantas Medicinales. Ed. ACRIBIA SA. Zaragoza España. 1120 p.
 - ✓ Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A., Francia, E. y Stanca, A. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* 105:1-14.
 - ✓ Chandra, D.C. (Ed.). 2013. Mitochondria as Targets for Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. Springer, New York, Estados Unidos. 260 p.
 - ✓ Cheong, J. J. y Do Choi, Y. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *TRENDS in Genetics* 19(7):409-413.
 - ✓ Chiara, G. y North, R.A. 1992. Neurobiology of opiate abuse. *Trends. Journal of Pharmacological Sciences* 13:185-193.
 - ✓ Cohen, S. y Flescher, E. 2009. Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry* 70(13):1600-1609.
 - ✓ Cordell, G.A. 1981. Introduction to Alkaloids-a biogenetic approach. John Wiley & Sons-Interscience. New York. 1055 p.
 - ✓ Costa, M.M.R., Hilliou, F., Duarte, P., Pereira, G.L., Almeida, I., Leech, M., Memelink, J., Ros Barceló, A. y Sottomayor, M. 2008. Molecular cloning and characterization of a

- vacuolar class III peroxisada involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* 2:403-417.
- ✓ Creelman, R. A. y Mullet, J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology* 48(1):355-381.
 - ✓ Crozier, A., Yokota T., Jaganath, I.B., Marks, S.C., Saltmarsh, M. y Clifford, M.N. 2006. Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant-based dietary components. En: Crozier A., Clifford, M.N. y Ashihara, H. (eds.) *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publis. Oxford, United Kingdom. Pp 208-238.
 - ✓ Dalton, D.R. 1979. *The Alkaloids-The Fundamental Chemistry-a biogenetic approach*. Marcel Dekker, New York. 635p.
 - ✓ Dalton, DR. 1991. Alkaloids. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley, New York. Pp 1039-1087.
 - ✓ Davies, A. N., Broadley, K., y Beighton, D. 2001. Xerostomia in patients with advanced cancer. *Journal of pain and symptom management* 22(4):820-825.
 - ✓ Davies, K.M. y Espley, R.V. 2013. Opportunities and challenges for metabolic engineering of secondary metabolite pathways for improved human health characters in fruit and vegetable crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 41(3):154-177.
 - ✓ Dewick, P. M. 2009. Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms. En: *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom. 514 p.
 - ✓ Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M. y Robledo C.W. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina [online] Disponible en: URL: <http://www.infostat.com.ar>. Acceso: 10/03/2015.
 - ✓ Dong, J.G., Bornmann, W., Nakanishi, K. y Berova, N. 1995. Structural studies of

- vinblastine alkaloids by exciton coupled circular dichroism. *Phytochemistry* 40 (6):1821-1824.
- ✓ Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon S, Gürel A, Aktaş L y Gesheva, E. 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *General and Applied Plant Physiology* 34:67-78.
 - ✓ El-Sayed, M. y Verpoorte, R. 2002. Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68(3):265-270.
 - ✓ El-Sayed, M. y Verpoorte, R. 2005. Methyljasmonate accelerates catabolism of monoterpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* during leaf processing. *Fitoterapia* 76(1):83-90.
 - ✓ Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. y Basra, S. M. A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable agriculture*. Springer, Dordrecht. pp 153-188.
 - ✓ Florido Bacallao, M., y Bao Fundora, L. 2014. Tolerancia al estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales* 35(3):70-88.
 - ✓ Frischknecht, P.M. y Baumann. T.W. 1985. Stress induced formation of purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. *Phytochemistry* 24:2255-2257.
 - ✓ Godoy-Hernández, G. y Loyola-Vargas, V.M. 1991. Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures *Plant Cell Reports* 10:537-540.
 - ✓ Gregory, R.K. y Smith, I.E. 2000. Vinorelbine - a clinical review. *British Journal of Cancer* 82:1907-1913.
 - ✓ Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M. y Zenk, M. H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(6):2389-2393.
 - ✓ Hartmann, T. 1999. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* 207:483-495

- ✓ Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. y Bohnert, H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology* 51(1):463-499.
- ✓ Herbert, RB. 2001. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Natural Product Reports* 18:50-65.
- ✓ Hibino, S. y Choshi, T. 2001. Simple indole alkaloids and those with a non-rearranged monoterpene unit. *Natural Product Reports* 18:66-87.
- ✓ Hirata, K., Horiuchi, M., Ando, T., Miyamoto, K. y Miura, Y. 1990. Vindoline and catharanthine production in multiple shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70(3):193-195.
- ✓ Hoshino, O. 1998. The Amaryllidaceae alkaloids. *The Alkaloids. Chemistry and Biology*, Academic Press, USA. pp 324-424.
- ✓ Hunter, C.S. 1988. *Cinchona* ssp.: Micropropagation, and the in vitro production of quinine and quinidine. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medical and Aromatic Plants*, Springer Verlag, Berlin. pp 367-387.
- ✓ Ihara, M. y Fukumoto, K. 1996. Recent progress in the chemistry of non-monoterpene indole alkaloids. *Natural Product Reports* 13:241-261.
- ✓ Jacobo-Velázquez, D. A., Martínez-Hernández, G. B., Rodríguez, S. C. y Cisneros-Zevallos, L. 2009. Carrots as biofactories of nutraceuticals: using extreme postharvest stress conditions to intensify the production of antioxidants via a mechanism mediated by reactive oxygen species. 6th International Postharvest Symposium. International Society of Horticultural Science. Antalya. Turquía.
- ✓ Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P., Gomathinayagam, M., Sridharan, R. y Panneerselvam, R. 2008. Antioxidant potential and indole alkaloid profile variations with water deficits along different parts of two varieties of *Catharanthus roseus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 62(2):312-318.
- ✓ Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Sankari, S., y Panneerselvam, R. 2007. Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine

- production in *Catharanthus roseus*. Process Biochemistry 42(11):1566-1570.
- ✓ Jaleel, C. A., Sankar, B., Murali, P. V., Gomathinayagam, M., Lakshmanan, G. M. A. y Panneerselvam, R. 2008. Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 62(1):105-111.
 - ✓ Johnson, E.L. y Emcho, S. D. 1994. Variation in alkaloid content in *Erythroxylum coca* leaves from leaf bud to leaf drop. Annals of Botany 73:645-650.
 - ✓ Jordan, A., Hadfield, J.A., Lawrence, N.J. y McGown, A.T. 1998. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents, which interact with the mitotic spindle. Medical Research Reviews 18(4):2592-2596.
 - ✓ Junaid, A., Sheba, H.K., Zahid, H.S., Zohra, F., Mehpara, M., Mukthar, A.B., Sekh, A.N., Ilah, A., Iffat, Z.A., Saeed, A.K., Abdul, M. y Maheshwar, P S. 2010. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: It's applications and production. Pharmacie Globale (IJCP) 4(12):1-16.
 - ✓ Kaya, M. D., Okçu, G., Atak, M., Cıkılı, Y., y Kolsarıcı, Ö. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). European Journal of Agronomy 24(4):291-295.
 - ✓ Kennedy, C. W. y Bush, L. P. 1983. Effect of Environmental and Management Factors on the Accumulation of N-acetyl and N-formyl Loline Alkaloids in Tall Fescue. Crop Science 23(3):547-552.
 - ✓ Koul, M., Lakra, N.S., Chandra, R. y Chandra, S. 2013. *Catharanthus roseus* and prospects of its endophytes: a new avenue for production of bioactive metabolites. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 4(7):2705-2716.
 - ✓ Kutchan, T.M. 1993. Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene. Phytochemistry 32:493-506.
 - ✓ Kutney, J.P. 1993. Plant cell culture combined with chemistry: a powerful route to complex natural products. Accounts of Chemical Research 26:559-566.

- ✓ Kutney, J.P. 1990. Biosynthesis and synthesis of Indole and bisindole alkaloids in plant cell cultures. *Natural Product Reports* 7:85-104.
- ✓ Leonard, J. 1999. Recent progress in the chemistry of monoterpene alkaloids derived from secologanin. *Natural Product Reports* 16:319-338.
- ✓ Lewis, J.R. 2001. Amaryllidaceae, Sceletium, imidazole, oxazole, thiazole, peptide and miscellaneous alkaloids. *Natural Product Reports* 18:95-128.
- ✓ Lounasmaa, M. y Tolvanen, A. 1992. Eburnamine-Vincamine Alkaloids. *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, San Diego. 116p.
- ✓ Maat, L. y Beyerman, H.C. 1983. The imidazole alkaloids. *The Alkaloids Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, San Diego. pp 282-331.
- ✓ Manske, R.H.F. 1950. *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, London. pp 1-17.
- ✓ Mazzafera, P. y Robinson, S.P. 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry*, 55:285-296.
- ✓ Michael, J.P. 2000. Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Natural Product Reports* 17:579-602.
- ✓ Migdal, C. 2000. Glaucoma medicinal treatment: philosophy, principles and practice. *Eye* 14:515-518.
- ✓ Miner Ansorena, J. 1994. *Sustratos Propiedades y Caracterización*. Ed. Mundi Prensa. España. 172 p.
- ✓ Misra, N., Luthra, R., Singh, K.L. y Kumar, S. 1999. Recent advances in biosynthesis of alkaloids. *Comprehensive Natural Products Chemistry* 4:25-59.
- ✓ Moreira, X., Sampedro, L. y Zas, R. 2009. Defensive responses of *Pinus pinaster* seedlings to exogenous application of methyl jasmonate: concentration effect and systemic response. *Environmental and Experimental Botany* 67(1):94-100.
- ✓ Moreno, L. P. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 27(2):179-191.

- ✓ Mothees, K., Schütte, H.R. y Lucker, M. 1985. *Biochemistry of Alkaloids*, VCH, Berlin. 406 p.
- ✓ Moudi, M., Go, R., Yien, C.Y.S. y Nazre, M. 2013. Vinca Alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine* 4:1231-1235.
- ✓ Murakami, A., Koshimizu, K. y Ohigashi, H. 1998. Chemoprevention with food phytochemicals: screening, rodent studies, and action mechanisms. *Journal of Medicinal Food* 1:29-38.
- ✓ Nilsen, E.T. y Orcutt, D.M. 1996. *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*. John Wiley and Sons, New York. 704 p.
- ✓ Nirmala, M.J., Samundeeswari, A. y Sankar, P.D. 2011. Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Journal of Plant Biology Research* 1(3):1-14.
- ✓ Noble, R.L. 1990. The discovery of the Vinca alkaloids-chemotherapeutic agents against cancer. *Biochemistry and Cell Biology* 68:1344-1351.
- ✓ O'Hagan, D. 2000. Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine and tropane alkaloids. *Natural Product Reports* 17:435-446.
- ✓ Pelletier, S.W. 1983. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. John Wiley & Sons, New York. 31p.
- ✓ Pérez, A. C. y Goossens, A. 2013. Jasmonate signalling: a copycat of auxin signalling? *Plant, Cell & Environment* 36(12):2071-2084.
- ✓ Pireivatlou, A. S. y Yazdanehpas, A. 2008. Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under pre-and post-anthesis drought stress conditions. *Journal of Agricultural Science* 10:109-121.
- ✓ Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Palme, K.J. y Jansen, M.A.K. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12(3):99-105.
- ✓ Quetin-Leclercq, J. Angenot, L. y Bisset, N.G. 1990. South American *Strychnos* species. Ethnobotany (except curare) and alkaloid screening. *Journal of*

Ethnopharmacology 28:1-52.

- ✓ Rahman, A. y Choudhary, M.I. 1998. Chemistry and biology of steroidal alkaloids. The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology. Academic Press, San Diego. pp 61-108.
- ✓ Rahman, A. y Choudhary, M.I. 1999. Diterpenoid and steroidal alkaloids. Natural Product Reports 16:619-635.
- ✓ Ribera, A.E. y Zuniga, G. 2012. Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control: a review. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 12(4):893-911.
- ✓ Rodriguez, S., Compagnon, V., Crouch, N. P., St-Pierre, B. y De Luca, V. 2003. Jasmonate-induced epoxidation of tabersonine by a cytochrome P-450 in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. Phytochemistry 64(2):401-409.
- ✓ Roepke, J., Salim, V., Wu, M., Thamm, A.M., Murata, J., Ploss, K., Boland, W. y De Luca, V. 2010. Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(34):15287-15292.
- ✓ Saenz, L., Santamaria, J. M., Villanueva, M. A., Loyola-Vargas, V. M., y Oropeza, C. 1993. Changes in the alkaloid content of plants of *Catharanthus roseus* L. (Don). as a result of water stress and treatment with abscisic acid. Journal of Plant Physiology 142(2):244-247.
- ✓ Saxton, J.E. 1994. Recent in the Chemistry of Indole Alkaloids and Mould Metabolites. Natural Product Reports 11:493-531.
- ✓ Schneider, MJ. 1996. Pyridine and piperidine alkaloids: an update. Alkaloids. Chemical and Biological Perspectives. Elsevier, Amsterdam. pp 155-299.
- ✓ Scott, LJ y Goa, KL. 2000. Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease. Drugs 60:1095-1122.
- ✓ Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Hamayun, M., Kang, S. M. y Lee, I. J. 2015. Foliar application of methyl jasmonate induced physio-hormonal changes in *Pisum*

- sativum* under diverse temperature regimes. *Plant Physiology and Biochemistry* 96:406-416.
- ✓ Shao, H.B., Chu, L.Y., Jaleel, C.A. y Zhao, C.X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies* 331:215-225.
 - ✓ Silveira Rodríguez, M.B., Monereo Megías, S. y Molina Baena, B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿cerca o lejos? *Revista Española de Salud Pública* 77:317-331.
 - ✓ Stas-Otto method. 2015 [online] Disponible en: [https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Stas-Otto method](https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Stas-Otto+method). Acceso: 24/03/2015.
 - ✓ Stöckigt, J y Ruppert, M. 1999. Strictosidine-the biosynthetic key to monoterpene indole alkaloids. *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Elsevier, Amsterdam. pp 109-138.
 - ✓ Toyota, M. y Ihara, M. 1998. Recent progress in the chemistry of non-monoterpene indole alkaloids. *Natural Products Reports* 15:327-340.
 - ✓ Tuteja, N. 2007 Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior* 2(3):135-138.
 - ✓ Vázquez-Flota, F.A. y De Luca, V. 1998. Developmental and light regulation of desacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Evidence of a multilevel regulatory mechanism. *Plant Physiology* 117:1351-1361.
 - ✓ Vázquez-Flota, F.A. y De Luca, V. 1998. Jasmonate modulates development and light regulated alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 49(2):395-402.
 - ✓ Verpoorte, R, van der Heiden, R y Memelink, J. 1998. Plant biotechnology and the production of alkaloids: prospects of metabolic engineering. *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, San Diego. pp 453-508.
 - ✓ Verpoorte, R., Schripsema, J. y van Der Leer, T. 1988. Cinchona alkaloids. *The Alkaloid. Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, San Diego. pp 331-398.
 - ✓ Verpoorte, R., van der Heijden, R. y Moreno, PRH. 1997. Biosynthesis of terpene

- indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells. The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology. Academic Press, San Diego. pp 221-229.
- ✓ Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M. y Sharma, S. 2017. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science* 8:161.
 - ✓ Wagner, H y Blatt, S. 1996. Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas. 2nd edition. Springer-Verlag. New York, USA. 326 p.
 - ✓ Wahb-Allah, M. A., Alsadon, A. A. y Ibrahim, A. A. 2011. Drought tolerance of several tomato genotypes under greenhouse conditions. *World Applied Sciences Journal* 15(7):933-940.
 - ✓ Wall, M.E. y Wani, M.C. 1993. Camptothecin and analogues: Synthesis, biological and *in vitro* and *in vivo* activities, and Clinical Possibilities. *Human Medicinal Agents from Plants* 24:149-169.
 - ✓ Wasternack, C. y Parthier, B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Science* 2:302-307.
 - ✓ Waterman, P. 1993. Alkaloids and Sulphur Compounds. *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London. 605 p.
 - ✓ Webster, A. R., Luff, A. J., Canning, C. R. y Elkington, A. R. 1993. The effect of pilocarpine on the glaucomatous visual field. *British journal of ophthalmology* 77(11):721-725.
 - ✓ Wynn, R. L. 1996. Oral pilocarpine (Salagen)--a recently approved salivary stimulant. *General dentistry* 44(1):26-29.
 - ✓ Xiong, L. y Zhu, J. K. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 133(1):29-36.
 - ✓ Zenk, M.H. Phillipson, J.D., y Roberts, M.F. 1985. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*, Springer Verlag, Berlin. 240 p.

- ✓ Zhang, D. 2014. *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling*. Springer, New York. 366p.
- ✓ Zhang, Y. I. y Turner, J. G. 2008. Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLOS ONE* 3(11):3699.
- ✓ Zhu, R.H., Li, H.D., Cai, H.L., Jiang, Z.P., Xu, P., Dai, L.B. y Peng, W.X. 2014. Validated HILIC–MS/MS assay for determination of vindesine in human plasma: Application to a population pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 96:31-36.

ANEXOS

Anexo I: Riego correspondiente a los tres niveles del factor estrés hídrico.

Fecha	Tratamiento	Riego (ml)
F1	Control	38
	Estrés bajo	20
	Estrés alto	8
F2	Control	76
	Estrés bajo	40
	Estrés alto	15
F3	Control	38
	Estrés bajo	20
	Estrés alto	8
F4	Control	38
	Estrés bajo	20
	Estrés alto	8
F5	Control	76
	Estrés bajo	40
	Estrés alto	15
F6	Control	76
	Estrés bajo	40
	Estrés alto	15
F7	Control	38
	Estrés bajo	20
	Estrés alto	8

Referencias: F1: 24/07/2015; F2: 31/07/2015; F3: 07/08/2015; F4: 18/08/2015; F5: 25/08/2015; F6: 31/08/2015 y F7: 04/09/2015.