

# CONTENIDO

INTRODUCCION	1
CAPITULO I	5
1. ANTECEDENTES	5
1.1. <u>Generalidades.</u>	5
1.2. <u>Protoplastos.</u>	6
1.2.1. Variables críticas para el aislamiento y cultivo de protoplastos.	7
1.3. <u>Cultivos a gran escala de células vegetales.</u>	19
1.3.1. Factores determinantes del crecimiento masivo a gran escala.	21
1.3.2. Cultivo en lote, semi-continuo y continuo.	31
1.3.3. Factores químicos involucrados en la producción de metabolitos secundarios.	33
1.3.4. Factores físicos involucrados en la producción de metabolitos secundarios.	40
OBJETIVOS	43
HIPOTESIS	44
MODELO EXPERIMENTAL	45
CAPITULO II	46
2. METODOLOGIA	46
2.1. <u>Materiales.</u>	46
2.1.1. Plantas.	46
2.1.2. Obtención y cultivo de protoplastos de hojas.	47
2.1.3. Obtención y cultivo de protoplastos a partir de suspensiones celulares.	49
2.1.4. Aislamiento y cultivo de células a partir de suspensiones celulares.	50

2.1.5. Cultivo de suspensiones celulares en matraces y fermentador.	51
2.1.6. Inductores.	51
2.1.7. Soluciones de inhibidores metabólicos.	51
2.1.8. Extracción y revelado de alcaloides.	51
2.2. <u>Métodos.</u>	52
2.2.1. Obtención de protoplastos a partir de hojas.	52
2.2.2. Aislamiento de protoplastos a partir de células en suspensión.	56
2.2.3. Aislamiento de células.	56
2.2.4. Establecimiento de las condiciones de cultivo de células en suspensión en un fermentador de 14 litros.	57
2.2.5. Medios de cultivos para incrementar la producción de alcaloides.	58
2.2.6. Estrategias de producción de alcaloides a nivel de matraz.	60
2.2.7. Extracción, detección y cuantificación de alcaloides.	62
CAPITULO III	66
3. RESULTADOS Y DISCUSION	66
3.1. Producción de protoplastos a partir de hojas de <u>Catharanthus roseus</u> .	66
3.1.1. Métodos de asepsia del material foliar.	66
3.1.2. Solución CPW vs solución VA.	68
3.1.3. Solución VA vs solución CR.	70
3.1.4. Curva de producción de protoplastos en la solución VA y enzimas purificadas.	72
3.1.5. Purificación de protoplastos.	75
3.1.6. Cultivo de protoplastos.	76
3.2. Producción de protoplastos a partir de células en suspensión de <u>Catharanthus roseus</u> .	79
3.2.1. Solución de aislamiento.	79

3.2.2. Purificación y cultivo de protoplastos.	81
3.3. Aislamiento de células a partir de cultivos en suspensión de <u>Catharanthus roseus</u> .	81
3.4. Cultivo de células en suspensión de <u>Catharanthus roseus</u> en fermentador.	83
3.4.1. Esterilización del medio de cultivo.	83
3.4.2. Volumen del paquete celular.	84
3.4.3. Peso fresco.	85
3.4.4. Peso seco.	87
3.4.5. pH.	90
3.5. Producción de alcaloides a nivel de matraz y en fermentador.	91
3.5.1. Metodología de extracción, detección y cuantificación de alcaloides.	91
3.5.2. Producción de alcaloides vs edad del cultivo en el fermentador.	93
3.5.3. Estrategias para potenciar la acumulación de alcaloides a nivel de matraz.	94
3.5.4. Efecto de inductores, inhibidores metabólicos y osmótico sobre la producción de alcaloides en células en suspensión a nivel de fermentador.	101
CONCLUSIONES	104
FIGURAS	107
APENDICE A	111
ESQUEMA 1	114
GRAFICAS	115
BIBLIOGRAFIA	129