

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ANTICANCERÍGENOS A PARTIR DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Caléndula officinalis*

MIGUEL OCTAVIO PÉREZ NAVARRO

Microbiólogo y Bioanalista

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Magíster en
Biotecnología

Director

MARIO ARIAS ZABALA

Ingeniero Químico, M. Sc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS

2008

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.	6
1. MARCO TEÓRICO.	12
2.1 CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES IN VITRO.	12
1.1.1 Establecimiento de Células Vegetales en Suspensión.	14
1.1.1.1 Obtención de Explantes Axénicos.	15
1.1.1.2 Medio de Cultivo y Factores Ambientales.	16
1.1.1.3 Producción de Suspensiones Celulares Vegetales.	17
1.2 METABOLISMO SECUNDARIO DE CÉLULAS VEGETALES.	18
1.2.1 Producción de Metabolitos Secundarios.	19
1.2.2 Elicitación.	20
1.3 <i>CALENDULA OFFICINALIS</i> Y SU IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA.	21
1.4 PRINCIPALES METABOLITOS PRODUCIDOS POR <i>C. OFFICINALIS</i> Y SU ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.	23
1.4.1 Terpenos.	23
1.4.2. Fenoles.	
¡Error! Marcador no definido.	24
1.4.2.1 Flavonoidesl.	25
1.4.2.2 Ácidos Fenólicos.	26
1.5 METABOLITOS SECUNDARIOS DE INTERÉS EN ESTE ESTUDIO.	27
1.5.1 Quercetina.	27
1.5.2 Kaempferol.	28

1.5.3 Ácido cafeico.	29
1.5.4 Ácido clorogénico.	30
2. METODOLOGÍA.	32
2.1 Obtención de Callos y Suspensiones.	32
2.1.1. Material Vegetal.	32
2.1.2 Obtención de Plántulas Asépticas.	33
2.1.3 Preparación del Medio de Cultivo.	34
2.1.4 Obtención de Callos.	35
2.1.5 Osbtención de Suspensiones	35
2.2 CURVA DE CRECIMIENTO Y VIABILIDAD CELULAR.	36
2.3 PROTOCOLO DE ELICITACIÓN.	37
2.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).	38
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	39
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	40
3.1 Obtención de Plántulas Asépticas.	40
3.1.1 Desinfección de las semillas.	40
3.1.2 Oxidación de las Semillas.	46
3.1.3 Germinación de las semillas.	50
3.2 Establecimiento de Callos.	57
3.2.2 Obtención de Suspensiones Celulares.	60
3.2.3 Establecimiento de la curva de crecimiento de las células en suspensión.	62
3.2.4 Viabilidad Celular.	64
3.3 Evaluación de la Producción de Metabolitos.	65

3.3.1 Efecto de la adición de MeJA sobre la producción de metabolitos por células de <i>C. officinalis</i> cultivadas en suspensión.	65
4 CONCLUSIONES.	67
5 RECOMENDACIONES.	70
BIBLIOGRAFÍA.	72
ANEXOS.	88

RESUMEN

Introducción: Las plantas producen gran diversidad de metabolitos secundarios con potenciales aplicaciones prácticas. Sin embargo, por las dificultades del cultivo y las bajas concentraciones en las que se encuentran estos compuestos en la planta, la obtención de metabolitos por cultivo en el campo, puede no resultar económicamente viable. El cultivo de células vegetales *in vitro* es una alternativa para la síntesis y obtención de metabolitos secundarios de interés industrial y farmacológico de una forma constante y en cualquier época del año. *Caléndula officinalis* es una planta mundialmente reconocida por sus propiedades medicinales, antiinflamatoria, cicatrizante, anticancerígena, entre otras. Propiedades que se las confieren los metabolitos secundarios que de ella provienen. Quercetina y kaempferol son flavonoides sintetizados por *C. officinalis*, y son eficaces para el tratamiento de alergias, además ha sido bien estudiada su eficiencia antioxidante, antiinflamatoria y su efecto cáncer-preventivo. La elicitación es una técnica que induce o aumenta la producción de metabolitos mediante el uso de elicitores, factores bióticos o abióticos que producen un estrés en la planta o en el cultivo celular. La elicitación, particularmente con Metil-Jasmonato (MEJA) ha sido efectiva para incrementar la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de diferentes especies vegetales. En este estudio se evaluó la producción de Quercetina y Kaempferol por cultivo de células en suspensión de *C. officinalis*, luego de un exclusivo protocolo de elicitación con MEJA.

Metodología: Se realizó un análisis factorial donde se evaluó la combinación de los tratamientos con etanol al 70% e hipoclorito al 5 %, durante tiempos de 1 a 5 minutos, y se evaluó cualitativamente la desinfección y el desarrollo de las plántulas durante los siguientes 15 días después de la siembra. Las hojas de las

plántulas asépticas y con un buen desarrollo se diseccionaron y se sembraron en agar MS. Los explantes produjeron los callos, los cuales cuando tenían la masa y la friabilidad deseada se trasladaron a erlenmeyers con caldo MS, obteniéndose la suspensiones celulares de *C. officinalis*. La elicitación se realizó con tres concentraciones (10, 100 y 1000 ppm) de MEJA, las cuales fueron adicionadas durante las diferentes etapas de la cinética de crecimiento celular de las suspensiones de *C. officinalis*.

Resultados y Análisis: El tratamiento consistente en la inmersión de las semillas en solución de etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5 % durante dos y tres minutos, respectivamente, fue el que produjo el mejor porcentaje de germinación. Así mismo, dicho tratamiento produjo porcentajes mínimos de contaminación y de oxidación en semillas de *C. officinalis*. El 94.5 % de los explantes sembrados produjo callos friables, los cuales se caracterizaban macroscópicamente por tener una coloración translúcida, un aspecto blando y un crecimiento rápido. La adaptación de las células al medio líquido fue rápida; sin embargo, con el tiempo el crecimiento de las suspensiones celulares cae drásticamente debido a la oxidación del medio de cultivo por la fenolización. No se detectó la producción de metabolitos de interés, quercetina, kaempferol, ácido cafeico y ácido clorogénico en las suspensiones de *C. officinalis*.

Conclusiones: Se establecieron cultivos *in vitro* de callos y suspensiones de células de *C. officinalis*, con miras a la producción de algunos de sus metabolitos secundarios de carácter anticancerígeno. El metil jasmonato (MeJA) no elicó la producción de ninguno de los metabolitos extra ni intracelularmente

PALABRAS CLAVES:

Caléndula Officinalis, suspensiones celulares, Elicitación, Metil-Jasmonato.

1 INTRODUCCIÓN

Las plantas producen gran diversidad de sustancias con potenciales aplicaciones prácticas (Vanisree y Tsay, 2004; Dummel *et al.*, 1980). Por sus bajas concentraciones en la planta y las dificultades asociadas al cultivo de las mismas, el aprovechamiento de estas sustancias por cultivo en el campo no resulta económicamente viable (Kieran *et al.*, 1997). El cultivo de las células vegetales en suspensión en un medio líquido nutritivo en un biorreactor, es una alternativa factible para este fin (Vanisree y Tsay, 2004). Sin embargo, previamente es necesario comprobar la producción de los metabolitos de interés a una escala de matraz.

Caléndula officinalis es una especie vegetal productora de diversos metabolitos con aplicaciones farmacológicas (Duke, 1992). Hasta la fecha no se ha reportado la producción de compuestos fenólicos a partir de células cultivadas en suspensión de esta especie. Se propone, entonces, el establecimiento de cultivos *in vitro* (callos y suspensiones celulares) de esta especie con miras a la elicitación con Metil-Jasmonato (MeJA) de algunos de sus metabolitos de interés como los ácidos fenólicos, cafeico y clorogénico, y los flavonoides, kaempferol y quercetina.

El cultivo de células vegetales en suspensión de *C. officinalis*, permitiría su manipulación con miras a la producción de algunos de sus compuestos de alto valor terapéutico e industrial (Vanisree y Tsay, 2004), reemplazando así las grandes extensiones de tierra que se tendrían que cultivar para producir una buena concentración del fitoquímico requerido (Kieran *et al.*, 1997). Adicionalmente, en el cultivo *in vivo* es necesario esperar durante largos períodos de tiempo para el crecimiento natural de las plantaciones, y los procesos de extracción y purificación finales de los productos deseados son bastante

complejos y costosos (Kieran *et al*, 1997), mientras que en el cultivo *in vitro* los productos sintetizados se pueden extraer en cualquier época del año y sin importar las condiciones climáticas. Además, los métodos de purificación son más rápidos, fáciles y económicos (Kieran *et al.*, 1997; Dicosmo y Misawa, 1995).

Colombia ha sido reconocida tradicionalmente por su gran biodiversidad vegetal (Pastrana *et al.*, 2002). Este reconocimiento, además de representar enormes posibilidades de desarrollo económico, le impone también frente a las generaciones presentes y futuras el deber de conocer, preservar y hacer un aprovechamiento sostenible de sus recursos biológicos. En el caso particular de los recursos fitogenéticos, ha sido identificada una gran diversidad de especies vegetales productoras de una amplia gama de sustancias de interés industrial y/o farmacológico, producto del metabolismo secundario de las células, en la mayor parte de los casos.

Los biocompuestos de *C. officinalis* son de interés medicinal y, en especial, por que pueden ser una alternativa para el tratamiento de patologías de gran morbilidad y mortalidad mundial como el cáncer (Duke, 1992; Krag, 1976), anomalía celular que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2020 podría aumentar su incidencia en un 50%, con 15 millones de nuevos casos. Además, poseen de propiedades reconocidas como anti-inflamatorias, cicatrizante, anti-ulcerativa y espasmolítica (Duke, 1992; Kemper, 1999).

Por ende, es necesario sintetizar estos metabolitos en cultivos de suspensiones celulares, ya que por esta técnica, los metabolitos son obtenidos de una forma constante, en mayor cantidad e independientemente de la época del año, factores climáticos y geográficos, siendo un sistema con más ventajas que el de extraer los fitoquímicos directamente por extracción química de la planta completa (Kieran *et al*, 1997).

La presente investigación permitirá que al país apropiarse en el desarrollo de una tecnología que, si bien no es nueva en el mundo, en Colombia no ha sido abordada de una manera sistemática con miras al desarrollo de bioprocesos de base tecnológica para la obtención de productos de alto valor agregado. Además, a mediano o largo plazo, los fitoquímicos determinados en este estudio y producidos a partir de cultivos celulares de *C. officinalis*, podrían dar lugar a medicamentos para el tratamiento de gran cantidad de patologías que afectan la calidad de vida humana.

2 MARCO TEORICO

2.1 Cultivo de Células Vegetales *In Vitro*

El cultivo *in vitro* de células vegetales es una de las aplicaciones de la biotecnología moderna que consiste en un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos de diversas plantas empleando medios nutritivos artificiales (Villalobos y Thorpe, 1991). Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma, el mejoramiento genético y la producción de metabolitos primarios y secundarios (Villalobos y Thorpe, 1991; Ramachandra y Ravishankar, 2002).

Las plantas tienen potencial bioquímico para producir una enorme variedad de metabolitos de interés industrial (Misawa, 1994; Alfermann y Petersen, 1995; Fu *et al.*, 1999; Vanisree y Tsay, 2004). Los compuestos bioactivos de las plantas medicinales son la principal fuente para la producción de fármacos, agroquímicos, pesticidas, insecticidas, saborizantes, colorantes, perfumes y aditivos alimentarios (Balandrin y Klocke, 1988; Zhao *et al.*, 2005). Comúnmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o cultivadas, lo que tiene una serie de desventajas. Su acumulación en las plantas es baja y lenta, ya que está regulada espacial y temporalmente, es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés (Verpoorte *et al.*, 2002)

Muchos de los metabolitos secundarios se han intentado sintetizar químicamente, sin éxito, por lo que se hace necesario obtenerlos directamente de las plantas (Kieran *et al.*, 1997). A través del cultivo *in vitro* de células vegetales, se podrían producir dichos compuestos (Kieran *et al.*, 1997) lo que ha generado grandes expectativas en este campo. Una de ellas es el uso del cultivo de células vegetales en suspensión para producir una enorme, casi ilimitada, variedad de compuestos de alto valor terapéutico y/o industrial (Vanisree y Tsay, 2004).

El cultivo de células vegetales también ha sido estudiado como un posible medio para la producción de varias proteínas recombinantes tales como anticuerpos, enzimas, vacunas y factores sanguíneos (Verdelhan *et al.*, 1999; Doran, 2000; Choi *et al.*, 2003; Hellwig *et al.*, 2004; Girard *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2004; Soderquist y Lee, 2005; Sorrentino *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005). Además, hace posible la producción de una amplia variedad de compuestos medicinales como alcaloides, terpenoides, esteroides, saponinas, fenoles, flavonoides y aminoácidos (Kemper, 1999; Vanisree *et al.*, 2004).

A nivel mundial, se han realizado investigaciones al respecto con el fin de comprobar los efectos medicinales de las plantas, identificar los principios activos que sintetizan y producirlos a gran escala mediante fuentes alternativas al cultivo tradicional de las plantas completas en el campo (Dicosmo y Misawa, 1995), siendo necesario optimizar los procesos para la producción de biocompuestos con carácter medicinal en nuevas especies vegetales, para dar nuevas alternativas a la producción de fármacos para el tratamiento de patologías de importancia mundial.

2.1.1 Establecimiento de Células Vegetales en Suspensión

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, teniendo como fin la producción de suspensiones celulares, debe tener en cuenta tres factores importantes, la obtención de pequeños segmentos de tejido vivo (explantes) completamente desinfectados, el medio de cultivo y las condiciones ambientales, y por último el tipo de callo a elegir debe ser el apropiado para la elaboración de las suspensiones celulares, en este caso, suspensiones productoras de metabolitos secundarios. A continuación se describirán con más detalle cada uno de estos factores.

2.1.1.1 Obtención de Explantes Axénicos

Los explantes son pequeños tejidos removidos de un órgano vegetal que luego son transferidos a un medio artificial con nutrientes para el crecimiento de células totipotentes. Dichos trozos de tejidos pueden tomarse de yemas, raíces, nudos, semillas germinativas o de tejidos ricos en células con alta actividad de división como los meristemos.

Los procedimientos para cultivar tejidos vegetales *in vitro* contemplan necesariamente un paso para la desinfección de los explantes. Esto con el fin de eliminar microorganismos, y así cumplir con los requisitos de asepsia que son indispensables a la hora de realizar técnicas de cultivo vegetal. A los cultivos libres de microorganismos se les llama axénicos, y para ello se utilizan varios agentes desinfectantes, solos o en combinación, como por ejemplo: hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, cloruro de mercurio, alcohol etílico, peróxido de hidrógeno, detergentes (como el Tween 20®), fungicidas, bactericidas y agentes desinfectantes comerciales.

Además de la completa esterilización del explante, también se debe tener en cuenta el grado de oxidación que sufre el tejido por el tratamiento con los de

desinfectantes; por eso es necesario estandarizar protocolos de descontaminación propios para cada especie, donde el explante quede totalmente aséptico y sin un alto necrosamiento que afecte su posterior crecimiento.

2.1.1.2 Medio de Cultivo y Factores Ambientales

El medio Murashige y Skoog (MS), es uno de los medios más utilizados para el cultivo vegetal *in vitro*. Está constituido principalmente por sacarosa, macro y micronutrientes, sales inorgánicas y vitaminas; además, puede ser suplementado con reguladores de crecimiento, todo esto con el fin de otorgarle a la célula vegetal todos los sustentos necesarios para su desarrollo. Al igual que las plantas en el campo, las condiciones ambientales en el cultivo *in vitro* juegan un papel muy importante para el crecimiento vegetal. En especial se debe tener muy en cuenta la temperatura y la luminosidad del cuarto de incubación en donde se almacenen los explantes, e igualmente la velocidad (rpm) del agitador orbital, cuanto se están manejando suspensiones celulares.

Cuando un explante es sembrado en medio sólido (agar-MS, por ejemplo), suplementado con una relación fitohormonal de auxina/citoquinina, y se proporcionan las condiciones ambientales óptimas, dependientes de cada especie vegetal, se puede dar origen a la formación de una masa de células indiferenciadas conocida como callo. Los callos pueden ser propagados indefinidamente por subdivisión (Villalobos y Thorpe, 1991) y son los callos que se disgregan con facilidad (friables) los más adecuados para el establecimiento de suspensiones celulares con miras a la producción de metabolitos secundarios.

2.1.1.3 Producción de Suspensiones Celulares Vegetales

Las suspensiones celulares se dan después de transferir los callos friables a matraces con medio líquido agitados en agitador orbital. Al igual que los callos, a las suspensiones se le deben proveer las condiciones nutricionales y ambientales óptimas, dependientes de cada especie vegetal, para el crecimiento de la biomasa. El mantenimiento de callos y suspensiones se efectúa mediante el subcultivo de la biomasa a un nuevo medio fresco, sólido o líquido según el caso, y por periodos de tiempo que pueden variar desde 1 - 6 semanas dependiendo de la especie.

2.2 Metabolismo Secundario de Células Vegetales

Las plantas presentan rutas metabólicas comunes en las que se producen compuestos que son necesarios para su crecimiento y desarrollo. Estos compuestos son conocidos como metabolitos primarios; *in vitro* estos fitoquímicos aparecen en una fase temprana de la cinética de crecimiento de la biomasa (Fig. 1). Sin embargo, además de estas rutas metabólicas, las plantas pueden presentar otras vías que llevan a la síntesis de sustancias que no son necesariamente utilizadas para su crecimiento y desarrollo. Estas vías constituyen el metabolismo secundario y los productos que de ellos provienen son los metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas complejas, que se almacenan principalmente en vacuolas, y son sintetizados por las plantas para su relación o defensa contra otros organismos. En el cultivo *in vitro* estos metabolitos pueden eventualmente producirse y, por lo general, aparecen en una fase tardía del la cinética de crecimiento celular, terminando la fase exponencial o durante la fase estacionaria (Figura 2.1).

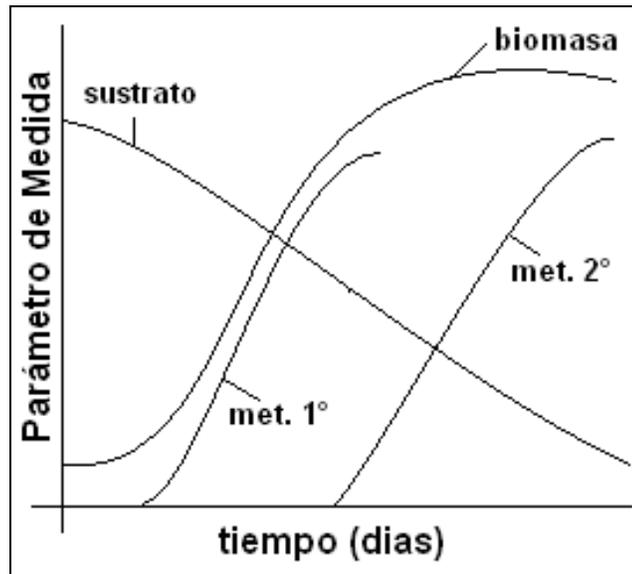


Figura 2.1. Cinética de crecimiento de la biomasa, producción de metabolitos primarios y secundarios, y consumo de sustrato

2.2.1 Producción de Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son la principal fuente para la producción de fármacos, agroquímicos, pesticidas, insecticidas, saborizantes, colorantes, perfumes y aditivos alimentarios (Balandrin y Klocke, 1988; Zhao *et al.*, 2005). El cultivo de células vegetales es una alternativa para la producción de fitoquímicos que son difíciles o imposibles de obtener por síntesis química o extracción vegetal (Zhao *et al.*, 2005; Kieran *et al.*, 1997). Sin embargo, la baja producción de estos biocompuestos es una de las principales limitaciones del cultivo celular, debido a que los metabolitos secundarios son producidos para proteger la planta de insectos, herbívoros y patógenos, o para sobrevivir a otros tipos de estrés biótico o abiótico (Zhao *et al.*, 2005). Basados en este principio se han creado estrategias

para la producción de metabolitos secundarios *in vitro*; estas incluyen tratamientos con diversos elicitores, factores de señalización y estrés abiótico (Yukimune *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004).

2.2.2 Elicitación

El término elicitación se refiere a la activación o incremento del metabolismo secundario, provocado por un agente conocido como elicitor. Los elicitores son aquellos factores bióticos como microorganismos o abióticos como sustancias químicas y agentes ambientales, que producen el estrés en la planta o en el cultivo celular para inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios. En general, el proceso de activación para la producción de metabolitos secundarios está dado, por una señal extra o intracelular que es percibida por un receptor de la endomembrana o la membrana plasmática, que a su vez activa señales de transducción que regulan la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Zhao *et al.*, 2005).

Vías de señalización, como la del jasmonato, han sido observadas como rutas transductoras de señales elicitoras para la producción de metabolitos secundarios en diversas especies vegetales (Farmer *et al.*, 2003). Aplicaciones exógenas de ácido jasmónico (JA) y metil-jasmonato (MeJA) en cultivo de células vegetales estimulan la vía de señalización del jasmonato que activan genes biosintéticos de diversos metabolitos secundarios (Gundlach *et al.*, 1992; Mueller *et al.*, 1993; Tamogami *et al.*, 1997, Zhao *et al.*, 2005). La inducción de metabolitos secundarios por la vía de señalización del jasmonato utilizando JA ó MeJA, estimula la acumulación de una amplia variedad de biocompuestos como terpenoides, flavonoides, alcaloides y fenilpropanoides, entre otros (Zhao *et al.*, 2005).

2.3 *Calendula officinalis* y su importancia farmacológica

Calendula officinalis o Marigold es una planta herbácea, originaria de Egipto y cultivada en Europa central y Mediterránea desde el siglo XII (Kemper, 1999; Acosta *et al.*, 2001). Actualmente es cultivada en Colombia (Acosta *et al.*, 2001) y su uso está aprobado por la Comisión Colombiana Revisora de Productos Farmacéuticos.

Históricamente, las flores de *C. officinalis* se usan para hacer extractos, tinturas, bálsamos y aceites, que se aplican directamente en la piel para ayudar a curar heridas y disminuir la inflamación (Kemper, 1999). También son recomendados como antihemorrágicos, antisépticos y espasmolíticos (Lastra y Piquet, 1999). Igualmente, los extractos de las flores de *C. officinalis* se usan en el tratamiento de leucorrea (Acosta *et al.*, 2001), como estimulante de la actividad hepática, especialmente de la secreción biliar, y para atenuar espasmos gástricos o intestinales (Lastra y Piquet, 1999)

En las últimas décadas, se han realizado estudios en animales y humanos donde se comprueban las propiedades antiinflamatoria (Schipochliev, 1981; Fleischner, 1985; Della, 1994) y cicatrizante de *C. officinalis* (Michel, 1977; Fleischner, 1985; Neto *et al.*, 1996); además se ha demostrado su actividad bactericida contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus fecalis* (Dumenil, 1980). En ratas, la aplicación interna de sus extractos, demostró que estimula la actividad hepática y colagoga (Ubeeva, 1987) y datos *in vitro* indican que polisacáridos de *C. officinalis* estimulan la fagocitosis (Wagner, 1985).

En Francia se reporta la actividad antitumoral y citotóxica de los extractos de *C. officinalis* (Acosta *et al.*, 2001; Rocaud, 1988) y en el último año se evaluó la

actividad citotóxica contra líneas de cáncer *in vitro*, y se encontró que dos glicósidos triterpenos de *C. officinalis*, exhibían un potente efecto citotóxico contra células de cáncer de colon, leucemia y melanomas (Ukiya, 2006).

Dichas propiedades medicinales de *C. officinalis* se presentan por el amplio espectro de compuestos químicos que produce; entre los constituyentes con mayor potencial activo se encuentran: sesqui-terpenos y glicósidos flavonoides (Ahmed, 1993; Pietta, 1992), terpenos, saponinas triterpenoides, alcoholes triterpenos, glicósidos triterpenos, flavonoides, carotenoides, ácidos fenólicos, esteroides, tocoferoles, calendulina y compuestos amargos (Kemper, 1999; Vanisree *et al.*, 2004).

2.4 Principales Metabolitos Producidos por *C. officinalis* y su Actividad Farmacológica

2.4.1 Terpenos

Son una gran variedad de compuestos naturales de origen vegetal, procedentes de unidades isoprenicas. Sus actividades biológicas comprenden las de atraer y repeler insectos; también hacen parte estructural de hormonas, compuestos aromáticos y de numerosos metabolitos secundarios.

Entre los biocompuestos de más relevancia terapéutica derivados de terpenos y sintetizados por *C. officinalis* se encuentran los alfa-Tocoferoles (Janiszowska y Jasinska, 1982), metabolitos que ha sido muy estudiados y de los cuales son bien conocida su actividad neuroprotectora, hipocolesterolemica, antioxidante y antiangiogénica (Chandan, 2006); los fitoesteroides estigmasterol y beta-sitosterol (Duke, 1992), de los cuales se ha reportado su capacidad hipocolesterolemica (Martins, 2004) y su actividad anticancerígena (Atif, 2000). Los triterpenos, lupeol

y el ácido oleanoleico también son producidos por *C. officinalis* (Akihisa, 1996; Duke, 1992) y se ha demostrado su potencial antiinflamatorio (Akihisa, 1996; Aquino, 1991), anti-VIH (Kashiwada *et al.*, 1998), anticancerígeno (Mohammad, 2005) y antitumoral (Chiang, 2003). Tetraterpenos de tipo carotenoide como la luteína y el licopeno (Duke, 1992), pigmentos vegetales que son importantes en la dieta por su propiedad antioxidante (Di Mascio *et al.*, 1989; Calvo, 2005) y anticancerígena (Giovannucci *et al.*, 1995; Schuurman *et al.*, 2002; Hsing *et al.*, 1990).

2.4.2. Fenoles

Se denominan fenoles a todos los compuestos químicos orgánicos cuya composición forma parte un anillo aromático (benceno) unido a uno o varios grupos hidroxilo. Los compuestos fenólicos constituyen uno de los productos naturales más importantes provenientes del metabolismo secundario vegetal. Estos fitoquímicos se usan desde tiempo atrás para la elaboración de tintas, curtido de pieles, refinado de vinos y antiséptico. En altas concentraciones este tipo de sustancias pueden ser tóxicas para los humanos, pero en las dosis indicadas estos compuestos se han utilizado para la elaboración de medicamentos. A continuación se describen algunos fenoles de importancia farmacológica que son sintetizados por *C. officinalis*.

2.4.2.1 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en las plantas, participan en la vida del vegetal ejerciendo importantes funciones como por ejemplo protegerla de los efectos nocivos de la radiación UV y ejercen una eficaz actividad antioxidante.

En otros organismos donde no se pueden sintetizar estos compuestos, como en los humanos, el consumo de flavonoides, ya sea por alimentos o suplementos, también puede producir un efecto protector contra el daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos.

Los flavonoides más importantes obtenidos a partir de *C. officinalis* son la rutina, la quercetina y el kaempferol (Duke, 1992; Matysik, 2005); estos compuestos en su calidad de flavonoides son muy eficaces para el tratamiento de alergias y ha sido bien estudiada su eficiencia anti-oxidante y su efecto cáncer-preventivo (Knekt *et al.*, 2002).

2.4.2.2 Ácidos Fenólicos

Los ácidos fenólicos, fenoles de bajo peso molecular, son precursores bioquímicos de gran variedad de compuestos antimicrobianos, moléculas de señalización y moléculas que juegan un papel importante en la respuesta defensiva de la planta. Al igual que los flavonoides tienen un papel importante como antioxidantes tanto en los vegetales como en los organismos que lo consumen.

En la literatura se ha descrito que *C. officinalis* produce ácidos fenólicos siendo los de mayor importancia farmacológica los ácidos vinílico, clorogénico y cafeico (Duke, 1992; Matysik G *et al.*, 2005), de los cuales se reporta una actividad antileucémica (Chiang, 2003).

2.5 Metabolitos Secundarios de Interés en este Estudio

2.5.1 Quercetina

Este flavonoide es uno de los antioxidantes y antiinflamatorios más potentes de la naturaleza, encontrado comúnmente en frutas y vegetales. Quercetina ha sido bien estudiada desde hace más de 20 años, otorgándosele un potencial anticancerígeno y una actividad antitumoral, debido a la regulación que ejerce sobre el ciclo celular evitando así la proliferación descontrolada de las células malignas.

Quercetina se ha identificado en extractos de flores de *C. officinalis* (Duke, 1992). Sin embargo no hay reportes de la producción del metabolito por cultivo de células en suspensión en esta especie.

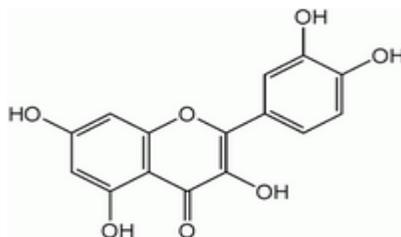


Figura 2.2. Estructura química de la quercetina

2.5.2 Kaempferol

Es uno de los más importantes flavonoides encontrados en la naturaleza y al igual que quercetina tiene propiedades antioxidantes. Se puede encontrar en bayas, como la fresa y la mora, así como en el té. En estudios recientes, el kaempferol extraído de hojas de Gynkgo biloba, fue eficaz para inhibir la proliferación celular

en cáncer de páncreas e inducir la apoptosis de las células cancerígenas, concluyéndose así que kaempferol puede tener aplicaciones clínicas como adyuvante en el tratamiento del cáncer de páncreas (Zhang *et al.*, 2008).

Kaempferol no tiene reportes de producción por cultivos de células vegetales *in vitro*, pero al igual que la quercetina se ha identificado en extractos de *C. officinalis* (Duke, 1992).

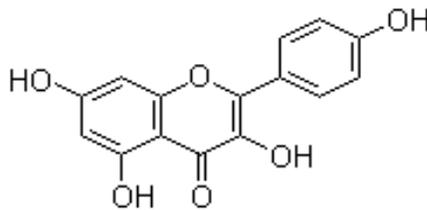


Figura 2.3: Estructura química del kaempferol

2.5.3 Ácido cafeico

Compuesto fenólico natural, el cual se encuentra en frutas, vegetales y hierbas, incluyendo café y caléndula (Matysik *et al.*, 2005). La cantidad de este metabolito depende necesariamente de la especie vegetal. El ácido cafeico, un importante antioxidante, puede ser un fuerte candidato para el tratamiento del cáncer y la metástasis (Chung *et al.*, 2004).

Ácido caféico se ha determinado en suspensiones de *Salvia officinalis* (Santos *et al.*, 2003) y *Lactuca sativa* (Kim *et al.*, 2007), dándose en esta última, un incremento en las concentraciones del metabolito cuando los cultivos celulares son elicitados con MeJA (Kim *et al.*, 2007).

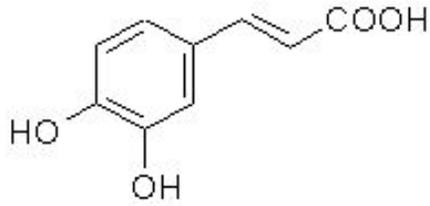


Figura 2.3. Estructura química ácido cafeico

2.5.4 Ácido clorogénico

Este ácido clorogénico es también un importante antioxidante, el cual puede prevenir la diabetes mellitus (Paynter *et al.*, 2006), enfermedades cardiovasculares (Lincoln *et al.*, 2000) e inhibir tumores. Ácido clorogénico se ha determinado por cromatografía en extractos celulares de *C. officinalis* (Matysik *et al.*, 2005).

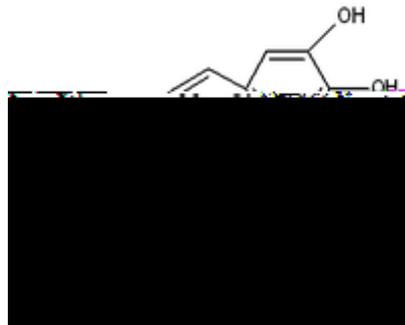


Figura 2.5. Estructura química del ácido clorogénico.

Es importante entonces tratar de inducir, vía elicitación, la biosíntesis de biocompuestos producidos por *C. officinalis* por cultivo de sus células en suspensión, ya que pueden ser una alternativa para la fabricación de fármacos

para el tratamiento y/o prevención de patologías de importancia mundial, como es el caso del cáncer.

La elicitación, particularmente con MeJA, ha sido efectiva para incrementar la producción de metabolitos secundarios en diversas especies vegetales. Uno de los principales ejemplos de estos procesos son los estudios realizados en *Taxus canadensis* y *Taxus cuspidata* para aumentar en más de 100 veces la producción de paclitaxel (Taxol) y otros taxoides (Ketchum *et al.*, 1999; Mirjalili y Linden, 1996; Roberts y Shuler, 1997). En el presente estudio se quiso evaluar el poder elicitor del MeJA en la biosíntesis de beta-sitosterol, ácido cafeico, ácido clorogénico, kaempferol y quercetina, en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Establecer cultivos *in vitro* (callos y suspensiones) de *Calendula officinalis* y evaluar el efecto elicitor que sobre la producción de algunos de sus metabolitos tiene el metil jasmonato.

2.2. Objetivos específicos

- Establecer un protocolo de desinfección de semillas de *C. officinalis*, con miras a la obtención de plántulas asépticas.
- Establecer cultivos *in vitro* (callos y suspensiones celulares) de *C. officinalis*.
- Determinar la producción de metabolitos anticancerígenos, a lo largo de la curva de crecimiento de *C. officinalis*.
- Determinar el efecto elicitor del metil-jasmonato sobre la producción de metabolitos anticancerígenos, a lo largo de la curva de crecimiento de *C. officinalis*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Obtención de Callos y Suspensiones

La producción *in vitro* de callos y suspensiones de *C. officinalis*, se llevó a cabo siguiendo una metodología similar a la propuesta por Grzelak y Janiszowska (2002). Los medios de cultivo utilizados para la producción y mantenimiento de callos y suspensiones, se realizaron con las mismas concentraciones reportadas por estos autores, pero con un suplemento adicional de 0.5 mg L⁻¹ de ácido ascórbico. Adicionalmente se evaluaron nuevos protocolos de desinfección en las semillas, con miras a la obtención de plántulas totalmente asépticas.

4.1.1. Material Vegetal

Para la obtención de plántulas de *C. officinalis* se utilizaron semillas comercializadas por Fercon Ltda. Con número de resolución del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) 01563. Las semillas fueron compradas en supermercados de la ciudad.

4.1.2 Obtención de Plántulas Asépticas.

Los explantes utilizados se obtuvieron de plántulas cultivadas en el laboratorio. Para la producción de plántulas libres de microorganismos, se realizó un diseño experimental factorial donde se evaluó la combinación de los tratamientos con etanol al 70% e hipoclorito al 5 %, durante tiempos de 1 a 5 minutos (ver Tabla 1), con el fin de establecer cual es el mejor protocolo en la desinfección de las

semillas de *C. officinalis* con miras a la obtención de las plántulas totalmente asépticas.

Tabla 4.1. Protocolo de desinfección de semillas de *C. officinalis*

TE 70% ¹ \ TH 5% ²	0 minutos	1 minuto	2 minuto	3 minuto	4 minuto	5 minuto
0 minutos	0*0	0*1	0*2	0*3	0*4	0*5
1 minutos	1*0	1*1	1*2	1*3	1*4	1*5
2 minutos	2*0	2*2	2*2	2*3	2*4	2*5
3 minutos	3*0	3*1	3*2	3*3	3*4	3*5
4 minutos	4*0	4*1	4*2	4*3	4*4	4*5
5 minutos	5*0	5*1	5*2	5*3	5*4	5*5

¹ Tiempo con etanol 70%

² Tiempo con hipoclorito 5%

Inmediatamente después del protocolo de desinfección, 20 semillas por cada combinación factorial se sembraron en 10 frascos con 15 mL de medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), solidificado por adición de agar al 6.5%, con la mitad de concentración de todos sus compuestos, suplementados con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 6.5 g L⁻¹ de agar. Los frascos se almacenaron en un cuarto con fotoperiodos de 12 h luz y 12 h oscuridad, a 25 ° C. Durante los siguientes 15 días se evaluaron las siguientes variables respuesta: el porcentaje de contaminación microbiana, el necrosamiento de las semillas no contaminadas y el porcentaje de semillas germinadas.

4.1.3 Preparación del Medio de Cultivo

El medio utilizado para formación de callos y suspensiones fue el medio MS basal, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 6.5 g L⁻¹ de agar (para medio sólido), 0.5 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y concentraciones hormonales de 0.4 mg

L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.4 mg L⁻¹ de quinetina. El pH fue ajustado a 5.8 con HCL o NaOH 0.1M, previo a la esterilización en autoclave a 20 PSI y 120° C por 15 minutos.

4.1.4 Obtención de Callos

Dos semanas después de la siembra de las semillas, las hojas de las plántulas obtenidas fueron diseccionadas (explantes de un área aproximada de 1 cm²) y cultivadas en frascos (2 explantes por frasco) con 20 mL de agar MS basal suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 6.5 g L⁻¹ de agar, 0.4 mg L⁻¹ quinetina, 0.4 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de ácido ascórbico. Los frascos se almacenaron en un cuarto con fotoperiodos de 12 h luz y 12 h oscuridad, a temperatura ambiente. Los callos fueron subcultivados en un medio fresco cada tres semanas, hasta obtener la consistencia y la masa ideal (aproximadamente 12 semanas).

4.1.5 Obtención de Suspensiones

Las suspensiones de *C. officinalis* fueron iniciadas por transferencia de 2-3 g de callo friable a erlenmeyers de 250 mL con 70 mL de medio líquido MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.4 mg L⁻¹ quinetina, 0.4 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de ácido ascórbico. Los erlenmeyers fueron almacenados en un cuarto con fotoperiodos de 12 h luz y 12 h oscuridad a temperatura ambiente, y mantenidos en un agitador orbital a 120 rpm. Al igual que en el cultivo de callos, el medio fue remplazado cada tres semanas por uno nuevo.

4.2 Curva de Crecimiento y Viabilidad Celular

Se realizaron dos experimentos para establecer las curvas de crecimiento.

Experimento 1: Cinética de crecimiento realizada 2 subcultivos después de iniciar el establecimiento de las suspensiones celulares.

Experimento 2: Cinética de crecimiento realizada 8 subcultivos después de haber iniciado el establecimiento de las suspensiones celulares.

Previamente al establecimiento de la curva de crecimiento, se realizó un tamizado de las suspensiones con una malla de acero inoxidable N° 40 (Tamaño de abertura de 0.42 mm) y se inocularon en erlenmeyers de 100 mL que contenían 15 mL de medio fresco. En ambos experimentos, el crecimiento celular de *C. officinalis* se determinó por volumen de células empaquetadas (Dixon y González, 1994). Se transfirió todo el contenido de una suspensión a un tubo graduado de centrifuga, el cual se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos hasta que el sobrenadante quedó libre de células; luego se determinó el volumen del botón celular. Este procedimiento se realizó cada dos días por un periodo de 30 días. El volumen de células empaquetadas se expresó como el porcentaje del volumen del botón sobre el volumen de la suspensión entera.

La viabilidad celular se determinó periódicamente en cada subcultivo. Por microscopía las células fueron observadas en fresco y lugol para analizar su morfología, sus agrupaciones y posible contaminación, además de analizar su viabilidad mediante la coloración con azul de Evans 0.5%, el cual tiñe de azul oscuro las células muertas y las vivas permanecen transparentes (Taylor y West, 1980).

4.3 Protocolo de Elicitación

Una vez se dispuso de una cantidad suficiente de suspensiones, se inició el proceso de elicitación. La elicitación fue realizada durante periodos de 25 días y en dos experimentos.

Experimento 1: Elicitación realizada 2 subcultivos después de iniciar el establecimiento de las suspensiones celulares.

Experimento 2: Elicitación realizada 8 subcultivos después de haber iniciado el establecimiento de las suspensiones celulares.

Para la elicitación se utilizaron tres concentraciones de metil-jasmonato, a saber, 10 ppm, 100 ppm y 1000 ppm, que fueron adicionadas cada dos días durante veinte días del crecimiento celular a tres grupos de suspensiones celulares, una concentración por cada grupo. El ensayo se realizó de la siguiente forma (ver también, Anexo 2):

El primer día se tomaron cuatro suspensiones; a tres de éstas se les adicionó una concentración de metil-jasmonato distinta (10, 100 y 1000 μM) y la restante fue el control (0 μM). El segundo día se tomaron dos muestras de 2 mL de cada una de las suspensiones del día anterior, incluyendo el control. Además, se tomaron tres nuevas suspensiones a las que se les adicionó una dosis de las diferentes concentraciones de metil-jasmonato. El tercer día se tomaron muestras de las suspensiones de los dos días anteriores, incluyendo el control, nuevamente se tomaron otras tres suspensiones y se les realizó el mismo procedimiento. Así, tomando las muestras de los días anteriores y tratando tres nuevas suspensiones, se siguió el procediendo hasta el décimo día (final de la fase exponencial). Las muestras fueron tomadas hasta el día en que se terminó la fase estacionaria de las suspensiones celulares.

4.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Las muestras de las suspensiones de *C. officinalis* tomadas durante la elicitación, fueron centrifugadas a 15000 rpm por 15 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron y se colocaron en viales debidamente rotulados, para su posterior análisis por HPLC siguiendo el método de Mesbah para flavonoides (Anexo 3) (Mesbah MK *et al.*, 2005) y el de Wen y colaboradores para ácidos fenólicos (Anexo 4) (Wen D *et al.*, 2005). Se corrieron las muestras, según los métodos propuestos para detectar kaempferol, quercetina, ácido cafeico y ácido clorogénico, y se compararon los cromatogramas resultantes con los de los respectivos estándares.

4.5 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SAS.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 Obtención de Plántulas Asépticas

Los protocolos de combinación de etanol al 70 % e hipoclorito de sodio al 5%, permitieron determinar el efecto de los desinfectantes en la producción de plántulas totalmente asépticas, evaluando el porcentaje de descontaminación, oxidación y germinación de las semillas.

5.1.1 Desinfección de las semillas

En la Tabla 5.1 se presentan los resultados de los treinta y seis tratamientos de esterilización con etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5 %, aplicados a semillas de *C. officinalis*.

Tabla 5.1. Resultados de los tratamientos de esterilización de semillas.

TE 70%¹	0 minutos	1 minuto	2 minuto	3 minuto	4 minuto	5 minuto
TH 5%²						
0 minutos	0%	5%	45%	80%	90%	95%
1 minutos	10%	55%	65%	75%	90%	100%
2 minutos	45%	55%	80%	80%	100%	100%
3 minutos	55%	75%	95%	100%	100%	100%
4 minutos	75%	95%	100%	100%	100%	100%
5 minutos	90%	100%	100%	100%	100%	100%

¹ Tiempo de exposición al Etanol 70%

² Tiempo de exposición al Hipoclorito de Sodio 5%

En la Figura 5.1 se presentan gráficamente los resultados anteriores, en términos de porcentajes de desinfección en las diferentes combinaciones entre los tiempos de etanol e hipoclorito de sodio.

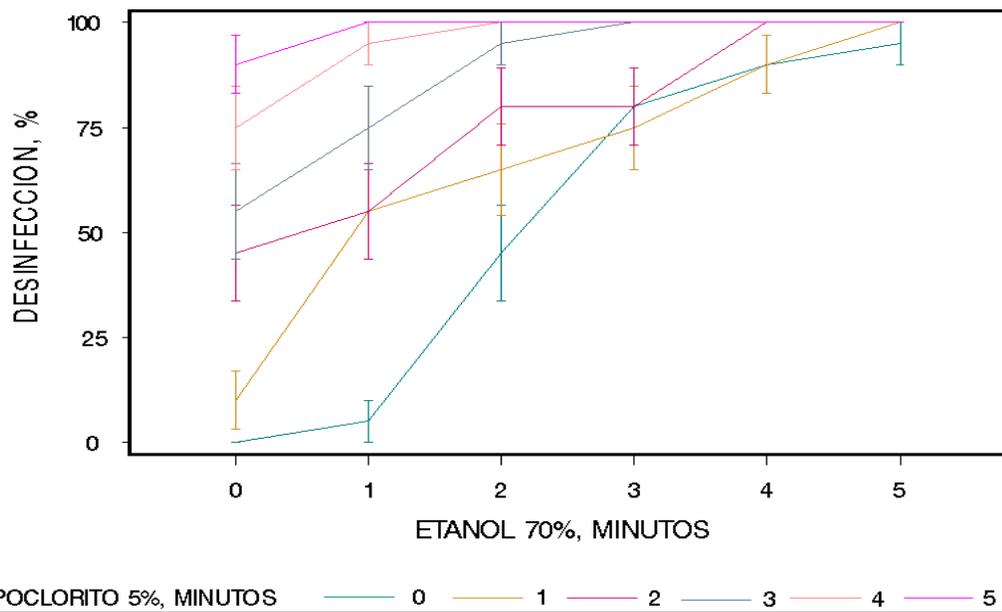


Figura 5.1. Porcentaje de semillas desinfectadas de *C. officinalis*, en función del tiempo de exposición al hipoclorito de sodio 5% y etanol 70%. Las barras representan la desviación estándar.

La Tabla 5.2 presenta el análisis de varianza realizado para comparar los porcentajes de desinfección de las semillas en los diferentes tratamientos.

Tabla 5.2. Análisis de varianza para la desinfección de semillas de *C. officinalis*.

Factor	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor F	Pr > F
Hipoclorito	5	18.99027778	3.79805556	42.48	<.0001
Etanol	5	25.74027778	5.14805556	57.58	<.0001
Hipoclorito*Etanol	25	12.28472222	0.49138889	5.50	<.0001

De esta tabla y de la figura 5.1 se concluye que tanto el etanol como el hipoclorito de sodio tienen un efecto marcado en el porcentaje de desinfección de las semillas. Se puede concluir también que la combinación de estos dos desinfectantes tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta, desinfección con un nivel de confianza del 95 %.

Para verificar si existen diferencias significativas en la variable respuesta (Desinfección de las semillas), se empleó una prueba de rango múltiple de Duncan's (ver Anexo 4, numeral 10.4.1.1), la cual permitió concluir que, tanto para hipoclorito de sodio 5 % y etanol 70 %, no existen diferencias estadísticamente significativas en el número promedio de desinfección entre los grupos de niveles 3 y 4 minutos y 4 y 5 minutos. El número promedio de desinfección es significativamente mayor en el segundo grupo de valores, para ambos factores. Los resultados anteriores pueden visualizarse en las siguientes gráficas (Figura 5.2), correspondientes al porcentaje de desinfección en función de los tiempos de exposición al hipoclorito de sodio y al etanol.

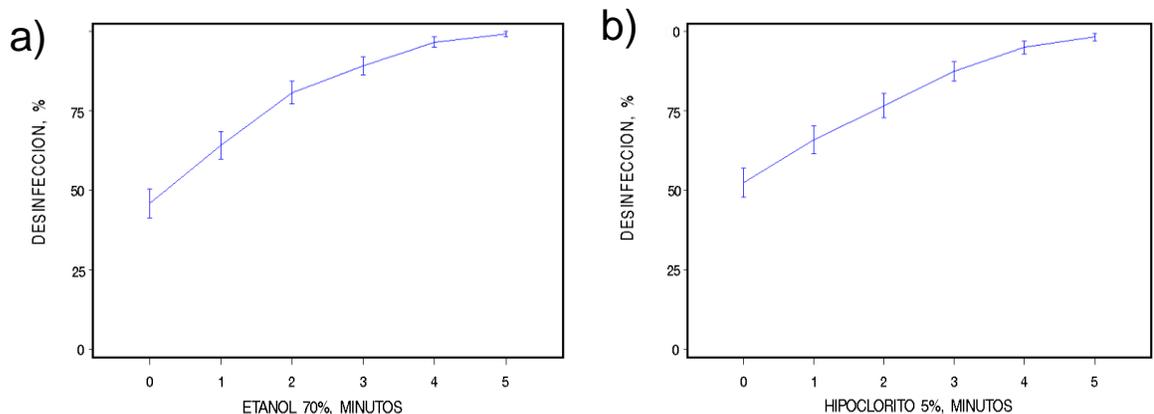


Figura 5.2. Efecto del tiempo de exposición de a) etanol 70 % y b) hipoclorito de sodio 5 %, sobre la desinfección de las semillas.

Del análisis anterior, puede concluirse que los mejores tratamientos para la desinfección de las semillas, son aquéllos donde los tiempos de exposición a los agentes desinfectantes son altos (4 y 5 minutos) usando tanto etanol 70 % como hipoclorito de sodio 5 % por separado. Así mismo, se obtuvo un buen resultado cuando se combinan ambos desinfectantes y se emplean tiempos de exposición intermedios (2 y 3 minutos).

Sin embargo, en el momento de la desinfección de los explantes hay dos problemas por solucionar. Uno de ellos es la contaminación endógena, la cual empieza a manifestarse aproximadamente después de 48 horas de sembrados los explantes y no puede ser eliminada mediante tratamientos de esterilización superficiales como los anteriores (Collin y Edwards, 1998). Por lo anterior se requiere el monitoreo de las semillas durante los siguientes días, para detectar este tipo de contaminación y eliminar las semillas que la presenten. En nuestro caso, al parecer, este problema no tubo gran incidencia, debido a que la contaminación en las semillas se presentaba de 18 a 36 horas después de la siembra, lo que es común en la contaminación exógena. Una de las mayores causas de la contaminación exógena, es la manipulación del explante (Dodds *et al.*, 1995). En este ensayo fue necesario el contacto directo de las manos con las semillas para retirar la testa; esta manipulación puede aumentar el índice de contaminación exógena, por lo cual se requiere sumergir los dedos en etanol (40 – 70 %) previamente a la operación (Biondi y Thorpe, 1981).

El segundo problema es la oxidación o necrosis del explante; esto básicamente se da por altas concentraciones o tiempos prolongados de exposición del explante a los desinfectantes. Por tal razón se requiere que las concentraciones y el tiempo de exposición de los agentes sean óptimos para que los explantes sean totalmente asépticos sin que las células del tejido sufran daños severos que afecten su posterior crecimiento. Así mismo, altas concentraciones o tiempos prolongados de exposición con agentes desinfectantes pueden generar oxidación de las semillas e inhibir su germinación (Dodds *et al.*, 1995).

5.1.2 Oxidación de las Semillas

Se consideró como “tejido muerto” (necrosis) u “oxidación” a las semillas que tomaban un color café oscuro o negro en su superficie, comparado con el color crema que tenían las semillas sanas. En la Tabla 5.3 se presentan los resultados de necrosis para los treinta y seis tratamientos de asepsia con etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5 %, aplicados a semillas de *C. officinalis*, en diferentes tiempos.

Tabla 5.3. Resultados de la oxidación en los tratamientos de esterilización de semillas de *C. officinalis*.

TE 70%¹	0 minutos	1 minutos	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos
TH 5%²						
0 minutos	0%	0%	0%	10%	40%	85%
1 minutos	0%	0%	5%	10%	50%	80%
2 minutos	0%	5%	5%	30%	50%	85%
3 minutos	5%	10%	5%	55%	75%	100%
4 minutos	20%	40%	35%	75%	95%	100%
5 minutos	40%	65%	75%	85%	100%	100%

En la Figura 5.3 se presentan gráficamente los resultados anteriores, en términos de porcentajes de oxidación en las diferentes combinaciones entre los tiempos de etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5 %.

De estos resultados, se puede concluir que los menores porcentajes de oxidación se dan cuando las semillas no son tratadas (0 minutos) o son expuestas a tiempos muy cortos (1 – 3 minutos) con los agentes desinfectantes.

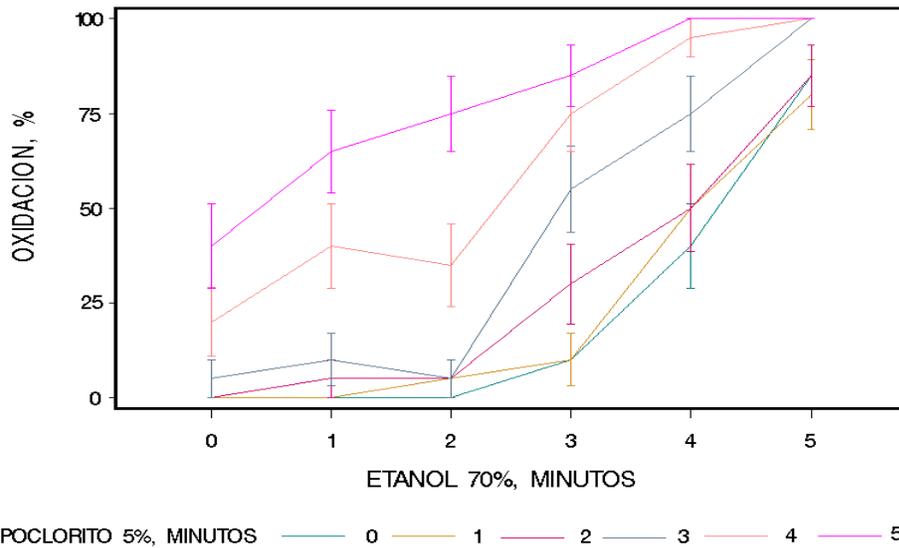


Figura 5.3. Porcentaje de oxidación de semillas de *C. officinalis*, en función del tiempo de exposición al hipoclorito de sodio 5% y etanol 70%. Las barras representan la desviación estándar.

Se ejecutó una ANOVA factorial (ver también, anexo 1, numeral 10.1.1.2) para comparar la oxidación de las semillas de *C. officinalis* con los diferentes tratamientos es presentado en la Tabla 5.4

Tabla 5.4. Análisis de varianza para la oxidación de semillas de *C. officinalis*.

Factor	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor F	Pr > F
Hipoclorito	5	29.70694444	5.94138889	51.41	<.0001
Etanol	5	60.79027778	12.15805556	105.20	<.0001
Hipoclorito*Etanol	25	6.55138889	0.26205556	2.27	0.0004

Se concluyó que ambos desinfectantes, combinados o por separado, tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta (oxidación) con un nivel de confianza del 95 %.

Para verificar si existen diferencias significativas en la variable respuesta (oxidación de las semillas), se empleó una prueba de rango múltiple de Duncan's (ver Anexo 4, numeral 10.4.1.2), la cual permitió concluir que, sólo en los niveles altos de tiempo con hipoclorito de sodio 5 % (3, 4 y 5 minutos) existen diferencias estadísticamente significativas, ya sea entre ellos o con respecto a los demás niveles. Por tanto, no existe diferencia significativa en el porcentaje promedio de oxidación cuando se utilizan niveles de hipoclorito de sodio 5 % entre 0 y 2 minutos. Para etanol 70 %, los resultados de la prueba de rango múltiple de Duncan's permitió concluir que no existe diferencia significativa en el porcentaje promedio de desinfección entre los niveles 1 y 2. Los resultados anteriores pueden visualizarse en las siguientes gráficas (Figura 5.4), correspondientes al porcentaje de desinfección en función de los tiempos de exposición al hipoclorito de sodio y al etanol.

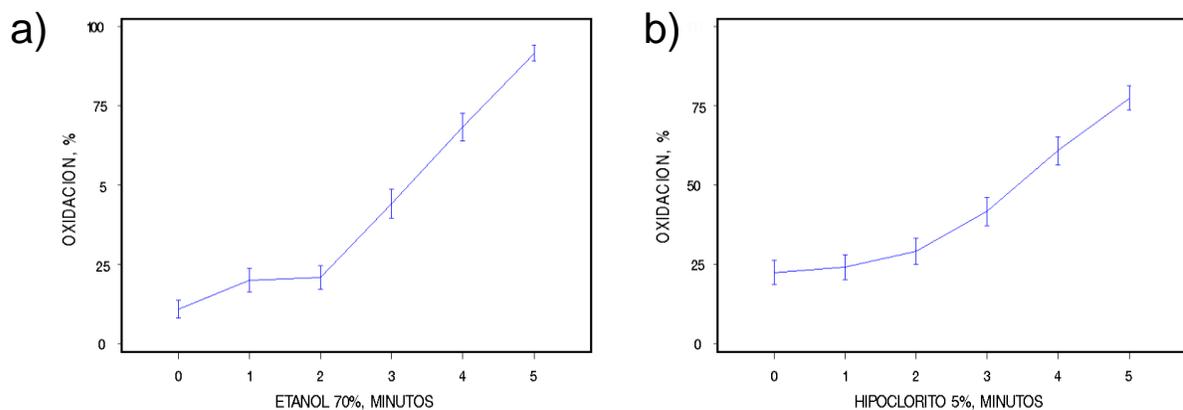


Figura 5.4. Efecto del tiempo de exposición de a) etanol 70 % y b) hipoclorito de sodio 5 %, sobre la oxidación de las semillas.

El análisis de las figuras 5.1 y 5.3, permite determinar que las semillas expuestas a altos tiempos con los desinfectantes sufrían poca contaminación y alto porcentaje de necrosis, y las semillas expuestas a bajos tiempos con los desinfectantes presentan alto porcentaje de contaminación y bajo de necrosis. Sin embargo, aquellas semillas con tiempos intermedios de exposición a los

desinfectantes mostraron poca contaminación y poca oxidación, siendo estos tiempos los más indicados para el tratamiento de las semillas con miras a la germinación de plántulas asépticas. Para evitar la necrosis se sugiere también, disminuir la intensidad de la luz, agregar antioxidantes al medio y al explante, subcultivar con frecuencia, incrementar las sales de calcio, reducir el nivel de nitrato en el medio y sumergir el explante en medio líquido por un día (Swartz y Lindstrom, 1986).

5.1.3 Germinación de las semillas

Se consideraron “semillas viables” aquéllas que no presentaron contaminación ni necrosis, siendo estas las más adecuadas para germinar. En la Tabla 5.5 se muestran los porcentajes de las semillas viables.

Tabla 5.5. Porcentaje de semillas viables, no contaminadas ni necrosadas.

TE 70%¹	0 minutos	1 minutos	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos
TH 5%²						
0 minutos	0%	5%	45%	70%	70%	60%
1 minutos	10%	55%	60%	65%	60%	55%
2 minutos	45%	50%	75%	70%	60%	45%
3 minutos	55%	70%	90%	70%	45%	45%
4 minutos	55%	55%	65%	60%	55%	20%
5 minutos	50%	35%	50%	45%	15%	10%

¹ Tiempo de exposición al Etanol 70%

² Tiempo de exposición al Hipoclorito de sodio 5%

Los porcentajes más altos de semillas viables se presentan en los tratamientos donde se combinaron el etanol 70 % y el hipoclorito de sodio 5 % con tiempos intermedios (2 - 3 minutos). En la Tabla 5.6 se presentan los porcentajes de germinación para los treinta y seis tratamientos de asepsia con etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5 %, aplicados a semillas de *C. officinalis*.

Tabla 5.6. Resultados de la germinación en los tratamientos de esterilización de semillas de *C. officinalis*.

TE 70% ¹ TH 5% ²	0 minutos	1 minutos	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos
0 minutos	0%	5%	45%	65%	20%	0%
1 minutos	5%	55%	60%	50%	30%	5%
2 minutos	40%	45%	65%	40%	25%	0%
3 minutos	45%	60%	90%	30%	10%	0%
4 minutos	30%	45%	60%	15%	0%	0%
5 minutos	30%	30%	25%	5%	0%	0%

¹ Tiempo de exposición al Etanol 70%

² Tiempo de exposición al Hipoclorito de sodio 5%

En la Figura 5.5 se presentan gráficamente los resultados de la tabla 5.5, en términos de porcentajes de germinación en las diferentes combinaciones entre los tiempos de etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5 %.

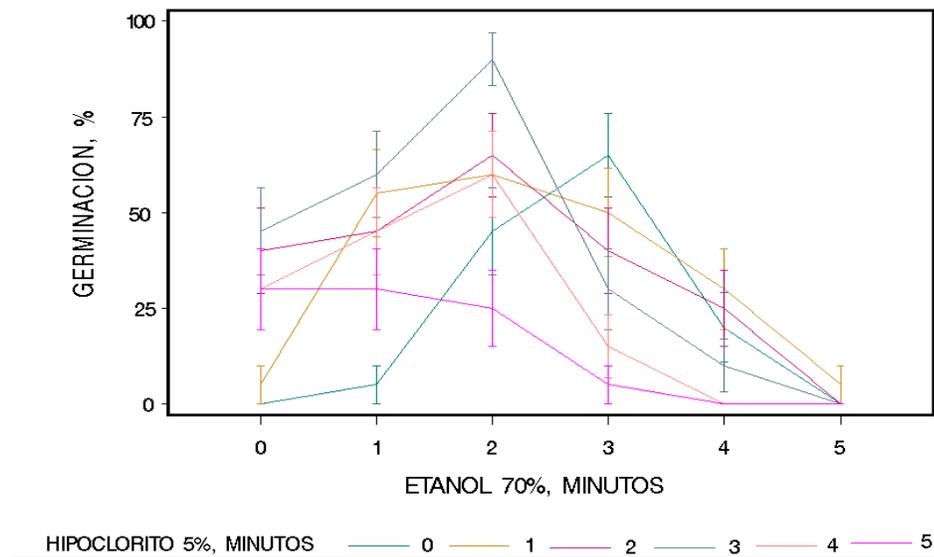


Figura 5.5. Porcentaje total de germinación en semillas de *C. officinalis*, en función del tiempo de exposición al hipoclorito de sodio 5% y etanol 70%. Las barras representan la desviación estándar.

Puede observarse que el tratamiento consistente en la inmersión de las semillas en solución de etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5 % durante dos y tres minutos, respectivamente, fue el que produjo el mejor porcentaje de germinación. Así mismo, dicho tratamiento produjo porcentajes mínimos de contaminación y de oxidación en semillas de *C. officinalis*.

Se empleó una prueba de rango múltiple de Duncan's para comprobar si existen diferencias significativas en la variable respuesta, germinación (Ver anexo 4, numeral 10.2.1.3). Esta prueba permitió concluir que el mejor porcentaje promedio de germinación con etanol 70 % (2 minutos) es significativamente diferente con respecto a los demás niveles. El porcentaje promedio de germinación es significativamente mayor en el nivel 2 minutos del factor etanol 70 %. En el caso del hipoclorito de sodio 5 %, los resultados de la prueba de rango múltiple de Duncan's permitieron concluir que no existen diferencias significativas en el porcentaje promedio de germinación entre los grupos de niveles 3, 2 y 1 minutos, 1 y 4 minutos y 4, 0 y 5 minutos. Los resultados anteriores son representados en las siguientes gráficas (Figura 5.6), correspondientes al porcentaje promedio de germinación en función de los tiempos de exposición al hipoclorito de sodio 5% y al etanol 70 %.

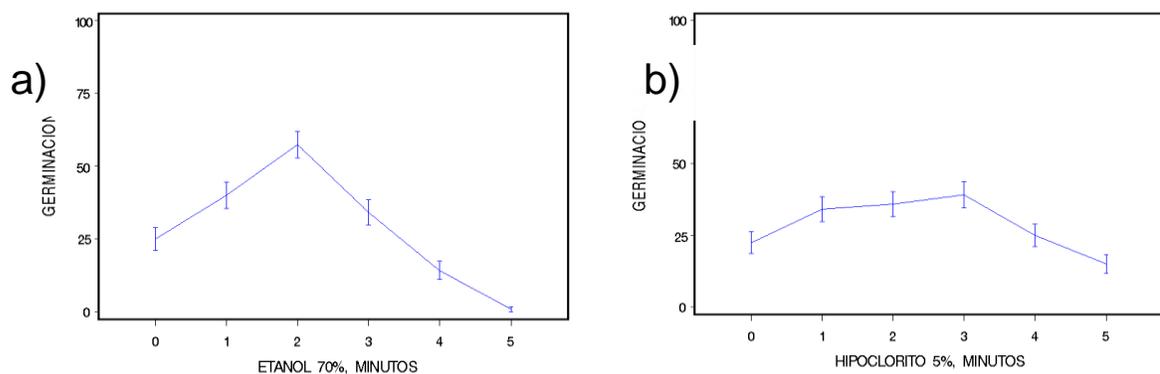


Figura 5.4. Efecto del tiempo de exposición de a) etanol 70 % y b) hipoclorito de sodio 5 %, sobre la germinación de las semillas.

La Tabla 5.7 presenta el análisis de la varianza para la germinación cuando se utiliza etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5 % para desinfectar semillas de *C. officinalis* (ver también anexo 1, numeral 10.1.1.3)

Tabla 5.7. Análisis de varianza para la germinación de semillas de *C. officinalis*.

Factor	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor F	Pr > F
Hipoclorito	5	5.161111111	1.032222222	6.76	<.0001
Etanol	5	23.86111111	4.772222222	31.24	<.0001
Hipoclorito*Etanol	25	13.53888889	0.54155556	3.54	<.0001

El análisis de la ANOVA factorial, indica que los tratamientos tienen un efecto significativo en la germinación de semillas de *C. officinalis*, con un nivel de confianza del 95%.

Con el análisis de los experimentos presentados hasta ahora, se puede decir que una de las desventajas que se presenta en los trabajos biotecnológicos con especies vegetales es la dificultad de la manipulación del material vegetal para la desinfección de explantes. Previamente a este estudio, se realizaron ensayos para la desinfección de explantes de *C. officinalis* provenientes del campo o vivero, pero éstos no permitieron la formación de callos directamente debido a la fuerte oxidación o a la contaminación microbiana cuando se realizaban tratamientos de desinfección menos rigurosos (Resultados no mostrados). La producción de plántulas *in vitro*, a partir de semillas asépticas, fue una solución a estos inconvenientes. El uso de etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 5% durante dos y tres minutos, respectivamente, presenta resultados altamente favorables para la desinfección de las semillas evitando la oxidación de las mismas, obteniéndose un alto porcentaje (90%) de germinación vegetal. Por lo anterior, se decidió adoptar este tratamiento para la desinfección de semillas de *C. officinalis*.

Dixon y Gonzáles (1994), proponen un protocolo general para la esterilización de semillas de especies vegetales, en el cual se sumergen las semillas en etanol absoluto por 10 segundos, o en una solución blanqueadora comercial al 10 % por 15 minutos, luego se deben seleccionar las semillas con testas intactas y sumergirlas en una solución blanqueadora comercial al 10 %, que contenga 0.05 % (v / v) de detergente, por 20 minutos. Así mismo, Grzelak y Janiszowska (2002) propusieron una desinfección para semillas de *C. officinalis*, donde cortes de semillas eran enjuagados con etanol 98 % y esterilizados con una solución de hipoclorito de sodio 6 % durante una hora dentro de condiciones de presión de aire reducida. Subsecuentemente, las semillas son almacenadas por 20 horas en agua a 5 °C. Luego dentro de condiciones estériles, son desinfectadas nuevamente con hipoclorito de sodio 6 % por 15 minutos previamente a la siembra.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, constituyen un nuevo protocolo que puede ser considerado una alternativa factible para la desinfección de semillas de *C. officinalis*, por ser un procedimiento más rápido y sencillo que el propuesto por los autores antes mencionados.

El medio de cultivo propuesto por Grzelak y Janiszowska (1992) para la germinación de las semillas, presentó buenos resultados, evidenciado en el buen crecimiento de las plántulas. En la Fotografía 5.1 se muestra la plántula de *C. officinalis* después de 10 días de germinación, proveniente de la desinfección de las semillas con 2 minutos de etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 5%, sembrada en medio MS basal sin hormonas. En condiciones estériles, las plántulas se diseccionaron y se cultivaron en medio MS basal, suplementado con 0.4 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0.4 mg L⁻¹ de quinetina, y 0.5 mg L⁻¹ de ácido ascórbico para la formación de callos friables.



Fotografía 5.1. Plántula de *C. officinalis*, 10 días después de la germinación.

5.2 Establecimiento de Callos y Suspensiones

5.2.1 Obtención de callos

Se realizaron cuatro siembras de 50 explantes cada una (200 explantes en total). Los explantes fueron tomados de hojas de plántulas jóvenes (15 días de germinadas) desarrolladas en las mejores condiciones establecidas anteriormente. En condiciones estériles, las plántulas se diseccionaron (1 cm² aproximadamente) y se cultivaron en condiciones de medio MS basal, suplementado con 0.4 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0.4 mg L⁻¹ de quinina, y 0.5 mg L⁻¹ de ácido ascórbico. La calogénesis comenzó a observarse de 2 a 3 semanas después de la siembra, donde pequeñas protuberancias o estructuras nodulares comenzaban a aparecer alrededor de los explantes.

Los resultados de la formación de callos con la combinación de hormonas (2,4-D y quinina) ensayadas, alcanza valores del 97 %, donde, de los 200 explantes sembrados, sólo dos explantes no mostraron formación de callo y cuatro presentaron contaminación exógena, posiblemente por la manipulación del tejido en el momento de la siembra. Sin embargo, se debe tener en cuenta no sólo el

número de callos obtenidos, sino también su friabilidad, característica que corresponde a callos formados por células grandes con una gran vacuola, aptos para la formación de suspensiones celulares (Serrano y Piñol, 1991). De los 194 callos formados, cinco no se consideraron friables por su aspecto de callo embriogénico, aglomerado de células compacto, de crecimiento lento y color blanco (Dixon y Gonzáles, 1994). Por tanto, el 94.5 % de los explantes sembrados produjo callos friables, los cuales se caracterizaban macroscópicamente por tener una coloración translúcida, un aspecto blando y un crecimiento rápido, como el tipo de callo no embriogénico descrito por Dixon y Gonzáles (1994) apto para la producción de metabolitos secundarios. Los resultados anteriores son ordenados en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8. Resultados de la formación de callos por siembra.

Número de Siembra	Explante Contaminado	Explantes No forman Callo	Callos embriogénicos	Callos Friables
1	1	1	2	46
2	0	0	0	50
3	3	0	1	46
4	0	1	2	47
Total	4	2	5	189

En general, los reportes para la micropropagación de especies vegetales que abordan el problema de la formación de callos friables, ratifican la dependencia de la respuesta de los explantes con la concentración en el medio de las hormonas, auxina y citoquinina. Comúnmente, se escoge una relación auxina/citoquinina alta, para que favorezca el crecimiento más que la división celular. Sin embargo, en nuestro caso, la relación auxina/citoquinina es igual a 1 (concentraciones hormonales de 0.4 mg L⁻¹ de 2,4-D / 0.4 mg L⁻¹ de quinetina), la cual produjo un índice de crecimiento promedio de 2.8 en la producción de biomasa y un alto

porcentaje (94.5%) en la formación de callos friables de *C. officinalis*. Este resultado es compatible con lo obtenido por Grzelak y Janiszowska (2002), donde con la misma la relación auxina/citoquinina (0.4 mg L^{-1} de 2,4-D / 0.4 mg L^{-1} de quinetina), se reporta el mejor porcentaje de formación de callos friables (85%) de *C. officinalis*. Por tal razón, con este ensayo se reafirma que el medio MS suplementado con 0.4 mg L^{-1} de 2,4-D, 0.4 mg L^{-1} de quinetina, propuesto por Grzelak y Janiszowska (2002), es adecuado para la formación de callos friables a partir de explantes de hojas de *C. officinalis*.

En la Fotografía 5.2 se presentan callos de *C. officinalis* provenientes de explantes de plántulas asépticas. La diferencia de color entre los callos translúcidos producidos en esta investigación y los callos de color verde descritos por Grzelak y Janiszowska (2002), puede deberse a algún efecto del ácido ascórbico sobre la producción de pigmentos.



Fotografía 5.2. Callos de *C. officinalis*

5.2.2 Obtención de Suspensiones Celulares

Igual que para la formación de callos, en las suspensiones celulares se utilizó el medio al propuesto por Grzelak y Janiszowska (2002), medio MS suplementado con 0.4 mg L^{-1} de 2,4-D, 0.4 mg L^{-1} de quinetina; adicionalmente se agregó 0.5

mg L⁻¹ de ácido ascórbico, como antioxidante. La Fotografía 5.3 corresponde a una suspensión celular de *C. officinalis* cultivada en medio MS bajo las condiciones establecidas anteriormente.



Fotografía 5.3. Suspensión celular de *C. officinalis* cultivada en las condiciones detalladas en el texto.

Las suspensiones de *C. officinalis* presentaron un índice de crecimiento promedio de 2.2 durante los primeros 4 meses, después del cuarto mes las suspensiones tomaban una coloración oscura (fenolización) y su índice de crecimiento promedio disminuía a 1.4. La fenolización es uno de los problemas más comunes que se presentan en el cultivo *in vitro*, es la liberación de compuestos fenólicos por los tejidos y la consecuente oxidación del medio de cultivo (Park *et al.*, 2000), aun con medios líquidos en los cuales es más fácil y rápido diluir los productos tóxicos (Pierik, 1990). Estos compuestos impiden el crecimiento y desarrollo de los propios tejidos vegetales (Pierik, 1990). La adición de ácido ascórbico como antioxidante no logró un adecuado control del fenómeno de fenolización.

5.2.3 Establecimiento de la curva de crecimiento de las células en suspensión

La Figura 5.5 corresponde a la curva de crecimiento de las células en suspensión de *C. officinalis* en medio MS en las condiciones establecidas previamente. En el experimento 1 (curva de crecimiento después de 2 subcultivos) puede apreciarse una fase *lag* de aproximadamente 6 días, una fase de crecimiento exponencial entre los días 6 y 18, una fase estacionaria entre los días 18 y 24 y una fase de declino suave a partir del día 24. Para el experimento 2 (curva de crecimiento después de 8 subcultivos) puede observarse una fase *lag* de 3 días aproximadamente, una fase exponencial entre los días 3 y 12, una fase estacionaria entre los días 12 y 21 y una fase de declino suave a partir del día 21.

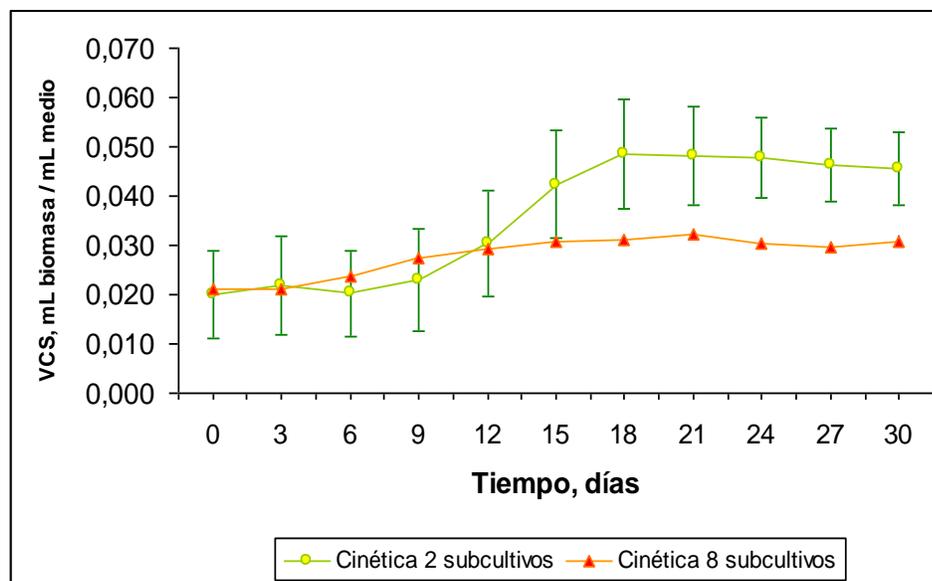


Figura 5.10: Curva de crecimiento de suspensiones celulares de *C. officinalis*, Experimento 1 y 2. Se muestran los valores promedio del volumen de células sedimentadas (VCS). Las barras indican la desviación estándar.

De estos resultados se puede concluir que la adaptación de las células al medio líquido fue rápida; sin embargo, con el tiempo el crecimiento de las suspensiones

celulares cae drásticamente debido a la oxidación del medio de cultivo por la fenolización. Para el experimento 1 se presentó una fase *lag* de 6 días y el crecimiento máximo celular se alcanza en el día 20, aproximadamente; estos resultados son similares a los reportado por Grzelak y Janiszowska (1992).

5.2.4 Viabilidad Celular

Las células viables no se tiñen o tienen una tenue coloración azul al utilizar Azul de Evans (Dixon y Gonzáles, 1994). La viabilidad celular en las suspensiones de *C. officinalis* fue mayor en los primeros meses donde se alcanzaban porcentajes del 85 % de células viables, con morfología ligeramente redondeada y distribuidas ya sea como células individuales o formando pequeños aglomerados. Este tipo de células se presentaban principalmente en suspensiones con un activo crecimiento (Orozco, 2002). Luego de 4 meses se presenciaba la formación de microcallos, los cuales son característicos de suspensiones heterogéneas o en las últimas fases de crecimiento celular, fase de desaceleración o estacionaria (Orozco, 2002). Después de este tiempo la viabilidad celular disminuía a un 55 %, debido, también, a la oxidación por fenolización.

5.3 Evaluación de la Producción de Metabolitos

5.3.1 Efecto de la adición de MeJA sobre la producción de metabolitos por células de *C. officinalis* cultivadas en suspensión

No se detectó la producción de metabolitos de interés, quercetina, kaempferol, ácido cafeico y ácido clorogénico en las suspensiones control de *C. officinalis* (suspensiones celulares no adicionadas con MeJA). Así mismo, no se detectó la producción intracelular ni extracelular de dichos metabolitos con la metodología planteada en los experimentos 1 y 2 de elicitación. En los cromatogramas de los sobrenadantes de las suspensiones de *C. officinalis* elicidadas con MeJA, no se detectó ningún pico relacionado con el presentado en los cromatogramas de los estándares de cada uno de los diferentes metabolitos (Anexo 5). Los métodos propuestos por Mesbah y Wen para la detección de flavonoides y ácidos fenólicos respectivamente, no detectaron ningún tipo de compuesto fenólicos en las muestras.

Muchas especies vegetales cultivadas en suspensión, producen metabolitos secundarios en la fase de crecimiento exponencial y presentan un máximo de producción de metabolitos en esta fase. Tal es el caso de alcaloides indólicos en cultivos de *Rauwolfia sellowii* (Rech *et al.*, 1998), tabersonina y ajmalicina de cultivos celulares de *Catharanthus roseus* (Bhadra y Shanks, 1997), taxanos en cultivos de *Taxus cuspidata* (Son *et al.*, 2000). Por el contrario, el paclitaxel (Taxol) y la bacatina III en cultivos de *Taxus wallichiana* y *Taxus canadiensis* (Osorio *et al.*, 2002; Phisalaphong y Linden, 1999) o la serpentina en cultivos de *catharanthus roseus* (Bhadra y Shanks, 1997), no están asociados al crecimiento celular y su producción máxima se presenta en la fase estacionaria. No se conocen reportes de producción de quercetina, kaempferol, ácido cafeico o ácido

clorogénico por cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*; por esta razón se elicitó y se tomaron muestras durante toda la cinética de crecimiento para determinar con certeza en qué fase se presenta la acumulación de estos metabolitos en la suspensiones, en caso de producirse.

Sin embargo, muchos metabolitos secundarios no son expresados cuando se establece el cultivo *in vitro* de la especie (Orozco, 2002). En ocasiones pueden descubrirse metabolitos, que no se expresaban en la planta *in vivo* (Schripsema *et al.*, 1996). En el caso de *C. officinalis*, en los cultivos celulares elicitados y no elicitados con MeJA, en este estudio no se produjo ninguno de los compuestos buscados, quercetina, kaempferol, ácido cafeico y ácido clorogénico, así como tampoco otros compuestos que podían ser detectados con los métodos de HPLC establecidos.

7 CONCLUSIONES

Se estableció el protocolo para la desinfección de semillas con miras a la obtención de plántulas totalmente asépticas de *C. officinalis*. El cual consiste en la inmersión del material vegetal en solución de etanol al 70 % (v / v) durante 2 minutos e hipoclorito de sodio (NaClO) al 5 % (v/v) durante 3 minutos. El protocolo presentado en este estudio es un procedimiento más rápido y sencillo, comparado con otros tratamientos reportados de desinfección de semillas.

Los explantes provenientes de las plántulas obtenidas *in vitro* son aptos para la formación de callo y no requieren de más tratamientos de desinfección, lo cual constituye un punto a favor, con respecto a los explantes provenientes de plantas de campo o vivero, debido a que se reduce en un alto porcentaje la oxidación o necrosis por dichos tratamientos.

Se establecieron cultivos *in vitro* de callos y suspensiones de células de *C. officinalis*, con miras a la producción de algunos de sus metabolitos secundarios de carácter anticancerígeno. Este es el primer estudio, que conozcamos, de producción de cultivos *in vitro* de esta especie con miras a la obtención de flavonoides y ácidos fenólicos. El único estudio conocido produjo callos y suspensiones de *C. officinalis* para la evaluación de producción de ácido oleanólico (Grzelak y Janiszowska, 2002).

El medio basal MS, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.5 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y concentraciones hormonales de 0.4 mg L⁻¹ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.4 mg L⁻¹ de quinetina resultó ser un medio adecuado para la formación de callos friables y suspensiones celulares de *C. officinalis*.

La curva de crecimiento de las células de *C. officinalis* en suspensión mostró el comportamiento típico de una curva sigmoideal, con una fase lag de 6 días, una fase de crecimiento exponencial de aproximadamente 12 días, una fase estacionaria de 5 días y una fase de declino suave a partir del día 24 de cultivo. No se encontró producción extracelular espontánea de ninguno de los metabolitos de interés en este estudio, en ninguna de las fases del crecimiento celular. Lo anterior permite concluir que, aunque el medio MS establecido mostró ser un medio adecuado para el crecimiento *in vitro* de células de *C. officinalis*, no parece ser un medio adecuado para inducir la producción de sus metabolitos secundarios. Así mismo, se determinó que el metil jasmonato (MeJA) no elicó la producción de ninguno de los metabolitos extra ni intracelularmente.

8 RECOMENDACIONES

El conocimiento generado y la experiencia adquirida en la presente investigación, brindan una base para futuros estudios orientados al establecimiento de cultivos *in vitro*, la producción de metabolitos secundarios y/o procesos de biotransformación en cultivos de células vegetales. Por tal razón se recomienda:

- ✚ Realizar estudios de optimización del medio de crecimiento de células de *C. officinalis*. Específicamente se debería hacer un estudio de optimización de la composición hormonal en otros tipos de medios, por ejemplo el SH.
- ✚ Hacer estudios que permitan establecer un medio óptimo de producción de metabolitos secundarios de interés comercial de *C. officinalis*.
- ✚ Se deben considerar estudios donde se establezcan callos y suspensiones celulares a partir de flores (Pétalos de la inflorescencia) de *C. officinalis* para la obtención de metabolitos de interés, debido a que la máxima acumulación *in vivo* se da en este tejido.
- ✚ Es necesario estudiar el posible efecto elicitor, que sobre la producción de metabolitos secundarios de *C. officinalis*, pudieran tener otras sustancias que han mostrado tal efecto en otras especies vegetales y sobre otros metabolitos. Así mismo, utilizar la luz como elicitor, pues es bien conocido que bajo condiciones naturales, las especies producen antioxidantes para protegerse de la radiación, también el uso de elicitores bióticos pueden dar una respuesta positiva a la producción de metabolitos.

✚ Es importante la evaluación de otros metabolitos secundarios de importancia farmacológica, los cuales sean más específicos de la especie *C. officinalis*.

9 BIBLIOGRAFÍA

Acosta L, Ferradá CR, Sánchez E, 2001. Instructivo técnico de *Caléndula officinalis*. Rev. Cubana Plant Med. (1):23-27

Ahmed AA, Jakupovic J, Mabry TJ, 1993. Sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. J Nat Prod. 56:1821-1824.

Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K, Tamura T, 1996. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. Phytochemistry. 43 (6):1255-1260.

Alfermann AW, Petersen M, 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. Plant Cell Tiss Org Cult. 43: 199-205.

Aquino R, De Feo V, De Simone F, Pizza C, Cirino G, 1991. Plant Metabolites. New Compounds And Anti-Inflammatory Activity Of *Uncaria tomentosa*. Journal of Natural Products. 54 (2): 453-459.

Atif B, Awad, Carol S, 2000. Fink Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action¹. J. Nutr. Review. 130: 2127–2130.

Balandrin MJ, Klocke JA, 1988. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic plant. 4: 1-36.

Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, Castaldo Cobianchi R, Vuotto ML, Ferrara L, 2000. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*. 71: 110-116.

Bhadra R, Shanks JV, 1997. Transient studies of nutrient uptake, growth, and indole alkaloid accumulation in heterotrophic cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Bioeng*. 55(3): 527-534.

Biondi S, Thorpe T, 1981. Clonal Propagation of Forest Tree Species. COSTER Symp. On Tissue Culture of Economically Important Plants. Ed A.N. Rao. p 197-202.

Calvo MM, 2005. Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr. Review*. 45 (7-8): 671-696.

Chandan KS, Savita K, Sashwati R, 2006. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. *Life Sci*. 78 (18): 2088–2098.

Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC, 2003. Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. *Am J Chin Med*. 31 (1): 37-46.

Choi SM, Lee O, Kwon S, Kwak SS, Yu D, Lee HS, 2003. High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnol Lett*. 25: 213-218.

Chung T, Moon S, Chang Y, Ko J, Lee Y, Cho G, Kim S, Kim J, Kim C, 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB Journal*, 18:1670-681.

Collin HA, Edwards SG, 1998. *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers.

Della R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Isaac O, 1994. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 60:516-20.

Di Mascio P, Kaiser S, Sies H, 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys.* 274 (2):532-8.

Dicosmo, F, Misawa M, 1995. Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13 (3): 425-453.

Dixon RA, Gonzales RA, 1994. *Plant Cell Culture. A Practical Approach.* 2 ed. Capítulo 1.

Dodds JH, Roberts LW, Heslop-Harrison J, 1995. *Experiments in Plant Tissue Culture.* 3 ed. Capítulo 2

Doran PM, 2000. Foreign proteins production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol.* 11: 199-204.

Duke JA, 1992. *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants.* Boca Raton, FL. CRC Press. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl>

Dumenil G, 1980. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis*. *Ann Pharm Fr.* 38 (6): 493-9.

Dummel G, Chemli R, Balansard G, Guirand H, Lallemand M, 1980. Evaluation and other homeopathic tinctures of *C. officinalis* and *C. arvensis*. Ann Pharm Fr. 38 (6):493-499.

Farmer EE, Alm ras E, Krishnamurthy V, 2003. Jasmonates and oxilipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. Curr Opin Plant Biol. 6: 372-378

Fleischner AM, 1985. Plants extract to accelerate healing and reduce inflammation. Cosmet Toilet. 100:45-46, 48-51, 54-58.

Fu TJ, Singh G, Curtis WR, 1999. Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients. New-York: Kluwer Acad. /Plenum. 290.

Flores SI, Ortega LJ, Montes HM, Ramos VA, 2002. Biosynthesis of Sterols and Triterpenes in Cell Suspension Cultures of *Uncaria tomentosa*. Plant and Cell Physiology. Vol. 43, No. 12: 1502-1509

Gao J, Hooker BS, Anderson DB, 2004. Expression of functional human coagulation factor XIII A-domain in plant cell suspensions and whole plants. Prot Exp Purif. 37: 89-96.

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 87 (23): 1767-1776.

Girard LS, Bastin M, Courtois D, 2004. Expression of the human milk protein sCD14 in tobacco plant cell culture. Plant Cell Tiss Org Cult. 78: 253-260

Grzelak A, Janiszowska W, 2002. Initiation and growth characteristics of suspension cultures of *C. officinalis* cells. Plant Cell Tiss Org Cult. 71: 29-40.

Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. Related Articles, 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc Natl Acad Sci U S A. 89 (6): 2389-2393.

Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R, 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. Nat Biotechnol 22 (11): 1415-1422.

Hsing AW, Comstock GW, Abbey H, Polk BF, 1990. Serologic precursors of cancer. Retinol, carotenoids, and tocopherol and risk of prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 82: 941–946.

Janiszowska W, Jasinska R, 1982. Intracellular localization of labelling of tocopherols with [U-14C] tyrosine in *Calendula officinalis* leaves. Acta Biochim Pol. 29 (1-2): 37-44.

Kashiwada Y, Wang HK, Nagao T, Kitanaka S, Yasuda I, Fujioka T, Yamagishi T, Cosentino LM, Kozuka M, Okabe H, Ikeshiro Y, Hu CQ, Yeh E, Lee KH, 1998. Anti-AIDS Agents, Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. J. Nat. Prod., 61 (9): 1090-1095.

Kemper KJ, 1999. Caléndula (*Caléndula officinalis*) Longwood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>. 1-13.

Ketchum RE, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML, 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. Biotechnol Bioeng. 62 (1): 97-105.

Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM, 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. Journal of Biotechnology. 59: 39–52

Kim HJ, Fonseca JM, Choi JH, Kubota C, 2007. Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J Agric Food Chem.* 55(25):10366-72.

Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A, 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr. Review.* 76: 560–568

Krag K, 1976. Plants used as contraceptives by the North American Indians: an ethnobotanical study. Botanical Museum. Cambridge, MA: Harvard University, 1177.

Lastra VH, Piquet GR, 1999. *Calendula officinalis*, artículos de revisión centro de investigación y desarrollo de medicamentos. *Rev Cubana Farm.* 33 (3): 188-194

Lincoln WM, Rima A-A, Ian BP, Kevin DC, 2000. Chemistry And Biological Effects Of Dietary Phenolic Compounds: Relevance To Cardiovascular Disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27 (3): 152–159.

Martins SL, Silva HF, Novaes MR, Ito MK, 2004. Therapeutic effects of phytosterols and phytostanols in cholesterolemia. *Arch Latinoam Nutr. Review.* 54 (3): 257-263.

Matysik G, Wojciak-Kosior M, Paduch R, 2005. The influence of *Calendulae officinalis* flos extracts on cell cultures, and the chromatographic analysis of extracts. *Pharm Biomed Anal.* 38 (2): 285-292.

McDonald KA, Hong LM, Trombly DM, Xie Q, Jackman AP, 2005. Production of human alpha-1-antitrypsin from transgenic rice cell culture in a membrane bioreactor. *Biotechnol Prog.* 21(3): 728-734.

Mesbah MK, Khalifa SI, El-Gindy A, Tawfik KA, 2005. HPLC determination of certain flavonoids and terpene lactones in selected *Ginkgo biloba* L. phytopharmaceuticals. *Il Farmaco.* 60 (2005) 583–590

Michel F, 1977. *Apis Mellifica* and *Calendula officinalis* combination active against sunburn. *Ger Offen.* 2.720.420.

Mirjalili N, Linden JC, 1996. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models. *Biotechnol Prog.* 12 (1): 110-118.

Misawa M, 1994. Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolites. FAO Agricultural Services Bulletin N°108. Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 95.

Mohammad S, Satwinderjeet K, Mee-Hyang K, Vaqar MA, Farrukh A, Hasan M, 2005. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. *Oxford Journal. Carcinogenesis Advance Access published.* 15: 1-36.

Mueller MJ, Brodschelm W, Spannagl E, Zenk MH. 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (16): 7490-7494.

Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.

Neto J, Fracasso JF, Neves M, Santos LD, Banuth VL, 1996. Treatment of varicose ulcer and skin lesions with Calendula. *Revista de Ciencias Farmaceuticas*. 17: 181-186.

Osorio NA, Garden H, Cusidó RM, Palazón J, Alfermann AW, Piñol MT, 2002. Taxol and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. *Journal of Plant Physiology* 159: 97-102.

Orozco F, 2002. Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucaliptus cinerea* y evaluación de la producción de 1,8 cineol y otros terpenoides. Tesis de Maestría.

Pastrana AA, Mayr MJ, Martínez ZC, Mora PC, Blanco FJ, 2002. Plan Estratégico de Mercados Verdes. Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá DC: 1-84. www.minambiente.gov.co/mercadosverdes

Park, S. Y.; Murthy, H. N.; Paek, K. Y. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 63 (1): 67-72.

Paynter NP, Yeh HC, Voutilainen S, Schmidt MI, Heiss G, Folsom AR, Brancati FL, Kao W H L, 2006. Coffee and Sweetened Beverage Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus . *American Journal of Epidemiology* 164 (11): 1075–1084.

Pierik, R. L. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa, p. 301.

Pietta P, Bruno AMP, Rava A, 1992. Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. J Chromatogr. 593: 165-170.

Rech SB, Batista CVF, Schirpsema J, Verpoorte R, Henriques AT, 1998. Cell Culture of *Rauwolfia sellowii*: Growth and Alkaloid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 54: 61-63

Roberts SC, Shuler ML. Related Articles, 1997. Large-scale plant cell culture. Curr Opin Biotechnol. 8 (2):154-159.

Rocaud MA, 1988. Citotoxic and antitumoral activity of *C. officinalis* extracts. Pharmazie. 43 (3): 220-221.

Ramachandra RS, Ravishankar GA, 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 20: 101-153.

Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M, 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). J Plant Physiol. 160(9):1025-32.

Schipochliev T, 1981. Study on the antiinflammatory effect of a group of plant extract. Vet Med Nauki. 18 (6): 87-93.

Schripsema J, Fung SY, Verpoorte R, 1995. Screening of plant cell cultures for new industrially interesting compounds. Plant Cell Culture secondary Metabolism, DICOSMO FRANK, MASANARU MISAWA. 1: 1-10

Schuurman AG, Goldbohm RA, Brants HA, van den Brandt PA, 2002. A prospective cohort study on intake of retinol, vitamins C and E, and carotenoids and prostate cancer risk (Netherlands). *Cancer Causes Control*. 13: 573–582.

Serrano M, Piñol M, 1991. *Biología Vegetal*. Colección Ciencias de la Vida. Ed. Síntesis. Madrid. España.

Soderquist RG, Lee JM, 2005. Enhanced production of recombinant proteins from plant cells by the application of osmotic stress and protein stabilization. *Plant Cell Rep*. 24 (2): 127-132.

Son SH, Choi SM, Lee YH, Chooi KB, Yea SR, Kim JK, Park HJ, Kwon OW, Noh EW, Scon JH, Park YG, 2000. Large Scale Growth and Taxane Production in Cell Cultures of *Taxus cuspidate* (Japanese yew) Using a Novel Bioreactor. *Plant Cell Reports*. 19: 628-633

Sorrentino A, Schilberg S, Fischer R, Rao R, Porta R, Mariniello L, 2005. Recombinant human tissue transglutaminase produced in tobacco suspension cell cultures is active and recognizes autoantibodies in the serum of coeliac patients. *Int J Biochem Cell Biol*. 37: 852-861.

Swartz HJ, Lindstrom JT, 1986. *Tissue Culture as a plant production system for horticultural crops*. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands). 201 - 220

Tamogami S, Rakwal R, Kodama O, 1997. Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid. *FEBS Lett*. 412 (1): 61-64.

Taylor JA, West DW, 1980. The Use of Evan's Blue Stain to Test the Survival of Plant Cells after Exposure to High Salt and High Osmotic Pressure. J. Exp. Bot., 31: 571 - 576.

Ubeeva I, 1987. Effect of Calephlones on the course of experimental hepatitis. Farmacol Toksikol (Moscow). 50 (1): 66-71.

Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y, 2006. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. J Nat Prod. 69 (12): 1692-1696.

Vanisree M, Tsay H-S, 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering. 2 (1): 29-48.

Vanisree M, Lee CY, Lo S-F, Nalawade SM, Lin CY, Tsay H-S, 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures . Bot. Bull. Acad. Sin. Review. 45: 1-22

Verdelhan des Molles D, Gomord V, Bastin M, Faye L, Courtois D, 1999. Expression of a carrot invertase gene in tobacco suspension cells cultivated in batch and continuous culture conditions. J Biosci Bioeng. 87: 302-306.

Verpoorte R, Contin A, Memelink J, 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochem. Review, 1: 13-25.

Villalobos VM, Thorpe TA, 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Capítulo 6: 127-141

Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I, Vollmar A, Odenthal S, Stuppner H, 1985. Immunostimulating action of polysaccharides (heteroglycans) from higher plants. *Arzneimittelforschung*. 35: 1069-1075.

Wen D, Li C, Di H, Liao Y, Liu H, 2005. A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines. *J Agric Food Chem*. 53 (17): 6624-6629.

Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y, 1996. Methyl Jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnol*. 14:1129-1132

Zhang C, Yan Q, Cheuk W, Wu J, 2004. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorhiza* hairy root culture by Ag elicitation and nutrient feeding. *Plant med*. 70: 147-151

Zhang Y, Chen AY, Li M, Chen C, Yao Q, 2008. Ginkgo biloba Extract Kaempferol Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *J Surg Res*. 148 (1):17–23

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R, 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. Review. 23: 283-333

10 ANEXOS

Anexo 1

Esquema simplificado del protocolo de elicitación con Metil-Jasmonato

MeJA	Días de Muestreo									
	0	2	4	6	8	11	14	17	20	24
0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
10	<input type="checkbox"/>	* <input type="checkbox"/>	* * <input type="checkbox"/>	* * * <input type="checkbox"/>	* * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * * * * * <input type="checkbox"/>
100	<input type="checkbox"/>	* <input type="checkbox"/>	* * <input type="checkbox"/>	* * * <input type="checkbox"/>	* * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * * * * <input type="checkbox"/>	* * * * * * * * * <input type="checkbox"/>

1000	<input type="checkbox"/>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		<input type="checkbox"/>	*	*	*	*	*	*	*	*	*
			<input type="checkbox"/>	*	*	*	*	*	*	*	*
				<input type="checkbox"/>	*	*	*	*	*	*	*
					<input type="checkbox"/>	*	*	*	*	*	*
						<input type="checkbox"/>	*	*	*	*	*
							<input type="checkbox"/>	*	*	*	*
								<input type="checkbox"/>	*	*	*
									<input type="checkbox"/>	*	*
										<input type="checkbox"/>	*
											<input type="checkbox"/>

* Indica el día de toma de muestra de sobrenadante de las suspensiones tratadas.

Indica el día de adición de MeJA al 95 %

Anexo 2

HPLC, condiciones para la detección de flavonoides, kaempferol y quercetina.

- 🌿 Fase estacionaria, Columna: VP – DDS
- 🌿 Rata de Flujo: 1.5 mL/min.
- 🌿 Detector UV, Absorbancia: 370 nm
- 🌿 Temperatura: 25 °C
- 🌿 Volumen inyector: 20 uL
- 🌿 Fase Móvil, Solvente A: Buffer de Acetato a pH 3,3
- 🌿 Fase Móvil, Solvente B: Acetonitrilo, grado HPLC
- 🌿 Gradiente [A/B]* t (min): [60/40]*11, [40/60]*7, [10/90]*10.
- 🌿 Estándares quercetina y Kaempferol, 0.4 – 20 ug/mL
- 🌿 Calibración: triplicados.

Anexo 3

HPLC, condiciones para la detección de ácidos fenólicos, Cafeico y clorogénico.

- ☛ Fase estacionaria, Columna: Angela X BP – C18
- ☛ Rata de Flujo: 0.5 mL/min.
- ☛ Detector UV, Absorbancia: 254 nm
- ☛ Temperatura: 25 °C
- ☛ Volumen inyector: 10 uL
- ☛ Fase Móvil, Solvente A: Agua grado HPLC con 0.02 % Acido trifluoroacético (TFA)
- ☛ Fase Móvil, Solvente B: Metanol más 0.02 % TFA
- ☛ Gradiente t * B %: 0 – 5 min * 25 %, 5 – 10 min * 25 – 30 %, 16 – 18 min * 45%, 25 – 30 min * 80 %, 30 – 40 min * 80 – 25 %.
- ☛ Estándares: ácido cafeico y clorogénico, 0.05 – 50 mg/mL
- ☛ Calibración: triplicados.

Anexo 4

10.4.1 Análisis Estadísticos

10.4.1.1 Análisis estadístico del tiempo de etanol 70 % e hipoclorito 5 % sobre la desinfección de las semillas.

Variable respuesta: Desinfección

Factores: etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5 %

Niveles de cada factor: tiempo (minutos):

Etanol 70 %: 0, 1, 2, 3, 4, 5

Hipoclorito 5 %: 0, 1, 2, 3, 4, 5

Si denotamos por Y la respuesta, el modelo a ser usado es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde los α_i miden el efecto del factor etanol 70 % en sus diferentes niveles, los β_j miden el efecto del factor hipoclorito de sodio 5 % en sus diferentes niveles, los $(\alpha\beta)_{ij}$ miden el efecto de la interacción entre los dos factores y los ε_{ijk} miden el error aleatorio que no es posible explicar con el modelo. El procedimiento GLM del Paquete SAS, arroja los siguientes resultados:

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Desinfección

Fuente	DF *	SS**	MS***	Valor de F	Pr > F
Modelo	35	57.0152778	1.6290079	18.22	<.0001
Error	684	61.1500000	0.0894006		
Total Correcto	719	118.1652778			

* **DF:** Grados de Libertad

** **SS:** Suma de cuadrados

*** **MS:** Cuadrado de la media

Fuente	DF*	SS Tipo III**	MS***	Valor de F	Pr > F
Hipoclorito	5	18.99027778	3.79805556	42.48	<.0001
Etanol	5	25.74027778	5.14805556	7.58	<.0001
Hipoclorito*Etanol	25	12.28472222	0.49138889	5.50	<.0001

* **DF:** Grados de Libertad

** **SS:** Suma de cuadrados

*** **MS:** Cuadrado de la media

Para verificar si existen diferencias significativas en la variable respuesta (desinfección de semillas), se emplea una prueba de rango múltiple de Duncan's cuyos resultados para hipoclorito de sodio 5 % son:

Duncan's Agrupamiento	Media	observaciones	Hipoclorito
A	0.98333	120	5
A			
B	0.95000	120	4
B			
B	0.87500	120	3
C	0.76667	120	2
D	0.65833	120	1
E	0.52500	120	0

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Se observa que sólo en los niveles 5 a 4 y 4 a 3 de hipoclorito de sodio no existen diferencias estadísticamente significativas.

Para etanol 70 %, los resultados de la prueba de rango múltiple de Duncan´s son:

Duncan´s Agrupamiento	Media	observaciones	Etanol	
	A	0.99167	120	5
	A			
B	A	0.96667	120	4
B				
B		0.89167	120	3
	C	0.80833	120	2
	D	0.64167	120	1
	E	0.45833	120	0

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Al igual que para el hipoclorito de sodio, se observa que sólo en los niveles 5 y 4 y 4 y 3 de etanol no existen diferencias estadísticamente significativas en el número promedio de desinfección.

10.4.1.2 Análisis estadístico del tiempo de etanol 70 % e hipoclorito 5 % sobre la oxidación de las semillas.

Variable respuesta: Oxidación

Factores: etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5%

Niveles de cada factor: tiempo (minutos):

Etanol 70 %: 0, 1, 2, 3, 4, 5

Hipoclorito 5 %: 0, 1, 2, 3, 4, 5

Si denotamos por **Y** la respuesta, el modelo a ser usado es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde los α_i miden el efecto del factor etanol 70 % en sus diferentes niveles, los β_j miden el efecto del factor hipoclorito de sodio 5 % en sus diferentes niveles, los $(\alpha\beta)_{ij}$ miden el efecto de la interacción entre los dos factores y los ε_{ijk} miden el error aleatorio que no es posible explicar con el modelo. El procedimiento GLM del Paquete SAS, arroja los siguientes resultados:

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Oxidación

Fuente	DF *	SS**	MS***	Valor de F	Pr > F
Modelo	35	97.0486111	2.7728175	23.99	<.0001
Error	684	79.0500000	0.1155702		
Total Correcto	719	176.0986111			

* **DF:** Grados de Libertad

** **SS:** Suma de cuadrados

*** **MS:** Cuadrado de la media

Fuente	DF*	SS Tipo III**	MS***	Valor de F	Pr > F
Hipoclorito	5	29.70694444	5.94138889	42.48	<.0001
Etanol	5	60.79027778	12.15805556	7.58	<.0001
Hipoclorito*Etanol	25	6.55138889	0.26205556	5.50	<.0001

* **DF:** Grados de Libertad

** **SS:** Suma de cuadrados

*** **MS:** Cuadrado de la media

Para verificar si existen diferencias significativas en la variable respuesta (desinfección de semillas), se emplea una prueba de rango múltiple de Duncan's cuyos resultados para hipoclorito de sodio 5 % son:

Duncan's Agrupamiento	Media	observaciones	Hipoclorito
A	0.77500	120	5
B	0.60833	120	4
C	0.41667	120	3
D	0.29167	120	2
D			
D	0.24167	120	1
D			
D	0.22500	120	0

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Se observa que sólo en los niveles 0, 1, y 2 de hipoclorito de sodio no existen diferencias estadísticamente significativas.

Para etanol 70 %, los resultados de la prueba de rango múltiple de Duncan's son:

Duncan's Agrupamiento	Media	observaciones	Etanol
A	0.91667	120	5
B	0.68333	120	4
C	0.44167	120	3
D	0.20833	120	2
D			
D	0.20000	120	1
E	0.10833	120	0

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Se observa que solo en los niveles 1 y 2 de etanol no existen diferencias estadísticamente significativas en el número promedio de desinfección.

10.4.1.3 Análisis estadístico del tiempo de etanol 70 % e hipoclorito 5 % sobre la germinación de las semillas.

Variable respuesta: germinación

Factores: etanol 70 % e hipoclorito de sodio 5%

Niveles de cada factor: tiempo (minutos):

Etanol 70 %: 0, 1, 2, 3, 4, 5

Hipoclorito 5 %: 0, 1, 2, 3, 4, 5

Si denotamos por Y la respuesta, el modelo a ser usado es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde los α_i miden el efecto del factor etanol 70 % en sus diferentes niveles, los β_j miden el efecto del factor hipoclorito de sodio 5 % en sus diferentes niveles, los $(\alpha\beta)_{ij}$ miden el efecto de la interacción entre los dos factores y los ε_{ijk} miden el error aleatorio que no es posible explicar con el modelo. El procedimiento GLM del Paquete SAS, arroja los siguientes resultados:

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Germinación

Fuente	DF *	SS**	MS***	Valor de F	Pr > F
Modelo	35	42.56111111	1.2160317	7.96	<.0001
Error	684	104.5000000	0.1527778		
Total Correcto	719	147.0611111			

* **DF:** Grados de Libertad

** **SS:** Suma de cuadrados

*** **MS:** Cuadrado de la media

Fuente	DF*	SS Tipo III**	MS***	Valor de F	Pr > F
Hipoclorito	5	5.16111111	1.03222222	6.76	<.0001
Etanol	5	23.86111111	4.77222222	31.24	<.0001
Hipoclorito*Etanol	25	13.53888889	0.54155556	3.54	<.0001

* **DF:** Grados de Libertad

** **SS:** Suma de cuadrados

*** **MS:** Cuadrado de la media

Para verificar si existen diferencias significativas en la variable respuesta (germinación de semillas), se emplea una prueba de rango múltiple de Duncan's cuyos resultados para hipoclorito de sodio 5 % son:

Duncan's Agrupamiento	Media	observaciones	Hipoclorito
A	0.39167	120	3
A			
A	0.35833	120	2
A			
B	0.34167	120	1
B			
B	0.25000	120	4
C			
C	0.22500	120	0
C			
C	0.15000	120	5

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Se observa que en los grupos de los niveles 3, 2 y 1, 1 y 4 y 0, 4 y 5 no existen diferencias estadísticamente significativas cuando se utiliza hipoclorito de sodio 5 %.

Para etanol 70 %, los resultados de la prueba de rango múltiple de Duncan's son:

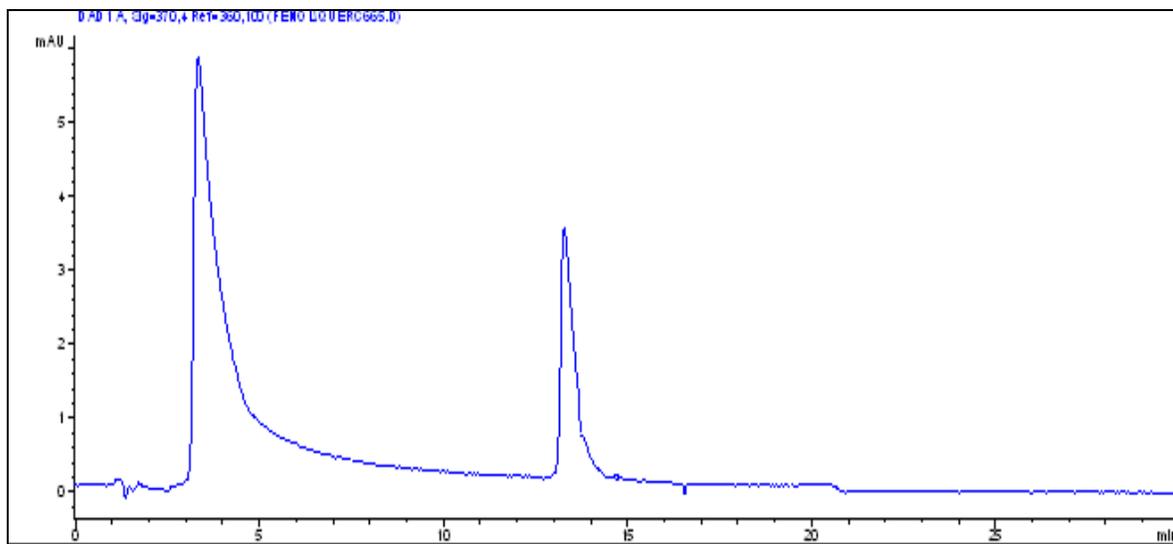
Duncan's Agrupamiento	Media	observaciones	Etanol
A	0.57500	120	2
B	0.40000	120	1
B			
C B	0.34167	120	3
C			
C	0.25000	120	0
D	0.14167	120	4
E	0.00833	120	5

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

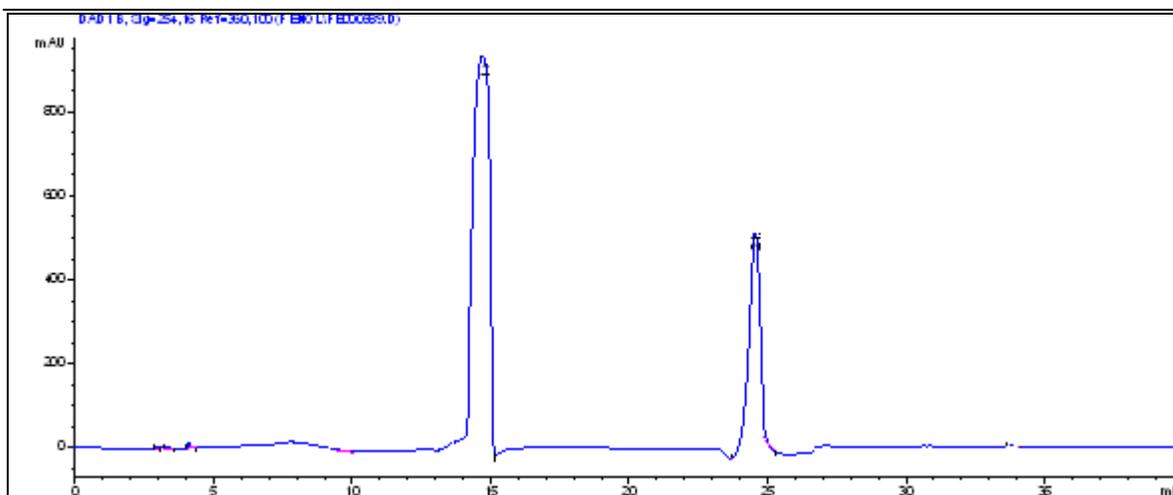
Se observa que en los grupos de los niveles 1 y 3 y 0 y 3 de etanol no existen diferencias estadísticamente significativas en el número promedio de desinfección.

Anexo 5

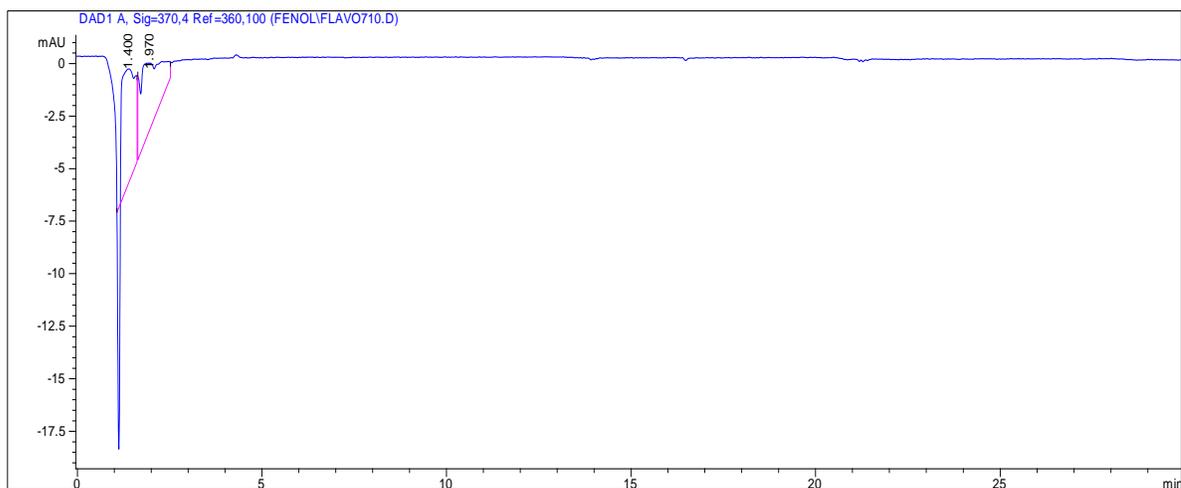
Cromatogramas:



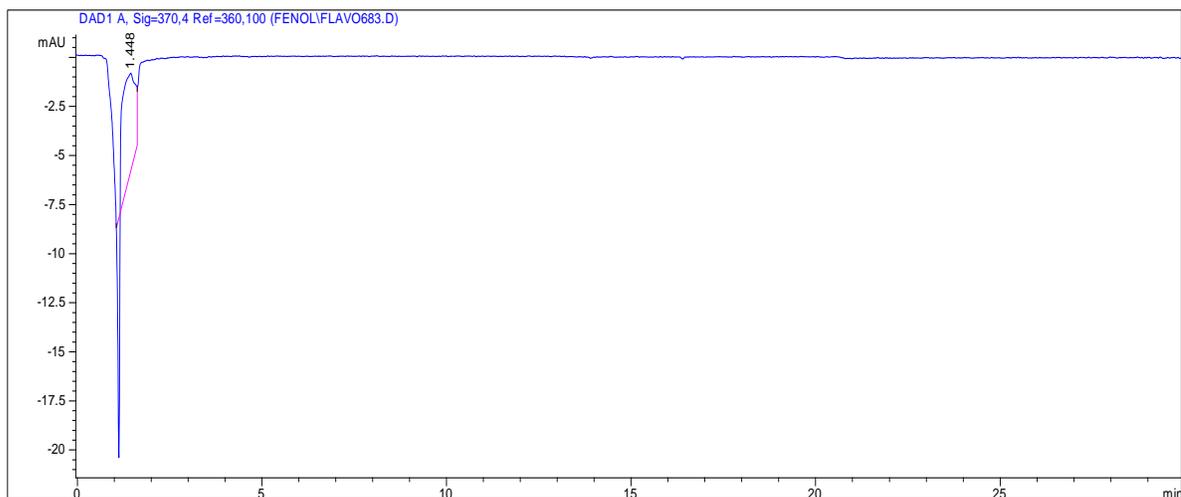
Anexo 5.1: Cromatograma de una mezcla de estándar sintético que contiene 20 ug/mL de quercetina (tiempo de retención, 3.329 minutos) y 10 ug/mL de kaempferol (tiempo de retención, 13.433 minutos).



Anexo 5.: Cromatograma de una mezcla de estándar sintético que contiene 50 mg/mL de ácido clorogénico (tiempo de retención, 14.093 minutos) y 20 mg/mL de ácido cafeico (tiempo de retención, 24.502 minutos).

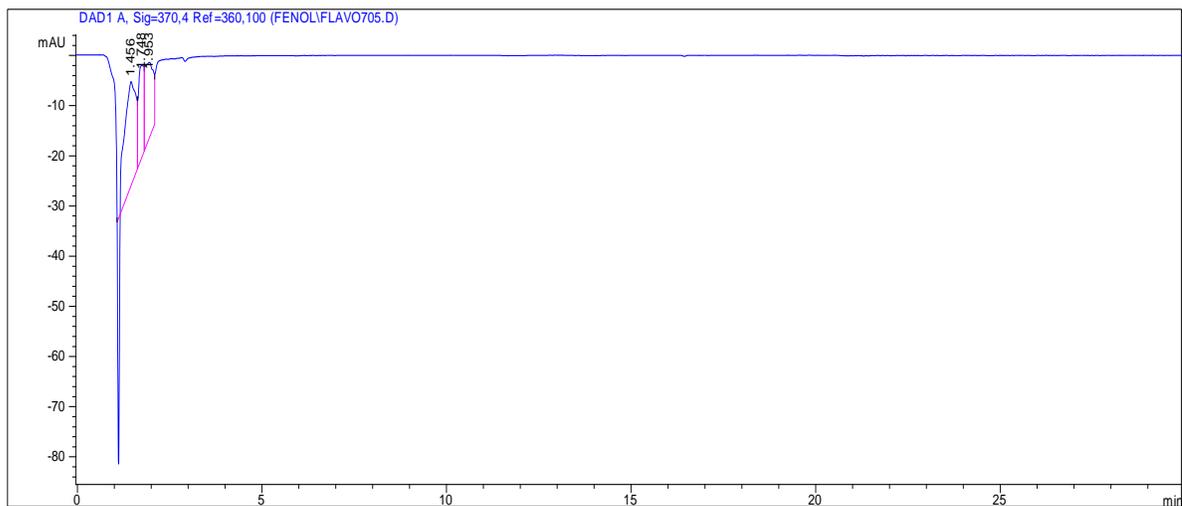


Anexo 5.3: Cromatograma de un sobrenadante de la suspensión control (sin elicitación) 22 días después del comienzo de la elicitación con MeJA.



Anexo 5.4: Cromatograma de un sobrenadante de una suspensión elicitada con MeJA al 10 %, el elicitor fue adicionado el día 8 y la muestra tomada el día 20.

Nota: Este cromatograma es característico de todos los restantes obtenidos para evaluar la producción de metabolitos extracelulares.



Anexo 5.5: Cromatograma de un extracto intracelular de una suspensión elicitada con MeJA al 10 %, el elicitor fue adicionado el día 11 y la muestra tomada el día 24.

Nota: Este cromatograma es característico de todos los restantes obtenidos para evaluar la producción de metabolitos intracelulares.