EVALUACION DE LA PRODUCCION DE ACIDO OLEANOLICO Y OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS A PARTIR DE CULTIVOS ELICITADOS DE CELULAS EN SUSPENSIÓN DE *Calendula officinalis*

JUAN PABLO ORTIZ ROSAS

Ingeniero Químico

Tesis de grado como requisito parcial para optar al título de Magister en Biotecnología

DIRECTOR

Dr. Mario Arias Zabala

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOCIENCIAS

MEDELLÍN

2011

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional.

RESUMEN

Calendula officinalis es una planta herbácea ampliamente usada en la medicina tradicional y en la industria cosmética, debido a sus propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes, entre otras, siendo el ácido oleanólico uno de los metabolitos que contribuye con estas actividades, incluyendo además una actividad antitumoral. Los cultivos *in vitro* de células vegetales son una alternativa viable para la producción controlada de metabolitos secundarios, pero para lograr una aplicación comercial es necesario emplear estrategias que mejoren la producción. El objetivo de la investigación fue estudiar el efecto de la elicitación con metil jasmonato (MJ), ácido salicílico (SA), y la concentración de sacarosa en el medio sobre la producción de ácido oleanólico libre (no como glicósido) en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*. Los cultivos fueron establecidos empleando la metodología descrita por Grzelak y col. (2002). El MJ y SA se introdujeron estérilmente el día de inoculación o luego de diez días. El ácido oleanólico fue cuantificado extracelularmente e intracelularmente por HPLC. Se encontró que la elicitación con MJ mejora la producción, siendo la concentración de 100 µM aplicándose el día decimo de cultivo, la condición que promueve la mayor producción (5.29 ± 0.33 mg/l), con respecto al cultivo sin elicitor (1.43 ± 0.21 mg/l), cuantificado en el medio e intracelularmente. El MJ mostro una tendencia mayor para la inducción de ácido oleanólico que el ácido salicílico (SA), y el efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo no fue concluyente. No fueron detectados en los extractos alcoholicos de las células cultivadas flavonoides como ácido clorogénico, quercetina, kaempferol, y ácido cafeico.

Palabras clave: metil jasmonato, ácido salicílico, células en suspensión, metabolitos secundarios, ácido oleanólico.

EVALUATION OF OLEANOLIC ACID AND OTHERS SECONDARY METABOLITES PRODUCTION FROM ELICITED CELL SUSPENSION CULTURES OF *Calendula officinalis*

ABSTRACT

Calendula officinalis is an herbaceous plant widely used in traditional medicine and cosmetic industry, due to its anti-inflammatory and wound-healing properties, being oleanolic acid one of bioactives compounds that contribute with these activities. *In vitro* plant cell cultures are viable alternative to controlled production for secondary metabolites, but, to achieve commercial application is necessary to employ strategies that enhance production. The objetive of this research was studied the effect of elicitation with methyl jasmonate (MJ) and salicylic acid (AS), and sucrose concentration in medium on free oleanolic acid production by cell suspension cultures of *C. officinalis*. Cell cultures were established using the methodology described by Grzelak et al (2002). MJ and SA were aseptically introduced at inoculation day or after ten days. Oleanolic acid was quantified extracellular and intracellular by HPLC. Elicitation at 10th day of culture with 100 µM of MJ was found to induce highest oleanolic acid production (5.29 ± 0.33 mg/l) compared with untreated cultures (1.43 ± 0.21 mg/l). MJ showed more capacity to induce oleanolic acid than AS in the concentration interval studied, and effect of sucrose concentration was unclear. However, AS had more negative effect on cell suspension cultures growth than MJ. Flavonoids including chlorogenic acid, quercetin, kaempferol and caffeic acid were not detected in alcoholic extracts of cell cultures.

Keywords: methyl jasmonate, salicylic acid, cell suspension cultures, secondary metabolites, oleanolic acid.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	III
2. ABSTRACT	IV
3. LISTA DE FIGURAS	VIII
4. LISTA DE TABLAS	X
5. INTRODUCCIÓN	1
6. JUSTIFICACIÓN	3
7. OBJETIVOS	4
7.1. Objetivo general	4
3.2. Objetivos específicos	4
8. MARCO TEORICO	5
4.1. Metabolitos secundarios de plantas	5
4.1.1 Los terpenos	5
4.2 Ácido oleanólico	6
4.3 Cálendula	8
4.3.1. Nombres comunes	8
4.3.2. Clasificación taxonómica	8
4.3.3. Descripción botánica	9
4.3.4. Usos y composición química	9
4.4. Cultivo de células y tejidos vegetales	10
4.4.1 Medios de cultivo y sus componentes en establecimiento de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales	10
4.4.2. Reguladores de crecimiento vegetal en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales	11
4.4.3. Establecimiento de cultivos de células en suspensión	11
4.4.4. Medidas del crecimiento celular	12
4.4.5. Cultivo de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios	13
4.4.5.1. Niveles de nutrientes en los medios de cultivo y la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos de células o tejidos vegetales	14
4.5. Elicitación	15
4.6. Producción de ácido oleanólico mediante cultivo de células vegetales en suspensión	18

4.6.1. Producción de ácido oleanólico desde cultivos de *Calendula officinalis* 19
4.7. Análisis químico para la extracción y detección de ácido oleanólico 20
4.7.1. Extracción de ácido oleanólico desde cultivos *in vitro* de células vegetales 20
4.7.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 21
4.7.3. Cromatografía en capa delgada 22
5. MATERIALES Y MÉTODOS 24
5.1. Materiales 24
5.2. Métodos 24
5.2.1. Obtención de plántulas de *Calendula officinalis* 24
5.2.2. Establecimiento de callos de *Calendula officinalis* 24
5.2.3. Establecimiento de suspensiones celulares de *Calendula officinalis* 25
5.2.4. Determinación de las curvas de crecimiento de *Calendula officinalis* 25
5.2.5. Elicitación de suspensiones celulares de *Calendula officinalis* 26
5.2.6. Efecto de la concentración de sacarosa sobre los cultivos celulares de *Calendula officinalis* 28
5.2.7. Extracción del ácido oleanólico desde suspensiones celulares de *Calendula officinalis* 29
5.2.8. Cuantificación del ácido oleanólico mediante cromatografía líquida de alta resolución 32
5.2.9. Detección de flavonoides por cromatografía en capa delgada 32
5.2.10. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas 33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 34
6.1. Generación de callos friables de *Calendula officinalis* 34
6.2. Generación de suspensiones celulares de *C. officinalis* 35
6.3. Determinación de la tasa de crecimiento de células en suspensión de *C. officinalis* 36
6.4. Efecto del metil jasmonato sobre el crecimiento celular 42
6.5. Efecto del ácido salicílico sobre el crecimiento celular 45
6.6. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento celular 48
6.7. Efecto de la concentración de metil jasmonato sobre la producción de ácido oleanólico 51
6.8. Efecto de la concentración de ácido salicílico sobre la producción de ácido oleanólico 54
6.9. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la producción de ácido oleanólico 57
6.10. Determinación de flavonoides en cultivos de células en suspensión de *Calendula officinalis* 58
6.11 Determinación de ácidos triterpenicos y comprobación por HPLC –MS 59
7. CONCLUSIONES 63
8. RECOMENDACIONES 64

9. BIBLIOGRAFIA 66
10. ANEXOS 74
Anexo 1. Curva de calibración para la cuantificación de ácido oleanólico 74
Anexo 2. Algunos cromatogramas obtenidos en el HPLC (206nm) 77
Anexo 3. Algunos cromatogramas y espectros obtenidos por HPLC-MS. 80
Anexo 4. Datos de producción de biomasa en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis* 82
Anexo 5. Análisis de varianza y comparaciones 87
Anexo 6. Componentes y preparación del medio MS 91

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fórmula estructural del ácido oleanólico.	6
Figura 2. *Calendula officinalis.*	8
Figura 3. Desarrollo de una cromatografía en capa delgada.	23
Figura 4. Procedimiento para extracción de ácido oleanólico desde medio de cultivo agotado de suspensiones celulares de *Calendula officinalis.*	30
Figura 5. Procedimiento para extracción de ácido oleanólico desde las células secas de *Calendula officinalis.*	31
Figura 6. A la izquierda, semillas de *Calendula officinalis*. A la derecha, plántulas de *C. officinalis* con una semana de germinadas.	34
Figura 7. A la izquierda, callos de *Calendula officinalis* formados luego de 20 días de su inducción. A la derecha, callos friables de *C. officinalis* formados luego de 2 meses de su inducción.	35
Figura 8. A la izquierda, callos de *C. officinalis* formados luego de seis meses días de su inducción, a la derecha de suspensiones celulares *C. officinalis* luego de 1 año de su establecimiento.	35
Figura 9. Células de *C. officinalis* vistas a 40 X, luego de 8 meses del establecimiento de las suspensiones celulares, luego de seis días de subcultivo.	36
Figura 10. Curva de crecimiento de *Calendula officinalis*, en cultivos luego de dos meses de establecidos.	37
Figura 11. Logaritmo natural de la biomasa, para determinar los días que hacen parte de la fase de crecimiento exponencial.	37
Figura 12. Curva de crecimiento de *Calendula officialis*, en cultivos luego de seis meses de establecidos.	38
Figura 13. Logaritmo natural de la biomasa, para determinar los días que hacen parte de la fase de crecimiento exponencial.	39
Figura 14. Oscurecimiento de las suspensiones celulares de *C. officinalis* luego de 15 dias de cultivo, por efecto de las distintas concentraciones de metil jasmonato.	42
Figura 15. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de metil jasmonato (MeJa) sobre el crecimiento celular, en azul elicitación día inicial, en rojo elicitación día 10. Las barras representan el error estándar.	43
Figura 16. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de metil jasmonato (MeJa) sobre el crecimiento celular.	44

Figura 17. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de ácido salicílico sobre el crecimiento celular. En azul elicitación en el día inicial del cultivo, en rojo elicitación en el día décimo del cultivo. 46

Figura 18. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de ácido salicílico sobre el crecimiento celular en el día décimo de iniciado el cultivo. 47

Figura 19. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de ácido salicílico sobre el crecimiento celular. 47

Figura 20: Efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento celular primer experimento. 48

Figura 21: Efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento celular segundo experimento. 49

Figura 22: Cromatoplaca de extractos hidroalcohólicos de cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*; fase móvil: acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico y agua (100:11:11:26). 59

Figura 23: Cromatograma para el ácido oleanólico en una concentración de 100 ppm, en HPLC- MS a 206 nm. 59

Figura 24: Espectro de masas para el ácido oleanólico en HPLC-MS, APCI modo positivo. 60

Figura 25. Cromatograma para un extracto en metanol de células elicitadas con 100 µM de metil jasmonato (día décimo), en HPLC- MS a 206 nm. 61

Figura 26. Espectro de masas para un extracto en metanol de células elicitadas con 100 µM de metil jasmonato (día décimo), APCI modo positivo. 61

Figura 27. Espectro de masas para un extracto en metanol de células elicitadas con 100 µM de metil jasmonato (día décimo), APCI modo positivo. a) HPLC-MS modo SCAN (206nm); b) iones con relación masa/carga entre 410.7 y 411.7; c) iones con relación masa/carga entre 438.7 y 439.7; d) iones con relación masa/carga entre 390.7 y 391.7. 62

LISTA DE TABLAS

Pagina

Tabla 1. Actividades terapéuticas del ácido oleanólico. 7

Tabla 2. Metabolitos secundarios producidos a partir de cultivos de células vegetales. 13

Tabla 3. Efecto de la elicitación con metil jasmonato y ácido salicílico o compuestos relacionados en la producción de metabolitos secundarios desde cultivos *in vitro.* 17

Tabla 4. Concentraciones y cantidades empleadas de agente elicitor en el primer experimento de elicitación (metil jasmonato ó ácido salicílico). 27

Tabla 5. Concentraciones y cantidades empleadas de agente elicitor en el segundo experimento de elicitación (metil jasmonato ó ácido salicílico). 29

Tabla 6. Crecimiento en inóculo concentrado 41

Tabla 7. Contenido de ácido oleanólico en medio de cultivo, células y total, en células elicitadas con metil jasmonato. 53

Tabla 8. Contenido de ácido oleanólico en medio de cultivo, células y total, en células elicitadas con ácido salicílico en el día décimo de cultivo. 55

Tabla 9. Contenido de ácido oleanólico en medio de cultivo, células y total, en células elicitadas con ácido salicílico en el día inicial de cultivo. 55

Tabla 10. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la producción de ácido oleanólico. 57

1. INTRODUCCIÓN

El ácido oleanólico es un triterpenoide pentacíclico ampliamente distribuido en plantas medicinales (Liu, 1995), entre las que se encuentra *Calendula officinalis (*Ruszkowski et at., 2003*)*. Este metabolito secundario ha mostrado tener múltiples actividades farmacológicas de interés, como cicatrizante, antiinflamatoria, anti -VIH, entre otras (Liu, 1995).

La producción actual de esta sustancia se basa en la extracción con solventes orgánicos desde plantas medicinales (Banik, 2008), y su valor en el mercado oscila entre 300 y 400 dólares por gramo (Srivastava, 2005) el cual es alto, como consecuencia de las bajas concentraciones en las plantas de las que se extrae.

Calendula officinalis es una planta comúnmente empleada en la medicina tradicional, y cuyos metabolitos presentes en ella han mostrado tener múltiples actividades farmacológicas (Ramos et al., 1998).

Sin embargo, los metabolitos secundarios generalmente se producen en bajas concentraciones en las plantas y las dificultades asociadas al cultivo de las mismas, hacen que el aprovechamiento de estas sustancias por cultivo de las diversas especies en el campo no siempre resulte económicamente viable (Kieran et at., 1997) y sea bastante dependiente del estado fisiológico y la etapa de desarrollo de la planta (Oskman e Inze, 2004).

El cultivo de las células vegetales en suspensión es un tipo de tecnología que posibilitaría la producción de metabolitos bajo condiciones controladas y reproducibles (Kieran et at., 1997). Sin embargo, para que estos sistemas de cultivo sean rentables, es importante desarrollar métodos que permitan la generación de grandes rendimientos de los productos (Dicosmo y Misawa, 1995); por ejemplo la optimización de los niveles de los nutrientes del medio de cultivo es importante para incrementar la productividad (Saito y Mizukami, 2002), así como el empleo de elicitores los cuales activan rutas de señalización para la formación de metabolitos secundarios en respuesta a diferentes tipos de estrés, o las moléculas que median estos procesos de elicitación tales como el metil jasmonato (Gundlach et al.,1992) ó el ácido salicílico (Godoy y Loyola,1997; Mehmetoğlu y Curtis, 1997), los cuales han mostrado buena efectividad como promotores de la producción de un diferente rango de metabolitos secundarios.

El interés farmacológico y comercial por esta sustancia, ha promovido diversos estudios en cultivos de cultivos de células en suspensión de diferentes plantas: *Scutellaria baicalensis* (Yoon et at., 2000)*, Perilla frutescens* (Wang et al., 2004), *Uncaria tomentosa (*Feria et at., 2005), *Tabernaemontana catharinensis* (Pereira et al., 2007), *Olea europaea* (Saimaru et al., 2007).

En *C. officinalis* se ha publicado la producción de ácido oleanólico en cultivos en suspensión (Grzelak y Janiszowska, 2002), incluso, el interés de incrementar la producción de esta sustancia ha sido estudiado muy recientemente en cultivos de células de esta especie (Wiktorowska et al.,

2010), esto mediante la aplicación de diferentes agentes elicitores incluyendo al ácido jasmónico, en ambos trabajos se analizó el contenido total de este compuesto (como aglicona libre o haciendo parte de saponinas). Sin embargo, aún no se ha reportado la respuesta de los cultivos de esta especie a la elicitación con metil jasmonato y ácido salicílico o a diferentes concentraciones de nutrientes, sobre la producción de ácido oleanólico libre.

2. JUSTIFICACION

El establecimiento de sistemas de producción de base biotecnológica, tales como los cultivos de células vegetales en suspensión para la producción de metabolitos secundarios con fines farmacológicos, ofrece alternativas de desarrollo sostenible a países como el nuestro, en donde la economía se centra en la generación de productos de bajo valor agregado y que generan altos niveles de contaminación durante su elaboración. Particularmente esta tecnología permite el aprovechamiento de la biodiversidad vegetal sin explotación exhaustiva de la tierra por medio de cultivos, lo cual es bastante importante para la conservación del medioambiente.

Calendula officinalis es una planta empleada en la actualidad con fines farmacológicos y cosméticos a nivel mundial. El desarrollo de un sistema de producción *in vitro* para los metabolitos secundarios de *Calendula officinallis* particularmente del ácido oleanólico constituye el primer paso para buscar una producción comercial empleando esta tecnología. En este sentido la presente investigación constituye un aporte al entendimiento del efecto que tienen elicitores como el metil jasmonato y el ácido salicílico, así como el efecto de la concentración de sacarosa sobre la producción de biomasa y del ácido oleanólico en cultivos de células en suspensión *C. officinalis* .

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Estudiar el efecto de algunos elicitores y de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células en suspensión de *Calendula officinalis.*

Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la elicitación con metil- jasmonato en diferentes concentraciones sobre la producción de ácido oleanólico y otros metabolitos en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*.

- Determinar el efecto de la elicitación con ácido salicílico en diferentes concentraciones sobre la producción de ácido oleanólico y otros metabolitos en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*.

- Determinar el efecto de la concentración de sacarosa sobre la producción de ácido oleanólico y otros metabolitos en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*.

4. MARCO TEORICO

4.1 METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS

Las plantas son una invaluable fuente de un amplio rango de metabolitos secundarios, los cuales son empleados como fármacos, agroquímicos, saborizantes, aromas, pigmentos, pesticidas y aditivos para alimentos (Ramachandra y Ravishankar, 2002). Los productos naturales y sus derivados representan más del 50 % del total de los medicamentos de uso clínico en el mundo, y las plantas superiores contribuyen con no menos del 25 % del total (Gurib-Fakim, 2006).

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios que parecen no tener una directa función en el crecimiento y desarrollo, y generalmente tienen una restringida distribución en el reino vegetal, dado que algunos metabolitos particulares son varias veces encontrados en una única especie vegetal o un grupo relacionado de especies (Taiz y Zeiger, 2002); sin embargo, se sabe que su rol principal está en la adaptación de las plantas a su medioambiente (Bourgaud et al., 2001). Algunos de estos metabolitos son difíciles de sintetizar químicamente y de difícil producción por parte de microorganismos a través de la ingeniería genética debido a la compleja red metabólica que involucra su síntesis y la regulación que existe sobre estas rutas (Zhong, 2001). Esto conduce a que la explotación comercial de dichas sustancias se restrinja a su extracción desde las plantas.

Los compuestos secundarios de las plantas son usualmente clasificados de acuerdo con su ruta biosintética. Tres grandes familias de moléculas son generalmente consideradas: compuestos fenólicos (antocianinas, flavonoides y taninos), compuestos nitrogenados (alcaloides) y, finalmente, terpenoides (en estos se incluye a los esteroides) (Bourgaud et al., 2001).

4.1.1 Los terpenos

Los terpenos (terpenoides), son quizás la más diversa familia dentro de los productos naturales sintetizados por las plantas. Estos terpenos pueden ser clasificados como metabolitos primarios necesarios para las funciones celulares y el mantenimiento, y como metabolitos secundarios, los cuales no están involucrados en el crecimiento y desarrollo (Roberts, 2007). El isopentenil pirofosfato (IPP), es un precursor único en la biosíntesis de los terpenos, y es producido por dos rutas biosintéticas en las plantas: la ruta del metil- eritritol- fosfato (MEP), donde la biosíntesis ocurre en los cloroplastos; y la ruta del ácido mevalónico (MVA), la cual tiene lugar en el citosol. La función de los terpenos en las plantas es considerada ser tanto ecológica como fisiológica, esto es porque pueden actuar inhibiendo el crecimiento de otras plantas (alelopatía), como insecticidas, atracción a insectos polinizadores, e incluso pueden actuar como hormonas vegetales, tales como el ácido abscísico y el ácido giberélico (Brielmann et al., 2006), entre otras.

Uno de los más conocidos terpenoides es la azadiractina, la cual impide la alimentación de algunos insectos hasta en dosis más bajas a 50 ppm,y se considera como un agente de control biológico a causa de su baja toxicidad en mamíferos. Los triterpenos glicósidos son algunas veces llamados saponinas debido a su capacidad de formar espuma; su toxicidad es debida a su capacidad para formar complejos con esteroles, característica que los hace antimicrobianos y están presentes en las plantas incluso antes de que los patógenos ataquen (Taiz y Zeiger, 2002).

Los triterpenos contienen 30 carbonos en su estructura, y son biosintéticamente derivados del escualeno, e incluyen esteroides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, entre otros. Sólo unos pocos triterpenos son distribuidos ampliamente entre las plantas, los cuales incluyen a las amirinas, el ácido oleanólico y el ácido ursólico (Brielmann et al., 2006). Los triterpenos en general son sintetizados en varios pasos; la unión de tres moléculas de isopentenil difosfato da lugar a la molécula de 15 carbonos farnesil difosfato (FPP). Dos moléculas de FPP son combinadas para dar lugar a la síntesis del escualeno. El escualeno sufre una ciclización, vía el intermediario, 2,3 óxido escualeno; este último compuesto es común a todos ácidos triterpénicos, y los productos dependen de la ciclasa específica. La β-amirin sintasa (también denominada β-amirin–ciclasa), se encarga de formar la β-amirina, la cual por oxidación del grupo metilo en el carbono 17 es convertida a ácido oleanólico, pero los detalles de esta última transformación aún permanecen desconocidos (Dewick, 2009).

4.2 ACIDO OLEANÓLICO

El ácido oleanólico (ácido 3β-hidroxi-olea- 12- en - 28- oico; No CAS: 508-02-1; peso molecular 456.7; Figura 1) es un triterpenoide pentacíclico, el cual está ampliamente distribuido en las plantas en forma de ácido libre o como aglicona formando parte de saponinas (Liu y Wang, 2007). Estos compuestos tienen un amplio espectro de actividades farmacológicas, y por esta razón estos compuestos se han convertido en medicamentos promisorios de origen natural (Liu, 1995). Las actividades biológicas que se atribuyen a esta molécula se resumen en la Tabla 1.

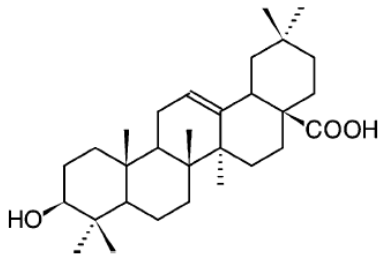


Figura 1. Fórmula estructural del ácido oleanólico. (Tomada de Rodríguez et al.,2003).

Así mismo, los glicósidos naturales del ácido oleanólico presentan múltiples actividades, por ejemplo actividad antidiabetogénica la cual fue en ratas alimentadas con glucosa (Yoshikawa y Matsuda, 2000), entre otras varias actividades, y algunos derivados sintéticos muestran inhibición

en la formación de osteoclastos (células que causan osteoporosis cuando hay desequilibrio entre la formación y la resorción de hueso) (Zhang, 2005) y presentan actividad anti-VIH (Zhu et al., 2001; Kashiwada et al., 1998).

Kowalski en 2007, reportó un estudio del contenido de ácido oleanólico y ácido ursólico en algunas plantas que podrían servir como fuentes de estos compuestos. En este documento se resalta entre las cinco especies estudiadas (*Silphium perfoliatum*, *S. trifoliatum, S. integrifolium, Panax quinquefolium* y *C. officinalis*) que *Calendula officinalis* es una de las plantas con mayor contenido de estos compuestos (en flores 20.53 mg/g seco).

Tabla 1. Actividades terapéuticas del ácido oleanólico.

Actividad	**Modelo de estudio**	**Mecanismo de acción**	**Referencias**
Anti-inflamatoria	Varios	Inhibición de la liberación de histamina, supresión de ciclooxigenasa & lipoxigenasa	Rajasekaran et al., 1990, Simon et al., 1992 (Citados por Liu, 1995).
Cicatrizante	Lesiones gástricas crónicas en ratas macho Sprague- Dawley inducidas con ácido acético	Sin establecer.	Rodríguez et al., 2003
	Ratones macho con incisión de 1cm.	Sin establecer.	Moura et al., 2006
Antitumoral	Línea celular de leucemia meloidal humana (HL60)	Inducción de apoptosis	Zhang et al., 2007
	Ratones macho ICR inoculados con células tumorales de sarcoma 180.	No establecida en el estudio.	Hsu et al., 1997
Hepatoprotectiva	Lesiones hepáticas inducidas con tetracloruro de carbono en ratones BALB/c machos.	Inhibición de la expresión y actividad del citocromo P450 2E1	Jeong, 1999.
Anti VIH	Línea de células T H9 infectadas con virus HIV-I	Inhibición de la replicación del virus	Kashiwada et al., 1998
Anticariogénica	*Streptoccocus mutans*	Inhibición de glucosiltransferasa	Kosai et al., 1987 (citado por Liu, 1995).
Anti-angiogénica	Embriones de pollo	Sin establecer.	Sohn et al., 1995
Anti-hipertensiva	Ratas Dalh macho sensibles a hipertensión (sal-sensibles).	Sin establecer.	Somova et al., 2003.
Inmunomoduladora	Ratones BALB/c machos	Incrementa número de células de la médula ósea y leucocitos, la producción de anticuerpos es más alta.	Raphael y Kuttan, 2003.

4.3 CALÉNDULA

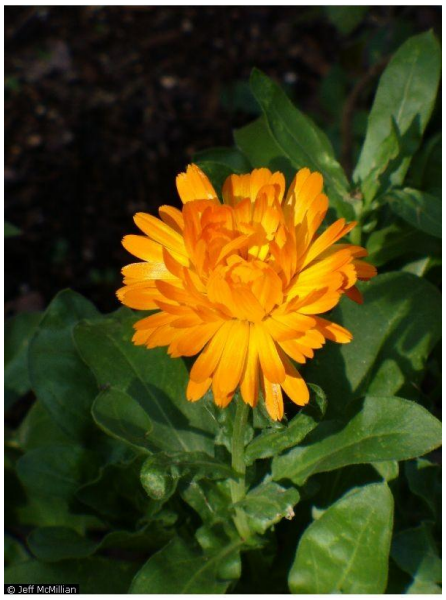


Figura 2. *Calendula officinalis* (Figura tomada de Jeff McMillian @ USDA-NRCS PLANTS Database)

Calendula officinalis es una planta de la familia de las asteráceas (antes denominadas como compuestas), la cual es originaria del Mediterráneo y se cultiva en múltiples lugares del mundo, esta planta ha sido ampliamente empleada en medicinal tradicional (Ramos et al., 1998) y en la fabricación de productos terapéuticos y cosméticos (Bako et al., 2002).

4.3.1 Nombres comunes

C. officinalis es conocida en Colombia como caléndula, y en otros países es conocida como marigold, pot marigold, maravilla, copetuda. Su nombre caléndula proviene del latín calendae que significa primer día del mes, que alude según la antigua Roma, a que ésta se encontraba en floración durante el primer día del mes, mientras su epíteto officinalis indica que es utilizada en la medicina tradicional (Acosta et al., 2001; Fonnegra y Jiménez, 2007).

4.3.2 Clasificación taxonómica

Reino	*Plantae*	(Vegetal)
Subreino	*Tracheobionta*	(Plantas vasculares)
Superdivisión	*Spermatophyta*	(Plantas con semillas)
División	*Magnoliophyta*	(Plantas con flores)
Clase	*Magnoliopsida*	(Plantas dicotiledoneas)
Subclase	*Asteridae*	
Orden	*Asterales*	
Familia	*Asteraceae*	
Genero	*Calendula L.*	
Especie	*Calendula officinalis L.*	

4.3.3 Descripción botánica

C. officinalis es una planta herbácea, anual, de color verde claro y de 30 a 60 cm de altura. En los primeros estadios la planta está conformada por una roseta basal de hojas, posteriormente desarrolla tallos angulosos y pubescentes a menudo ramificados desde la base. Las hojas son oblongolanceoladas o espatuladas, alternas de hasta 13 cm de largo. En los tallos se encuentran los capítulos florales cuyo diámetro oscila entre 3 y 6 cm y están conformados por flores liguladas marginales y tubulares en el centro. El involucro es gris- verdoso en forma de platillo de 1.5 cm a 3 cm de diámetro, el receptáculo desnudo, plano o ligeramente prominente, su fruto es en aquenio. La temperatura óptima para la germinación está entre 18 y 24°C, sin embargo durante el resto de las etapas admite temperaturas superiores. Prefiere climas templados, aunque resiste heladas y sequías; crece en alturas que van desde el nivel del mar hasta los 1000 m (Acosta et al., 2001).

4.3.4 Usos y composición química

Los extractos de esta planta son reconocidos por sus propiedades antiinflamatorias (Akihisa et al., 1996), cicatrizantes (Lavagna et al., 2001) antioxidantes (Cetkovic et al., 2004), anti-VIH (Kalvatchev et al., 1997), inmunomodulador y antitumoral (Jimenez et al., 2006).

Dentro de los compuestos que presentan actividad biológica en esta planta se destacan los carotenoides, flavonoides y las saponinas triterpenoides (Kurkin y Sharova, 2007). Las plantas de caléndula sintetizan significativas cantidades de saponinas oleanólicas, encontradas no solamente en las flores sino también en diferentes órganos de esta planta (Szakiel et al., 2003; Szakiel et al., 2005).

La composición química descrita para la caléndula por Fonnegra y Jiménez (2007) es:

Aceite esencial (0.1 a 0.4 %): mentona, isomentona, γ- terpineno, α- muroleno, gamma y delta-cadineno, cariofileno, pedunculatina, alfa y beta- ionona, entre otros. Flavonoides: rutósido, heterósidos de isorramnetina y quercetina. Saponósidos (2 a 5 %); calendulósidos A, D, F y D2 (derivados del ácido oleanólico). Alcoholes triterpénicos: alfa y beta amirina, taraxasterol, arnidiol, faradiol, y triterpentrioles pentacíclicos. Esteroles libres, esterificados y glucosilados, carotenos, xantofilas; ácidos fenoles, taninos y polisacáridos (galactanas).

Los flavonoles tales como la quercetina y el kaempferol, están presentes en la planta de *C. officinalis* como aglicona libre o como glicósidos (Cetkovic et al., 2004; Pietta y Bruno, 1992) son conocidos por su actividad anticancerígena, ya que son moléculas con propiedades antioxidantes y hacen parte de múltiples plantas medicinales (Cai et al., 2004).

4.4 CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales incluye todos los aspectos relacionados con el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos (Gaspar et al., 1996), empleando soluciones nutritivas en un ambiente controlado y aséptico (Loyola V., y Vázquez F., 2006). Entre las aplicaciones biotecnológicas del cultivo de tejidos vegetales se encuentran la propagación y conservación de plantas, desarrollo de plantas con resistencia a agentes bióticos y abióticos de estrés, y la producción de compuestos químicos de interés comercial (Kyrakosyan, 2006).

El éxito en el establecimiento de cultivos *in vitro* de tejidos vegetales, depende en principio del explante (fuente, tamaño, edad), de los componentes del medio de cultivo, de la asepsia, y de las condiciones de incubación, además de la composición hormonal (Dixon y Gonzales, 1994).

4.4.1 Medios de cultivo y sus componentes en establecimiento de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Aunque el botánico austriaco Gottlieb Haberlandt en 1902 realizó los primeros intentos en iniciar cultivos de células vegetales (Georgiev et al., 2009), no fue sino durante los años cincuenta en donde esta área rápidamente se desarrolló. Este progreso fue permitido en parte al descubrimiento de los factores de crecimiento necesarios, primero el ácido indol acético, y posteriormente por el aislamiento de una derivado de la adenina, la kinetina (6-furfurilaminopurina) presente en extractos de levadura autoclavados empleados como suplemento de los medios de cultivo (Gautheret, 1983). Numerosos esfuerzos en el pasado se realizaron para desarrollar formulaciones de los componentes de medios de cultivo. Uno de los intentos más exitosos en la formulación de medios de cultivos fue el desarrollado por Murashige y Skoog en 1962 (medio MS), el cual es un medio químicamente definido y se empleó para el cultivo de tejidos de tabaco. Gamborg et al., 1968, también desarrollaron una formulación de un medio de cultivo para suspensiones celulares de soya (medio B5), en las cuales se quería evitar el suplemento con leche de coco. Schenk y Hildebrandt en 1972, reportaron un medio de cultivo que soportaba el crecimiento de cultivos de callos de numerosas especies tanto de monocotiledóneas como dicotiledóneas (medio SH). La mayor diferencia entre los medios de cultivo está generalmente en el nivel total de sales empleadas, además en la cantidad y calidad de la fuente de nitrógeno empleada. Dado que la mayoría de los cultivos celulares son fotosintéticamente incompetentes, y por consiguiente su comportamiento es heterotrófico, es necesario suplir los medios con una fuente de carbono orgánica, generalmente sacarosa o glucosa. Los cultivos de células vegetales también requieren los mismos macro y micronutrientes que requiere la planta en campo, los cuales son aplicados en el medio como sales minerales; también requieren aminoácidos, vitaminas del complejo B, y reguladores de crecimiento, tales como auxinas y citoquininas (Brown, 1990).

4.4.2 Reguladores de crecimiento vegetal en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos tales como la división celular y la elongación (Machacova et al., 2008). Las citoquininas estimulan particularmente la síntesis de proteínas y participan en el control del ciclo celular (van Staden et al., 2008). Gaspar et al., en 1996, han resumido las funciones de estos reguladores de crecimiento en los cultivos *in vitro*, de donde se resalta que las auxinas ejercen un fuerte influencia sobre el crecimiento expansivo de la células, iniciación de la división, y organización de los meristemos para generar un tejido no diferenciado (callo), o un tejido diferenciado (generalmente raíces), y promueve la diferenciación vascular. Las citoquininas estimulan la división celular (junto con las auxinas), y liberan de la dormancia a las yemas axilares (laterales). La división es regulada por la acción conjunta de auxinas y citoquininas; cada una influencia diferentes fases del crecimiento celular. Las auxinas afectando la replicación del ADN, mientras las citoquininas ejercen algún control sobre los eventos que conducen a la mitosis. La naturaleza y concentración requeridas de estos reguladores de crecimiento para el establecimiento de un cultivo varían de especie a especie. Típicamente, una auxina, como el ácido indol acético (IAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o ácido naftalenacético (NAA), y citoquinas, tales como kinetina, 6-bencilamino purina (BAP), o zeatina, son requeridas solas o más comúnmente en combinación (Brown , 1990).

4.4.3 Establecimiento de cultivos de células en suspensión

El establecimiento de cultivos de células vegetales en suspensión generalmente viene precedido por el establecimiento de cultivos en callos (Godoy y Vasquez, 2006). Las suspensiones de células vegetales, en las cuales las células crecen en estado indiferenciado en un medio líquido, han sido empleadas en investigación en bioquímica y fisiología celular, crecimiento, metabolismo, biología molecular, experimentos en ingeniería genética, o para la producción de metabolitos secundarios (Robledo, 2006). Un callo es una respuesta a la herida de un explante (el fragmento de una planta o tejido empleado para iniciar el cultivo) el cual consiste de células desorganizadas y en división. Esta proliferación celular *in vitro* también se puede alcanzar sin generar una herida física, por medio del empleo de semillas germinando sobre un medio que contiene reguladores de crecimiento (Smith, 1986).

Existen dos factores que en particular gobiernan el éxito en el establecimiento de los cultivos celulares: el origen del explante y el medio de cultivo. En general tejidos como vástagos o raíces de plántulas, yemas que no estén en estado de dormancia, o extremos de vástagos, son los mejores materiales para producir un callo friable (Gamborg et al., 1976).

Para el mantenimiento de los callos, éstos son subcultivados (divididos y ubicados sobre medio fresco, usualmente cada cuatro semanas) (Smith, 1986). No se debe suponer que los callos son homogéneos y compuestos por células idénticas, además la misma etapa de subcultivo es selectiva, en la cual las células con mayor crecimiento son favorecidas, así los callos comienzan a

ser mas homogéneos con el tiempo. Cabe mencionar que los callos contienen células meristemáticas, las cuales son consideradas totipotenciales (Kreis, 2007).

Para obtener células en suspensión, algunas porciones de callo friable son transferidas al medio líquido en frascos y el medio es constantemente agitado. La agitación cumple dos funciones fundamentales: ejerce una presión moderada sobre los agregados celulares, fragmentándolos en estructuras más pequeñas y el movimiento del medio permite intercambio gaseoso entre el medio de cultivo y la fase gaseosa (Bhojwani y Razdan, 1996). Las suspensiones celulares de plantas crecen de manera similar como las células microbianas; sin embargo, las dimensiones son más grandes que las células de bacterias u hongos, dado que alcanzan 20 a 40 µm de diámetro y 100 a 200 µm de longitud. La vacuola central ocupa una gran porción del volumen de una célula. Las suspensiones además contienen aglomerados, formados por un número variable de células. Estos agregados surgen como el resultado de la falla en la separación de las células nuevas luego de la división, o de la adherencia de las células nuevas entre ellas mismas. En algunos casos estos agregados pueden contener 200 células, y pueden alcanzar 2 mm de diámetro (Godoy y Vásquez, 2006).

Durante el periodo de incubación la biomasa de las células en suspensión se incrementa debido a la división y al alargamiento celular. Este crecimiento continúa por un periodo limitado de tiempo, y se detiene debido al agotamiento de algún componente del medio o por la acumulación de metabolitos tóxicos en este medio. En el momento del subcultivo, el frasco se mantiene sin movimiento por unos pocos segundos para permitir que las colonias grandes sedimenten, y la suspensión es tomada desde la parte superior del cultivo. Una práctica regular de este procedimiento podría permitir la generación de suspensiones finas. Es importante resaltar que un prolongado mantenimiento de los cultivos en fase estacionaria podría resultar en una extensiva muerte y lisis celular (Bhojwani y Razdan, 1996).

4.4.4 Medidas del crecimiento celular

Conteo: Dado que las células vegetales en suspensión contienen generalmente colonias de varios tamaños hace difícil realizar un conteo confiable del número de células por toma de muestras directamente desde los frascos de cultivo. En tal caso, es recomendable fragmentar los agregados con ácido crómico o con pectinasas (Bhojwani y Razdan, 1996).

Peso fresco y peso seco: en un papel de filtro seco y prepesado se ubica la muestra de la suspensión, las células son lavadas con agua destilada, luego de la filtración (por ejemplo con vacío y en un embudo Büchner) se pesa de nuevo el papel (ahora con células), la diferencia da lugar al peso fresco de la muestra. En el caso de la determinación del peso seco, las muestras son secadas a 60 ºC hasta que el valor del peso no cambie (Dixon y Gonzales, 1994).

4.4.5 Cultivo de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios

Las células vegetales cultivadas son totipotenciales en principio, y por consiguiente, cualquier producto presente en la planta podrá ser también sintetizado en los cultivos bajo las condiciones apropiadas de incubación (Funk et al., 1987). La producción de estos compuestos secundarios por vía biotecnológica empleando cultivos *in vitro* de vegetales se ha incrementado, debido a las posibles fluctuaciones en el valor de estos compuestos que dependen de los efectos del clima, pestes, y enfermedades en las cosechas productoras (Verpoorte et al., 1999). Existe múltiple evidencia de que los cultivos de células vegetales son capaces de producir metabolitos secundarios; algunos trabajos se mencionan a continuación en la Tabla 2 a partir de la información publicada por Mulagabal y Tsay (2004).

Tabla 2. Metabolitos secundarios producidos a partir de cultivos de células vegetales (adaptada de Mulagabal y Tsay., 2004)

Nombre de la planta	**Metabolito activo**	**Tipo de cultivo**	**Referencia**
Anchusa officinalis	Acido rosmarinico	Suspensión	De- Eknamkul y Ellis, 1985
Capsicum annum L.	Capsaícina	Suspensión	Johnson et al., 1990
Catharanthus roseus	Catarantina	Suspensión	Zhao et al., 2001
Catharanthus roseus	Alcaloides indólicos	Suspensión	Moreno et al., 1993
Coffea arabica L.	Cafeína	Callos	Waller et al., 1983
Digitalis purpurea L.	Cardenólidos	Suspensión	Hagimori et al., 1982
Eriobotrya japonica	Triterpenos	Callos	Taniguchi et al., 2002
Hyoscyamus niger	Alcaloides de tropano	Callos	Yamada y Hashimoto, 1982
Lithospermum erythrorhizon	Derivados de shikonina	Suspensión	Fujita et al., 1981; Fukui et al., 1990
Nicotiana tabacum L.	Nicotina	Suspensión	Mantell et al., 1983
Nothapodytes foetida	Camptotecina	Callos	Thengane et al., 2003
Panax notoginseng	Ginsenósidos (saponinas)	Suspensión	Zhong y Zhu, 1995
Papaver somniferum L.	Morfina y Codeína	Suspensión	Siah y Doran, 1991
Portulaca grandifora	Flavonoides	Suspensión	Nakao et al., 1999
Stizolobium hassjoo	L- DOPA	Suspensión	Huang et al., 2002
Taxus spp.	Taxol	Suspensión	Wu et al., 2001
Thalictrum minus	Berberina	Suspension	Kobayashi et al., 1987

De acuerdo con Vanisree (2004) las principales ventajas que ofrecen los cultivos celulares sobre los sistemas convencionales de producción de plantas en campo son:

- Los compuestos deseados pueden ser producidos bajo condiciones controladas, independientes de cambios climáticos o condiciones del suelo.
- Los cultivos de células están libres de microorganismos e insectos.
- Las células de cualquier planta, tropical o alpina, pueden ser fácilmente multiplicadas para producir sus metabolitos específicos.
- El control automatizado del crecimiento celular y la racional regulación de los procesos del metabolismo pueden reducir los costos laborales y mejorar la productividad.

Sin embargo, la baja productividad de los metabolitos secundarios en cultivos en suspensión, ha sido el principal cuello de botella para su comercialización, por lo que se están implementando varias estrategias, entre las que se encuentra la optimización de los niveles de los componentes de los medios de cultivo y la elicitación (Dornenburg y Knorr, 1995). De hecho, pocos metabolitos secundarios producidos a través del cultivo de células o tejidos vegetales han alcanzado una producción comercial, este es el caso de la shikonina, el paclitaxel (Taxol®), berberina, ginsenósidos y el ácido rosmarínico (Verpoorte et al., 2000; Bourgaud et al., 2001; Collin, 2001).

4.4.5.1 Niveles de nutrientes en los medios de cultivo y la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos de células o tejidos vegetales

La síntesis y acumulación de metabolitos secundarios por cultivos de células vegetales puede ser incrementada por la manipulación de las condiciones de cultivo. La mayor parte de los metabolitos secundarios son acumulados en los ciclos de cultivo una vez la división celular ha cesado; por ende cualquier manipulación del medio de cultivo que inhiba la división celular podría esperarse incremente el grado de diferenciación celular y la capacidad de sintetizar y acumular metabolitos secundarios (Yeoman et al., 1996). Collin (2001) resume algunas modificaciones en el medio (de producción y no de acumulación de biomasa) que han dado lugar a incrementar significativamente los rendimientos, entre la que se encuentran:

- Disminución de los niveles de auxinas.
- Reducción de los niveles de los nutrientes inorgánicos, particularmente los nitratos y los fosfatos.
- Altos niveles de sacarosa.

Entre los estudios en los que se ha conseguido un mejoramiento en la producción de metabolitos secundarios, especialmente mediante el aumento de los niveles de sacarosa del medio, se encuentra la producción de antocianinas desde callos cultivados de *Daucus carota* por Narayan y Venkataraman (2002) se reportó que con niveles de sacarosa de 7.5% p/v se alcanzaba una cantidad de antocianinas del 6.5% del peso seco de las células y las células alcanzaban una biomasa de 2 g en peso seco, mientras que con el 3 % de sacarosa la cantidad de antocianinas

alcanzada fue del 3.5% del peso seco de las células, mientras el peso seco de la biomasa fue de 1.2 gramos; se debe tener en cuenta que los callos eran subcultivados cada 21 días, y en esa medida el análisis se realizaba pasado este tiempo (Narayan y Venkataraman, 2002).

En la producción de saponinas ginseng desde cultivos de células en suspensión de *Panax ginseng,* elevadas concentraciones de sacarosa de 60 g/L han dado lugar a una producción de 275 mg/L y biomasa total de 22.4 g/L al cabo de 30 días de cultivo, esto cuando se trabaja con un inóculo inicial de 6 g/L de biomasa, mientras que con una concentración de 30 g/L y con este mismo nivel de inóculo se obtiene 124.9 mg/L de saponinas y la biomasa alcanza un valor de 16.8 g/L (Akalezi et al., 1999).

4.5 ELICITACIÓN

Una aproximación para mejorar los rendimientos de un producto en cultivos de células vegetales es la alteración del metabolismo por factores externos (estrés). Un elicitor puede ser definido como una sustancia, la cual, cuando se introduce en pequeñas cantidades en un sistema vivo, inicia o mejora la biosíntesis de compuestos específicos (Namdeo, 2007). Los metabolitos secundarios inducidos por la elicitación se conocen como fitoalexinas y generalmente tienen actividad antimicrobiana (Taiz y Zeiger, 2002); sin embargo, la elicitación no sólo produce fitoalexinas, también incrementa la producción de algunos metabolitos de expresión constitutiva, por lo que se dice que los elicitores generalmente afectan todo el metabolismo secundario (Vasconsuelo y Boland, 2007).

Los procesos de elicitación para mejorar la producción de metabolitos secundarios desde cultivos de células vegetales, han sido estudiados ya desde hace cerca de 25 años. Uno de los estudios que abrió paso a esta estrategia fue realizado por Ebel et al., (1976), ya que ellos observaron la producción de una fitoalexina (gliceolina compuesto fenilpropanoide) y la sobre-expresión de la enzima fenil-alanina amonio liasa, cuando se introducía en un cultivo de células en suspensión de soya (*Glycine max*) un glucano de la pared celular del hongo patógeno *Phytophthora megasperma*.

Dicosmo y Misawa (1985) publicaron una revisión con algunos de los resultados de los procesos de elicitación con agentes bióticos hasta ese entonces. En este resumen se evidencia que los principales agentes elicitores hasta ese entonces eran micelio de hongos, esporas, polisacáridos fúngicos y quitosano, etc., dando resultados exitosos sobre la producción de morfina en cultivos de *Papaver somniferum* y shikonina en cultivos de *Lithospermum erythrorhizon*, entre otros.

Gundlach et al., en 1992, observaron que al elicitar con fragmentos de paredes celulares de levadura los cultivos de células en suspensión de *Rauvolfia canescens* y *Eschscholtzia californica,* entre otras especies, las células acumulaban de manera endógena ácido jasmónico y metil jasmonato. Ellos aplicaron metil-jasmonato de manera exógena a cultivos celulares de *E. californica* y encontraron que la acumulación de alcaloides era directamente proporcional a la cantidad de metil-jasmonato adicionada (en el rango de concentración aplicado), y la mayor

acumulación se daba en el día cinco después (120 horas) de la adición de esta sustancia; este proceso daba lugar a la acumulación de los mismos alcaloides como en el caso de la elicitación con preparaciones de pared celular de levaduras. Aplicando este agente a otras suspensiones celulares (distantes taxonómicamente) también se evidenció la acumulación en los cultivos de algunos flavonoides, antraquinonas, y varias clases de alcaloides (dependiendo de la especie). La transcripción y por ende la actividad de la enzima fenil alanina amonio liasa, la cual hace parte de la síntesis de compuestos de la ruta fenilpropanoide, fue incrementada por la aplicación exógena de metil-jasmonato, lo cual los llevó a concluir que el ácido jasmónico y el metil jasmonato son moléculas transductoras de señales en procesos de elicitación.

Este conocimiento ha permitido a múltiples investigadores imitar los efectos de la elicitación mediante la adición exógena de ácido jasmónico y metil-jasmonato, logrando así incrementar la producción de múltiples metabolitos secundarios en diferentes cultivos *in vitro* de diferentes especies vegetales. Algunos de estos esfuerzos son incluidos a en la Tabla 3.

Los jasmonatos son considerados como moléculas que modulan muchos eventos fisiológicos en plantas superiores, floración, senescencia, y son contemplados como una clase de fitohormonas. El jasmonato es también una molécula señal en la llamada resistencia sistémica inducida, respuesta a lesiones (también causada por la alimentación de insectos) y procesos de elicitación (Malarz et al., 2007). 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, fenilpropanoides, entre otros (Zhao et al*.,* 2005). (Taiz y Zeiger, 2002).

Una de las primeras publicaciones en las que se muestra el papel que podía cumplir el ácido salicílico (en el estudio se trabaja con su derivado, el ácido acetil salicílico), fue realizada por Godoy y Loyola (1997), al evidenciar que al adicionar de manera exógena esta sustancia a los medios que contenían cultivos de células en suspensión de *Catharanthus roseus* (derivadas de tumor), afectaban fuertemente la producción de metabolitos secundarios tales como alcaloides, antocianinas y furanocoumarinas. Otra estudio publicado en el mismo año fue el realizado por Mehmetoğlu y Curtis (1997), quienes también mostraron el potencial del ácido salicílico para estimular una mayor producción de sesquiterpenos (lubimina y solavetivona) en cultivos de células de *Hyoscyamus muticus*; el efecto era visto principalmente en las suspensiones y no en los cultivos de raíces, en una concentración del ácido salicílico de 40 µM. Así mismo, como en el caso de los jasmonatos, los investigadores con el ácido salicílico comenzaron a explorar su potencial para mejorar la producción de metabolitos secundarios, y algunos de esos esfuerzos también son incluidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de la elicitación con metil jasmonato y ácido salicílico o compuestos relacionados en la producción de metabolitos secundarios desde cultivos *in vitro*

Especie/ metabolito analizado	Agente empleado	Cantidad producida		Observaciones	Referencia
		Control	Con agente		
Capsicum frutescens/ Capsaicina en c.s.	SA 200 µM	29.25 ± 1.4 µg/ cultivo.	46.64 ± 2.3 µg/ cultivo	Máxima producción día 12, adición en el día de inoculación. Análisis en células. Cada cultivo tenía 40 ml.	Sudha y Ravishankar, 2003
	MJ 0.05 µM		40.19 ± 2 µg/ cultivo		
Panax ginseng L. / Saponinas ginseng en raíces.	SA 200 µM	8 mg/g de tejido seco (aprox).	30.74 mg/g	Máxima producción día 7, adición en el día de inoculación. Análisis en raíces. Decremento 25 % en biomasa producida con SA.	Ali et al., 2006
	MJ 200 µM		40.40 mg/g		
Vaccinium pahalae L. / Antocianinas en c.s.	MJ 0.5 µM	60 mg/L	180 mg/L	La máxima acumulación de antocianinas se da cuando las células son inoculadas en el día 3, y son recolectadas en el día 14. Análisis en células.	Fang et al., 1999
Artemisia annua/ Artemisinina en c.s. (Lactona sesquiterpeno)	MJ 5 mg/L (22.3 µM)	18 mg/L aprox.	76.03± mg/L 3.1	Elicitación en el día 25 del cultivo, y células recolectadas para análisis en células en el día 30.	Baldi y Dixit, 2008
	ASA 20-50 mg/L		49 mg/L aprox.		
Hypericum perforatum/ Hipericina L.	JA 250 µM	0.14 mg/g base seca, aprox.	0.318± mg/g 0.02	Este tratamiento con JA también promovió mayor producción de biomasa. Adición de JA en el día de inoculación. Biomasa total 2.7 g/L.	Walker et al., 2002
Taxus media/ Paclitaxel en c.s.	MJ 100 µM	28.2 ± 2.4 mg/L	110.3±4.9 mg/L	Adición de MJ el día de inoculación y células recolectadas para análisis en el día 14. Reducción de la producción de biomasa por MJ.	Yukumine et al., 1996
Taxus baccata/ Paclitaxel en c.s.		0.4±0.0 mg/L	48.3±2.5		
Taxus chinensis var. *mairei/* Paclitaxel en c.s.	SA 20 mg/L	0.4 mg/g peso seco de las células	1.6 mg/g peso seco	Adición con MJ día 14 del cultivo, recolección día 21. 20 mg/L de SA fue la concentración letal menos dañina y con mejor actividad. Biosíntesis no por ruta del mevalonato.	Wang et al., 2007
Lithospermum erythrorhizon/ Ácido rosmarinico en c.s.	MJ 100 µM	0.02 % del peso fresco de las células	0.22% del peso fresco de las células	Adición con MJ seis después de la inoculación. Las células fueron recolectadas luego de 72 h.	Mizukami et al., 1993

c.s.: cultivos de células en suspensión; r: raíces; ASA: ácido acetil salicílico; JA: ácido jasmónico; SA: ácido salicílico.

La señalización del ácido salicílico es esencial en sistemas con resistencia adquirida hacia patógenos, inducidos por el ataque de patógenos y conduce a la síntesis de proteínas relacionadas con patogénesis. Sin embargo, activa varios genes inducidos por elicitores fúngicos y por lesiones (Zhang et al., 2010).

4.6 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO OLEANÓLICO MEDIANTE CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN

La elicitación como estrategia para la producción de ácidos triterpenos tipo oleanano en cultivos de células en suspensión de *Tripterygium wilfordii*, fue explorada por Kutney et al., 1993. Ellos emplearon homogenizados autoclavados del hongo *Botrytis* sp., y en este caso la mayor acumulación de los triterpenos (90 %) se dio en la biomasa celular, sugiriéndose que el 10 % (liberado en el medio de cultivo) era producto más de la lisis que de la excreción. La adición de este homogenado en el medio (1% v/v), da lugar a la producción de estos triterpenos a niveles entre 20 y 50 mg/L, luego de 72 horas, comparado con el control que contenía 1- 5 mg/L de estos triterpenos (no se detectó la formación de glicósidos de éstos). Las células tenían disminución en su tasa de crecimiento y tendían a oscurecerse con la presencia del elicitor.

Se ha reportado la producción de triterpenoides pentacíclicos, como los ácidos oleanólico (AO) y ursólico (AU), en cultivos de células en suspensión de la planta *Uncaria tomentosa* (rubiaceae) (Feria et al., 2005); en este estudio se ha incrementado la concentración de sacarosa desde 20 hasta 50 g/L en el medio, alcanzándose concentraciones de estos ácido triterpénicos . AO de 553 ± 193 µg/g células secas en comparación con el control (129 ± 61 µg/g células secas) en el día 27 del cultivo, mientras la elicitación con acido jasmónico (concentración aproximada de 100 µM) en el día 5 luego de iniciado el cultivo, dio lugar a una concentración de AO de 1680 ± 39 µg/g células secas. La proporción entre AU:AO, se mantuvo en 70:30.

También ha sido reportada para cultivos en suspensión de *Scutellaria baicalensis* donde los cultivos han sido elicitados con extracto de levadura y metil jasmonato (Yoon et al., 2000), resaltando que la aplicación de MJ en una concentración de 100 µM a cultivos en suspensión a los 7 días de la inoculación, da lugar a una producción de AO en el medio de cultivo 0.75 mg/L de medio luego de 20 horas del tratamiento, mientras el control está a menos de 0.1 mg/L de medio.

En cultivos de células de suspensión de *Perilla frutescens* en donde el AO se produce junto con otros triterpenoides y antocianinas, y su producción se ve favorecida mediante la elicitación con una fracción de carbohidratos purificada a partir de extracto de levadura, un 2 %v/v de este elicitor es introducido en el medio de cultivo con 7 días de inoculación, al séptimo día del tratamiento con el elicitor el cultivo alcanza una concentración de AO a 19 mg/L (2.2 mg/ gramo seco) comparada con el control (1.3 mg/ gramo seco) (Wang et al., 2004).

La producción de AO junto con otros ácidos triterpénicos, también ha sido publicada para cultivos de células en suspensión de *Olea europaea* (Saimaru et al., 2007), estudio en el cual se

recolectaron cerca de 2 kg de células (peso fresco) cultivadas en suspensión (con 4 semanas de cultivo) y se analizaron, encontrándose producción de 6 mg de AO; en este estudio no se emplea elicitación.

También se ha establecido que el empleo de elicitores bióticos da lugar a una mejor producción de AO en cultivos de células en suspensión de *Tabernaemontana catharinensis* (apocynaceae) (Pereira et al., 2007); en este trabajo se emplearon homogenizados autoclavados de *Candida albicans, Fusarium oxysporum, Penicillium avelanium* y *Saccharomyces cerevisiae*, y dos líneas celulares de esta especie vegetal generadas en dos medios diferentes que se diferencian en la concentración de kinetina (1mg/L y 0.1mg/L) en donde se encontró que el mejor resultado para ambas líneas fue la aplicación del homogenizado de *Saccharomyces cerevisiae* a cultivos de 20 días de incubados en una concentración de 50 mg/L; la producción de AO luego de 72 horas de la elicitación fue 7.460 ± 2.632 mg/g peso seco para la de más alta concentración de kinetina y 6.764 ± 0.991mg/L para línea generada con más baja concentración de kinetina, en comparación con los controles (0.641 ± 0.172 y 0.263 ± 0.226 mg/g peso seco, respectivamente).

4.6.1 Producción de ácido oleanólico desde cultivos de *Calendula officinalis*

Grzelak y Janiszowska (2002) fueron los primeros en establecer cultivos en suspensión de *Calendula officinalis.* Del estudio se resalta que el medio de crecimiento de los callos difiere del medio líquido en la suspensión ya que las sales NH_4NO_3, KNO_3, KH_2PO_4, $MgSO_4$ y $CaCl_2$, han sido reducidas a la mitad de la concentración. Ellos estudiaron dos composiciones hormonales en las suspensiones (las composiciones que resultaron en una mayor callogénesis), las cuales eran 0.4 mg/L tanto de 2,4 D como de kinetina, y 0.1 mg/L de 2,4 D y 0.5 mg/L de 2iP [6-(γ,γ-dimetilalilamino) purina], siendo esta úlitma composición la que promovió mejores resultados en la producción de ácido oleanólico (79 µg de AO/ frasco luego de 24 días, mientras que con 2,4 D y kinetina apenas se alcanzó 15 µg por frasco, cada frasco contenía 100 ml de medio). Cabe mencionar que la cantidad de ácido oleanólico en hojas frescas de *C. officinalis* es 305.7 µg/g, de acuerdo con esta misma publicación, y la cantidad de células por frasco fue cercana a los 15 gramos en peso fresco, dando un valor de 5.3 µg/g.

Recientemente, Wiktorowska et al., (2010), han publicado sus resultados sobre la elicitación de células de *C. officinalis* en suspensión con ácido jasmónico y otros agentes (quitosano, pectina, extracto de levadura, restos de una cepa del hongo *Trichoderma viride*), viendo su efecto sobre la producción de ácido oleanólico y el crecimiento de las células, encontrando que al cabo de 72 de horas de la elicitación con ácido jasmónico, el ácido oleanólico alcanza una concentración intracelular de 0.84 mg/g de células secas (aprox. 6.98 mg/L) incrementa 9.4 veces la producción de ácido oleanólico total con respecto al control (el ácido oleanólico total representa la suma del libre más el que hace parte de saponinas, ellos no hacen distinción). La elicitación se llevó a cabo 5 días después de ser realizada la inoculación, y el análisis se realizó cada día durante cuatro días. En esta etapa de tiempo el crecimiento se ve muy poco afectado. Los otros agentes también

promovieron una mayor producción de ácido oleanólico, pero no tan significante como el efecto promotor del ácido jasmónico.

El ácido oleanólico sintetizado por las suspensiones de *Calendula officinalis* se ha probado proviene de la ruta del ácido mevalónico, principal precursor inicial de esta sustancia (Szakiel et al., 2003).

4.7 ANÁLISIS QUÍMICO PARA LA EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDO OLEANÓLICO

4.7.1 Extracción de ácido oleanólico desde cultivos *in vitro* de células vegetales

En general el proceso de extracción depende de la naturaleza del material a analizar y de los compuestos a ser aislados. Estos procesos de extracción, especialmente para materiales vegetales, siguen las etapas de secado, disminución del material, y extracción con solvente, teniendo este último la posibilidad de ser realizado por maceración, ebullición, extracción soxhlet, extracción con fluidos supercríticos, sublimación o arrastre con vapor. Las extracciones pueden ser selectivas o totales, siendo estas últimas realizadas con un solvente orgánico polar (etanol, metanol, o mezcla hidroalcohólica) y empleados en un intento de extraer tantos compuestos como sea posible, lo cual está basado en la capacidad de estos solventes de incrementar la permeabilidad celular, facilitar la extracción eficiente de grandes cantidades constituyentes polares y de baja polaridad. Generalmente este extracto es evaporado a sequedad, redisuelto en agua, y los metabolitos re – extraídos sobre la base de su coeficiente de partición por sucesivos particionamientos entre el agua y los solventes orgánicos inmiscibles de diferentes polaridades (Seidel, 2006).

Grzelak y Janiszowska (2002), para realizar el análisis químico del contenido de ácido oleanólico de células de suspensión de *Calendula officinalis,* realizaron la extracción de células frescas maceradas dos veces con metanol y puestas a ebullición por una hora. Luego, el metanol es evaporado a sequedad. La mezcla de glicósidos (ellos ya hablan de mezcla de glicósidos) es hidrolizada con la mezcla ácida de Kiliani (HCl, CH_3COOH, H_2O, 10:35:55) a 100°C por dos horas. Un volumen de agua cinco veces el hidrolizado es agregado a éste y luego es extraído cuatro veces con éter. Luego de la evaporación del éter a un mililitro, el extracto es analizado por TLC. Szakiel et al., (2003) realizaron un estudio nuevamente sobre suspensiones celulares de *C. officinalis,* en donde analizaron las células tal como la descripción anterior, pero en este caso el medio agotado del cultivo también es analizado, y se realizan cuatro extracciones con n-butanol. Este solvente posteriormente es evaporado, y luego se realiza la hidrólisis con la mezcla de Kiliani y las siguientes etapas de procesamiento siguen como con las células. Las proporciones de los solventes a células en ningún caso fueron mencionadas.

Feria et al., (2005) analizaron el contenido de los ácidos oleanólico y ursólico en suspensiones celulares de *Uncaria tomentosa* luego de ser tratadas con acido jasmónico, extracto de levadura y pectina (derivada de cítricos). Las células fueron inicialmente separadas del medio por filtración para luego ser liofilizadas. Las células liofilizadas (0.2 g) fueron suspendidas por 10 horas con 10

ml de HCl 5 mM, filtradas luego esto fue neutralizado con hidróxido de sodio y luego secadas a 60°C, y extraídas tres veces con 5 ml de cloroformo, los extractos fueron evaporados al vacío y luego disueltos en 0.5 ml de metanol, para luego ser analizados por HPLC.

Pereira et al., (2007) estudiaron la producción de triterpenos en cultivos de células en suspensión de *Tabernaemontana catharinensis*; emplearon 200 mg de material seco y pulverizado el cual era extraído durante toda la noche sucesivamente con cloroformo y metanol (5 ml de cada uno) en una habitación mantenida a temperatura ambiente. El cloroformo y el metanol fueron agrupados y evaporados a temperatura ambiente. Los extractos crudos eran resuspendidos en agua y particionados tres veces con acetato de etilo (no se hace mención de las cantidad de estos solventes empleados). Los extractos orgánicos combinados fueron evaporados al vacío y los residuos disueltos en 1 ml de metanol y analizados en HPLC.

Taniguchi et al., (2002) estudiaron la producción de triterpenos por callos de *Eriobotrya japonica.* Para el análisis tomaron 46.6 gramos (peso seco) de callos y realizaron tres extracciones con dos litros de etanol cada vez. Esta solución fue evaporada al vacío. El extracto (9 g) fue disuelto en agua (180 ml) y entonces fue particionado siete veces con 180 ml de acetato de etilo, y luego se realiza una separación en columna.

Yoon et al., (2000) para analizar el contenido de triterpenoides en el medio de cultivo de suspensiones celulares de *Scutellaria baicalensis*, tomaron 30 l de medio y realizaron tres extracciones sucesivas con igual cantidad de acetato de etilo; el extracto combinado fue evaporado al vacío, y posteriormente se separó por cromatografía en columna.

4.7.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida es una técnica de separación conducida en una fase líquida. Una muestra es separada en sus componentes constituyentes (o analitos), por su distribución entre una fase móvil (líquido fluyendo) y una fase estacionaria (sorbentes empacadas en una columna). Dos analitos son separados por su diferencia de afinidad por la fase estacionaria, reteniéndose por más tiempo el más afín a ella. Un detector en línea monitorea la concentración en el efluente de cada componente separado y como resultado se genera un cromatograma. Esta técnica de separación ofrece múltiples ventajas tales como la capacidad de realizar un análisis cuantitativo rápido y preciso, de alta sensibilidad de detección. Generalmente uno de los modos de separación más comunes es la cromatografía líquida en fase reversa, en la cual el soporte de sílica tiene unidos grupos hidrofóbicos de manera covalente, tal como grupos octadecil (C18). En la cromatografía en fase reversa los compuestos más polares se eluyen primero que los no polares, dado que estos últimos interactúan más fuertemente con los grupos C18 de la fase estacionaria. En este modo de operación generalmente las fases móviles son polares, tales como mezclas de metanol o acetonitrilo con agua. Este modo de operación se denomina en fase reversa, ya que la cromatografía por adsorción es más comúnmente realizada empleando una fase estacionaria polar (sílica o alúmina), y los metabolitos más polares viajan en la columna más lentamente que

los no polares. En la cromatografía líquida de alta resolución (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) el flujo de la fase móvil a través de la columna es bombeado a alta presión. En HPLC el tiempo entre la inyección de la muestra y el tiempo al que un pico es máximo, se le denomina tiempo de retención para el soluto que lo produce. El área del pico es proporcional a la cantidad del analito. El trabajo con fases móviles con pH bajos, suprime la ionización de analitos débilmente ácidos y conduce a un mayor tiempo de retención, cuando se emplea en fase reversa. Un detector con arreglo con fotodiodo provee un espectro UV de los picos que se eluyen de la columna, lo cual facilita la identificación de los picos (Wong, 2006).

4.7.3 Cromatografía en capa delgada

Gibbons (2006), describe algunos de los principios básicos de esta técnica de separación, los cuales serán brevemente mencionados a continuación. La separación por cromatografía en capa delgada es efectuada por la aplicación de una mezcla o extracto como una mancha o banda delgada sobre un sorbente que ha sido ubicado sobre una placa. La placa es entonces ubicada en una cámara con suficiente solvente disponible para humedecer la parte baja del borde de la placa con sorbente, pero no tanto como para humedecer la parte de la placa donde las manchas fueron aplicadas. El solvente entonces migra hacia la parte superior de la placa a través del sorbente por capilaridad, y este proceso es conocido como desarrollo. Un factor en la cuantificación de la migración de un componente sobre un sistema de solvente y sorbente particular es el valor R_f. El valor R_f es definido como se menciona en la Ecuación 1. Los datos nombrados en la ecuación, son graficados en la Figura 3.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto desde el origen}}{\text{Distancia recorrida por el solvente desde el origen}} \quad \textbf{(Ecuación. 1)}.$$

En esta tipo de cromatografía es común el empleo de sílica y alúmina (cromatografía por adsorción). Como los componentes se mueven a través del sorbente, sus tasas relativas de migración son afectadas por sus afinidades individuales por el solvente. La separación ocurre cuando un componente es mas fuertemente adsorbido por el sorbente comparado con los otros componentes. Cuando el sorbente es sílica o alúmina, los productos polares se mueven más lentamente comparados con los no polares. La adsorción tiene lugar como el resultado de la interacción entre el compuesto y los grupos asociados con el sorbente (en el caso de la sílica, la adsorción se da por la interacción por puentes de hidrogeno entre grupos hidroxilo disponibles de está y los grupos funcionales del compuesto).

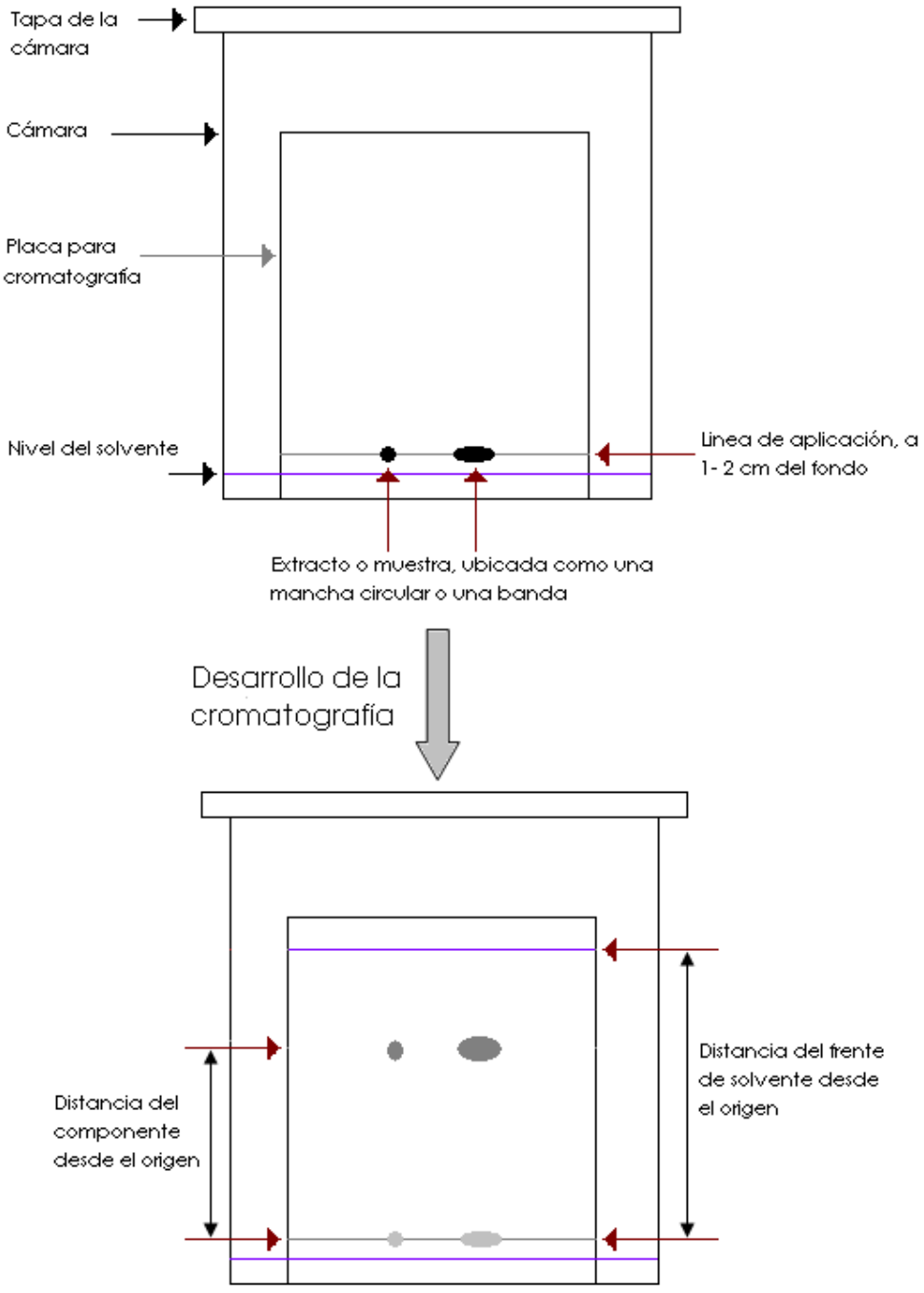


Figura 3. Desarrollo de una cromatografía en capa delgada. (Adaptada de Gibbons, 2006)

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 *Materiales*

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Bioconversiones de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Medellín.

Material vegetal

Se adquirieron semillas certificadas de *Calendula officinalis* marca Fercon, adquiridas en un almacén de cadena.

5.2 *Métodos*

5.2.1 Obtención de plántulas de *Calendula officinalis*

La generación de plántulas parte de la germinación de los embriones de manera aséptica. Para ello las semillas fueron inicialmente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 6 % durante 20 minutos, para retirar la mayor cantidad de contaminación superficial, para posteriormente rescatar los embriones, los cuales fueron desinfectados con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 2% por 5 minutos. En la cabina de flujo laminar las semillas fueron lavadas tres veces con agua destilada y estéril, secadas sobre un papel toalla estéril, y ubicadas sobre medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con todos sus componentes a la mitad de su concentración, suplementados con 30 g/L de sacarosa y solidificados con 7.5 g/L de agar, con pH ajustado a 5.8 antes del autoclavado por 15 minutos. Se ubicaron 4 semillas por frasco (los frascos contenían aproximadamente 20 ml de medio semisólido y fueron cubiertos con una lamina de papel aluminio para mantener el ambiente estéril). La germinación se realizo a temperatura ambiente, con fotoperiodo natural.

5.2.2 Establecimiento de callos de *Calendula officinalis*

Una vez las plántulas germinaron completamente desde los embriones (aproximadamente 2 semanas), sus hojas fueron retiradas del resto de la plántula en condiciones asépticas, mediante corte con bisturí en una caja de Petri previamente esterilizada y cada hoja fue cortada por la mitad, de manera que de cada hoja resultaron dos explantes, y en cada frasco se ubicaron cuatro explantes. El medio que contenían los frascos fue medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa, y las hormonas 2,4 D (ácido 2, 4 diclorofenoxiacetico) y Kinetina en concentraciones 0.4 mg/L cada uno, tal como lo reportó previamente Grzelak y Janiszowska (2002). El medio es suplementado con 7.5 g/L de agar, el pH fue ajustado a 5.8 con con HCl 1 M o NaOH 1 M antes del autoclavado (20 lbf/pulg^2, 121 ° C, por 15 minutos). El subcultivo de los callos se realizó cada dos o tres semanas de acuerdo con la cantidad de biomasa existente en cada frasco. Los frascos fueron mantenidos a temperatura ambiente, y fotoperiodo natural.

5.2.3 Establecimiento de suspensiones celulares de *Calendula officinalis*

El contenido de callo en un frasco fue empleado para inocular un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad que contiene 100 ml de medio MS modificado (con las siguientes sales a la mitad de la concentración habitual: NH_4NO_3, KNO_3, KH_2PO_4, $MgSO_4$ y $CaCl_2$), suplementado con 30 g/L de sacarosa, y las hormonas 2iP [6-(γ,γ- dimetilalilamino) purina] y 2,4 D en 0.5mg/L y 0.1mg/L respectivamente, tal como lo describió Grzelak y Janiszowska (2002). El pH fue ajustado a 5.8 con HCl 1 M o NaOH 1 M antes del autoclavado (20 lbf/pulg^2, 121 ° C, por 15 minutos). Los frascos fueron ubicados en un equipo tipo shaker rotatorio a 110 rpm, con temperatura controlada a 25 °C, fotoperiodo natural.

Para el mantenimiento de las suspensiones, se realizó subcultivo de éstas cada 8 a 10 días, dependiendo de la cantidad de biomasa que contenía cada Erlenmeyer. En el caso que las suspensiones estuviesen diluidas se les permitía sedimentar y se retiraba todo el medio, y se completaba a 100 ml con medio fresco. Si estaban concentradas en biomasa las suspensiones, se les permitía sedimentar a las células y aglomerados y su contenido eran repartidos en dos o tres frascos con medio fresco. Para el mantenimiento de suspensiones finas, durante algunos subcultivos, no se retiraba el medio, se agitaba el frasco y se le permitía sedimentar por unos pocos segundos para lograr que los aglomerados pequeños y células individuales aún permanezcan suspendidos, mientras que los aglomerados grandes no, y el sobrenadante era transferido a un frasco que contenía 75 ml de medio fresco, hasta completar 100 ml.

5.2.4 Determinación de las curvas de crecimiento de *Calendula officinalis*

Para la determinación el crecimiento de la biomasa celular se empleo el método del peso seco, en el cual se empleó un sistema de filtración al vacío, con un filtro de papel Whatman No. 1 ubicado en el interior de un embudo Büchner, las células fueron lavadas con agua destilada para retirar el medio residual. Para la evaluación del crecimiento celular se empleo el método de eliminación (Kim, et al., 1991). Este método consiste en inocular un número de frascos igual al número de muestras a analizar durante la curva de crecimiento celular, de manera que cada frasco es eliminado del experimento en el momento de análisis, esto con el fin de evitar el muestreo sobre un mismo frasco, procedimiento que pone en riesgo de contaminación microbiana al cultivo. Sin embargo, para evitar la heterogeneidad en el inóculo a emplear, es necesario que el contenido de células de varios frascos sea mezclado en uno.

El contenido de 4 a 6 frascos de 250 ml con 100 ml de suspensiones celulares de 8 días de subcultivadas, fueron mezcladas en un frasco de 500 ml previamente esterilizado junto con un agitador magnético y agitados en una plancha a 150 rpm, esto con el fin de asegurar una buena homogeneidad del inóculo. Es importante aclarar que las suspensiones celulares empleadas como inóculo fueron previamente inspeccionadas para detectar posible contaminación microbiana en medio PDA (Potato Dextrose Agar: Agar con papa - glucosa), en algunas ocasiones enriquecido con extracto de levadura para amplificar su espectro de detección. La suspensión contenida en este

frasco fue empleada entonces como inóculo, para lo cual se tomo 5 ml de está con una pipeta adaptada para este fin y se introducían de manera aséptica en los frascos de 100 ml conteniendo 20 ml de medio fresco. Los frascos fueron ubicados en un equipo tipo shaker rotatorio a 110 rpm, y con temperatura controlada a 25°C, con fotoperiodo natural. Fueron tomadas frascos por triplicado cada 2 o 3 dias, de manera aleatoria. Los frascos inoculados y tapados, fueron numerados y mediante la generación de números aleatorios fueron organizados en orden ascendente, de manera que en esta nueva organización los frascos serían retirados en este orden.

Para determinar la velocidad específica de crecimiento, se realiza el cálculo en la fase exponencial del cultivo. Para ello se emplea la Ecuación 2. La cual está basada sobre la velocidad a la cual incrementa la concentración de biomasa en un sistema cerrado (cultivo en batch).

$$\frac{dx}{dt} = \mu * x \quad \rightarrow \quad \frac{dx}{x} = \mu * dt \quad \rightarrow \quad \int_{x_0}^{x_f} \frac{dx}{x} = \int_{0}^{t} \mu * dt \,,$$

$\ln(x_f) - \ln(x_0) = \mu * t$, reordenando,

$$\ln(x_f) = \mu * t + \ln(x_0) \quad \textbf{(Ecuación 2.)}$$

Para estimar el tiempo de duplicación se empleó la Ecuación 3, el cual corresponde al tiempo en el que una determinada cantidad de biomasa se duplica en su valor, durante la fase de crecimiento exponencial.

Tiempo de duplicación:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \textbf{(Ecuación 3.)}$$

Por lo tanto, es posible determinar la velocidad específica de crecimiento durante la fase exponencial del cultivo, realizando una regresión lineal para los puntos considerados como parte de la fase de crecimiento exponencial.

5.2.5 Elicitación de suspensiones celulares de *Calendula officinalis*

Para la elicitación de las suspensiones similares se siguió un procedimiento similar al de la curva de crecimiento celular, incluyendo la forma en la que se determino la biomasa celular. Para ello el contenido de células de varios frascos fue mezclado en un Erlenmeyer previamente esterilizado junto con un agitador magnético en condiciones asépticas, y esta suspensión fue empleada como inóculo para varios Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml de medio fresco previamente esterilizado. Una vez realizada la inoculación con células, se procedió a adicionar la solución etanólica de acido

salicílico o de metil jasmonato, la cual era previamente microfiltrada (filtro de 0,22 µm) y adicionada en condiciones asépticas a las suspensiones, de manera que la estas tuvieran como concentración final las concentraciones mencionadas en la Tabla 4. Durante el transcurso de la investigación no se realizó estudio de interacción entre el metil jasmonato y el ácido salicílico, debido a que se quería primero estudiar su posible efecto elicitor sobre la producción de ácido oleanólico por separado. En un primer ensayo se estudió el efecto de los elicitores sobre la producción de biomasa, y para este se realizó el experimento con cuatro replicas por tratamiento. Las soluciones madre tanto de ácido salicílico como de metil jasmonato tenían la misma concentración la cual era igual a 30 mM. De estas soluciones se prepararon dos soluciones adicionales una de 3 mM y la otra de 300 µM. Esto con el fin de adicionar siempre la misma cantidad de solución del agente elicitor, a excepción del caso de la concentración de 1000 µM.

Tabla 4. Concentraciones y cantidades empleadas de agente elicitor en el primer experimento de elicitación (metil jasmonato o ácido salícilico)

Concentración final en el medio de cultivo (µM)	Cantidad de agente empleada (µl)
0	0
1	83
10	83
100	83
200[a]	167
1000[b]	833

a: Tratamiento con metil jasmonato y no con acido salicílico. b: Ensayo realizado con acido salicílico y no con metil jasmonato .

Es importante aclarar que los tratamientos fueron asignados a los frascos de manera aleatoria, previa numeración de los frascos, y generación de números aleatorios asignados, se organizaron en orden ascendente, y se comenzó la asignación de tratamientos también en orden ascendente de concentración.

En estos ensayos, también se quiso determinar el efecto de la elicitación sobre la producción de biomasa luego de doce días de haber comenzado el cultivo. Para ello en el de ensayo con metil jasmonato se introdujo a dos frascos con doce días de cultivo, para que quedase en una concentración final de 10 µM. En el ensayo con ácido salicílico, este también se adicionó a dos frascos en el día doce del cultivo en concentraciones finales de 10 µM y 100 µM.

Se debe mencionar que las condiciones de incubación de los cultivos fueron iguales a las de las curvas de crecimiento, y el medio preparado en las mismas condiciones. En todos los casos las células fueron analizadas luego de quince días de cultivo. Con un agitador magnético pequeño, de

los frascos con 25 ml de suspensión fueron tomados de 5 ml de muestra para realizar el análisis del peso seco de la biomasa.

Luego de este ensayo, se decidió establecer un inóculo más concentrado para comenzar el experimento, y para ello se realizó un ensayo para determinar en las nuevas condiciones cuanta biomasa y en que tiempo se podía obtener. Para ello el volumen de trabajo fue de 20 ml en un frasco tipo Erlenmeyer de 100 ml. Se obtuvo un inóculo mas concentrado mediante un mayor reposo del sistema y eliminación del medio, y se utilizó un volumen de inóculo igual a 5 ml. De acuerdo con los buenos resultados de este experimento se decidió mantener esta proporción para continuar con los ensayos de elicitación.

Para el segundo ensayo de elicitación en el cual se realizaría los análisis químicos para la cuantificación de ácido oleanólico, se trabajó con un volumen de trabajo de 20 ml en un Erlenmeyer de 100 ml (no en 25 ml como en los primeros ensayos), tal como se describió anteriormente. En este caso el metil jasmonato y el ácido salicílico fueron adicionados posteriormente a la inoculación de los frascos, de manera aséptica y esterilizados por microfiltración como se describió anteriormente. Ya que se evidenció que la adición de los agentes elicitores afectaba fuertemente la producción de biomasa, se decidió estudiar en este caso el efecto de la elicitación sobre la producción de biomasa y ácido oleanólico, en dos tiempos distintos, en el día del inicio del cultivo, y diez después del inicio de este, ya que en este último caso, se alcanzaría una mayor biomasa antes de la elicitación. La asignación de tratamientos a los frascos de fue manera aleatoria, previa numeración de los frascos, y generación de números aleatorios asignados, se organizaron en orden ascendente, y se comenzó la asignación de tratamientos también en orden ascendente de concentración, primero los elicitados en el día del inicio del cultivo, y posteriormente los elicitados en el día diez del cultivo. Los tratamientos empleados son descritos en la Tabla 5.

Como en este experimento se quería determinar la concentración del ácido oleanólico en las células y en el medio de cultivo. Se les determinó el peso seco al contenido total de las muestras y posteriormente se recuperaba la cantidad de biomasa necesaria para realizar el análisis químico del papel de filtro. Estos experimentos tenían tres replicas por tratamiento, las cuales fueron analizadas para la determinación de la biomasa.

5.2.6 Efecto de la concentración de sacarosa sobre los cultivos celulares de *Calendula officinalis*

Para la determinación del efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios de *C. officinalis*, se siguió la metodología descrita para la elicitación en ambos casos, sin la adición de agentes elicitores. La evaluación de este efecto implicaba preparar medios diferentes con la concentración de sacarosa deseada, o preparar un único medio y luego de ajustar el pH, ajustar la concentración final de sacarosa con la forma pura de este compuesto en el caso en que no fuese 30 g/L la concentración final, y la opción que se tomó fue la última, y después de este ajuste en la concentración se procedió al autoclavado. Las

concentraciones de sacarosa estudiadas fueron 30, 45, 60 y 75 g/L, concentración final en el medio de cultivo.

Tabla 5. Concentraciones y cantidades empleadas de agente elicitor en el segundo experimento de elicitación (metil jasmonato o ácido salicílico)

Concentración final en el medio de cultivo (µM)	Cantidad de agente empleada (µl)
0	0
1[a]	67
10[a]	67
100[a]	67
1000[b]	667

a: Tratamientos con metil jasmonato y con acido salicílico, con aplicación del agente en frascos distintos, en el día del cultivo y diez días después del cultivo. b: aplicación solo en frascos con diez días de cultivo.

5.2.7 Extracción del ácido oleanólico desde suspensiones celulares de *Calendula officinalis*

De acuerdo con el análisis realizado de los documentos en los que se extrae y determina la concentración de ácido oleanólico en células y en medio de cultivo (numeral 2.7.1 del presente documento), y los materiales disponibles en el laboratorio, y preensayos realizado, se determino seguir los procedimientos descritos en las Figuras 4 y 5.

Sin embargo, cabe aclarar que para el análisis químico tanto de las células como del medio de cultivo fueron tomadas dos de las tres replicas para estos experimentos, seleccionadas de manera aleatoria. Esto debido al elevado número tanto de extracciones, como de análisis en el equipo de HPLC (cada muestra analizada en el equipo llevaba 30 minutos).

Figura 4. Procedimiento para extracción de ácido oleanólico desde medio de cultivo agotado de suspensiones celulares de *Calendula officinalis*

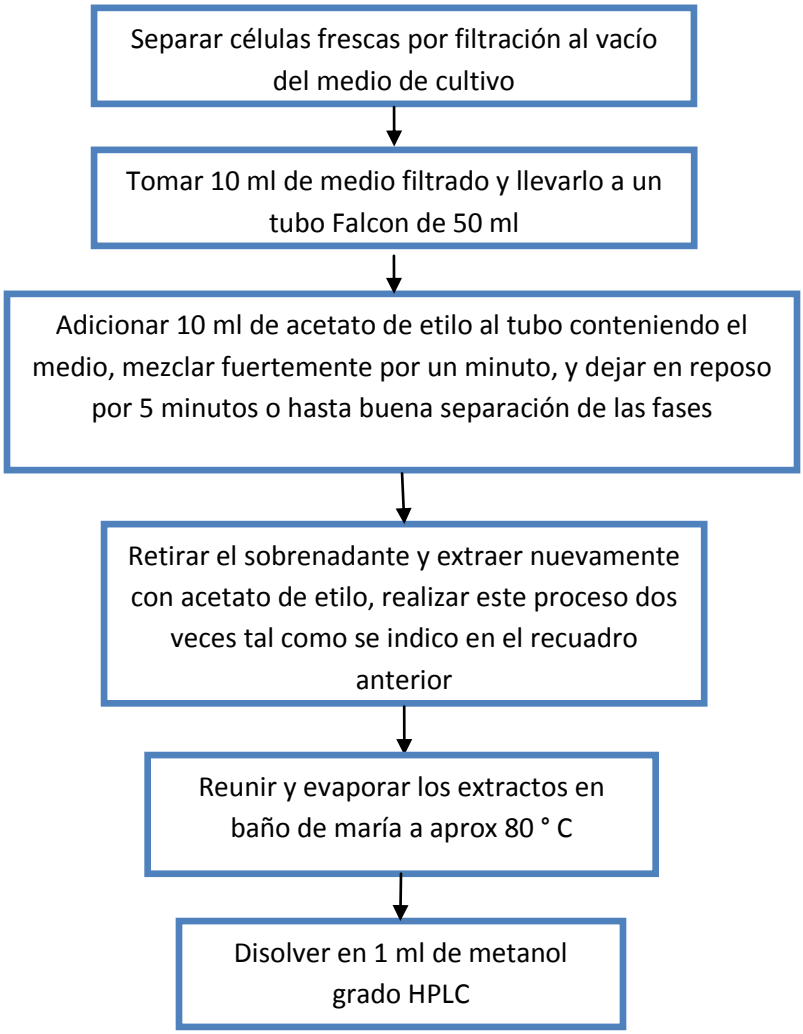
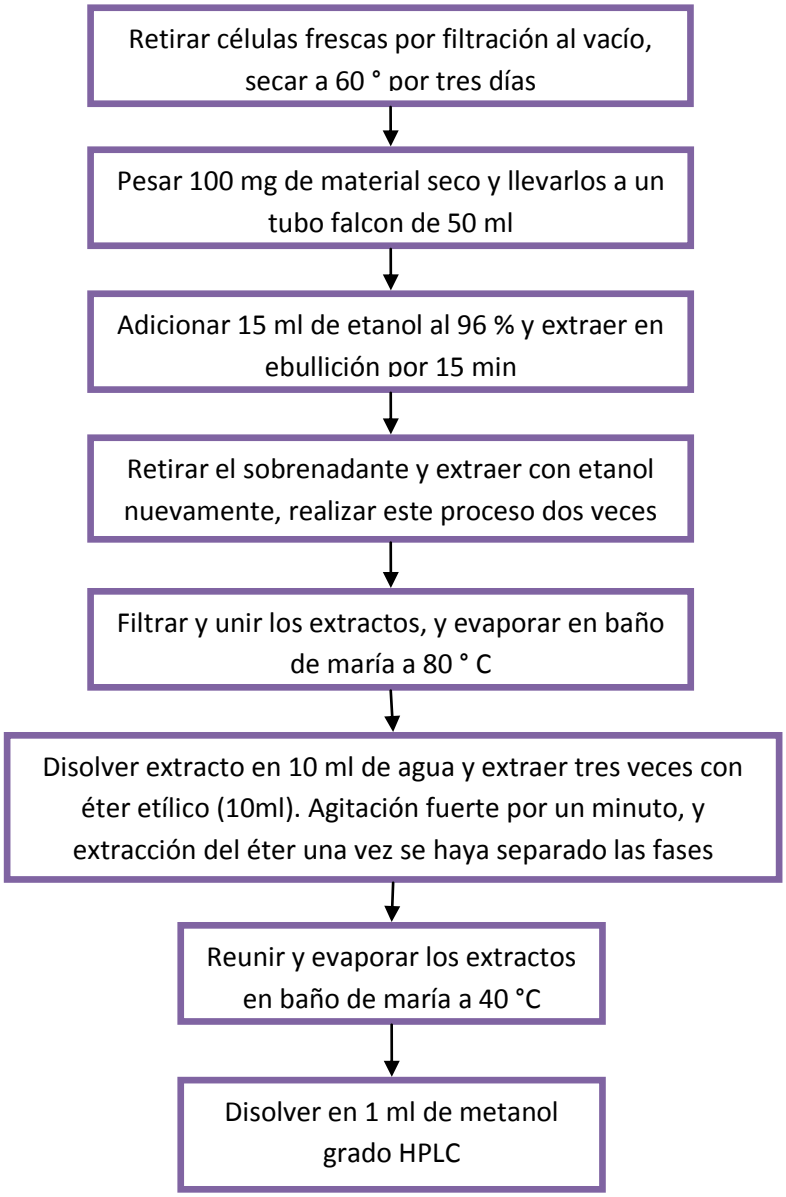


Figura 5. Procedimiento para extracción de ácido oleanólico desde las células secas de *Calendula officinalis*



5.2.8 Cuantificación del ácido oleanólico mediante cromatografía líquida de alta resolución

El método aplicado para la cuantificación del ácido oleanólico en las muestras fue la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC de sus siglas en ingles). La columna empleada como fase estacionaria fue una columna C18 (Pinnacle DB Restec, C 18, 5µm, 250 x 4.6mm), y el método empleado fue el descrito por Chen et a., (2003), el cual al realizarlo en el laboratorio fue reproducible. El equipo contaba con un detector con arreglo de fotodiodo, y la lectura para la cuantificación se realizó en una longitud de onda de 206 nm. La fase móvil empleada fue la mezcla de dos solventes A-B (A: acetonitrilo; B: solución acuosa de ácido fosfórico al 1.25 %; la proporción de A a B fue de 86:14 v/v), y la fase móvil tenía un flujo de 0.5 ml/min (en estas condiciones el tiempo de retención del ácido oleanólico en la publicación fue cercano a los 18 minutos). Este método fue elegido por que se reporto buena separación entre los compuestos con estructura similar tales como el ácido ursólico. Para el establecimiento de la curva de calibración, se prepararon soluciones estándar con concentraciones de 5,10, 15,20, 25 y 100 mg/L. El volumen de inyección a la columna siempre fue de 20 µL. Cada punto de concentración fue analizado por triplicado para realizar la curva de calibración. Sin embargo, por el elevado número de muestras a analizar, y por el carácter exploratorio de la investigación solo se analizó cada muestra una sola vez por el equipo, salvo en los casos en los que fuese difícil la cuantificación en los que se tomo doble medición. La identificación del pico se realizó de acuerdo con la comparación del tiempo de retención.

5.2.9 Detección de flavonoides por cromatografía en capa delgada

Las células de *C. officinalis* fueron analizadas para detectar la posible presencia de los flavonoides ácido caféico, ácido clorogénico, quercetina y kaempferol; en la presencia de de ácido salicílico o metil jasmonato. Para ello se generó un concentrado de células, el cual sirvió de inoculo, el cual se se preparó mezclando el contenido de seis frascos de 250 ml con 100 ml de suspensión en un frasco estéril (con 8 días de cultivo). Se permitió la sedimentación y se retiró una porción del medio del sobrenadante. Un total de seis frascos de 250 ml con 80 ml de medio MS modificado (ya descrito) fueron inoculados con 20 ml de inóculo, e incubados a 25 ºC y fotoperiodo natural. Luego de 8 días de cultivo, dos frascos fueron elicitados con metil jasmonato, dos frascos con ácido salicílico, mientras los otros dos frascos permanecían sin elicitar. Para la elicitación se contó con soluciones de metil jasmonato y ácido salicílico (30 mM cada una), y para que quedaran en una concentración final de 100 µM, fueron tomados 333 µl, los cuales fueron introducidos de manera aséptica y microfiltradas con filtros estériles de 0.22 µm. Luego de 5 días de estos tratamientos, las células fueron recolectadas y secadas a 60 ºC, durante 24 horas. Posteriormente se tomaron 200 mg de células secas, provenientes de cada frasco y fueron extraídas durante una hora a 90 ºC con 20 ml de una solución hidroalcoholica (etanol:agua equivalente a 80:20), este fue uno de los procedimientos empleados por Gao y Liu (2005), específicamente para extraer flavonoides desde cultivos de células en suspensión. Los extractos fueron separados de las células y llevados a sequedad. Finalmente, este material seco fue redisuelto en 1 ml etanol para su análisis.

Para la cromatografía en capa delgada, se emplearon placas con sílica gel como fase estacionaria, de dimensiones 20x 20 cm. Se emplearon dos fases móviles para el análisis en placas distintas. Una fase móvil que contenía acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico y agua, en proporciones 100:11:11:26 (en volumen) respectivamente, esto para la detección del ácido clorogénico. Para la detección de ácido cafeico, quercetina y kaempferol, fue empleada una fase móvil que contenía acetato de etilo y hexano en proporción 2:1 (en volumen) respectivamente. Las soluciones patrón de los componentes analizados fueron preparadas en concentraciones de 1000 ppm, y en el sistema de detección de ácido clorogénico fueron aplicados 20 puntos con capilares, tanto de la muestras patrón como de los extractos a analizar. En el segundo sistema de elución fueron aplicados 10 puntos de los patrones y 20 puntos de los extractos. Las cromatoplacas con lámparas UV a 254 nm y 366 nm.

5.2.10 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Con el fin de comprobar la presencia de ácido oleanólico en las muestras procesadas por HPLC y determinar si en los distintos tratamientos se producían compuestos relacionados con el acido oleanólico (ácidos triterpenicos), se seleccionaron algunos de los mejores tratamientos para el análisis de cromatografía liquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). Se estudio un tratamiento con metil jasmonato (100 µM, aplicado en el décimo día de cultivo), un tratamiento con ácido salicílico (10 µM, aplicado en el décimo día de cultivo), un tratamiento con una concentración de sacarosa (75 g/L), y una muestra sin tratamiento. Las muestras analizadas fueron seleccionadas de forma aleatoria desde las muestras previamente analizadas por HPLC. El estudio se realizó con Cromatógrafo líquido Agilent serie 1200 acoplado a un detector de masas tipo cuadrupolo LC/MSD VL (Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia, SIU). Algunas de las condiciones de análisis son mencionadas a continuación:

- Ionización por medio de una fuente APCI (atmospherical pressure chemical ionization) en modo positivo.
- Flujo en el LC de 1,5 ml/min- tiempo de corrida de 7 minutos- fase móvil compuesta de ACN:H2O 85:15-volumen de inyección 0,5 ul-temperatura del termostato 25 °C.
- Longitud de onda del DAD 206 nm.
- Columna: Zorbax Eclipse 4,6 mm x 150 mm y 5 micras.
- Voltaje del capilar= 3500 voltios.
- Voltaje de fragmentación= 100 voltios
- Flujo del gas de secado= 5 litros/min
- Presión del nebulizador= 60 psi
- Temperatura del gas de secado= 350 °C
- Temperatura del vaporizador= 450 °C
- Corriente corona= 4 microamperios
- Gas de secado= nitrógeno
- Para el modo SIM se usaron los iones 391,30 - 411,30 y 439,30.
- Para el modo SCAN se uso un rango de masas entre 100 m/z y 700 m/z.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Generación de callos friables de *Calendula officinalis*

Como primer paso para la obtención de explantes para la generación de callos, se obtuvieron plántulas asépticas. La primera etapa, la desinfección de las semillas, fue una modificación del estudio realizado por Grzelak y Janiszowska (2002). Con este procedimiento se obtuvo un porcentaje de germinación superior al 80% y la contaminación presentada no superó el 10 % de los frascos. Esta modificación permitió reducir este procedimiento a 1 hora, el cual estaba planteado por los investigadores mencionados para 21 horas. Pérez (2008), empleó una combinación de tratamientos que incluían hipoclorito de sodio y etanol, con un tiempo total de 5 minutos de desinfección teniendo buenos resultados; sin embargo en el estudio no es claro si el tratamiento se aplicó sobre las semillas o sobre los embriones. Cabe aclarar que no se profundizó mucho en este aspecto pues, si bien es importante, no es el objeto del presente estudio. En la Figura 6 se aprecian las semillas y plántulas germinadas de *C. officinalis* empleadas como fuente de explantes.

Figura 6. A la izquierda, semillas de *Calendula officinalis*. A la derecha, plántulas de *C. officinalis* con una semana de germinadas.

Como siguiente etapa para la generación de callos friables, se incubaron explantes de hoja en los medios suplementados con 0.4 mg/L de 2-4 D, y 0.4 mg/L de kinetina, combinación hormonal, que dio buenos resultados para la callogénesis, tal como ya había sido demostrado por Grzelak y Janiszowska (2002), y Pérez (2008). En dos semanas ya se observó respuesta de los explantes al medio y, luego de dos meses de subcultivo periódico, se obtuvieron callos friables (Figura 7). La condición de friabilidad de los callos fue evidenciada de manera cualitativa, dado que cumplían con la característica más representativa a escala macroscópica de ser poco compactos (George et al., 2008). Los callos obtenidos se pueden observar en las Figuras 7 y 8.

Durante el establecimiento de los cultivos de callos de *Calendula officinalis* se evidenció, luego de tres meses, la fenolización (conversión a color café) de los callos, tal como lo reportó (Grzelak y Janiszowska, 2002); sin embargo, se observó que reduciendo el periodo de subcultivo, de 14 o 21

días a 10 días, se evitó este fenómeno. Posiblemente, la fenolización en este caso se debía a la acumulación de metabolitos tóxicos en el medio de cultivo (compuestos fenólicos), y con el subcultivo frecuente los callos no fueron expuestos a este estrés oxidativo, tal como lo mencionan Bhojwani y Razdan (1996), sin embargo, mayor experimentación es requerida para corroborar este fenómeno. Al cabo de varios subcultivos más, se mantuvo un buen crecimiento de los callos durante los siguientes meses, aunque la tasa de crecimiento en estas condiciones no fue determinada. Luego de 8 meses de subcultivo, los callos disminuyeron su capacidad de crecimiento.

Figura 7. A la izquierda, callos de *Calendula officinalis* formados luego de 20 días de su inducción. A la derecha, callos friables de *C. officinalis* formados luego de 2 meses de su inducción.

6.2 Generación de suspensiones celulares de *C. officinalis*

Figura 8. A la izquierda, callos de *C. officinalis* formados luego de seis meses días de su inducción, a la derecha de suspensiones celulares *C. officinalis* luego de 1 año de su establecimiento.

Las suspensiones celulares de *C. officinalis* (Figura 8 a la derecha) fueron inicialmente establecidas empleando dos callos (aprox. 8 gramos en peso fresco cada uno, Figura 8 a la izquierda) en los matraces de 250 mL con 100 mL de medio, dando lugar a una alta fenolización de las suspensiones

al cabo de los 14 días de cultivo. Cuando se establecieron las suspensiones a partir de un callo, en lugar de dos, y el subcultivo se redujo a 8 días de cultivo, la fenolización de las suspensiones no fue evidenciada.

Al cabo de dos subcultivos de haber iniciado las suspensiones celulares, se apreciaba una alta disgregación de los agregados celulares, y para los siguientes subcultivos, los agregados grandes fueron separados de los más pequeños, cuidadosamente por sedimentación; de esta manera se mantuvieron las suspensiones sin grandes agregados celulares, condición necesaria para la obtención de resultados uniformes en la fase de evaluación del crecimiento y la elicitación. En la Figura 9, se pueden apreciar agregados celulares de *C. officinalis*, los cuales tienen células en división, y células que se han mantenido unidas luego de este proceso.

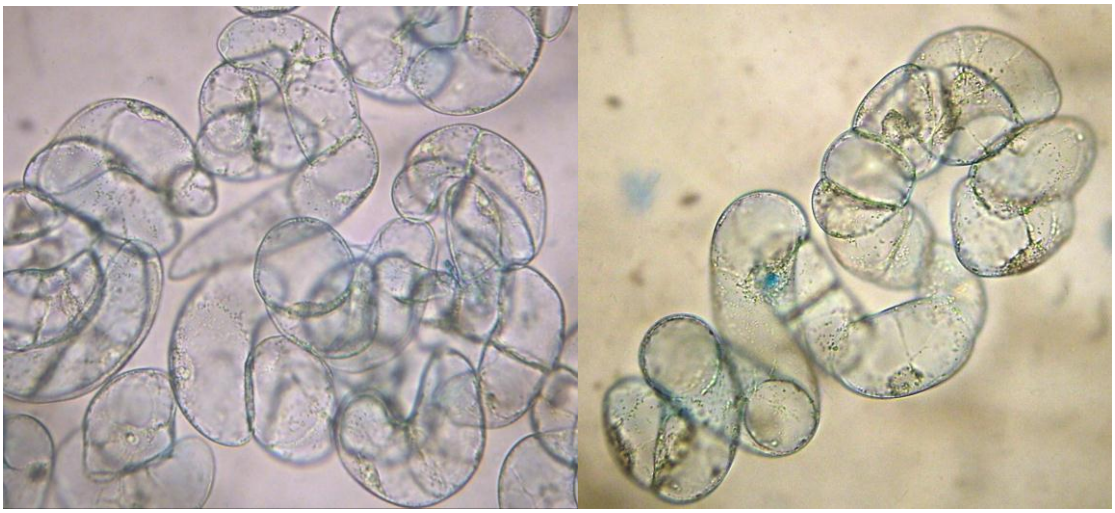


Figura 9. Células de *C. officinalis* vistas a 40 X, luego de 8 meses del establecimiento de las suspensiones celulares, luego de seis días de subcultivo.

6.3 Determinación de la tasa de crecimiento de células en suspensión de *C. officinalis*

Debido a que el protocolo de mantenimiento de las suspensiones se modificó considerablemente a lo realizado por Grzelak y Janisowka (2002), y Pérez (2008), fue necesario construir nuevamente las curvas de crecimiento características para las células en suspensiones de *Calendula officinalis*.

En la Figura 10 se aprecia que no hay una evidente fase de adaptación en este cultivo y, ya que es importante caracterizar en qué intervalo se incrementa la biomasa a una tasa exponencial para poder determinar la velocidad específica de crecimiento, es conveniente realizar una gráfica en escala logarítmica para apreciar mejor esta fase de crecimiento.

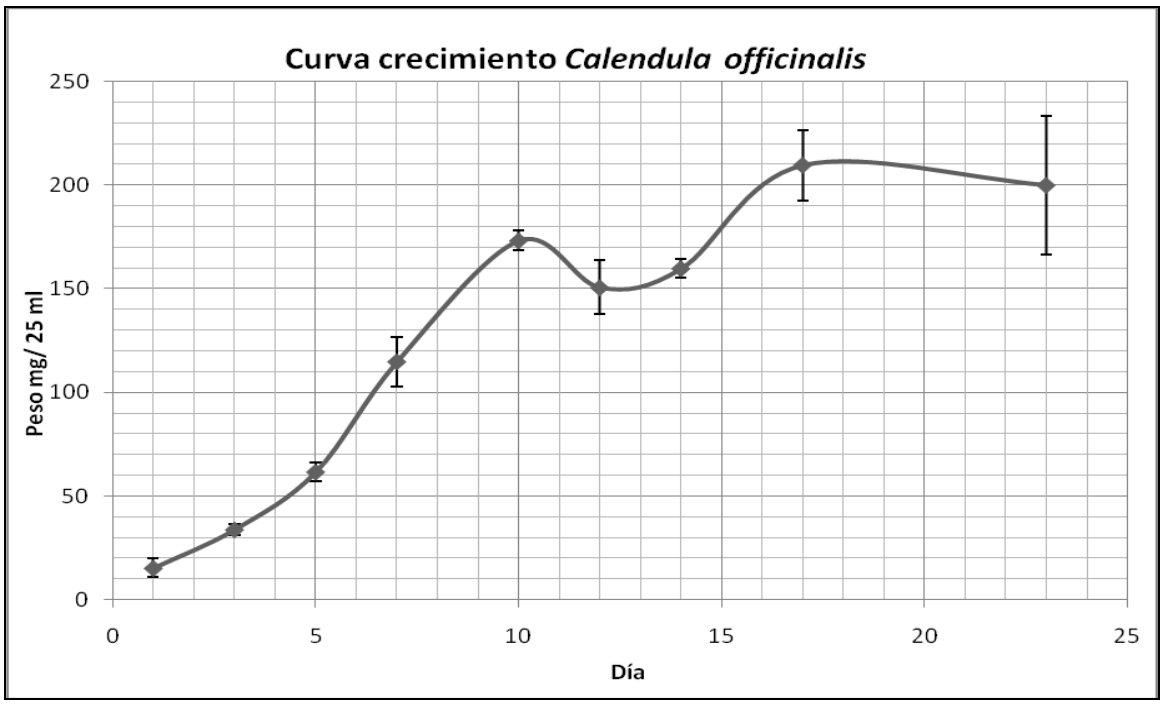


Figura 10. Curva de crecimiento de *Calendula officinalis*, en cultivos luego de dos meses de establecidos.

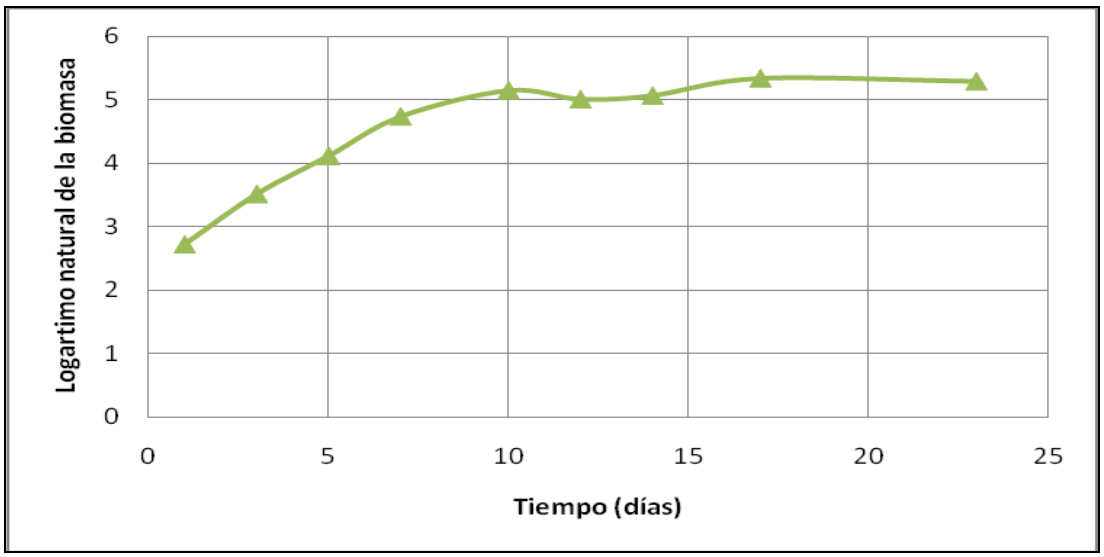


Figura 11. Logaritmo natural de la biomasa, para determinar los días que hacen parte de la fase de crecimiento exponencial.

Observando la Figura 11 es posible identificar los días que hacen parte de la fase de crecimiento exponencial, los cuales van desde el día 1 hasta el día 10 del cultivo, intervalo de días en el que se mantiene una relación lineal entre el logartimo de la cantidad de biomasa y el tiempo.

En este caso la velocidad específica de crecimiento, calculada (Ecuación 2) entre los días 1 y 10, con mediciones en los días 1, 3, 5, 7 y10, los cuales corresponden a la fase de crecimiento exponencial es: 0.274 días^{-1}; esta velocidad específica de crecimiento corresponde a un tiempo de duplicación de 2.53 días (calculada con la Ecuación 3). La cantidad de biomasa máxima alcanzada en este caso corresponde a 209.6 mg/ 25 mL de medio, lo cual es equivalente a 8.32 g/L de células secas. Durante el establecimiento de esta curva de crecimiento ocurrió una falla eléctrica, razón por la cual posiblemente se presenta la tendencia vista en la Figura 10. Esta curva fue establecida a los dos meses de establecer el cultivo en suspensión. Las barras indican la desviación estándar de la media del punto medido.

En la Figura 12, se observa la curva de crecimiento que fue realizada luego de seis meses de establecer las suspensiones celulares. Aunque parece que hay una etapa de adaptación durante los primeros días de cultivo observando esta figura, al realizar el gráfico empleando el logaritmo natural de la biomasa (Figura 13), se evidencia que los primeros días también hacen parte de la fase de crecimiento exponencial.

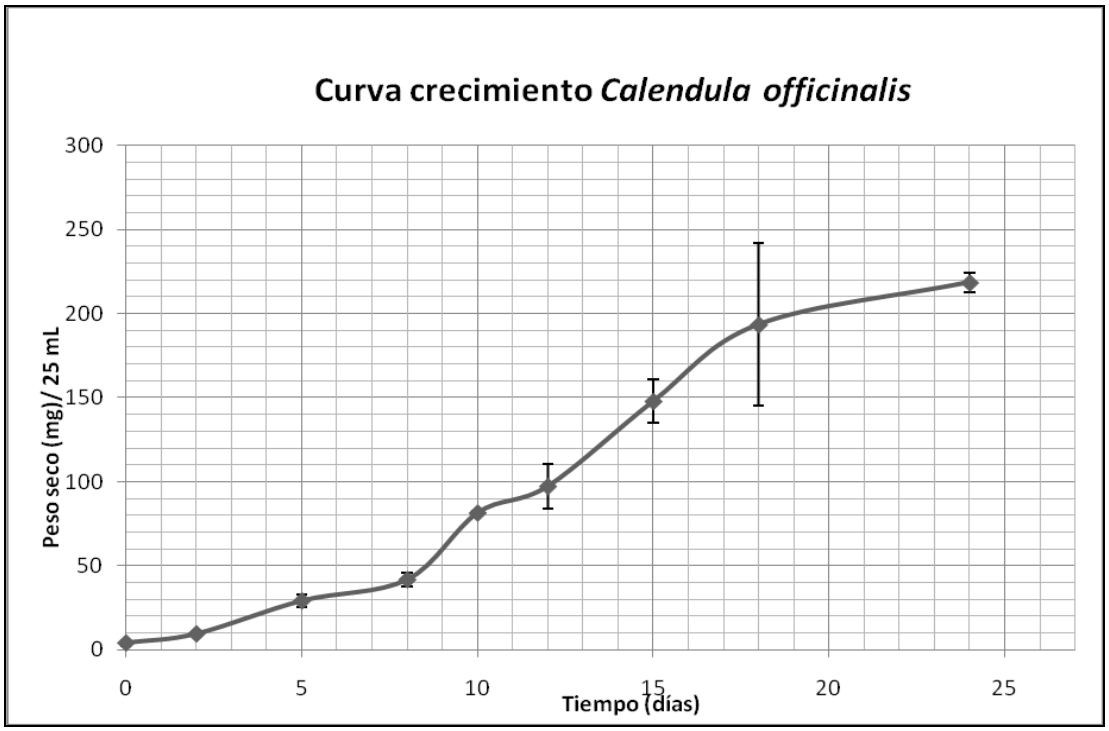


Figura 12. Curva de crecimiento de *Calendula officialis*, en cultivos luego de seis meses de establecidos.

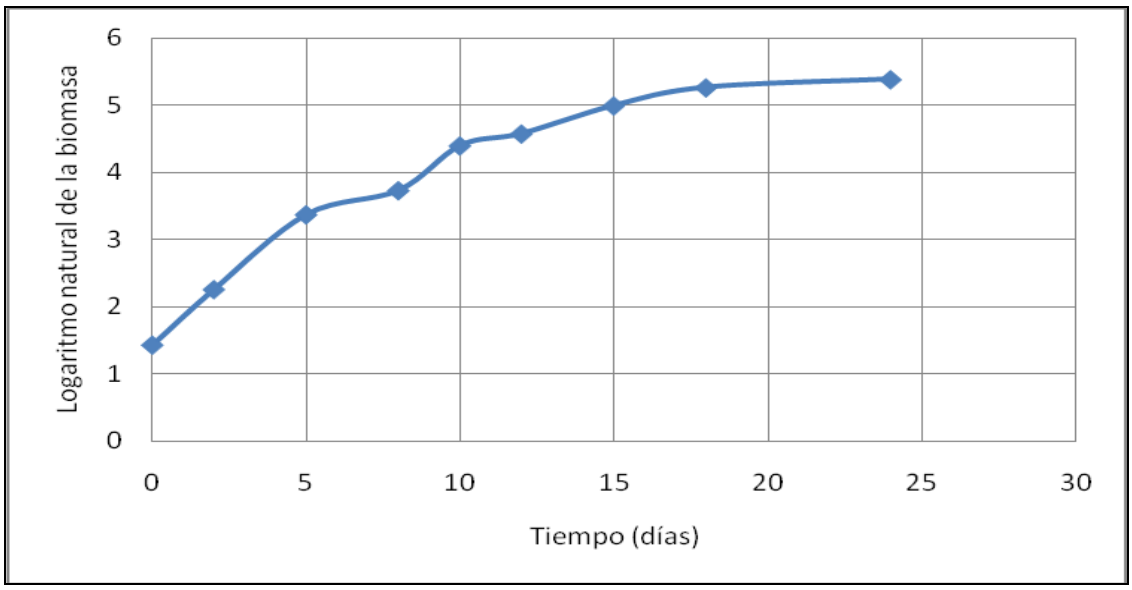


Figura 13. Logaritmo natural de la biomasa, para determinar los días que hacen parte de la fase de crecimiento exponencial.

De acuerdo con la Figura 13, se aprecia una tendencia lineal entre las variables entre el día inicial del cultivo y el día 12. De esta manera entonces se procedió a determinar los coeficientes de la regresión lineal. Relacionando las dos variables mediante una regresión lineal, se encontró que el valor de la pendiente es 0.261 día^{-1}, valor que corresponde a la velocidad específica de crecimiento, cuyo intervalo de confianza al 95 % corresponde a (0.228 día^{-1} mínimo, y 0.296 día^{-1} máximo). En este caso correspondiendo a un tiempo de duplicación igual a 2.65 días. El nivel de biomasa máximo alcanzado fue de 218.53 mg/ cada 25 mL, equivalente a 8.74 g/L.

Comparando los resultados de las velocidades específicas de crecimiento para las suspensiones de 2 y 6 meses de establecidas, se encuentra que no son estadísticamente diferentes, pues los valores determinados para cada velocidad, están dentro del intervalo de confianza al 95 % de la otra, y además los máximos niveles alcanzados de la biomasa son similares. Esto, nuevamente contrasta con los resultados obtenidos por Pérez (2008), pues al cabo de 8 subcultivos (con un subcultivo cada 14-15 días, es aproximadamente un total de 4 meses), las células ya habían perdido la capacidad de multiplicarse, estas diferencias posiblemente pueden ser debidas a que a partir de un mismo cultivo de una planta pueden obtenerse variantes o líneas celulares con diferentes comportamientos. En la publicación de Grzelak y Janiszowska (2002), es evidente que la tasa de crecimiento no cambia sustancialmente al comparar las curvas realizadas entre los 2 y 8 meses de establecido los cultivos de células de *C. officinalis*.

Wang et al. (1999), encuentran que las células en suspensión de *Taxus chinensis* tienen una tasa específica de crecimiento igual 0.12 día^{-1} (tiempo de duplicación de 5.77 días), en medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa. Feria et al. (2005), encuentran que las células en suspensión

de *Uncaria tomentosa,* presentan una tasa especifica de crecimiento equivalente a 0.159 día^{-1} (tiempo de duplicación de 4.36 días) en medio Nitsch & Nitsch, suplementado con 20 g/L de sacarosa. Pepin et al. (1995), reportan que los cultivos de células en suspensión de *Vitis vinífera* cultivadas en medio B5 presentan una velocidad específica de crecimiento aproximadamente igual a 0.24 día^{-1} (tiempo de duplicación de 2.8 días). Comparando los resultados obtenidos en los estudios anteriormente mencionados, es evidente que las células cultivadas de *Calendula officinalis* en las condiciones estudiadas en la presente investigación, tienen una alta tasa de crecimiento, implicando un menor tiempo en su duplicación.

En cuanto a la no evidente fase de adaptación en el crecimiento celular por parte de las suspensiones de *Calendula officinalis* cultivadas en las condiciones de la investigación, cabe aclarar que durante la ejecución del experimento se contaba con células con una buena viabilidad celular ya que provenían de cultivos con una tasa de subcultivo alta (por tanto con baja acumulación de metabolitos tóxicos), y además en el desarrollo de la curva de crecimiento, se empleaban 5 mL de suspensión celular (células más medio del cultivo de procedencia) y 20 mL de medio fresco. En el estudio publicado por Wang y Zong (2002), se observa que cuando se emplea medio de cultivo acondicionado (medio en el cual ya han crecido células), como suplemento al medio fresco, las células de *Taxus chinensis* cultivadas en biorreactor comienzan su crecimiento desde el inicio del cultivo sin pasar por la fase de adaptación; así mismo la velocidad específica de crecimiento también se ve incrementada desde 0.086 día^{-1} hasta 0.125 día^{-1} (este incremento en particular cuando la proporción es 50:50, de medio fresco a medio acondicionado), siendo este efecto atribuido a factores no definidos obtenidos desde el medio acondicionado. Sakurai et al. (1997), también encuentran un efecto similar al emplear medio acondicionado, al emplear un 25 %, 50% y 75 % de medio acondicionado como medio de cultivo. Grzelak y Janiszowska (2002), realizaron experimentos para generar la curva de crecimiento de *C. officinalis* en un medio con la misma composición de nutrientes y hormonas que el empleado en la presente investigación, así como temperatura, pH y agitación, alcanzando la fase estacionaria al día 21 luego de iniciado el cultivo en condiciones de total oscuridad, y la fase estacionaria al día 25 luego de iniciado en condiciones de total iluminación; adicionalmente en ambos casos era evidente una fase de adaptación de al menos 2 días; sin embargo, es importante resaltar que estos autores en su investigación desarrollaron el experimentos inoculando células sin medio, mientras en la presente investigación se inoculó con algo de medio residual.

Cuando se realizaron las curvas de crecimiento en las condiciones mencionadas de la presente investigación, se encontró que la fase estacionaria en promedio se alcanzaba entre los días quince y veinte del cultivo. Sin embargo, en estos experimentos se empleó un inóculo que resultaba ser bastante diluido, lo cual posiblemente extendía durante más tiempo el crecimiento del cultivo, posiblemente porque se requieren más generaciones de células para que se consuma algún componente limitante del crecimiento y las células entren en fase estacionaria. Adicionalmente, era importante contar con un inóculo concentrado, pues se requería de una mayor cantidad de biomasa para realizar un análisis químico de los metabolitos en la etapa de elicitación. En la Tabla

6, se resumen los resultados de un experimento, cuyo objetivo fue determinar la cantidad de biomasa que se obtenía cuando se emplea un inóculo concentrado. Es de aclarar que el experimento fue llevado a cabo a temperatura ambiente (25 ±7 º C), teniendo el cultivo una concentración inicial de células igual a 2.19 g/L, alcanzando una biomasa máxima de 182 mg/ 20 mL, lo cual corresponde a 9.10 g/L.

Tabla 6. Crecimiento en inóculo concentrado

Día de cultivo	Biomasa (mg) en 20 mL	Biomasa seca(g/L)	Error estándar
0	43,9	2,20	0,029
5	85,5	4,27	0,016
10	164,0	8,20	0,746
15	182,0	9,10	0,241

Con el fin de realizar un análisis más detallado acerca de los niveles de biomasa máxima alcanzados en la presente investigación, y teniendo en cuenta que el medio empleado tiene la mitad de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes, y por lo tanto se pudo presentar una limitación de estos componentes, se decidió construir una fórmula empírica para la biomasa de células vegetales cultivadas en suspensión *in vitro*, para realizar una estimación del consumo de nitrógeno; esto considerando que la proporción entre los diferentes componentes de las diferentes células de especies vegetales cultivadas *in vitro* en suspensión no deben ser sustancialmente diferentes. Las formulas empíricas para dos especies vegetales cultivadas *in vitro* (al no existir más información disponible al respecto) son mencionadas a continuación:

Especie vegetal	**Formula empírica biomasa**	**Referencia**
Catharanthus roseus (cultivos de células en suspensión)	$CH_{1.57}N_{0.11}O_{0.62}$	Rho y André, 1991
Elaeis guineensis (palma de aceite, cultivos de células en suspensión)	$CH_{1.76}N_{0.10}O_{0.56}$	Gorret et al., 2004

Al promediar los subíndices que corresponde a cada elemento, en las dos fórmulas empíricas mencionadas anteriormente, se obtiene la siguiente fórmula: $CH_{1.665}N_{0.105}O_{0.59}$, así el peso molecular de la biomasa sería igual:

Peso molecular biomasa = 1*12+1.665*1+0.105*14+0.59*16=24.575 g/C-mol.

Total biomasa formada =biomasa final- biomasa inicial = 9.10-2.20= 6.9 gramos

C-moles de biomasa= 6.9 gramos de biomasa /24.575 g/C-mol = 0.2808 C moles.

Moles de nitrógeno necesarios= 0.2808C-mol*0.105 moles de N/C-mol= 0.02948 moles.

Este valor corresponde a 29.5 mmoles, y al comparar este valor con la cantidad de nitrógeno total que tiene el medio empleado (MS modificado, solo con 30 mmoles de nitrógeno por litro), se hace evidente que éste puede ser un componente el cual puede estar limitando la cantidad de biomasa máxima de las células en suspensión de *C. officinalis*, aunque no se debe descartar otro u otros nutrientes limitantes debido a la particular formulación del medio.

6.4 Efecto del Metil Jasmonato sobre el crecimiento celular

Con el fin de establecer el grado de sensibilidad que presentan las células de *C. officinalis* al metil jasmonato se realizó un primer ensayo, que permitió evidenciar que las células disminuían su crecimiento y se tornaban más oscuras a medida que incrementaba la concentración de este agente (Figura 14).

Con el fin de establecer cuantitativamente el efecto sobre el crecimiento, se decidió expresar los resultados con el conocido índice de crecimiento (Ecuación 4), la cual permite comparar de una manera más eficiente los diferentes experimentos, dado que no siempre se cuenta con la misma concentración de biomasa inicial.

$$\text{Indice de crecimiento} = \frac{\text{Biomasa final} - \text{Biomasa inicial}}{\text{Biomasa inicial}} \qquad \textbf{(Ecuación 4).}$$

Figura 14. Oscurecimiento de las suspensiones celulares de *C. officinalis* luego de 15 dias de cultivo, por efecto de las distintas concentraciones de metil jasmonato estudiadas.

La Figura 15 muestra los resultados de un experimento preliminar empleando como agente elicitor el metil jasmonato en diferentes concentraciones, en donde claramente se aprecia el efecto negativo de la concentración del metil jasmonato sobre el crecimiento celular. Incluso aplicado en una concentración de 1 µM (aplicado en el día inicial del cultivo), se reduce el índice de crecimiento a un 67.2 % del índice obtenido en con el tratamiento sin metil jasmonato.

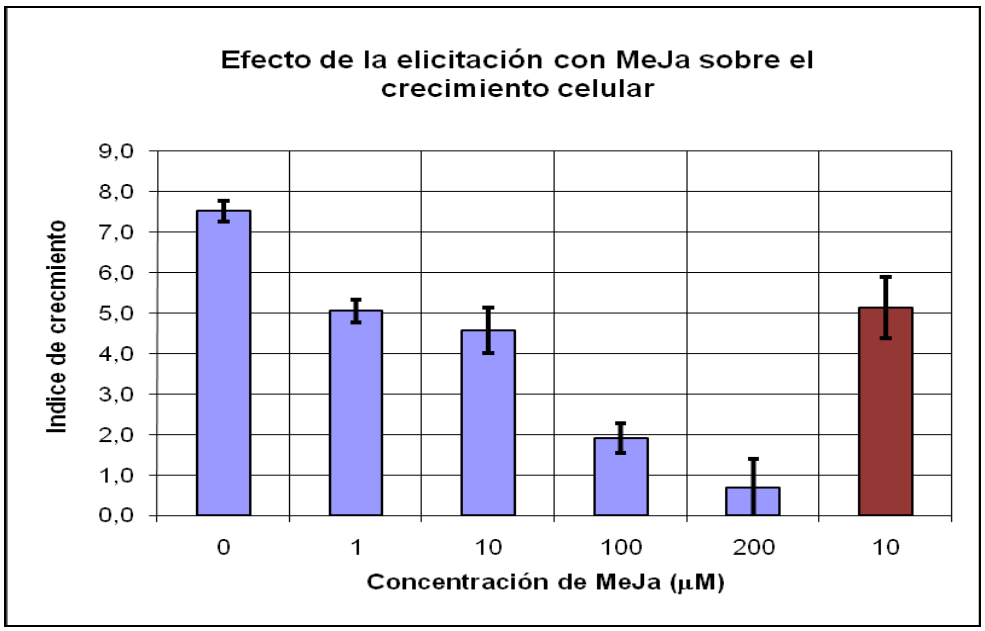


Figura 15. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de metil jasmonato (MeJa) sobre el crecimiento celular, en azul elicitación día inicial, en rojo elicitación día 10. Las barras representan el error estándar.

Cuando se aplica metil jasmonato a una concentración final de 200 µM (aplicado en el día inicial del cultivo), el tratamiento resulta ser tan letal que el índice de crecimiento comparado con el control sin adición de metil jasmonato se ve reducido a un 9.18 % de su valor. Cuando la elicitación se conduce en el día diez de iniciado el cultivo con una concentración final de metil jasmonato de 10 µM, el índice de crecimiento se reduce un 68.34 % del valor sin adición de este agente, el cual es mayor cuando se aplica el metil jasmonato en esta misma concentración pero el dia inicial del cultivo en donde el índice de crecimiento se reduce a un 60.77 %.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el segundo experimento (Figura 16), se aprecia que en este último se mantiene el efecto inhibitorio que tiene el metil jasmonato sobre el crecimiento. Por ejemplo, a una concentración de 1 µM (aplicado en el día inicial del cultivo), se reduce el índice de crecimiento a un 65.46 % del control sin elicitación, lo cual no es diferente de lo obtenido durante el primer experimento. Sin embargo, al comparar el valor de los índices de crecimiento, inclusive entre los controles del primer y segundo experimento, se aprecia que son sustancialmente diferentes (7.15 y 1.82, respectivamente), una posible explicación a este comportamiento es la diferencia en la concentración inicial de células en el cultivo, ya que en el primer experimento se empleó un inóculo diluido (1.17 g/L), mientras en el segundo experimento se empleo un inóculo más concentrado (2.55 g/L), lo cual implica que para una determinada cantidad de nutrientes en el primer caso la biomasa celular podrá alcanzar un mayor número de divisiones, dando lugar a un mayor índice de crecimiento.

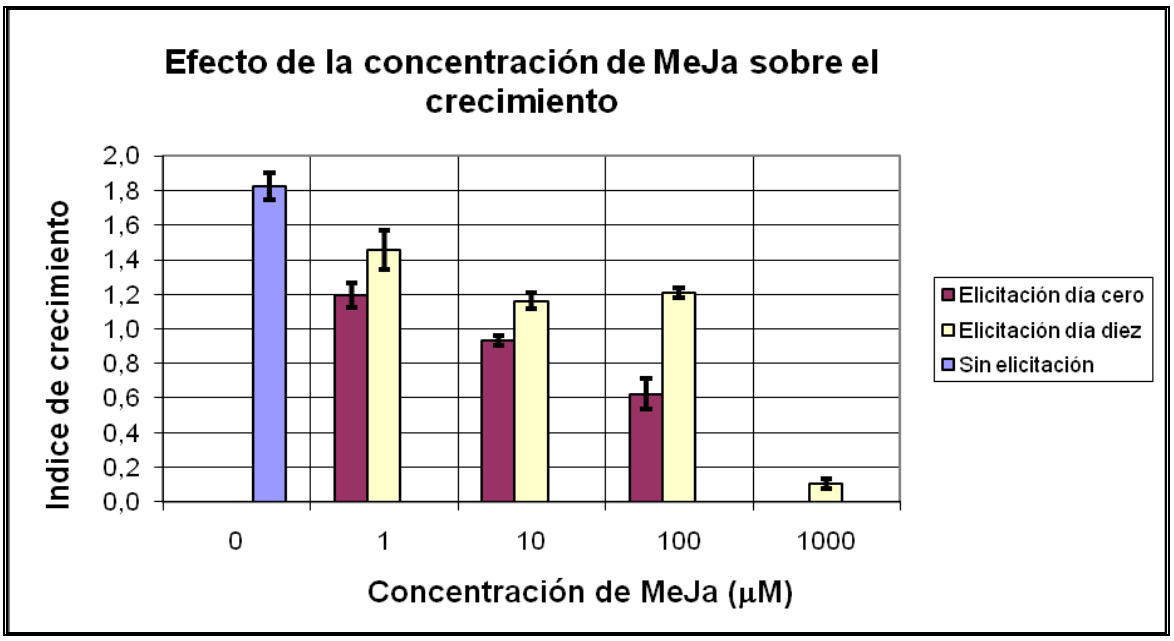


Figura 16. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de metil jasmonato (MeJa) sobre el crecimiento celular

Cuando se elicitaron las suspensiones celulares en el día décimo de iniciado el cultivo (aún en fase de crecimiento exponencial), se evidenció que en todas las concentraciones estudiadas también se presenta la inhibición en el crecimiento; al observar las barras de error en los experimentos en los que se emplean las concentraciones de 10 y 100 µM, se aprecia que no hay diferencias significativas a estos niveles; sin embargo, cuando se aplica este agente elicitor a 1000 µM, se encuentra un alto nivel de inhibición, e incluso de lisis celular ya que se espera que para el día diez de cultivo ya se haya alcanzado un incremento sustancial en la biomasa y el índice de crecimiento no sea tan bajo (se redujo a un 5.7 % del control).

La inhibición del crecimiento celular por el metil jasmonato también ha sido reportada para cultivos de células en suspensión de diferentes especies vegetales. Yukumine et al. 1996, reportaron que los cultivos de células en suspensión de *Taxus media* (un híbrido entre *T. baccata* y *T. cuspidata*), son sensibles a las diferentes concentraciones de metil jasmonato, y se aprecia una reducción del crecimiento cercana al 13 % del valor del control (tratamiento sin el agente elicitor), en concentraciones de 0.1, 1 y 10 µM, y en una concentración final de 100 µM, la reducción en el crecimiento fue aproximadamente un 32 % del valor de biomasa del control.

Thanh et al., 2005, indican que lo cultivos de células en suspensión de *Panax ginseng*, son inhibidos en su crecimiento cuando se introduce metil jasmonato en el medio de cultivo; sin embargo, la inhibición es más reducida en comparación con lo encontrado en la presente investigación, ya que a una concentración de 100 µM en el día inicial del cultivo la concentración de biomasa es el 90 % de la obtenida cuando no se aplica metil jasmonato. Sin embargo,

previamente Lu et al. (2001), reportan que los cultivos de *Panax ginseng* no son sensibles a metil jasmonato, en las concentraciones de 50, 100 y 200 µM aplicado en el día inicial del cultivo. Esto conduce a pensar que la inhibición depende de la línea celular específica.

Kang et al. (2006), reportan que el metil jasmonato también genera un decremento en el crecimiento de los cultivos de células en suspensión de *Ginkgo biloba,* particularmente cuando se emplean concentraciones de metil jasmonato de 10, 100 y 1000 µM, generando en todos los casos un nivel de biomasa cercano al 65 % del control sin adición de este agente.

Por otro lado, los cultivos de células en suspensión de *Catharanthus roseus* (Lee et al., 2004) no resultan ser afectados en su crecimiento por la adición de metil jasmonato aplicado en concentraciones finales de 10 y 100 µM cuando éste es introducido en el día inicial del cultivo, o durante la fase de crecimiento exponencial. De donde se infiere que inhibición del crecimiento celular en los cultivos de células vegetales en suspensión por parte del metil jasmonato es dependiente de la especie.

Kim et al. (2005), establecen que los mecanismos por los cuales se presenta la inhibición en el crecimiento o pérdida de viabilidad celular, cuando se elicitan cultivos de células en suspensión de *Taxus* sp. con metil jasmonato, no se deben directamente a la presencia de este agente en el medio de cultivo, sino posiblemente a los metabolitos secundarios estimulados en su producción por este agente. Además estos investigadores también establecen que la reducción en la viabilidad, no desaparece cuando se trasladan las células a un medio sin metil jasmonato, lo cual indica que existen mecanismos aún por establecer durante el proceso de elicitación que pueden afectar al crecimiento celular.

6.5 Efecto del ácido salicílico sobre el crecimiento celular

Cuando se emplea ácido salicílico como agente elicitor se encuentra que se presenta también inhibición en el crecimiento celular. Sin embargo, entre el primer y segundo experimentos se presentan grandes diferencias en el comportamiento inhibitorio. La Figura 17 muestra los resultados del primer experimento, pero, si bien es evidente el efecto inhibitorio sobre el crecimiento, se aprecia que comienza a presentarse desde la concentración 10 µM en donde se alcanza el 71.57 % del índice de crecimiento del tratamiento sin elicitor. La elicitación en el día 10 (en rojo), muestra que también se presenta un cierto grado de inhibición del crecimiento cuando se elicitan los cultivos en un día posterior al inicial; sin embargo, la biomasa se desarrolló más cuando se elicitan posteriormente al día inicial del cultivo (87.4 % del índice de crecimiento del tratamiento control), comparando los experimentos con las mismas concentraciones.

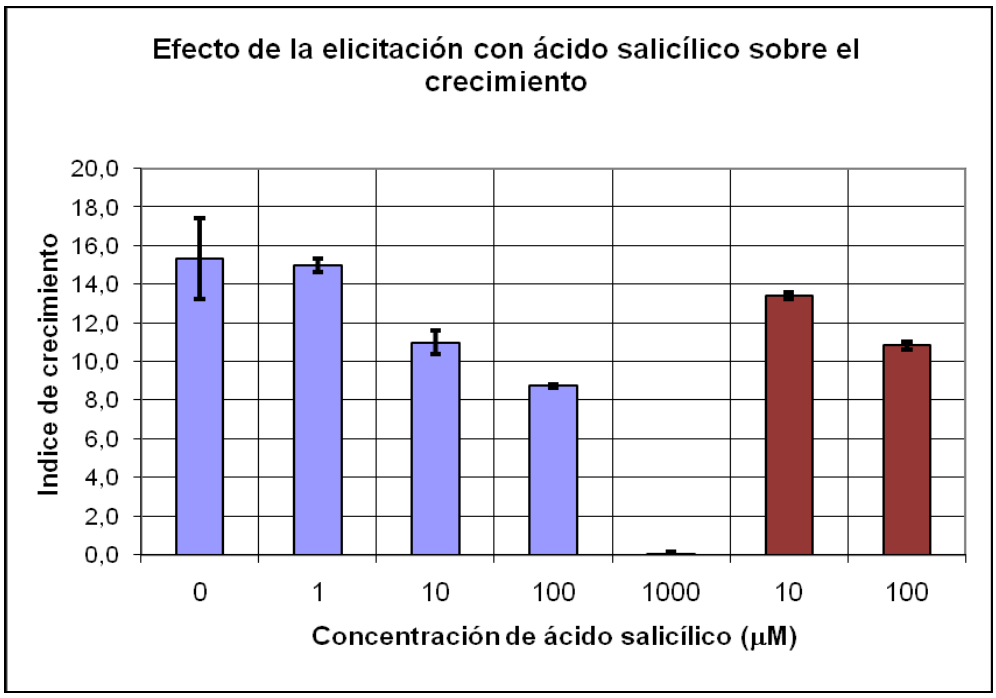


Figura 17. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de ácido salicílico sobre el crecimiento celular. En azul elicitación en el día inicial del cultivo, en rojo elicitación en el día décimo del cultivo.

Al analizar los resultados del segundo experimento, Figuras 18 y 19, experimento en el cual se realiza la elicitación con este agente pero en el día inicial del cultivo (Figura 19) y también la elicitación luego de diez días de iniciado el cultivo (Figura 18), se evidencia que el efecto inhibitorio se mantiene, sin embargo, es más intenso. Es importante aclarar que estos fueron los últimos experimentos en realizarse durante la experimentación (particularmente el de la elicitación en el día inicial), y los cultivos celulares tenían aproximadamente 10 meses de ser establecidos.

Observando la Figura 18 es evidente que, a diferencia del primer experimento, el grado de inhibición es el mismo para las concentraciones de 1, 10 y 100 µM, ya que se alcanza aproximadamente un 68% del crecimiento del ensayo sin este agente. Estos resultados difieren de los del primer experimento, ya que para la concentración de 10 µM (introducida el día diez del cultivo) fue mayor con respecto al control sin elicitor; por lo tanto, se evidencia que hubo probablemente un cambio en la sensibilidad por parte de los cultivos, al agente elicitor.

La Figura 19, muestra los resultados obtenidos luego de elicitar los cultivos con ácido salicílico, en el día inicial del cultivo, durante un segundo experimento. Este experimento se realizó posteriormente al de la elicitación del día diez. También en este experimento se evidencia la incrementada sensibilidad de estos cultivos a este agente, ya que cuando éste se introduce el día de la inoculación reduce la capacidad de crecimiento en este caso a cerca de un 13 % del índice de crecimiento obtenido cuando no se emplea este agente.

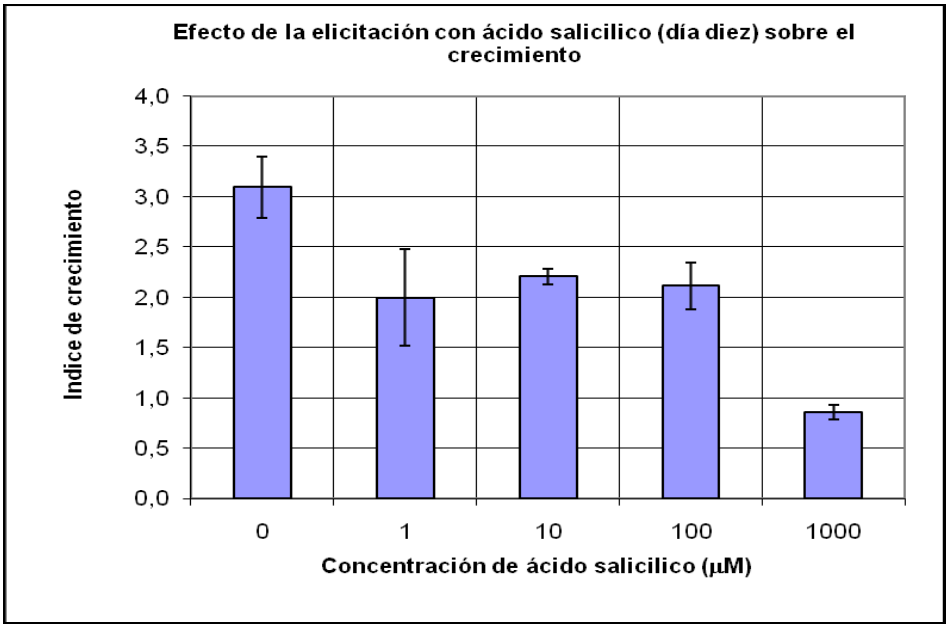


Figura 18. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de ácido salicílico sobre el crecimiento celular en el día decimo de iniciado el cultivo.

Previamente se ha reportado la sensibilidad de los cultivos celulares al ácido salicílico. En el estudio publicado por Wang et al. (2007), se encontró un efecto negativo sobre el crecimiento celular (particularmente sobre la viabilidad celular), cuando se emplea el ácido salicílico en todo el rango de concentraciones estudiadas las cuales estuvieron entre 10 mg/L y 40 mg/L (72.4 µM - 289.6 µM).

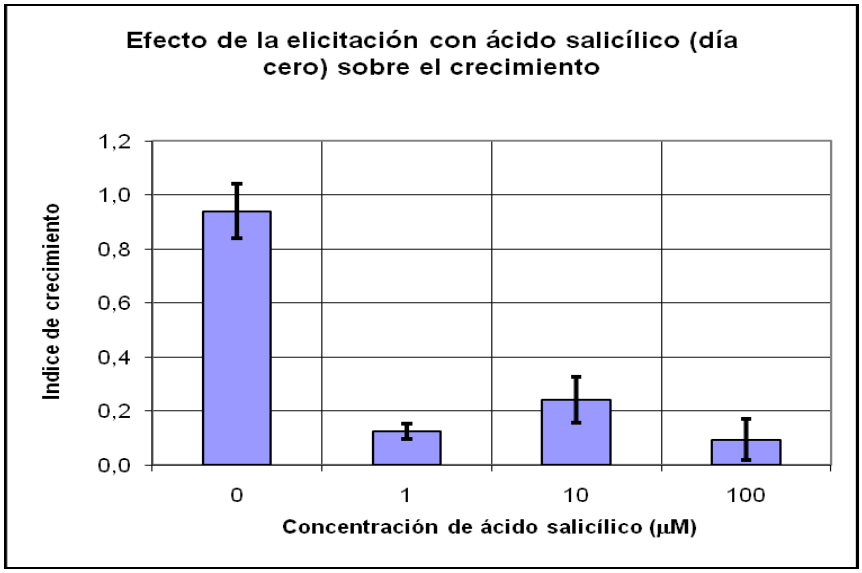


Figura 19. Efecto de la elicitación con diferentes concentraciones de ácido salicílico sobre el crecimiento celular

Así mismo, Kang et al. (2006), reportan que el ácido salicílico genera un pérdida en la capacidad de crecimiento en los cultivos de células en suspensión de *Ginkgo biloba,* particularmente cuando se emplean concentraciones de metil jasmonato de 10, 100 y 1000 µM, generando en todos los casos un nivel de biomasa cercano al 62.5 % del control sin adición de este agente, reducción del crecimiento similar al obtenido con el metil jasmonato.

Qiao et al. (2003), establecieron que al introducir ácido salicílico en el medio de cultivo de suspensiones celulares de *Taxus cuspidata,* las células reducían su viabilidad celular, y encontraron que la apoptosis era un mecanismo de este proceso; sin embargo, este proceso es más eficiente en la presencia de peróxido de hidrógeno. No es extraño que el ácido salicílico pueda dar lugar a un proceso de apoptosis, ya que esta molécula participa en la primera etapa de la reacción de las plantas contra el ataque de patógenos conocida como respuesta hipersensible, la cual da lugar a una muerte celular localizada, y también participa en el subsecuente desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (SAR por sus iníciales en ingles) (Draper, 1997). Por lo tanto, éste podría ser un posible mecanismo de afectación del crecimiento de las células cultivadas en suspensión de *Calendula officinalis* cuando se emplea ácido salicílico como agente elicitor.

Sin embargo, para el cambio de sensibilidad de los cultivos al ácido salicílico, una posible explicación puede ser la variación somática (denominada somaclonal cuando ésta es probada durante el desarrollo de la planta), el cual es un fenómeno común en el cultivo *in vitro*, debido a mutaciones o cambios epigenéticos (cambios en la expresión de los genes) en las células cultivadas. Este fenómeno se incrementa con el número de subcultivos y con la edad del cultivo, tal como se ha reportado para cultivos embriogénicos de células en suspensión de *Coffea arabica* (Etienne y Bertrand, 2003). La variabilidad debida al número de subcultivos también ha sido descrita en la producción de Taxol® (paclitaxel) en cultivos de células en suspensión de *Taxus* sp. tan sólo al cabo de 5 subcultivos (Kim y col., 2004). En este caso, se podría suponer que la variación somática hizo más sensibles a las células al ácido salicílico; sin embargo, el tipo de experimentación que se debe realizar para responder este cuestionamiento estuvo fuera del alcance de la presente investigación.

6.6 Efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento celular

La Figura 20 muestra el efecto que tiene la concentración de la sacarosa sobre el crecimiento de las células de *C. officinalis*; en este primer ensayo se evidenció que hubo un efecto inhibitorio cuando se emplearon concentraciones de sacarosa más altas que 30 g/L en el medio de cultivo, ya que a 45 g/L se obtuvo sólo 82.83 % del índice de crecimiento comparado obtenido a la concentración usual de 30 g/L, mientras que a las concentraciones de sacarosa de 60 y 75 g/L se obtiene el 56.84 y 59.83 % del índice de crecimiento respectivamente (aunque observando los barras de error muestran que en estas últimas dos concentraciones no hay diferencias apreciables).

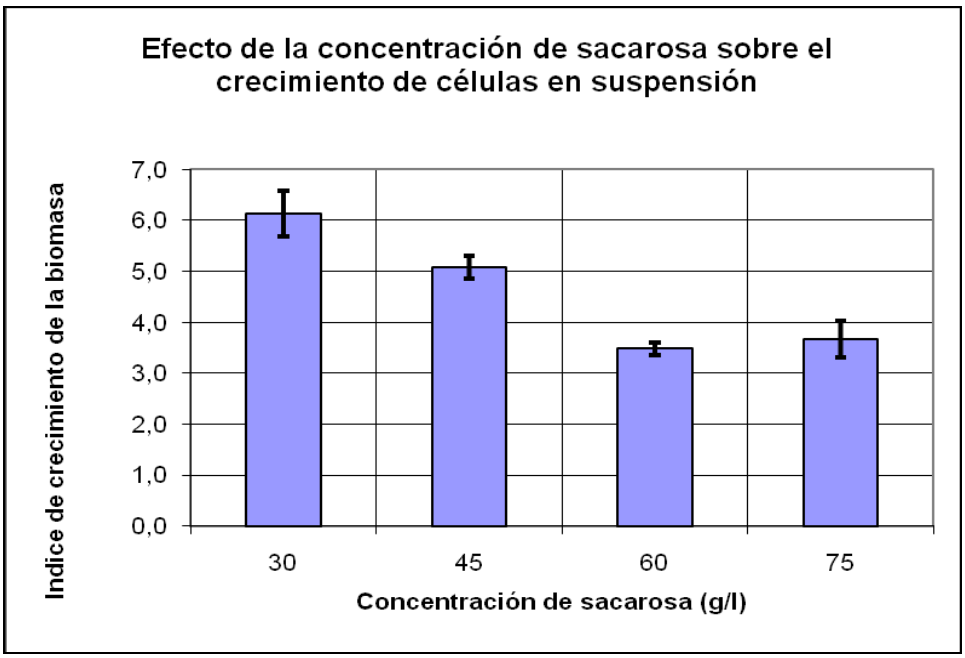


Figura 20. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento celular

Sin embargo, en un segundo experimento (Figura 21), se evidencia un comportamiento distinto, ya que todas las concentraciones de sacarosa promovieron una mayor producción de biomasa reflejándose en un mayor índice de crecimiento que el obtenido a 30 g/L. La concentración de sacarosa de 60 g/L favoreció el crecimiento celular ya que el índice fue un 151.9 % superior que el obtenido a 30 g/L.

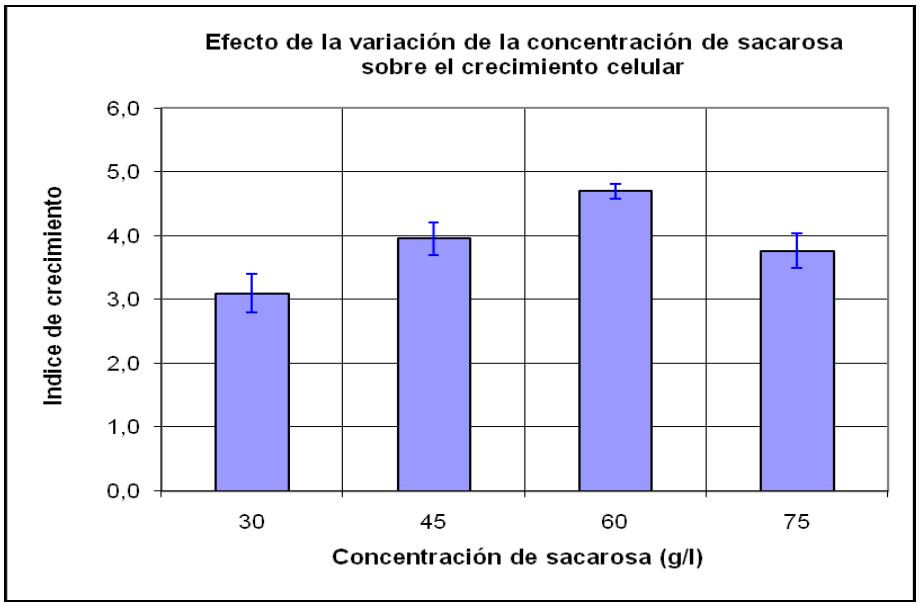


Figura 21. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento celular

Para analizar el porqué de estas diferencias es importante destacar que el primer experimento fue llevado a cabo en la presencia de un inóculo diluido, mientras en el segundo experimento el inóculo empleado era más concentrado (1.04 g/L y 1.76 g/L, respectivamente). Esto podría implicar que la sacarosa en el segundo experimento fue consumida en un menor tiempo, posiblemente debido a que había una mayor cantidad de biomasa celular que la consumiera. Es probable que si el primer experimento se hubiese realizado por un tiempo más prolongado, los resultados finales serían los mismos que los obtenidos en el experimento dos. Sin embargo, es necesario confirmar esto mediante el seguimiento del consumo de sacarosa en el tiempo a las diferentes concentraciones. Otro punto importante a tener en cuenta es que durante el desarrollo del segundo experimento, no se tuvo control sobre la temperatura (mientras en el primer experimento, se mantuvo la temperatura a 25 °C), por lo que esta fluctuaba entre 18 °C y 32 °C en el laboratorio, lo cual pudo influir en la tasa de consumo de la fuente de carbono, y por lo tanto en el crecimiento.

Feria et al. (2005), estudiaron cómo se afectaba la producción biomasa y de los ácidos oleanólico y ursólico en cultivos de *Uncaria tomentosa*; durante este estudio se determinó la curva de crecimiento con 20 g/L de sacarosa, en la cual la fase estacionaria fue alcanzada a los diez días. Sin embargo, ellos realizaron un estudio durante 27 días de cultivo con cuatro concentraciones distintas de sacarosa (20, 30, 40 y 50 g/L), encontrando que en los primeros días de cultivo se inhibía levemente el crecimiento a concentraciones más altas de sacarosa (con respecto al crecimiento a 20 g/L de sacarosa), pero en el día 27 la concentración más alta de sacarosa 50 g/L soportaba una mayor producción de biomasa celular (35.2 g/L de biomasa seca a 50 g/L de sacarosa, y 13.9 g/L de biomasa a 20 g/L).

Wang et al. (1999), encontraron que las células cultivadas de *Taxus chinensis* sobre medio MS suplementado con 20 o 30 g/L de sacarosa presentaban una fase de adaptación de 3 días, mientras las células cultivas con 40 g/L y 50 g/L presentaron una fase de adaptación de 6 y 9 días respectivamente. Sin embargo, en estas concentraciones las suspensiones alcanzaron una incrementada cantidad de biomasa en peso seco 13.9 g/L (sacarosa = 20 g/L; día noveno del cultivo), 17.0 g/L (sacarosa = 30 g/L; día 14 del cultivo), 20.8 g/L (sacarosa = 40g/L; día 20 del cultivo) y 26.3 g/L (sacarosa = 50 g/L; día 26 del cultivo).

Kim et al (1999), estudiaron el efecto de la concentración inicial de sacarosa, glucosa y fructosa, sobre el crecimiento de células cultivadas en suspensión de *Camptotheca acuminata* y encontraron que en concentraciones de 2 %, 4% y 6%, no había diferencias significativas en el crecimiento, mientras las concentraciones de 8% y 10 % resultaban inhibitorias.

Akalezi et al (1999), establecieron el efecto de la concentración de inóculo y de la concentración inicial de la sacarosa en el medio de cultivo sobre el crecimiento celular y sobre la producción de saponinas ginseng en cultivos de células en suspensión de *Panax ginseng*. En este caso los mejores resultados para el crecimiento fueron obtenidos para concentraciones celulares iniciales en el

medio de 4.5 y 6 g/L, y la sacarosa en una concentración de 60 g/L, en donde se obtuvo una concentración de biomasa celular en peso seco de 17.3 y 22.4 g/L, respectivamente, mientras que a una concentración de células inicial de 1.5 y 3 g/L, y la sacarosa en una concentración de 60 g/L se obtuvo una concentración de biomasa de 4.76 y 12.7 g/L. Sin embargo, el efecto de la concentración de la sacarosa no mostró ser muy determinante en la concentración final de la biomasa.

Al analizar los resultados obtenidos por los diferentes investigadores, es evidente que sí hay una cierta inhibición en el crecimiento cuando se emplean altas concentraciones de sacarosa, al menos durante las primeras fases del cultivo, pero al final cuando el estudio es llevado a cabo por un periodo de tiempo largo, se observa que las concentraciones más altas soportan un mayor crecimiento de las células cultivadas, y nuevamente se aprecia el efecto que tiene la concentración inicial de las células en los resultados de los experimentos.

Sierra et al. (1992) indican que es muy importante tener un estricto control durante el subcultivo, tanto en el tiempo al que es llevado a cabo como en la concentración del inóculo, y sustenta que los cambios evidenciados entre cultivo y cultivo para la producción de biomasa y producción de metabolitos secundarios son altamente dependientes de esto. De acuerdo con esto, es posible que las diferencias entre los resultados obtenidos entre experimento y experimento, no sólo puedan ser debidas a la variación somaclonal, tal como se ha mencionado anteriormente, sino posiblemente, al no tenerse durante el subcultivo un estricto control, el estado fisiológico de las células entre los experimentos pueda ser distinto, dando lugar a distintos resultados.

6.7 Efecto de la concentración de metil jasmonato sobre la producción de ácido oleanólico

Los datos de cuantificación del ácido oleanólico están organizados de acuerdo con el día de realización del experimento. Adicionalmente cada valor corresponde al promedio de dos mediciones independientes cuantificadas por cromatografía líquida de alta resolución. El gráfico de la curva de calibración para la determinación de este compuesto puede ser observada en el Anexo 1, así como algunos cromatogramas obtenidos para los diferentes tratamientos.

Para estimar la concentración de ácido oleanólico en los diferentes ensayos, se empleó la siguiente ecuación, la cual fue obtenida a través de la regresión lineal entre las áreas bajo el pico y las distintas concentraciones conocidas del patrón.

$$[\text{Ácido oleanólico, mg/L}] = 4.53806 * 10^{-5} * (\text{Unidades de área}) - 0.14886, \quad \textbf{(Ecuación 5)}$$

Sin embargo, la concentración de ácido oleanólico libre en el medio de cultivo era recalculada, pues siempre se tomaron 10 mL para las extracciones, los cuales eran reducidos a 1 mL por evaporación. Por lo tanto la concentración final obtenida debía ser dividida en 10.

En cambio, la concentración de ácido oleanólico intracelular se calculó así:

Se estimó la cantidad de ácido oleanólico en 1 mL del extracto, luego se dividió por 100 mg, ya que esa era la cantidad de biomasa seca de la cual se partió para el análisis químico.

Así finalmente, la concentración total de ácido oleanólico se obtenía mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 6.

$$\text{Concentración total}(\text{mg/L}) = \text{Concentración en el medio de cultivo (mg/L)} + \text{Concentración intracelular (mg/g)} * \text{Concentración de biomasa (g/L)}$$

El resultado obtenido para cada una de las concentraciones es reportado en la Tabla 7.

Con el empleo de metil jasmonato como agente elicitor, se observa que los contenidos intracelulares de ácido oleanólico son incrementados en todos los casos con el incremento en la concentración de dicho agente (a excepción cuando la concentración es 1000 µM); pero la concentración total se ve afectada, puesto que cuando la concentración del elicitor es más alta, más alta es la inhibición sobre el crecimiento, lo cual es particularmente evidente cuando se introduce el metil jasmonato en el día inicial del cultivo (sin * en Tabla 7). La presencia de dicha inhibición contradice lo inicialmente esperado, ya que se pretendía que al introducir el agente elicitor al comienzo del cultivo se consiguiera un efecto acumulativo, de tal forma que las células al ser expuestas un mayor tiempo (durante su crecimiento) a este agente, permitieran conseguir concentraciones más altas tanto intracelulares como extracelulares de ácido oleanólico.

Yukimune et al. (1996), estudiaron el efecto de la elicitación con metil jasmonato y ácido jasmónico en distintas concentraciones sobre la producción de Taxol® (un terpeno) en cultivos de células en suspensión de *Taxus media, T. brevifolia y T. baccata*. Se encontró que a la concentración de 100 µM se promovía la mayor producción de Taxol®, particularmente en los cultivos de *T. media* (esta es la misma concentración en la que se alcanzó la mayor actividad para las células *C. officinalis* en el presente estudio) en donde la concentración alcanzada de Taxol® fue 110.3 mg/L, la cual es 3.9 veces más alta que la obtenida sin el empleo de metil jasmonato (28.2 mg/L). En este estudio la elicitación se realizó en el día inicial del cultivo y se evidenció que la concentración de Taxol® incrementa linealmente con el tiempo de exposición al agente, dándose la máxima acumulación del metabolito en el día 14 de cultivo (y por ende de contacto de las células con el agente), mostrando por lo tanto un efecto acumulativo.

Wiktorowska et al. (2010) realizaron la elicitación de cultivos de células en suspensión de *Calendula officinalis* con ácido jasmónico; sin embargo, el rango de concentraciones estudiado fue hasta de 150 µM en el medio de cultivo. Ellos elicitaron en el día cinco, y recolectaron células luego cada día, hasta pasados cuatro días de la introducción del agente elicitor. Ellos mostraron que tratando las células con ácido jasmónico 100 µM, se daba lugar a una mayor acumulación de ácido oleanólico total intracelular pasadas 72 horas de la elicitación (0.84 mg/g de células secas),

este ácido oleanólico total es el resultado de la cuantificación del ácido oleanólico libre el cual no está enlazado químicamente y la forma de este compuesto como aglicona haciendo parte de saponinas, el cual fue determinado por extracción e hidrólisis. La concentración extracelular (liberado al medio de cultivo) de ácido oleanólico total también fue mayor a esta concentración, alcanzando concentraciones de 0.26 mg/L, luego de 72 horas. Como la concentración de células en el ensayo con 100 µM fue cercana a los 8 g/L (peso seco), es posible estimar la producción total de este compuesto en estas condiciones, la cual es aproximadamente 6.98 mg/L. Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente estudio se encuentra que el mejor tratamiento fue con el metil jasmonato a una concentración de 100 µM, introducido en el día décimo de iniciado el cultivo, en donde la producción total de ácido oleanólico fue 5.29 mg/L, lo cual es inferior al valor mencionado por el estudio anterior. Posiblemente estas diferencias pueden ser debidas a que en el presente estudio no se cuantificó la forma como glicósido, solo el ácido oleanólico libre.

Tabla 7. Contenido de ácido oleanólico en medio de cultivo, células y total, en células elicitadas con metil jasmonato (MJ)

Tratamiento	Concentración en el medio (mg/L)	Concentración en células (mg/g) células secas	Concentración total (mg/L)	Error estándar del total
Inóculo	0,05	0,03	0,11	0,10
0 µM MJ	0,02	0,10	1,43	0,22
1 µM MJ	0,06	0,13	1,40	1,05
10 µM MJ	n.d.	0,14	1,29	0,03
100 µM MJ	0,08	0,14	1,06	0,33
1 µM MJ*	0,04	0,16	2,06	0,12
10 µM MJ*	0,35	0,33	3,87	0,05
100 µM MJ*	0,30	0,47	5,29	0,33
1000 µM MJ*	0,08	0,15	0,90	0,46

n.d. = no detectado; *Corresponden a elicitación en el día diez de iniciado el cultivo.

Otra posible razón por la cual probablemente se encuentre una menor producción, puede ser que exista algún tipo de mecanismo para la degradación del ácido oleanólico. Grzelak y Janiszowska (2002) analizaron la producción de ácido oleanólico durante el crecimiento en cultivo de células en suspensión de *Calendula officinalis* (sin la presencia de algún agente elicitor), encontrando dos picos máximos en la producción de esta sustancia a nivel intracelular; uno en el día séptimo y otro luego del día 21 (comienzo de la fase estacionaria). La existencia de estos picos sugiere que en las células existe un sistema de regulación de la concentración de ácido oleanólico, mecanismo que puede actuar cuando se elicitan las células en el día inicial del cultivo. Esto también es

consecuente con lo descrito por Wiktorowska et al. (2010), dado que en su estudio la concentración del ácido oleanólico en el tercer día, luego de la elicitación, resultó ser mayor que la del cuarto día, mostrando un mecanismo para la regulación de la concentración de dicho metabolito. En el presente estudio la cuantificación se realizó ya sea 15 días o 5 días luego de la elicitación, por lo que el mecanismo de regulación de la concentración pudo intervenir por un mayor tiempo.

Otras posibles explicaciones del porqué de estas diferencias en la concentración de ácido oleanólico pueden ser diferencias en variedades de la especie, e incluso pueden ser líneas celulares con comportamientos distintos. Incluso, existen reportes en donde se muestra diferencias en la actividad entre el metil jasmonato y el ácido jasmónico, tal como lo indica Yukimune et al. (1996), quienes encontraron que el ácido jásmonico es un poco más efectivo (un 8.3%) que el metil jasmonato como agente elicitor en cultivos de células de *Taxus media* para la producción de Taxol®.

En cuanto al mejor tiempo para la introducción de metil jasmonato, Lee et al. (2004) estudiaron el efecto del tiempo de adición y concentración de este agente sobre la producción de ajmalicina (sesquiterpeno) en cultivos en suspensión de *Catharanthus roseus,* en donde encontraron que la concentración óptima es 100 µM, particularmente cuando se introduce en el día sexto de iniciado el cultivo, esto es en plena fase de crecimiento exponencial. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, dado que la mayor producción del metabolito se dio a la misma concentración del agente empleado como elicitor y cuando la elicitación se realizó en plena fase crecimiento exponencial (en nuestro caso en el día décimo de iniciado el cultivo), lo cual puede deberse a que las células en esta fase se encuentran metabólicamente muy activas.

Sin embargo, los niveles de producción de ácido oleanólico en cultivos de células vegetales en suspensión de *C. officinalis* se mantienen más bajos que los reportados por Wang et al.(2004) para cultivos de células de suspensión de *Perilla frutescens,* mediante elicitación con una fracción de carbohidratos purificada a partir de extracto de levadura, en donde la concentración de ácido oleanólico alcanza fue de 19 mg/L (2.2 mg/ gramo seco) comparada con el control (1.3 mg/ gramo seco).

6.8 Efecto de la concentración de ácido salicílico sobre la producción de ácido oleanólico

Los valores descritos para la concentración de ácido oleanólico a continuación también fueron obtenidos mediante la Ecuación 6.

Al igual que la elicitación con metil jasmonato se evidenció que el ácido salicílico también estimula la producción de ácido oleanólico en cultivos de células en suspensión de *Calendula officinalis* tal como se observa en las Tablas 8 y 9. En ambos casos se observa que la concentración más efectiva para estimular la producción de ácido oleanólico es 10 µM (aunque es comparable con el efecto obtenido con 100µM), independientemente del tiempo de adición del ácido salicílico. Sin

embargo, cuando las células son tratadas con el ácido salicílico en el día inicial del cultivo (Tabla 9), la inhibición en el crecimiento es tan fuerte que se obtienen concentraciones de ácido oleanólico menores que las obtenidas cuando la adición del agente elicitor se realiza en el día décimo de iniciado el cultivo (Tabla 8). Observando la magnitud en el error estándar en la Tabla 8, es posible evidenciar que no existen diferencias apreciables en las concentraciones finales de ácido oleanólico para los tratamientos con ácido salicílico a concentraciones 1, 10 y 100 µM. Se requiere una mayor experimentación (mayor número de réplicas) para poder determinar en este caso qué tratamiento es el mejor.

Tabla 8. Contenido de ácido oleanólico en medio de cultivo, células y total, en células elicitadas con ácido salicílico en el día decimo de cultivo (SA)

Tratamiento	Concentración en el medio (mg/L)	Concentración en células (mg/g) células secas	Concentración total (mg/L)	Error estándar en total
Inóculo	n.d.	n.d.	n.d.	----
0 µM SA	0,84	0,01	0,94	0,21
1 µM SA	0,29	0,32	2,23	0,10
10 µM SA	0,35	0,40	2,63	0,42
100 µM SA	0,06	0,48	2,49	0,15

n.d. = no detectado

Tabla 9. Contenido de ácido oleanólico en medio de cultivo, células y total, en células elicitadas con ácido salicílico en el día inicial de cultivo (SA)

Tratamiento	Concentración en el medio (mg/L)	Concentración en células (mg/g) células secas	Concentración total (mg/L)	Error estándar en total
Inóculo	0,01	n.d.	0,01	0,01
0 µM SA	0,03	n.d.	0,03	0,03
1 µM SA	n.d.	0,05	0,16	0,16
10 µM SA	0,14	0,45	1,51	0,02
100 µM SA	0,01	0,10	0,24	0,16

En la Tabla 9, se aprecia que el tratamiento con 10 µM de ácido salicílico en el día inicial del cultivo, promueve la mayor producción (1.51 mg/L). Sin embargo, este nivel de producción siempre se mantiene en un nivel inferior que cuando se elicita en el día décimo del cultivo. Este

fue el último experimento realizado con las células por lo que posiblemente ya no se tenía una buena viabilidad celular.

Wang et al. (2007), estudiaron el efecto del ácido salicílico sobre la producción de Taxol (paclitaxel, un terpeno), y encontraron que este compuesto tenía un efecto positivo en la síntesis de este anticancerígeno. En esa investigación ellos emplearon un inhibidor (mevastatina) de la ruta del ácido mevalónico (ruta productora de IPP, precursor de todos los terpenos), y se logró probar que la síntesis del taxol era incrementada por el ácido salicílico por una ruta no mediada por el ácido mevalónico. Además en esta investigación concluyeron que la producción de taxol incrementaba si la adición de este compuesto se introducía en el día 14 del cultivo y no en el día 7, empleando una concentración de 20 mg/L de ácido salicílico (144.8 µM), debido a que se había desarrollado una mayor cantidad de biomasa.

Dado que durante la ejecución de la experimentación del presente estudio no se conocía que el metil jasmonato o el ácido salicílico pudiesen estimular la producción de ácido oleanólico en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*, no se planteó la interacción entre los dos factores. Prakash y Srivastava (2008) encontraron que el ácido jasmónico y el ácido salicílico por separado eran capaces de estimular la producción de azadiractina (un terpeno) en cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica*. Adicionalmente encontraron que la introducción simultánea de estos agentes en el medio de cultivo permitió mejorar la producción de azadiractina; particularmente las concentraciones óptimas encontradas fueron 137.3 mg/L y 2.9 mg/L para el ácido salicílico y jasmónico, respectivamente. Probablemente, al igual que en el caso de la azadiractina, el ácido oleanólico se produzca en una mayor concentración cuando se empleen estos dos agentes elicitores juntos. Sin embargo, dado el efecto inhibitorio que tienen estos elicitores sobre el crecimiento celular, se considera que se deben buscar las condiciones de tiempo de adición y concentración de ambos que minimicen dichos efectos. Incluso, debido a este mismo efecto inhibitorio, es probable que la mejor forma de promover una mayor cantidad de ácido oleanólico sea a través de procesos conducidos en dos etapas; una en donde se optimice la cantidad de biomasa celular y otra en donde el agente elicitor actúe sobre una mayor cantidad de biomasa y promueva una mayor producción de metabolitos secundarios.

Shabani et al. (2010), notaron que tanto el metil jasmonato (concentraciones: 0.1, 1 y 2 mM) como el ácido salicílico (concentraciones: 0.1 y 1mM) son capaces de inducir la expresión de los genes que codifican las enzimas escualeno sintasa y β-amirin sintasa en raíces de plántulas de *Glycyrrhiza glabra*, en donde la mayor expresión en ambos casos se da luego de 24 horas de la aplicación de estos compuestos. Estas enzimas están involucradas en la síntesis del ácido oleanólico, y probablemente por esta razón estos agentes elicitores por separado promueven la producción de ácido oleanólico en cultivos de células en suspensión de *Calendula officinalis*.

6.9 Efecto de la concentración de sacarosa sobre la producción de ácido oleanólico.

Tabla 10. Contenido de ácido oleanólico en medio de cultivo, células y total, en células en medio con diferente concentración de sacarosa.

Tratamiento	Concentración en el medio (mg/L)	Concentración en células (mg/g) células secas	Concentración total (mg/L)	Error estándar en total
Inóculo	n.d.	n.d.	n.d.	----
30 g/L	0,84	0,01	0,94	0,21
45 g/L	0,48	0,01	0,60	0,31
60 g/L	0,30	0,11	1,41	0,04
75 g/L	0,19	0,23	2,13	0,31

El efecto que tiene la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre la producción de ácido oleanólico en los cultivos de *C. officinalis,* no es concluyente dado que existe un punto bajo de producción de este compuesto, cuando se emplea una concentración de sacarosa igual a 45 g/L. Sin embargo, analizando este comportamiento por separado, se encuentra que con el incremento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo se obtiene una menor liberación de ácido oleanólico en el medio y, por el contrario, la concentración intracelular de este compuesto tiende a disminuir con el incremento en la concentración de sacarosa.

En el estudio publicado por Wiktorowska et al. (2010) se indica que no hay un efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre la producción de ácido oleanólico en los cultivos de células de *C. officinalis* establecidos por ellos. El efecto que tiene la concentración de esta fuente de carbono en el medio sobre la producción de metabolitos secundarios, es variable y dependiente del tipo de cultivo establecido. Así por ejemplo, Wang et al. (1999), encontraron que al incrementar la cantidad de sacarosa en el medio, no había un resultado concluyente, pues a 20 g/L obtenían 168.3 mg/L, a 30 g/L obtenían 206.7 mg/L, a 40 g/L obtenían 147.4 mg/L y finalmente a 50 g/L obtenían 209.0 mg/L de taxano (taxuyunanina C).

Por su parte, Kim et al. (1999), determinaron el efecto que tenía la concentración de sacarosa sobre la producción del compuesto anticancerígeno camptotecina, en cultivos de células en suspensión de *Camptotheca acuminata;* ellos encontraron que una concentración del 6% de sacarosa (aprox. 60 g/L), daba lugar a una acumulación de dicho compuesto once veces más alta que la del control con 2 % de sacarosa en el medio de cultivo. Feria et al. (2005), quienes también estudiaron cómo se afectaba la producción de los ácidos oleanólico y ursólico en cultivos de *Uncaria tomentosa,* encontraron que concentraciones elevadas de sacarosa (50 g/L) incrementaban la producción de estos ácidos, aunque el análisis sólo se realizó a nivel intracelular.

Este estudio de carácter preliminar permitió establecer que las concentraciones del ácido salicílico y sacarosa sí afectan la producción de ácido oleanólico en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis.* Sin embargo, se requiere una mayor cantidad de réplicas durante la experimentación, con el fin de encontrar resultados más concluyentes, en términos de encontrar los mejores tratamientos con un alto nivel de significancia estadística.

6.10 Determinación de flavonoides en cultivos de células en suspensión

Inicialmente se planteó estudiar si el metil jasmonato o el ácido salicílico en el medio de cultivo, mostraban algún efecto en la producción de algunos metabolitos secundarios, entre ellos los flavonoides quercetina, kaempferol, ácido clorogénico y ácido cafeico, todos estos metabolitos con actividad antioxidante. Para analizar si se producían estos metabolitos en los cultivos de células en suspensión de *C. officinalis* con los diferentes tratamientos, se realizó una cromatografía en capa delgada, empleando para ello soluciones de dichos patrones. Sin embargo, ninguno de estos compuestos fue detectado en las células, en las condiciones descritas (Figura 22). El ácido clorogénico (patrón) no se arrastró en la fase móvil: acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico y agua (100:11:11:26), pero sí en la fase móvil: acetato de etilo y hexano (2:1), la cual es menos polar. En todos los ensayos se detecto que había un compuesto (o compuestos) que presenta una polaridad intermedia al kaempferol y el ácido clorogénico. Este compuesto posiblemente corresponda a otro flavonoide, dado que la extracción hidroalcohólica extrae preferiblemente este tipo de compuestos, pero una mayor caracterización es requerida para definir la naturaleza de esta sustancia.

6.11 Determinación y comprobación por HPLC –MS

Durante el análisis de cromatografía líquida de alta resolución o eficiencia, se evidenció en los cromatogramas no sólo la presencia del pico correspondiente al ácido oleanólico, sino que con los tratamientos, también había un efecto sobre los picos vecinos. Estas sustancias posiblemente corresponden a otros triterpenos, los cuales tienen polaridad similar al ácido oleanólico, y absorción en la longitud de onda estudiada.

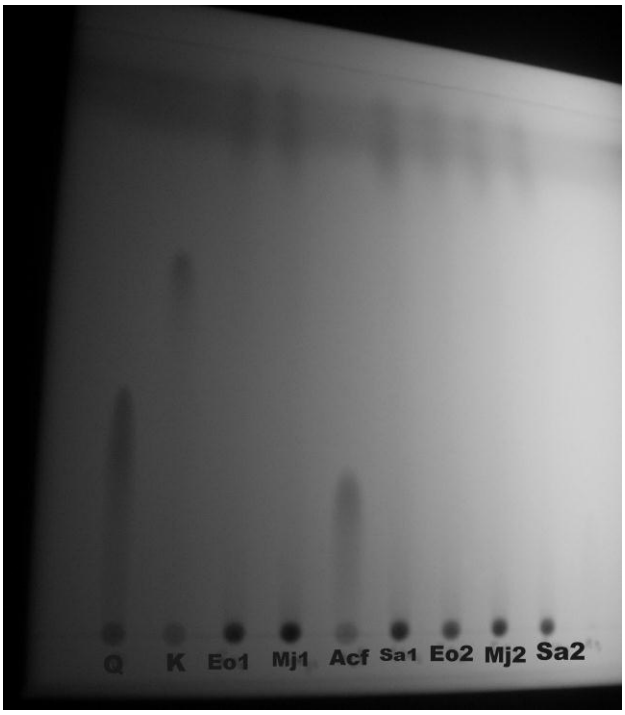


Figura 22. Cromatoplaca de extractos hidroalcohólicos de cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*; fase móvil: acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico y agua (100:11:11:26). Q= quercetina, K= Kaempferol, Eo1= Extracto de células sin tratamiento con elicitor (muestra 1), Mj1= extracto de células tratadas con metil jasmonato (muestra 1),, Acf= ácido cafeico, Sa1= Extracto de células tratadas con ácido salicílico (muestra 1), Eo2= Extracto de células sin tratamiento con elicitor (muestra 2), Mj2= extracto de células tratadas con metil jasmonato (muestra 2), Acf= ácido cafeico, Sa2= Extracto de células tratadas con ácido salicílico (muestra 2).

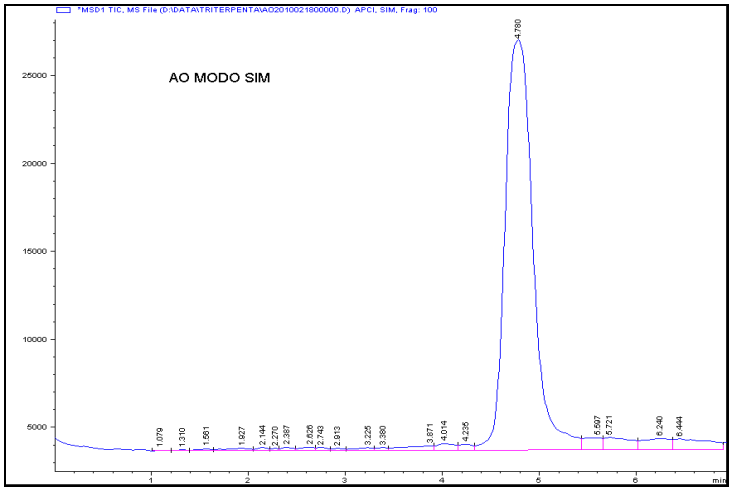


Figura 23. Cromatograma para el ácido oleanólico en una concentración de 100 ppm, en HPLC- MS a 206 nm.

Figura 24. Espectro de masas para el ácido oleanólico en HPLC-MS, APCI modo positivo.

Huang et al. (2007), realizaron un análisis en condiciones similares de ionización, para la identificación de ácido oleanólico en la planta *Anoectochilus roxburghii* (wall.) Lindl; en este caso también realizaron la cuantificación en modo positivo. En estas condiciones el principal ion formado de esta sustancia tuvo un peso molecular m/z de 439.4, lo cual es muy cercano al valor obtenido tanto para el estándar de ácido oleanólico, como para las muestra. Este peso molecular corresponde a la molécula sin una molécula de agua, pero con un ion hidronio $[M+H-H_2O]^+$.

Tarvainen et al. (2010) realizaron un estudio para la identificación y cuantificación de ácidos triterpénicos en la planta *Plantago major;* para ello emplearon cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en modo APCI (+). De esta forma identificaron los tres principales fragmentos que corresponden a iones masa/carga de (m/z) = 439 la cual indicaron que corresponde al ácido oleanólico más un ión hidronio y sin una molécula de agua, este ión representa el fragmento con mayor abundancia. $[M+H-H_2O]^+$; el ión con m/z = 411, indicaron que corresponde a la molécula de ácido oleanólico con un ion hidronio y sin una molécula de ácido fórmico $[M+H-HCOOH]^+$, mientras que el ión con m/z= 393 corresponde a la molécula $[M+H- H_2O - HCOOH]^+$.

Estos resultados son consistentes, con lo obtenido en donde el principal fragmento obtenido corresponde al ión m/z 439.3. Este fragmento es una característica de los ácidos triterpénicos.

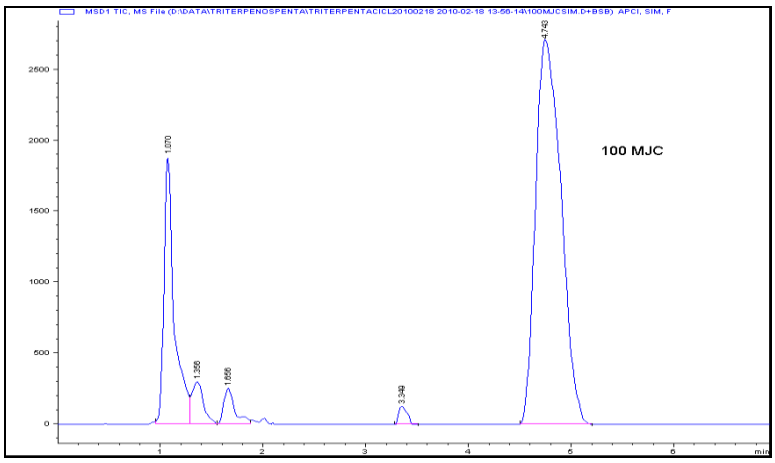


Figura 25. Cromatograma para un extracto en metanol de células elicitadas con 100 µM de metil jasmonato (día décimo), en HPLC- MS a 206 nm.

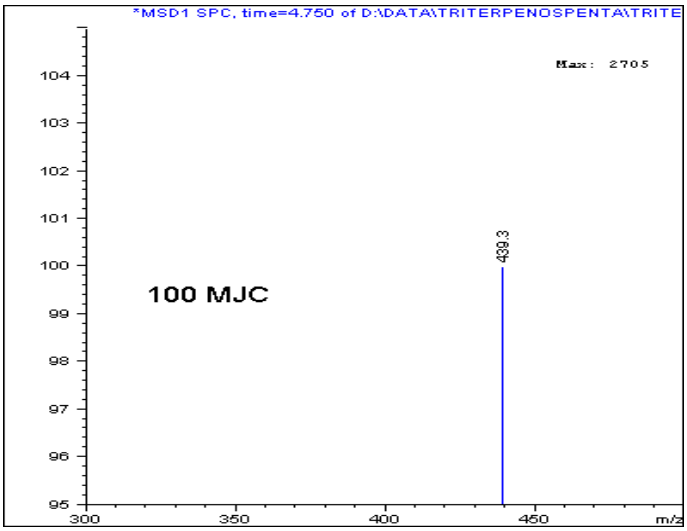


Figura 26. Espectro de masas para un extracto en metanol de células elicitadas con 100 µM de metil jasmonato (día décimo), APCI modo positivo.

Observando la Figuras 23, se aprecia que el ácido oleanólico tiene un tiempo de retención 4.7 min, compuesto que se encuentra en el extracto de células de *C. officinalis* (Figura 25). Comparando las Figuras 24 y 26, se aprecia que en este tiempo de retención se genera luego de la ionización un ión con relación carga/masa de 439.3, en ambos casos, corroborando al menos al nivel de peso molecular la presencia del ácido oleanólico en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis.*

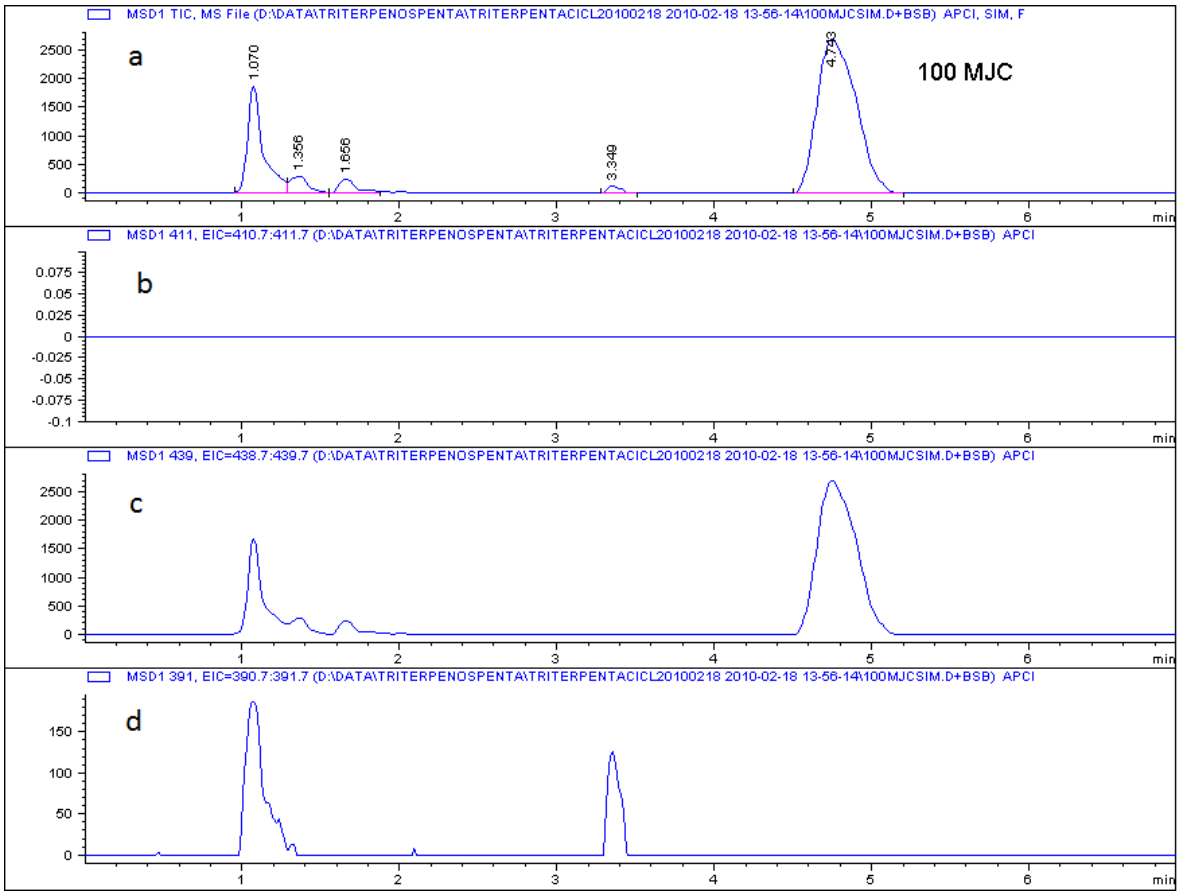


Figura 27. Espectro de masas para un extracto en metanol de células elicitadas con 100 µM de metil jasmonato (día décimo), APCI modo positivo. a) HPLC-MS modo SCAN (206nm); b) iones con relación masa/carga entre 410.7 y 411.7; c) iones con relación masa/carga entre 438.7 y 439.7; d) iones con relación masa/carga entre 390.7 y 391.7.

Estos resultados muestran que con metil jasmonato no solo se estimula la producción de ácido oleanólico, sino también se evidencia la presencia de otro tipo de compuestos (Figura 27 a), en este caso la observación se realizo a 206 nm UV. La Figura 27 c muestra la presencia de iones con relaciones masa/carga similares al ácido oleanolico, los cuales son provenientes de compuestos con un menor tiempo de retención en la columna, esta similaridad permite inferir que estos compuestos son estructuras relacionadas de ácidos triterpenicos. La Figura 27 d, muestra otros compuestos distintos que dan lugar a iones con relaciones masa/carga entre 390.7 y 391.7. Al comparar estos pesos moleculares con los compuestos descritos en el marco teórico para *C. officinalis*, no se encuentra ninguno con pesos moleculares similares, lo cual no indica que no estén presentes en los cultivos celulares. Dado que no existen bases de datos para los iones producidos por HPLC-MS como si para GC-MS, no se puede inferir información de estos compuestos. Este análisis nos permite concluir solo si se tienen los patrones de los compuestos que se quieren confirmar, más no permite identificar una sustancia.

7. CONCLUSIONES

Mediante el cultivo *in vitro* de células vegetales en suspensión de *Calendula officinalis* fue posible la producción de ácido oleanólico libre, lo cual constituye una etapa inicial para buscar la producción comercial de esta sustancia mediante este tipo de tecnología.

La elicitación tiene un alto efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células de *C. officinalis,* particularmente cuando la elicitación es en el día inicial de cultivo, pero la elicitación con metil jasmonato en el día diez de cultivo, en concentraciones finales de 10 y 100 µM, promueven la mayor producción de ácido oleanólico desde los cultivos de células vegetales en suspensión de *Calendula officinalis* (3,87 y 5.29 mg/L, respectivamente, comparado con el control sin adición 1.43 mg/L).

La elicitación con ácido salicílico promueve una mayor producción de ácido oleanólico con respecto al control sin adición (0.94 mg/L), siendo la elicitación más efectiva en el día diez del cultivo y en las concentraciones de 10 y 100 µM las más efectivas (ácido oleanólico producido: 2.63 y 2.49 mg/L, respectivamente).

La elicitación con 100 µM de metil jasmonato de las células de *C. officinalis* promueve una mayor producción de ácido oleanólico que el ácido salicílico, en el rango de concentraciones estudiadas (3.7 veces con respecto al control, comparado con 2.8 veces del mejor tratamiento con ácido salicílico 10 µM).

Se encuentra que la concentración de sacarosa que promueve la mayor producción de ácido oleanólico es la de 75 g/L, aunque mayor experimentación es requerida para alcanzar resultados concluyentes sobre la concentración de sacarosa en el medio de cultivo que da lugar a un mayor crecimiento o de ácido oleanólico en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis.*

En el medio de cultivo analizado se encontró ácido oleanólico en pequeñas cantidades en la mayoría de los tratamientos, sin embargo, se mantuvo siempre inferior al nivel proporcionado por las células para un mismo matraz. A nivel intracelular se da la principal acumulación, en relación a la producción de ácido oleanólico total.

En las condiciones estudiadas, la producción de los flavonoides quercetina, kaempferol, ácido clorogénico, y ácido cafeico, no fue detectada mediante cromatografía en capa delgada, tanto en células sin elicitar, como elicitadas.

El análisis de HPLC-MS permitió corroborar mediante comparación con el patrón que los picos detectados en HPLC corresponden a ácido oleanólico. Así mismo, permitió evidenciar la presencia de compuestos similares producidos en los cultivos, dado que se presentan compuestos que generan iones con pesos moleculares similares al ácido oleanólico.

8. RECOMENDACIONES

La producción de ácido oleanólico en los medios de cultivo, puede estar asociada a un sistema de excreción de esta sustancia por parte de las células, pero también posiblemente a la lisis celular a las condiciones estudiadas. Este punto es de vital importancia a nivel biotecnológico pues de ser el primer mecanismo, es posible modificar éste para alcanzar una mayor cantidad de esta sustancia en el medio de cultivo; o de ser el segundo caso, es posible estudiar condiciones que prevengan esta lisis y que permitan que no haya pérdida de este producto en el medio.

Se recomienda realizar un estudio en el que se determine el consumo de sacarosa, nitratos, amonio, y fosfatos como principales macronutrientes. Esto con el fin de determinar cuál de estos componentes limita la máxima producción de células de *C. officinalis* y así también poder determinar si existe una relación entre la producción de ácido oleanólico y la concentración de algunos de estos componentes. Esto permitiría diseñar medios de cultivo óptimos para la producción de biomasa y para la producción de ácido oleanólico.

En los estudios preliminares realizados para evaluar el posible efecto promotor de la concentración de sacarosa sobre la producción de ácido oleanólico en el medio de cultivo se deben tener en cuenta otros factores, los cuales no fueron analizados durante el desarrollo de los experimentos, los cuales pueden dar mayor claridad acerca de esto. Se recomienda que los estudios se realicen nuevamente, pero teniendo en cuenta un mayor tiempo para el desarrollo del experimento, por ejemplo treinta días y haciendo un seguimiento del perfil de consumo de los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa). Esto con el fin de determinar si definitivamente existe un efecto entre la concentración de la sacarosa en el medio y la producción de metabolitos secundarios tales como el ácido oleanólico.

Con el fin de realizar estudios para optimizar la producción de ácido oleanólico, se sugiere estudiar primero el perfil de producción de dicha sustancia diariamente luego del tratamiento con el agente elicitor, para evidenciar en cual día se presenta una mayor acumulación de dicha sustancia. Así mismo, se sugiere estudiar un rango más corto de concentración de metil jasmonato (10 y 100 µM), elicitando en el día diez del cultivo.

Es recomendable realizar estudios de interacción entre los elicitores estudiados ácido salicílico y metil jasmonato, con fin el evidenciar si ello permitiría una mayor acumulación de ácido oleanólico tanto intracelular como extracelular. Posiblemente se podría encontrar algún efecto positivo, dado que algunos investigadores consideran que estos agentes promueven elicitación de rutas específicas y distintas, la biosíntesis de triterpenos puede en principio partir de dos rutas distintas.

Se recomienda realizar estudios fitoquímicos de mayor alcance, para determinar qué otros posibles compuestos están presentes en los cultivos de células en suspensión de *C. officinalis* (en cultivos con y sin elicitación), ya que entre éstos pueden estar presentes otros compuestos con actividades farmacológicas interesantes. Incluso, para este último propósito se recomienda

realizar estudios de actividades farmacológicas varias (esto en conjunto con investigadores expertos en esta área) de extractos de células y del medio de cultivo.

En los ensayos en cromatografía en capa delgada, se evidenció la presencia de una sustancia común a todos los tratamientos, la cual tiene polaridad media y que tiene una alta absorción a 365 nm, por lo que esta sustancia podría ser caracterizada para realizar su identificación.

Se debe proporcionar un mayor control en el subcultivo, en términos de concentración inoculo y tiempo de subcultivo, con el fin de lograr menos variabilidad entre subcultivos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **ACOSTA De La LUZ Lérida, RODRIGUEZ FERRADA Carlos, SANCHEZ GOVÍN Esther, 2001**. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. Revista Cubana Planta Med. Vol. 1. Pp. 7-23.
2. **AKALEZI C.O., LIU S., LI Q.S., YU J.T., ZHONG J.J, 1999.** Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. Process Biochemistry. Vol. 34. Pp. 639-642.
3. **AKIHISA Toshihiro, YASUKAWA Ken, OINUMA Hirotoshi, KASAHARA Yoshimasa, YAMANOUCHI Sakae, TAKIDO Michio, KUMAKI Kunio, TAMURA Toshitake, 1996.** Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. Phytochemistry. Vol. 43 No. 6: Pp. 1255-1260.
4. **ALI Mohammad, YU Kee, HANH Eun, PAEK Kee, 2006.** Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidantin suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. Plant Cell Reports. Vol 25, Pp 613-620.
5. **BALDI Ashish, DIXIT V. K., 2008.** Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. Bioresource Technology. Vol. 99. Pp. 4609-4614.
6. **BANIK R.M., PANDEY D.K., 2008.** Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology. Industrial crops and products. Vol. 27. Pp. 241-248.
7. **BHOJWANI S. S., RAZDAN M. K., 1996**. Cell culture en: Plant tissue culture: Theory and Practice, a Revised Edition. Elsevier. ISNB: 0-444-81623-2. Pp. 66-67.
8. **BOURGAUD F., GRAVOT A., MILESI S., GONTIER E., 2001.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. Vol. 161. Pp. 839-851.
9. **BRIELMANN Harry L., SETZER William N., KAUFMAN Peter B., KIRAKOSYAN Ara, CSEKE Leland J., 2006**. Phytochemicals: The Chemical Components in Plants. En: CSEKE Leland J., KIRAKOSYAN Ara, KAUFMAN Peter B., WARBER Sara L., DUKE James A., BRIELMANN Harry L. Natural Products form Plants. Second edition. Taylor y Francis Group.
10. **BROWN Jacqueline T., 1990**. The Initiation and Maintenance of Callus Cultures. En: POLLARD Jeffrey, WALKER John M., Methods in Molecular Biology, Vol. 6. Plant Cell and Tissue Culture. The Humana Press. Pp. 57-58.
11. **CAI Yizhong, LUO Qiong, SUN Mei, CORKE Harold, 2004**. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 tradicional Chinese medicinal plantas associated with anticancer. Life Sciences. Vol. 74. Pp. 2157-2184.
12. **CETKOVIC Gordana, DIJAS Sonja, CANADANOVIC Jasna, TUMBAS Vesna, 2004.** Antioxidant properties of marigold extracts. Food research international. Vol. 37. Pp. 643-650.
13. **CHEN J. H., XIA Z. H., TAN R. X., 2003.** High- performance liquid chromatographic analysis of bioactive triterpenes in *Perilla frutescens*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 32. Pp. 1175-1179.
14. **COLLIN H., 2001.** Secondary product formation in plant tissue cultures. Plant growth regulation. Vol. 34. Pp. 119-134.
15. **DEWICK Paul M., 2009**. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. En: Medicinal Natural Products, a Biosynthetic approach. Third edition. John Wiley & Sons. Pp. 187-246.

16. **DICOSMO Frank, MISAWA Masanaru, 1995.** Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. Biotechnology Advances. Vol. 13. No. 3. Pp. 425-453.
17. **DICOSMO F., MISAWA M., 1985**. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. Trends in biotechnology. Vol. 3. No. 12.
18. **DIXON, Robert, GONZALES Robert A., 1994.** Plant Cell Culture: A Practical Approach, Second edition. Oxford University Press.
19. **DORNENBURG Heike, KNORR Dietrich, 1995.** Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 17. Pp. 674-684.
20. **DRAPER John, 1997.** Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense. Trends in Plant Science- Research news. Vol. 2. No. 5. Pp. 162-165.
21. **EBEL Jürgen, AYERS Arthur R., ALBERSHEIM Peter, 1976**. Host- Pathogen Interactions: XII. Response of suspension cultured soybean cells to the elicitor isolated from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, a fungal pathogen of soybeans. Plant Physiology. Vol. 57. Pp. 775-779.
22. **ETIENNE H., BERTRAND B., 2003.** Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frecuency and phenotype of variants. Tree physiology. Vol. 23. Pp. 419-426.
23. **FANG Yimin, SMITH M. A., PEPIN M. F., 1999**. Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin- producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*). In Vitro Cell. Dev. Biol. –Plant. Vol. 35. Pp. 106-113.
24. **FERIA R. Iris, LAZO Elizabeth, PONCE N. Teresa, CERDA G. Carlos M., RAMOS V. Ana C. 2005,** Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. Biotechnology Letters. Vol. 27. Pp. 839-843.
25. **FONNEGRA G. Ramiro, JIMENEZ R. Silvia L., 2007.** Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Segunda edición. Editorial Universidad de Antioquia. Pp. 72-74.
26. **FUNK C., GÜGLER K, BRODELIUS P., 1987.** Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). Phytochemistry. Vol. 26. No. 2. Pp. 401-405.
27. **GAMBORG O. L., MILLER R. A., OJIMA K., 1968.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. Vol. 50. Pp. 151-158.
28. **GAMBORG O. L., MURASHIGE T., THORPE A., VASIL I. K., 1976**. Plant tissue culture media. In vitro. Vol. 12. No. 7. Pp. 473-478.
29. **GAO Min, LIU Chun Zhao, 2005.** Comparation of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. World Journal of Microbiology & Biotechnology. Vol. 21. Pp. 1461-1463.
30. **GASPAR Thomas, KEVERS Claire, PENEL Claude, GREPPIN Hubert, REID David M., THORPE Trevor A., 1996.** Review: Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell & Development Biology. Vol. 32. Pp. 272-289.
31. **GAUTHERET Roger J., 1983**. Plant Tissue Culture: a History. The Botanical Magazine, Tokio. Vol. 96. Pp. 393-410.
32. **GEORGE Edwin F., HALL Michael A., DE KLERK Geert J., 2008.** Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1, The Background. Third edition. Editorial Springer.
33. **GEORGIEV Milen I., WEBER Jost, MACIUK Alexandre, 2009.** Minireview: Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. Applied Microbiology & Biotechnology. Vol. 83. Pp. 809-823.

34. **GIBBONS Simon, 2006.** An Introduction to Planar Chromatography. En: SARKER Satyajit D., LAFIT Zahid, GRAY Alexander I., Natural Products Isolation. Second Edition. Methods in Biotechnology. Vol. 20. Humana Press Inc. Pp. 77-81.
35. **GODOY HERNANDEZ Gregorio, LOYOLA VARGAS Víctor, 1997.** Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. Plant Cell Reports. Vol. 16. Pp. 287-290.
36. **GODOY HERNANDEZ Gregorio, VASQUEZ FLOTA Felipe A., 2006.** Growth Measurements. En: En: LOYOLA VARGAS Victor M., VASQUEZ FLOTA Felipe. Plant Cell Culture Protocols. Second edition. Methods in Molecular Biology (318). Human Press Inc.
37. **GRZELAK Anna, JANISZOWSKA Wirginia.** Initiation and growth characteristics of suspension cultures of *Calendula officinalis* cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol. 71. Pp. 29-40. 2002.
38. **GUNDLACH Heidrun, MÜLLER Martin J., KUTCHAN Toni M., ZENK Meinhart H., 1992**. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor- induced plant cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 89. Pp. 2389-2393.
39. **GURIB-FAKIM Ameenah, 2006.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine. Vol. 27. Pp. 1-93.
40. **HSU Hsue Yin, YANG Jenq- Jer, LIN Chin Ching, 1997**. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery hematopoietic system postirradiation in mice. Cancer Letters. Vol. 111. Pp.7-11.
41. **HUANG Liying, CHEN Tianwen, YE Zhao, CHEN Guonan, 2007.** Use of liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization –ion trap mass spectrometry for identification of oleanolic acid and ursolic acid in *Anoectochillus roxburghii* (wall.), Lindl. Journal of Mass Spectrometry. Vol. 42. Issue 7. Pp. 910-917.
42. **JEONG Hye Gwang, 1999.** Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride- induced hepatic injury. Toxicology Letters. Vol. 105. Pp. 215-222.
43. **JIMENEZ M. Eva, GARCIA L. Angel, PACO Laura, ALGARRA Ignacion, COLLADO Antonia, GARRIDO Federico, 2006.** A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vivo* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer. Vol. 5. Pp. 119-133.
44. **KALVATCHEV Z., WALDER R., GARZARO D, 2007.** Anti-VIH activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. Biomed & Pharmacoter. Vol 51. Pp. 176-180.
45. **KASHIWADA Yoshiki, WANG Hui- Kang, NAGAO Tsuneatsu, KITANAKA Susumu, YASUDA Ichiro, FUJIOKA Toshihiro, YAMAGISHI Takashi, CONSENTINO Mark, KOZUKA Mutsuo, OKABE Hikaru, IKESHIRO Yasumasa, HU Chan-Qi, YEH Eric, LEE Kuo- Hsiung, 1998.** Anti-AIDS Agents. 30. Anti-VIH activity of oleanolic acid, Pomolic acid, and structurally related triterpenoids. J. Nat. Prod. Vol. 61. Pp. 1090-1095.
46. **KIERAN P.M., MacLOUGHLIN P.F., MALONE D.M., 1997.** Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. Journal of Biotechnology. Vol. 59. Pp. 39–52.
47. **KIM Beum J., GIBSON Donna M., SHULER Michael L., 2005.** Relationship of Viability and Apoptosis to Taxol Production in *Taxus* sp. Suspension Cultures Elicited with Methyl Jasmonate. Biotechnology Progress. Vol. 21. Pp. 700-707.
48. **KIM Beum Jun, GIBSON Donna M., SHULER Michael L., 2004.** Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures. Biotechnology Progress. Vol. 20. Pp. 1666-1673.

49. **KIM Sung H., HUR Byung K., BYUN Sang Y., 1999.** Effect of sugar concentration on camptothecin production in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. Biotechnology and Bioprocess Engineering. Vol. 4. Pp. 277-280.

50. **KIM Dong, PEDERSEN H., CHIN Chee Kok, 1991.** Development of process strategies for berberine production in plant cell suspension cultures. Journal of Biotechnology. Vol. 21. Issue 3. Pp. 201-207.

51. **KOWALSKI Radoslaw, 2007.** Studies of Selected Plant Raw Materials as Alternative Sources of Triterpenes of Oleanolic and Ursolic Acids Types. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 55. Pp. 656-662.

52. **KREIS Wolfgang, 2007.** *In- Vitro* Culturing Techniques of Medicinal Plants. En: KAISER Oliver, QUAX Wim J., Medicinal Plant Biotechnlogy. Wiley VCH. Pp. 162 -165.

53. **KURKIN V.A., SHAROVA O.V., 2007.** Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. Chemistry of natural compounds. Vol. 43, No 2., Pp. 216-217.

54. **KUTNEY James P., SAMIJA Mijo D., HEWITT Gary M., BUGANTE Elizabeth C., GU Huifen, 1993**. Anti-inflammatory oleanane triterpenes from *Tripterygium wilfordii* cell suspension cultures by fungal elicitation. Plant Cell Reports. Vol. 12. Pp. 356-359.

55. **KYRAKOSYAN Ara, 2006.** Plant Biotechnology for the Production of Natural Products. . En: CSEKE Leland J., KIRAKOSYAN Ara, KAUFMAN Peter B., WARBER Sara L., DUKE James A., BRIELMANN Harry L. Natural Products form Plants. Second edition. Taylor y Francis Group.

56. **LAVAGNA Silvio, SECCI Daniela, CHIMENTI Paola, BONSIGNORE Leonardo, OTTAVIANI Antonio, BIZZARRI Bruna, 2001.** Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epitelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. II Farmaco. Vol. 56. Pp. 451-453.

57. **LEE P. Carolyn W., ERTURK Seda, TENGTRAKOOL Jennifer, 2004.** Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation. Biotechnology Letters. Vol. 0. Pp. 1595- 1599.

58. **LIU J., 1995.** Pharmacology of oleanolic acid and ursolic. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 49. Pp. 57-68.

59. **LU M. B., WONG H. L., TENG W. L., 2001.** Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of Panax ginseng. Plant Cell Reports. Vol. 20. Pp. 674-677.

60. **MACHAKOVA Ivana, ZAZIMALOVA Eva, GEORGE Eduwin F.,2008.** Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. En: GEORGE Eduwin F., HALL Michael A., DE KLERK Geert-Jan. Plant Propagation by Tissue Culture. Third Edition. Springer. Pp. 175-204.

61. **MALARZ Janusz, STOJAKOWSKA Anna, KISIEL Wanda, 2007.** Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Cichorium intybus*. Acta Physiol. Plant. Vol. 29. Pp. 127-132.

62. **MEHMETOĞLU Ülkü, CURTIS Wayne R., 1997**. Synthesis in Hairy Root and Cell Suspension Cultures of *Hyoscyamus muticus*. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 67. Pp. 71-77.

63. **MIZUKAMI Hajime, TABIRA Yukari, ELLIS Brian E., 1993**. Methyl-jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Reports. Vol. 12. Pp. 706-709.

64. **MOURA Gustavo, VILLEGAS Leon, MARCALO Ana, VAISBERG Abraham, HAMMOND GERALD, 2006.** In vivo wound healing activity of oleanolic acid derived from the acid hydrolysis of *Anredera diffusa*. J. Nat. Prod. Vol. 69. Pp. 978-979.

65. **MULABAGAL V.,TSAY H., 2004.** Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering**.** Vol. 2. No. 1. Pp. 29-48.

66. **MURASHIGE Toshio, SKOOG Folke, 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia plantarum. Vol. 15. Pp. 473-497.

67. **NAMDEO A.G., 2007.** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacognosy Reviews. Vol. 1. Issue1. Pp 69-79.

68. **NARAYAN M.S., VENKATARAMAN L.V., 2002.** Effect of sugar and nitrogen on the production of anthocyanin in cultured carrots (*Daucus carota*) cells. Journal of Food Science. Vol. 67,.No. 1.Pp. 84-86.

69. **PEREIRA Paulo S., KISS T. Fábio, DE CASTRO F. Suzelei, DE SOUZA Camila M., Lourenco Miriam V., 2007.** Enhanced triterpene production in *Tabernaemontana catharinensis* cell suspensión cultures in response to biotic elicitors. Quim. Nova. Vol. 30. No. 8. Pp. 1849-1852.

70. **PÉREZ N. Miguel O., 2008.** Evaluación de la producción de metabolitos anticancerígenos a partir de células en suspensión de *Calendula officinalis*. Tesis Maestría en Ciencias – Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín.

71. **PIETTA Piergiorgio, BRUNO Annamaria, 1992.** Separation of flavonol- 2-0 glycosides from *Calendula officinalis officinalis* and *Sambucus nigra* by high- performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. Journal of chromatography. Vol. 593. Pp. 165-170.

72. **PRAKASH Gunjan, SRIVASTAVA Ashok K.**, **2008.** Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. Biochemical Engineering Journal. Vol. 40. Pp. 218-226.

73. **QIAO Jian J., YUAN Ying J., ZHAO Hong, WU Jin C., ZENG An P., 2003.** Apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidata* co- treated with salicylic acid and hydrogen peroxide. Biotechnology Letters. Vol. 25. Pp. 387-390.

74. **RAMACHANDRA R. S., RAVISHANKAR G. A., 2002.** Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances. Vol. 20. Pp. 101-153.

75. **RAMOS A., EDREIRA A., VIZOSO A., BETANCOURT J., LOPEZ M., DECALO M., 1998.** Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L . Journal of ethnopharmology. Vol. 61. Pp. 49-55.

76. **RAPHAEL T. J., KUTTAN G., 2003**. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. Phytomedicine. Vol. 10. Pp. 483-489.

77. **ROBERTS Susan C., 2007**. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. Nature Chemical Biology. Vol. 3., No 7. Julio. Pp. 387-395.

78. **ROBLEDO PAZ Alejandrina, VASQUEZ SANCHEZ María M., ADAME ALVAREZ Rosa M., JOFRE GARFIAS Alba E., 2006**. Callus and Suspension Culture Induction, Maintenance, and Characterization. En: LOYOLA VARGAS Victor M., VASQUEZ FLOTA Felipe. Plant Cell Culture Protocols. Second edition. Methods in Molecular Biology (318). Human Press Inc.

79. **RODRIGUEZ Jaime, ASTUDILLO Luis, SCHEMEDA Guillermo, 2003.** Oleanolic acid promotes healing of acetic acid- induced chronic gastric lesions in rats. Pharmacological Research. Vol. 48. Pp. 291-294.

80. **RUSZKOWSKI Dariusz, SZAKIEL Anna, JANISZOWSKA Wirginia, 2003.** Metabolism of [3-^{3}H] oleanolic acid in *Calendula officinalis* L. roots. Acta physiolagiae plantarum. Vol. 25. No 4. Pp. 311-317.
81. **SAIMARU Hiroshi, ORIHARA Yutaka, TANSAKUL Pimpimon, KANG Young-Hwa, SHIBUYA Masaaki, EBIZUKA Yukata, 2007.** Production od triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea.* Chem. Pharm. Bull. Vol. 55. No. 5. Pp. 784-788.
82. **SAITO Kazuki, MIZUKAMI Hajime, 2002.** Plant Cell Cultures as Producers of Secondary Compounds. Pp. Chapter 5. Plant Biotechnology and Transgenic Plants. OKSMAN Kirsi-Marja, BARZ Wolfgang. Marcel Dekker, Inc.
83. **SAKURAI Miei, OZEKI Yoshihiro, MORI Tsukasa, 1997.** Induction of anthocyanin accumulation in rose suspension-cultured cells by conditioned medium of strawberry suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol. 50., Pp. 211-214**.**
84. **SCHENK Roy U., HILDEBRANT A. C., 1972.** Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany. Vol. 50. Pp. 199-204.
85. **SEIDEL Véronique, 2006**. Initial and Bulk Extraction. En: SARKER Satyajit D., LAFIT Zahid, GRAY Alexander I., Natural Products Isolation. Second Edition. Methods in Biotechnology. Vol. 20. Humana Press Inc. Pp. 27-46.
86. **SHABANI L., EHSANPOUR G., ESMAEILI A., 2010.** Assessment of squalene synthase and beta-amyrin synthase gene expression in Licorice roots treated with metal jasmonate and salicylic acid using real time qPCR. Russian Journal of Plant Physiology. Vol. 57. No 4, PP. 515-519.
87. **SIERRA Martha I., Van der HEIJDEN Robert, Van der LEER Theo, VERPOORTE Robert, 1992.** Stability of alkaloid production in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* during long term subculture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. Vol. 28. Pp. 59-68.
88. **SMITH Roberta H. 1986**. Establishment of Calli and Suspension Cultures. Methods in Enzymology. Vol. 118. PP. 539-549.
89. **SOHN Kyung Hee, LEE Ho Young, CHUNG Hae Young, YOUNG Han Suk, YI She Yoon, KIM Kyu Wom, 1995.** Anti-angiogenic activity of triterpene acids. Cancer Letter. Vol. 94. Pp. 213-218.
90. **SOMOVA L.I., SHODE F.O., RAMNANAN P., NADAR A., 2003.** Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africa* leaves. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 84. 2003. Pp. 299-305.
91. **SRIVASTAVA Santosh, KHAN Merajuddin, KHANUJA Suman., 2005.** Process for isolation of hepatoprotective agent "oleanolic acid" from *Lantana camara.* Patente WO 2005/095321 A1.
92. **SUDHA G., RAVISHANKAR A, 2003.** Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. Current Science, Vol. 85. No. 8. Pp.1212- 1217.
93. **SZAKIEL Anna, GRZELAK Anna, DUDEK Paulina, JANISZOWSKA Wirginia, 2003.** Biosynthesis of oleanolic acid its glycosides in *Calendula officinalis* suspension culture. Plant Physiology and Biochemistry. Vol. 41. Pp. 271-275.
94. **SZAKIEL Anna, RUSZKOWSKI Dariusz, JANISZOWSKA Wirginia, 2005.** Saponins in *Calendula officinalis* L. – structure, biosynthesis, transport and biological activity. Phytochemistry Reviews, Vol. 4. Pp. 151-158.

95. **TAIZ Lincoln. ZEIGER Eduardo, 2002.** Plant Physiology. Third edition. Editorial Sinauer Associates.
96. **TANIGUCHI Shoko, IMAYOSHI Yoko, KOBAYASHI Eri, TAKAMATSU Yoshie, ITO Hideyuki, HATANO Tsutomu, SAKAGAMI Hiroshi, TOKUDA Harukani, NISHINO Hoyuko, SUGITA Daigo, SHIMURA Susumu, YOSHIDA Takashi, 2002**. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. Phytochemistry. Vol. 59. Pp. 315-323.
97. THANH N. T., MURTHY H. N., YU K. W., HANH E. J., PAEK K. Y. ,2005. Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l ballon type bubble bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 67. Pp. 197-201.
98. **Van STADEN Johannes, ZAZIMALOVA Eva, GEORGE Eduwin F.,2008.** Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. En: GEORGE Eduwin F., HALL Michael A., DE KLERK Geert-Jan. Plant Propagation by Tissue Culture. Third Edition. Springer. Pp. 175-204.
99. 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.
100. VASCONSUELO Andrea, BOLAND Ricardo, 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science. Vol. 172. Pp. 861-875.
101. **VERPOORTE R., Van der HEIJDEN R., Ten HOPEN H. J. G., MEMELINK J., 1999**. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. Biotechnology Letters. Vol. 21, Pp. 467-479.
102. **VERPOORTE R., van der HEIJEN R., MEMELINK J., 2000.** Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. Transgenic research. Vol. 9. Pp. 323- 343.
103. **WALKER Travis S., BAIS Harsh Pal, VIVANCO Jorge M., 2002**. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). Phytochemistry. Vol. 60. Pp. 289-293.
104. **WANG J. M., XIA Z.H., CHU J.H., TAN R.X., 2004.** Simultaneous production of anthocyanin and triterpenoids in suspension cultures of *Perilla frutescens.* Enzyme and Microbial Technology. Vol. 34. Pp. 651-656.
105. **WANG Yan Dong, WU Jin Chuan, YUAN Ying Jin, 2007.** Salicylic acid induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var *mairei.* Cell Biology International. Vol. 31. Pp. 1179-1183.
106. **WANG Zhen- Yu, ZHONG Jiang- Jiang, 2002.** Repeated elicitation enhances taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors. Biotechnology Letters. Vol. 74. 445-448.
107. WANG H. Q., YU J. T., ZHONG J. J., 1999. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus Chinensis* by sucrose feeding strategy. Process Biochemistry. Vol. 35. Pp. 479 - 483.
108. Wang Zhen Yu, ZHONG Jian Jiang, 2002. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. Biochemical Engineering Journal. Vol. 12, Pp. 93-97.
109. **WIKTOROWSKA Ewa, DŁUGOZ Marek, JANISZOWSKA Wirginia, 2010**. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension of *Calendula officinalis* L. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 46. Pp 14-20.

110. **WONG Michael W., 2006**. Modern HPLC for practicing scientists. John Wiley & Sons. Pp. 1-44.
111. **YEOMAN M. M., YEOMAN C.L., 1996.** Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. New Phytologist. Vol. 134. No. 4, Pp. 553-569.
112. YOON Hee, KIM Hye, MA Choong- Je, HOON Huh, 2000. Induced accumulation of triterpenoids in *Scutellaria baicalensis* suspension cultures using yeast elicitor. Biotechnology letters. Vol. 22. Pp. 1071-1075.
113. **YOSHIKAWA Masayuki, MATSUDA Hisashi, 2000.** Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from medicinal foodstuffs. Biofactors. Vol. 13. Pp. 231-237.
114. **YUKUMINE Yukihito, TABATA Homare, HIGASHI Yosuke, HARA Yasuhiro, 1996**. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. Nature Biotechnology. Vol. 14. September. Pp. 1129-1132.
115. **ZHANG Pengxia, LI Hongmei, CHEN Dong, NI Juhua, KANG Yuming, WANG Shuqiu, 2007.** Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cell through caspace activation and poly(ADP- ribose) polymerase cleavage. Acta biochimica et biophysica sinica. Vol. 39. No. 10. Pp.803-809.
116. ZHANG Yaxi, XU Shaohua, DING Pingtao, WANG Dongmei, CHENG Yu, HE Jing, GAO Minghui, XU Fang, LI Yan, ZHU Zhaohai, LI Xin, ZHANG Yuelin, 2010. Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 107. Issue 42, No 19. Pp. 18220-18225.
117. ZHANG Y., LI J. X., ZHAO J., WANG S. Z., PAN Y., TANAKA K., KADOTA S., 2005. Synthesis and activity of oleanolic acid derivatives, a novel class of inhibitors of osteoclast formation. Bioorganic and Medical Chemistry Letters. Vol. 15. Issue 6. Pp. 1625-1632.
118. **ZHAO Jian, DAVIS Lawrence C, VERPOORTE Robert, 2005.** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances. Review. 23: 283-333.
119. ZHONG Jian- Jiang, 2001. Biochemical Engineering of the Production of Plant- Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology. Vol. 72. Pp. 1-26.
120. ZHU Yong- Ming, SHEN Jing –Kang, WANG Hui- Kang, CONSENTINO L. Mark, LEE Kuo – Hsiung, 2001. Synthesis and Anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. Vol. 11. Pp. 3115-3118.

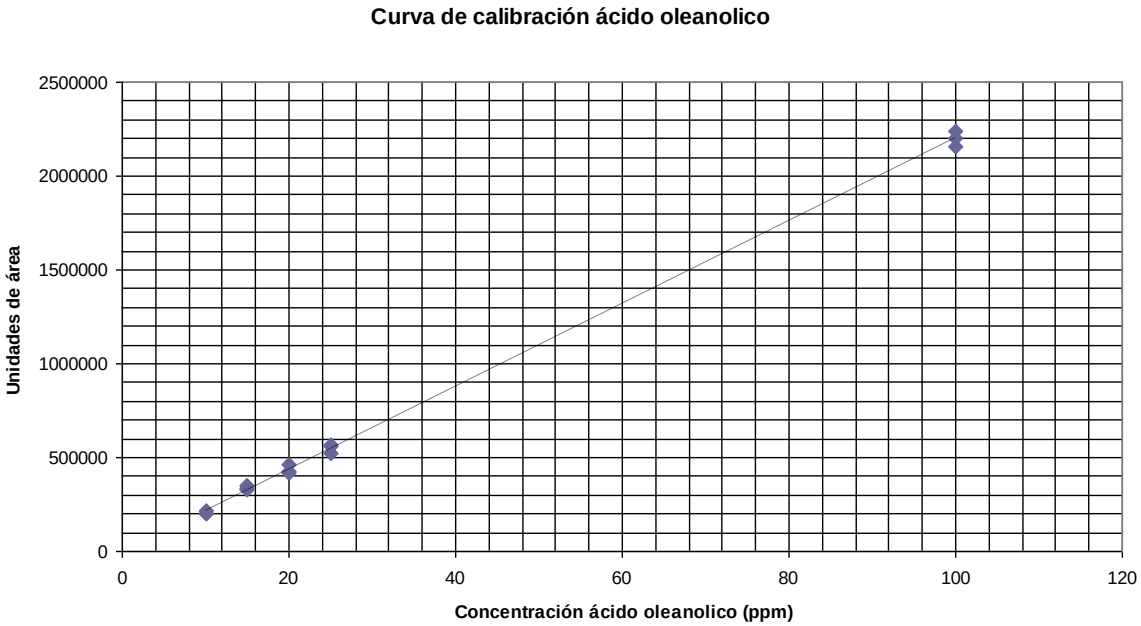
ANEXOS

ANEXO 1. Curva de calibración para la cuantificación de ácido oleanólico

Datos empleados para la elaboración de la curva de calibración para la cuantificación de ácido oleanólico por HPLC

Concentración de ácido oleanólico (mg/l)	Área del pico (unidades de área)
10	204088
10	202386
10	217825
15	329384
15	348178
15	333208
20	461652
20	420408
20	425207
25	558986
25	567002
25	525646
100	2238476
100	2153508
100	2203116

Curva de calibración para la cuantificación de ácido oleanólico



El análisis de estos datos por regresión lineal mediante el sistema operativo Microsoft Excel 2003, empleando los datos de manera que se generara una ecuación que permitiera estimar la concentración del metabolito en función al área del pico resulto en el siguiente resumen.

Resumen	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,999597446
Coeficiente de determinación R2	0,999195054
R^2 ajustado	0,999133135
Error típico	1,017184778
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	16696,5494	16696,5494	16137,1569	1,6759E-21
Residuos	13	13,4506433	1,03466487		
Total	14	16710			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0.148860938	0,45075745	0,37414925	0,39786512	0,69718606	-0,65943938
Variable X 1	4.53806E-05	4,4426E-07	3,5724E-07	127,03211	1,6759E-21	4,4609E-05

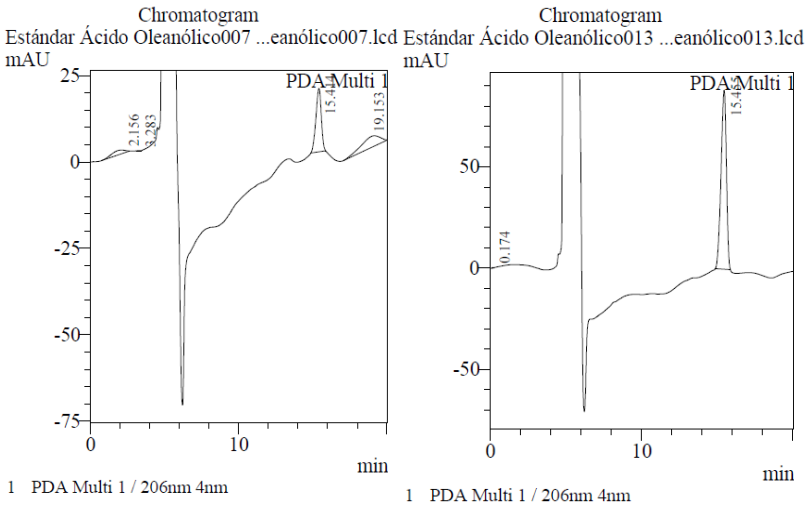
De esta la manera, se encontró la siguiente ecuación, la cual fue empleada para el análisis de los datos del presente documento.

[Ácido oleanólico, mg/l] = 4.53806 *10 $^{-5}$ * (Unidades de área)- 0.14886

En los análisis claramente se aprecia, que en el rango de concentraciones empleados la ecuación genera un intervalo de confianza del 95 % para la intercepción, el cual contiene el valor cero, el cual es demostrativo además del coeficiente de regresión del buen ajuste del sistema.

ANEXO 2. Algunos cromatogramas obtenidos en el HPLC (206 nm)

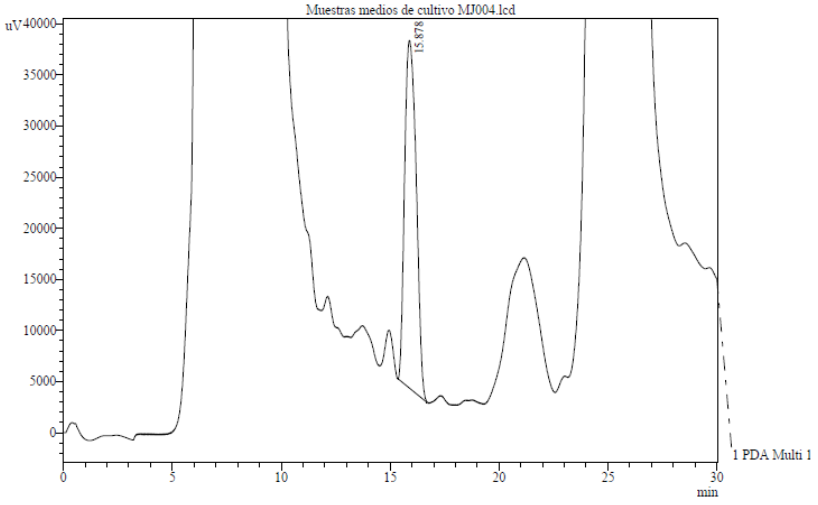
Cromatogramas de soluciones patrón de concentración conocida.



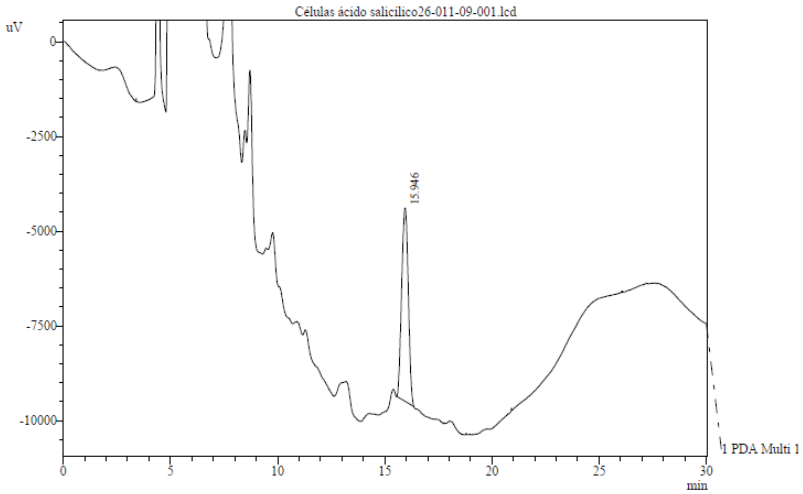
Ácido Oleanólico 20 ppm **Ácido Oleanólico 100 ppm**

Algunos cromatogramas obtenidos durante la cuantificación de ácido oleanólico mediante HPLC.

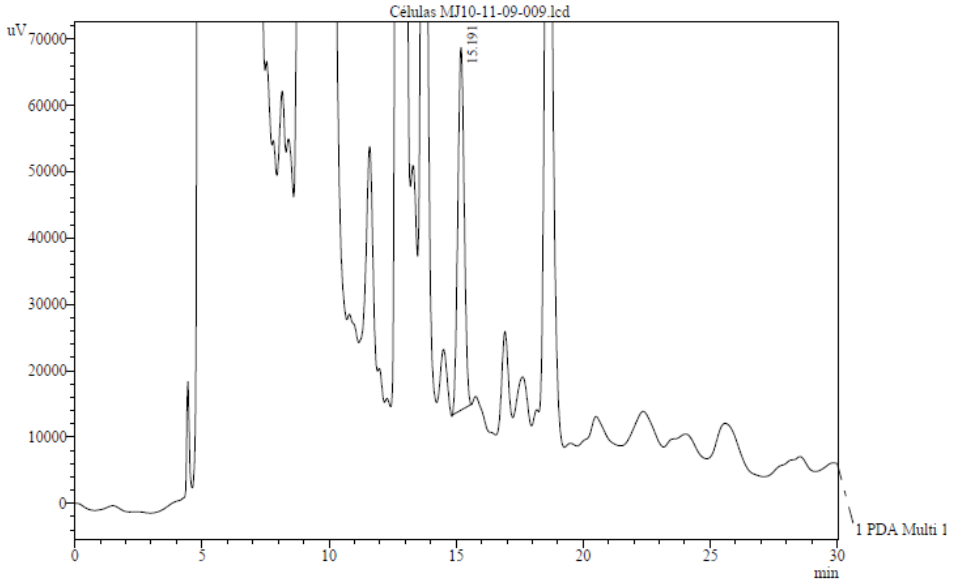
Muestra obtenida del medio de cultivo con células tratadas con metil jasmonato (10 µM aplicado en el día décimo).



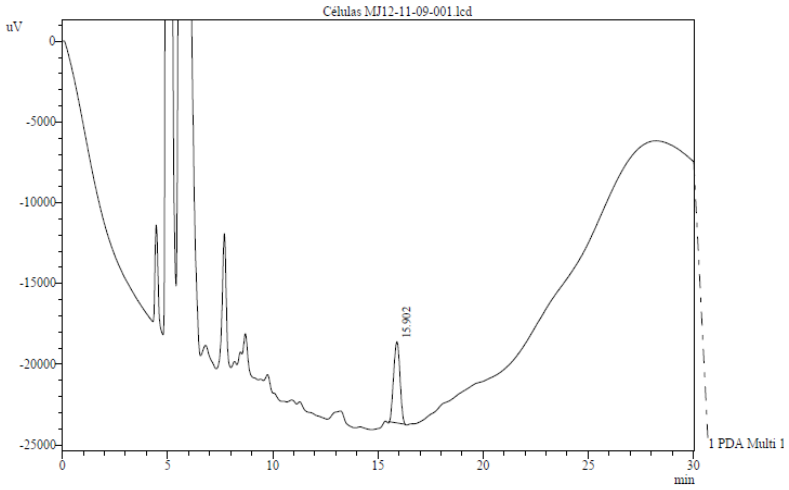
Muestra obtenida del extracto de células tratadas con ácido salicílico (1 µM día décimo del cultivo).



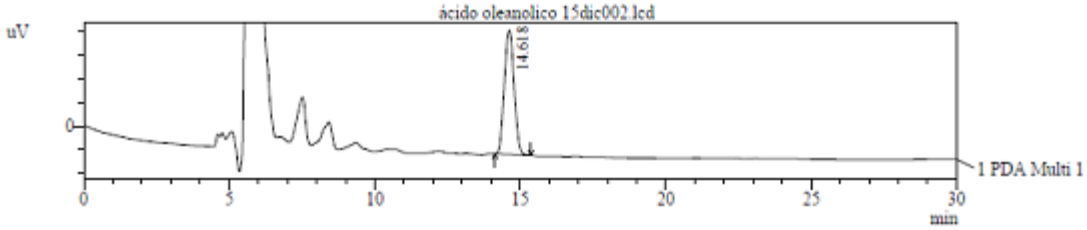
Muestra obtenida del extracto de células tratadas con metil jasmonato (100 µM aplicado en el día inicial de cultivo).



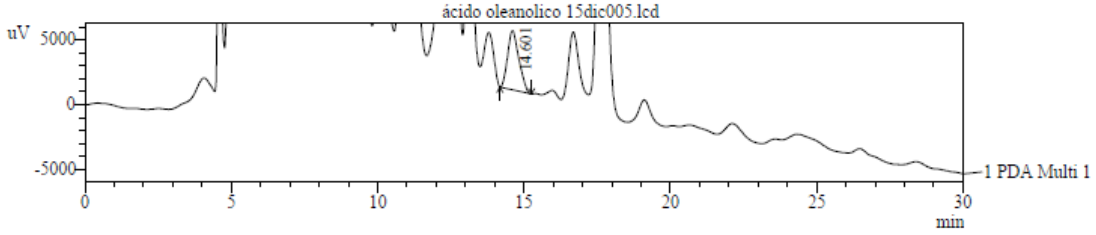
Muestra obtenida del extracto de células tratadas con metil jasmonato (1 µM aplicado en el día inicial del cultivo).



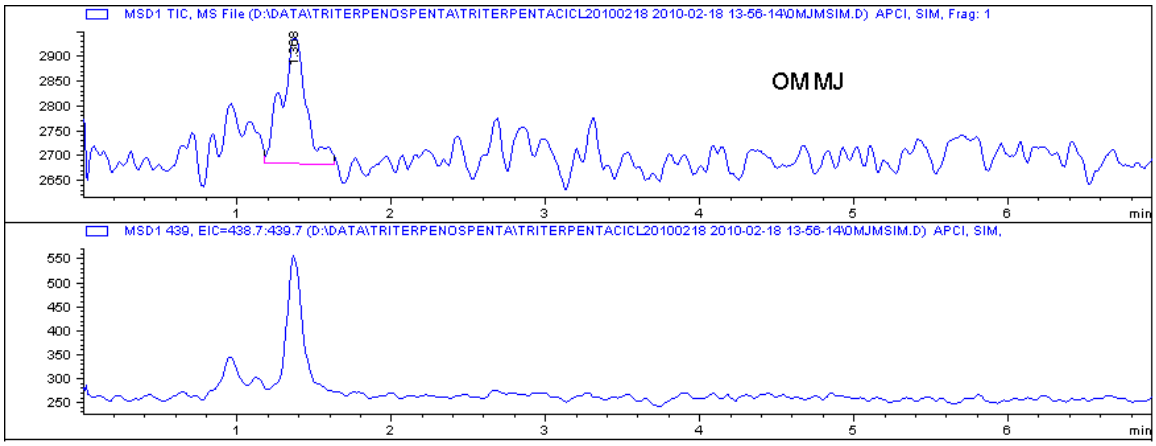
Muestra de solución patrón de ácido oleanólico de 5 ppm.

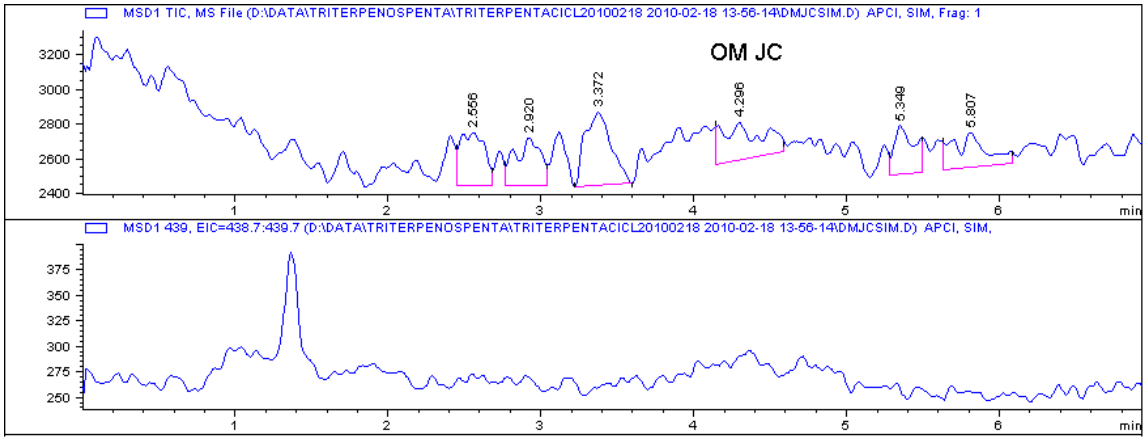


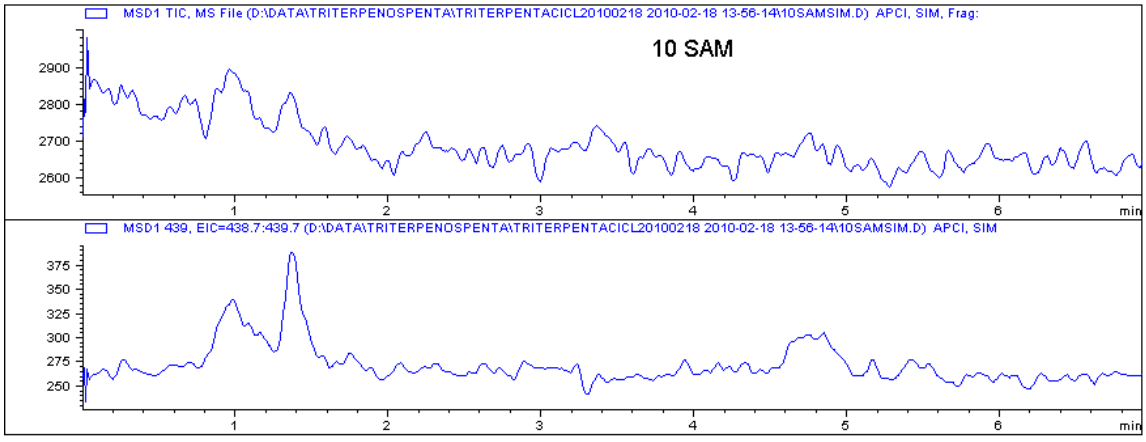
Muestra obtenida del extracto de células tratadas con 30 g/L de sacarosa.

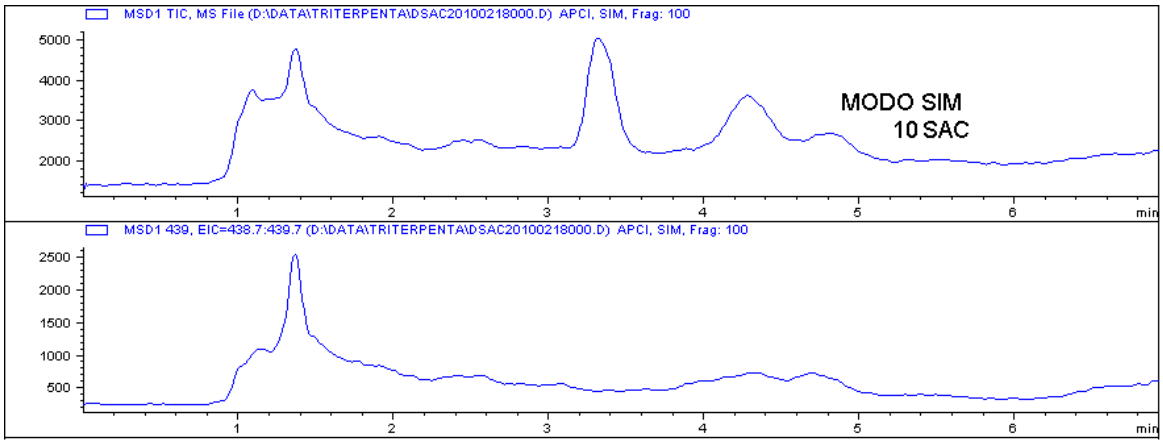


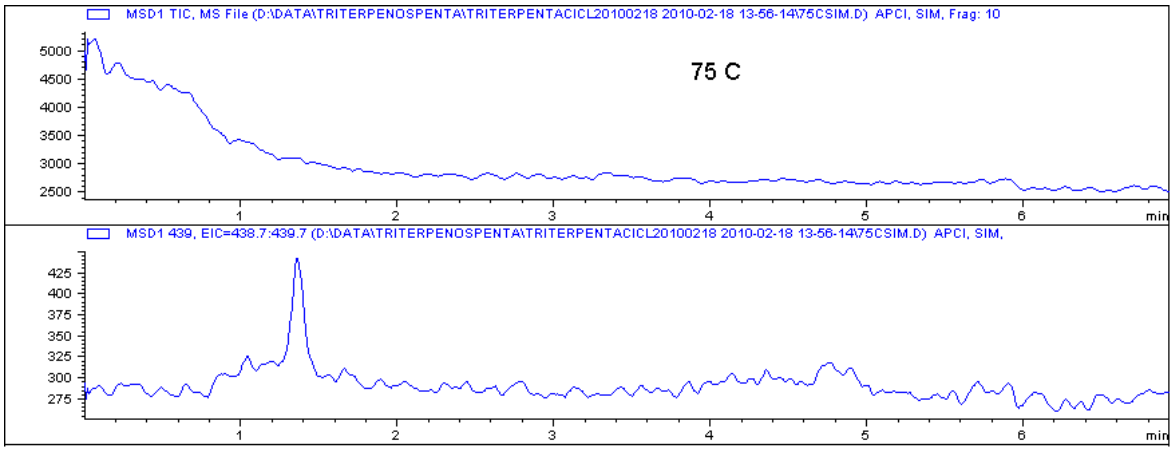
ANEXO 3. Algunos cromatogramas y espectros obtenidos por HPLC-MS

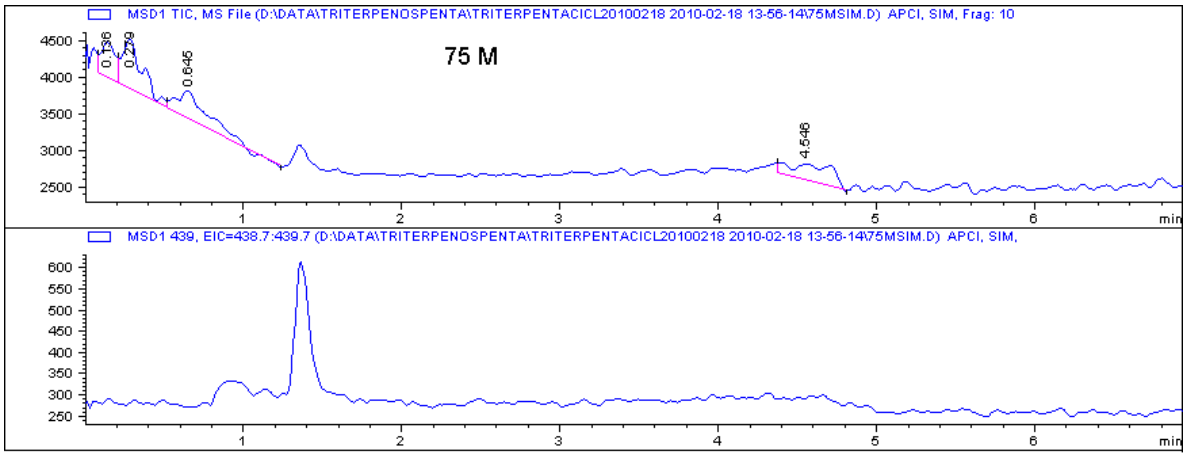







MSD1 TIC, MS File (D:\DATA\TRITERPENTA\DSAC20100218000.D) APCI, SIM, Frag: 100
MODO SIM
10 SAC
MSD1 439, EIC=438.7:439.7 (D:\DATA\TRITERPENTA\DSAC20100218000.D) APCI, SIM, Frag: 100
min


MSD1 TIC, MS File (D:\DATA\TRITERPENOSPENTA\TRITERPENTACICL20100218 2010-02-18 13-56-14\75CSIM.D) APCI, SIM, Frag: 10
75 C
MSD1 439, EIC=438.7:439.7 (D:\DATA\TRITERPENOSPENTA\TRITERPENTACICL20100218 2010-02-18 13-56-14\75CSIM.D) APCI, SIM,
min


MSD1 TIC, MS File (D:\DATA\TRITERPENOSPENTA\TRITERPENTACICL20100218 2010-02-18 13-56-14\75MSIM.D) APCI, SIM, Frag: 10
75 M
0.136
0.229
0.645
4.546
MSD1 439, EIC=438.7:439.7 (D:\DATA\TRITERPENOSPENTA\TRITERPENTACICL20100218 2010-02-18 13-56-14\75MSIM.D) APCI, SIM,
min

ANEXO 4. Datos de producción de biomasa en cultivos de células en suspensión de *C. officinalis*

Datos producción de biomasa de *C. officinalis* para el primer experimento variando la concentración de metil jasmonato

Concentración metil jasmonato (µM)	Peso células (mg) en 25 ml	Peso promedio (mg) en 25 ml
0	257,5	248,8
0	262	
0	288,5	
0	187	
1	200	176,8
1	165,5	
1	175	
1	166,5	
10	159	162,6
10	158	
10	127	
10	206,5	
100	101	84,9
100	84	
100	54,5	
100	100	
200	15,5	49,4
200	27	
200	47	
200	108	
10*	177,5	203,0
10*	247	
10*	184,5	
Inóculo	28,5	29.2
Inóculo	29,1	
Inóculo	30,1	
Inóculo	29,3	

*Elicitación en el día décimo de iniciado el cultivo

Datos producción de biomasa de *C. officinalis* para el primer experimento variando la concentración de sacarosa

Concentración (g/L)	Peso células (mg) en 25 ml	Promedio (mg) en 25 ml
30	208,5	184,6
30	185,5	
30	191,5	
30	153	
45	170,5	157,4
45	164	
45	147	
45	148	
60	108	116,1
60	113,5	
60	121,5	
60	121,5	
75	123	120,9
75	141,5	
75	122	
75	97	
Inóculo	22,7	25,9
Inóculo	29,1	
Inóculo	28,4	
Inóculo	23,5	

Datos producción de biomasa de *C. officinalis* para el primer experimento variando la concentración de ácido salicílico

Concentración ácido salicílico (µM)	Peso células (mg) en 25 ml	Peso promedio (mg) en 25 ml
0	247,5	243,8
0	187,5	
0	296,5	
1	234	238,2
1	227	
1	269	
1	223	
10	177	178,5
10	231	
10	156	
10	151	
100	137	145,2
100	150,5	
100	148,5	
100	145	
1000	21,5	15,2
1000	8,5	
1000	15,5	

10*	223	215
10*	207	
100*	168	176,5
100*	185	
Inóculo	12,6	14,9
Inóculo	18,5	
Inóculo	14,6	
Inóculo	13,9	

*Elicitación en el día décimo de iniciado el cultivo

Datos producción de biomasa de *C. officinalis* para el segundo experimento variando la concentración de metil jasmonato

Concentración metil jasmonato (µM)	Peso células (mg) en 25 ml	Peso promedio (mg) en 25 ml
0	285,9	271,0
0	261,3	
0	265,7	
1	208,5	210,5
1	199,6	
1	223,5	
10	188,1	185.76
10	188,7	
10	180,3	
100	167,8	155,8
100	160,2	
100	139,5	
1*	244,4	235.7
1*	214,5	
1*	248,2	
10*	212,7	207,6
10*	198,9	
10*	211,1	
100*	206,6	212,2
100*	213,7	
100*	216,2	
1000*	107,1	106,0
1000*	101,2	
1000*	109,6	
Inóculo	97,2	96,0
Inóculo	97,2	
Inóculo	97,2	

*Elicitación en el día décimo de iniciado el cultivo

Datos producción de biomasa de *C. officinalis* para el primer experimento variando la concentración de ácido salicílico (elicitación día décimo)

Concentración ácido salicílico (µM)	Peso células (mg) en 25 ml	Peso promedio (mg) en 25 ml
0	131,2	143,8
0	164,9	
0	135,3	
1	72	105,3
1	116,7	
1	127,2	
10	113,3	112,6
10	107,8	
10	116,7	
100	99,4	109,3
100	103,1	
100	125,5	
1000	61,3	65,1
1000	64,1	
1000	69,9	
Inóculo	35,4	35,1
Inóculo	38,2	
Inóculo	31,8	

Datos producción de biomasa de *C. officinalis* para el primer experimento variando la concentración de ácido salicílico (elicitación día cero)

Concentración ácido salicílico (µM)	Peso células (mg) en 25 ml	Peso promedio (mg) en 25 ml
0	94	99,1
0	104,3	
1	54,7	57,5
1	59,9	
1	57,8	
10	54,9	63,4
10	67,7	
10	67,7	
100	49,8	55,9
100	63,2	
100	54,8	
Inóculo	49,1	51,1
Inóculo	56,1	
Inóculo	48,1	

Datos producción de biomasa de *C. officinalis* para el primer experimento variando la concentración de sacarosa

Concentración (g/L)	Peso células (mg) en 25 ml	Promedio (mg) en 25 ml
30	131,2	143.8
30	164,9	
30	135,3	
45	183,2	174.0
45	182,9	
45	156	
60	208,1	200.2
60	197,3	
60	195,2	
75	186,3	167.4
75	159,1	
75	156,7	
Inóculo	35,4	35,1
Inóculo	38,2	
Inóculo	31,8	

ANEXO 5. ANALISIS DE VARIANZA Y COMPARACIONES

Análisis de varianza para el efecto de la concentración de metil jasmonato

El siguiente análisis se realizó con base con los índices de crecimiento estimados con los datos obtenidos durante el segundo experimento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5,72726341	7	0,81818049	60,5924473	2,4943E-10	2,6571966
Dentro de los grupos	0,21604818	16	0,01350301			
Total	5,94331159	23				

Se estimó mediante la prueba t, para diferencia entre medias, si los tratamientos mencionados, presentan diferencias significativas o no.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	10 µ *MJ (día décimo)*	*10* µ *MJ (día cero)*
Media	1,162152778	0,934375
Varianza	0,006182002	0,002382813
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,004282407	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	4,262977008	
P(T<=t) una cola	0,006511349	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,013022697	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	100 µ *MJ (día décimo)*	*10* µ *MJ (día décimo)*
Media	1,210069444	1,162152778
Varianza	0,002691334	0,006182002
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,004436668	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	

Estadístico t	0,881056495
P(T<=t) una cola	0,214022515
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782
P(T<=t) dos colas	0,428045029
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105

Análisis de varianza para el efecto de la concentración de acido salicílico

El siguiente análisis se realizó con base con los índices de crecimiento estimados con los datos obtenidos durante el segundo experimento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7,65411282	4	1,91352821	8,22300735	0,00333004	3,47804969
Dentro de los grupos	2,32704183	10	0,23270418			
Total	9,98115465	14				

Se estimó mediante la prueba t, para diferencia entre medias, si los tratamientos mencionados, presentan diferencias significativas o no.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	10 µ *SA (día décimo)*	*100* µ SA *(día décimo)*
Media	2,204933586	2,111954459
Varianza	0,016340569	0,161577473
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,088959021	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,381800152	
P(T<=t) una cola	0,361012904	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,722025809	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	10 µ *SA (día décimo)*	*1* µ *SA (día décimo)*
Media	2,204933586	1,9971537
Varianza	0,016340569	0,696098535

Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,356219552	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,426373551	
P(T<=t) una cola	0,345890006	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,691780013	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa

El siguiente análisis se realizó con base con los índices de crecimiento estimados con los datos obtenidos durante el segundo experimento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3,9236621	3	1,30788737	7,17319026	0,0117432	4,06618056
Dentro de los grupos	1,45863954	8	0,18232994			
Total	5,38230163	11				

Se estimó mediante la prueba t, para diferencia entre medias, si los tratamientos mencionados, presentan diferencias significativas o no.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	45 g/L	*30 g/L*
Media	3,953510436	3,092979127
Varianza	0,197612601	0,2739172
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,2357649	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	2,170564676	
P(T<=t) una cola	0,047874797	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,095749594	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	60 g/L	*30 g/L*
Media	4,69829222	3,092979127
Varianza	0,038813916	0,2739172
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,156365558	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	4,972042453	
P(T<=t) una cola	0,003820195	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,007640391	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	60 g/L	*45 g/L*
Media	4,69829222	3,953510436
Varianza	0,038813916	0,197612601
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,118213258	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	2,653026461	
P(T<=t) una cola	0,028401023	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,056802046	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	60 g/L	*75 g/L*
Media	4,69829222	3,76375712
Varianza	0,03881392	0,21897605
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,12889498	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	3,18803618	
P(T<=t) una cola	0,01663929	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,03327858	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

ANEXO 6. COMPONENTES Y PREPARACIÓN DEL MEDIO MS

Componentes del medio de cultivo diseñado por Murashige & Skoog, 1992

Componente	Concentración final en el medio X mg/l	Solución Stock	Volumen de Stock adicionado al medio (ml)
NH_4NO_3	1650 (20.6 mM)	Stock 1. Concentración por 20 X. (1 Litro).	50
$CaCl_2*2H_2O$	332.2 (2.3 mM)		
$MgSO_4*7H_2O$	370 (1.5 mM)		
KNO_3	1900 (18.8 mM)		
KH_2PO_4	170 (1.3 mM)	Stock 2. Concentración por 20 X. (500 ml).	50
H_3BO_3	6.2 (100 µM)	Stock 3. Concentración por 40X. (200 ml).	5
$CoCl_2*6H_2O$	0.025 (0.1 µM)		
$MnSO_4*H_2O$	16.9 (100 µM)		
$CuSO_4*5H_2O$	0.025 (0.1 µM)		
KI	0.83 (5 µM)		
$Na_2MnO_4*2H_2O$	0.25 (1 µM)		
$ZnSO_4*7H_2O$	8.6 (30 µM)		
Na_2EDTA	37.3 (100 µM)	Stock 4. Concentración por 20 X. (1 litro).	50
$FeSO_4*7H_2O$	27.8 (100 µM)		
Mio-inositol	100 (550 µM)	Stock 5. Concentración por 40X. (200 ml).	50
Glicina	2.0 (26.6 µM)		
Acido nicotínico	0.5 (4.1 µM)		
Piridoxina HCl	0.5 (2.4 µM)		
Tiamina HCl	0.1 (0.3 µM)		

En los diferentes textos relacionados con el cultivo *in vitro* células y tejidos vegetales se encuentra información varia acerca de la preparación de los Stocks y de los medios de cultivo. La información que se describe a continuación toma los aspectos más importantes en su preparación, de manera que se reduzca un poco la variabilidad asociada a su preparación.

En la preparación del Stock 1, se recomienda mezclar de manera separada el $MgSO_4*7H_2O$, debido a la posible dificultad de su solubilización, si se realiza en conjunto con los otros componentes del Stock.

Para la preparación del Stock 3, cuando se prepara solo 200 ml del stock, se deben pesar 1 mg de los componentes $CoCl_2*6H_2O$ y $CuSO_4*5H_2O$, lo cual puede generar errores en la medición y variabilidad en los resultados obtenidos cada vez que se prepare este Stock. Para evitar esto, se recomienda preparar una solución de estos dos componentes por separado a una concentración más alta por ejemplo de 25 mg en 100 ml, y así de esta solución solo se toma 2.5 ml para adicionar la cantidad requerida de estos minerales al Stock 3.

En la preparación del Stock 4, se recomienda solubilizar primero el Na_2EDTA, y posteriormente solubilizar el $FeSO_4*7H_2O$. Las preparaciones a 20X de concentración mostraron ser más estables a la precipitación, sin calentamiento, ni ajuste de pH.

Luego de la preparación del Stock 5, el cual corresponde a las vitaminas, las cuales son más susceptibles a la descomposición y por lo tanto se mantiene en congelación, se recomienda dosificar la dosis requerida por cada litro (o por dos), pues esto permite que no haya perdida de actividad de estos compuestos en el tiempo por efecto de la excesiva descongelación – congelación.

Para la preparación de un litro de medios de cultivo, se debe proporcionar la cantidad mencionada en la Tabla anterior. Se sugiere colocar 500 ml de agua antes de la adición de los stocks al frasco de preparación, para prevenir la precipitación, y luego de esto adicionar la sacarosa y los reguladores de crecimiento, mezclar y llevar hasta 950 ml, para posteriormente ajustar al valor del pH deseado con HCl, o con NaOH (también es posible con KOH). Luego de ajustar el pH, se adiciona el agente gelificante cuando se requiera, y finalmente se lleva a un volumen de 1 L con agua destilada.