UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio metabolómico de células de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Apocynaceae) cultivadas en suspensión, como respuesta al tratamiento con dos elicitores de la biosíntesis de compuestos fenólicos

Dary Luz Mendoza Meza

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Química
Medellín, Colombia
2019

Estudio metabolómico de células de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. cultivadas en suspensión, como respuesta al tratamiento con dos elicitores de la biosíntesis de compuestos fenólicos

Dary Luz Mendoza Meza

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Biotecnología

Director:

Ph.D., Mario Evelio Arias Zabala

Línea de Investigación:

Producción de Metabolitos Secundarios de Células Vegetales

Grupo de Investigación:

Biotecnología Industrial

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Química

Medellín, Colombia

2019

(Dedicatoria o lema)

A mi madre, por su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada con recursos de las siguientes instituciones:

- Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Convocatoria Nacional De Proyectos Para El Fortalecimiento De La Investigación, Creación E Innovación De La Universidad Nacional De Colombia 2016-2018. Código del proyecto: 35515.

- Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia – COLCIENCIAS. Convocatoria 776-2017. Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación Francisco José de Caldas" - (Grant No. FP44842-006-2018).

Y el apoyo de:

- Fondo del Sistema de regalías de la Gobernación del Atlántico y COLCIENCIAS - Doc. Nal. Convocatoria 673. "Créditos Educativos Condonables Para La Formación De Capital Humano De Alto Nivel Para Las Regiones –Departamento Del Atlántico".

- Universidad del Atlántico, a través de la Comisión de Estudios de Doctorado. Resolución de Rectoría No. 000117 de 21 de enero de 2015.

- Laboratorio de Bioconversiones de la Universidad Nacional de Colombia, Medellín-Colombia, donde se realizó la investigación.

- Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Nacional Autónoma de México (LURMN), Instituto de Química de la UNAM (IQ-UNAM), donde se realizó la pasantía de doctorado y se desarrollaron los experimentos de metabolómica.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta metabólica de células de *Thevetia peruviana* cultivadas en suspensión a escala de matraz agitado y tratadas con dos elicitores. Se estableció que estas células *in vitro* poseen un perfil fitoquímico similar al de la planta de origen, detectándose metabolitos de alto interés biomédico como glucósidos cardiotónicos (GC), flavonoides (Fv), compuestos fenólicos (CF) y antioxidantes (AA). El mayor contenido de estos metabolitos se detectó durante la fase de crecimiento exponencial, de manera extracelular; a nivel intracelular no se detectaron variaciones significativas. Se estableció que 300 µM de ácido salicílico (AS) y 3µM de jasmonato de metilo (MeJA), adicionados el día 4, aumentaron significativamente el contenido intracelular de CF, Fv y AA. Particularmente, MeJA incrementó 2,55 veces el contenido de Fv; 1,49 veces los CF y 1,66 veces la AA, a las 72 h. El efecto del MeJA sobre el metabolismo fenólico se confirmó mediante espectroscopia FT-NIR, HPLC y análisis multivariante (AMV); MeJA también incrementó la producción de ácido clorogénico y disminuyó la producción de dihidroquercetina. El perfilado metabólico de las células, usando resonancia magnética nuclear (^{1}H-RMN y J-resuelto) y AMV, reveló que MeJA causa reprogramación metabólica de las células, provocando aumento de la glucosa, prolina y glutamina y disminución de la sacarosa. Estas respuestas serían necesarias para la biosíntesis fenólica. En contraste, AS revirtió el efecto de MeJA en el tratamiento con ambos elicitores. Estos resultados contribuyen al conocimiento del metabolismo de *T. peruviana*, permitiendo mejorar la aplicación de los cultivos *in vitro* de células vegetales a la producción de metabolitos de alto valor como la DHQ.

Palabras clave: *Thevetia peruviana*; cultivos de células vegetales; perfil metabólico; ácido salicílico, Jasmonato de metilo; compuestos fenólicos; elicitores.

Abstract

The objective of this work was to study the metabolic response of plant cell cultures of *Thevetia peruviana* at shake flask scale under treatement with two elicitors. It was established that these in vitro cells have a phytochemical profile similar to that obtained from native plant, detecting metabolites of high biomedical interest such as cardiac glycosides (CG), flavonoids (Fv), phenolic compounds (PC) and antioxidants (AA). The highest content of these metabolites was detected during the exponential growth phase, extracellularly; at intracellular level no significant variations were detected. It was established that 300 µM salicylic acid (SA) and 3 µM methyl jasmonate (MeJA), added on day 4, significantly increased the content of PC, Fv and AA. In particular, MeJA increased the Fv content by 2.55 times; 1.49 times the CF and 1.66 times the AA, at 72 h. The effect of MeJA on phenolic metabolism was confirmed by FT-NIR spectroscopy, HPLC and multivariate analysis (MVA); MeJA also increased the production of chlorogenic acid and decreased dihydroquercetin. Metabolic profiling of the cells, using nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR and J-resolved) and MVA, revealed that MeJA causes metabolic reprogramming of the cells, causing an increase in glucose, proline and glutamine, and a decrease in sucrose. These responses would be necessary for phenolic biosynthesis. In contrast, SA reversed the effect of MeJA in the treatment with both elicitors. These results contribute to the knowledge of the metabolism of *T. peruviana*, in order to improve the application of *in vitro* plant cell cultures to produce high value metabolites as DHQ.

Keywords: *Thevetia peruviana*; plant cell culture; metabolic profile; salicylic acid, methyl jasmonate; phenolic compounds; elicitors.

Contenido

Pág.

Resumen. IX

Abstract. X

Lista de figuras..... XIV

Lista de tablas XIX

Lista de Abreviaturas..... XXI

Introducción 1

1. Capítulo 1. Producción y perfil de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de Thevetia peruviana (Pers.) K. Schum 7
1.1 Resumen 7
1.2 Introducción 8
1.3 Materiales y métodos 13
1.3.1 Reactivos..... 13
1.3.2 Cultivo de callos..... 13
1.3.3 Cultivos de células en suspensión 14
1.3.4 Cinética de crecimiento..... 15
1.3.5 Análisis fitoquímico preliminar..... 15
1.3.6 Cuantificación de CF, Fv, AA y GC totales..... 17
1.3.7 Perfil HPLC de metabolitos..... 18
1.3.8 Análisis estadístico 19
1.4 Resultados y discusión 19
1.4.1 Cultivo de células vegetales *in vitro* 19
1.4.2 Análisis fitoquímico preliminar..... 20
1.4.3 Determinación de CF, Fv, GC, AA. 24
1.4.4 Perfil HPLC de metabolitos..... 27
1.4.5 Cuantificación de la DHQ..... 31
1.5 Conclusiones 33
Bibliografía..... 33

2. Capítulo 2. Efecto elicitor del ácido salicílico y jasmonato de metilo en la producción de biomasa, compuestos fenólicos, flavonoides y antioxidantes en cultivos de células en suspensión de Thevetia peruviana..... 41
2.1 Resumen 41
2.2 Introducción 42
2.3. Materiales y métodos 44

2.3.1. Reactivos 44
2.3.2. Suspensiones celulares.....44
2.3.3. Preparación de los elicitores.....44
2.3.4. Efecto del AS y MeJA en la producción de biomasa, CF, Fv y AA (intracelulares y extracelulares). 44
2.3.5. Optimización de las condiciones de elicitación 45
2.3.5.1. Tiempo de adición del elicitor. 45
2.3.5.2. Tiempo de exposición al elicitor.....46
2.3.6. Métodos analíticos 46
2.3.6.1. Procesamiento de las muestras 46
2.3.6.2. Determinación de la producción de biomasa 47
2.3.6.3. Determinación de la producción de metabolitos 47
2.3.7. Perfil HPLC de metabolitos 48
2.3.8. Análisis estadístico.....49
2.4. Resultados y discusión 49
2.4.1. Suspensiones celulares.....49
2.4.2. Efecto de AS y MeJA en la producción de biomasa, CF, Fv y AA.....49
2.4.3. Optimización de las condiciones de elicitación. 53
2.4.3.1. Variable: tiempo de elicitación 53
2.4.3.2. Variable: tiempo de exposición al elicitor 56
2.4.4. Perfil HPLC de metabolitos 59
2.4.5. Cuantificación de DHQ y ácido clorogénico. 65
2.5. Conclusión.....68
Bibliografía 69

3. Capítulo 3. Detección de cambios en la inducción de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de T. peruviana tratadas con ácido salicílico y jasmonato de metilo, usando espectroscopia FT-NIR y RP-HPLC combinada con análisis multivariante discriminante (AMV).....75
3.1. Resumen 75
3.2. Introducción 76
3.3. Materiales y métodos.....79
3.3.1. Reactivos. 79
3.3.2. Cultivos de células en suspensión.....79
3.3.3. Tratamiento de con los elicitores 79
3.3.4. Análisis FT-NIR 80
3.3.5. Análisis RP-HPLC 81
3.4. Resultados y discusión 82
3.4.1. FT-NIR y AMV de los datos espectrales 82
3.4.2. Perfilado RP-HPLC y AMV de los datos cromatográficos 88
3.5. Conclusiones 93
Bibliografía 93

4. Capítulo 4. Perfil metabólico basado en ^{1}H-RMN de cultivos de células en suspensión de Thevetia peruviana tratados con ácido salicílico y jasmonato de metilo. 99
4.1. Resumen 99
4.2. Introducción 100
4.3. Materiales y métodos.....101

4.3.1. Reactivos 101
4.3.2. Suspensión celular de cultivo de *T. peruviana* 102
4.3.3. Tratamiento de los cultivos con los elicitores 102
4.3.4. Extracción de metabolitos intracelulares 103
4.3.5. Mediciones de RMN 103
4.3.6. Preprocesamiento de espectros RMN 104
4.3.7. Análisis multivariable (AMV) de los datos RMN 105
4.3.8. Identificación y cuantificación de metabolitos 105
4.3.9. Análisis de datos 106
4.4. Resultados y discusión 106
4.4.1. Análisis de espectros ^{1}H-RMN 106
4.4.2. AMV de los datos espectrales de RMN 113
4.4.3. Cuantificación de metabolitos 116
4.4.4. Efecto de los elicitores en el perfil metabólico – Análisis cuantitativo 120
4.5. Conclusión 127
Bibliografía 128

5. Conclusiones y recomendaciones 135
5.1. Conclusiones 135
5.2. Recomendaciones 138

A. Anexo: Curvas de Calibración Estándar de Ácido Gálico, Quercetina, peruvósido y Trolox. 139

B. Anexo: Cromatogramas de Extractos EtOH*aq* de células de *T. peruviana* tratados con HCl 20%. 140

C. Anexo: Curva de Calibración Estándar de la Dihidroquercetina 143

D. Anexo: Diseño del Experimento de Elicitación (Concentración del elicitor) 144

E. Anexo: Diseño del Experimento de Elicitación (Tiempo de adición del elicitor) 147

F. Anexo: Análisis estadístico para la optimización del tiempo de elicitación en la producción de compuestos fenólicos (CF). 149

G. Anexo: Análisis estadísticos del efecto de la variable tiempo de elicitación en la producción de Biomasa.. 152

H. Anexo: Análisis de Regresión Líneal. 154

I. Anexo: Curva de Calibración Estándar del Ácido Clorogénico 155

Bibliografía general 156

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Glucósidos cardiotónicos identificados en frutos y semillas de *T. peruviana*. . 9

Figura 1-2: Compuestos flavonoides identificados en hojas y frutos de *T. peruviana*.. ... 10

Figura 1-3: Frutos (A); explantes al inicio de la formación de los callos (B); cultivos *in vitro* de callos friables (C) y células en suspensión (D) de *T. peruviana* 14

Figura 1-4: Curva de crecimiento de cultivos de células en suspensión 20

Figura 1-5: TLC de extractos de *T. peruviana*. Detección de glucósidos cardiotónicos (I y II), triterpenos (III) y esteroides (IV) en extractos de EtOH *aq* (E) y AcoEt (A) de explantes, callos y suspensiones celulares de *T. peruviana*..... 22

Figura 1-6: TLC de extractos de *T. peruviana*. Detección de compuestos fenólicos (I), flavonoides (II) y antioxidantes (III) en extractos EtOH *aq* (E) y AcoEt (A) de explantes, callos y suspensiones celulares de *T. peruviana*..... 23

Figura 1-7: Contenido de compuestos fenólicos (A), flavonoides (B), glucósidos cardiotónicos (C) y actividad antioxidante (D) en el medio de cultivo de las suspensiones celulares de *T. peruviana* (extracelulares)..... 26

Figura 1-8: Perfil cromatográfico (HPLC) a 280 nm de extractos intracelulares en EtOH aq y en el medio de cultivo (extracelular) de las suspensiones celulares de *T. peruviana*, entre los días 5 y 10 de cultivo de la fase de crecimiento exponencial.. 28

Figura 1-9: A) Comparación del cromatograma (280 nm) y el espectro de absorción UV/vis de un extracto EtOH *aq* de células de *T. peruviana* cosechadas en el día 5 de cultivo y el estándar de la dihidroquercetina. B) Estructura de la dihidroquercetina. 29

Figura 1-10: Comparación de cromatogramas (280 nm) de extractos EtOH aq de células de *T. peruviana* (día 5 de cultivo) antes y después de la hidrólisis con HCl 20%.. 30

Figura 1-11: Cuantificación de dihidroquercetina extracelular e intracelular en los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*. 32

Figura 2-1: Optimización de la variable tiempo de adición del elicitor en la producción de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*.. 54

Figura 2-2: Efecto de la variable tiempo de adición del elicitor en la acumulación de biomasa en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*.. 55

Figura 2-3: Optimización de la variable tiempo de exposición al elicitor sobre la acumulación de compuestos fenólicos (A), flavonoides (B) y antioxidantes (C) intracelulares en los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* tratadas con MeJA 3µM, AS 300 µM y la combinación AS/MeJA (3 µM/300 µM)..... 57

Figura 2-4: Cultivos de células en suspensión control y tratadas con MeJA (3 µM) y AS (300 µM)..... 58

Figura 2-5: Perfil HPLC de extractos etanólicos (intracelulares) de suspensiones celulares de *T. peruviana* control (A) y tratadas con AS (B), MeJA (C) y AS/MeJA (D), cosechadas a diferentes tiempos (24, 48, 72, 96 y 120 horas post-elicitación)..... 60

Figura 2-6: Cromatograma HPLC (280 nm) y espectro de absorción UV/vis del estándar ácido clorogénico y el extracto intracelular de una suspensión celular de *T. peruviana* tratada con MeJA 3 µM y cosechada a las 72 h post-elicitación. 61

Figura 2-7: Perfil HPLC de extractos etanólicos hidrolizados (intracelulares) de las suspensiones celulares de *T. peruviana* control (A) y tratadas con AS (B), MeJA (C) y AS/MeJA (D), cosechadas a diferentes tiempos de cultivos (24, 48, 72, 96 y 120 h)..... 62

Figura 2-8: Cromatograma (280 nm) de extractos etanólicos hidrolizados de suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con MeJA 3 µM. 63

Figura 2-9: Cromatograma HPLC (280 nm) y espectro de absorción UV/vis del ácido salicílico y el extracto etanólico de una suspensión celular de *T. peruviana* tratada con AS/MeJA y cosechada a las 72 h post-elicitación. 64

Figura 2-10: Perfil HPLC del medio de cultivo (extracelular) de suspensiones celulares de *T. peruviana* control (A) y tratadas con AS (B), MeJA (C) y AS/MeJA (D), cosechadas a diferentes tiempos (24, 48, 72, 96 y 72 h)..... 65

Figura 2-11: Concentración de DHQ intracelular (aglicona y conjugada) y extracelular en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* sin y con elicitación, cosechadas a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-elicitación..... 66

Figura 3-1: Espectros FT-NIR sin procesar de las muestras de *T. peruvana* (biomasa), tratadas con AS, MeJA, AS/MeJA y el control (n = 60). 82

Figura 3-2: Espectros FT-NIR de la biomasa de *T. peruvana* procesados con el algoritmo SNV + 1Der.....83

Figura 3-3: A) Gráfico de score bidimensional y B) gráfico de loadings para los tres primeros componentes principales del PCA de los espectros FT-NIR de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA.....84

Figura 3-4: A) Gráfico de score bidimensional y B) gráfico de loadings para los tres primeros componentes principales del PLS-DA de los espectros FT-NIR de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA.....86

Figura 3-5: A) Gráfico de score bidimensional y B) gráfico de loadings para los tres primeros componentes principales del OPLS-DA de los espectros FT-NIR de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA.....87

Figura 3-6: Perfiles de HPLC (280 nm) de los extractos de la biomasa de *T. peruviana* tratadas con AS, MeJA y AS/MeJA, cosechadas 24, 48, 72, 96 y 120 h post-elicitación. Se muestran los datos brutos de los cromatogramas apilados (n = 60). 89

Figura 3-7: A) Gráfico de score y B) Loadings bidimensionales del PCA de los datos cromatográficos de extractos de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA.. 90

Figura 3-8: A) Gráficos de score y B) Loadings del PLS-DA del OPLS-DA de los datos cromatograficos de extractos de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA. 91

Figura 3-9: A) Gráficos de score y B) Loadings bidimensionales del OPLS-DA de los datos cromatograficos de extractos de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA.. 92

Figura 4-1: Superposición de espectros ^{1}H-NMR apilados [700 MHz, 298 K, 50% de MeOH-d4 / D2O (KH_2PO_4, pH 6,0)] de extractos intracelulares de cultivo de suspensión celular de *T. peruviana*.....107

Figura 4-2: ^{1}H-RMN (a) y proyección JRES (b) correspondientes a la misma muestra de extracto intracelular de suspensiones celulares de *T. peruviana*.....113

Figura 4-3: Gráfico de scores del PCA de los datos espectrales ^{1}H-RMN de extractos intracelulares de las suspensiones celulares de *T. peruviana* recolectados en diferentes momentos (24, 48, 72, 96, 120 y 144 h) después del tratamiento con AS (azul), MeJA (rojo), AS/ MeJA (amarillo) y controles (verde).....114

Figura 4-4: Gráfico de score del OPLS-DA de los datos espectrales de ^{1}H-RMN de extractos intracelulares de las suspensiones celulares de *T. peruviana* recolectados en diferentes momentos (24, 48, 72, 96, 120 y 144 h) después del tratamiento con AS (azul), MeJA (rojo), AS/MeJA (amarillo) y controles (verde).. 115

Figura 4-5: Cantidad relativa de metabolitos identificados en las suspensiones celulares de *T. peruviana*. Controles y tratamientos con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA. ..117

Figura 4-6: Cantidad relativa de metabolitos identificados en las suspensiones celulares de *T. peruviana*. Controles y tratamientos con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA. .118

Figura 4-7: Gráfico de score (a) y gráfico de loadings (b) del PCA de la respuesta metabolómica de las suspensiones de *T. peruviana* a diferentes tratamientos.....120

Figura 4-8: Dendrograma HCA de la respuesta metabolómica (datos cuantitativos) de las células de *T. peruviana* a los tratamientos con AS (azul), MeJA (rojo), AS/MeJA (amarillo) y control (verde). 121

Figura 4-9: Doble dendrograma de HCA de respuesta metabolómica (datos cuantitativos) para los diferentes tratamientos de elicitación de cultivos de células en suspensión de plantas de *T. peruviana* (control, AS, MeJA y AS/MeJA). 122

Figura 4-10: Gráfico de score de los análisis PLS-DA (a) y OPLS-DA (b) de la respuesta metabolómica (datos cuantitativos) a los diferentes tratamientos: AS (azul), MeJA (rojo), AS/MeJA (amarillo) y controles (verde).. 123

Figura 4-11: Esquema propuesto de interacción entre el metabolismo primario con la ruta fenólica en cultivos de suspensión celular de *T. peruviana* a las 72 h después de la elicitación.. 126

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Reactivos para la detección de metabolitos por TLC. 16

Tabla 1-2: Análisis fitoquímico preliminar de explantes, callos y células en suspensión de *T. peruviana*. 21

Tabla 1-3: Contenido intracelular de compuestos fenólicos (CF), flavonoides (Fv), glucósidos cardiotónicos (GC) y actividad antioxidante (AA) en extractos etanólicos de explantes, callos y suspensiones celulares de *T. peruviana*. 25

Tabla 1-4: Concentración de intracelular y extracelular de DHQ (mg/100 mL). 31

Tabla 2-1: Contenido de compuestos fenólicos (CF) y acumulación de biomasa en las suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con AS y MeJA. 50

Tabla 2-2: Contenido de flavonoides (Fv) y antioxidantes (AA) en las suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con diferentes concentraciones de AS y MeJA. 51

Tabla 2-4: Tiempos de retención (t_R) a 280 nm y absorbancia máximas de los estándares analíticos de fenoles y flavonoides usados en el estudio. 59

Tabla 2-5: Concentración total de dihidroquercetina y ácido clorogénico (intracelular y extracelular) en las suspensiones celulares de *T. peruviana* con y sin tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA. 67

Tabla 4-1: Desplazamientos químicos (δ en ppm) de los metabolitos detectados en los espectros de ^{1}H-RMN (CH_3OH-d4-K_2HPO_4 en D_2O, 1:1(v/v), pH 6,0) de cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*. 110

Tabla 4-2: Importancia variable en los valores de proyección (VIP) para los componentes predictivos y ortogonales en el modelado de datos OPLS-DA. 124

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AA	Actividad antioxidante
AMV	Análisis multivariado
AS	Ácido Salicílico
CF	Compuestos fenólicos
CHI	Chalcona Isomerasa
CL	Cromatografía Líquida
DAD	Detector de arreglo de diodos
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EM	Espectrometría de masas
EP	Equivalentes de peruvósido
EQ	Equivalentes de quercetina
ET	Equivalentes Trolox
FT-NIR	Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier
Fv	Flavonoides
GC	Glucósidos cardiotónicos
HCA	Mapa de calor
HMBC	Espectroscopia de coherencia heteronuclear de enlaces múltiples.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSQC	Espectroscopia de coherencia heteronuclear cuántica simple.
JA	Jasmonatos
JRES	Proyecciones del J-resuelto
MeJA	Jasmonato de metilo
OPLS-DA	Análisis discriminantes de mínimos cuadrados parciales ortogonales
PAL	Fenil alanina liasa
PCA	Análisis de componentes principales
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SG	Algoritmo de Savirzky-Golay
SNV	Varianza Normal Estándar
TLC	Cromatografía de capa fina
TOCSY	Espectroscopia de Correlación total.
t_R	Tiempo de retención
μ_{max}	Velocidad máxima de crecimiento

Introducción

Colombia posee gran diversidad de especies vegetales que podrían ser fuente de productos farmacéuticos valiosos; a pesar de esto, el desarrollo del sector productivo de los fitoterapéuticos es bajo comparado con otros países de América, debido en parte a los altos costos de extracción y purificación de los principios activos o por la dificultad de obtenerlos por síntesis química. Por lo anterior, se hace necesario desarrollar métodos alternativos para incrementar la productividad de compuestos valiosos, reduciendo los tiempos y costos de producción.

Thevetia peruviana (Pers.) K. Schum es un arbusto ornamental ampliamente conocido a nivel fitoquímico por el alto contenido de glucósidos cardiotónicos (GC) que causan efectos similares a la digoxina (Kohls et al., 2012; Kumar et al., 2015). Esta planta también produce metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Hassan et al., 2011; Dabur et al., 2007), bactericida (Bhoyar et al., 2014), antiviral (Tewtrakul et al., 2002) y anticancerígena (Haldar et al., 2015; Tian et al., 2016), que la hacen una especie atractiva para la industria farmacéutica. Algunas de estas actividades se han relacionado con la presencia de compuestos fenólicos (CF), en especial de flavonoides (Fv). Sin embargo, la disponibilidad del recurso biológico para la extracción y caracterización de los metabolitos bioactivos está francamente limitada por el área de tierra cultivada y por factores bióticos y abióticos que pueden afectar la biosíntesis de estos compuestos en la planta (Pavarini et al., 2012; Ramakrishna et al., 2011). Con el propósito de solucionar estos inconvenientes, se han desarrollado métodos biotecnológicos, como el cultivo *in vitro* de órganos, tejidos y células vegetales (Arias et al., 2009; Arias et al., 2011).

Los cultivos *in vitro* de células vegetales en suspensión se consideran una fuente particularmente atractiva para la producción de metabolitos secundarios de alto valor económico; como ejemplos están, la producción de taxol desde *Taxus brevifolia*; ajmalicina desde *Catharanthus roseus*; metformina desde *Galega officinalis*; digoxina desde *Digitalis lanata*; y morfina desde *Papaver somniferum* (Shilpa et al., 2010). El

desarrollo de cultivos de células vegetales se fundamenta en el carácter totipotente de estas células, las cuales son capaces de retener la información genética completa de la planta y por lo tanto tienen la capacidad de sintetizar el perfil de metabolitos encontrados en su progenitora (Ramachandra et al., 2002). Cultivos *in vitro* de células en suspensión de *T. peruviana* fueron establecidos desde hace algunos años por el Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia. A la fecha se ha logrado una producción estable y constante de biomasa, también se ha demostrado la capacidad de los cultivos para producir GC (Arias et al., 2010) y CF totales (Arias et al., 2016). No obstante, el mantenimiento de estos cultivos resulta costoso por lo que es necesario implementar estrategias que incrementen su productividad, con miras a lograr el equilibrio costo-beneficio.

Una de estas estrategias es la adición de elicitores o inductores del metabolismo a los cultivos celulares. Los elicitores se definen como factores que inician, mejoran u orientan la biosíntesis de compuestos específicos en un sistema de células vivas (Namdeo et al., 2007). El uso de elicitores en biotecnología vegetal se fundamenta en la característica general de todas las células vivas de responder a señales del medio ambiente mediante cambios en la expresión génica (Zhong et al., 2014). Los elicitores generalmente se clasifican de acuerdo con su naturaleza, en bióticos o abióticos; y de acuerdo con su origen, en exógenos o endógenos. Los elicitores bióticos son sustancias biológicas que pueden proceder de la pared celular de las plantas (pectinas, celulosa, etc.) o de microorganismos (quitina, glucanos, etc.); también pertenecen a este grupo algunas hormonas de señalización (ácido abscísico, jasmonato/etileno, ácido salicílico, etc), glicoproteínas, proteínas G o proteínas intracelulares cuyas funciones están acopladas a receptores y que producen efectos metabotrópicos o ionotrópicos. Los elicitores abióticos no poseen origen biológico e incluyen sales inorgánicas, iones metálicos y factores físicos (pH, luz, temperatura, etc.) (Manoj et al., 2011; Namdeo et al., 2007).

El ácido jasmónico (JA) es una fitohormona endógena que provoca respuestas de estrés en las plantas y aumentan la acumulación de metabolitos secundarios mediante la regulación de actividades enzimáticas específicas (Weathers et al., 2010). Entre las funciones fisiológicas del JA está la respuesta de defensa frente al ataque de insectos, patógenos, heridas o procesos de desecación (Reymond & Farmer, 1998). El JA y su éster metílico, el jasmonato de metilo (MeJA), se utilizan frecuentemente como elicitores

biológicos en cultivos de células vegetales, causando estimulación de la biosíntesis de una amplia variedad de metabolitos secundarios, incluidos diferentes clases de CF (Krzyzanowska et al., 2011; Sudha et al., 2002; Ding et al., 2004). Otra fitohormona utilizada usada comúnmente como elicitor es el ácido salicílico (AS); esta es una molécula de señalización endógena que producen las plantas como defensa a patógenos (Reymond & Farmer, 1998). Se ha demostrado que AS induce la producción de CF en cultivos celulares de *Salvia miltiorrhiza* (Dong et al., 2010); también induce la expresión de genes relacionados con la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, incrementando de una manera rápida y transitoria las actividades de enzimas tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la chalcona isomerasa (CHI) (Dixon et al., 2002).

Los estudios del efecto de los elicitores sobre el metabolismo vegetal generalmente se realizan usando enfoques de investigación de caja negra, es decir desde el punto de vista de las entradas que recibe y las salidas o respuestas que produce en el sistema biológico, sin tener en cuenta lo que sucede internamente. La presente investigación planteó el uso de la metabolómica basada en ^{1}H-RMN para estudiar el efecto de AS y MeJA, en el metabolismo de células de *T. peruviana* cultivadas en suspensión. El propósito, al incorporar esta herramienta analítica, fue ampliar el número de marcadores para el estudio del efecto de los elicitores, lo que proporcionaría una visión holística del sistema biológico bajo las condiciones investigadas. Por lo tanto, con esta estrategia se busca detectar cambios en el perfil o concentración de múltiples metabolitos bajo determinada condición de elicitación; también se pretende obtener información sobre posibles vínculos entre los diferentes conjuntos de reacciones metabólicas que son posiblemente alteradas por la elicitación.

El objetivo general de la investigación fue estudiar la respuesta metabólica de la biosíntesis de CF en células de *T. peruviana* cultivadas en suspensión, debido al tratamiento con dos elicitores. Los objetivos específicos fueron:

- Evaluar la producción y el perfil de compuestos fenólicos intra y extracelulares en los cultivos en suspensión de *T. peruviana*, a escala de matraz agitado.
- Determinar el efecto del AS y MeJA en la producción de biomasa, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y actividad antioxidante total en las células de *T. peruviana* cultivadas en suspensión.

- Optimizar la producción de compuestos fenólicos en los cultivos tratados con AS o MeJA.
- Establecer los posibles cambios en la composición y concentración de compuestos fenólicos o sus precursores, en las células en suspensión de *T. peruviana* expuestas al AS o MeJA.

El manuscrito se encuentra dividido en 4 capítulos. En el capítulo 1, titulado: "**Producción y perfil de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum**" se demuestra la capacidad de la línea celular de *T. peruviana* para producir los metabolitos de interés (compuestos fenólicos, CF), encontrándose estos a nivel intracelular y extracelular (medio de cultivo) y estableciéndose la concentración más alta el día 8 de crecimiento (fase exponencial); en este capítulo también se presenta el perfil de los metabolitos (intracelulares y extracelulares) de las suspensiones celulares determinados mediante HPLC, dando cumplimiento al objetivo 1. En el capítulo 2, titulado: "**Efecto elicitor del ácido salicílico y jasmonato de metilo en la producción de biomasa, compuestos fenólicos, flavonoides y antioxidantes en cultivos de células en suspensión de *Thevetia peruviana***", se demuestra el efecto del tratamiento con AS y MeJA en la producción de biomasa, estableciéndose que MeJA tiene efecto negativo sobre este parámetro, mientras que AS no tiene efecto significativo, comparado con el control; también, se demuestra que AS y MeJA tienen efecto en la producción de los metabolitos de interés (CF, Fv, AA), incrementaron significativamente su producción de una manera dependiente de la concentración y el tiempo de adición del elicitor. Adicionalmente, a través de la aplicación de arreglos factoriales multinivel y un diseño de bloques completamente al azar se logró establecer la concentración del elicitor, tiempo de adición del elicitor y tiempo de exposición al elicitor que mejoraron significativamente la producción de CF, Fv y AA, lo cual demuestra el cumplimiento de los objetivos 2 y 3. En el capítulo 3, titulado "**Detección de cambios en la inducción de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* tratadas con ácido salicílico y jasmonato de metilo, usando espectroscopia FT-NIR y RP-HPLC combinada con análisis multivariante discriminante (AMV)**" se evidencia que el tratamiento de las suspensiones celulares de *T. peruviana* con AS y MeJA, cultivadas bajo las mejores condiciones de elicitación establecidas en el capítulo 2, produce cambios en la composición de CF. Además, se evidencia como la aplicación de

plataformas analíticas de alto rendimiento como la espectroscopia de infrarrojo cercano (FT-NIR) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinada con análisis multivariante (AMV) mejoran la discriminación de los tratamientos, evidenciándose la influencia de los cambios en producción y composición de los CF. En el caso específico del HPLC se demuestra que compuestos como el ácido clorogénico y la dihidroquercetina, son determinantes para la discriminación de los tratamientos de acuerdo al tipo de elicitor y el tiempo de exposición al elicitor. En el mismo sentido, en el capítulo 4, titulado: "**Perfil metabólico basado en ^{1}H-RMN de cultivos de células en suspensión de *Thevetia peruviana* tratados con ácido salicílico y jasmonato de metilo**" demuestra que las células de *T. peruviana* responden de forma diferente al tratamiento con los elicitores provocando cambios cualitativos y cuantitativos en la biosíntesis de CF y de algunos precursores. Particularmente, la aplicación de la ^{1}H-RMN combinada con el AMV al estudio de los perfiles metabólicos de las células de *T. peruviana*, revela que el tratamiento con MeJA ocasiona variaciones cuantitativas en algunos metabolitos primarios (i.e., aumento en las concentraciones intracelulares de glucosa, prolina y glutamina y disminución de la sacarosa); estos cambios serían necesarios para la biosíntesis de CF como el ácido clorogénico, ácido ferúlico y bencil-glucósidos. De acuerdo con lo anterior, los capítulos 3 y 4 evidencian el cumplimiento del objetivo 4.

La presente investigación hace aportes valiosos al conocimiento del efecto de dos moléculas de señalización (AS y MeJA) en la producción de biomasa y de compuestos de interés farmacéutico, como son los CF y Fv, en un cultivo de células en suspensión de *T. peruviana*. Previo a este estudio no se tenía conocimiento sobre el efecto de la aplicación de estas moléculas, de manera independiente o combinada, sobre el metabolismo de *T. peruviana*. Se resalta que en este estudio la optimización de variables asociadas a la elicitación de los cultivos, tales como el tiempo de adición al elicitor y el tiempo de exposición al elicitor, lo cual es un avance en la obtención de un producto de base biotecnológica. De especial interés es la detección del flavonoide dihidroquercetina y de los ácidos clorogénico y ferúlico en los cultivos celulares de *T. peruviana*, debido a su potencial fitoterapéutico.

1. Capítulo 1

Producción y perfil de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de *Thevetia peruviana (Pers.) K. Schum.*

1.1 Resumen

Thevetia peruviana es un arbusto ornamental que crece en muchas regiones tropicales del mundo. Esta planta produce metabolitos secundarios con propiedades biológicas de interés para la industria farmacéutica. El objetivo del presente estudio fue evaluar la producción y el perfil de compuestos fenólicos en las suspensiones celulares de *T. peruviana*, cultivadas a escala de matraz agitado. Inicialmente se realizó un análisis fitoquímico preliminar de los metabolitos presentes en las suspensiones celulares, comparándolos con los callos y explantes. También se determinó el contenido total de compuestos fenólicos (CF), flavonoides (Fv), glucósidos cardíotónicos (GC) y antioxidantes (AA). El perfil químico de CF y Fv, en los cultivos celulares se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis fitoquímico preliminar mostró resultados positivos para alcaloides, aminoácidos, antioxidantes, glucósidos cardiotónicos, leucoantocianidinas, flavonoides, fenoles, azúcares y triterpenos en todas las muestras; además, por cromatografía de capa fina (TLC) se evidenció mayor número de componentes correspondientes a CF y Fv en extractos etanólicos (EtOH) de las suspensiones celulares. En el medio de cultivo celular se detectó un contenido máximo de CF, Fv, GC y AA entre los días 6 y 12 de crecimiento; mientras que, el contenido intracelular de estos metabolitos fue relativamente constante durante la fase de crecimiento exponencial (0 a 12 días). El análisis HPLC detectó un

compuesto con un tiempo de retención de 11,6 minutos, correspondiente a la dihidroquercetina, un flavonoide con propiedades anti-cáncer. Hasta donde conocemos no existen reportes previos de la presencia de este compuesto en la planta o en cultivos *in vitro* de sus células. Estos resultados evidencian la utilidad de cultivos celulares de *T. peruviana* en la producción de metabolitos de valor farmacéutico.

Palabras clave: *Thevetia peruviana*, cultivos vegetales *in vitro*, metabolitos secundarios, dihidroquercetina, HPLC.

1.2 Introducción

Thevetia peruviana (Pers.) K. Schum es una planta que se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales de Centro y Sur América (Bandara et al., 2010). En Colombia se encuentra en las regiones de la Amazonía, Andina y Caribe, donde se usa principalmente como planta ornamental (Cardenas et al., 2011). Esta especie es reconocida por contener GC, como peruvósido y tevetinas (Figura 1-1), especialmente concentrados en sus frutos y semillas (Kohls et al., 2012; Kohls et al., 2015; Kumar et al., 2015); estos metabolitos tienen un efecto ionotrópico positivo similar a la digoxina (Kramer, 1955) por lo que son de especial interés para la industria farmacéutica.

En el fruto y hojas de *T. peruviana* también se concentran otros metabolitos secundarios con actividad biológica relevante, como los CF (Heldar et al., 2015; Ramos-Silva et al., 2017; Tewtrakul et al., 2002); estos compuestos constituyen un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios que cumplen funciones de defensa frente a factores bióticos y abióticos en las plantas (Moura et al., 2010). La mayoría de los CF reportados en *T. peruviana* son Fv, del tipo flavonoles y flavanonas glicosiladas (Voigtländer & Balsam, 1970; Abe et al., 1995; Tewtrakul et al., 2002) (Figura 2-1).

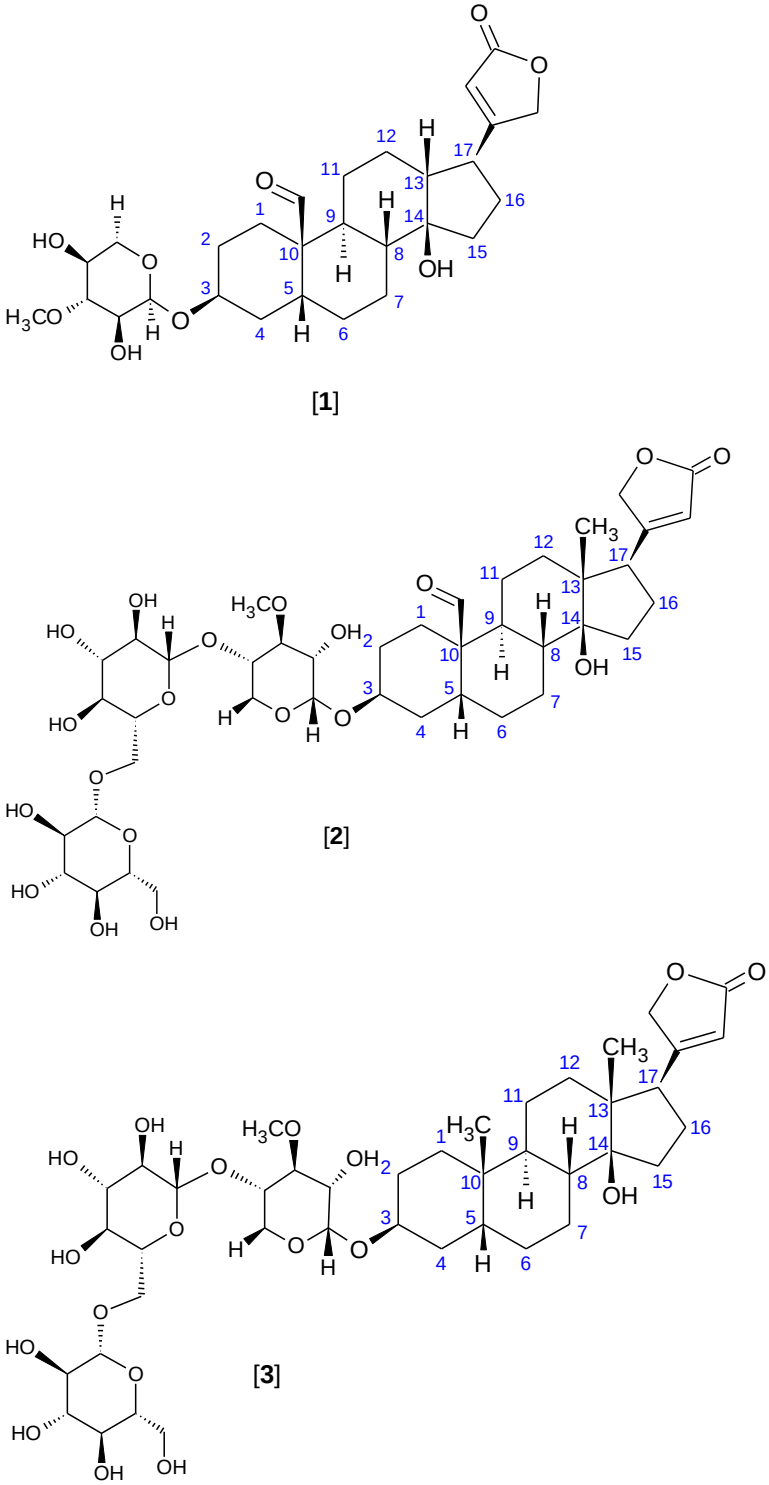


Figura 1-1: Glucósidos cardiotónicos identificados en frutos y semillas de *T. peruviana*. [1] Peruvósido; [2] Tevetina A; [3] Tevetina B

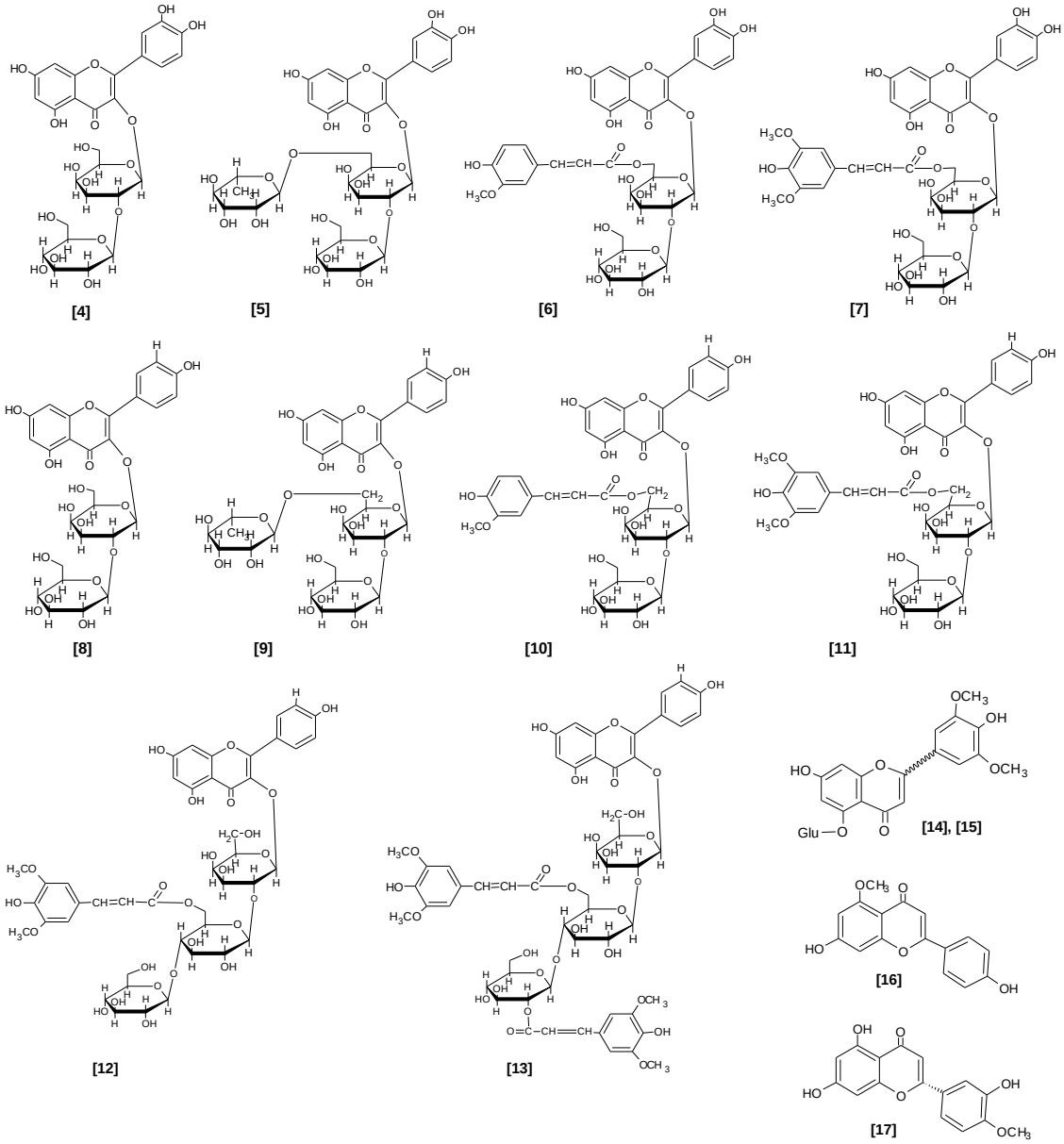


Figura 1-2: Compuestos flavonoides identificados en hojas y frutos de *T. peruviana* (Voigtländer & Balsam, 1970; Abe et al., 1995; Tewtrakul et al., 2002). [4] Quercetin 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosido]; [5] Quercetin 3-O-{β-D-glucopiranosil-(1→2)-[α-L-rhamonopiranosil-(1→6)]-β-D-galactopiranosido}; [6] Quercetin 3-O-[(6-O-feruloil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosido]; [7] Quercetin 3-O-[(6-O-sinapoil)-β−D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosido]; [8] Kaempferol 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosido]; [9] Kaempferol 3-O-{β-D-glucopiranosil-(1→2)-[α-L-rhamonopiranosil-(1→6)]-β-D-galactopiranosido}; [10] Kaempferol 3-O-[(6-O-feruloil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosido]; [11]

Kaempferol 3-O-[(6-O-sinapoil)-β−D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosido]; [12] Kaempferol 3-O-β-D-glucopiranosil(1→4)[6-O-sinapoil-β-D-glucopiranosil] (1→2)-β-D-galactopiranosido; [13] Kaempferol 3-O-[2-O-sinapoil-β-D-glucopiranosil (1→4)[6-O-sinapoil-β-D-glucopiranosil] (1→2)-β-D-galactopiranosido; [14] (2R)-5-O-β-D-glucopiranosil-7,49-dihidroxi-39,59-dimetoxiflavanona; [15] (2S)-5-O-β-D-glucopiranosil-7,49-dihidroxi-39,59-dimetoxiflavanona; [16] Apigenina-5-metileter [Thevetiaflavona]; [17] Hesperetina.

La presencia de Fv en extractos metanólicos del fruto de *T. peruviana* ha sido asociada con actividad antitumoral y anti-metastásica en diferentes líneas celulares de cáncer humano y de ratón. Heldar et al., 2015 demostraron el efecto antitumoral de extractos metanólicos del fruto de *T. peruviana* contra la línea celular de carcinoma de ascitis de Ehrlich en ratones albinos suizos, asociando esta actividad con la presencia de componentes antioxidantes en el extracto. En otro estudio, Ramos-Silva et al., 2017 demostraron que fracciones metanólicas del fruto, conteniendo el flavonoide apigenina-5-metileter (también llamada thevetiaflavona), producen inhibición de la proliferación, motilidad y adhesión de las células humanas de cáncer colorectal y de mama, así como inducción de la apoptosis en líneas celulares humanas de cáncer de próstata y pulmón, con efectos mínimos sobre células no tumorigénicas. Por otra parte, Tewtrakul et al., 2002 describieron que los flavonoles quercetin 3-O-[(6-O-sinapoil)-ß-D-glucopiranosil-(1→2)-ß -D-galactopiranosido] y quercetin 3-O-[(6-O-feruloil)-ß-D-glucopiranosil-(1→2)-ß-D-galactopiranosido], aislados en extractos etanólicos de hojas de *T. peruviana,* muestran actividad contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1), causando inhibición *in vitro* de las enzimas integrasa y transcriptasa reversa asociada a la ADN-polimerasa viral. El alto potencial farmacéutico de estas moléculas plantea la necesidad de disponer de una fuente continua de material biológico de calidad para su extracción, purificación y aplicación en ensayos de actividad *in vitro* e *in vivo*.

El cultivo de células vegetales se ha usado como estrategia para incrementar la producción de compuestos biológicamente valiosos (Ochoa-Villareal et al., 2016). Diversos grupos de metabolitos, incluyendo alcaloides, flavonoides, polifenoles, terpenos, triterpenos y cardiotónicos se han producido con éxito en este tipo de cultivos a escala de laboratorio. No obstante, son muy pocos los compuestos que hoy día se producen comercialmente usando está tecnología, debido principalmente a problemas como la baja

productividad, crecimiento lento e inestabilidad genética de los cultivos. Actualmente, el mejor ejemplo de aplicación industrial del cultivo de células vegetales en suspensión es la producción de Taxol™ (nombre genérico: paclitaxel), un fármaco anticancerígeno producido en cultivos de células en suspensión de *Taxus spp* (Karuppusamy, 2009).

Los rendimientos de producción de los metabolitos de interés no siempre son adecuados, aun en líneas celulares altamente productoras, lo cual puede estar relacionado con ciertas condiciones del cultivo *in vitro* (por ejemplo: nutrición, oxigenación, exposición a la luz y agitación, entre otros) que pueden alterar el metabolismo celular activando o inactivando la biosíntesis de algunos compuestos o causando modificaciones químicas en aquellos aislados previamente en la planta (Shimoda et al., 2002; Schmeda-Hirschmann et al., 2005). Por esta razón, para lograr altos rendimientos y producciones consistentes, es necesario analizar tanto el crecimiento de células como la cuantificación de los productos deseados mediante técnicas analíticas cromatográficas y espectroscópicas.

Previamente se ha reportado la producción de cultivos celulares *in vitro* de *T. peruviana* (Arias et al., 2010; Rincón-Pérez et al., 2016). También se ha demostrado su capacidad para producir CF totales (Arias et al., 2016; Arias et al., 2017). Sin embargo, poco se sabe sobre el perfil de estos compuestos (intra y extracelulares) durante el crecimiento de las células. Por lo anterior, el propósito del presente estudio fue evaluar la producción y el perfil de CF en las suspensiones celulares de *T. peruviana*, cultivadas a escala de matraz agitado.

En este estudio se logró evidenciar que las células de *T. peruviana* cultivadas en suspensión presentan los principales grupos de metabolitos encontrados en los callos y explantes procedentes del fruto, incluidos CF y Fv. Se destaca la detección por HPLC del compuesto dihidroquercetina (DHQ); este es un flavononol con actividad antioxidante y anti-cáncer. En nuestro conocimiento este compuesto no había sido reportado previamente en la planta o en cultivos *in vitro* de células de *T. peruviana*.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Reactivos

Ácido salicílico, Jasmonato de metilo (95%); reactivo de Folin & Ciocalteu (2N), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), sal diamonio de 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico) (ABTS), ácido pícrico, 2-Aminoetil difenilborinato (NP); y los siguientes estándares analíticos grado HPLC: peruvósido (90%), nerifolina (95 %), betulina (98%), ácidos ursólico (90%), oleanólico (97%), clorogénico (95%), gálico (> 99%), trans-sinapico (≥ 99%), trans-ferúlico (99%), quercetina (≥ 95%), (±)-hesperetina (≥ 98%), kaempferol (≥ 90%) y dihidroquercentina (≥ 85%), fueron comprados en Sigma (Chemical, St. Louis, MO, USA). Acido cafeico fue provisto por ICN Biomedicals Inc. Todos los solventes usados en este estudio fueron grado analítico, marca Merck (Darmstadt, Germany).

1.3.2 Cultivo de callos

El cultivo de callos de *T. peruviana* se obtuvo a partir de colectados en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (6º 15' 46.8''N; 75º 34' 41.6''W), siguiendo un protocolo estandarizado previamente en nuestro laboratorio (Arias el al., 2010). En resumen, los frutos se sumergieron en etanol del 70% por 5 min, luego fueron transferidos a una solución de NaClO al 10% por 5 min. Entre los lavados y después de los lavados los frutos fueron enjuagados 3 veces con agua destilada estéril. Se retiró la cáscara de los frutos y la pulpa se cortó en láminas de 2-3 mm para obtener los explantes. Estos se sembraron asépticamente en medio sólido SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), suplementado con 2 mg L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 0,5 mg L^{-1} de kinetina; 7 g L^{-1} de agar; 30 g L^{-1} de sacarosa y 3 mg L^{-1} de mioinositol (pH 5,8), esterilizado a 20 psi durante 20 min. Se mantuvieron en un fotoperiodo normal a temperatura ambiente (25 ± 2 ºC), realizando subcultivos cada 3 semanas hasta obtener callos friables (Figura 1-3).

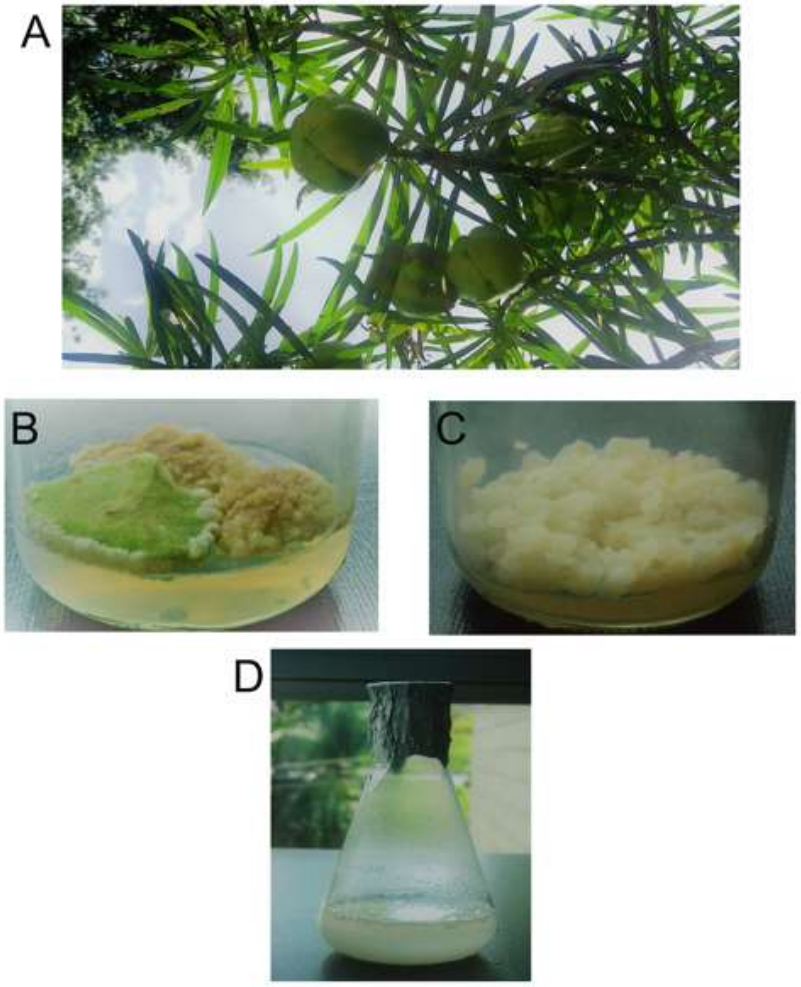


Figura 1-3: Frutos (A); explantes al inicio de la formación de los callos (B); cultivos *in vitro* de callos friables (C) y células en suspensión (D) de *T. peruviana*

1.3.3 Cultivos de células en suspensión

Un inóculo de aproximadamente 10 g de callos friables se transfirió a 100 mL de medio líquido SH estéril, previamente suplementado con 2 mg L^{-1} de 2,4-D y 0,5 mg L^{-1} de kinetina, 30 g L^{-1} de sacarosa y 3 mg L^{-1} de mioinositol (pH 5,8), en matraces de 250 mL. Los cultivos se mantuvieron en un agitador orbital a 110 rpm, con fotoperiodo normal a 25 ± 2 ºC. Se realizaron subcultivos cada 2 semanas a partir de 2 g L-1 de inóculo como se describe en Arias el al., 2010.

1.3.4 Cinética de crecimiento

Se realizó la curva de crecimiento de las células en suspensión en matraces de 250 mL, usando un inóculo de 4 días y concentración inicial de 2-3 g L^{-1} en 100 mL de medio líquido SH estéril suplementado, bajo las condiciones de cultivos descritas arriba. Se midió el peso seco de la biomasa cada dos días durante 20 días, previa filtración del medio de cultivo y secado de la biomasa a 60 ºC durante 24 h en un horno de convección. El crecimiento celular se expresó en gramos de biomasa seca por litro de cultivo (g L^{-1}). La biomasa y el medio de cultivo (15 mL) recolectada en cada tiempo, se almacenaron a - 20 ºC para el análisis posterior de los metabolitos intracelulares y extracelulares, respectivamente. La curva se realizó por triplicado.

1.3.5 Análisis fitoquímico preliminar

Aunque el objetivo principal de este estudio fue evaluar la producción de CF en los cultivos celulares de *T. peruviana*, se decidió realizar un análisis fitoquímico preliminar de las principales familias de metabolitos producidos por la planta de origen (explante) y en los cultivos celulares (callos y suspensiones), para evaluar de forma rápida si las condiciones de crecimiento *in vitro* podrían estar modificando la bioquímica de las células. En especial, se incluyó el análisis de glucósidos cardiotónicos y triterpenos por ser los quimiotipos de referencia en el estudio de *T. peruviana.* El análisis fitoquímico se realizó mediante ensayos de coloración y precipitación (vía húmeda) y por cromatografía en capa fina.

- Análisis por vía húmeda

Las muestras (explantes, callos y biomasa de las suspensiones celulares) se secaron a 60 ºC por 24 h, luego se pulverizaron en un mortero. El material resultante fue usado para identificación preliminar de las familias de metabolitos secundarios. Se realizaron ensayos de coloración y precipitación en tubos de ensayo de acuerdo a protocolos descritos previamente (Sanabria, 1983). Los resultados se presentaron en términos de presencia (+) o ausencia (-) del metabolito.

- Análisis por cromatografía en capa fina (TLC)

Se prepararon extractos de las muestras en dos tipos de solventes, acetato de etilo (AcoEt) y solución acuosa de etanol al 50 % v/v (EtOH *aq*), seleccionados con base en

un cribado previo. Un peso de 0,5 g de las muestras secas y pulverizadas de los explantes, callos y suspensiones celulares, se extrajo con 25 mL del solvente en un baño ultrasónico (frecuencia 40 kHz) durante 30 min a 30 ºC. Los homogenizados resultantes se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min. Diez mililitros de cada extracto (EtOH *aq* y AcoEt) se concentraron en un rotavaporador (IKA® HB10) a presión reducida de 72 y 240 mbar, respectivamente. El volumen restante de los extractos se almacenó a -20 ºC para el análisis posterior del contenido de metabolitos.

Los extractos concentrados se llevaron a 2 mL con el respectivo solvente. Posteriormente, se aplicaron 5 µL de cada extracto sobre placas de TLC Silica gel 60 F_{254} (Merck, Darmstadt, Germany) de dimensiones 10 x 10 cm. Se usó la siguiente mezcla de solventes como fase móvil 1: AcoEt: MeOH: agua (100:13.5:10 v/v/v) y fase móvil 2: BuOH: AcOH: agua (25:1:24, v/v/v). Las cromatoplacas se revelaron con diversos reactivos de tinción, siguiendo protocolos descritos previamente (Waldi, 1965; Zarzycki, 2015) (Tabla 1-1). Después del revelado, las cromatoplacas se fotografiaron y se almacenaron en formato JPGE, luego se analizaron los factores de retención (Rf) con el software de acceso libre JustQuantify (http://justquantify.eu/DefaultHD.aspx).

Tabla 1-1: Reactivos para la detección de metabolitos por TLC.

Reactivo	**Metabolito detectado**
Reactivo de Folin & Ciocalteu	Fenólicos, reductores
Reactivo (NP/Polietilenglicol) / $UV_{360\ nm}$	Flavonoides
Solución etanólica de $AlCl_3$ (10 % p/v) /$UV_{360\ nm}$.	
Solución metanólica de DPPH (0,08 % p/v).	Antioxidantes
Solución etanólica de ácido sulfurico (50 % v/v) /$UV_{360\ nm}$	Glucósidos cardiotónicos
Reactivo de Anisaldehido – ácido sulfúrico	Azúcares y glucósidos digitálicos
Reactivo de Liebermann-Burchard (LB)/ $UV_{360\ nm}$	Triterpenos y esteroides
Solución saturada de cloruro de antimonio (III)/ $UV_{360\ nm}$	Glucósidos cardiotónicos y terpenos

1.3.6 Cuantificación de CF, Fv, AA y GC totales.

La producción de CF, Fv y AA se determinó en los extractos de EtOH *aq* (metabolitos intracelulares) y directamente en el medio de cultivo filtrado de las suspensiones celulares (metabolitos extracelulares) durante la cinética de crecimiento. Al medio de cultivo no se le hizo ninguna extracción o tratamiento. También se incluyó el análisis de contenido de GC como referencia del comportamiento bioquímico del cultivo. La cuantificación se realizó por métodos fotocolorimétricos, como sigue:

- *Compuestos fenólicos (CF)*

Se determinaron mediante el método de Folin & Ciocalteu (Slinkard et al., 1977). Se mezcló 2 mL de muestra con 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10%; después de 2 min, se agregó 2 mL de Na_2CO_3 al 7,5% y se incubó durante 10 min a 50 ºC. La absorbancia de la reacción se midió a 765 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 Spectronic (Thermo Fisher Scientific®). El contenido de CF de cada muestra se calculó usando una curva de calibración estándar de ácido gálico (80 – 40 – 20 – 10 y 5 mg mL^{-1}) (Anexo A). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de cultivo (mg EAG L^{-1}) o por gramo de peso seco de biomasa (mg EAG /g BS).

- *Flavonoides (Fv)*

Se usó el método de complejación de flavonoides-aluminio ($AlCl_3$) (Pekal et al., 2014) para su determinación. En resumen, 1 mL de muestra se mezcló con 0,3 mL de $NaNO_2$ al 5%. Después de 5 min de incubación en oscuridad se agregaron 0,5 mL de $AlCl_3$ al 2%. La muestra se agitó suavemente y se neutralizó 6 min más tarde con 0,5 mL de NaOH 1N. Después de 10 min, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 425 nm. El contenido de Fv se calculó utilizando una curva de calibración estándar de quercetina (200 – 100 – 25 – 12,5 y 6,25 mg mL^{-1}) (Anexo A). Los resultados se expresaron en miligramos equivalente de quercetina por litro de cultivo (mg EQ L^{-1}) o por gramo de peso seco de biomasa (mg EQ /g BS).

- *Actividad antioxidante (AA)*

Se realizó mediante el ensayo de decoloración de cationes radicales ABTS (Re et al., 1999). Previamente, se preparó una solución acuosa de ABTS (7 mM) y se obtuvo el

catión radical mezclando volúmenes iguales de solución ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM. La mezcla se incubó en oscuridad durante 16 h a 14 ºC y posteriormente se diluyó en agua destilada hasta una absorbancia de 0,70 ± 0,1 a 734 nm. Se mezclaron 3 mL de la solución diluida de $ABTS^{\bullet+}$ con 100 µL de muestra y la mezcla se incubó durante 10 min en oscuridad; luego se midió la absorbancia a 734 nm usando agua como blanco. La actividad AA de cada muestra se calculó utilizando una curva de calibración estándar de Trolox (Calbiochem®) (150 – 75 – 37,5 – 18,8 y 9,4 mg mL^{-1}) (Anexo A). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de Trolox por litro de cultivo (mg ET L^{-1}) o por gramo de peso seco de biomasa (mg ET/g BS).

- *Glucósidos cardiotónicos (GC)*

Se determinaron de acuerdo con el método descrito previamente (Tofighi et al., 2016) con algunas modificaciones. Se mezclaron 750 µL de la muestra con 750 µL de reactivo de Baljet recién preparado (95 mL de ácido pícrico al 1% + 5 mL de NaOH al 10%). La mezcla se incubó por una hora en oscuridad y luego se diluyó con 1,5 mL de agua destilada. La absorbancia de la reacción se midió a longitud de onda de 495 nm. Se preparó una curva de calibración estándar de peruvósido (400 – 200 – 100 – 50 – 25 – 12,5 y 6,25 mg L^{-1}) (Anexo A). Los resultados se expresaron en miligramos equivalente de peruvósido por litro de cultivo (mg EP L^{-1}) o por gramo de peso seco de biomasa (mg EP/ g BS).

1.3.7 Perfil HPLC de metabolitos

Se determinó el perfil HPLC de CF/Fv extracelulares e intracelulares durante la fase de crecimiento exponencial de los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana.* Con el propósito de analizar el contenido de agliconas de CF y Fv, los extractos se sometieron a hidrólisis ácida de acuerdo con el procedimiento descrito por Tu et al., 2017. En resumen, 2 mL de cada extracto se mezcló con 0,5 mL de una solución acuosa de HCl 20%. La mezcla se calentó a 85 ºC por 90 min, luego se dejó enfriar y el volumen se llevó a 10 mL con EtOH *aq* en un matraz aforado; después se filtró en membranas de 0,45 µm y se analizó por HPLC. Además, se analizó el medio de cultivo antes de agregar el inóculo, este se usó como blanco para diferenciar los componentes producidos por las células de aquellos presentes en el medio de crecimiento.

Los análisis se llevaron a cabo en un equipo de HPLC Shimadzu Prominence acoplado a un detector de matriz de diodos (SPD-M20 A). Para la separación cromatográfica se usó una columna de fase reversa LiChrospher1 250-4 RP-18, 5-mm (Merck S.A), operada a una temperatura de 28 ºC, una velocidad de flujo de 1,5 mL min^{-1} y un volumen de inyección de 20 µL. Se usó una fase móvil binaria, consistente de: A (ácido fórmico al 1 % en agua) y B (ácido fórmico al 1 % en acetonitrilo). El gradiente de elución fue el siguiente: 0 min (80 % A + 20 % B); 7 min (75 % A + 25 % B); 13 min (70 % A + 30 % B); 7 min (65 % A + 35 % B); 3 min (80 % A + 20 % B). Se seleccionó la longitud de onda de 280 nm para el análisis de los datos. Se compararon los tiempos de retención (t_R) y los datos de absorbancia UV-vis de los componentes presentes en las muestras y los obtenidos a partir de estándares analíticos de fenoles y flavonoides informados previamente en *T. peruviana* (Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical database) y otros disponibles en el laboratorio.

1.3.8 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se presentaron como valores de la media ± desviación estándar (DE). Las diferencias entre los tratamientos se evaluaron mediante ANOVA de una vía, también se realizaron comparaciones múltiples (por pares) mediante el método de la Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05 usando el software estadístico R-Studio versión 1.1.383.

1.4 Resultados y discusión

1.4.1 Cultivo de células vegetales *in vitro*

La producción de callos friables de *T. peruviana* duró aproximadamente 4 meses. Las suspensiones celulares fueron obtenidas a partir de este material biológico. La cinética de crecimiento se inició con un inóculo de 4 días (después de la fase *lag*); el crecimiento exponencial finalizó el día 12 alcanzando una cantidad máxima de producción de biomasa de 15,26 ± 0,71 g L^{-1} el día 14 (Figura 1-4). La velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) se alcanzó al día 12 de cultivo. Este resultado fue consistente con lo reportado previamente en estudios de células en suspensión de *T. peruviana* a escala de matraz agitado (Arias et al., 2010; Arias et al., 2016), evidenciándose la estabilidad de la línea

celular. La cinética de crecimiento es una de las actividades que se debe realizar rutinariamente para evaluar la estabilidad de las líneas celulares vegetales, también proporciona información acerca del momento en que las células alcanzan su máximo rendimiento (fase estacionaria). Frecuentemente en esta fase es cuando se incrementa la producción de los metabolitos secundarios (Gonçalves & Romano, 2017)

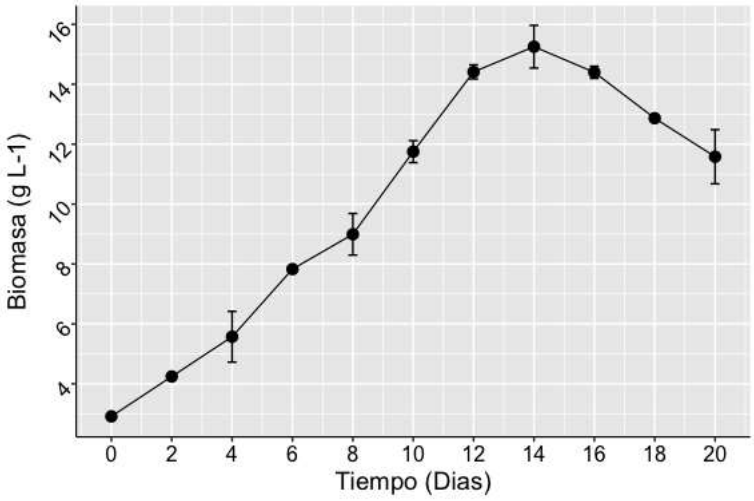


Figura 1-4: Curva de crecimiento de cultivos de células en suspensión

1.4.2 Análisis fitoquímico preliminar

La Tabla 1-2 presenta el resultado del tamizaje fitoquímico preliminar por vía húmeda de *T. peruviana*. Se observó alta correspondencia en las familias de metabolitos detectados en explantes, callos y suspensiones celulares; solo dos familias de metabolitos, saponinas y taninos, no se detectaron en los cultivos celulares. Adicionalmente, coumarinas se detectaron en los cultivos de células en suspensión, pero no en los explantes. Las coumarinas son una clase de CF que se derivan biogenicamente del ácido skiquimico (Matos et al., 2015), por lo que es posible que se encuentren en los explantes en concentraciones tan bajas que no fueron detectadas en el análisis fitoquímico preliminar. También, se observó similitud entre el perfil fitoquímico de las muestras y el reportado en la literatura científica para los frutos de *T. peruviana* (Rahman et al., 2014).

Tabla 1-2: Análisis fitoquímico preliminar de explantes, callos y células en suspensión de *T. peruviana*.

Grupo metabolito	Ensayo	Explantes (Pulpa fruto)	Callos	Células en Suspensión
Alcaloides	a) Dragendorf	+	+	+
	b) Mayer	+	+	+
Aminoácidos	Ninhidrina	+	+	+
Flavonoides	$AlCl_3$	+	+	+
Fenólicos	$FeCl_3$	+	+	+
Saponinas	Prueba de espuma	+	-	-
Triterpenos, esteroles	Libermann-Burchard	+	+	+
Glucósidos cardiotónicos	Reactivo de Baljet	+	+	+
Coumarinas	NaOH 5%	-	+	+
Azúcares	Keller Killiani	+	+	+
Leucoantocianidinas	HCl – Alcohol Amílico	+	+	+
Taninos	Gelatina-NaCl	+	-	-

Metabolito presente (+); ausente (-)

Las figuras 1-5 y 1-6 muestran los resultados del análisis fitoquímico por TLC de extractos EtOH *aq* y AcoEt de explantes, callos y suspensiones celulares de *T. peruviana*. La mayor cantidad de componentes correspondientes a triterpenos y esteroides se detectaron en los extractos de AcoEt; mientras que los correspondientes a CF, Fv y AA se detectaron principalmente en los extractos de EtOH *aq.* Los GC se detectaron tanto en los extractos EtOH *aq* como en los extractos AcoEt.

El análisis de los Rf de componentes revelados con H_2SO_4/UV_{360nm} y anisaldehído/H_2SO_4 sugiere la presencia de un componente con valor Rf cercano al peruvósido en los extractos EtOH *aq* de todas las muestras. Este compuesto había sido detectado y cuantificado previamente por HPLC en esta línea celular (Arias et al., 2016), lo cual evidencia la estabilidad de la ruta de biosíntesis en este sistema biológico. El peruvósido es uno de los cardiotónicos de *T. peruviana* de mayor interés, por sus efectos cardiovasculares y por los recientes hallazgos que sugieren su actividad como anti-leucémico (Feng et al., 2016) y antitumoral contra células de cáncer de mama triple

negativas y células positivas al receptor de estrógeno (ER+) (Kaushik et al., 2017). Debido a lo anterior, actualmente se realizan experimento de escalado en biorreactor de 7 litros para incrementar su producción en este sistema de cultivo (Arias, 2018).

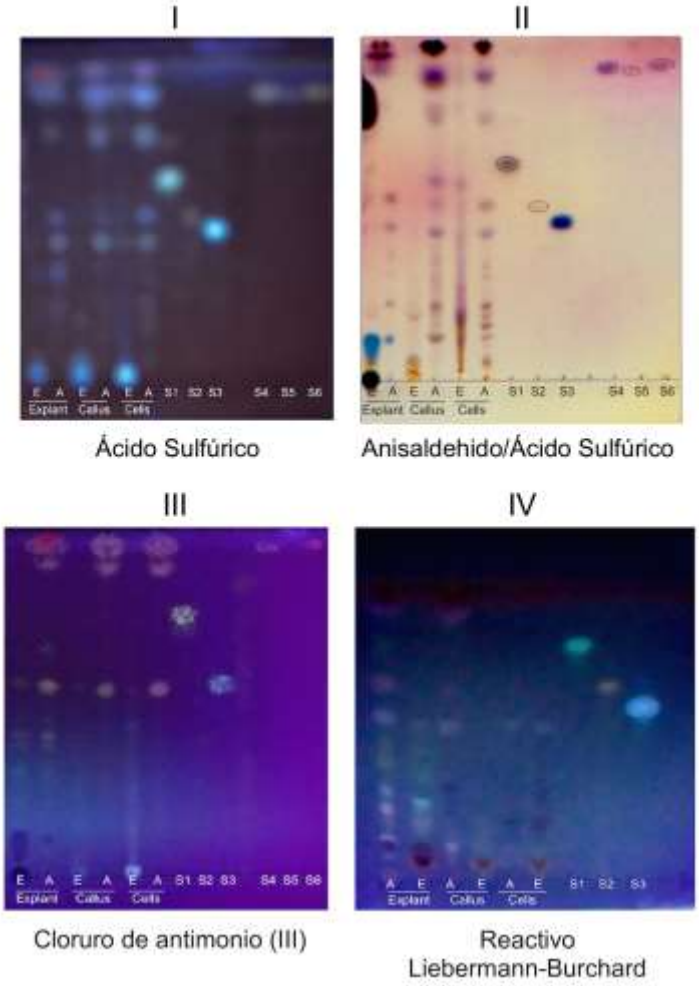


Figura 1-5: TLC de extractos de *T. peruviana*. Detección de glucósidos cardiotónicos (I y II), triterpenos (III) y esteroides (IV) en extractos de EtOH *aq* (E) y AcoEt (A) de explantes, callos y suspensiones celulares de *T. peruviana*. S1: nerifolina (200 µg/mL); S2: peruvósido (400 µg/mL); S3: digoxina (500 µg/mL); S4: ácido oleanólico (200 µg/mL); S5: betulina (200 µg/mL) y S6: ácido ursólico (200 µg/mL), respectivamente. Fase móvil: AcoEt: MeOH: Agua (100:13.5:10 v/v/v).

El revelado con anisaldehído/H_2SO_4 y con el reactivo de Liberman-Burchard detectó dos componentes con valor Rf cercano al de los triterpenoides ácido oleanólico y ácido

ursólico en los extractos de AcoEt. Estos compuestos son descritos en la literatura por sus actividades antibacterial, antiviral, antiulcerativa y antiinflamatoria (Wolska et al., 2010); por tanto, su presencia en los cultivos celulares *in vitro* de *T. peruviana* es de gran interés para estudios futuros que incluyan la confirmación de su identidad y la determinación de la productividad.

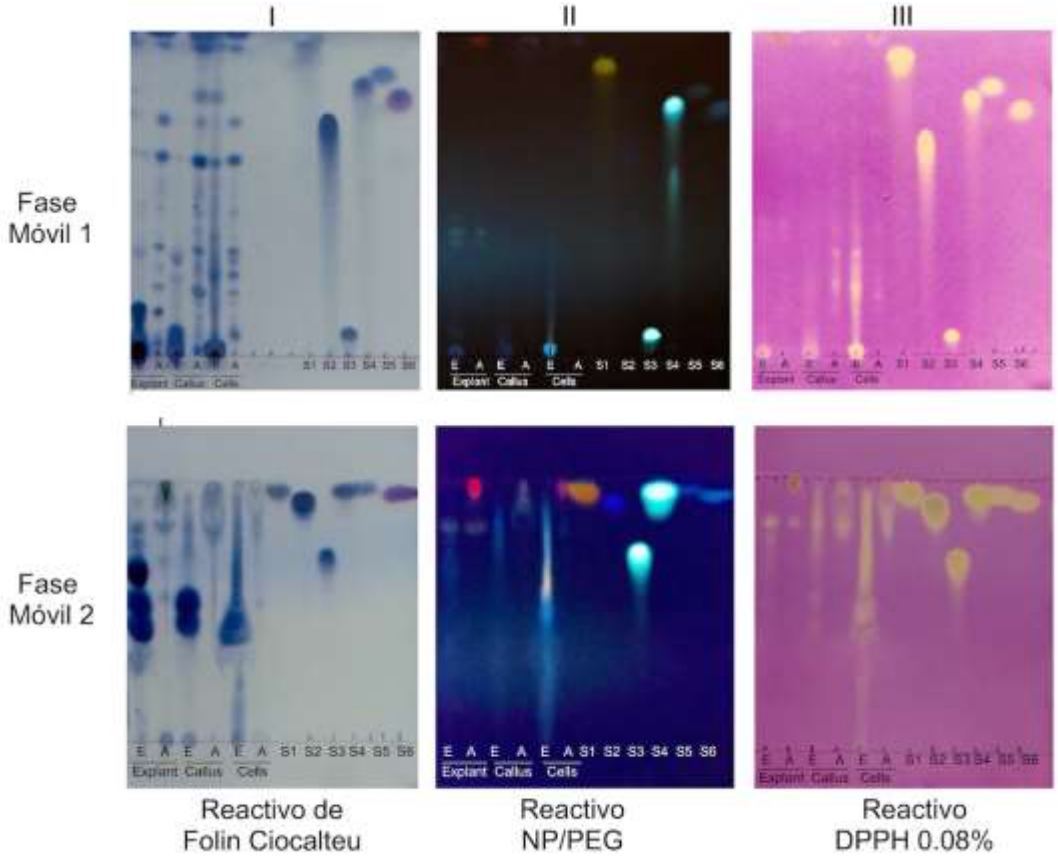


Figura 1-6: TLC de extractos de *T. peruviana*. Detección de compuestos fenólicos (I), flavonoides (II) y antioxidantes (III) en extractos EtOH *aq* (E) y AcoEt (A) de explantes, callos y suspensiones celulares de *T. peruviana*. S1 a S6 corresponden a los estándares dihidroquercetina, ácido gálico, clorogénico, cafeico, sinápico y ferúlico a la concentración de 100 µg/mL. Fase móvil 1: AcoEt:MeOH:Agua (100:13.5:10 v/v/v). Fase móvil 2: BuOH:AcOH:Agua (24:1:25, v/v/v).

Adicionalmente, se detectó un perfil complejo de componentes en las cromatoplacas reveladas con el reactivo de Folin-Ciocalteu, observándose diferencias entre el extracto del explante y los extractos de callos y suspensiones celulares (Figura 1-6). El reactivo

de Folin-Ciocalteu es usado comúnmente para revelar CF; no obstante, este reactivo también puede revelar otros compuestos como aminoácidos, ácido dehidroascórbico y azúcares reductores (ej. glucosa y fructosa) presentes en extractos crudos de las plantas (Everette et al., 2010), lo cual podría conducir a falsos positivos. Por lo anterior, las cromatoplacas también se revelaron con una solución etanólica del radical DPPH, la cual se utiliza para detectar compuestos antioxidantes como los CF y Fv; con este reactivo, se reveló un mayor número de componentes en el extracto EtOH *aq* de las suspensiones celulares; de forma similar, en este extracto también se detectaron más componentes Fv con el revelador NP/PEG. Los CF y Fv de *T. peruviana* son de gran interés biomédico, especialmente sinapoil y feruloil glucósidos de la quercetina y el kaempferol, los cuales se han descrito previamente por su actividad antiviral contra el VIH (Tewtrakul et al., 2002). Una característica de este grupo de metabolitos de *T. peruviana* es que generalmente se encuentran glicosilados formando moléculas polifenólicas complejas, lo cual explicaría que no se hayan detectaron usando estándares de Fv sencillos. No obstante, la detección preliminar de esta familia de metabolitos en los cultivos celulares de *T. peruviana* aporta información sobre el perfil químico de las suspensiones.

1.4.3 Determinación de CF, Fv, GC, AA.

La tabla 1-3 presenta los resultados de la determinación de los metabolitos intracelulares en extractos EtOH *aq* de explantes, callos y suspensiones celulares de *T. peruviana*. El análisis de ANOVA mostró que hay diferencia significativa en el contenido de CF (ANOVA: *valor-F* = 4,011; *valor-p* = 0,0095), Fv (ANOVA: *valor-F* = 12,460; *valor-p* = 3,2e-5) y AA (ANOVA: *valor-F* = 4,225; *valor-p* = 0,0076), encontrándose el contenido más alto en las suspensiones celulares; por el contrario, el contenido de GC (ANOVA: *valor-F* = 443,9; *valor-p* = 6,19e-15) fue significativamente mayor en los explantes. Cuando se compararon solamente las suspensiones celulares durante la cinética de crecimiento, se observó diferencias no significativas en el contenido de CF (ANOVA: valor-F = 1,826; *valor-p* = 0,224) y Fv (ANOVA: *valor-F* = 1,563; *valor-p* = 0,285) entre los 0 – 12 días, correspondiente a la fase de crecimiento exponencial; además, se observó diferencia no significativa en el contenido de AA durante toda la cinética de crecimiento (ANOVA: *valor-F* = 0,873; *valor-p* = 0,581). Contrariamente, el análisis del contenido de

GC mostró diferencia significativa entre los 0 – 20 días (ANOVA: *valor-F* = 79,320; *valor-p* = 8,77e-09), obteniéndose el contenido más alto en el día 14 (2,25 ± 0,10 mg EP/ g BS); no obstante, este valor fue 2,84 veces menor al determinado en los explantes.

Tabla 1-3: Contenido intracelular de compuestos fenólicos (CF), flavonoides (Fv), glucósidos cardiotónicos (GC) y actividad antioxidante (AA) en extractos etanólicos de explantes, callos y suspensiones celulares de *T. peruviana*.

Muestras	**CF** (mg EAG/g BS)	**Fv** (mg EQ/ g BS)	**GC** (mg EP/ g BS)	**AA** (mg ET/ g BS)
Explantes	2,49 ± 0,44^{b}	0,48 ± 0,18^{d}	6,39 ± 0,29^{a}	3,58 ± 0,24^{b}
Callos	3,50 ± 0,34^{a}	1,51 ± 0,29^{cd}	1,49 ± 0,01^{cd}	7,29 ± 0,11^{ab}
Células día 0	2,52 ± 0,01^{b}	1,41 ± 0,01^{bcd}	0,97 ± 0,01^{de}	7,29 ± 0,02^{ab}
Células día 2	3,23 ± 0,48^{ab}	1,66 ± 0,30^{bcd}	0,91 ± 0,04^{e}	10,63 ± 4,14^{a}
Células día 4	3,70 ± 0,11^{ab}	1,74 ± 0,07^{bcd}	1,20 ± 0,11^{cde}	10,11 ± 0,29^{a}
Células día 6	3,38 ± 0,09^{ab}	2,04 ± 0,27^{bc}	1,59 ± 0,02^{e}	9,83 ± 0,87^{a}
Células día 8	3,65 ± 0,31^{ab}	1,83 ± 0,08^{bcd}	1,33 ± 0,06^{cde}	10,24 ± 0,33^{a}
Células día 10	3,66 ± 0,24^{ab}	1,95 ± 0,60^{bc}	1,29 ± 0,04^{cde}	10,85 ± 2,18^{a}
Células día 12	3,30 ± 0,34^{ab}	2,33 ± 0,33^{abc}	1,20 ± 0,04^{cde}	10,27 ± 0,20^{a}
Células día 14	4,20 ± 0,36^{a}	2,67 ± 0,22^{ab}	2,25 ± 0,10^{b}	10,79 ± 0,38^{a}
Células Día 16	4,57 ± 0,39^{a}	2,87 ± 0,34^{ab}	1,14 ± 0,03^{cde}	10,86 ± 1,80^{a}
Células Día 18	4,57 ± 1,31^{a}	3,58 ± 0,47^{a}	0,99 ± 0,05^{de}	11,18 ± 0,23^{a}
Células Día 20	4,85 ± 0,37^{a}	3,77 ± 0,13^{a}	0,91 ± 0,09^{e}	10,54 ± 0,67^{a}

Valores de la media ± DE de 3 réplicas independientes. Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).
Las células en el dia 0 corresponden a cultivos en fase de crecimiento exponencial.

Uno de los problemas asociados al cultivo *in vitro* de células en suspensión es la disminución de la eficiencia de producción de algunos metabolitos. En este estudio, solamente los GC mostraron reducción significativa de su concentración en los cultivos celulares, comparado con los explantes. Se pueden emplear diferentes estrategias para mejorar la concentración de GC en los cultivos de *T. peruviana*, entre los cuales se encuentran modificaciones de condiciones de cultivo (i.e., temperatura, densidad y

calidad de la luz, etc.) y de parámetros como la agitación y aeración, los cuales están siendo evaluados en estudios alternos.

La figura 1-7 muestra los resultados de la determinación del contenido de metabolitos directamente en el medio de cultivo. El contenido más alto de CF y Fv se produjo el día 8 (59,08 ± 4,4 mg EAG L^{-1}) y el día 10 (128,25 ± 27,13 mg EQ L^{-1}), respectivamente. El nivel más alto de GC se produjo el día 6 (449,26 ± 54,21 mg EP L^{-1}), mientras que la máxima actividad AA se observó el día 12 (267,65 ± 12,24 mg ET L^{-1}). Este resultado revela que durante la fase de crecimiento exponencial se produce una liberación progresiva de estos metabolitos hacia el medio, lo cual representa una ventaja para la subsecuente separación de los metabolitos de interés.

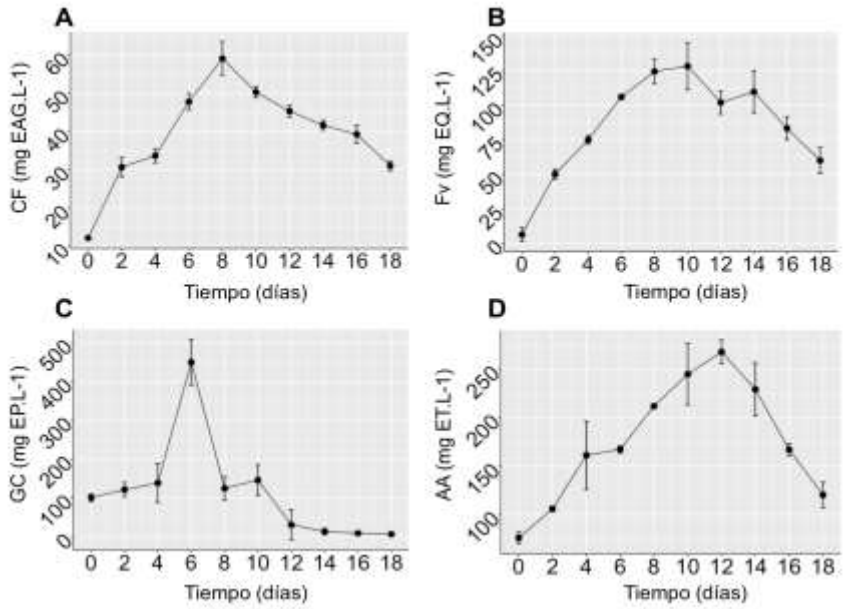


Figura 1-7: Contenido de compuestos fenólicos (A), flavonoides (B), glucósidos cardiotónicos (C) y actividad antioxidante (D) en el medio de cultivo de las suspensiones celulares de *T. peruviana* (extracelulares). Los resultados son presentados como el valor de la media ± DE de tres determinaciones independientes.

La presencia de metabolitos celulares en el medio de cultivo está relacionada con la capacidad que tienen las células de expulsar las sustancias tóxicas o las que no son requeridas para el metabolismo en un momento dado. En este sentido, se ha demostrado

que los metabolitos secundarios experimentan diferentes reacciones de biotransformación después de su biosíntesis (Ej: hidroxilación, esterificación o glicosilación), las cuales son determinantes para su excreción o almacenamiento. Kreis & Reinhard (1987) describieron la producción de formas glicosiladas de GC en un cultivo de células en suspensión de *Digitalis lanata*, los cuales se encontraron frecuentemente almacenados en vacuolas, mientras que las formas no glicosiladas o agliconas se encontraron en el medio de cultivo, lo cual sugería la capacidad de las agliconas para difundir rápidamente al medio extracelular, a través de la membrana plasmática. Un fenómeno similar fue descrito para los CF en cultivos de células en suspensión de *Catharanthus roseus* (Shimoda et al., 2002) y en otros cultivos de células vegetales (Tabata et al., 1988). En el caso de las suspensiones celulares de *T. peruviana*, es claro que durante la fase de crecimiento exponencial ocurre una progresiva liberación de metabolitos al medio de cultivo hasta que se alcanza un nivel máximo que varía dependiendo del tipo de compuesto, por lo que el contenido extracelular de los GC, CF y Fv estaría relacionado tanto con el incremento de la biomasa, como con la naturaleza química del metabolito. La subsecuente disminución de estos compuestos en el medio extracelular podría explicarse por uno o varios de los siguientes eventos: 1) los compuestos son retomados, biotransformados y utilizados para el metabolismo primario; 2) se reduce su biosíntesis por agotamiento de precursores y en consecuencia su excreción; o, 3) son degradados en el medio de cultivo. La comprobación del papel de la glicosilación en la excreción y almacenamiento de GC y CF en células de *T. peruviana* requerirá de experimentos adicionales, enfocados a la caracterización de este tipo de compuestos (glicósidos) a nivel intra y extracelular durante la cinética de crecimiento.

1.4.4 Perfil HPLC de metabolitos

La figura 1-8 muestra el perfil HPLC de los extractos etanólicos (intracelulares) y medios de cultivo (extracelulares) de las suspensiones de *T. peruviana* entre los días 5 a 10 (fase de crecimiento exponencial).

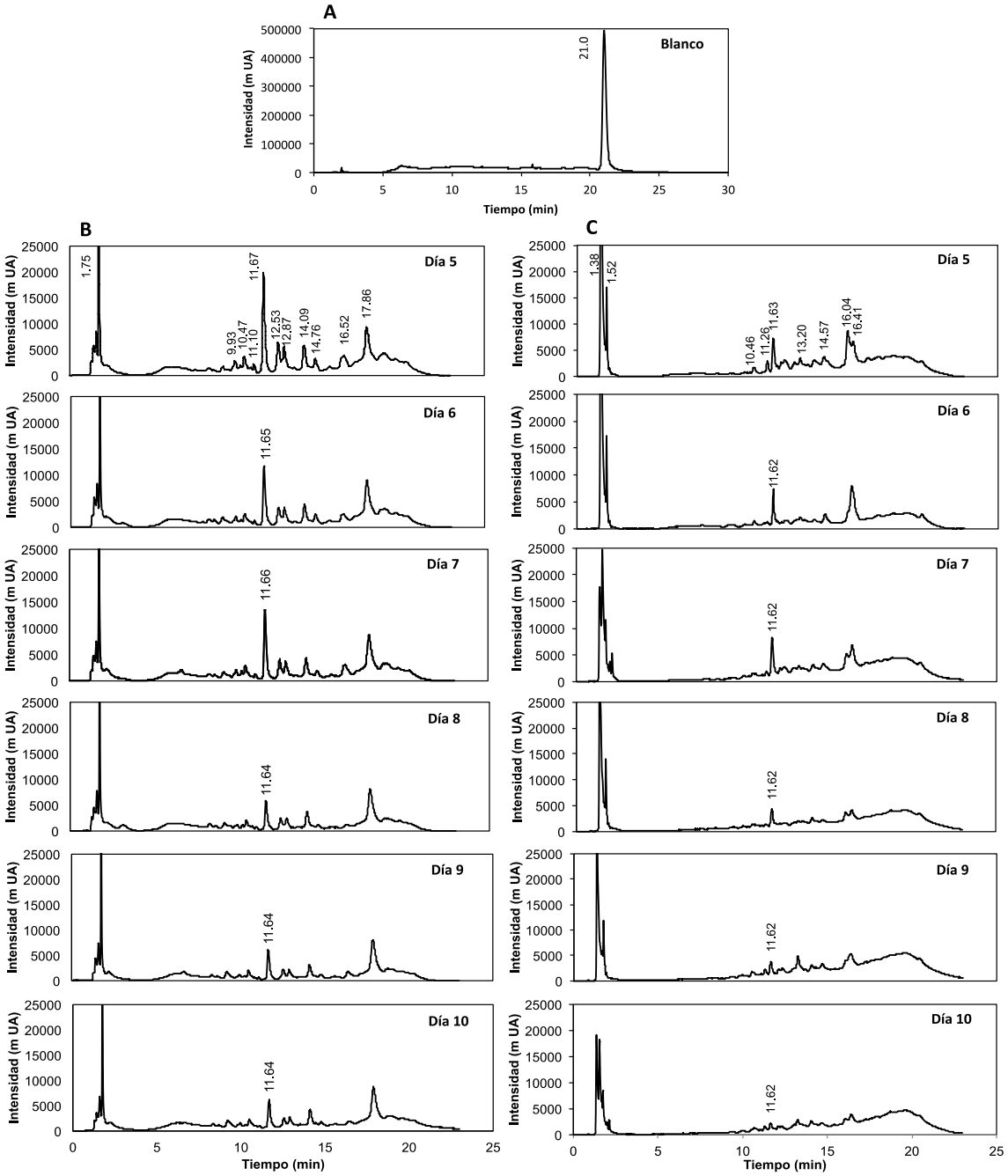


Figura 1-8: Perfil cromatográfico (HPLC) a 280 nm de extractos intracelulares en EtOH aq y en el medio de cultivo (extracelular) de las suspensiones celulares de *T. peruviana*, entre los días 5 y 10 de cultivo de la fase de crecimiento exponencial. A. Medio de cultivo sin inóculo (Blanco); B. Extractos intracelulares; C. Medio extracelular.

Se detectaron diferencias en el perfil cromatográfico de las muestras intracelulares y extracelulares, observándose un sólo pico común con t_R de 11,6 min. Este componente no está presente en el blanco (medio de cultivo sin inóculo), demostrándose que proviene de las células de *T. peruviana.* La comparación del t_R y las absorbancias máximas de cada uno de los componentes detectados en las muestras y los estándares arrojó que el componente con t_R de 11,6 corresponde al flavonoide dihidroquercetina (DHQ) (Figura 1-9). Por otra parte, el componente con t_R = 21 min que se detectó en el blanco no estuvo presente en las muestras (intra y extracelulares), debido posiblemente a su rápida metabolización por las células de *T. peruviana*.

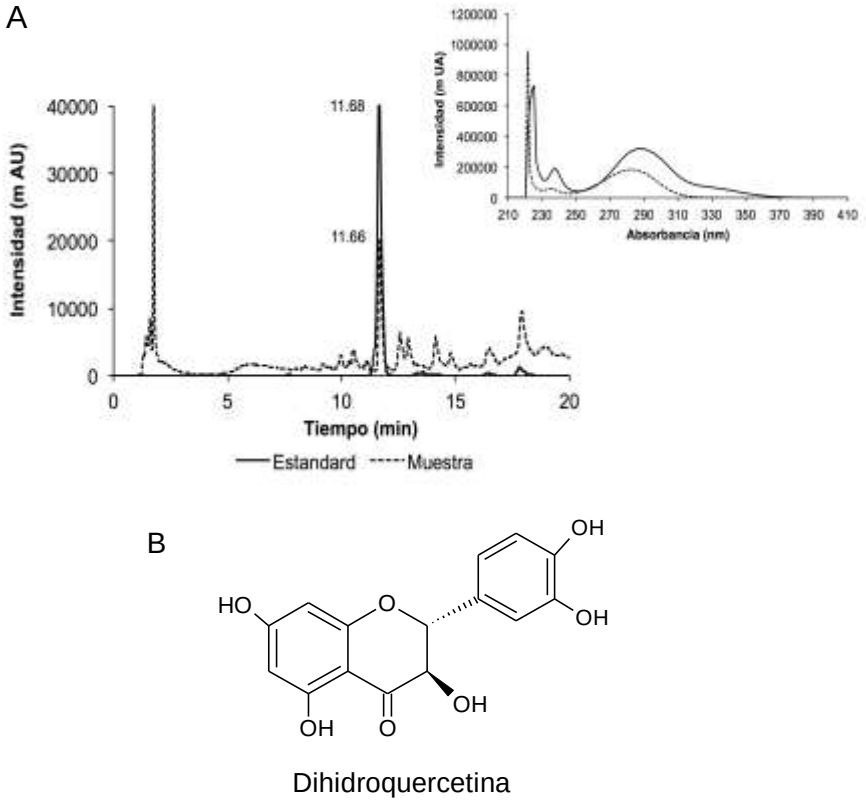


Figura 1-9: A) Comparación del cromatograma (280 nm) y el espectro de absorción UV/vis de un extracto EtOH *aq* de células de *T. peruviana* cosechadas en el día 5 de cultivo y el estándar de DHQ. B) Estructura de la DHQ.

Con el propósito de detectar CF o Fv sencillos (agliconas) en los extractos intracelulares de las suspensiones de *T. peruviana*, estos se sometieron a hidrólisis con HCl 20 % y luego se analizaron por HPLC. Este experimento permitió la detección de dos componentes mayoritarios (λ = 280 nm), los cuales estaban presentes en todas las muestras (Anexo B). El primero es un componente no identificado con t_R = 5,65 min, el segundo mostró un t_R cercano al del estándar DHQ (t_R = 11,6 min). También se detectaron tres componentes minoritarios con t_R de 1,41 - 7,09 y 9,78 cuya identidad no fue establecida en el presente estudio (Figura 1-10).

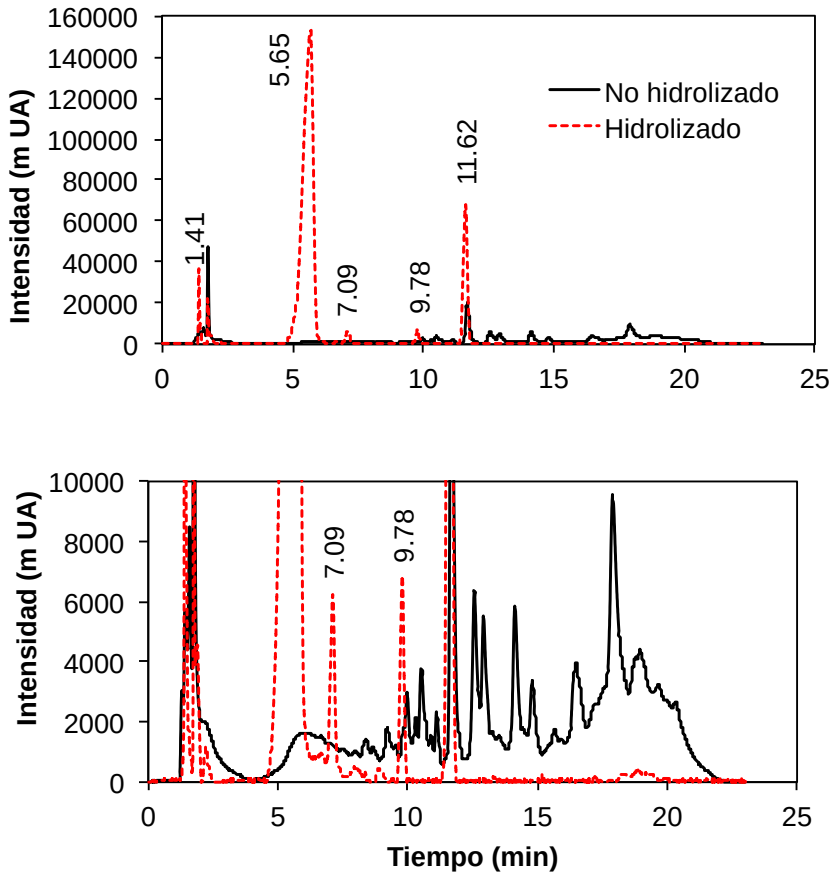


Figura 1-10: Comparación de los cromatogramas (280 nm) de extractos EtOH aq de células de *T. peruviana* (día 5 de cultivo) antes y después de la hidrólisis con HCl 20%. En la parte inferior se muestra una ampliación del mismo cromatograma.

Por otra parte, los componentes con t_R mayores de 12 minutos, que no se detectaron después del tratamiento con HCl, podrían corresponder a CF y Fv complejos, razón por la que no se detectaron en los extractos hidrolizados. Diversos estudios han reportado la presencia de flavonas, flavanonas y flavonoles esterificados, hidroxilados y glicosilados en plantas de *T. peruviana*, como la apigenina-5-metiléter (Voigtländer & Balsam, 1970), dimetoxiflavanonas glicosiladas (Abe et al., 1995) y ésteres sinapoilo y feruloilo de los glucósidos del kaempferol y la quercetina (Tewtrakul et al., 2002). Sin embargo, en el presente estudio, no se identificaron las agliconas de estos compuestos en las suspensiones celulares de *T. peruviana*, debido posiblemente a su baja concentración en las muestras.

1.4.5 Cuantificación de la DHQ

La DHQ fue el único componente identificado en las suspensiones celulares de *T. peruviana*. La cuantificación de este compuesto se realizó por HPLC, usando una curva de calibración (Anexo C) con un estándar de DHQ (100 - 6,25 µg mL^{-1}) Los resultados se expresaron en unidades de mg/100 mL de suspensión celular (Tabla 1-4). A nivel intracelular se cuantificaron las formas conjugada y aglicona de la DHQ, usando las siguientes ecuaciones:

$$DHQ\ conjugada = DHQ_{(Extracto+\ HCl\ 20\%)} - DHQ_{(Extracto\ -\ HCl\ 20\%)}$$

$$DHQ\ aglicona = DHQ_{(Extracto-\ HCl\ 20\%)}$$

Tabla 1-4: Concentración de intracelular y extracelular de DHQ (mg/100 mL).

Tiempo* (días)	DHQ Intracelular (Media ± DE)**		DHQ extracelular (Media ± DE)	DHQ Total Media ± DE)
	Aglicona	Conjugada		
5	0,320 ± 0,496	1,955 ± 0,496	0,286 ± 0,030	2,562 ± 0,333
6	0,330 ± 1.248	2,806 ± 1,248	0,256 ± 0,021	3,392 ± 1.202
7	0,447 ± 0,533	3,401 ± 0,533	0,344 ± 0,017	4,192 ± 0,655
8	0,157 ± 0,223	3,328 ± 0,223	0,142 ± 0,053	3,627 ± 0.083
9	0,107 ± 0,455	3,470 ± 0,455	0,058 ± 0,013	3,635 ± 0,479
10	0,196 ± 1.329	4,452 ± 1,329	0,028 ± 0,001	4,674 ± 1,384

* Tiempo después del subcultivo (fase de crecimiento exponencial).

** Valores de la media de tres replicas independientes ± desviación estándar (DE).

Se calculó la cantidad de DHQ total (DHQ intracelular + DHQ extracelular) en las suspensiones celulares, obteniéndose entre 2,56 y 4,67 mg de DHQ total/100 mL, entre el día 5 y el día 10 de la fase de crecimiento exponencial. Estos resultados muestran que las concentraciones intracelulares de DHQ son significativamente mayores a las concentraciones en el medio extracelular (*valor p* < 0,05) (Figura 1-11).

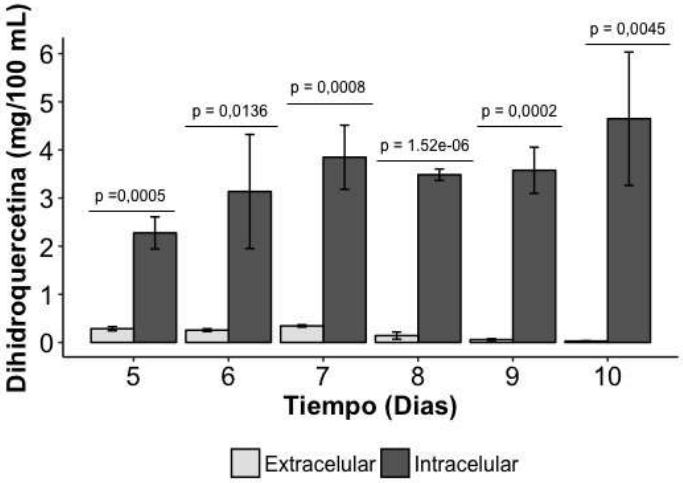


Figura 1-11: Cuantificación de DHQ extracelular e intracelular (total y aglicona) en los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*.

DHQ es un precursor natural de la quercetina en las plantas. La síntesis de quercetina a partir de DHQ es catalizada por la enzima flavonol sintasa (FLS), una enzima ferrosa no hémica que pertenece a la familia de dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-ODD). Esta enzima cataliza la formación de un doble enlace entre los carbonos C-2 y C-3 de la DHQ. FLS también exhibe actividad flavanona 3-hidroxilasa (F3H), aceptando flavanonas como sustratos para la síntesis de dihidroxiflavonoles como la DHQ, proporcionando así una ruta de conexión entre las flavanonas y los flavonoles (Sun et al., 2019). Por lo anterior, la identificación de FLS/F3H (por ejemplo, a través de estudios transcriptómicos) sería una continuación del presente estudio que aportaría al conocimiento de la ruta metabólica de la DHQ en los cultivos celulares de *T. peruviana*.

La DHQ es un potente antioxidante con propiedades terapéuticas prometedoras en estados inflamatorias mayores como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y

hepáticas (Tiukavkina et al., 1997; Weidmann, 2012; Oi et al., 2012); este compuesto se reportó previamente en otra especie de la familia apocynaceae, *Trachelospermum jasminoides* (Sheu et al., 2009), identificándose en forma libre y glicosilada como taxifolina 3-glucósido y taxifolina 3-arabinósido (Sakushima & Nishibe, 1988).

La caracterización de las formas glicosiladas de la DHQ y otros flavonoides presentes en los cultivos *in vitro* de *T. peruviana* requerirá de estudio adicionales que incluyan la separación, purificación y análisis estructural mediante técnicas analíticas como la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear (^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN).

1.5 Conclusiones

En el desarrollo de cultivos de células vegetales destinados a la obtención de metabolitos secundarios, es fundamental lograr altos rendimientos y producciones consistentes. Los resultados del presente estudio representan un avance en el conocimiento del potencial de cultivos celulares *in vitro* de *T. peruviana*, para la producción de metabolitos de alto valor farmacéutico como son los CF, Fv y AA. La evaluación de estos metabolitos mediante técnicas analíticas espectroscópicas y cromatográficas permitió su detección tanto en la biomasa (intracelulares) como en el medio de cultivo (extracelulares) durante la fase de crecimiento exponencial, evidenciándose diferencias en el perfil cromatográfico y la producción dependiendo del tiempo de cultivo. Un resultado relevante fue la identificación del flavonoide DHQ en las suspensiones celulares, con una producción de 4,67 mg de DHQ total/100 mL en el día 10 de la fase de crecimiento exponencial. La DHQ es un compuesto de interés por sus propiedades antioxidantes y anticáncer. Estudios futuros estarán dirigidos al, aumento y estabilización de la producción de éste y otros CF y Fv de interés biomédico, presentes en estos cultivos.

Bibliografía

Abe F, Iwase Y, Yamauchi T, Yahara S, Nohara T. Flavonol sinapoyl glycosides from leaves of *Thevetia peruviana*. Phytochemistry. 1995 Sep;40(2):577–81.

Arias JP. Análisis de variables de operación sobre el comportamiento de cultivos de células vegetales en suspension de *T. peruviana.* Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquía. Medellín, Colombia. 2018.

Arias JP, Zapata K, Rojano B, Arias M. Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. J Photochem Photobiol B. 2016 Oct;163:87–91. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014.

Arias JP, Zapata K, Rojano B, Peñuela M, Arias M. Cardiac glycosides, phenolic compounds and antioxidant activity from plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Rev. UDCAactual Divulg Cient. 2017; 20(2):353–62.

Arias M, Angarita M, Restrepo JM, Caicedo LA, Perea M. Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension culture of *Thevetia peruviana*. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2010; 46: 233–8. doi: 10.1007/s11627-009-9249-z.

Bandara V, Weinstein SA, White J, Eddleston M. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. Toxicon. 2010 Sep 1;56(3):273–81. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.026.

Cárdenas López D, Castaño Arboleda N, Cárdenas-Toro J. Plantas introducidas, establecidas e invasoras en Amazonia colombiana. Bogotá, Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas –Sinchi-, 2011: 65-66, 142.

Dr. Duke’s Phytochemical and Ethnobotanical databases.
https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search (Acceso 12 Junio 2018).

Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. J Agric Food Chem. 2010; 58(14):8139-44. doi: 10.1021/jf1005935.

Feng Q, Leong WS, Liu L, Chan WI. Peruvoside, a Cardiac Glycoside, Induces Primitive Myeloid Leukemia Cell Death. Molecules. 2016 Apr 22;21(4):534. doi: 10.3390/molecules21040534.

Gonçalves S, Romano A. Production of Plant Secondary Metabolites by Using Biotechnological Tools, Secondary Metabolites. In: Sources and Applications. Vijayakumar & Raja editors. IntechOpen. 2018. doi: 10.5772/intechopen.76414.

Haldar S, Karmakar I, Chakraborty M, Ahmad D, Haldar PK. Antitumor potential of *Thevetia peruviana* on Ehrlich's ascites carcinoma-bearing mice. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2015;34(2):105–13.

Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. J Med Plants Res. 2009; 3(13):1222–39.

Kaushik V, Azad N, Krishnan A, Iyer V. Antitumor effects of naturally occurring cardiac glycosides convallatoxin and peruvoside on human ER+ and triple-negative breast cancers. Cell Death Discov. 2017; 3: 17009. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.9.

Kohls S, Scholz-Böttcher BM, Teske J, Zark P, Rullkötter J. Cardiac glycosides from yellow oleander (*Thevetia peruviana*) seed. Phytochemistry. 2012 Mar;75:114-27. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.11.019.

Kohls S, Scholz-Böttcher BM, Teste J, Rullkötter J. Isolation and quantification of six cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana* provide a basis for toxicological survey. Indian J Biochem Biophys Section B. 2015 Dec; 54: 1502–10. doi: 10.1002/chin.201611220

Kramer M. Pharmacology and therapeutic use of cardiac glycoside thevetin. Arztl Wochensch. 1955 Feb 11;10(6):131–6.

Kreis W, Reinhard E. Selective uptake and vacuolar storage of primary cardiac glycosides by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. J Plant Physiol. 1987 Jun; 128: 311–26. doi: 10.1016/S0176-1617(87)80117-7.

Kumar GN, Atreya A, Kanchan T. *Thevetia peruviana*. Wilderness Environ Med. 2015 Dec;26(4):590-1. doi: 10.1016/j.wem.2015.07.007.

Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Abreu OA, Molina E, Yordi EG. Coumarins—An important class of phytochemicals. In: Rao AV & Rao LG, editor. Phytochemicals-Isolation, Characterisation and Role in Human Health. InTech: Rijeka, Croatia. 2015;113–140. doi: 10.5772/59982.

Moura JC1, Bonine CA, de Oliveira Fernandes Viana J, Dornelas MC, Mazzafera P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. J Integr Plant Biol. 2010 Apr;52(4):360-76. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x.

Ochoa-Villarreal M, Howat S, Hong S, Jang MO, Jin YW, Lee EK, Loake GJ. Plant cell culture strategies for the production of natural products. BMB Rep. 2016 Mar 31; 49(3): 149–158. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.3.264.

Oi N, Chen H, Ok Kim M, Lubet RA, Bode AM, Dong Z. Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3-K. Cancer Prev Res (Phila). 2012 Sep;5(9):1103-14. doi: 10.1158/1940–6207.

Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. Food Anal Methods. 2014; 7:1776–82. doi: 10.1007/s12161-014-9814-x.

Rahman N, Mahmood R, Rahman H, Haris M. Systematic screening for phytochemicals of various solvent extracts of *Thevetia peruviana* Schum. Leaves and fruit rind. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014; 6 (8): 173-9.

Ramos-Silva A, Tavares-Carreón F, Figueroa M, De la Torre-Zavala S, Gastelum Arellanez A, Rodríguez-García A, Galán-Wong LJ, Avilés-Arnaut H. Anticancer potential of *Thevetia peruviana* fruit methanolic extract. BMC Complement Altern Med. 2017 May 2;17(1):241. doi: 10.1186/s12906-017-1727-y.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applyingan improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999 May;26(9-10):1231-7. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

Rincón-Pérez J, Rodríguez-Hernández L, Ruíz-Valdiviezo VM, Abud-Archila M, Luján-Hidalgo MC, Ruiz-Lau N, González-Mendoza D, Gutiérrez-Miceli FA. Fatty acids profile, phenolic compounds and antioxidant capacity in elicited callus of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. J Oleo Sci. 2016;65(4):311-8. doi: 10.5650/jos.ess15254.

Sakushima A, Nishibe S. Taxifolin 3-arabinoside from *Trachelospermum jasminoides* var. Pubescens. Phytochemistry. 1988; 27(3): 948-50. doi: 10.1016/0031-9422(88)84132-3.

Sanabria, A. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositeae. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1983.

Schenk RV, Hildebrandt AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot. 1972; 50(1):199-204. doi: 10.1139/b72-026.

Schmeda-Hirschmann G, Jordan M, Gerth A, Wilken D. Secondary metabolite content in rhizomes, callus cultures and *in vitro* regenerated plantlets of *Solidago chilensis*. Z Naturforsch C. 2005 Jan-Feb;60(1-2):5-10.

Sheu MJ, Chou PY, Cheng HC, Wu CH, Huang GJ, Wang BS, Chen JS, Chien YC, Huang MH. Analgesic and anti-inflammatory activities of a water extract of *Trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae). J Ethnopharmacol. 2009 Nov 12;126(2):332-8. doi: 10.1016/j.jep.2009.08.019.

Shimoda K, Yamanea S, Hirakawa H, Ohta S, Hirata T. Biotransformation of phenolic compounds by the cultured cells of *Catharanthus roseus*. J Mol Catal B Enzym. 2002 Feb;16: 275–81. doi: 10.1016/S1381-1177(01)00073-X.

Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am J Enol Vitic. 1977; 28: 49–55.

Sun YJ, He JM, Kong JQ. Characterization of two flavonol synthases with iron-independent flavanone 3-hydroxylase activity from *Ornithogalum caudatum* Jacq. BMC Plant Biol. 2019 May 14;19(1):195. doi: 10.1186/s12870-019-1787-x.

Tabata M, Umetani Y, Ooya M, Tanaka S. Glucosylation of phenolic compounds by plant cell cultures. Phytochemistry. 1988; 27(3): 809-13. doi: 10.1016/0031-9422(88)84097-4

Tewtrakul S, Nakamura N, Hattori M, Fujiwara T, Supavita T. Flavanone and flavonol glycosides from the leaves of *Thevetia peruviana* and their HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase inhibitory activities. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2002 May;50(5):630-5.

Tiukavkina NA, Rulenko IA, Kolesnik IuA. Dihydroquercetina new antioxidant and biologically active food additive. Vopr Pitan. 1997; (6):125.

Tofighi Z, Ghazi Saeidi N, Hadjiakhoondi A, Yassa N. Determination of cardiac glycosides and total phenols in different generations of *Securigera securidaca* suspension culture. Research Journal of Pharmacognosy (RJP). 2016; 3(2): 25-31.

Tu X, Ma S, Gao Z, Wang J, Huang S, Chen W. One-Step Extraction and hydrolysis of flavonoid glycosides in rape bee pollen based on soxhlet-assisted matrix solid phase dispersion. Phytochem Anal. 2017 Nov;28(6):505-511. doi: 10.1002/pca.2699.

Voigtländer HW, Balsam G. Apigenin 5-methylether a new flavone from *Thevetia peruviana*. Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges. 1970 Oct;303(10):782-7.

Waldi D. Spray Reagents for Thin-Layer Chromatography. In: Stahl E, editor. Thin-Layer Chromatography. Springer, Berlin, Heidelberg. 1965; 483–502. doi: 10.1007/978-3-662-01031-0_23

Weidmann AE. Dihydroquercetin: More than just an impurity? Eur J Pharmacol. 2012 Jun 5;684(1-3):19-26. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.03.035.

Wolska KI, Grudniak AM, Fiecek B, Kraczkiewicz-Dowjat A, Kurek A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. Cent Eur J Biol. 2010; 5(5): 543–53. doi: 10.2478/s11535-010-0045-x.

Zarzycki PK. 2015. Chapter 8 - Staining and Derivatization Techniques for Visualization in Planar Chromatography. In: Poole CF, editor. Instrumental Thin-Layer Chromatography. Boston: Elsevier. 2015;191–237. doi: 10.1016/B978-0-12-417223-4.00008-X.

2. Capítulo 2

Efecto elicitor del ácido salicílico y jasmonato de metilo en la producción biomasa, compuestos fenólicos, flavonoides y antioxidantes en cultivos de células en suspensión de *Thevetia peruviana*

2.1 Resumen

El objetivo del presente estudio fue establecer y optimizar el efecto del ácido salicílico (AS), jasmonato de metilo (MeJA) y la combinación AS/MeJA, en la producción biomasa y de CF, Fv y AA en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* a escala de matraz agitado. Inicialmente se estudiaron los efectos independientes del AS y MeJA sobre la biomasa y la producción de los metabolitos de interés. Luego se optimizaron las condiciones de elicitación que permitieron incrementar la producción de CF, como son: el tiempo de elicitación y el tiempo de exposición al elicitor. Los contenidos de CF, Fv y AA se determinaron mediante los métodos de Folin-Ciocalteu, método de complejación de flavonoides-aluminio y el ensayo ABTS, respectivamente. Se analizaron las diferencias en el perfil de metabolitos intracelulares debido a los tratamientos mencionados, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los contenidos más altos de CF, Fv y la AA se obtuvieron así: MeJA 3 µM > AS/MeJA (300 µM/3 µM AS) > 300 µM AS > control, cuando lo cultivos se elicitaron el día 4 y se cosecharon 96 h después de la elicitación. Se demostró que MeJA 3 mM aumentó 1,49 veces el contenido de CF; 1,66 veces la AA y 2,55 veces los Fv, comparado con el cultivo control. Mediante HPLC se

identificó presencia del flavonoide dihidroquercetina en todos los tratamientos. Adicionalmente, MeJA tuvo efecto inductor en la producción de ácido clorogénico, pero no incrementó la producción total de dihidroquercetina.

Palabras clave: *Thevetia peruviana*, cultivos vegetales *in vitro*, elicitores, ácido salicílico, Jasmonato de metilo, compuestos fenólicos.

2.2 Introducción

Thevetia peruviana (Pers.) K. Schum es fuente importante de metabolitos secundarios con actividad farmacéutica, siendo ampliamente investigada la producción de glicósidos cardiotónicos (Bandara et al., 2010; Kohls et al., 2012; Kohls et al., 2015). No obstante, durante la última década ha cobrado gran interés el estudio de los CF producidos por esta planta, especialmente flavonoles y flavanonas, por su potencial actividad antimicrobiana (Hassan et al., 2011; Dabur et al., 2007), antineoplásica (Haldar et al., 2015; Ramos-Silva et al., 2017) y antiviral contra el VIH-1 (Tewtrakul et al., 2002).

Los CF son uno de los grupos de metabolitos secundarios más importantes en las plantas. Estos compuestos están relacionados con los mecanismos de adaptación ambiental y estrés en condiciones de crecimiento *in vivo* (Buchanan et al., 2015). Sin embargo, la calidad y la cantidad de estos compuestos y otros metabolitos secundarios es extremadamente variable y depende de las condiciones bióticas y abióticas en las plantas cultivadas en campo (Ncube et al., 2012). Por lo anterior, los cultivos *in vitro* de células vegetales se visionan como una alternativa viable para aumentar la tasa de crecimiento de la biomasa y estabilizar la producción de metabolitos. Adicionalmente, estos cultivos permiten la manipulación de variables de crecimiento, así como el uso de precursores y/o elicitores que pueden alterar las rutas de biosíntesis de CF, optimizando su producción (Sajca et al., 2000).

Un elicitor puede definirse como un compuesto (natural o sintético) que inicia o mejora la biosíntesis de metabolitos específicos cuando se introduce en pequeñas concentraciones en un sistema de células vivas (Namdeo, 2007; Zhao et al., 2005). El ácido jasmónico

(JA) y el ácido salicílico (AS) son moléculas de señalización que responden al estrés biótico y abiótico en las plantas. Estas moléculas pueden usarse para inducir reacciones catalíticas por enzimas específicas involucradas en la biosíntesis de CF (Beckers & Spoel, 2006). JA y AS se han utilizado en la estimulación de la producción de flavonoides y polifenoles en suspensiones celulares, callos y cultivos de tejidos de diversas familias de plantas (Manivannan et al., 2016; Vuong et al., 2014; Saeed et al., 2017; Gadzovska et al., 2013). JA también se ha usado en combinación con AS para incrementar la producción de CF en cultivos de células en suspensión de *Vitis vinifera* L., obteniéndose aumento de hasta 2,76 veces en el contenido de CF intracelulares con 10 µM de JA + 10 µM de AS y 7,63 veces en el contenido de CF extracelulares con 10 µM de JA + 500 µM de AS (Sudha et al 2003).

En el caso de cultivos de células en suspensión de *T. peruviana,* Rincon et al., 2016*,* describió el uso de JA (100 µM) en combinación con el ácido abscísico (10 µM) para incrementar la producción de CF en cultivos de callos de *T. peruviana*, obteniendo un aumento de 2,9 veces en los CF totales comparado con los cultivos control (no elicitados). MeJA también se ha usado para incrementar la producción del cardiotónico peruvósido en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*, obteniéndose que la aplicación de 100 mg/L de MeJA al inicio del cultivo, induce la producción de 8,93 mg/L de peruvósido (Arias et al., 2010). Estas investigaciones se constituyen en antecedentes del uso de fitohormonas, como JA, en la elicitación de compuestos de interés en cultivos *in vitro* de células de *T. peruviana*; no obstante, se requiere realizar una investigación más completa que permita establecer el efecto de la aplicación, por separado y en combinación, del AS y MeJA, en el crecimiento de la biomasa, producción y perfil de los CF y Fv.

En el presente estudio se logró establecer el efecto de la aplicación de AS y MeJA a los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*, evidenciándose cambios tanto en la acumulación de biomasa como en el contenido y perfil de CF y Fv, debido al tratamiento y el tiempo de exposición a cada elicitor. También se definieron las condiciones de elicitación, (tiempo de adición del elicitor y tiempo de exposición al elicitor), que mejoraron la producción de CF.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Reactivos

Los reactivos de Folin-Ciocalteu (2.0 N), ácido salicílico, Jasmonato de metilo (95%) se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO). Ácido gálico y Trolox, 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico) (ABTS), acetonitrilo grado HPLC, ácido fórmico y los solventes usados para las extracciones (grado analítico) se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

2.3.2. Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares se prepararon a partir de 10 g (peso seco) de callos friables frescos, los cuales se transfirieron a 100 mL de medio estéril líquido SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), suplementado con 2 mg L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 0,5 mg L^{-1} de kinetina; 30 g L^{-1} de sacarosa y 1 g L^{-1} de mioinositol (pH 5,8) en matraces de 250 mL. Las suspensiones celulares se mantuvieron en un agitador orbital a 110 rpm, fotoperiodo natural y 25 ± 2 ºC. Los subcultivos se realizaron cada 2 semanas a partir de 2 g L-1 de inóculo (peso seco) (Arias et al., 2016).

2.3.3. Preparación de los elicitores

AS y MeJA se prepararon inicialmente a una concentración de 50 mM usando como solvente etanol al 50 % (v/v), a partir de esta solución madre se prepararon las concentraciones de trabajo, las cuales se filtraron a través de membranas Millipore de 0,45 µm (Minisart1, Sartorius, Alemania) antes de adicionarlas a las suspensiones celulares

2.3.4. Efecto del AS y MeJA en la producción de biomasa, CF, Fv y AA (intracelulares y extracelulares).

Los experimentos se llevaron a cabo usando una suspensión celular de 6 días con una concentración de biomasa de 2 – 3 g de peso seco por litro de cultivo (g L^{-1}). Se utilizaron matraces de 250 mL para un volumen final de 100 mL de suspensión celular en medio

líquido estéril SH. Las condiciones del cultivo se mantuvieron como se describió previamente en el capítulo I.

Para establecer el efecto de AS y MeJA en el cultivo celular se utilizó un arreglo factorial basado en un diseño completamente aleatorizado con dos factores a saber: concentración del elicitor y tiempo de exposición al elicitor (Anexo D: Diseño experimental). El MeJA se adicionó al cultivo en concentraciones de 0, 1, 3 y 5 µM, mientras que el AS se adición en concentraciones de 0, 100, 300 y 600 µM. Estos rangos de concentración se seleccionaron a partir de la revisión de estudios previos (Manivannan et al., 2016; Vuong et al., 2016; Sudha et al 2003) y mediante un cribado inicial realizado en el laboratorio. Los elicitores se adicionaron al cultivo en el día 8 de la fase de crecimiento exponencial (seleccionado con base en la cinética de crecimiento y de producción de CF). Las células se cosecharon a las 24 y 96 h después de la adición del elicitor y se determinó la producción de biomasa, el contenido intracelular y extracelular de CF, Fv y AA, mediante los métodos analíticos que se describen en el apartado 2.3.6. A partir de los resultados de estos experimentos se procedió a mejorar las condiciones de elicitación para incrementar la producción de los metabolitos de interés.

2.3.5.Optimización de las condiciones de elicitación

Los experimentos para optimizar las condiciones de elicitación, como: el tiempo de adición del elicitor y el tiempo de exposición al elicitor, se realizaron usando las mejores concentraciones de AS y MeJA establecidas como se describe arriba. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando un método de muestreo destructivo, que consistió en procesar la muestra completa en cada tiempo de cosecha. Se utilizó una solución de etanol al 50 % (v/v) como control en estos experimentos. En experimentos previos se había establecido que la solución etanólica no tiene efecto elicitor significativo comparado con un cultivo sin etanol (valor p = 0,246).

2.3.5.1. Tiempo de adición del elicitor.

Para establecer el mejor tiempo de adición del elicitor se utilizó un arreglo factorial con tres factores: Tratamiento (AS y MeJA), tiempo de adición del elicitor (día 0, 4 y 8 del cultivo en fase exponencial) y tiempo de exposición al elicitor (24 y 96 horas post-

elicitación). Las concentraciones de AS y MeJA se mantuvieron fijas así: AS 300 µM y MeJA 3µM (Anexo E: Diseño de experimento). La producción de biomasa y CF se realizó utilizando los métodos analíticos que se describen en el apartado 2.3.6.

2.3.5.2. Tiempo de exposición al elicitor.

Después de la determinación del mejor tiempo de adición del elicitor, se realizó un experimento ampliando la ventana de tiempo de cosecha de las células después de la adición del elicitor (24 – 48 – 72 – 96 y 120 h), con el propósito de establecer el mejor tiempo de exposición al elicitor cuando AS y MeJA se aplican por separado y en combinación (AS/MeJA) al cultivo. Se utilizó un diseño experimental de tres bloques (completamente al azar) con una variable independiente (tiempo de elicitación) y tres variables respuesta: contenido de CF, contenido de Fv y actividad AA.

2.3.6. Métodos analíticos

2.3.6.1. Procesamiento de las muestras

A continuación, se describe el procesamiento de la biomasa y el medio de cultivo para la cuantificación de metabolitos intracelulares y extracelulares.

- Metabolitos intracelulares

La biomasa obtenida de cada experimento se secó en un horno de convección a 60 ºC durante 48 h y se pulverizó utilizando mortero. Para obtener los metabolitos intracelulares, la biomasa pulverizada (0,3 g) se extrajo con 15 mL de una solución de etanol en agua al 50% (v/v), en un baño ultrasónico (frecuencia 40 kHz) a 30 ºC durante 30 min. Los extractos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min; el sobrenadante se recolectó y almacenó en tubos de polipropileno a 4 °C, protegidos de la luz. Estos extractos se utilizaron para la determinación cuantitativa de CF, Fv y AA.

- Metabolitos extracelulares

Los metabolitos extracelulares se determinaron directamente del medio de cultivo celular, después de la filtración de la biomasa, sin ningún paso de extracción previo.

2.3.6.2. Determinación de la producción de biomasa

Para determinar este parámetro, las suspensiones celulares provenientes de cada tratamiento se filtración al vacío. La biomasa retenida se lavó tres veces con agua destilada y luego se secó a 60 ºC durante 24 h en un horno de convección. El peso seco obtenido se expresó en gramos de biomasa seca por litro de cultivo (g L^{-1}).

2.3.6.3. Determinación de la producción de metabolitos

- Determinación del contenido de CF.

Se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu siguiendo una metodología descrita previamente (Slinkard & Singleton, 1977). El contenido de CF se calculó usando una curva de calibración estándar de ácido gálico (80 – 40 – 20 – 10 y 5 mg mL^{-1}) (Anexo A), los resultados se expresaron en miligramos equivalentes a ácido gálico por litro de cultivo (mg EAG L^{-1}) o por gramo de peso seco de biomasa (mg EAG /g BS) para los CF extracelulares e intracelulares, respectivamente.

- Determinación del contenido de Fv.

Los flavonoides se determinaron mediante el método de complejación de flavonoides con aluminio ($AlCl_3$) descrito previamente (Pekal & Pyrzynska, 2014). Para los cálculos se utilizó una curva de calibración estándar de quercetina (200 - 100 - 25 – 12,5 y 6,25 mg mL^{-1}) (Anexo A). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de quercentina por litro de cultivo (mg EQ L^{-1}) o por gramo de peso seco de biomasa (mg EQ /g BS) para los CFv extracelulares e intracelulares, respectivamente.

- Determinación de la AA.

Se usó el ensayo de decoloración de cationes radicales ABTS (Re et al., 1999). La AA se calculó utilizando una curva de calibración estándar con Trolox (150 - 75 – 37,5 – 18,8 y 9,4 mg mL^{-1}) (Anexo A). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes Trolox por litro de cultivo (mg ET L^{-1}) o por gramo de peso seco de biomasa (mg ET /g BS) para la AA extracelular e intracelular, respectivamente.

2.3.7. Perfil HPLC de metabolitos

Este análisis se realizó con el propósito de establecer el efecto de los elicitores en el perfil de CF (intracelulares y extracelulares) bajo las mejores condiciones de elicitación establecidas en el inciso 2.3.5.2. El análisis HPLC se realizó siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1. En forma resumida, 2 mL de cada muestra se diluyó hasta 10 mL con una solución acuosa de etanol al 50%. Los extractos diluidos se filtraron en membranas de 0,45 µm, luego se analizaron. Adicionalmente, los extractos intracelulares se sometieron a hidrólisis ácida para el análisis de las agliconas (Tu et al, 2017); para lo cual, el extracto (2 mL) se mezcló con 0,5 mL de HCl 20%, seguido de calentamiento a 85 ºC por 90 min. Los hidrolizados se atemperaron y se ajustó el volumen a 10 mL con etanol 50%, luego se filtraron en membranas de 0,45 µm.

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo HPLC Shimadzu Prominence acoplado a un detector de matriz de diodos (SPD-M20 A) y al Software ChemStation, utilizando una columna de fase inversa LiChrospher1 250-4 RP-18, 5 mm (Merck S.A). Las condiciones de la separación fueron: temperatura de 28 °C, velocidad de flujo de 1,5 mL min^{-1} y un volumen de inyección de 20 µL. La fase móvil consistió en: A (ácido fórmico al 1% en agua) y B (ácido fórmico al 1% en acetonitrilo). El gradiente de elución fue el siguiente: 0 min (80% A + 20% B); 7 min (75% A + 25% B); 13 min (70% A + 30% B); 7 min (65% A + 35% B); 3 min (80% A + 20% B). Se seleccionó la longitud de onda de 280 nm para el análisis cromatográfico. Se compararon los tiempos de retención (t_R) y la absorbancia UV-vis de los componentes presentes en las muestras y los obtenidos a partir de estándares analíticos de compuestos fenólicos y flavonoides informados previamente en *T. peruviana* (Dr. Duke's Phytochemical and Ethnopharmaceutical database) y otros disponibles en el laboratorio. También se realizó cuantificación del flavonoide dihidroquercetina (DHQ), previamente identificado en las suspensiones de *T. peruviana* (resultados del Capítulo 1) y de otros compuestos que se pudiesen identificar en los tratamientos, para lo cual se usaron curvas de calibración con los estándares de referencia.

2.3.8. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos se analizaron con el software estadístico RStudio versión 1.1.383. Los resultados de la determinación de CF, Fv y AA se presentaron como valores de la media ± desviación estándar (DE). Las diferencias entre los tratamientos se evaluaron con un ANOVA de una vía, con un nivel de significancia de 0,05. También se realizaron comparaciones múltiples (por pares) mediante el método de la Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey. Los resultados se presentaron como intervalos de confianza al 95% (IC del 95%).

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Suspensiones celulares

Los cultivos celulares iniciados a partir de un inóculo de 6 días mostraron una fase de crecimiento exponencial de 12 días, obteniéndose una concentración máxima de biomasa en peso seco de 14,81 ± 0,32 g L^{-1}, en el día 14. Esta información es indispensable para precisar el momento de adición de los elicitores al cultivo. Se ha establecido que durante la fase de crecimiento exponencial muchos metabolitos se producen en niveles bajos, o no se producen, debido a que los precursores son utilizados principalmente para la formación de biomasa. Por lo anterior, la inducción de la producción de metabolitos secundarios suele ser más efectiva en la fase de crecimiento estacionaria o cuando las células alcanzan su máximo rendimiento (Ramirez-Estrada et al., 2016). No obstante, en el presente estudio se estableció el día 8 de crecimiento (fase exponencial) para los experimentos iniciales de elicitación, tomando como criterio para esta selección tanto la cinética de producción de biomasa como la cinética de producción de CF (en el día 8 se alcanzó la concentración más alta de CF, Ver Figura 1-7).

2.4.2. Efecto de AS y MeJA en la producción de biomasa, CF, Fv y AA.

Las Tablas 2-1 y 2-2 muestra los resultados de la evaluación del efecto del AS y MeJA en la producción de biomasa y de los metabolitos de interés (CF, Fv y AA) a nivel intracelular y extracelular. Se demostró que AS y MeJA afectan la acumulación intracelular de CF, Fv y AA de una manera dependiente de la concentración y el tiempo

de exposición al elicitor. A las 24 y 96 horas, el tratamiento con MeJA 3 µM incrementó de manera significativa el contenido intracelular de CF, Fv y AA (valor-p < 0,05); adicionalmente, MeJA 1µM causó incrementó significativo en el contenido de Fv y AA a las 96 horas. En el caso del AS, solo la concentración de 300 µM causó aumento significativo en el contenido de estos metabolitos después de 24 horas de elicitación.

Tabla 2-1: Contenido de compuestos fenólicos (CF) y acumulación de biomasa en las suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con AS y MeJA.

Elicitor (µM)	**Tiempo de cosecha (horas)**	**Contenido de CF (mg EAG/g BS)***		**Biomasa ($g\ L^{-1}$)**
		Intracelular	**Extracelular**	
MeJA				
0	24	3,250 ± 0,381^{b}	6,118 ± 1,586^{ab}	10,850 ± 1,282^{ab}
1		3,638 ± 0,129^{ab}	7,750 ± 1,142^{a}	8,386 ± 0,146^{c}
3		**4,476 ± 0,097^{a}**	7,697 ± 0,500^{a}	7,934 ± 0,150^{c}
5		3,257 ± 0,129^{b}	6,128 ± 0,975^{ab}	8,270 ± 1,012^{c}
0	96	3,258 ± 0,537^{b}	5,256 ± 0,752^{ab}	11,263 ± 0,499^{a}
1		3,920 ± 0,201^{ab}	3,295 ± 0,268^{b}	9,674 ± 1,40^{abc}
3		**4,282 ± 0,051^{a}**	4,785 ± 1,422^{ab}	8,742 ± 0,358^{bc}
5		3,812 ± 0,519^{ab}	4,755 ± 0,564^{ab}	8,994 ± 0,152^{bc}
AS				
0	24	5,235 ± 0,408^{bc}	2,739 ± 0,346^{bc}	8,311 ± 0,790^{b}
100		4,890 ± 0,267^{c}	2,908 ± 0,232^{bc}	8,049 ± 0,331^{b}
300		**5,983 ± 0,074^{a}**	3,008 ± 0,532^{bc}	8,247 ± 0,282^{b}
600		5,613 ± 0,021^{ab}	2,161 ± 0,329^{c}	8,470 ± 0,076^{b}
0	96	5,131 ± 0,766^{bc}	4,691 ± 0,483^{a}	11,328 ± 0,086^{a}
100		4,830 ± 0,048^{c}	4,652 ± 1,093^{a}	12,073 ± 1,551^{a}
300		4,928 ± 0,239^{c}	3,780 ± 0,439^{ab}	10,925 ± 0,533^{a}
600		5,192 ± 0,059^{bc}	3,378 ± 0,065^{abc}	10,818 ± 0,257^{a}

* Valores de la media ± DE de 3 réplicas independientes. Para cada elicitor, los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p < 0,05).

Tabla 2-2: Contenido de flavonoides (Fv) y antioxidantes (AA) en las suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con diferentes concentraciones de AS y MeJA.

Elicitor (µM)	Tiempo de cosecha (horas)	Contenido de Fv (mg EQ/g BS)*		Contenido de AA (mg ET/g BS)*	
		Intracelular	Extracelular	Intracelular	Extracelular
MeJA					
0	24	4,225 ± 0,124[b]	15,627 ± 1,553[a]	6,775 ± 0,361[b]	17,020 ± 2,357[a]
1		4,331 ± 0,155[b]	16,334 ± 0,883[a]	6,503 ± 0,584[b]	18,939 ± 0,265[a]
3		**5,107 ± 0,348[a]**	15,839 ± 0,430[a]	**8,789 ± 0,212[a]**	16,668 ± 0,562[a]
5		4,469 ± 0,124[b]	13,088 ± 2,012[a]	6,844 ± 0,653[b]	13,823 ± 3,664[a]
0	96	4,461 ± 0,080[b]	8,292 ± 0,584[a]	6,038 ± 0,684[b]	**13,909 ± 2,209[a]**
1		**5,513 ± 0,674[a]**	7,577 ± 1,548[a]	**14,703 ± 0,171[a]**	6.176 ± 2.248[b]
3		**5,750 ± 0,179[a]**	7,967 ± 0,752[a]	**14,641 ± 0,085[a]**	6,533 ± 0,425[b]
5		4,998 ± 0,219[ab]	8,077 ± 0,738[a]	6,558 ± 0,174[b]	7,000 ± 0,717[b]
AS					
0	24	5,883 ± 0,486[ab]	**5,347 ± 0,092[a]**	6,596 ± 0,149[ab]	**14,040 ± 1,061[a]**
100		5,236 ± 0,840[b]	3,215 ± 0,225[b]	6,364 ± 0,020[b]	8,325 ± 1,114[c]
300		**6,605 ± 0,199[a]**	3,227 ± 0,738[b]	**7,181 ± 0,412[a]**	13,261 ± 0,740[ab]
600		5,981 ± 0,628[ab]	1,253 ± 0,340[c]	6,684 ± 0,302[ab]	9,582 ± 1,922[bc]
0	96	5,049 ± 0,380[a]	**8,239 ± 0,291[a]**	6,880 ± 0,219[a]	10,061 ± 0,491[a]
100		4,497 ± 0,862[a]	4,546 ± 1,165[b]	6,547 ± 0,165[a]	10,065 ± 0,415[a]
300		5,835 ± 0,628[a]	3,190 ± 0,186[bc]	7,112 ± 0,413[a]	12,951 ± 1,193[a]
600		5,985 ± 0,488[a]	2,037 ± 0,390[c]	6,875 ± 0,257[a]	9,620 ± 2,279[a]

* Valores de la media ± DE de 3 réplicas independientes. Para cada elicitor, los valores con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Por otra parte, se evidenció que AS y MeJA no afectan significativamente el contenido extracelular de CF y Fv (valor $p > 0,05$) en las tres concentraciones evaluadas; además, estas moléculas provocan reducción en el contenido extracelular de AA a las 24 y 96 h, respectivamente. A partir de estos resultados los experimentos que siguieron se enfocaron en optimizar las condiciones de elicitación para incrementar la producción de los metabolitos intracelulares.

El efecto inductor de AS y MeJA en la biosíntesis de CF, Fv y AA en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* no había sido reportado antes. Previamente, un estudio realizado por Rincón et al., 2016, describió la presencia de CF en cultivos de callos de *T. peruviana*, en concentración de 0,95 ± 0,01 mg EAG/g de extracto seco (ES); esta concentración aumentó a 2,8 ± 0,02 mg EAG/ g ES después del tratamiento con JA 100 mM + ácido abscísico 10 mM. Otro estudio realizado por Arias et al., 2016, informó de la producción de CF en suspensiones celulares de *T. peruviana* cultivada bajo luz de diferentes longitudes de onda y en la oscuridad; obteniendo contenidos fenólicos totales entre 7,21 y 7,91 mg EAG/ g BS en condiciones de luz y 9,46 mg EAG/ g BS en la oscuridad, a los 23 días de cultivo; este estudio también demostró la relación directa entre el contenido de CF y la capacidad antioxidante determinada mediante ensayo FRAP (acrónimo para Potencial Antioxidante Reductor Férrico) y ABTS.

En cuanto al efecto sobre la acumulación de biomasa de *T. peruviana*, los resultados muestran que MeJA reduce significativamente la acumulación de biomasa en ambos tiempos, a las 24 h (*valor p* = 0,0116) y 96 h de elicitación (*valor- p* = 0,0153). El efecto inhibidor de MeJA en la acumulación de biomasa se había informado previamente en cultivos de suspensión celular de Taxus (Patil et al., 2014) y fresas (Miyanaga et al., 2000). Dos estudios independientes demostraron que MeJA inhibe el ciclo mitótico en células vegetales, deteniéndolos en la fase G1 antes de la transición a la fase S. Esto reduce la progresión del ciclo celular y, en consecuencia, el número de células que están en división activa (Noir et al., 2013). Estos hallazgos explicarían la reducción del crecimiento celular que se observó en las suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con MeJA. En cuanto al tratamiento con AS, en nuestras condiciones experimentales, este elicitor no afectó la acumulación de biomasa en los cultivos de *T. peruviana* (Tabla 2-1). Teniendo en cuenta que MeJA y AS no aumentaron la biomasa, el tratamiento con estos elicitores no se recomienda cuando el propósito de los cultivos sea únicamente la obtención de biomasa.

Aunque la producción de biomasa es frecuentemente asociada con la producción de metabolitos secundarios, se debe considerar que durante la fase exponencial muchos de los precursores necesarios para el metabolismo secundario están siendo utilizados en el

crecimiento celular, por lo que los metabolitos de interés se estarían formando en cantidades bajas. Por el contrario, cuando las células son estresadas, ellas sacrifican el crecimiento celular y los precursores son utilizados para la biosíntesis de metabolitos de defensa, como los CF. No obstante, es posible modificar algunas condiciones de elicitación, como el tiempo de adición del elicitor y el tiempo de cosecha de las células después de la adición del elicitor, con el fin de incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios y reducir el efecto negativo sobre la acumulación de biomasa. En algunos casos el uso de combinaciones de elicitores también puede mejorar estos aspectos.

2.4.3. Optimización de las condiciones de elicitación.

Para establecer las mejores condiciones de elicitación se utilizó un arreglo factorial multinivel con tres factores, a saber: el tratamiento (AS y MeJA), tiempo de adición del elicitor (día 0, 4 y 8 de crecimiento) y tiempo de exposición al elicitor (24 y 96 post-elicitación). A partir de estos resultados, se realizó un experimento variando los tiempos de exposición al elicitor (desde 24 a 120 horas) bajo las mejores condiciones de concentración de elicitor y tiempo de adición del elicitor previamente establecidas. Además, se evaluó el efecto de la adición de la mezcla AS 300 µM/MeJA 3 µM sobre la producción de los metabolitos de interés.

2.4.3.1. Variable: tiempo de elicitación

La Figura 2-1 muestra que el contenido de CF aumentó significativamente en comparación con los cultivos control cuando se añadió AS en el día 4 de crecimiento. Cuando el AS se adicionó al principio (día 0) o al final (día 8) de la fase exponencial, se produjo un aumento no significativo en los CF en comparación con el control. Por otro lado, MeJA aumentó significativamente el contenido de CF en comparación con el control, en los tres tiempos de adición de elicitor y 96 h post-elicitación. El análisis de varianza sobre los factores principales muestra que el tiempo de adición del elicitor influyen significativamente en la variable respuesta (producción de CF); así mismo, el gráfico de interacciones muestra que el mejor tiempo de adición del elicitor, para la producción de CF en los cultivos de *T. peruviana,* es el día 4 de crecimiento en la fase exponencial. (Anexo F: Análisis estadístico para la optimización del tiempo de elicitación en la producción de compuestos fenólicos). Este resultado fue comparable al descrito por Wang y colaboradores en 2015, quienes demostraron que la adición de MeJA en la fase

de crecimiento exponencial de cultivos celulares de *Hypericum perforatum,* incrementó significativamente la acumulación de CF, siendo el día 4 el tiempo en que se produjo el mayor efecto elicitor.

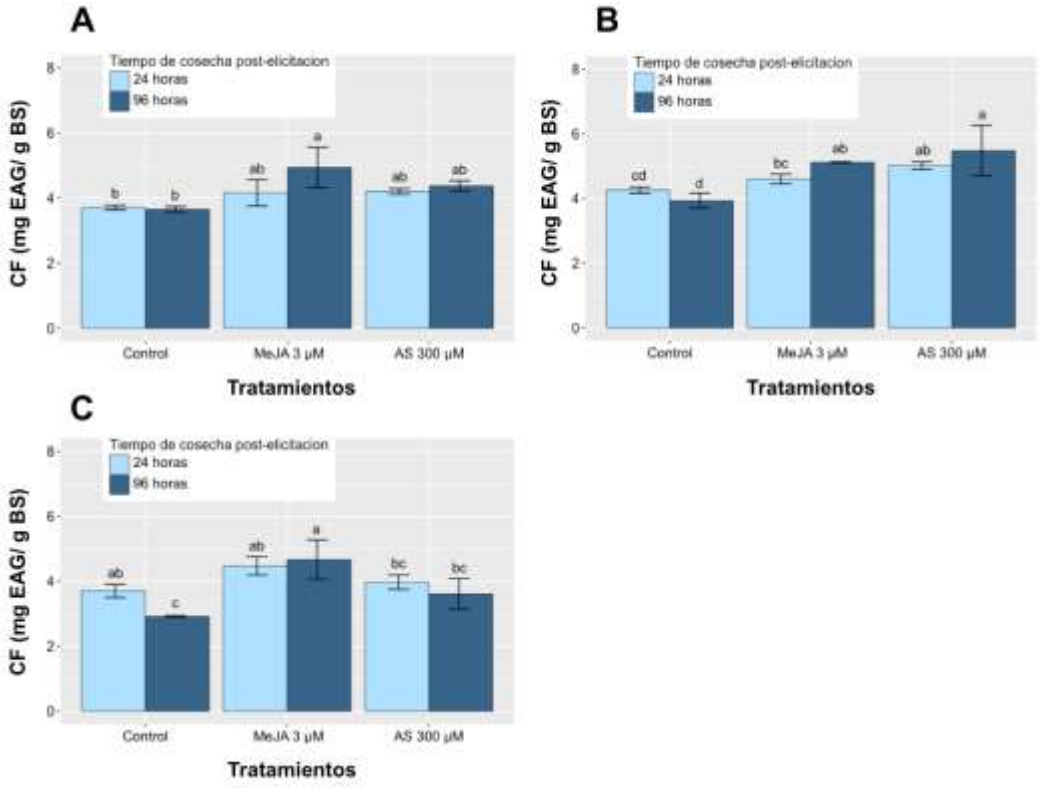


Figura 2-1: Optimización de la variable "tiempo de adición del elicitor" en la producción de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*. Los elicitores fueron adicionados al inicio del cultivo o día 0 (A) y durante el crecimiento exponencial, días 4 (B) y 8 (C). Los controles fueron cultivos celulares sin elicitor. Los resultados se presentan como la media ± DE, de tres experimentos independientes. Tratamientos identificados con letras distintas difieren significativamente (valor $p < 0,05$).

Por otra parte, se evaluó la producción de biomasa en los tres tiempos de adición de AS y MeJA. La Figura 2-2 muestra que la adición de MeJA (3 µM) y AS (300 µM) al inicio del cultivo (día 0) resulta en una disminución significativa de la biomasa a las 24 horas post-

elicitación respecto al control, correspondiente 0,76 veces para MeJA y 0,59 veces para AS; el efecto inhibidor sobre la biomasa fue mayor a las 96 horas (1,6 veces con ambos elicitores). Cuando los elicitores se adicionaron el día 4, resultó en una reducción significativa de la producción de biomasa a las 24 horas (1,83 veces con MeJA y 1,35 veces con AS); sin embargo, a las 96 horas se observó recuperación de la biomasa, alcanzando concentraciones similares a las obtenidas en el control.

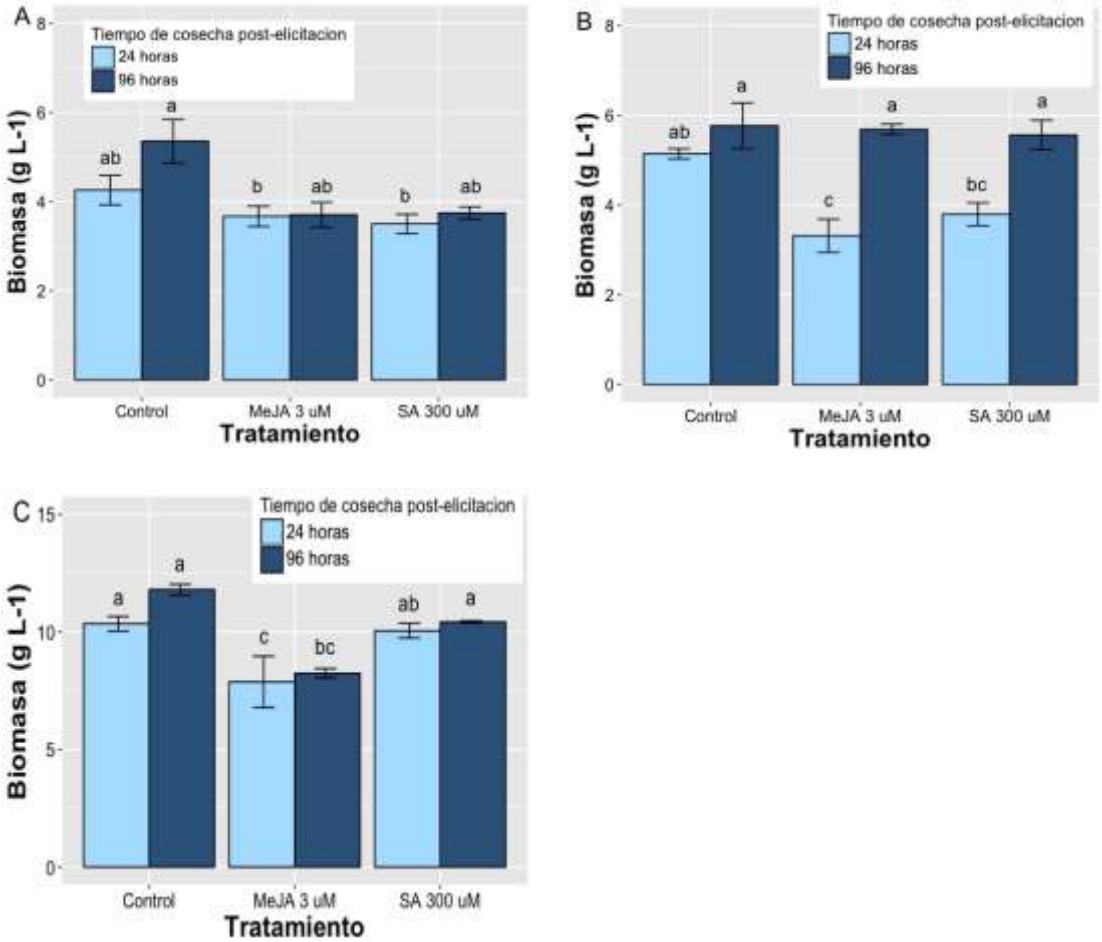


Figura 2-2: Efecto de la variable “tiempo de adición del elicitor” en la acumulación de biomasa en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*. Los elicitores fueron adicionados al inicio del cultivo o día 0 (A) y durante el crecimiento exponencial, días 4 (B) y 8 (C). Los controles fueron cultivos celulares sin elicitor. Los resultados se presentan como la media ± DE, de tres experimentos independientes. Tratamientos identificados con letras distintas difieren significativamente (valor $p < 0,05$).

La adición de MeJA el día 8 produjo los contenidos más bajos de biomasa en los cultivos después de 24 y 96 horas post-elicitación (reducción de 2,47 y 3,56 veces respecto al control); por el contrario, AS no causó efecto significativo en la producción de biomasa. Lo anterior demuestra que el tiempo de adición del elicitor influye significativamente en la producción de biomasa (ANEXO G: Análisis estadísticos del efecto de la variable tiempo de elicitación en la producción de Biomasa).

De acuerdo con estos resultados se escogió que el día 4 de cultivo como el mejor tiempo de adición de MeJA y AS al cultivo de células en suspensión de *T. peruviana*, debido a que en este tiempo se reducen los efectos negativos en la producción de biomasa y se incrementa significativamente la producción de CF.

2.4.3.2. Variable: tiempo de exposición al elicitor

Este parámetro se evaluó en los cultivos tratados con MeJA 3 µM, AS 300 µM y una combinación de ambos, AS 300 µM más MeJA 3µM (AS/MeJA). Los elicitores se adicionaron a las suspensiones celulares el día 4 del cultivo (mejor tiempo de adición del elicitor definido arriba). Se determinó la producción de CF, Fv y AA a nivel intracelular a las 24, 48, 72, 96 y 120 h post-elicitación (Figura 2-3). El aspecto de las suspensiones celulares se muestra en la Figura 2-4, observándose cambio de coloración desde crema al amarillo que fue más intenso en los tratamientos con MeJA, lo cual indica incremento en la producción de CF u otros compuestos coloreados.

El tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA incrementó la acumulación de CF comparados con el control (sin elicitación) en todos los tiempos evaluados. También se observó una alta correlación entre el contenido de CF, Fv y la AA (Anexo H). Los niveles más altos de CF y AA se encontraron en los tratamientos con MeJA 3 µM a las 96 h post-elicitación (CF = 4,47 ± 0,37 mg EAG/ g BS; AA = 16,65 ± 1,43 mg ET/ g BS), lo cual representa un aumento del 49,25 % y 66,28 % en comparación con el control, respectivamente. Además, el mayor contenido de CF se encontró a las 72 h después de la elicitación con MeJA 3 µM (Fv = 6,88 ± 0,65 mg EQ/ g BS), lo que representa un aumento del 105,26 % en comparación con los cultivos no tratados con MeJA.

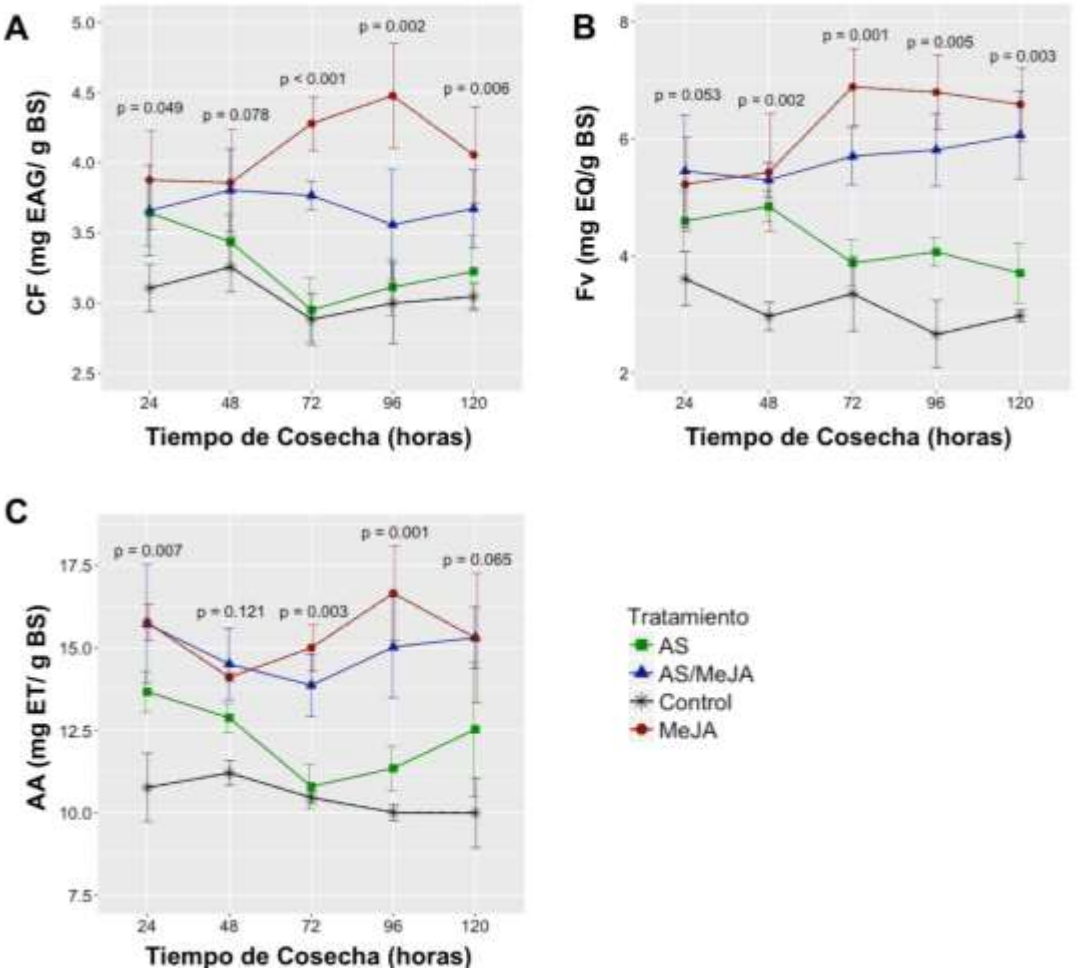


Figura 2-3: Optimización de la variable "tiempo de exposición al elicitor" sobre la acumulación de compuestos fenólicos (A), flavonoides (B) y antioxidantes (C) intracelulares en los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* tratadas con MeJA 3µM, AS 300 µM y la combinación AS/MeJA (3 µM/300 µM). Los datos se presentan como valores de la media ± DE de tres experimentos independientes.

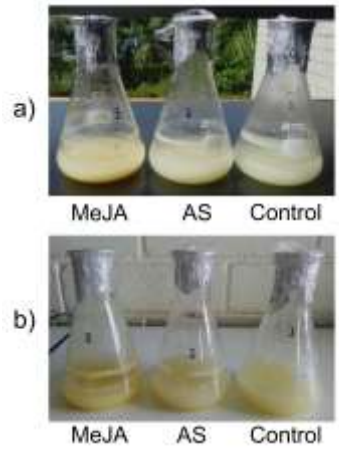


Figura 2-4: Cultivos de células en suspensión control y tratadas con MeJA (3 µM) y AS (300 µM). Las células fueron cosechadas, a) 24 horas y b) 96 horas después de la adición del elicitor.

Por otro lado, el máximo efecto elicitor del AS se obtuvo durante las primeras horas de cultivo, logrando un aumento de 21,41 % en los CF y 36,5 % en la AA a las 24 h post-elicitación, en comparación con el control; mientras que el contenido de Fv aumentó 81,9 % a las 48 h post-elicitación. La combinación de elicitores AS y MeJA también aumentó la producción de estos metabolitos en comparación con el cultivo sin elicitor, pero estos niveles fueron más bajos a los obtenidos solo con MeJA y más altos a los obtenidos solo con AS. Estos resultados sugieren que AS y MeJA tienen diferentes mecanismos de acción sobre el metabolismo de las suspensiones celulares de *T. peruviana*.

Los resultados obtenidos hasta este punto demuestran que AS 300 µM y MeJA 3 µM (solos o en combinación) causan incremento en la producción de CF totales en los cultivos de *T. peruviana,* cuando son adicionados al cultivo en el día 4 crecimiento (fase exponencial) y un tiempo de exposición de 24 h para AS y, entre 72-96 h para MeJA. No obstante, es necesario saber si existen diferencias en el perfil de los metabolitos que son inducidos por estas moléculas. Para respuesta a esta inquietud se analizó el perfil HPLC de los metabolitos presentes en los extractos intracelulares y en el medio extracelular de los cultivos a los diferentes tiempos de cosecha después de la adición de los elicitores.

2.4.4. Perfil HPLC de metabolitos

La Tabla 2-3 presenta los t_R a 280 nm y las absorbancias máximas de los fenoles y flavonoides usados como estándares en este experimento. El análisis por HPLC demostró que el tratamiento con AS 300 µM, MeJA 3 µM y la combinación AS/MeJA ocasiona cambios en el perfil de metabolitos intracelulares y extracelulares en las suspensiones celulares de *T. peruviana*. Independientemente del tratamiento, se detectaron 11 componentes comunes en todos los extractos intracelulares (Figura 2-5).

Tabla 2-3: Tiempos de retención (t_R) a 280 nm y absorbancia máximas de los estándares analíticos de fenoles y flavonoides usados en el estudio.

Compuesto	**Formula Molecular**	**t_R (min)**	**Absorbancia máxima (nm)**
Ácido clorógenico	$C_{16}H_{18}O_9$	8,990	228/321/635
Ácido cafeico	$C_9H_8O_4$	9,438	232/317/622
Ácido trans-sinápico	$C_{11}H_{12}O_5$	9,915	222/237/292
Dihidroquecetina	$C_{15}H_{12}O_7$	11,652	221/288/237
Coumarina	$C_9H_6O_2$	14,537	225/274/309
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	16,369	226/253/369
Hesperetina	$C_{16}H_{14}O_6$	18,653	223/237/286
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	18,990	228/266/356

La comparación de los tiempos de retención (t_R) y los datos de absorbancia UV-vis de los componentes presentes en las muestras y los estándares analíticos, identificó la presencia del flavonoide DHQ (t_R = 11,6 min) en todas las muestras. La intensidad del pico de la DHQ fue dependiente del tiempo de cultivo y del tratamiento. El tratamiento de las suspensiones con AS provocó una respuesta celular temprana caracterizada por la producción de dos compuestos con t_R = 7,48 y 7,98 min, a las 24 h de elicitación. Estos compuestos no fueron detectados en las suspensiones control (Figura 2-5B). Adicionalmente, en las suspensiones tratadas con MeJA se detectaron dos compuestos diferentes con t_R = 8,96 y 13,29 min, después de 72 h (Figura 2-5C). El componente con t_R de 8.98 min se identificó como ácido clorogénico por comparación con el estándar analítico de referencia (Figura 2-6).

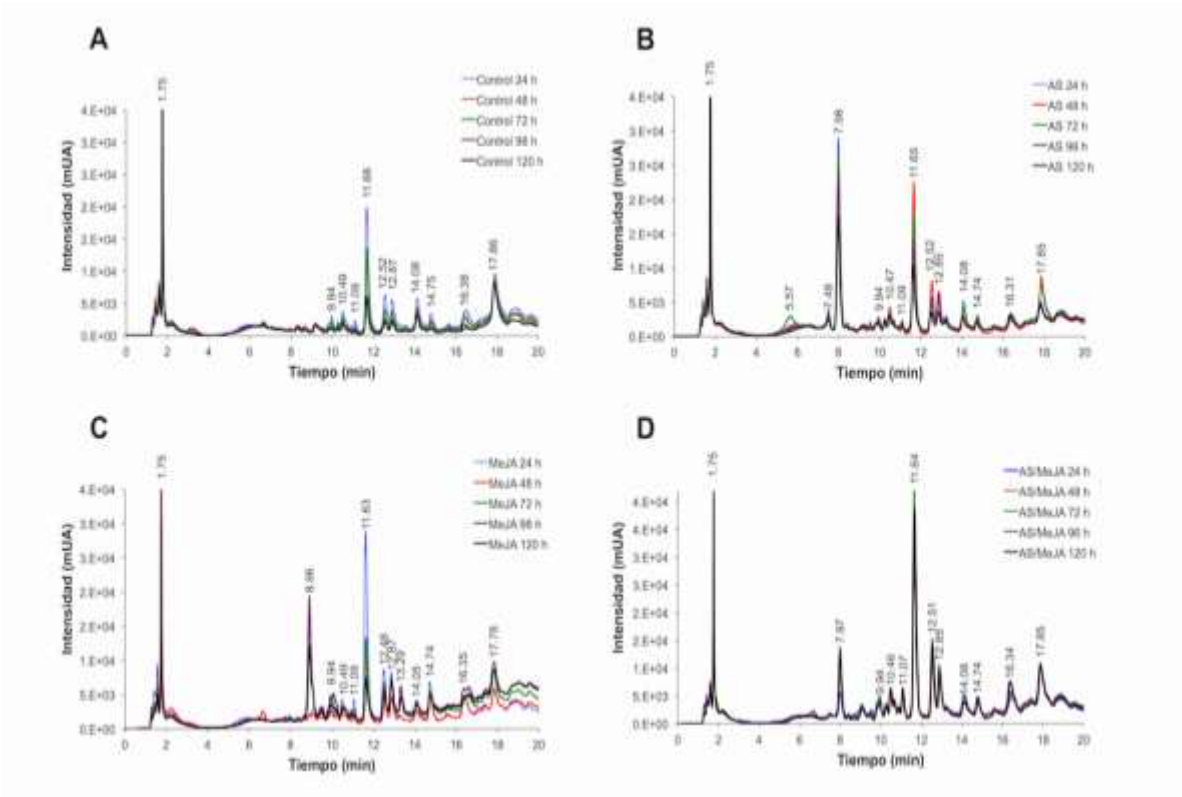


Figura 2-5: Perfil HPLC de extractos etanólicos (intracelulares) de suspensiones celulares de *T. peruviana* control (A) y tratadas con AS (B), MeJA (C) y AS/MeJA (D), cosechadas a diferentes tiempos (24, 48, 72, 96 y 120 horas post-elicitación). Cada cromatograma corresponde al promedio de tres experimentos independientes.

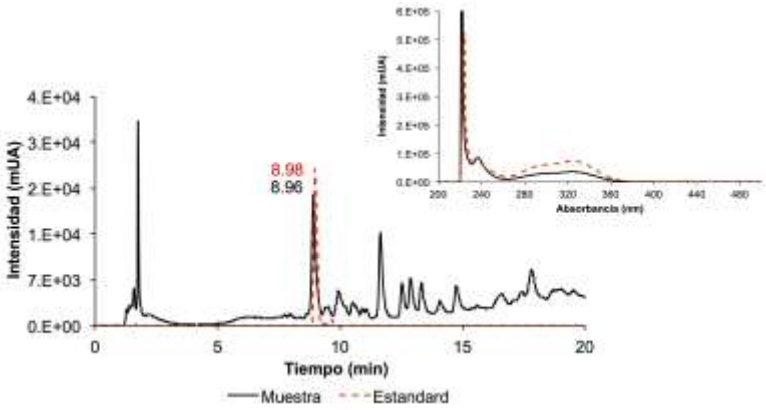


Figura 2-6: Cromatograma HPLC (280 nm) y espectro de absorción UV/vis del estándar ácido clorogénico y el extracto intracelular de una suspensión celular de *T. peruviana* tratada con MeJA 3 µM y cosechada a las 72 h post-elicitación.

Los cromatogramas del tratamiento con AS/MeJA no mostraron picos diferentes a los identificados en los tratamientos independientes con AS y MeJA; sin embargo, se detectaron cambios en las intensidades. Por ejemplo, se observó incremento en la intensidad del pico de la DHQ y disminución del pico con t_R = 7,98 min, que había sido inducido por AS. De manera interesante, el ácido clorogénico que fue inducido por MeJA, no se detectó en el tratamiento con AS/MeJA (Figura 2-5D). Estos resultados sugieren que el tratamiento simultáneo con AS y MeJA produce un efecto antagónico en algunos, pero no en todos los CF producidos en los cultivos celulares de *T. peruviana*. Niki et al.,1998 describieron que el antagonismo entre AS y JA desempeña un papel central en la modulación endógena de la red de señalización inmune de las plantas. De manera similar, se ha informado que el tratamiento exógeno con AS y JA puede resultar en un efecto antagónico sobre la producción de CF y antioxidantes, ya que los salicilatos pueden anular aspectos de la cascada de señalización de JA (Ncho et al., 2016; Considine et al., 2009). Este efecto antagónico podría explicar la reducción en la producción de CF totales y de ácido clorogénico en las suspensiones de *T. peruviana* cuando AS y MeJA se usan en combinación, comparado con MeJA solo. No obstante, la interacción entre AS y MeJA parece ser más compleja y también puede darse un efecto sinérgico sobre el metabolismo secundario vegetal, dependiendo de la concentración y el tiempo de aplicación al cultivo (Sukito & Tachibana, 2016).

Dado que la mayoría de los CF y Fv reportados en plantas nativas de *T. peruviana* se encuentran glicosilados (unidos a carbohidratos), se decidió someter los extractos intracelulares a una hidrólisis con HCl 20% para obtener las agliconas. Los cromatogramas de todas las muestras hidrolizadas presentaron dos componentes mayoritarios, el primero con t_R = 5,6 min y otro con t_R = 11,6 min (correspondiente a la DHQ); también se detectaron cuatro picos minoritarios con t_R = 1,41 – 1,75 – 7,05 y 10,07 min, lo cuales no fueron identificados (Figura 2-7). El ácido clorogénico (t_R = 8,96 min) se detectó solo en los extractos hidrolizados de las suspensiones celulares tratadas con MeJA a partir de las 72 h de elicitación (Figura 2-8).

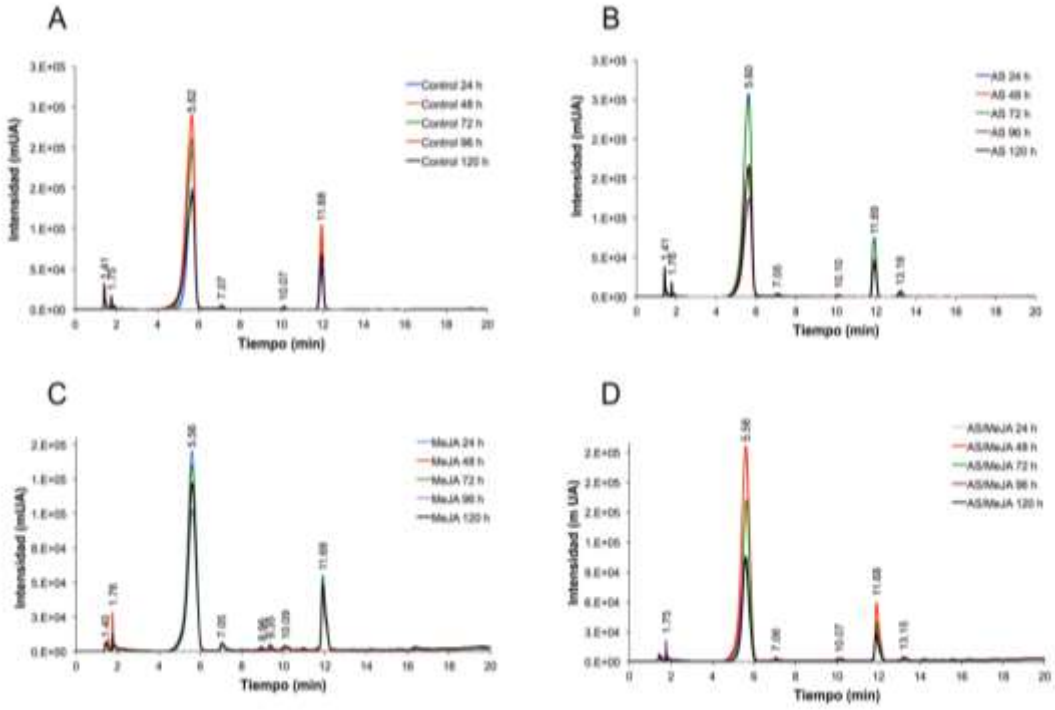


Figura 2-7: Perfil HPLC de extractos etanólicos hidrolizados (intracelulares) de las suspensiones celulares de *T. peruviana* control (A) y tratadas con AS (B), MeJA (C) y AS/MeJA (D), cosechadas a diferentes tiempos de cultivos (24, 48, 72, 96 y 120 h). Cada cromatograma corresponde al promedio de tres experimentos independientes.

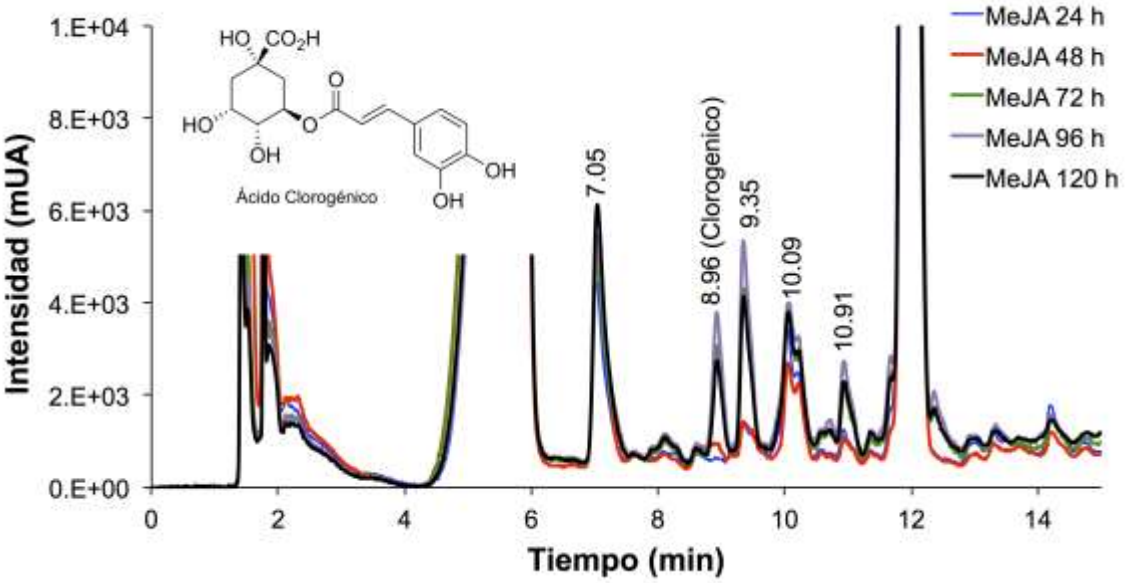


Figura 2-8: Cromatograma (280 nm) de extractos etanólicos hidrolizados de suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con MeJA 3 µM.

Además, en las suspensiones celulares tratadas con AS y AS/MeJA, se detectó un pico con t_R = 13,13 min, el cual corresponde al ácido salicílico (t_R = 13,13 min; $Ab._{max.}$ = 221/235/300) (Figura 2-9). La detección de AS únicamente en las muestras hidrolizadas sugiere que este compuesto estaría presente en una forma glicosilada a nivel intracelular. La presencia de formas conjugadas del AS con carbohidratos se ha reportado en varios estudios de cultivos de células vegetales en suspensión (Umetani et al., 1990). Se ha documentado que la adición exógena de alcohol salicílico a estos cultivos activa la transcripción de genes de enzimas glicosiltransferasas, las cuales median la adición de carbohidratos al AS y otros compuestos fenólicos (Payyavula et al., 2009). Se ha planteado que la glicosilación es un mecanismo poderoso para que las plantas regulen la localización celular, disponibilidad y actividad biológica de los fenilpropanoides (Le Roy et al., 2016).

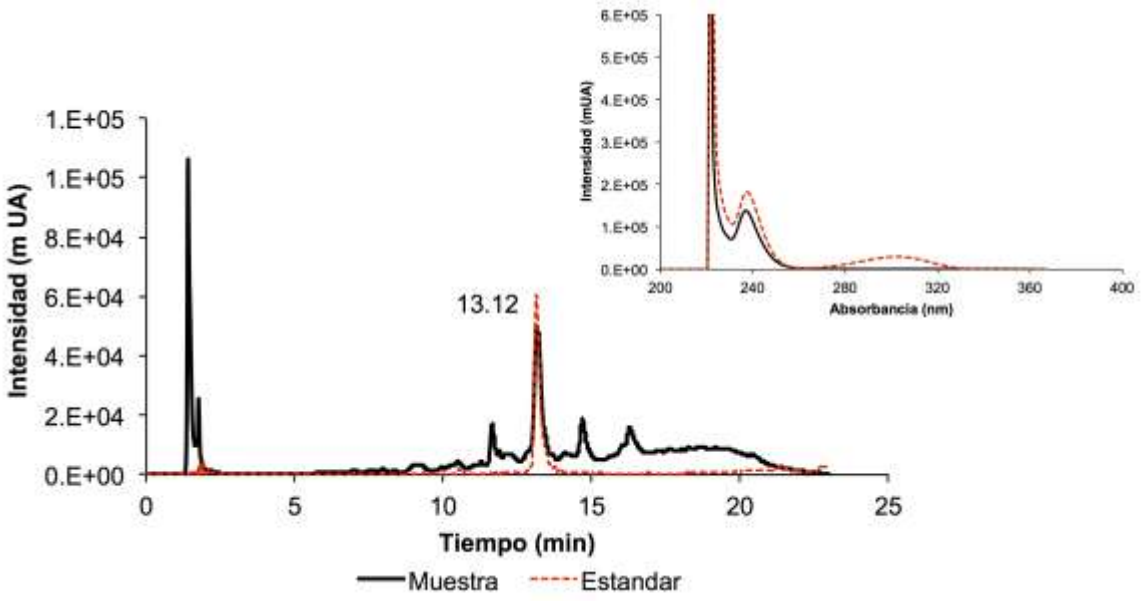


Figura 2-9: Cromatograma HPLC (280 nm) y espectro de absorción UV/vis del ácido salicílico y el extracto etanólico de una suspensión celular de *T. peruviana* tratada con AS/MeJA y cosechada a las 72 h post-elicitación.

A pesar de que el propósito de la elicitación estuvo enfocado principalmente a mejorar la producción de metabolitos intracelulares, se decidió realizar el análisis por HPLC de los metabolitos presentes en los medios extracelulares. La Figura 2-10 muestra los cromatogramas correspondientes a estos análisis. En todas las muestras se detectó un componente no identificado con t_R = 16,27 min y otro componente con t_R = 11,6 min correspondiente a la DHQ. Adicionalmente, en los tratamientos con AS y la combinación AS/MeJa se detectó el AS (t_R = 13,13 min) y otro un componente no identificado con t_R = 14,66 min (Figura 2-10).

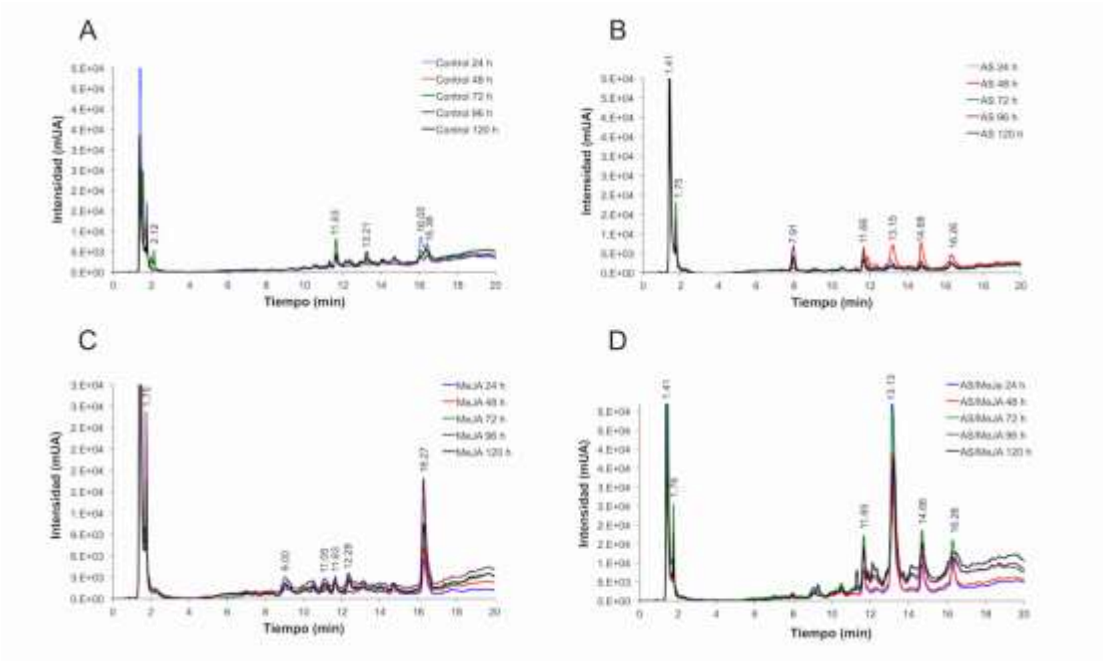


Figura 2-10: Perfil HPLC del medio de cultivo (extracelular) de suspensiones celulares de *T. peruviana* control (A) y tratadas con AS (B), MeJA (C) y AS/MeJA (D), cosechadas a diferentes tiempos (24, 48, 72, 96 y 72 h). Cada cromatograma corresponde al promedio de tres experimentos independientes.

2.4.5.Cuantificación de DHQ y ácido clorogénico.

Se calcularon las cantidades totales de DHQ y ácido clorogénico que se produjeron en los cultivos celulares de *T. peruviana*, en los diferentes tratamientos y tiempo de cosecha posterior a la elicitación. La cuantificación se realizó usando curvas de calibración por HPLC con los estándares de referencia (Anexo C y Anexo I).

Las concentraciones más altas de DHQ se encontraron en las suspensiones celulares tratadas con AS y en las suspensiones control en el día 9 de cultivo (72 horas post-elicitación). El análisis de los extractos hidrolizados permitió establecer de manera indirecta la DHQ que se encuentra unida a carbohidratos (forma conjugada), de tal manera que la DHQ cuantificada en los extractos normales (sin HCl) es la que se encuentra libre (forma aglicona) y la DHQ cuantificada en los extractos hidrolizados con

HCl corresponde a la DHQ intracelular total (forma aglicona + forma conjugada), por tanto la DHQ conjugada se calcula con la siguiente ecuación.

$$DHQ\ conjugada\ =\ DHQ_{(+\ HCl)}\ -DHQ_{(-\ HCl)}$$

La Figura 2-11 muestra los resultados de la cuantificación de las formas aglicona y conjugada de la DHQ en los tratamientos con AS, MeJA, AS/MeJA y el control.

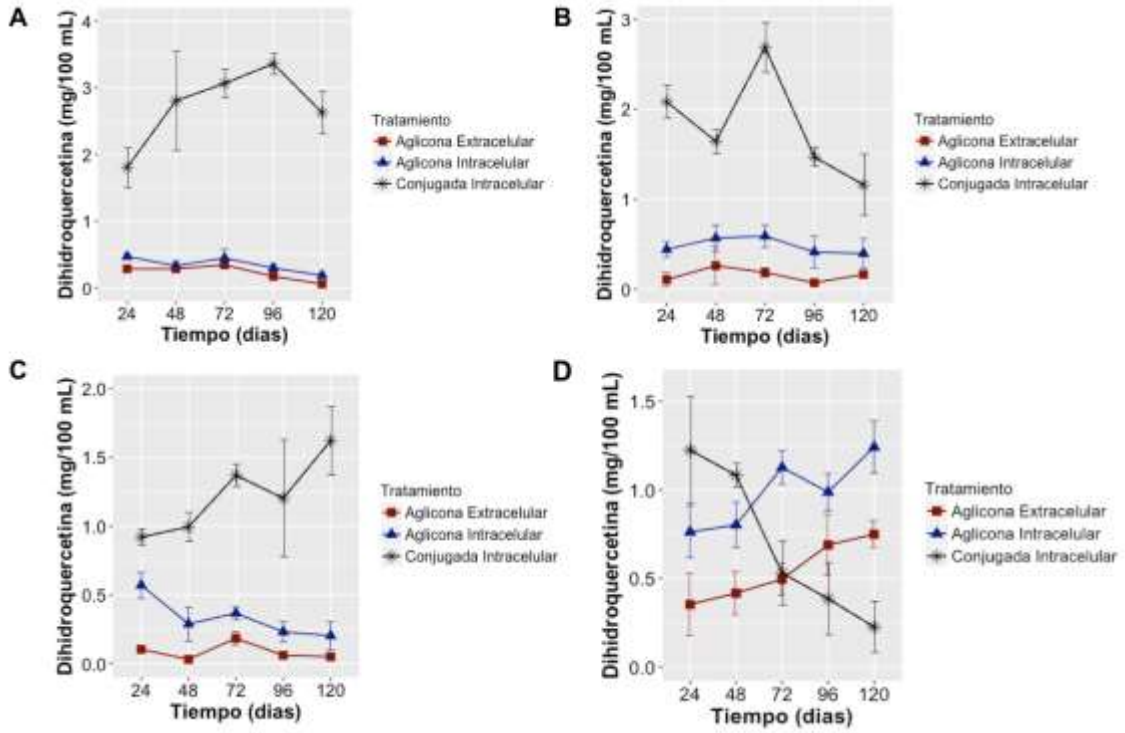


Figura 2-11: Concentración de DHQ intracelular (aglicona y conjugada) y extracelular en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* sin y con elicitación, cosechadas a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-elicitación. La figura A corresponde al control y las figuras B, C y D corresponden a los tratamientos con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA, respectivamente.

Este análisis permitió establecer que la DHQ se encontraba mayoritariamente en forma conjugada en los tratamientos con AS, MeJA y en el control. En las suspensiones tratadas con AS/MeJA la cantidad de DHQ conjugada fue dependiente del tiempo de

cultivo, observándose disminución de su concentración a medida que se incrementaba la forma libre (aglicona), sin que hubiese diferencia significativa en el contenido total (valor p = 0,245). Por otra parte, las concentraciones más altas de DHQ (intracelular + extracelular) se encontraron en los cultivos celulares que no fueron tratados con AS o MeJA, obteniéndose una concentración máxima de 4,31 ± 0,29 mg /100 mL de suspensión celular en el día 10 de cultivo (72 h posterior al inicio del experimento de elicitación); mientras que la cantidad más baja de DHQ se obtuvo en los tratamientos con MeJA (1,60 – 2,16 mg/100 mL). Respecto al ácido clorogénico, este solo se detectó en las suspensiones tratadas con MeJA, a partir de las 72 h de elicitación, obteniéndose una concentración máxima de 1,75 ± 0,22 mg/100 mL de cultivo (Tabla 2-4).

Si bien, estos resultados podrían indicar que MeJA 3 µM dirige el metabolismo fenólico de las células de *T. peruviana* hacia la biosíntesis de polifenoles como el ácido clorogénico, se requeriría de otros estudios (i.e., estudios de transcriptómica) para comprobar esta hipótesis. Los polifenoles como el ácido clorogénico y los flavonoides como la DHQ se sintetizan a partir de un precursor común, el aminoácido fenilalanina, en la ruta de los fenilpropanoides (Ververidis et al., 2007). La actividad de enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL), chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI) y flavanona 3-hidroxilasa (F3H) son claves para biosíntesis de estos metabolitos. Actualmente se sabe que fitohormonas como el AS y JA cumplen un papel fundamental en el control de la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas medicinales, incluidos los fenilpropanoides (Afrin et al., 2015). En el caso específico de este grupo de metabolitos, estudios realizados en cultivos de células en suspensión de *Hypericum perforatum* demuestran que el tratamiento con MeJA incrementa la producción de flavonoides y la actividad de la enzima PAL (Wang et al., 2015); igualmente, tratamiento con AS 250 µM produce aumento de la biosíntesis de fenilpropanoides y la actividad de las enzimas PAL y CHI (Gadzovska et al., 2013). En el caso de *T. peruviana*, la determinación de la actividad de estas enzimas o la expresión de los genes permitan entender el efecto de estas AS y MeJA en el control de la ruta fenilpropanoide.

Tabla 2-4: Concentración total de dihidroquercetina y ácido clorogénico (intracelular y extracelular) en las suspensiones celulares de *T. peruviana* con y sin tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA.

Tratamiento	Dihidroquercetina (mg/100 mL de cultivo)	Ácido clorogénico (mg/ 100 mL de cultivo)
Control (*valor p* = 8,45e-3)		
24 h	3,03 ± 0,36[b]	ND
48 h	3,75 ± 0,69[ab]	ND
72 h	4,30 ± 0,29[a]	ND
96 h	4,02 ± 0,17[ab]	ND
120 h	2,99 ±0,30[b]	ND
AS (*valor p* = 3,86e-4)		
24 h	3,07 ± 0,99[b]	ND
48 h	3,04 ± 0,63[b]	ND
72 h	4,05 ± 0,13[a]	ND
96 h	2,32 ± 0,31[bc]	ND
120 h	2,03 ± 0,36[c]	ND
MeJA (*valor p* = 0,222)		**MeJA (valor p = 1,78e-5)**
24 h	2,16 ± 0,24[a]	ND
48 h	1,60 ± 0,33[a]	0,18 ± 0,04[b]
72 h	2,14 ± 0,14[a]	1,48 ± 0,26[a]
96 h	1,71 ± 0,48[a]	1,75 ± 0,22[a]
120 h	2,05 ± 0,43[a]	1,21 ± 0,46[a]
AS/MeJA (*valor p* = 0,245)		
24 h	3,10 ± 0,55[a]	ND
48 h	3,10 ± 0,28[a]	ND
72 h	3,55 ± 0,25[a]	ND
96 h	3,05 ± 0,18[a]	ND
120 h	3,46 ± 0,16[a]	ND

Valores de la media ± DE de 3 réplicas independientes. Para cada elicitor, los valores con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$). ND = No detectado

2.5. Conclusión

Se demostró que la elicitación con AS y MeJA aumentó el contenido intracelular de CF, FV y AA en los cultivos celulares, lo que sugiere un efecto inductor de estas fitohormonas

en la ruta metabólica de los fenilpropanoides de *T. peruviana*. Por otra parte, estas moléculas no mejoraron la producción de biomasa, lo cual sugiere que los precursores necesarios para el crecimiento de la biomasa estarían siendo utilizados para la biosíntesis de CF. La adición de MeJA 3 µM en el día 4 de crecimiento y la cosecha de las células a las 72 h posteriores a la elicitación, produjo la mayor acumulación de CF, Fv y AA. Mediante análisis de HPLC se comprobó que AS y MeJA ocasiona cambios en el perfil de metabolitos de *T. peruviana*. Se destaca que MeJA induce la producción de compuestos como el ácido clorogénico en los cultivos a las 72 horas post-elicitación. El flavonoide DHQ se produjo en todos los cultivos celulares de *T. peruviana*, pero su concentración fue mayor en las suspensiones tratadas con AS 300 µM y en el control. El tratamiento de los cultivos con la combinación AS/MeJA produjo cambios en el perfil de CF, sugiriendo un efecto antagónico del AS sobre el MeJA. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la elicitación con fitohormonas como AS y JA se podría aplicar juntamente con otras estrategias (por ejemplo, procesos de escalado), para aumentar la productividad de CF, Fv y AA en estos cultivos.

Bibliografía

Afrin S, Huang J-J, Luo Z-Y. JA-mediated transcriptional regulation of secondary metabolism in medicinal plants. Science Bulletin. 2015 Jun;60(12):1062-72. doi: 10.1007/s11434-015-0813-0.

Arias JP, Zapata K, Rojano B, Arias M. Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. J Photochem Photobiol B. 2016 Oct;163:87–91.
doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014.

Arias M, Angarita M, Restrepo JM, Caicedo LA, Perea M. Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension culture of *Thevetia peruviana*. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2010; 46: 233–8. doi: 10.1007/s11627-009-9249-z

Bandara V, Weinstein SA, White J, Eddleston M. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander)

and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. Toxicon. 2010 Sep 1;56(3):273–81. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.026.

Beckers GJ, Spoel SH. Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. Plant Biol (Stuttg). 2006 Jan;8(1):1-10. doi: 10.1055/s-2005-872705.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., 2015: 984–1195.

Considine M, Gordon C, Croft K, Ching S. Salicylic acid overrides the effect of methyl jasmonate on the total antioxidant capacity of table grapes. Acta Hortic. 2009; 841:495–498. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.841.67.

Dabur R, Gupta A, Mandal TK, Singh DD, Bajpai V, Gurav AM, Lavekar GS. Antimicrobial activity of some Indian medicinal plants. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2007 Feb; 4(3): 313–8. doi:10.4314/ajtcam.v4i3.31225.

Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical databases.
https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search (Accessed 12 June 2018).

Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, Hagège D, Courtois D, Joseph C. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphtodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC). 2013 Apr;113(1):25–39. doi: 10.1007/s11240-012-0248-0.

Haldar S, Karmakar I, Chakraborty M, Ahmad D, Haldar PK. Antitumor potential of *Thevetia peruviana* on Ehrlich's ascites carcinoma-bearing mice. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2015;34(2):105–13. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2015012017.

Hassan MM, Saha AK, Khan SA, Islam A, Mahabub-Uz-Zaman M, Ahmed SSU. Studies on the antidiarrhoeal, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanol-extracted leaves of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). Open Vet J. 2011; 1(1): 28–31.

Kohls S, Scholz-Böttcher BM, Teste J, Rullkötter J. Isolation and quantification of six cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana* provide a basis for toxicological survey. Indian J Biochem Biophys. 2015; 54: 1502–10. doi: 10.1002/chin.201611220.

Kohls S, Scholz-Böttcher BM, Teske J, Zark P, Rullkötter J. Cardiac glycosides from yellow oleander (*Thevetia peruviana*) seed. Phytochemistry. 2012 Mar;75:114-27. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.11.019.

Le Roy J, Huss B, Creach A, Hawkins S, Neutelings G. Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. Front Plant Sci. 2016 May 26;7:735. doi: 10.3389/fpls.2016.00735.

Manivannan A, Soundararajan P, Park YG, Jeong BR. Chemical Elicitor-Induced Modulation of Antioxidant Metabolism and Enhancement of Secondary Metabolite Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. Int J Mol Sci. 2016 Mar 18;17(3):399. doi: 10.3390/ijms17030399.

Miyanaga K, Seki M, Furusaki S. Quantitative determination of cultured strawberry-cell heterogeneity by image analysis: effects of médium modification on anthocyanin accumulation. Biochem Eng J. 2000 Jul 1;5(3):201–207. doi: 10.1016/S1369-703X(00)00059-0.

Namdeo A. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharmacognosy Reviews 2007;1:69–79.

Ncho XE, Doumbia ML, Traore S, Konan YKF, Kone M, Kouakou TH. Estimation of total phenolic compounds in treated leaves with methyl jasmonate and salicylic acid of banana (*Musa acuminata* L. AAA group cv. Grand Naine) susceptible to the black leaf streak disease. Agric Sci Res J. 2016;6:175–181.

Ncube B, Finnie JF, Van Staden J. Quality from the field: the impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. S Afr J Bot. 2012;82:11–20. doi: 10.1016/j.sajb.2012.05.009.

Niki T, Mitsuhara I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leave. Plant Cell Physiol. 1998 May;39(5):500–7. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029397.

Noir S, Bömer M, Takahashi N, Ishida T, Tsui TL, Balbi V, Shanahan H, Sugimoto K, Devoto A. Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. Plant Physiol. 2013 Apr;161(4):1930-51. doi: 10.1104/pp.113.214908.

Patil RA, Lenka SK, Normanly J, Walker EL, Roberts SC. Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *Taxus* cells. Plant Cell Rep. 2014 Sep;33(9):1479-92. doi: 10.1007/s00299-014-1632-5.

Payyavula RS, Babst BA, Nelsen MP, Harding SA, Tsai CJ. Glycosylation-mediated phenylpropanoid partitioning in *Populus tremuloides* cell cultures. BMC Plant Biol. 2009 Dec 29;9:151. doi: 10.1186/1471-2229-9-151.

Pekal A, Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. Food Anal Methods. 2014; 7(9):1776–82. doi: 10.1007/s12161-014-9814-x.

Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó RM, Javier Palazon J. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. Molecules. 2016 Feb; 21(2): 182. doi: 10.3390/molecules21020182.

Ramos-Silva A, Tavares-Carreón F, Figueroa M, De la Torre-Zavala S, Gastelum Arellanez A, Rodríguez-García A, Galán-Wong LJ, Avilés-Arnaut H. Anticancer potential of *Thevetia peruviana* fruit methanolic extract. BMC Complement Altern Med. 2017 May 2;17(1):241. doi: 10.1186/s12906-017-1727-y.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applyingan improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999 May;26(9-10):1231-7. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

Rincón-Pérez J, Rodríguez-Hernández L, Ruíz-Valdiviezo VM, Abud-Archila M, Luján-Hidalgo MC, Ruiz-Lau N, González-Mendoza D, Gutiérrez-Miceli FA. Fatty acids profile, phenolic compounds and antioxidant capacity in elicited callus of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. J Oleo Sci. 2016;65(4):311-8. doi: 10.5650/jos.ess15254.

Saeed S, Ali H, Khan T, Kayani W, Khan MA. Impacts of methyl jasmonate and phenyl acetic acid on biomass accumulation and antioxidant potential in adventitious roots of *Ajuga bracteosa* Wall ex Benth, a high valued endangered medicinal plant. Physiol Mol Biol Plants. 2017 Jan;23(1):229-237. doi: 10.1007/s12298-016-0406-7.

Sajca L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochem Eng J. 2000;4(2):89–99. doi: 10.1016/S1369-703X(99)00035-2.

Schenk RV, Hildebrandt AC. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. Can J Bot. 1972; 50:199-204.

Slinkard K, Singleton VK. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am J Enol Vitic. 1977 Jan;28:49–55.

Sudha G, Ravishankar GA. Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and the involvement of methyl jasmonate and salicylic acid. Acta Physiol Plant. 2003 sep;25(3):249–56. doi: 10.1007/s11738-003-0005-4.

Sukito A, Tachibana S. Effect of methyl jasmonate and salycilic acid synergism on enhancement of bilobalide and ginkgolide production by immobilized cell cultures of *Ginkgo biloba*. Bioresour Bioprocess. 2016;3:24. doi: 10.1186/s40643-016-0101-0.

Tewtrakul S, Nakamura N, Hattori M, Fujiwara T, Supavita T. Flavanone and flavonol glycosides from the leaves of *Thevetia peruviana* and their HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase inhibitory activities. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2002; 50: 630–5.

Tu X, Ma S, Gao Z, Wang J, Huang S, Chen W. One-Step Extraction and Hydrolysis of Flavonoid Glycosides in Rape Bee Pollen Based on Soxhlet-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion. Phytochem Anal. 2017 Nov;28(6):505-511. doi: 10.1002/pca.2699.

Umetani Y, Kodakari E, Yamamura T, Tanaka S, Tabata M. Glucosylation of salicylic acid by cell suspension cultures of *Mallotus japonicas*. Plant Cell Rep. 1990 Oct;9(6):325-7. doi: 10.1007/BF00232861.

Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of multienzyme pathways in plants and microbes. Biotechnol J. 2007 Oct;2(10):1235-49. doi: 10.1002/biot.200700184.

Vuong TV, Franco C, Zhang W. Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Biotecnol Rep. 2014;1–2:15–21. doi: 10.1016/j.btre.2014.04.002.

Wang J, Qian J, Yao L, Lu Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. Bioresour Bioprocess. 2015; 2:5. doi: 10.1186/s40643-014-0033-5.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal traduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv. 2005 Jun;23(4):283-333. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.01.003.

3. Capítulo 3

Detección de cambios en la inducción de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* tratadas con ácido salicílico y jasmonato de metilo, usando espectroscopia FT-NIR y RP-HPLC combinadas con análisis multivariante discriminante (AMV).

3.1. Resumen

El objetivo del presente estudio fue establecer cambios en el perfil de CF en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* elicitados con ácido salicílico (AS) y jasmonato de metilo (MeJA). Se utilizó la espectroscopia infrarroja cercana con transformada de Fourier (FT-NIR) y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), combinadas con análisis estadísticos multivariados (AMV) para detectar diferencias significativas entre los tratamientos. El resultado del análisis de componentes principales (PCA) de los datos espectrales FT-NIR mejoró la discriminación de las muestras de acuerdo con el tratamiento; mientras que el gráfico de cargas del PCA exhibió influencia significativa de una señal centrada a 4670 cm^{-1}; esta señal es característica de CF, lo que evidencia el efecto de la elicitación sobre este grupo de metabolitos. Los resultados de la aplicación del AMV a los datos cromatográficos fueron notablemente consistentes con los

obtenidos a partir de los datos del FT-NIR. Los análisis discriminantes de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) mejoraron la separación de las muestras respecto a el tratamiento. Por otra parte, los modelos PCA y PLS-DA mostraron que el tiempo de exposición de las células al MeJA influye significativamente en la discriminación de este grupo respecto al control, sugiriendo que la respuesta ocurre 72 h después de la elicitación. En conclusión, se logra confirmar que AS y MeJA afectan de diferente manera el metabolismo fenólico de las células en suspensión de *T. peruviana*, produciendo cambios en la composición de estos metabolitos; estos cambios son particularmente dependientes del tiempo de exposición al elicitor en los cultivos tratados con MeJA.

Palabras clave: *Thevetia peruviana*, cultivos vegetales *in vitro*, FT-NIR, HPLC, análisis estadístico multivariante, análisis discriminante.

3.2. Introducción

El cultivo *in vitro* de células vegetales en suspensión es una estrategia biotecnológica ampliamente utilizada para incrementar la producción de biomasa y de metabolitos secundarios de valor farmacéutico (Ramachandra et al., 2002; Whitaker et al., 1986). En el caso de *T. peruviana* esta estrategia va en caminada a el desarrollo productos de base biotecnológica, tales como la producción de metabolitos como peruvósido, tevetina y compuestos fenólicos con alto potencial para el tratamiento del cáncer.

La obtención de cultivos celulares en suspensión de *T. peruviana* se logró hace más de una década en nuestro laboratorio (Arias et al., 2010) y se ha mantenido activa, demostrando estabilidad en los parámetros cinéticos de crecimiento celular (tiempos de duplicación, velocidad específica de crecimiento y consumo de sustrato), incluso al incrementarse la edad de los cultivos, medida como subcultivos celulares (Villegas-Quiceño et al., 2018). De igual forma, se demostró que los cultivos responden al tratamiento con elicitores químicos, como AS, MeJA o la combinación AS/MeJA incrementando significativamente la producción de CF, Fv y AA totales (resultados mostrados en el capítulo 2 de este documento); evidenciándose, por la técnica de

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) e inspección visual de los cromatogramas, cambios en el perfil de CF intracelulares y extracelulares, dependiendo del tipo de elicitor (Mendoza et al., 2018). No obstante, las evaluaciones de cromatogramas basadas en similitudes visuales presentan dificultades que lo hacen inconveniente para detectar diferencias significativas entre muestras complejas; por ejemplo, la detección de cambios menores entre compuestos estrechamente relacionados se dificulta debido a la subjetividad de la inspección visual. Por otra parte, el análisis cuantitativo sólo se podría realizar a unos pocos compuestos de identidad conocida, por lo que se estarían ignorando aquellos analitos desconocidos que podrían ser marcadores importantes de la respuesta celular al tratamiento.

Una solución a estos inconvenientes es la aplicación del análisis estadístico multivariante (AMV) a los datos. Actualmente es común el uso de técnicas analíticas cromatográficas o espectroscópicas combinadas con el AMV para extraer información biológica relevante de organismos vivos (Siebert, 2001; Granato et al., 2018). Este enfoque es usado ampliamente en la investigación de plantas; por ejemplo, en estudios de clasificación según el origen geográfico (Li et al., 2017), discriminación de especies (Chen et al., 2011) y cultivares (Guo et al., 2017), evaluación metabólica de plantas modificadas genéticamente (Moreira & Scarminio, 2013) y predicción de componentes de calidad química (Zareef et al., 2018), entre otros. De la misma forma, el perfil cromatográfico de CF, combinado con el AMV, se ha empleado en estudios de clasificación de plantas de acuerdo a la susceptibilidad a infecciones (Diabate et al., 2009); también en la determinación de la calidad de plantas medicinales (Liu et al., 2017), probando ser una herramienta eficaz para estos propósitos.

Por otra parte, técnicas analíticas no destructivas, como la espectroscopia de infrarrojo medio con transformada de Fourier (FT-MIR) (Christou et al., 2017) y la espectroscopia de infrarrojo cercano (FT-NIR) (Borille et al., 2017), se han usado junto al análisis quimiométrico, para discriminar y clasificar plantas. Aunque estas técnicas tienen menor sensibilidad, comparada con las cromatográficas, ofrecen la ventaja de ser rápidas y económicas, debido a que no se requiere preparación laboriosa de las muestras, ni gasto de reactivos o solventes; por lo que, si el objetivo es realizar un análisis discriminante rápido, éstas deben considerarse. En nuestro conocimiento, la aplicación de la espectroscopia infrarroja a la investigación de cultivos de células vegetales en

suspensión se ha centrado en la cuantificación de productos (Hashimoto et al., 2005) y el monitoreo de parámetros cinéticos del cultivo, como la velocidad de consumo de sustrato (Hashimoto et al., 2001).

En el presente estudio se usó FT-NIR para determinar cambios en la producción de CF en las suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA. La espectroscopia NIR caracteriza el material en base a su absorción en un rango de ~4000–12500 cm^{-1}; este rango corresponde a sobretonos de frecuencias vibracionales fundamentales (armónicos) y bandas de combinación. Las bandas que principalmente se observan surgen sobre todo del estiramiento de uniones O-H, C-H, y N-H, por lo que esta técnica se ha utilizado para el análisis cualitativo y cuantitativo compuestos fenólicos (Frizon et al., 2015; Hassan et al., 2015), flavonoides (Lu et al., 2011) y carbohidratos (Smith-Moritz et al., 2011) en plantas. Aunque la espectroscopia NIR ofrece una menor selectividad molecular comparada con el FT-IR (rango de ~400–4000 cm^{-1}), debido al mayor ensanchamiento de las bandas y a la omnipresencia de las uniones O-H, CH y N-H en las moléculas orgánicas, este inconveniente puede solucionarse a través del análisis quimiométricos de los datos, permitiendo su aplicación en estudios de clasificación de muestras (Cozzolino et al., 2003). Adicionalmente, FT-NIR ofrece la ventaja de poder trabajar con diferentes volúmenes de muestreo con un menor tiempo de análisis,

Por lo anterior, el propósito de esta parte de la investigación fue establecer de manera rápida los cambios en la producción y composición de CF en los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*, debido al tratamiento con AS y MeJA, para lo cual se utilizó FT-NIR y RP-HPLC combinados con AMV. Estas plataformas analíticas permitieron mejorar la discriminación entre los tratamientos y evidenciar el efecto del tiempo de exposición a los elicitores.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Reactivos.

Etanol absoluto 98%, ácido fórmico 98-100% y acetonitrilo (grado HPLC) se adquirieron en Merck (Darmstadt, Germany).

3.3.2.Cultivos de células en suspensión

Los cultivos celulares se realizaron en medio líquido estéril SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), suplementado con 2 mg L^{1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 0,5 mg L^{-1} de kinetina; 30 g L^{-1} de sacarosa y 1 g L^{-1} de mioinositol (pH 5,8), a partir de 2-3 g L^{-1} de inóculo (peso seco) y 100 mL de medio de cultivo, en matraces de 250 mL. Las suspensiones celulares se mantuvieron en un agitador orbital a 110 rpm (New BrunswickTMInnova1 2300), fotoperiodo natural y 25 ± 2 ºC (Arias et al., 2010). Los experimentos de elicitación se realizaron a partir de un subcultivo de 6 días, conteniendo 2 g L^{-1} de biomasa (peso seco), bajo las condiciones antes descritas.

3.3.3.Tratamiento de con los elicitores

La concentración de los elicitores (AS 300 µM, MeJA 3 µM y la mezcla AS 300 µM/MeJA 3µM), y el tiempo de adición del elicitor (día 4 de cultivo) fueron establecidos en cómo se describió en el Capítulo 2 de este documento y correspondieron a las mejores condiciones de elicitación (Mendoza et al., 2018). AS y MeJA se prepararon en una solución acuosa de etanol al 50 % (v/v) y se filtraron a través de membranas Millipore de 0,45 µm (Minisart1, Sartorius, Alemania) antes de adicionarlos a las suspensiones celulares. Las células fueron cosechadas a las 24, 48, 72, 96 y 120 h posteriores a la adición de cada elicitor, con el propósito de establecer el efecto del tiempo de cultivo sobre los cambios en la producción y el perfil de los CF. El control de este experimento fueron suspensiones celulares sin elicitor. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando un método de muestreo destructivo. En total se realizaron 60 experimentos, 15 por cada elicitor y 15 para el control.

3.3.4. Análisis FT-NIR

- **Muestras**

Las células cosechadas se filtraron al vacío y se sometieron a secado en un horno de convección a 60 ºC durante 48 h. La biomasa obtenida se pulverizó utilizando mortero. Posteriormente, se analizó en un espectrómetro infrarrojo (NIRMaster™ FT-NIR Spectrometer BUCHI) a un número de onda entre 4000 - 10000 cm^{-1}. Se realizaron 32 scans por muestra, a intervalos de 4 cm^{-1}.

- **Procesamiento de los datos espectrales**

Debido a que después de 7000 cm^{-1} las lecturas de absorbancia fueron negativas, se seleccionó la región entre 4000 a 7000 cm^{-1} para construir la matriz X, cuyas dimensiones fueron de 60 observaciones x 750 variables. Previo al AMV, los espectros fueron pre-procesados en el software SIMCA 14.1.0.2047 (MKS Umetrics, Suecia) utilizando primera y segunda derivada y algoritmos numéricos como el de Savirzky-Golay (SG) y SNV (acrónimo en inglés para la Varianza Normal Estándar). El procesamiento tuvo el propósito de resolver señales superpuestas, mejorar las propiedades de la señal y suprimir características espectrales no deseadas, como los efectos de la dispersión de la luz causada por la heterogeneidad de las muestras (Bi et al., 2016). La calidad de cada modelo se determinó por el parámetro de bondad de ajuste (R2) y el parámetro de bondad de predicción (Q2). Luego de seleccionar el mejor modelo de procesamiento, los datos de la matriz X se normalizaron y se escalaron utilizando varianza unitaria (UV).

- **Análisis multivariante (AMV)**

A partir de los datos procesados se realizó: Análisis de componentes principales (PCA) y los análisis discriminantes de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA). El PCA es un método de reconocimiento no supervisado cuyo propósito es explorar la presencia de patrones relevantes e interpretables en los datos y detectar valores atípicos a través del análisis T2 de Hottelling (95 % del intervalo de confianza); por otra parte, PLS-DA y OPLS-DA son métodos supervisados de reconocimiento de patrones que maximizan la separación entre muestras (Bartel et al., 2013). Los modelos de PCA, PLS-DA y OPLS-DA se generaron utilizando el software SIMCA. Los gráficos de puntuaciones (scores) se usaron para

visualizar rápidamente la discriminación entre los tratamientos, mientras que los gráficos de carga (loadings) permitieron identificar las variables con mayor valor para la discriminación de los tratamientos.

3.3.5. Análisis RP-HPLC

- **Obtención de extractos intracelulares**.

Se obtuvieron extractos intracelulares de las suspensiones de *T. peruviana* para cada uno de los tratamientos con los elicitores y el control, siguiendo el protocolo previamente descrito en los Capítulos 1 y 2. En resumen, 0,3 g de biomasa seca y pulverizada se extrajo con 15 mL de etanol al 50%, en un baño ultrasónico (frecuencia 40 kHz) a 30 ºC durante 30 min. Los extractos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min; el sobrenadante se recolectó y almacenó protegido de la luz, a -20 °C.

Un volumen de 2 mL de cada extracto se diluyó hasta 10 mL con etanol al 50%, luego se filtró a través de membranas de 0,45 µm. El perfilado cromatográfico se realizó en un equipo HPLC Shimadzu Prominence acoplado a un detector de matriz de diodos (SPD-M20 A) y al Software ChemStation, usando una columna de fase reversa LiChrospher1 250-4 RP-18, 5 mm (Merck S.A). Las condiciones del análisis fueron: temperatura de 28 °C, velocidad de flujo de 1,5 mL min-1 y volumen de inyección de 20 µL. Se usó una fase móvil binaria cuya composición fue: fase A (ácido fórmico al 1% en agua) y fase B (ácido fórmico al 1% en acetonitrilo). El programa de gradiente se estableció como se describió en el Capítulo 1 (numeral 1.3.7). El tiempo de ejecución de 30 min se estableció para eluir todos los CF que pudiesen estar presentes en las muestras. Los datos fueron adquiridos cada 640 milisegundos (msec). La longitud de onda de monitoreo fue seleccionada a 280 nm.

- **Procesamiento de datos y AMV**

Los datos de absorbancia en función del tiempo para cada muestra se exportaron como archivos ASCII 2D; luego se usaron para construir una matriz X con 60 observaciones y 4.686 variables. Un análisis previo de los datos mostró poca dispersión en los tiempos de retención entre las muestras, por lo que no se aplicó ningún algoritmo para alinear los picos. La matriz X de datos fue importada al software SIMCA 14.1.0.2047 (MKS

Umetrics, Suecia), los datos se normalizaron y se escalaron usando el método de Pareto; luego se aplicaron los análisis de PCA, PLS-DA y OPLS-DA.

3.4. Resultados y discusión

AS y JA son fitohormonas endógenas de tolerancia al estrés biótico y abiótico (Khan & Khan, 2013; Rejeb et al., 2014). Estas moléculas promueven la expresión de genes que activan rutas metabólicas de defensa, como la ruta de los fenilpropanoides (Reymond & Farmer, 1998); por esta razón, AS y el éster metílico del JA (MeJA) se usaron como elicitores en los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*. En este estudio se utilizaron dos técnicas analíticas robustas, la espectroscopia FT-NIR y la cromatografía RP-HPLC, combinado con AMV como métodos exploratorios para establecer repuestas diferenciales en el metabolismo fenólico de células de *T. peruviana* tratadas con AS, MeJA y la mezcla AS/MeJA.

3.4.1. FT-NIR y AMV de los datos espectrales

La Figura 3-1 muestra los espectros FT-NIR sin procesar de la biomasa de *T. peruviana* correspondientes a los controles y los diferentes tratamientos con los elicitores.

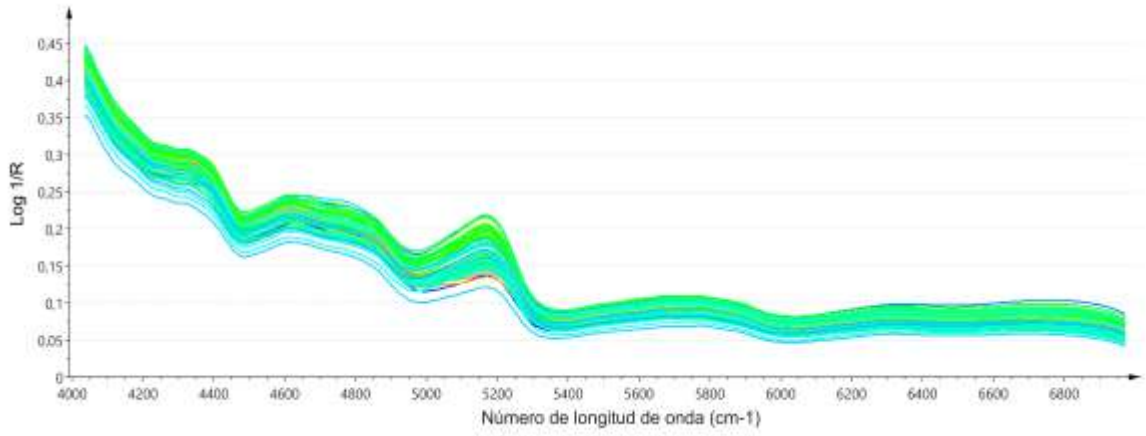


Figura 3-1: Espectros FT-NIR sin procesar de las muestras de *T. peruvana* (biomasa), tratadas con AS, MeJA, AS/MeJA y el control (n = 60).

El algoritmo SNV más la primera derivada (SNV + 1 Der) fue el mejor método para el procesamiento de los espectros, generando un modelo PCA que redujo la dimensionalidad de los datos a seis componentes principales (R2X(cum) = 0,996 y Q2(cum) = 0,995). SNV es un método común de procesamiento de espectros FT-IR (Bi et al., 2016; Rinnan et al., 2009), su objetivo es corregir efectos de dispersión de las señales, siendo usado en estudios de regresión multivariable, en modelos de clasificación y de análisis exploratorios. En este caso, la aplicación del algoritmo SNV a los datos ayudó a corregir la línea base de los espectros, mientras que la primera derivada mejoró la separación de posibles señales superpuestas (Figura 3-2).

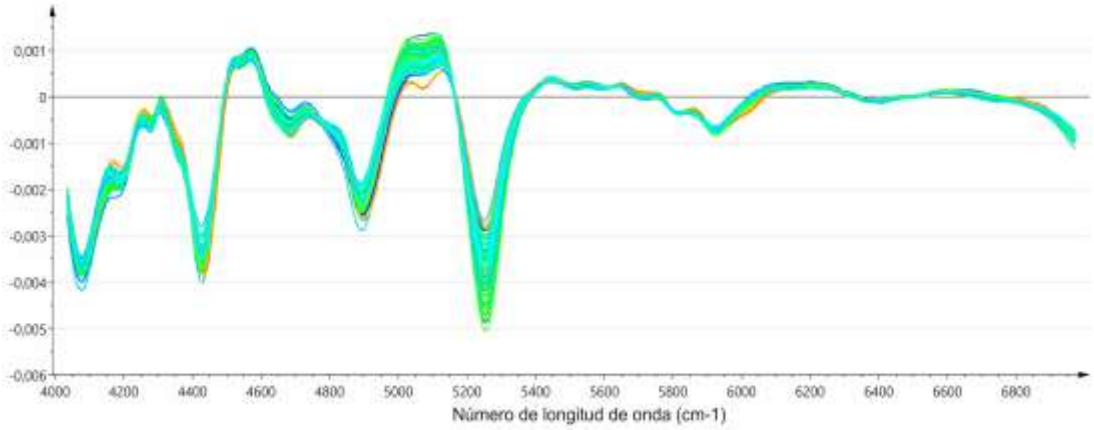


Figura 3-2: Espectros FT-NIR de la biomasa de *T. peruviana* procesados con el algoritmo SNV + 1Der.

La Figura 3-3 A muestra el gráfico bidimensional de score utilizando los dos primeros componentes principales, que representan el 82 % y el 11,4 % de la variación total de los datos, respectivamente. Se observó la existencia de un patrón de distribución de las puntuaciones de acuerdo con el tratamiento; las muestras correspondientes a los tratamientos con AS y MeJA fueron separadas por el segundo componente t [2]; mientras que las muestras correspondientes al tratamiento con AS/MeJA y el control fueron separadas por el primer t [1] y segundo componente t [2]. Adicionalmente, el gráfico de score mostró que las puntuaciones dentro de un mismo tratamiento exhiben un límite amplio de distribución, lo cual sugiere que el PCA tiene una capacidad relativamente alta para distinguir los tratamientos de acuerdo con el tiempo de exposición al elicitor (tiempo de cosecha post-elicitación).

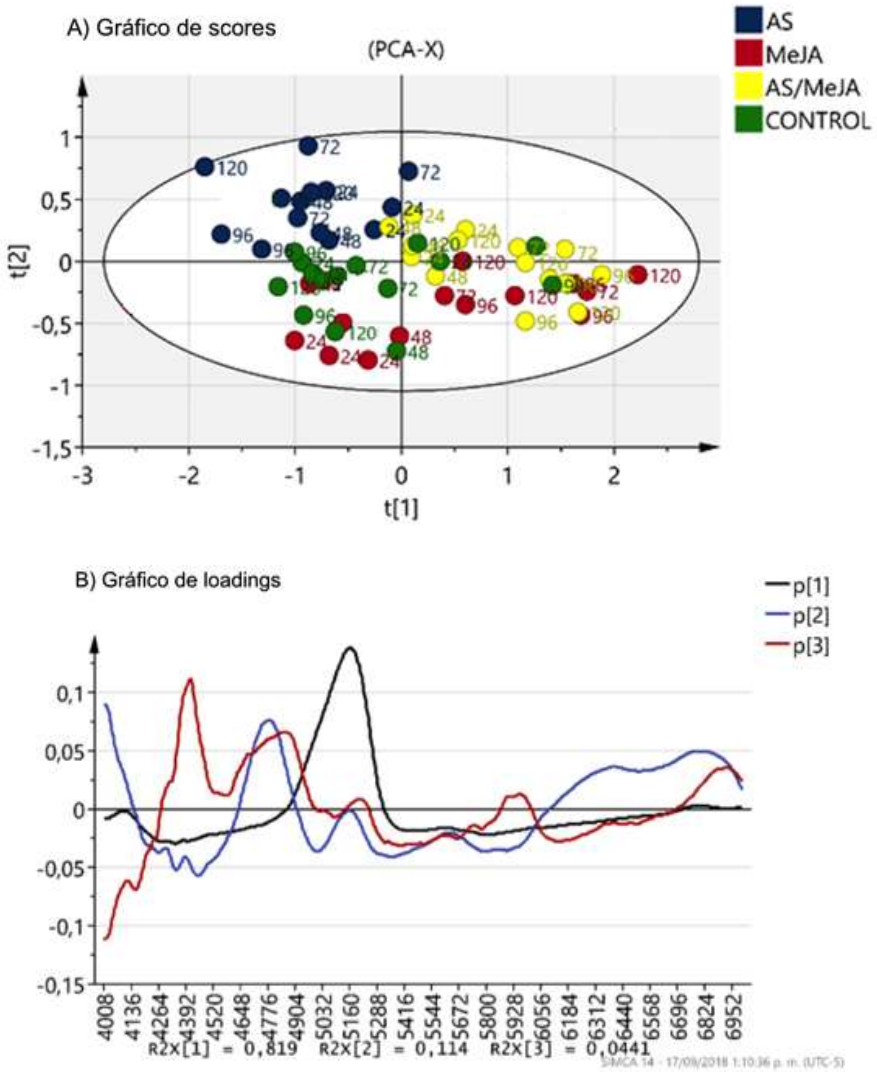


Figura 3-3: A) Gráfico de score bidimensional y B) gráfico de loadings para los tres primeros componentes principales del PCA de los espectros FT-NIR de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA. Los números en las puntuaciones del gráfico de score representan el tiempo de cosecha de las células post-elicitación (24 a 120 h); la elipse representa el T2 Hotelling con un 95% de confianza.

En cuento al gráfico de loadings (Figura 3-3 B), éste mostró que las variables espectrales más significativas para la separación de muestras en el PCA se distribuyeron

principalmente en la región de 4200 - 5300 cm^{-1}. El primer componente principal enfatizó la señal espectral centrada a 5160 cm^{-1}, la cual corresponde a la combinación de estiramiento y flexión del –OH de las moléculas de agua; concretamente, esta señal ha sido asignada a la formación de enlaces de hidrógeno del agua hacia el oxígeno del carbonilo del esqueleto central de las proteínas (Iwamoto, 2010). El segundo componente principal destacó una señal espectral centrada en 4670 cm^{-1}, la cual es característica del enlace C-H de especies fenólicas (Li & Qu, 2010). Aunque el tercer componente solamente describe el 4,41 % de la variación, éste exhibió una clara dominación de la señal fenólica a 4670 cm^{-1} y otra señal centrada a 4390 cm^{-1}, correspondiente al almidón (combinación de estiramiento O-H y C-C) (Lapcharoensuk & Nakawajana, 2018). Este resultado confirma que el tratamiento de las suspensiones celulares de *T. peruviana* con AS y MeJA producen cambios cualitativos y cuantitativos en el metabolismo fenólico, también se sugiere un efecto sobre el metabolismo de las proteínas y los carbohidratos, lo que debe confirmarse mediante estudios metabolómicos con técnicas analíticas más robustas como Resonancia Magnética Nuclear Protónica (^{1}H-RMN) y Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (CL-EM) [35]

Un subsiguiente análisis de los datos espectrales usando el método supervisado PLS-DA apoya lo observado en el PCA. El modelo PLS-DA redujo la dimensionalidad de los datos espectrales a nueve componentes principales que explicaron el 99,8 % de la varianza (R2X = 0,998; R2Y = 0,837 y Q2X = 0,731). El gráfico de score (Figura 3-4 A) del PLS-DA mostró un mejor agrupamiento de las muestras de acuerdo con el tratamiento y confirmó la relevancia del segundo componente principal para la separación de las muestras tratadas con AS y MeJA. El gráfico de loadings del PLS-DA reafirma la relevancia de la señal fenólica a 4670 cm^{-1} en el segundo y tercer componente principal (Figura 3-4 B).

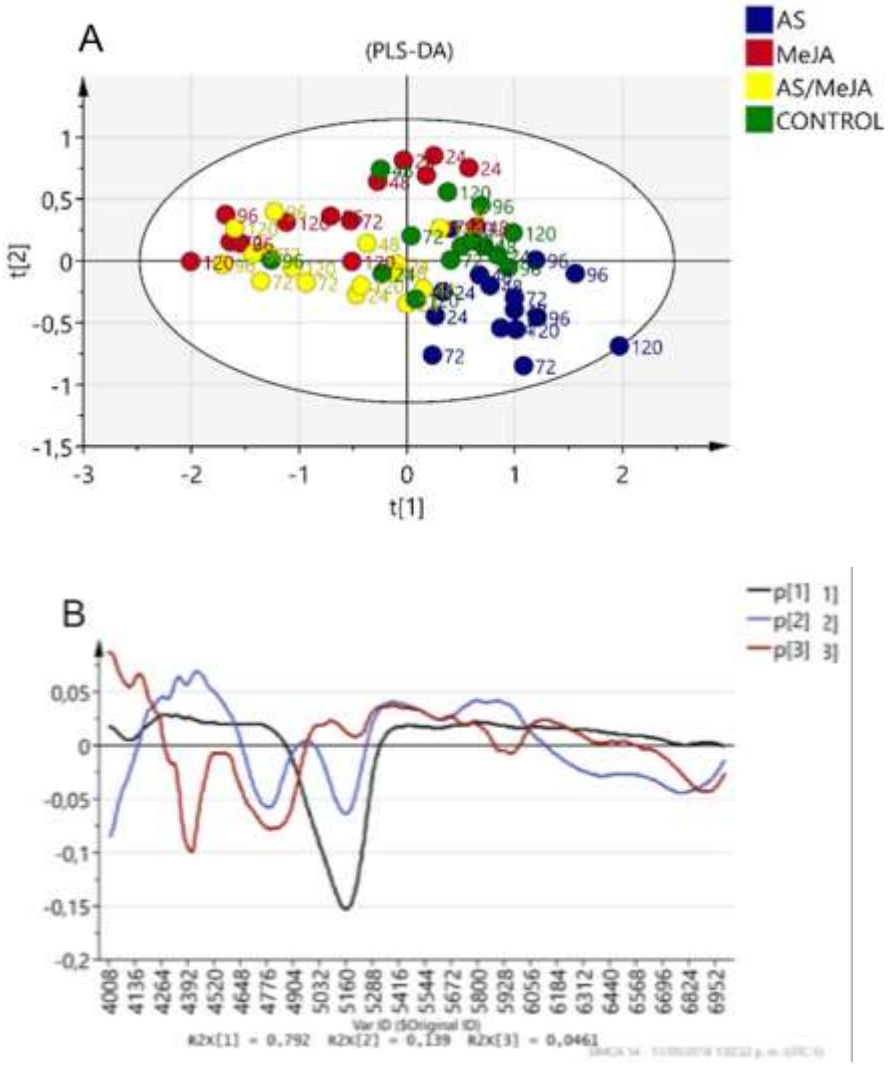


Figura 3-4: A) Gráfico de score bidimensional y B) gráfico de loadings para los tres primeros componentes principales del PLS-DA de los espectros FT-NIR de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA. Los números en las puntuaciones del grafico de score representan el tiempo de cosecha de las células post-elicitación (24 a 120 h); la elipse representa el T2 Hotelling con un 95% de confianza.

El análisis OPLS-DA generó un modelo (R2X = 0,998; R2Y = 0,779 y Q2R = 0,719) que redujo la dimensionalidad de los datos a tres componentes predictivos y cinco componentes ortogonales (3 + 5 + 0). El gráfico de score bidimensional (Figura 3-5 A)

mostró que el modelo reduce el efecto del tiempo de exposición al elicitor, lo cual explica la menor segregación de las muestras dentro de un mismo tratamiento (Figura 3-5 A).

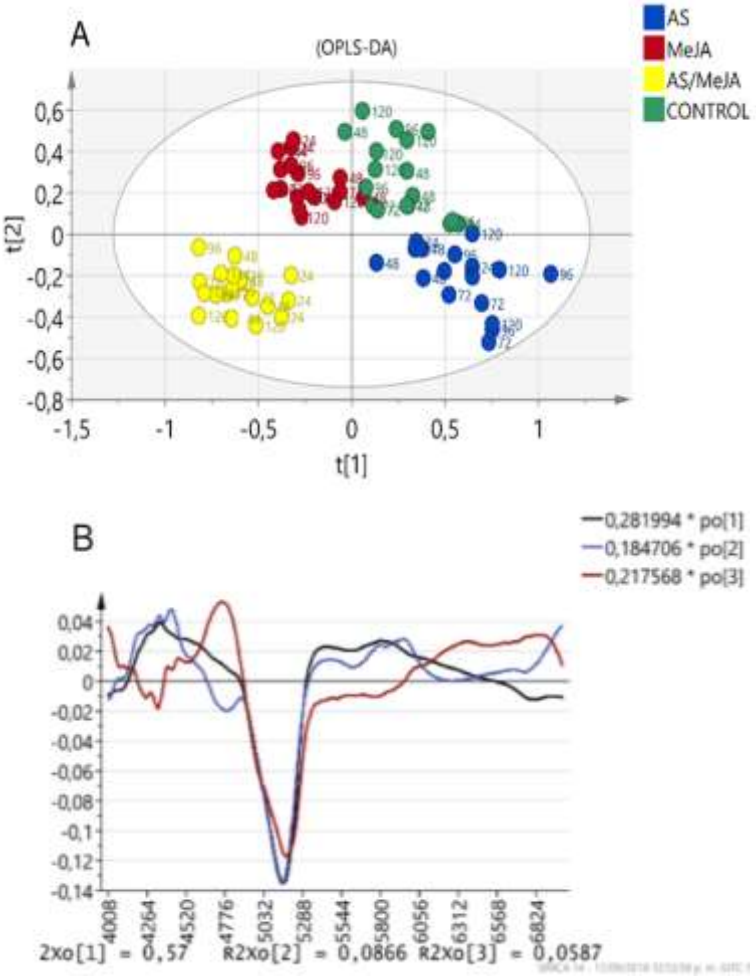


Figura 3-5: A) Gráfico de score bidimensional y B) gráfico de loadings para los tres primeros componentes principales del OPLS-DA de los espectros FT-NIR de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA. Los números en las puntuaciones del gráfico de score representan el tiempo de cosecha de las células post-elicitación (24 a 120 h); la elipse representa el T2 Hotelling con un 95% de confianza.

Tanto PLS-DA como OPLS-DA son herramientas de modelado estadístico potentes que se usan comúnmente en estudios de clasificación y discriminación entre grupos experimentales; sin embargo, estas técnicas pueden forzar la separación de los grupos, generando interpretaciones estadísticas erróneas; especialmente cuando el PCA no expone separación de los grupos (Worley & Powera, 2016). En el presente estudio, PCA

mostró la existencia de un patrón de separación de las muestras de acuerdo al tratamiento, por lo que se asume que los resultados de los análisis supervisados son confiables.

FT-NIR combinado con AMV se ha usado para el desarrollo de métodos predictivos del contenido de compuestos fenólicos (Frizon et al., 2015; Hassan et al., 2015) y flavonoides (Lu et al., 2011) en plantas, evidenciándose el valor predictivo de la banda fenólica a 4670 cm^{-1}. En el presente estudio, está banda fue significativa para la discriminación de los tratamientos, demostrando que AS y MeJA causan efectos diferentes en la biosíntesis fenólica en los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*. También se demostró que la segregación de las muestras fue dependiente del tipo de elicitor y también del tiempo de exposición al elicitor; esto fue particularmente evidente en los tratamientos con MeJA y AS/MeJA, permitiendo establecer que, bajo las condiciones del experimento, estos elicitores inducen la biosíntesis de compuestos fenólicos a las 72 horas.

3.4.2. Perfilado RP-HPLC y AMV de los datos cromatográficos

En el capítulo 2 se mostró, mediante comparación visual de los cromatogramas de HPLC, que el tratamiento con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA produce cambios en el perfil de los metabolitos intracelulares de *T. peruviana*, analizados a 280 nm. En el presente capitulo se aplicó AMV a los datos cromatográficos del HPLC con el propósito de evidenciar una mejor discriminación de los tratamientos de acuerdo al tipo de elicitor y detectar los componentes que son significativos para la discriminación de los tratamientos.

El AMV se aplicó a los datos, previa normalización y escalado. El modelo de PCA (R2X = 0,91; Q2X = 0,851) redujo la dimensionalidad de los datos a seis componentes principales. Los dos primeros componentes pudieron explicar el 49,2 % y 21 %, respectivamente, de la varianza total de los datos.

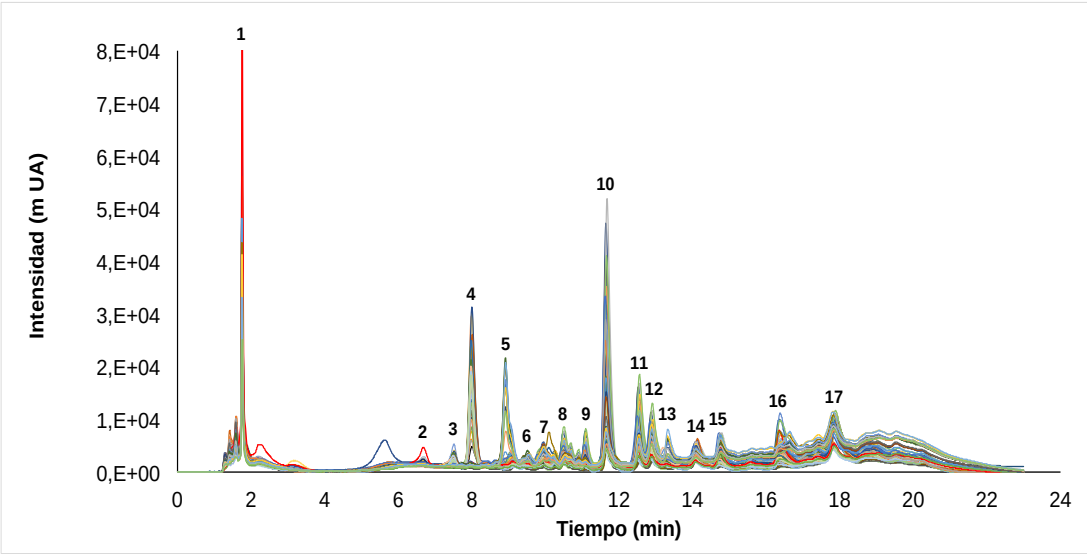


Figura 3-6: Perfiles de HPLC (280 nm) de los extractos de la biomasa de *T. peruviana* tratadas con AS, MeJA y AS/MeJA, cosechadas 24, 48, 72, 96 y 120 h post-elicitación. Se muestran los datos brutos de los cromatogramas apilados (n = 60).

El gráfico de score del PCA (Figura 3-7 A) muestra diferenciación explícita entre las muestras según el tratamiento. La separación fue más evidente entre los controles y el grupo tratado con la combinación AS/MeJA. En el caso de las muestras tratadas sólo con AS y sólo con MeJA, la separación respecto al control fue influenciada por el tiempo de exposición al elicitor. Adicionalmente, algunas muestras correspondientes al tratamiento con MeJA (tiempos de cosecha a 96 y 120 h) se ubicaron en posiciones remotas en el gráfico, por lo que éstas podrían definirse como valores atípicos en el modelo; para confirmar esto, se realizó un análisis de los residuales T2 de Hotelling, el cual descartó la presencia de valores atípicos, en consecuencia, todos los datos se incluyeron en los siguientes análisis.

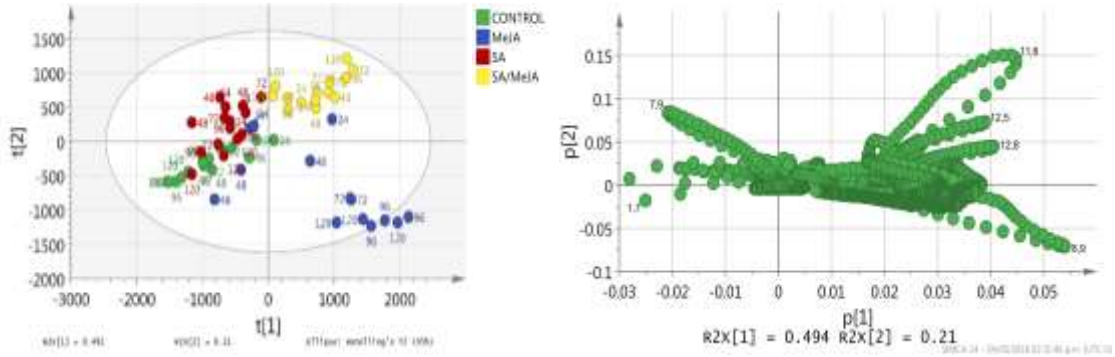


Figura 3-7: A) Gráfico de score y B) Loadings bidimensionales del PCA de los datos cromatográficos de extractos de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA. Los números de las puntuaciones en el gráfico de score representan el tiempo de cosecha de las células post-elicitación (24 a 120 h); la elipse representa el T2 Hotelling con un 95% de confianza.

El gráfico de loadings del PCA (Figura 3-8 B) se usó para determinar los componentes químicos responsables de la varianza de los datos. Se observó que compuestos como la dihidroquercetina (t_R =11,6 min) y componentes con t_R = 12,5 y 12,8 min influyen en la separación del grupo de muestras tratadas con la combinación AS/MeJA; mientras que compuestos como ácido clorogénico (t_R = 7,9) y el componente con t_R = 8,9 son importantes para la separación de los grupos de muestras tratadas sólo con AS y sólo con MeJA, respectivamente. Infortunadamente, los compuestos con t_R = 12,5 – 12,8 y 7,9 min no se han identificado aún, por lo que uno de los esfuerzos futuros será su caracterización química, dada la relevancia como posible marcador de discriminación asociada al tratamiento de las suspensiones de *T. peruviana* con AS y la combinación AS/MeJA.

La aplicación del análisis PLS-DA a los datos cromatográficos mejoró la separación de las muestras de acuerdo con el tratamiento (Figura 3-8). El gráfico de score (Figura 3-8 A) muestra que el segundo componente principal t [2] separa los grupos de muestras tratados con AS y AS/MeJA de aquellos tratados con MeJA y el control; mientras que el

primer componente principal separa los grupos tratados con las MeJA y AS/MeJA de aquellos tratados con AS y el control. Este gráfico también indica que la separación de las muestras en el grupo tratado con MeJA estuvo influenciada por el tiempo de cosecha post-elicitación, observándose diferencia significativa a las 72 h de exposición al MeJA. La Figura 3-9 presenta los resultados del análisis OPLS-DA. Este modelo redujo la dimensionalidad de las variables cromatográficas a tres componentes predictivos y cinco componentes ortogonales (3 + 5 + 0), evidenciándose reducción del efecto del tiempo de cosecha de las células post-elicitación lo que mejoró la separación de los grupos de muestras de acuerdo con el tratamiento. Lo mismo se observó con los datos FT-NIR.

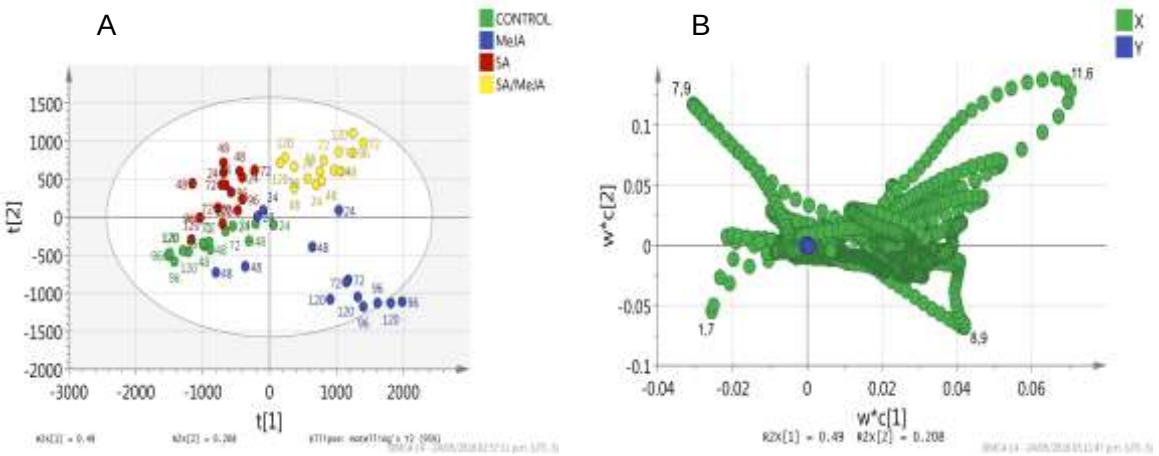


Figura 3-8: A) Gráficos de score y B) Loadings del PLS-DA del OPLS-DA de los datos cromatograficos de extractos de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA. Los números de las puntuaciones en el gráfico de score representan el tiempo de cosecha de las células post-elicitación (24 a 120 h); la elipse representa el T2 Hotelling con un 95% de confianza.

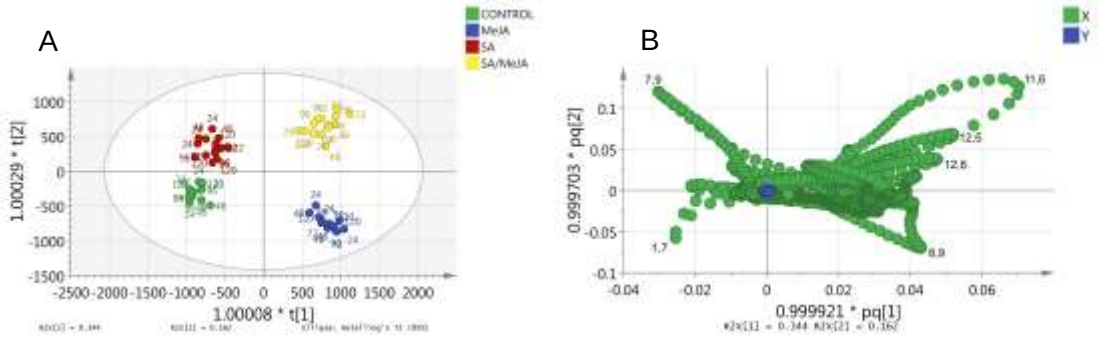


Figura 3-9: A) Gráficos de score y B) Loadings bidimensionales del OPLS-DA de los datos cromatograficos de extractos de la biomasa de *T. peruviana*, después del tratamiento con AS, MeJA y AS/MeJA. Los números de las puntuaciones en el gráfico de score representan el tiempo de cosecha de las células post-elicitación (24 a 120 h); La elipse representa el T2 Hotelling con un 95% de confianza.

A través de estos resultados se logra demostrar que AS y MeJA producen cambios diferentes en la composición de CF de las suspensiones celulares de *T. peruviana*, lo cual supone variaciones en el metabolismo fenólico. Estos cambios no podían verse únicamente con la cuantificación de los CF totales. Al utilizar técnicas más robustas como el FT-NIR y RP-HPLC se introduce un número mayor de variables al análisis del perfil de metabolitos, a partir de las cuales se puede extraer información biológica relevante, como, por ejemplo, el tiempo en que se produce la inducción de los CF. Se destaca la ventaja del uso del FT-NIR combinado con el AMV para el estudio del efecto de los elicitores en cultivos de células vegetales en suspensión; al tratarse de una técnica no destructiva, rápida y económica FT-NIR podría usarse en el monitoreo cualitativo y cuantitativo de los metabolitos de interés en este tipo de cultivos. Así mismo, se resalta que la aplicación del AMV a los datos HPLC aporta evidencia convincente de cambios en la huella digital de los CF inducidos por el AS y MeJA en los cultivos celulares de *T. peruviana*, lográndose la detección de componentes que se producen diferencialmente y dirigiendo las investigaciones futuras a la caracterización de estos compuestos.

3.5. Conclusiones

El tratamiento de los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA ocasionó diferencias en la composición de CF, las cuales fueron detectadas mediante el análisis FT-NIR y RP-HPLC. En especial, el uso de FT-NIR combinada con AMV demostró la contribución de los CF en la discriminación de las muestras, así como la relación entre los CF y el tipo de elicitor. La aplicación de FT-NIR combinada con AMV en la detección del efecto de la elicitación en este tipo de cultivos no ha sido reportado antes. Esta estrategia podría mejorar los actuales protocolos de análisis de CF en mezclas complejas, permitiendo realizar comparaciones exploratorias de los cambios en el metabolismo fenólico de una forma rápida y precisa, en un volumen alto de muestras, reduciendo además el consumo de reactivos. Adicionalmente, la aplicación tanto del FT-NIR como del RP-HPLC combinado con AMV evidenció el efecto del tiempo de exposición del elicitor en la discriminación de las suspensiones tratadas con MeJA, lo cual es un avance para la optimización de esta variable asociada al cultivo celular. No obstante, se hace necesario realizar estudios con técnicas analíticas más robustas como ^{1}H-RMN y CL-EM que permitan aclarar el efecto cualitativo y cuantitativo de los elicitores sobre precursores del metabolismo fenólico, a través de un estudio más completo de los perfiles metabólicos, lo cual permitiría estudiar las posibles interacciones entre el metabolismo primario y el metabolismo secundario en los cultivos celulares de *T. peruviana*.

Bibliografía

Arias M, Angarita M, Restrepo JM, Caicedo LA, Perea M. Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension culture of *Thevetia peruviana*. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2010; 46: 233–8. doi: 10.1007/s11627-009-9249-z.

Bartel J, Krumsiek J, Theisa FJ. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. Comput Struct Biotechnol J. 2013; 4: e201301009. doi: 10.5936/csbj.201301009.

Bi Y, Yuan K, Xiao W, Wu J, Shi C, Xia J, Chu G, Zhang G, Zhou G. A local pre-processing method for near-infrared spectra, combined with spectral segmentation and

standard normal variate transformation. Anal Chim Acta. 2016 Feb 25;909:30-40. doi: 10.1016/j.aca.2016.01.010.

Borille BT, Marcelo MCA, Ortiz RS, Mariotti KC, Ferrão MF, Limberger RP. Near infrared spectroscopy combined with chemometrics for growth stage classification of cannabis cultivated in a greenhouse from seized seeds. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2017 Feb 15;173:318-23. doi: 10.1016/j.saa.2016.09.040.

Chen P, Luthria D, Harrington Pde B, Harnly JM. Discrimination among *Panax* Species using Spectral Fingerprinting. J AOAC Int. 2011 Sep-Oct;94(5):1411-21.

Christou C, Agapiou A, Kokkinofta R. Use of FTIR spectroscopy and chemometrics for the classification of carobs origin. J Adv Res. 2017;10:1–8. doi: 10.1016/j.jare.2017.12.001.

Cozzolino D, Smyth HE, Gishen M. Feasibility study on the use of visible and near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. J Agric Food Chem. 2003 Dec 17;51(26):7703-8. doi: doi.org/10.1021/jf034959s.

Diabate S, Franqueville H, Adon B, Coulibaly OA, Ake S. The role of phenolic compounds in the determination of wilt disease tolerance of oil palm (*Elaeis guineensis* JACQ). Afr J Biotechnol. 2009; 8(21): 5679–90.

Frizon CNT, Oliveira GA, Perussello CA, Peralta-Zamora P-G, Camlofski AMO, Rossa UB, Hoffmann-Ribani R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. LWT - Food Science and Technology. 2015;60:795e801. doi: 10.1016/j.lwt.2014.10.030.

Granato D, Putnik P, Bursać Kovačević D, Sousa Santos J, Calado V, Silva Rocha R, Gomes Da Cruz A, Jarvis B, Ye Rodionova O, Pomerantsev A. Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology, and Effects of Processing. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2018 Mar; 17(3): 663–77. doi: 10.1111/1541-4337.12341.

Guo Y, Ding X, Ni Y. The combination of NIR spectroscopy and HPLC chromatography for differentiating lotus seed cultivars and quantitative prediction of four main constituents in lotus with the aid of chemometrics. Anal Methods. 2017; 9: 6420–9. doi: 10.1039/C7AY02021J.

Hashimoto A, Nakanishi K, Motonaga Y, Kameoka T. Sugar metabolic analysis of suspensions of plant cells using an FT-IR/ATR method. Biotechnol Prog. 2001 May-Jun;17(3):560-4. doi: 10.1021/bp010013w.

Hashimoto A, Yamanaka A, Kanou M, Nakanishi K, Kameoka T. Simple and rapid determination of metabolite content in plant cell culture medium using an FT-IR/ATR method. Bioprocess Biosyst Eng. 2005 Apr;27(2):115-23. doi: 10.1007/s00449-004-0388-7.

Hassan H, Fan M, Zhang T, Yang K. Prediction of Total Phenolics and Flavonoids Contents in Chinese Wild Rice (*Zizania latifolia*) Using FT-NIR Spectroscopy. Am J Food Tech. 2015;10:109–17. doi: 10.3923/ajft.2015.109.117.

Iwamoto R. Infrared and Near-Infrared Study of the Interaction of Amide C═O with Water in Ideally Inert Medium. J Phys Chem A. 2010;114:7398-407. doi: 10.1021/jp102479t.

Khan MIR, Khan NA. Salicylic Acid and Jasmonates: Approaches in Abiotic Stress Tolerance. J Plant Biochem Physiol. 2013;1:e113. doi:10.4172/2329-9029.1000e113.

Lapcharoensuk R, Nakawajana N. Identification of Syrup Type using Fourier transform-Near Infrared Spectroscopy with Multivariate Classification Methods. J Innov Opt Health Sci. 2018;11(2):1750019. doi: 10.1142/S1793545817500195.

Li J, Zhang J, Zhao YL, Huang HY, Wang YZ. Comprehensive Quality Assessment Based Specific Chemical Profiles for Geographic and Tissue Variation in *Gentiana rigescens* Using HPLC and FTIR Method Combined with Principal Component Analysis. Front Chem. 2017 Dec 22;5:125. doi: 10.3389/fchem.2017.00125.

Li W, Qu H. Rapid quantification of phenolic acids in *Radix Salvia Miltrorrhiza* extract solutions by FT-NIR spectroscopy in transflective mode. J Pharm Biomed Anal. 2010 Aug 1;52(4):425-31. doi: 10.1016/j.jpba.2010.01.009.

Liu Z, Wang D, Li D, Zhang S. Quality Evaluation of *Juniperus rigida* Sieb. et Zucc. Based on Phenolic Profiles, Bioactivity, and HPLC Fingerprint Combined with Chemometrics. Front Pharmacol. 2017 Apr 19;8:198. doi: 10.3389/fphar.2017.00198.

Lu B, Chen J, Huang W, Wu D, Xu W, Xie Q, Yu X, Li L, Determination of flavonoids and phenolic acids in the extract of bamboo leaves using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. Afr J Biotechnol. 2011;10(42):8448-55. doi: 10.5897/AJB11.320.

Mendoza D, Cuaspud O, Arias JP, Ruiz O, Arias M. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Biotechnol Rep (Amst). 2018 Jul 3;19:e00273.
doi: 10.1016/j.btre.2018.e00273.

Moreira I, Scarminio IS. Chemometric discrimination of genetically modified Coffea arabica cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. Talanta. 2013 Mar 30;107:416-22. doi: 10.1016/j.talanta.2013.01.053.

Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances. 2002; 20(2): 101–53. doi: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.

Rejeb IB, Pastor V, Mauch-Mani B. Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. Plants (Basel). 2014 Oct 15;3(4):458-75. doi: 10.3390/plants3040458.

Reymond P, Farmer EE. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. Curr Opin Plant Biol. 1998 Oct;1(5):404-11. doi: 10.1016/S1369-5266(98)80264-1.

Rinnan A, van den Berg F, Engelsen S. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. TrAC Trends Anal Chem. 2009;28(10): 1201-22. doi: 10.1016/j.trac.2009.07.007.

Schenk RV, Hildebrandt AC. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. Can J Bot. 1972; 50:199-204.

Siebert KJ. Chemometrics in Brewing — A Review. J Am Soc Brew Chem. 2001; 59(4): 147–56. doi: 10.1094/ASBCJ-59-0147.

Smith-Moritz AM, Chern M, Lao J, Sze-To WH, Heazlewood JL, Ronald PC, Vega-Sánchez ME. Combining multivariate analysis and monosaccharide composition modeling to identify plant cell wall variations by Fourier Transform Near Infrared spectroscopy. Plant Methods. 2011 Aug 18;7:26. doi: 10.1186/1746-4811-7-26.

Villegas-Quiceño AP, Arias-Echeverri JP, Aragón-Mena D, Ochoa-Cáceres S, Arias-Zabala ME. Multi-objective optimization in biotechnological processes: application to plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Revista Facultad de Ingeniería-Universidad de Antioquía. 2018; 87: 35–40.

Whitaker RJ, Hobbib GC, Leslie A, Steward LA. Chapter 26. Production of secondary metabolites in plant cell cultures. In: Biogeneration of Aromas. Parliament TH & Croteau R, editors. Washington, DC. 1986:347–62. doi: 10.1021/bk-1986-0317.ch026.

Worley B, Powers R. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. Curr Metabolomics. 2016; 4(2): 97–103. doi: 10.2174/2213235X04666160613122429.

Zareef M, Chen Q, Ouyang Q, Felix YH. Kutsanedzie FYH, Md. Mehedi Hassan M, Viswadevarayalua A, Wanga A. Prediction of amino acids, caffeine, theaflavins and water extract in black tea using FT-NIR spectroscopy coupled chemometrics algorithms. Anal Methods. 2018;10: 3023–31. doi: 10.1039/C8AY00731D.

4. Capítulo 4

Perfil metabólico basado en ^{1}H-RMN de cultivos de células en suspensión de *Thevetia peruviana* tratados con ácido salicílico y jasmonato de metilo

4.1. Resumen

Se realizó un perfil metabólico de cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* tratadas con ácido salicílico (AS), jasmonato de metilo (MeJA) y su combinación (AS/MeJA) mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica (^{1}H-RMN y J-Resuelto) y análisis multivariado (AMV) con el objetivo de establecer cambios en la composición y concentración de CF o sus precursores ocasionados por la elicitación. Se detectaron variaciones tanto cualitativas como cuantitativas en el conjunto de metabolitos a lo largo del tiempo de cultivo (24 a 144 h después del tratamiento) de las suspensiones celulares tratadas con los elicitores en comparación con el control. AMV mostró una clara separación entre el control y los tratamientos. MeJA causó una reprogramación metabólica de las células que afectó el metabolismo primario y la biosíntesis fenólica a las 72 h después de la adición del elicitor; tras la elicitación con MeJA, el contenido de glucosa, prolina y glutamina aumentó mientras que el contenido de sacarosa disminuyó. Estas respuestas metabólicas podrían ser importantes para obtener energía, esqueletos de carbono y equivalentes redox (NADPH) necesarios para la biosíntesis *de novo* de compuestos fenólicos. Los principales compuestos detectados en el tratamiento con MeJA fueron bencil-glucósidos, ácido clorogénico, ácido ferúlico y

fenilacético. La combinación de AS/MeJA mostró que AS revierte el efecto de MeJA sobre el metabolismo de *T. peruviana*, específicamente la biosíntesis fenólica. Estos resultados podrían permitir la identificación de puntos susceptibles en la ruta, para estimular la producción de compuestos fenólicos de interés farmacéutico en cultivos celulares en suspensión de *T. peruviana*.

Palabras clave: *Thevetia peruviana*, cultivo de células vegetales, perfil metabólico, Jasmonato de metilo, ácido salicílico.

4.2. Introducción

Previamente se describió el potencial de los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* para la producción de altos niveles de CF a escala del matraz agitado; también, como el tratamiento de los cultivos con dos moléculas de señalización, AS y MeJA produjeron incremento significativo de la acumulación de estos metabolitos. Así mismo, los resultados de los experimentos de elicitación con la combinación AS/MeJA sugieren que existe una interacción compleja en las vías de señalización de estas moléculas que afecta la biosíntesis de estos compuestos (resultados que fueron publicados en Mendoza., 2018).

El papel del JA y AS en la regulación de la red de la señalización de defensa de las plantas contra el ataque de patógenos o insectos herbívoros está bien establecido (Pietersen et al., 2012). Estas fitohormonas promueven la acumulación de metabolitos secundarios de defensa como fitoalexinas (Siciliano et al., 2015; Gundiach et al 1992; Klessig & Malamy, 1994) cuando son aplicados de forma exógena a cultivos en campo (Asghari & Hasanlooe, 2016) y plantas de invernadero (Kim et al., 2006; He et al., 2005), razón por la que son usados como elicitores para aumentar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de tejidos y células vegetales en suspensión (Repka et al., 2004). Aunque ambos elicitores activan la biosíntesis de CF, se ha informado que el tratamiento exógeno con la combinación AS más JA puede producir un efecto antagónico (Considine et al., 2009; Ncho et al., 2016), sin embargo, el antagonismo no siempre ocurre. Mur et al, 2006 demostraron a través de estudios transcriptómicos que las plantas

de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) exhiben un aumento sinérgico transitorio y temprano de la expresión de genes asociados con AS o JA cuando estos inductores se aplicaron a bajas concentraciones (< 100 µM) y una respuesta antagónica en tiempos de tratamiento más prolongados o en concentraciones más altas. Estos hallazgos aumentan el interés por aprender cómo AS, MeJA y su combinación afectan el metabolismo de células de *T. peruviana* cultivadas en suspensión.

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y los métodos basados en espectrometría de masas (EM), que incluyen CG – EM (cromatografía de gases – EM) y CL – EM (cromatografía de líquidos – EM), son las herramientas analíticas más utilizadas para estudiar el perfil metabolómico en plantas (Krishnam et al., 2005; Hong et al., 2016). 1D y 2D-RMN se han utilizado para identificar fenilpropanoides producidos en las hojas de *Brassica rapa* tratadas con MeJA (Liang et al., 2016a; Liang et al., 2016b). Además, se usó ^{1}H-RMN para estudiar el efecto de JA, (Pan et al., 2005; Sanchez-Sampedro, et al., 2007) y AS (Mustafa et al., 2009) en el perfil metabólico de cultivos de células vegetales en suspensión, demostrando que es una herramienta analítica útil para la discriminación entre diferentes grupos de tratamientos y para evaluar los cambios metabólicos causados por un tratamiento dado.

En el presente estudio se evaluaron los cambios metabólicos en el cultivo en suspensión de células vegetales de *T. peruviana* tratadas con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA utilizando ^{1}H-RMN y análisis de datos multivariados. La elicitación de los cultivos se llevó a cabo bajo las mejores condiciones establecidas en el capítulo 2. Se detectaron diferencias cualitativas y cuantitativas en el perfil metabólico de los cultivos tratados con los elicitores y cultivos sin tratar. Además, en los cultivos tratados con MeJA se observó una reprogramación metabólica que afectó la biosíntesis de CF.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Reactivos

Metanol deuterado-d_4 (CH_3OH-d_4), KH_2PO_4 no deuterado y la sal sódica del ácido trimetilsililpropiónico-d_4 (TSP) fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

Óxido de deuterio (D_2O), ácido salicílico, metil-jasmonato (> 95%), sacarosa (> 99.5%), D- (+) glucosa (> 99.5%) y los estándares de compuestos fenólicos y flavonoides (ácido clorogénico, ácido trans-ferúlico, ácido trans-sinápico, kaempferol, quercetina y hesperetina) se adquirieron en Sigma (St. Louis, EE. UU.). La selección de los estándares se hizo basados en la informaron de metabolitos de *T. peruviana* previamente publicada (Dr. Ducke's phytochemical and ethnobotabical database) y otros disponibles en el laboratorio.

4.3.2.Suspensión celular de cultivo de *T. peruviana*

Las suspensiones celulares se establecieron a partir de 10 gramos de callos friables fresco en 100 mL de medio líquido estéril SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) suplementado con 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 0,5 mg/L de kinetina; 30 g/L de sacarosa y 1 g/L de mio-inositol (pH 5,8) en matraces de 250 mL (Arias et al., 2010). Los cultivos en suspensión celular se mantuvieron en un agitador orbital a 110 rpm (New Brunswick ™ Innova® 2300), fotoperíodo natural y temperatura de 25 ± 2 °C. Se realizaron sub-cultivos cada 2 semanas. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando suspensiones celulares de 6 días en matraces de 250 mL con 100 mL de medio estéril líquido SH, en las mismas condiciones descritas anteriormente.

4.3.3.Tratamiento de los cultivos con los elicitores

Los cultivos se trataron con 300 µM de AS, 3 µM de MeJA y una combinación de 300 µM de AS más 3 µM de MeJA (AS/MeJA). Los elicitores se prepararon en una solución acuosa de etanol al 50% (v/v), luego se filtraron a través de filtros Millipore de 0,45 µm (Minisart®, Sartorius, Alemania). La concentración de cada elicitor se estableció en un estudio previo (Mendoza et al., 2018), a partir de la mayor acumulación de CF y flavonoides (Fv), comparados con los cultivos no elicitados.

Los elicitores se agregaron después del cuarto día de inicio del cultivo, durante la fase de crecimiento exponencial. Las suspensiones celulares se cosecharon a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h después de agregar el elicitor. El control de los experimentos fueron

suspensiones celulares a las cuales se les adicionó etanol acuoso. La concentración final de etanol en los tratamientos y el control fue de 0,5% (v/v). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

4.3.4. Extracción de metabolitos intracelulares

Las suspensiones celulares se filtraron usando un sistema de vacío y papel de filtro cuantitativo. La biomasa se enjuagó tres veces con agua destilada y se secó en un horno de convección a 60 °C durante 48 h. Los metabolitos intracelulares se extrajeron utilizando el protocolo establecido por Kim et al., 2010, con algunas modificaciones. En resumen, se transfirieron 25 mg de la biomasa seca pulverizada a un microtubo de 2 mL y se extrajo con 400 µL del disolvente CH_3OH-d_4 y 400 µL de tampón KH_2PO_4 en D_2O (pH 6,0) conteniendo 0,01% de TSP. La muestra se agitó por vórtex durante 2 min y luego se extrajo en un baño de ultrasonido (frecuencia 40 kHz) durante 15 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó en un equipo Thermo Scientific Heraeus ™ Biofuge ™ Primo R durante 15 min a 21.000 x g, y posteriormente se transfirieron 600 µL de sobrenadante a un tubo de RMN y se sometieron a los análisis de RMN.

4.3.5. Mediciones de RMN

El análisis de RMN se realizó en 72 muestras correspondientes a 18 muestras por cada tratamiento de elicitación y 18 muestras de control. Todos los espectros de RMN se obtuvieron a 300 K en un espectrómetro Avance III HD 700 funcionando a una frecuencia de ^{1}H de 699,95 MHz (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.). El equipo estaba equipado con una criosonda TCI con gradiente de eje z de 5 mm. El espectro 1D-^{1}H-RMN se registró utilizando la secuencia de pulsos estándar Bruker *noesypr1d*, en la cual la frecuencia de agua residual se irradió durante un retraso de relajación de 1,0 s y un tiempo de mezcla de 10 ms. Se recopilaron un total de 64 exploraciones en 64 k puntos de datos en un ancho espectral de 14 kHz con un retraso de relajación de 4 s, y un tiempo de adquisición de 2,3 s. Los decaimientos de inducción libre (FID) se multiplicaron por una función exponencial con un factor de ampliación de línea de 0,3 Hz antes de la transformación de Fourier. Los espectros de ^{1}H-RMN se corrigieron manualmente para la distorsión de la fase y la línea base, utilizando el software MestReNova (versión 10.0.2,

Mestrelab Research, Santiago de Compostela, España). Los cambios químicos de ^{1}H-RMN se referenciaron a la señal de TSP a 0,0 ppm.

Los espectros 2D del J-resuelto (JRES) se adquirieron con la secuencia estándar de pulsos Bruker *jresgpprqf*, en la que el pico del agua residual se irradió durante un retraso de relajación de 4 s. Se utilizaron un total de 32k puntos de datos en F2 con un retraso de relajación de 4 s, y 64 transitorios que utilizan 40 incrementos de τ; los anchos espectrales en F2 y F1 fueron 16,025 y 50 Hz, respectivamente. Los datos de JRES fueron rellenados con cero a 128 k puntos de datos en F2, y hasta 256 incrementos en F1. La apodización de los datos del JRES se realizó utilizando una función de campana sinusoidal sin cambios en ambas dimensiones antes del FT. Los datos se inclinaron, simetrizaron con respecto a la horizontal a través del centro de F1, y se proyectaron en el horizonte o la suma. Las proyecciones de JRES fueron referenciadas a la señal del TSP a 0.0 ppm, no se necesitó una línea de base corregida.

^{1}H-RMN y JRES se ejecutaron para los estándares siguiendo el método descrito anteriormente; también, se realizaron experimentos 2D-RMN usando el método “spiking” con muestras representativas para confirmar las asignaciones de los desplazamientos químicos, incluidos TOCSY (acrónimo en inglés para “Espectroscopia de Correlación total”), HSQC (acrónimo en inglés para “Espectroscopia de coherencia heteronuclear cuántica simple”) y HMBC (acrónimo en inglés para “Espectroscopía de coherencia heteronuclear de enlaces múltiples), utilizando programas de pulso estándares de Bruker.

4.3.6. Preprocesamiento de espectros RMN

Todos los espectros de RMN se redujeron automáticamente a archivos ASCII utilizando el software MestReNova y se normalizaron para el área de señal TSP en 0.0 ppm. Se excluyeron los rangos de desplazamiento químico de δ 4.75–4.95, que representan agua y δ 3.31–3.33 que representan el metanol residual. Los espectros de ^{1}H-RMN se redujeron a regiones integradas de igual anchura espectral de 0.04 ppm en la región de δ 0.5-10.0 con un total de 239 regiones espectrales (ventanas) por espectro. Las proyecciones de JRES se alinearon previamente para corregir los desplazamientos

químicos y luego se redujeron a regiones integradas de 0.002 ppm en la región de δ 0.1-10.0 con un total de 4885 ventanas.

4.3.7. Análisis multivariable (AMV) de los datos RMN

Los análisis de componentes principales (PCA), discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) se realizaron en el software SIMCA 14.1.0.2047 (MKS Umetrics, Suecia) utilizando el método de escalado de Pareto. La dimensión de las matrices de datos resultantes fueron 239 × 70 para ^{1}H-RMN y 476 x 70 para las proyecciones JRES (dos muestras de los 72 originales fueron eliminadas de análisis final porque se identificaron como muestras atípicas en la prueba T2 Hotelling). Para el AMV, las variables (matriz X) fueron las regiones de resonancia (ventanas) y las clases (control y tratamientos); mientras que las observaciones (matriz Y) fueron los nombres de las muestras. La calidad de cada modelo se determinó por los parámetros de bondad de ajuste (R2) y de bondad de predicción (Q2).

4.3.8. Identificación y cuantificación de metabolitos

Se utilizó el software Chenomx NMR Suite v. 8.3 para identificar y cuantificar los metabolitos presentes en las muestras según la ubicación de las resonancias individuales en los espectros de ^{1}H-RMN de 700 MHz. Cada espectro se procesó utilizando el módulo Procesador de Chenomx; se corrigieron la línea de ensanchamiento, fase y línea base. Luego, se calibró la concentración del estándar interno TSP (0,3 mM). Los metabolitos individuales en cada espectro se identificaron utilizando el módulo “Profiler”, que hace comparaciones con la biblioteca interna de Chenomx. Dado que el disolvente y el pH afectan el desplazamiento químico de los metabolitos, la identificación se apoyó en las publicaciones previas de desplazamientos químicos de metabolitos de plantas, disueltos en CH_3OH-d_4-KH_2PO_4 en D_2O, a pH 6,0 (Liang et al., 2006a; Sanchez-Sampedro et al., 2007; Mustafa et al., 2009).

4.3.9. Análisis de datos

Los datos cuantitativos de los metabolitos identificados se analizaron con el software estadístico libre RStudio versión 1.1.383. Las diferencias entre los tratamientos se evaluaron con un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un nivel de significancia de 0,05. Se realizaron comparaciones múltiples (por pares) usando el método de la diferencia significativa honesta de Tukey (DSH), con un nivel de significancia $p < 0,05$. Los análisis PCA, clúster jerárquico (HCA), PLS-DA y OPLS-DA se realizaron según lo implementado en el software SIMCA 14.1.0.2047 (MKS Umetrics, Suecia). Los datos se escalaron automáticamente, aunque los diferentes métodos de escalado no mostraron ninguna mejora. Se utilizó el software GenEx 7.0.0.243 (MultiD Analyzes AB, Suecia) para realizar el análisis de calor agrupado. Después de la optimización, se utilizó el algoritmo de Ward como método de agrupamiento y la distancia de Manhattan como medida de espaciado para el mapa de calor.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Análisis de espectros ^{1}H-RMN

Los extractos intracelulares de las suspensiones celulares de *T. peruviana* se analizaron por ^{1}H-RMN. La figura 4-1 presenta los espectros de RMN completos (0-10 ppm) de las suspensiones control y las tratadas con los elicitores, correspondientes a los tiempos de cosecha de 24 y 144 h post-elicitación.

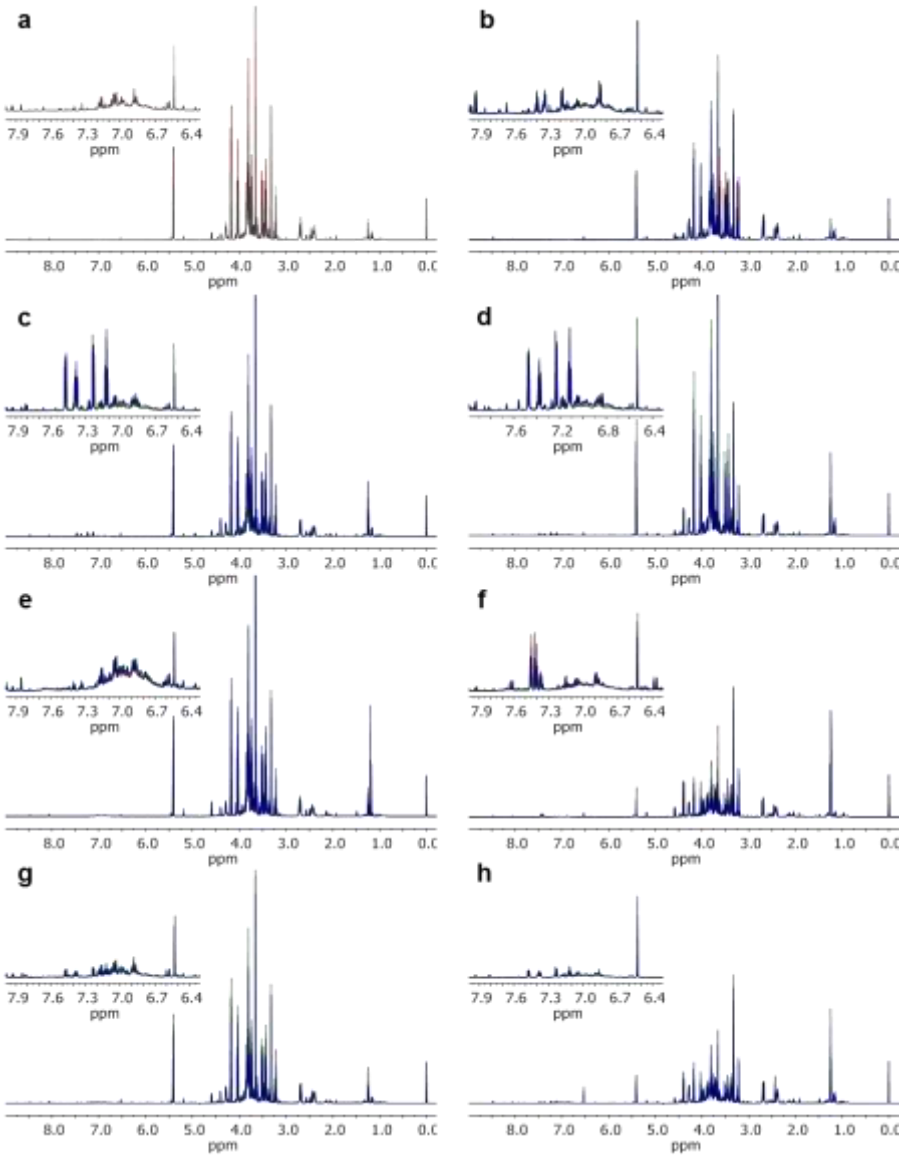


Figura 4-1: Superposición de espectros ^{1}H-NMR apilados [700 MHz, 298 K, 50% de MeOH-d4 / D2O (KH_2PO_4, pH 6,0)] de extractos intracelulares de cultivo de suspensión celular de *T. peruviana* recolectados a 24 (a, c, e, g) y 144 h (b, d, f, h) post-elicitación. Los espectros de los controles (a, b) y los tratamientos con AS (c, d), MeJA (e, f) y AS/MeJA (g, h) se muestran por triplicado. Se usó TSP (a pH 6) como estándar interno. La región aromática expandida (rangos de 6,0 – 8,0) se muestra en la parte superior de cada espectro.

La comparación visual de los espectros mostró cambios cualitativos que dependen del tratamiento y el tiempo de cosecha. En el grupo de los controles hubo un ligero aumento en la acumulación de compuestos aromáticos (rangos de δH 6,0 – 8,0 ppm) a lo largo del

tiempo de cultivo (Figuras 4-1a, b). Por otro lado, cuando las suspensiones celulares se trataron con AS (Figuras 4-1c, d), se evidenciaron cambios notables en la región aromática 24 h después de la elicitación, estos cambios fueron relativamente constantes hasta el final del experimento (144 h post-elicitación). El tratamiento con MeJA también produjo cambios en la región aromática, especialmente entre δH 7.0 - 7.5 ppm, estos cambios son visibles en el espectro a las 144 h (Figuras 4-1e, f); en este tratamiento también se observó una reducción en la intensidad de algunas señales en la región de los carbohidratos (δ 4,0 – 5,5). En contraste, la combinación de AS/MeJA disminuyó la intensidad de las señales en la región aromática en comparación con las muestras tratadas solo con AS o MeJA (Figuras 4-1g, h). Estos resultados concuerdan con estudios previos, los cuales informaron que la adición exógena de AS o MeJA a cultivos de células vegetales en suspensión afecta el metabolismo celular y cambia el perfil de los compuestos aromáticos, especialmente los fenilpropanoides y lignanos (Liang et al., 2016a: Sanchez-Sampedro et al., 2007).

La identificación de varios compuestos en las muestras fue posible mediante comparación de los desplazamientos químicos experimentales de señales específicas con aquellas reportados en condiciones similares (CH_3OH-d_4-K_2HPO_4 en D_2O, 1: 1 v/v, pH 6,0) en la bibliografía. Algunos de estos metabolitos fueron confirmados comparando los espectros de RMN de las muestras con los espectros de compuestos de referencia. Este fue el caso de la glucosa y la sacarosa, identificadas en todas las muestras; salicilato, identificado en los tratamientos con AS y AS/MeJA; y, los ácidos clorogénico y ferúlico, identificados en los tratamientos con MeJA. Adicionalmente, los experimentos bidimensionales de RMN (TOCSY, HSQC y HMBC) permitieron la identificación parcial de otros compuestos (Tabla 1-4). Curiosamente, algunos fenilpropanoides descritos previamente en plantas de *T. peruviana*, como el ácido sinápico, kaempferol, quercetina y hesperetina no se detectaron en ninguna de las muestras; igualmente, la dihidroquercetina que había sido reportada como uno de los componentes principales en los capítulos anteriores, no se detectó en estas muestras, una posible causa para esto pudo ser la alta densidad de señales en la zona aromática donde aparecen los desplazamientos químicos para estos compuestos. Adicionalmente, algunos de estos

compuestos, con excepción de la dihidroquercetina, pueden estar en concentraciones muy bajas para ser detectados.

Todas las muestras tratadas con elicitores mostraron una señal de δH 1.23 ppm cuya intensidad fue drásticamente superior a la del control. Los datos espectrales identificaron esta señal como el grupo metilo del 1-O-etil-β-glucopiranosido, ^{1}H-RMN (700 MHz, CD_3OD-KH_2PO_4 en D_2O a pH 6,0) δ 1.23 (CH-3, t, *J* = 7.1 Hz), 3.69 (CH-2´, m), δ 3.97 (CH2´, m); δ 4.40 (H-1α, d, *J* = 8.0), δ 4.84 (H-1β, d, *J* = 7.5); ^{13}C RMN (175 MHz, CD_3OD-KH_2PO_4 en D_2O a pH 6,0) δ ~ 17.25 (CH-3), δ ~ 68.9 (CH-2´), δ ~ 105.92 (C1). Este resultado está de acuerdo con lo informado por Kraemer y colaboradores, 1999 (Kraemer et al., 1999), quienes detectaron 1-O-etil-β-glucopiranosido en cultivos de células de plantas de *Ilex paraguariensis* tratados con MeJA y AS; los autores atribuyeron la producción de este compuesto al etanol utilizado como solvente de los elicitores. De manera similar, las suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas solo con etanol presentaron la señal del 1-O-etil-β-glucopiranosido, pero con menor intensidad. La producción de este compuesto fue mayor en las suspensiones tratadas con los elicitores, siendo el tratamiento con MeJA el que mostró la mayor intensidad de la señal a las 144 h pos-elicitación. Se ha planteado que la reacción de glucosilación del etanol es un mecanismo de detoxificación natural que protege a las células vegetales de la toxicidad del alcohol (Kvesitadzeet al., 2006); en células de suspensión de *T. peruviana*, este mecanismo evidentemente se intensificó por el tratamiento con AS y/o MeJA. Es posible que estos elicitores aumenten en la síntesis *de novo* de enzimas detoxificantes de etanol, sin embargo, esto debe comprobarse.

Tabla 4-1: Desplazamientos químicos (δ en ppm) de los metabolitos detectados en los espectros de ^{1}H-RMN (CH_3OH-d4-K_2HPO_4 en D_2O, 1:1(v/v), pH 6,0) de cultivos celulares de *T. peruviana.*

Metabolitos	Desplazamientos químicos (δ en ppm), multiplicidad y acoplamientos J (Hz)
Ácidos grasos	δ 0.87(H-ω, t); δ 1.29 (CH-2 d, brs)
2-Oxocaproato	δ 0.87(H-ω, t); δ 1.31 (CH-2, m); δ 1.55 (CH-2, m)
Leucina	δ 0.96(H-5, d, J=6.1); δ 0.97 (H-5´, d, J=6.4)
Isoleucina	δ 1.01 (H-4´, d, J=7.1)
Valina	δ 0.99 (H-4, d, J=7.0); δ 1.05 (H-4´, d, J=7.1)
O-Etil-β-glucopiranosido	δ 1.23 (CH-3, t, J = 7.1 Hz), δ 3.69 (CH-2´, m), δ 3.97 (CH2´, m); δ 4.40 (H-1□,□d, J = 8.0), δ 4.84 (H-1β, d, J = 7.5)
Treonina	δ 1.32(H-4, d, J=6.7)
Alanina	δ 1.47 (H-3, d, J=7.2)
Prolina	δ 1.99 (H-4, m); δ 2.02 (H-3, m)
Acetato	δ 1.91 (H-2, s)
Glutamato	δ 2.03 (H-3a, m); δ 2.12 (H-3b, m)
Glutamina	δ 2.15 (H-3, m); δ 2.46 (H-4, m)
Succinato	δ 2.44 (s)
Malato	δ 2.68 (H-3b, dd, J=15.4, 3.2); δ 4.27 (H-2, dd, J=9.5, 3.3)
2-Oxoglutarato	δ 2.98 (H-3, t, J=7.3)
Colina	δ 3.20 (CH_3, s)
Sacarosa[a]	δ 3.42 (H-4, t, J=9.5); δ 3.50 (H-2, dd, J=9.9, 3.9); δ 3.64 (H-1´, s); δ 3.73 (H-3, t, J=9.5); δ 4.01 (H-4´, t, J=8.4); δ 4.16 (H-3´, d, J=8.6); δ 5.39 (H-1, d, J=3.9)
β-Glucosa[a]	δ 4.57 (H-1, d, J=4.6)
Bencil-β-D-glucósido[b]	δ 4.73 (H-1x, m); δ 7.38-7.35 (H-5, m); δ 7.41 (H-4, t, J=7.6); δ 7.45 (H-3, d, J=7.4)
Salicílico-α-D-glucósido[b]	δ 4.93 (H-1´α, d, J=7.6); δ 7.12 (H-4, td, J=7.5, 0.9); δ 7.23 (H-6, dd, J=8.3, 0.9); δ 7.38 (H-5, ddd, J=8.3, 7.5, 1.6); δ 7.47 (H-3, dd, J=7.5, 1.6)
Bencil-α-D-glucósido[b]	δ 4.93 (H-1x, m); δ 7.36 (H-5, m); δ 7.41 (H-4, t, J=7.6); δ 7.45 (H-4, d, J=7.4)
α-Glucosa[a]	δ 5.17 (H-1, d, J=3.7)
NADH/NADHP	δ 6.10 (d, J=6.0); δ 8.23 (s)
Ferulato	δ 7.56 (H-7 , d, J = 15.9 Hz), δ 7.19 (H-2 , d, J = 2.1 Hz), δ 7.10 (H-6 , dd, J = 8.4 Hz, 2.1 Hz), δ 6.88 (H-5 , d, J = 8.4 Hz), δ 6.34 (H-8 , d, J = 15.9 Hz)
Clorogenato[a]	δ 6.37 (H-8´, d, J=15.3); δ 6.89 (H-5´, d, J=8.2); δ 7.07 (H-6´, dd, J=8.3, 2.0); δ 7.22 (H-2´, d, J=2.11); δ 7.62 (H-10´, d, J=15.9)
Fumarato	δ 6.52 (s)
Salicilato[a]	δ 6.94 (H-5, m); δ 7.49 (H-4, td, J=7.8, J_2=1.8); δ 7.84 (H6, dd, J=7.8, 1.7)
4-Hidroxifenilacetato	δ 7.15 (H-6, H-7, d, J=8.6)
Fenilacetato	δ 7.32 (H-4, H-5, d, J=7.3)
Nicotinato	δ 7.50 (m); δ 8.27 (H-5, m); δ 8.57 (H-8, dd, J=4.6, 1.6); δ 8.96 (H-6, s)
Adenina	δ 8.17 (H-8, s); δ 8.18 (H-2, s)
NAD^+/$NADP^+$	δ 8.21 (m); δ 9.11 (d, J=9.0); δ 9.34 (s)
Formiato	δ 8.45 (s)

[a] Desplazamientos químicos se confirmaron con los espectros de los estándares y usando el método de “spking”.

[b] Los desplazamientos químicos se basan en espectros 2D-RMN

El análisis de la región aromática de los espectros de las suspensiones celulares tratados con AS y la combinación AS/MeJA mostró señales características para un derivado glucosilado de ácido salicílico, que se identificó parcialmente como un α-D-glucósido salicílico: ^{1}H-RMN (700 MHz, CD_3OD)-KH_2PO_4 en D_2O a pH 6,0) δ 7.47 (H-3, dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz), δ 7.38 (H-5, ddd, *J* = 8.3, 7.5, 1.6 Hz), δ 7.23 (H-6 , dd, *J* = 8.3, 0.9 Hz), δ 7.12 (H-4, td, *J* = 7.5, 0.9 Hz), δ 4.93 (H-1´α, d, *J* = 7.6 Hz); ^{13}C RMN (175 MHz, CD_3OD-KH_2PO_4 en D_2O a pH 6,0) δ ~ 175.2 (C = O), ~ 154.0 (C-1), δ ~ 133.38 (C-5), ~ 131.62 (C-3) , δ ~ 130.1 (C-2), ~ 125.94 (C-4), ~ 119.76 (C-6), ~ 102.5 (C-1´). Otro compuesto parcialmente identificado en cultivos celulares tratados con MeJA fue un bencil-glucósido: ^{1}H-NMR (700 MHz, CD_3OD-KH_2PO_4 en D_2O a pH 6,0) δ 7.45 (H-3, d, *J* = 7.3 Hz), 7.41 (H-4, t, *J* = 7.6 Hz), δ 7.38 - 7.35 (H-5, m) δ 4.93 (H-1α, m), 4.73 (H-1β, m); ^{13}C RMN (175 MHz, CD^3OD-KH^2PO^4 en D^2O a pH 6,0) δ ~ 135.7 (C-2), ~ 126.87 (C-4), δ ~ 126.85 (C-3), ~ 126.70 (C-5) , δ ~ 100.2 (C-1´), ~ 69.5 (C-1). Ninguno de estos compuestos se detectó en las muestras control, lo que demuestra que su presencia en cultivos celulares fue inducida por el AS.

Chong et al., 2001 informaron previamente el aumento de la síntesis *de novo* de AS y la acumulación de glucósidos del ácido salicílico en cultivos de *N. tabacum* infectados con el virus del mosaico del tabaco. Los salicilatos glucósilados también se produjeron en cultivos en suspensión celular de tabaco tratado con β-megaspermina (un inductor de *Phytophthora megasperma*), y en un cultivo celular de *Catharanthus roseus* tratado con 200 y 500 µM de AS (Muljono et al., 2003). De manera similar, nuestros resultados mostraron una rápida acumulación intracelular de salicílico-α-D-glucósido en las suspensiones de *T. peruviana* a las 24 h después de la adición de AS. Como en otros CF, la glucosilación parece ser necesaria para el almacenamiento de AS en una forma no tóxica en plantas (Le Roy et al., 2016). Los experimentos en tabaco, soja y arabidopsis muestran que los salicilatos glucósilados se producen en el citosol mediante una glucosiltransferasa y luego se transportan a las vacuolas para su almacenamiento (Dempsey et al., 2011).

Por su parte, los bencil-glucósidos son formas conjugadas de los ácidos benzoicos. Estos compuestos son un grupo importante de CF que se sintetizan a partir del ácido cinámico. Los ácidos benzoicos son elementos estructurales para numerosos metabolitos primarios y especializados, incluidas fitohormonas, cofactores y compuestos de defensa (Widhalm

& Dudareva, 2015). Otros dos CF identificados en las suspensiones celulares de *T. peruviana* fueron el ácido clorogénico (ácido 3-O-cafeoil quinico) y el ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico); ambos son derivados del ácido cinámico y se han investigado exhaustivamente por su papel en la defensa contra las infecciones por hongos fitopatógenos (Martínez et al., 2017; Bhattacharya et al., 2010). En especial, el ácido clorogénico sirve como fitoalexina en muchas especies de plantas (Jeandet et al., 2013). La presencia casi exclusiva de estos compuestos, así como de los bencil-glucósidos, en suspensiones celulares tratadas con MeJA, demuestra que MeJA activa la ruta fenilpropanoide a la altura del ácido cinámico en las células de *T. peruviana*. Estos resultados coinciden con los reportados previamente en cultivos de suspensión celular de *Silybum marianum* y *Agastache rugosa* Kuntze elicitados con MeJA (Sanchez-Sampedro et al., 2007; Kim et al., 2013). Además, está bien demostrado que MeJA aumenta la actividad de la enzima L-fenilalanina amonio-liasa (PAL, EC 4.3.1.5) en algunos cultivos en suspensión celular (Suzuki et al., 2005), PAL cataliza el primer paso en biosíntesis de ácidos cinámicos.

La superposición de señales es uno de los principales problemas para las asignaciones de resonancias cuando se analizar mezclas complejas por RMN, esto debido a que se limita el número de metabolitos que se pueden identificar y cuantificar. Para mitigar este problema, se realizó un análisis 2D-RMN del JRES (Figura 4-2). En particular, el contenido de información recuperable en las proyecciones de JRES (Figura 4-2b) fue diferente del obtenido en ^{1}H-RMN (Figura 4-2a), debido a la reducción de la multiplicidad de picos y la edición de los tiempos de relajación. No obstante, en los espectros JRES se observó pérdida de algunas señales correspondientes a metabolitos con tiempo de relajación T2 corto; por ejemplo, resonancias de malato [δ 2.39 (H-3, dd, *J* = 15.5, 9.3 Hz, brs), δ 2.68 (H-3´, dd, *J* = 15.5, 3.3, brs), δ 4.27 (H- 2, dd, *J* = 9.3, 3.3, brs] que estuvieron presentes en ^{1}H-NMR, se perdieron en las proyecciones JRES (Figura 4-2a).

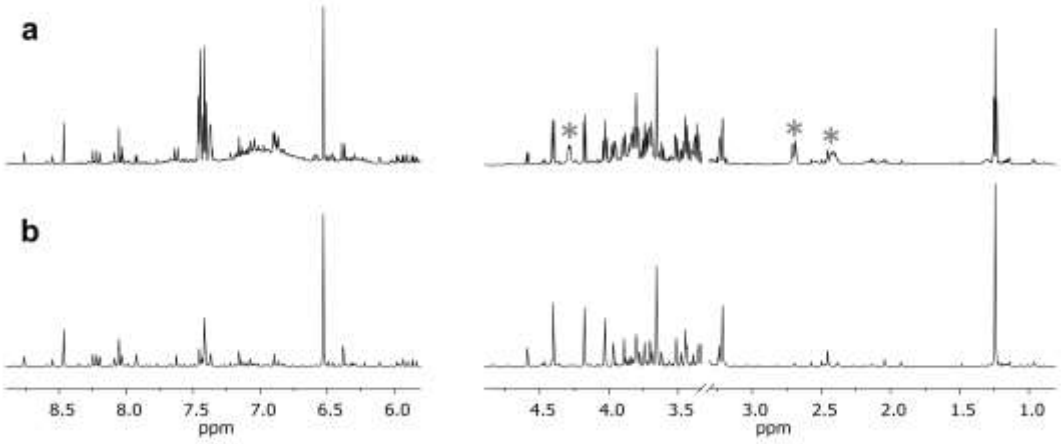


Figura 4-2: ^{1}H-RMN (a) y proyección JRES (b) correspondientes a la misma muestra de extracto intracelular de suspensiones celulares de *T. peruviana*. Se muestran las regiones de carbohidratos, ácidos orgánicos (δ 0.5 - 5.0) y aromáticos (δ 6.0 - 9.0 ppm). Los asteriscos marcan señales del malato que están presentes en el espectro de ^{1}H-RMN pero ausentes en el JRES.

4.4.2. AMV de los datos espectrales de RMN

Después del procesamiento de los espectros de ^{1}H-RMN, los datos se importaron al software SIMCA 14.0. Como prueba preliminar, se realizó un PCA para evaluar la diferenciación macroscópica entre muestras y establecer posibles agregaciones o tendencias (Figura 4-3). Se realizó un PCA a las tres réplicas biológicas independientes de cada tiempo de cultivo de las suspensiones control y las tratadas con los elicitores. El modelo de PCA (R2X (cum) = 0,903 y Q2X (cum) = 0,773) redujo la dimensionalidad de los datos a 6 componentes principales (PC). El gráfico bidimensional de score para el modelo PCA mostró clara separación entre la mayoría de las puntuaciones del control y los correspondientes tratamientos con elicitores (Figura 4-3a); la primera PC (PC1) separó las muestras con respecto al tiempo de cultivo, y la segunda PC (PC2) separó las muestras según el tratamiento. Estas tendencias se observaron más claramente a lo largo del tiempo cuando el modelo de PCA se aplicó solo a dos grupos (control vs tratamiento).

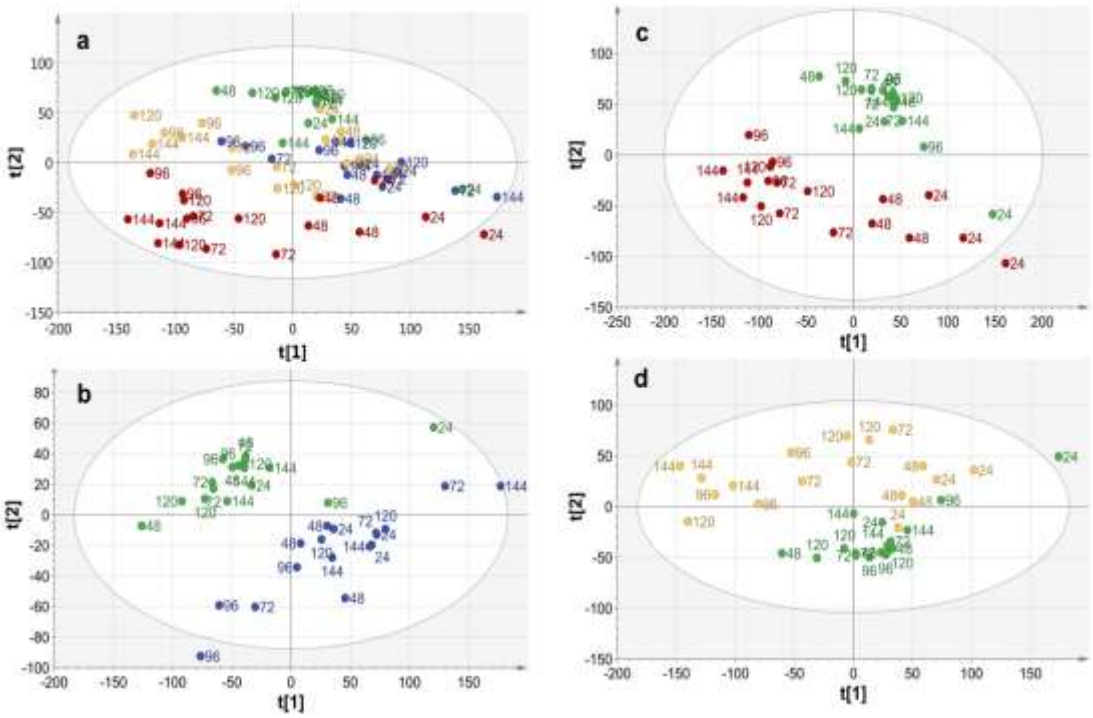


Figura 4-3: Gráfico de scores del PCA de los datos espectrales ^{1}H-RMN de extractos intracelulares de las suspensiones celulares de *T. peruviana* recolectados en diferentes momentos (24, 48, 72, 96, 120 y 144 h) después del tratamiento con AS (azul), MeJA (rojo), AS/ MeJA (amarillo) y controles (verde). Gráfico control vs todos los tratamientos (a); AS (b), MeJA (c) y AS/MeJA (d). La elipse representa los T2 Hotelling con un 95% de confianza.

Los gráficos de score para las muestras tratadas con AS (Figura 4-3b), MeJA (Figura 4-3c) y AS/MeJA (Figura 4-3d) mostraron clara separación entre los controles y los tratamientos. Es muy notable que la mayoría de las muestras tratadas con MeJA y AS/MeJA se separaron de acuerdo al tiempo de cultivo post-elicitación; los conglomerados correspondientes a los tiempos de 72 a 144 h se distribuyeron en un cuadrante diferente de aquellos cultivados de 24 a 48 h, lo que sugiere un cambio significativo en perfil de metabolitos; en contraste, la separación según el tiempo de cultivo, de las suspensiones control y las tratadas con AS, no fue evidente.

Las tendencias del PCA mejoraron con el método supervisado de OPLS-DA, el cual aisla la variabilidad biológica de las muestras en algunas direcciones ortogonales y elimina los

componentes espectrales no relacionados con las clases de muestras. El modelo OPLS-DA (R2X (cum) = 0,921, R2Y (cum) = 0,902 y Q2X (cum) = 0,838) redujo la dimensionalidad de los datos a 3 componentes predictivos y 5 componentes ortogonales (3 + 5 + 0). El gráfico bidimensional de score del OPLS-DA (Figura 4-4) mostró mejor separación entre el control y los tratamientos, y entre los tratamientos, comparado con PCA. PC1 separó las muestras tratadas con MeJA y AS/MeJA de las tratadas con AS y control; mientras que PC2 separó las muestras tratadas con MeJA y SA de las tratadas con AS/MeJA y control. PC2 también separó muestras tratadas con MeJA según el tiempo de cultivo; este resultado fue equivalente al PCA.

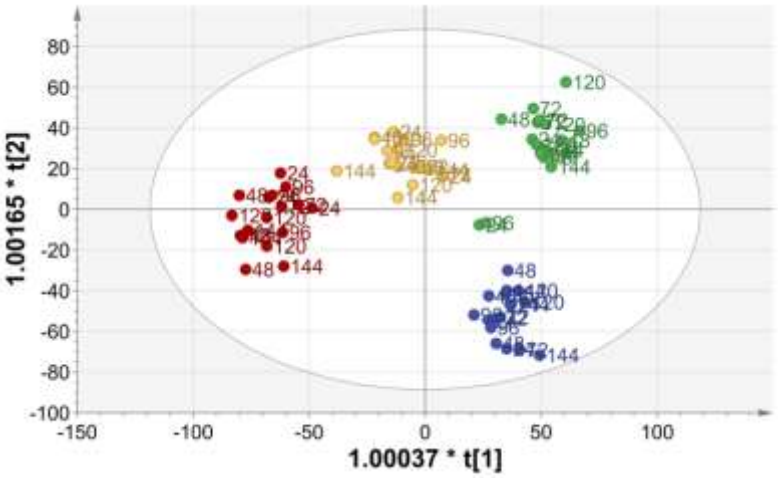


Figura 4-4: Gráfico de score del OPLS-DA de los datos espectrales de ^{1}H-RMN de extractos intracelulares de las suspensiones celulares de *T. peruviana* recolectados en diferentes momentos (24, 48, 72, 96, 120 y 144 h) después del tratamiento con AS (azul), MeJA (rojo), AS/MeJA (amarillo) y controles (verde). La elipse representa los T2 Hotelling con un 95% de confianza.

Los AMV también se realizaron con el conjunto de datos espectrales de las proyecciones del JRES. Los resultados con este conjunto de datos (δ 0.1–10.0) fueron similares a los obtenidos a partir de los datos de espectros de ^{1}H-RMN. El modelo PCA (R2X (cum) = 0,896 y Q2X (cum) = 0,735) redujo la dimensionalidad de los datos a 11 PC, mientras que el modelo OPLS-DA (R2X (cum) = 0,82; R2Y (cum) = 0,883 y Q2X (cum) = 0,797) resultó en 3 componentes predictivos y 5 componentes ortogonales (3 + 5 + 0). Los resultados de ambas proyecciones, ^{1}H-RMN y JRES, mostraron que las suspensiones celulares tratadas con AS/MeJA cayeron cerca del centro del gráfico de score y

estuvieron flanqueadas por las suspensiones tratadas solo con AS y solo con MeJA. Aunque el conjunto de datos de las proyecciones del JRES se ha utilizado anteriormente en estudios metabolómicos de cultivos de suspensión de células vegetales (Liang et al., 2006a), los resultados obtenidos no mostraron una mejora significativa en el análisis multivariado en comparación con el conjunto de datos de ^{1}H-RMN.

4.4.3. Cuantificación de metabolitos

El paquete Chenomx NMR Suite v. 4.6 se usó para la cuantificación de los metabolitos identificados en las suspensiones de *T. peruviana*. Las figuras 4-5 y 4-6 presentan las cantidades relativa al TSP (0,3 mM) de los metabolitos primarios y secundarios cuya concentración fue significativamente diferente entre los tratamientos. En particular, el tratamiento de las suspensiones de *T. peruviana* con MeJA produjo un aumento significativo en los niveles de ácidos grasos en comparación con el control a las 72 h post-elicitación. Estos resultados confirman el efecto elicitor del MeJA sobre el metabolismo lipídico informado previamente en el cultivo de callos de *T. peruviana* (Rincón-Pérez et al., 2016) y en los cultivos de suspensión celular de *C. roseus* (Goldhaber-Pasillas et al., 2014); también demostraron que el tratamiento exógeno con JA cambia el perfil de los ácidos grasos hacia la biosíntesis de precursores de oxilipinas involucrada en la señalización de la respuesta al estrés. Las oxilipinas a menudo son los mismos precursores de JA; por ejemplo, el ácido α-linolénico (Eckardt et al., 2008; Dave & Graham, 2012).

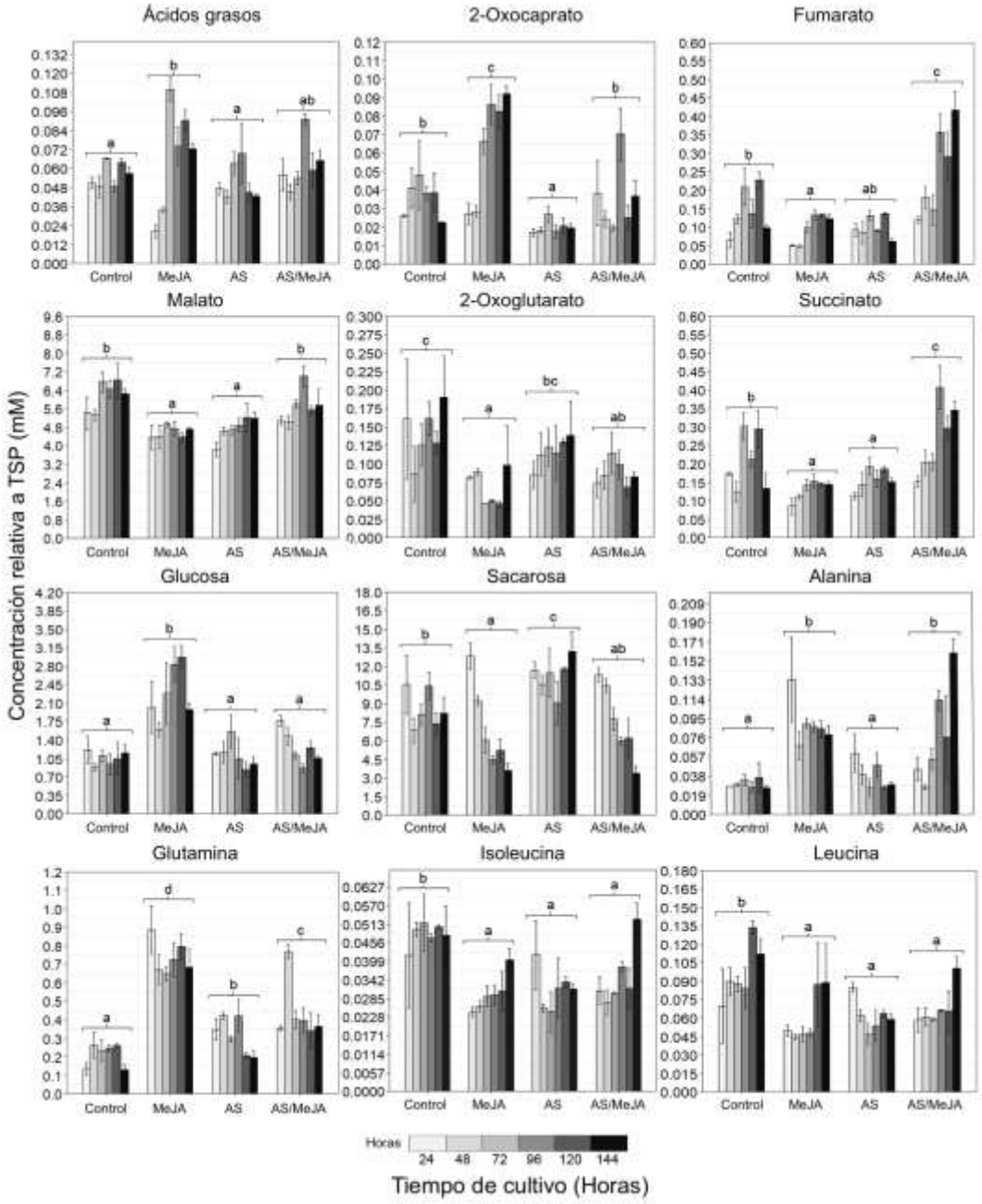


Figura 4-5: Cantidad relativa de metabolitos identificados en las suspensiones celulares de *T. peruviana*. Controles y tratamientos con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA. Los datos se proporcionan como medias ± DE, que se calcularon utilizando tres réplicas biológicas. Los tratamientos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

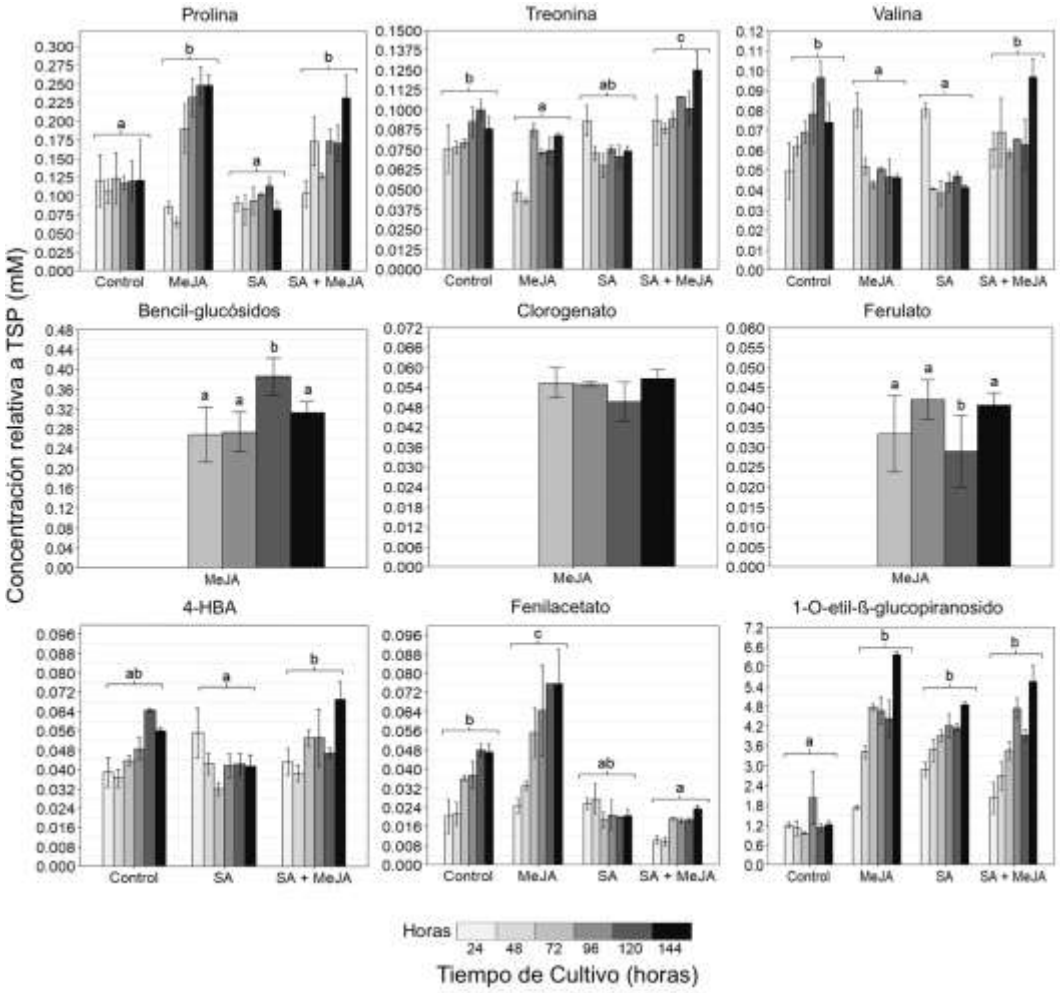


Figura 4-6: Cantidad relativa de metabolitos identificados en las suspensiones celulares de *T. peruviana*. Controles y tratamientos con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA. Los datos se proporcionan como medias ± DE, que se calcularon utilizando tres réplicas biológicas. Los tratamientos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

La elicitación con MeJA también causó cambios en la producción de aminoácidos, por ejemplo: alanina, glutamina y prolina aumentaron, mientras que la leucina, isoleucina y valina disminuyeron con respecto al control. Así mismo, los niveles de intermediarios del ciclo de Krebs como fumarato, malato, 2-oxoglutarato y succinato se redujeron poco después de la adición de MeJA. Este tratamiento también produjo cambios en el metabolismo de los carbohidratos, la glucosa aumentó gradualmente mientras que la sacarosa disminuyó durante el experimento. Curiosamente, la mayoría de los

compuestos fenólicos detectados en este estudio (fenilacetato, clorogenato, ferulato y bencil-glucósidos) se encontraron en un nivel superior a las 72 h después del tratamiento con MeJA y se mantuvieron en niveles altos a lo largo de las 144 h de cultivo. Sánchez-Sampedro et al., 2007 presentaron respuestas metabólicas similares en cultivos de células en suspensión de *Silybum marianum* elicitados con MeJA y extractos de levadura; estos autores demostraron que los elicitores aumentan los niveles de glucosa y aminoácidos y, disminuyen la sacarosa, siendo estos cambios dependientes de la síntesis *de novo* de proteínas.

A diferencia del MeJA, el tratamiento con AS no afectó el contenido de ácidos grasos, alanina o prolina respecto al control, el contenido de estos metabolitos fue incluso más bajo que el de los tratamientos con MeJA. Otros cambios metabólicos importantes en las muestras tratadas con AS fueron la disminución del contenido de leucina, isoleucina y valina y el aumento en la sacarosa con respecto al control. La glucosa no se vio afectada por el tratamiento con AS. Sorprendentemente, la síntesis *de novo* de compuestos fenólicos en muestras tratadas con AS fue menor que en el tratamiento con MeJA y no se encontraron diferencias significativas en comparación con el control, por lo que se considera a MeJA como un mejor indicador para la biosíntesis *de novo* de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana*. Por otro lado, el tratamiento con la combinación de AS/MeJA no mejoró la producción de compuestos fenólicos en comparación con MeJA sólo, incluso el tratamiento con AS/MeJA revirtió el efecto MeJA sobre la producción de compuestos fenólicos y algunos metabolitos primarios como fumarato, succinato, glucosa y algunos aminoácidos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que AS anula el efecto de MeJA en la síntesis *de novo* de estos compuestos.

Otro compuesto identificado en todas las muestras fue 1-O-etil-glucopiranosido; la cuantificación confirmó que AS y MeJA amplificaron aproximadamente 3 veces su producción comparada con las suspensiones celulares tratadas solo con etanol, lo que demuestra el efecto protector de estos elicitores contra la toxicidad del etanol.

4.4.4. Efecto de los elicitores en el perfil metabólico – Análisis cuantitativo

Después del análisis cuantitativo de los espectros de RMN, se realizó una PCA adicional con los datos de concentración (promedio de las tres replicas). El propósito fue identificar variaciones en el perfil de los metabolitos. Los datos fueron modelados satisfactoriamente por 3 componentes (R2X (cum) = 0,705 y Q2X (cum) = 0,467). De acuerdo con el gráfico bidimensional de score (Figura 4-7a), existen diferencias notables en el perfil de metabolitos entre los diferentes tratamientos de elicitación, ya que las muestras se juntan parcialmente de acuerdo con dichos tratamientos.

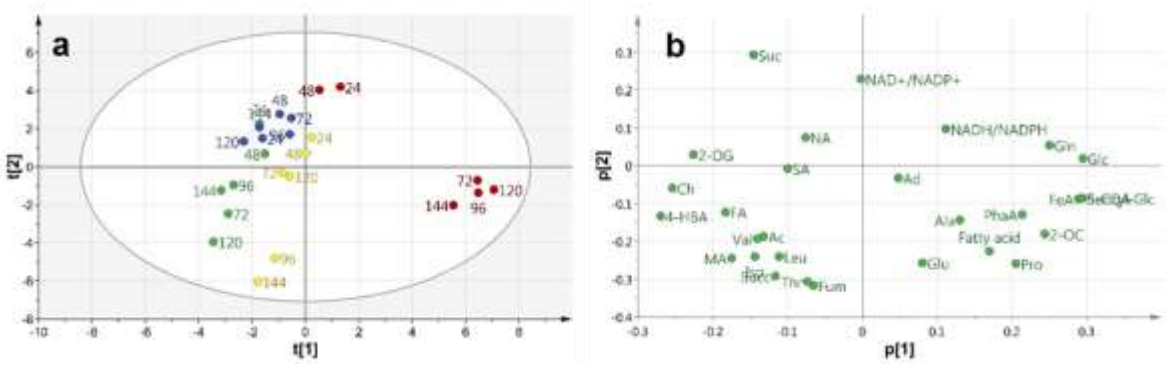


Figura 4-7: Gráfico de score (a) y gráfico de loadings (b) del PCA de la respuesta metabolómica de las suspensiones de *T. peruviana* a diferentes tratamientos: AS (azul), MeJA (rojo), AS/MeJA (amarillo) y controles (verde). Las muestras en (a) se etiquetaron de acuerdo con el tiempo de cosecha (24, 48, 72, 96, 120 y 144 h). La elipse representa los T2 de Hotelling con un 95% de confianza. Las variables en (b) son: Adenina (Ad), Alanina (Al), Acetato (Ac), Colina (Ch), Clorogenato (5-CQA), Bencil-glucósidos (Bencil-Glc), Formiato (FA), Ferulato (FA) , Fumarato (Fum), Glucosa (Glu), Glutamina (Gln), Glutamato (Glu), 4-HBA (4-hidroxibencilacetico), Isoleucina (Iso), Leucina (Leu), Malato (MA), Nicotinato (NA), 2-oxocaprato (2-OC), 2-oxoglutarato (2-OG), Fenilacetato (PhaA), Prolina (Pro), Salicilato (SA), Sacarosa (Suc), Succinato (Succ), Treonina (Thr) y Valina (Val).

El gráfico de loadings correspondiente (Figura 4-7b), en forma general, indica una influencia importante de la glucosa, ácido clorogénico, ácido ferúlico, bencil-glucósidos, 2-oxocaproato, glutamina, glutamato, NADH/NADPH, fenilacetato, ácidos grasos, alanina

y prolina en PC1, como factor diferenciador del tratamiento con MeJA. Sin embargo, la superposición parcial entre AS, AS/MeJA y los grupos de control en el gráfico de score hace que sea difícil encontrar el perfil metabólico característico de los otros métodos, por lo que se decidió utilizar una técnica multivariable adicional no supervisada para seguir analizando la estructura de los datos. Como se observó, el análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) separó claramente los datos de acuerdo con el tratamiento de elicitación (Figura 4-8).

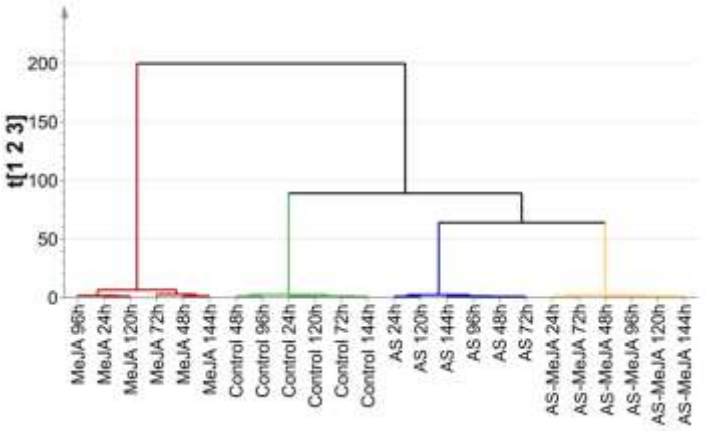


Figura 4-8: Dendrograma HCA de la respuesta metabolómica (datos cuantitativos) de las células de *T. peruviana* a los tratamientos con AS (azul), MeJA (rojo), AS/MeJA (amarillo) y control (verde).

A continuación, se realizó un análisis del mapa de calor, para visualizar el agrupamiento de aglomerados jerárquicos entre muestras y variables. Un mapa de calor es una tabla codificada por colores en la cual, las filas (tratamientos de elicitación) y las columnas (metabolitos) se clasificaron por agrupamiento jerárquico (doble dendrograma), lo que facilita la identificación visual de patrones. La figura 4-9 muestra los mejores resultados obtenidos.

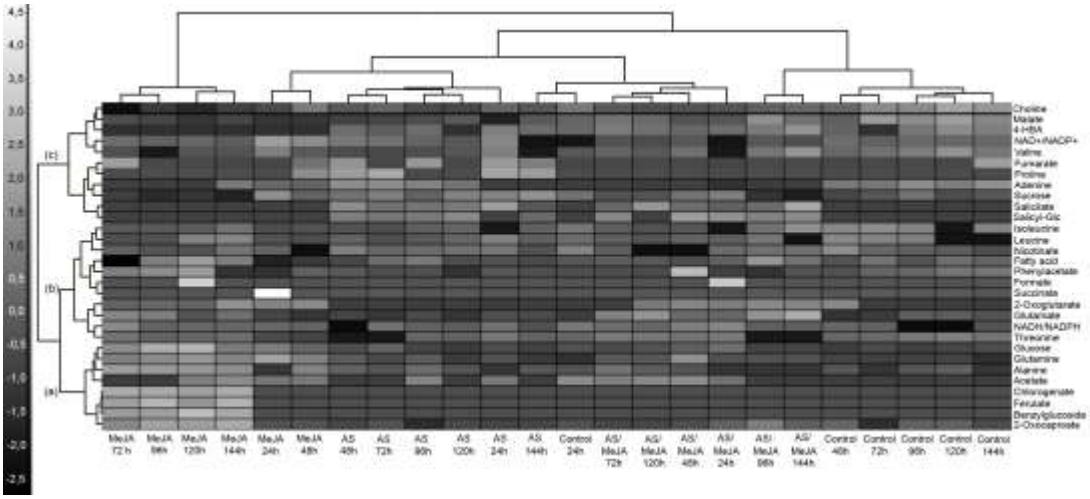


Figura 4-9: Doble dendrograma de HCA de respuesta metabolómica (datos cuantitativos) para los diferentes tratamientos de elicitación de cultivos de células en suspensión de plantas de *T. peruviana* (control, AS, MeJA y AS/MeJA).

La representación de agrupamiento bidimensional mostró las relaciones entre las muestras y las variables. La agrupación entre variables (metabolitos) permitió identificar posibles conexiones entre el metabolismo primario y la vía fenólica. Los metabolitos se dividieron en tres grupos (a), (b) y (c), pero sólo los dos primeros mostraron correlaciones con los compuestos fenólicos sintetizados *de novo*. El grupo (a) mostró correlación entre los bencil-glucósidos, el clorogenato y el ferulato con los siguientes compuestos: 2-oxocaproato, alanina, acetato, glutamina y glucosa; mientras, el grupo (b) mostró correlación entre el fenilacetato con: treonina, NADH/NADPH, glutamato, 2-oxoglutarato, succinato, formiato, ácidos grasos, nicotinato, leucina e isoleucina. Por otro lado, el mapa de calor también mostró que las muestras tratadas con los elicitores comparten diferentes metabolitos en cierta medida, lo que explica la dificultad de asignarlos como compuestos característicos de los diferentes tratamientos, tanto en los análisis de PCA como en el mapa de calor. En consecuencia, se aplicaron a los datos los análisis supervisados de PLS-DA y OPLS-DA; el resultado mostró 5 variables latentes (R2X (cum) = 0,807; R2Y (cum) = 0,899 y Q2 (cum) = 0,756) y 3 + 4 + 0 variables latentes (R2X (cum) = 0,880; R2Y (cum) = 0,948 y Q2X (cum) = 0,790) que explican bien los resultados de PLS-DA y OPLS-DA, respectivamente. Evidentemente, tal resultado representa una mejora con respecto al análisis de PCA, observando que hay una

tendencia de las muestras del mismo tratamiento a estar cerca (Figura 4-10) con una resolución más clara entre los grupos en comparación con la PCA.

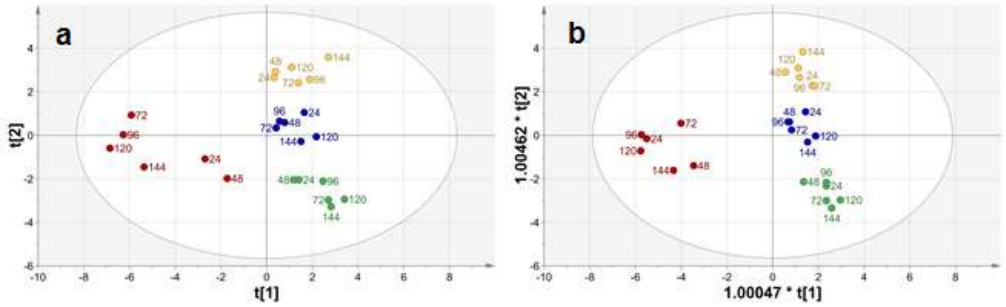


Figura 4-10: Gráfico de score de los análisis PLS-DA (a) y OPLS-DA (b) de la respuesta metabolómica (datos cuantitativos) a los diferentes tratamientos: AS (azul), MeJA (rojo), AS/MeJA (amarillo) y controles (verde). Las muestras se etiquetaron de acuerdo con su tiempo de recolección (24, 48, 72, 96, 120 y 144 h). La elipse representa los T2 Hotelling con un 95% de confianza.

Curiosamente, con OPLS-DA, los datos dentro de los tratamientos en diferentes tiempos están menos dispersos, lo que indica que la variación ortogonal eliminada por OPLS-DA debe estar relacionada con fuentes de variación que no están correlacionadas con la elicitación; es decir, la parte no predictiva de la variación en el bloque X está probablemente asociada con cambios temporales en las concentraciones de metabolitos. Nuevamente, debido a la dificultad de asignar un perfil de metabolitos característico a cada variable latente, se analizaron las variables latentes predictivas y ortogonales del OPLS-DA a través de sus valores de importancia variable en los parámetros de proyección (VIP) (Tabla 3). Para esto, SIMCA calculó la influencia en la respuesta de cada término en el modelo. VIP es la suma de las contribuciones de influencia variable sobre todas las dimensiones del modelo. Los términos con VIP mayor que uno (valor promedio) son los más relevantes para explicar el modelo.

Tabla 4-2: Importancia variable en los valores de proyección (VIP) para los componentes predictivos y ortogonales en el modelado de datos OPLS-DA.

Metabolito	Predictivo	Metabolito	Ortogonal
Salicil-Glucósidos	1.3761	Nicotinato	1.4921
Salicilatos	1.3114	NADH/NADPH	1.4228
Glutamato	1.3041	Ácidos grasos	1.4149
Malato	1.2370	NAD+/NADP+	1.3199
Colina	1.1400	Sacarosa	1.2251
Glutamina	1.1397	Valina	1.2224
4-HBA	1.1341	Prolina	1.1710
Isoleucina	1.1338	Fumarato	1.1432
2-Oxoglutarato	1.0915	Adenina	1.1129
Glucosa	1.0712	Treonina	1.0903
Fumarato	1.0655	Formiato	1.0883
Treonina	1.0647	Alanina	1.0624
Fenilacetato	1.0257	Clorogenato	1.0166
2-Oxocaproato	1.0104	Bencilglucósido	1.0025
Succinato	1.0036		

A partir de la Tabla 3 es posible asignar los metabolitos con mayor influencia utilizando valores predictivos de VIP, y aquellos que tienden a causar dispersión debido a otras fuentes de variación que usan valores ortogonales de VIP. Con esta metodología, aunque no es posible asignar una influencia individual de los tipos de metabolitos a cada tratamiento de elicitación, es posible discernir aquellos que afectan más al modelo. Como se observó, los metabolitos con mayor influencia en la separación de los diferentes tratamientos de elicitación son los salicilatos, glutamato, malato, colina, glutamina, 4-HBA, isoleucina, 2-oxoglutarato, glucosa, fumarato, treonina, fenilacetato, 2-oxocaproato y succinato, lo que es consistente con los resultados de análisis de mapa de calor agrupados sin supervisión. Como se discutió anteriormente, la Tabla 4-3 indica que las concentraciones de nicotinato, NADH/NADPH, ácidos grasos, $NAD^+/NADP^+$, sacarosa, valina, prolina, fumarato, adenina, treonina, formiato, alanina, clorogenato y bencil-

glucósido parecen ser más afectadas por un factor temporal, que causa una dispersión no discernible debido al despliegue de datos en la disposición de la matriz de dos vías.

Los resultados del análisis cuantitativo de los metabolitos muestran que los elicitores causan cambios en el metabolismo primario que afectan la síntesis *de novo* de compuestos fenólicos. En particular, la producción de compuestos fenólicos en las suspensiones celulares tratadas con MeJA se asoció con un aumento en el contenido de glucosa, glutamina y prolina; en concordancia, las muestras con bajo contenido de estos metabolitos primarios (por ejemplo, tratamientos con AS y AS/MeJA) mostraron una baja producción de compuestos fenólicos *de novo*. Es bien sabido que los mecanismos defensivos de la planta implican un costo metabólico que afecta su crecimiento celular; en particular, el flujo de carbono entre el metabolismo primario y secundario se ve afectado principalmente por la biosíntesis de moléculas defensivas, como los compuestos fenólicos (Havko et al., 2016). La glucosa es una de las principales fuentes de energía (ATP) y de esqueletos de carbono para la ruta fenólica, por lo que es lógico que en condiciones de estrés el contenido de glucosa aumente y, en consecuencia, el contenido de sacarosa disminuya. Los compuestos fenólicos se sintetizan a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y eritosa-4-fosfato en la vía del ácido shikímico; ambos compuestos se producen a partir de glucosa, en las vías de glucólisis y fosfato de pentosa (PPP), respectivamente. La etapa oxidativa de PPP produce equivalentes redox (NADPH) que se utilizan en la producción de eritosa-4-fosfato a partir del aminoácido prolina.

Adicionalmente, la reducción de los niveles de 2-oxoglutarato podría explicarse porque estas moléculas son las aceptadoras de iones de amonio generados por la desaminación reductiva de fenilalanina, a través del ciclo de glutamina sintetasa y glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Carreto et al., 2015). Los niveles bajos de leucina, isoleucina y valina podrían ser otra forma de redirigir el flujo de carbono y energía a expensas de la biosíntesis de proteínas. La reducción en la producción de polisacáridos y proteínas en cultivos celulares en suspensión de *T. peruviana* tratados con MeJA explicaría, en parte, la disminución en la producción de biomasa previamente informada en estas condiciones de crecimiento (Mendoza, et al., 2018).

Aunque en el presente estudio no se detectaron intermediarios de la vía del ácido shikímico, los resultados obtenidos permitieron proponer un esquema de interacción entre el metabolismo de los carbohidratos, aminoácidos y la vía fenólica en suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con MeJA (Figura 4-11).

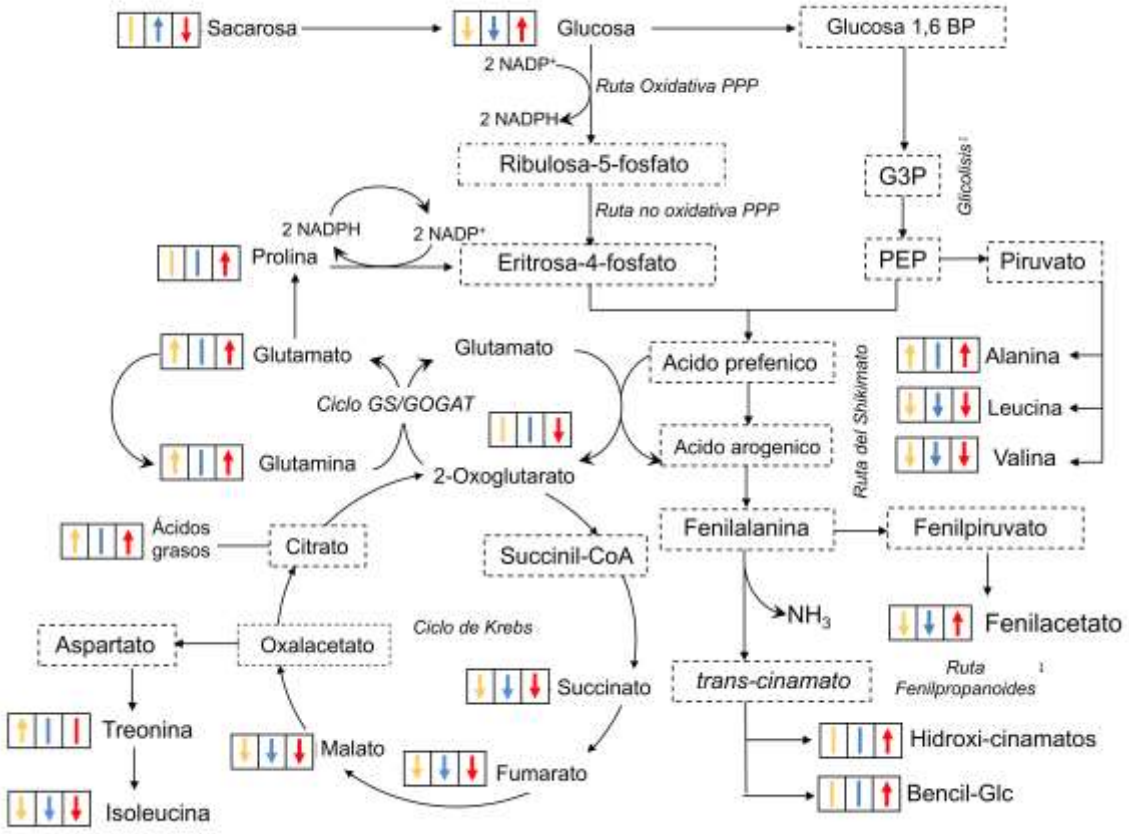


Figura 4-11: Esquema propuesto de interacción entre el metabolismo primario con la ruta fenólica en cultivos de suspensión celular de *T. peruviana* a las 72 h después de la elicitación. Los metabolitos identificados en este experimento se etiquetan con flechas, de acuerdo con el tratamiento principal: MeJA (rojo), AS (azul), AS/MeJA (amarillo). La orientación de las flechas muestra el efecto de los inductores en la producción de metabolito en comparación con el control: (↑) aumenta, (↓) disminuye, (I) no es diferente. Los metabolitos dentro de las cajas de puntos no se detectaron en el presente estudio. Bencil-Glc = bencil-glucósidos; G3P = gliceraldehído-3-fosfato; GS = glutamina sintasa; GOGAT = glutamina oxoglutarato aminotransferasa; PEP = Fosfenol piruvato; PPP = vía de los fosfatos de pentosa.

A pesar de que los salicilatos también se identificaron como VIP, estos se detectaron únicamente en las suspensiones tratadas con AS, por lo que está claro que los salicilatos no son productos de la elicitación. Los tratamientos con AS y AS/MeJA también mostraron cambios en el metabolismo primario, pero estos cambios no aumentaron significativamente la producción *de novo* de compuestos fenólicos, por lo que podría ser una consecuencia del reparto metabólico fundamental de los recursos de energía y carbono hacia otras vías secundarias diferentes a la biosíntesis de fenilpropanoides.

4.5. Conclusión

Este es el primer estudio metabolómico de células de *T. peruviana* cultivadas en suspensión y tratadas con elicitores químicos (AS, MeJA y AS/MeJA). Se logró la identificación y elucidación de la estructura de algunos compuestos presentes en los extractos crudos de suspensión celular de *T. peruviana*, usando espectroscopia de ^{1}H-RMN. El análisis multivariante utilizando datos espectrales de RMN (^{1}H-RMN y proyecciones del JRES) y las concentraciones relativas de metabolitos mostraron una clara separación entre las suspensiones control y las tratadas con los elicitores; también se observó separación temporal de las muestras tratadas con MeJA y AS/MeJA. Todos los elicitores causaron cambios en el metabolismo primario de las células de *T. peruviana*, pero solo MeJA aumentó la producción de compuestos fenólicos a las 72 h después de la adición del elicitor.

Los bencil-glucósidos, ácido clorogénico, ácido ferúlico y fenilacético fueron los principales CF identificados en el tratamiento con MeJA. La producción de estos compuestos se asoció con cambios en el metabolismo de los carbohidratos y los aminoácidos, específicamente con el aumento del contenido de glucosa, glutamina y prolina y la disminución del contenido de 2-oxoglutarato y sacarosa. El tratamiento con AS o AS/MeJA no afectó significativamente la producción de CF en comparación con el control. Nuestros resultados muestran claramente que AS revierte el efecto de MeJA en la biosíntesis de CF cuando estos elicitores se utilizan en combinación. Los estudios futuros con fracciones purificadas de CF y el análisis de RMN con asistencia de HPLC-EM serían necesarios para mejorar la identificación de otros CF presentes en

suspensiones celulares de *T. peruviana,* que no se identificaron en este estudio posiblemente debido a su baja concentración en las muestras.

Bibliografía

Afrin S, Huang J-J, Luo Z-Y. JA-mediated transcriptional regulation of secondary metabolism in medicinal plants. Science Bulletin. 2015 Jun;60(12):1062-72. doi: 10.1007/s11434-015-0813-0.

Arias JP, Zapata K, Rojano B, Arias M. Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. J Photochem Photobiol B. 2016;163:87–91.
doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014.

Arias M, Angarita M, Restrepo JM, Caicedo LA, Perea M. Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. In vitro Cell Dev Biol Plant. 2010;46:233–8. doi: 10.1007/s11627-009-9249-z

Asghari M, Hasanlooe AR. Methyl jasmonate effectively enhanced some defense enzymes activity and total antioxidant content in harvested “Sabrosa” strawberry fruit. Food Sci Nutr. 2016;4:377–83. doi: 10.1002/fsn3.300.

Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V. The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and *Rhizobium infection*. Mol Plant Pathol. 2010;11:705–19. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x

Caretto S, Linsalata V, Colella G, Mita G, Lattanzio V. Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. Int J Mol Sci. 2015;16:26378–94. doi: 10.3390/ijms161125967.

Chong J, Pierrel MA, Atanassova R, Werck-Reichhart D, Fritig B, Saindrenan P. Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon

elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. Plant Physiol. 2001;125:318–28. doi: 10.1104/pp.125.1.318.

Considine M, Gordon C, Croft K, Ching S. Salicylic acid overrides the effect of methyl jasmonate on the total antioxidant capacity of table grapes. Acta Hortic. 2009;841: 495–8. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.841.67

Cozzolino D, Smyth HE, Gishen M. Feasibility study on the use of visible and near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. J Agric Food Chem. 2003 Dec 17;51(26):7703-8. doi: doi.org/10.1021/jf034959s.

Dave A, Graham IA. Oxylipin signaling: a distinct role for the jasmonic acid precursor cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (cis-OPDA). Front Plant Sci. 2012;3:42.
doi: 10.3389/fpls.2012.00042

Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. Arabidopsis Book 9. 2011:e0156. doi: 10.1199/tab.0156.

Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical databases.
https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search (Accessed 1 February 2018)

Eckardt NA. Oxylipin signaling in plant stress responses. Plant Cell. 2008 Mar; 20(3):
495–7. doi: 10.1105/tpc.108.059485.

Goldhaber-Pasillas GD, Mustafa NR, Verpoorte R. Jasmonic acid effect on the fatty acid and terpenoid indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Molecules. 2014;19:10242–160. doi: 10.3390/molecules190710242.

Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:2389–93. doi: 10.1073/pnas.89.6.2389

Havko NE, Major IT, Jewell JB, Attaran E, Browse J, Howe GA. Control of carbon assimilation and partitioning by jasmonate: an accounting of growth–fefense tradeoffs. Plants (Basel). 2016 Jan 15;5(1). pii: E7. doi: 10.3390/plants5010007.

He Y, Liu Y, Cao W, Huai M, Xu B, Huang B. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in *Kentucky bluegrass*. Crop Sci. 2005;45:988–95. doi:10.2135/cropsci2003.0678.

Hong J, Yang L, Zhang D, Shi J. Plant metabolomics: an indispensable system biology tool for plant science. Int J Mol Sci. 2016 Jun 1;17(6). pii: E767.
doi: 10.3390/ijms17060767.

Jeandet P, Clément C, Courot E, Cordelier S. Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. Int J Mol Sci. 2013 Jul 8;14(7):14136-70. doi: 10.3390/ijms140714136.

Kim HJ, Chen F, Wang X, Choi JH. Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). J Agric Food Chem. 2006 Sep 20;54(19):7263-9.

Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants. Nat Protoc. 2010 Mar;5(3):536-49. doi: 10.1038/nprot.2009.237.

Kim YB, Kim JK, Uddin MR, Xu H, Park WT, Tuan PA, Li X, Chung E, Lee JH, Park SU. Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate. PLoS One. 2013 May 28;8(5):e64199. doi: 10.1371/journal.pone.0064199.

Klessig DF, Malamy J. The salicylic acid signal in plants. Plant Mol Biol. 1994 Dec;26(5):1439-58.

Kraemer K, Schenkel E, Verpoorte R. Glucosylation of ethanol in *Ilex paraguariensis* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 1999; 18: 509–13. doi: 10.1007/s002990050613.

Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. J Exp Bot. 2005 Jan;56(410):255-65.

Kvesitadze G, Ramsden J, Sadunishvili T, Khatisashvili G. Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants: Basis of phytoremediation. Springer Science & Business Media. 2006;111–9.

Le Roy J, Huss B, Creach A, Hawkins S, Neutelings G. Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants. Front Plant Sci. 2016 May 26;7:735. doi: 10.3389/fpls.2016.00735.

Liang YS, Choi YH, Kim HK, Linthorst HJ, Verpoorte R. Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. Phytochemistry. 2006a Nov;67(22):2503-11. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.08.018

Liang YS, Kim HK, Lefeber AW, Erkelens C, Choi YH, Verpoorte R. Identification of phenylpropanoids in methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. J Chromatogr A. 2006b Apr 21;1112(1-2):148-55. doi: 10.1016/j.chroma.2005.11.114.

Martínez G, Regente M, Jacobi S, Del Rio M, Pinedo M, de la Canal L. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. Pest Biochem Physiol. 2017;140:30–5. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.05.012.

Mendoza D, Cuaspud O, Arias JP, Ruiz O, Arias M. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Biotechnol Rep (Amst). 2018 Jul 3;19:e00273. doi: 10.1016/j.btre.2018.e00273.

Muljono RAB, Scheffer JJC, Verpoorte R. Effect of Feeding Salicylic Acid on 2,3-dihydroxybenzoic acid formation in cultured cells of *Catharanthus roseus*. Pharm Biol. 2003;41:284–90. doi: 10.1076/phbi.41.4.284.15681

Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiol. 2006 Jan; 140(1): 249–62. doi: 10.1104/pp.105.072348.

Mustafa NR, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic changes of salicylic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures monitored by NMR-based metabolomics. Biotechnol Lett. 2009 Dec; 31(12): 1967–74. doi: 10.1007/s10529-009-0107-1

Ncho XE, Doumbia ML, Traore S, Konan YKF, Kone M, Kouakou TH. Estimation of total phenolic compounds in treated leaves with methyl jasmonate and salicylic acid of banana (*Musa acuminata* L. AAA group cv. Grand Naine) susceptible to the Black Leaf Streak Disease. Agric Sci Res J. 2016;6:175–81.

Pan Q, Zhao J, Wang Y, Tang K. Progress in NMR-based metabolomics of *Catharanthus roseus*. Front Agr Sci Eng. 2015;2(3):195-204. doi: 10.15302/J-FASE-2015063.

Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC. Hormonal modulation of plant immunity. Annu Rev Cell Dev Biol. 2012;28:489-521. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.

Repka V, Fischerová I, Šilhárová K. Methyl jasmonate is a potent elicitor of múltiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. Biologia Plantarum 48, 273–283. doi: 10.1023/B:BIOP.0000033456.27521.e5

Rincón-Pérez J, Rodríguez-Hernández L, Ruíz-Valdiviezo VM, Abud-Archila M, Luján-Hidalgo MC, Ruiz-Lau N, González-Mendoza D, Gutiérrez-Miceli FA. Fatty acids profile,

phenolic compounds and antioxidant capacity in elicited callus of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. J Oleo Sci. 2016;65(4):311-8. doi: 10.5650/jos.ess15254.

Sánchez-Sampedro A1, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R, Corchete P. Metabolomic alterations in elicitor treated *Silybum marianum* suspension cultures monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy. J Biotechnol. 2007 Jun 15;130(2):133-42. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.03.007

Schenk RV, Hildebrandt AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot. 1972; 50:199-204. doi: 10.1139/b72-026.

Siciliano I, Amaral Carneiro G, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. Jasmonic acid, Abscisic acid, and Salicylic acid are involved in the phytoalexin responses of rice to *Fusarium fujikuroi*, a high gibberellin producer pathogen. J Agric Food Chem. 2015 Sep 23;63(37):8134-42. doi: 10.1021/acs.jafc.5b03018.

Sun YJ, He JM, Kong JQ. Characterization of two flavonol synthases with iron-independent flavanone 3-hydroxylase activity from *Ornithogalum caudatum* Jacq. BMC Plant Biol. 2019 May 14;19(1):195. doi: 10.1186/s12870-019-1787-x.

Suzuki H, Reddy MS, Naoumkina M, Aziz N, May GD, Huhman DV, Sumner LW, Blount JW, Mendes P, Dixon RA. Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. Planta. 2005 Mar;220(5):696-707. doi: 10.1007/s00425-004-1387-2.

Widhalm JR, Dudareva N. A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. Mol Plant. 2015 Jan;8(1):83-97. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.001.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

Los resultados de esta investigación hacen importantes contribuciones al conocimiento del metabolismo de células de *T. peruviana* cultivada *in vitro* bajo condiciones de crecimiento normal (sin elicitor) y cuando son tratadas con AS y MeJA. Este conocimiento permitirá establecer condiciones de cultivo en este sistema biológico con miras al desarrollo futuro de productos de base biotecnológica.

En esta investigación se pudo comprobar que la línea celular de *T. peruviana* conserva la capacidad de producir las principales familias de metabolitos secundarios presentes en la planta de origen (explantes), lo cual es relevante ya que uno de los primeros pasos en el establecimiento de este tipo de cultivos es verificar que el metabolito o grupos de metabolitos de interés sean producidos por la línea celular, bajo las condiciones de crecimiento implementadas. En este caso el grupo de metabolitos a los cuales va dirigido el presente estudio son los CF, Fv y AA, los cuales se detectaron en la biomasa de los callos y en los cultivos de células en suspensión.

También se demostró que fitohormonas como el AS y MeJA, aplicadas de manera exógena al cultivo, afectan la producción de los metabolitos de interés (CF, Fv y AA) de una manera dependiente de la concentración, el tiempo de adición y de exposición al elicitor, incrementándolos significativamente con respecto a los cultivos no elicitados. No obstante, el tratamiento con MeJA también causó disminución de la producción de biomasa, este efecto fue dependiente del tiempo de adición del MeJA al cultivo. Ninguno de las dos fitohormonas causó efecto significativo en la producción de CF, Fv y AA en el medio extracelular. En términos generales, la estrategia de elicitar los cultivos celulares de *T. peruviana* con AS y MeJA resultó en un incremento significativo en el contenido intracelular de CF, Fv y AA. Adicionalmente, se logró mejorar la producción de CF con

AS 300 µM y MeJA 3 µM adicionándolos al cultivo el día 4 de la fase exponencial. También se estableció que el tiempo de exposición a los elicitores influye significativamente en la producción de CF, Fv y AA, alcanzándose los contenidos más altos entre las 72 y 96 horas, así: MeJA 3 µM > AS/MeJA (300 µM/3 µM AS) > 300 µM AS > control. MeJA aumentó 1,49 veces el contenido de CF; 2,55 veces el contenido de Fv y 1,66 veces la AA, comparado con el cultivo sin elicitar.

El análisis del perfil de metabolitos por HPLC detectó 17 componentes intracelulares en las suspensiones celulares; dos de ellos se identificaron como ácido clorogénico y dihidroquercetina (DHQ). El ácido clorogénico es un polifenol con propiedades antioxidantes, mientras que DHQ es un flavonoide con propiedades antioxidante y anticáncer. Este es el primer reporte de DHQ en cultivos celulares de *T. peruviana*, lo cual es de gran relevancia por sus propiedades biológicas.

El tratamiento con MeJA 3 µM indujo la producción de ácido clorogénico a las 72 horas post-elicitación. En el caso de la DHQ, la combinación AS/MeJA incremento la producción de la aglicona a las 72 horas; no obstante, las concentraciones de DHQ total (aglicona + glicosilada) no incrementaron después del tratamiento con AS y MeJA aplicados de manera independiente al cultivo. Las concentraciones más altas de DHQ total se obtuvieron en las suspensiones control y en las tratadas con AS, alcanzándose la concentración máxima a las 72 horas (4,30 y 4,05 mg/100 mL, respectivamente). El hecho de que el tratamiento con MeJA incremente el contenido de ácido clorogénico y disminuya el contenido de DHQ sugiere que MeJA dirige el metabolismo fenólico de las células de *T. peruviana* hacia la biosíntesis de polifenoles, no obstante, se requieren otros experimentos que validen esta hipótesis.

La aplicación de técnicas analíticas robustas como FT-NIR combinadas con análisis multivariado confirmó que el tratamiento con AS, MeJA y la combinación AS/MeJA provocan cambios en la biosíntesis de CF en las suspensiones celulares de *T. peruviana*; además, sugiere que otros metabolitos, como carbohidratos y proteínas, pueden influir en la discriminación de los grupos de acuerdo con el tratamiento de elicitación. Así mismo, RP-HPLC combinada con análisis multivariado confirmó que la DHQ y dos compuestos

no identificados (t_R = 12,5 y 12,8 min) influyen en la separación del grupo tratado con AS/MeJA; mientras que, el ácido clorogénico influyó en la separación del grupo tratado con MeJA. Así mismo, otro compuesto con t_R = 7,9 min parece ser importante para la separación del grupo tratado con AS.

La identificación y elucidación de la estructura de varios metabolitos presentes en los extractos celulares de *T. peruviana* fue posible usando una técnica analítica más robusta como es la ^{1}H-RMN. El análisis multivariante utilizando datos espectrales de RMN (^{1}H-RMN y proyecciones del JRES) y las concentraciones relativas de metabolitos, demostraron que todos los elicitores causaron cambios en el metabolismo primario de las células de *T. peruviana*, pero sólo MeJA aumentó significativamente la producción de CF a las 72 h después de la adición del elicitor. En el caso del tratamiento con AS, se evidenció una respuesta metabólica temprana (24 h post-elicitación); no obstante, los CF identificados en estas muestras correspondieron principalmente a salicilatos glucosilados.

Los principales CF identificados en el tratamiento con MeJA fueron bencil-glucósidos, ácido clorogénico, ácido ferúlico y ácido fenilacético. La producción de estos compuestos se asoció con cambios en el metabolismo de los carbohidratos y los aminoácidos, específicamente con el aumento del contenido de glucosa, glutamina y prolina y la disminución del contenido de 2-oxoglutarato y sacarosa. El tratamiento con AS o la mezcla AS/MeJA no afectó significativamente la producción de CF en comparación con el control, lo cual sugiere que AS revierte el efecto de MeJA en la biosíntesis de estos compuestos cuando estos elicitores se utilizan en combinación.

En conclusión, los cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* son un recurso valioso para la producción de CF con potencial actividad farmacéutica como la DHQ, ácido clorogénico y ácido ferúlico. Elicitación de los cultivos celulares con MeJA es una estrategia que considerar para incrementar la producción de compuestos poli fenólicos valiosos. Estudios futuros con fracciones purificadas de los extractos intracelulares y análisis de RMN con asistencia de HPLC-EM serían necesarios para mejorar la identificación de otros compuestos presentes en suspensiones celulares de *T. peruviana.*

5.2. Recomendaciones

Con el propósito de fortalecer la presente línea de investigación, se plantean las siguientes actividades futuras:

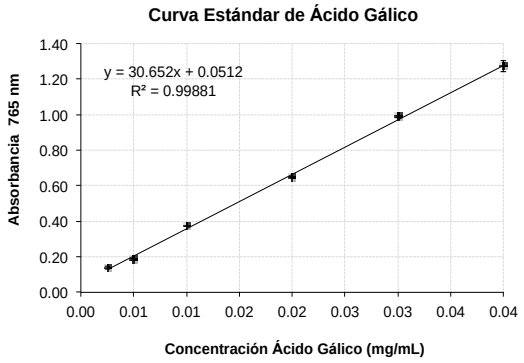
- Purificación y caracterización estructural de los compuestos fenólicos producidos por las células de *T. peruviana* cultivadas en suspensión.

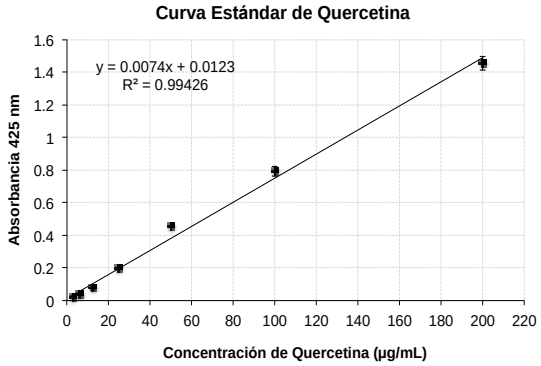
- Estudios de transcriptómica de genes de enzimas del metabolismo fenilpropanoide, como la fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4-hidoxilasa (C4H), 4- coumarato CoA ligasa (4CL), chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI), en las células de *T. peruviana* cultivadas en suspensión, determinando el efecto del MeJA en la transcripción de los genes.

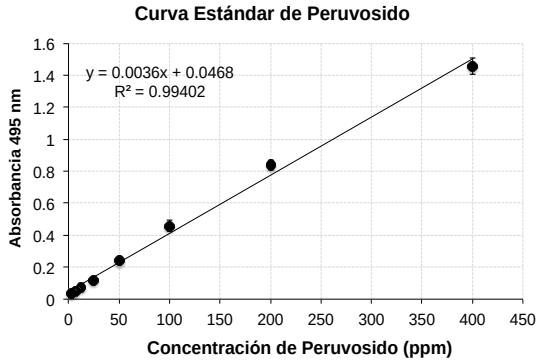
- Evaluación del efecto del escalado del cultivo, sobre el metabolismo de las células de *T. peruviana,* en presencia de MeJA.

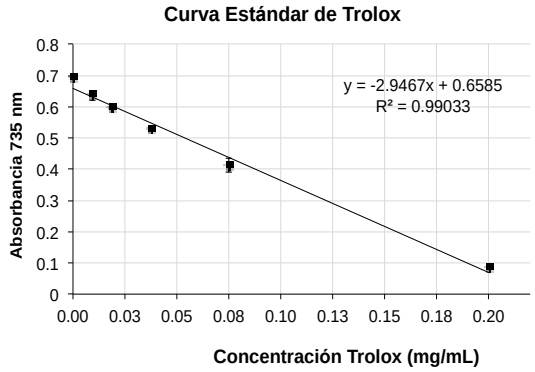
- Evaluación de las actividades biológicas relevantes de extractos, fracciones y compuestos purificados de células de *T. peruviana* cultivadas en suspensión, tales como actividades citotóxicas, frente a líneas celulares de cáncer de próstata y mama.

A. Anexo: Curvas de Calibración Estándar de Ácido Gálico, Quercetina, peruvósido y Trolox.



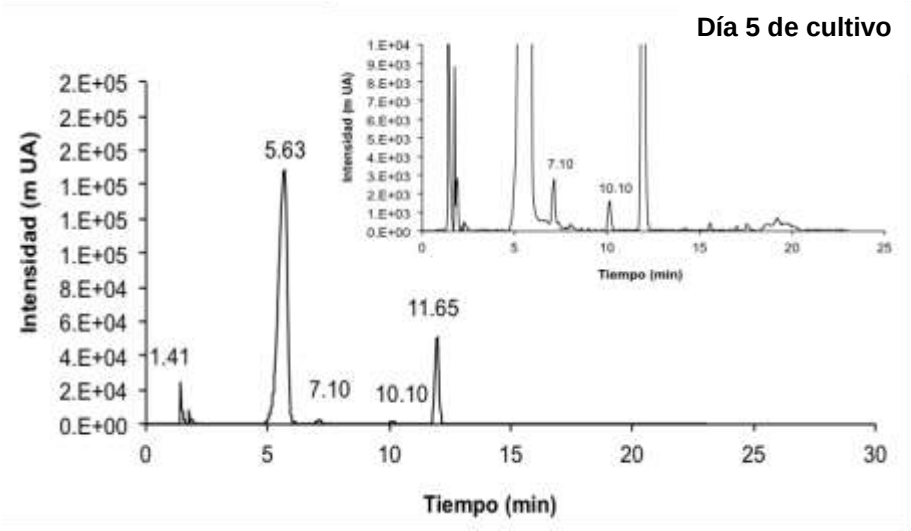


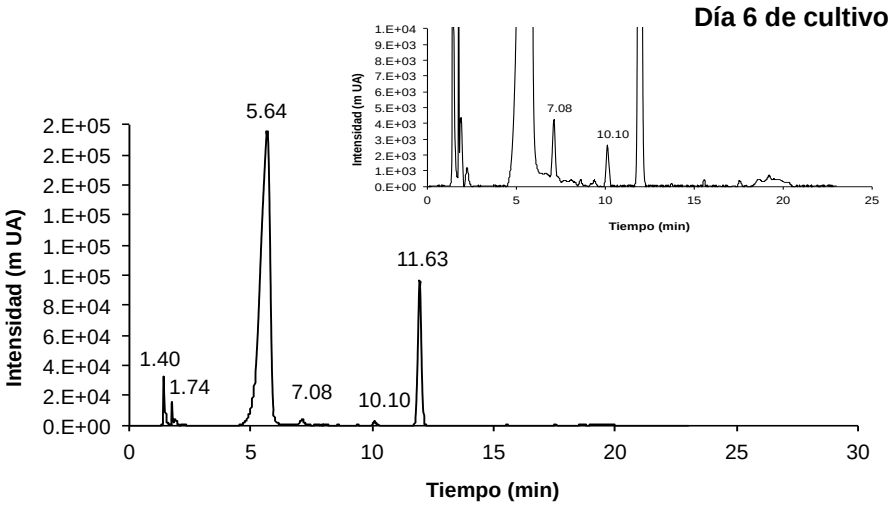


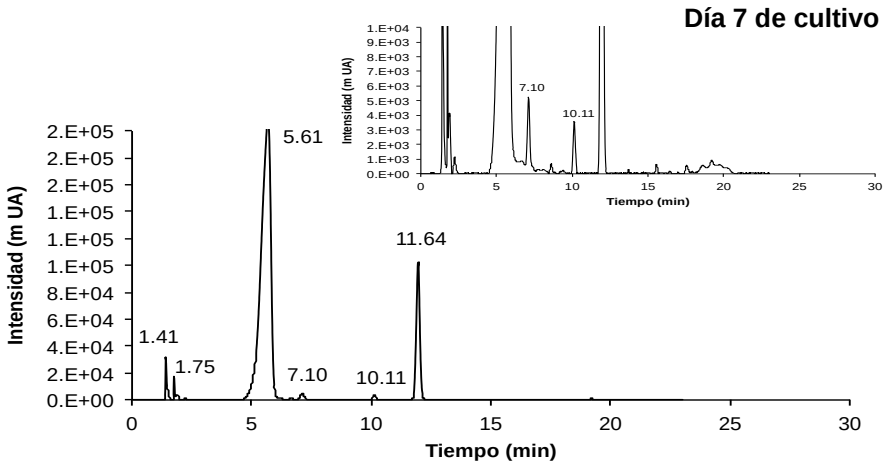


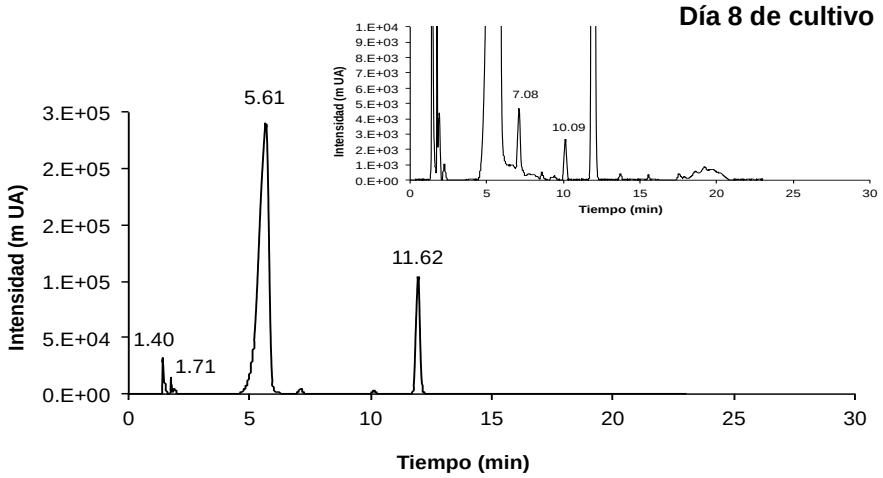
Curvas típicas de calibración de los estándares de ácido gálico, quercetina, peruvósido y trolox, para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos, flavanoides, glucósidos cardiotónicos y antioxidantes, respectivamente. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones independientes.

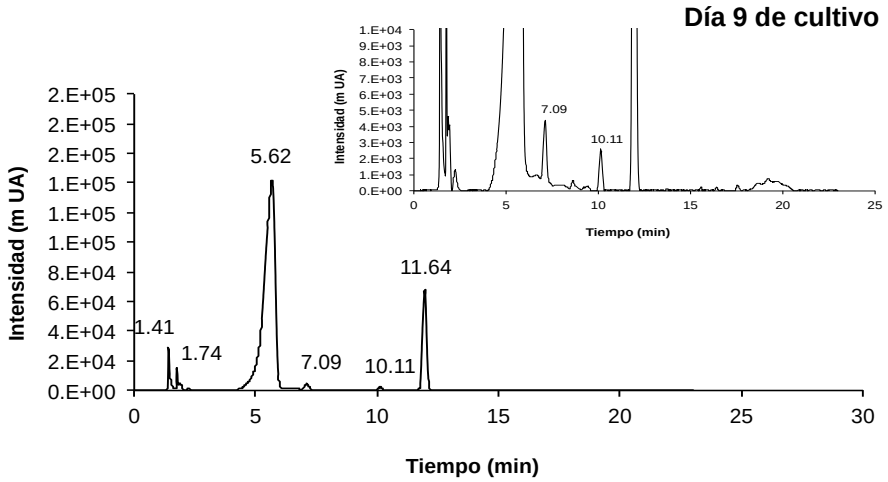
B. Anexo: Cromatogramas de Extractos EtOH*aq* de células de *T. peruviana* tratados con HCl 20%.

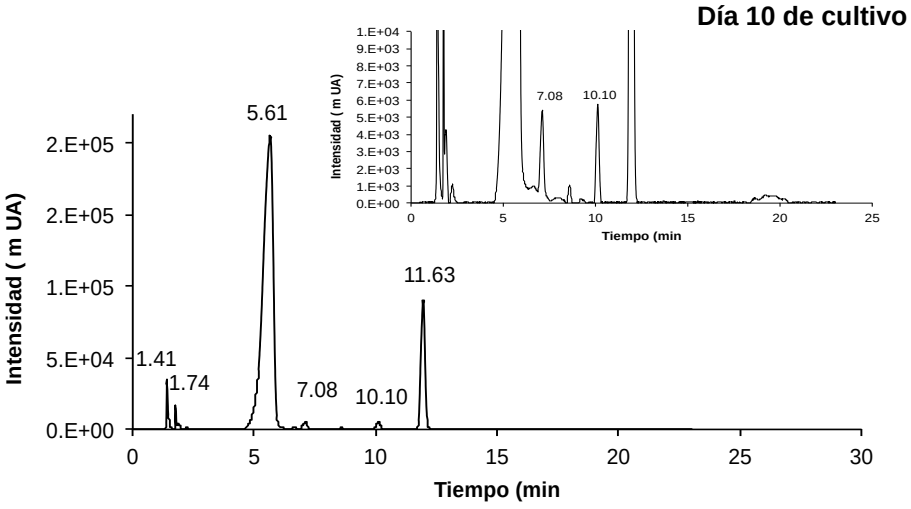




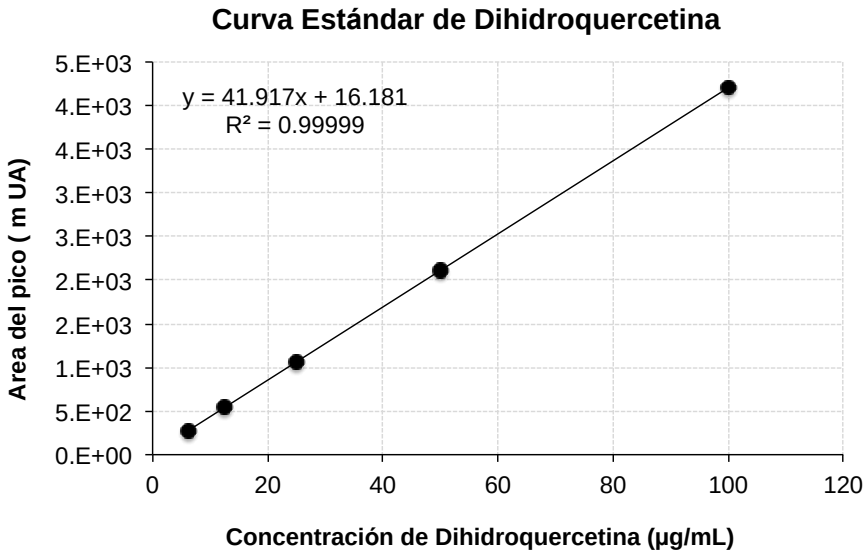

Día 7 de cultivo
Intensidad (m UA)
Tiempo (min)
5.61
11.64
1.41
1.75
7.10
10.11
7.10
10.11


Día 8 de cultivo
Intensidad (m UA)
Tiempo (min)
5.61
11.62
1.40
1.71
7.08
10.09


Día 9 de cultivo
Intensidad (m UA)
Tiempo (min)
5.62
11.64
1.41
1.74
7.09
10.11
7.09
10.11


Día 10 de cultivo
Intensidad (m UA)
2.E+05
2.E+05
1.E+05
5.E+04
0.E+00
5.61
1.41
1.74
7.08
10.10
11.63
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo (min
1.E+04
9.E+03
8.E+03
7.E+03
6.E+03
5.E+03
4.E+03
3.E+03
2.E+03
1.E+03
0.E+00
7.08
10.10
Intensidad (m UA)
Tiempo (min

C. Anexo: Curva de Calibración Estándar de la Dihidroquercetina



Curva típica de calibración estándar de dihidroquercetina (Taxifolina) usando RP-HPLC. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones independientes.

D. Anexo: Diseño del Experimento de Elicitación (Concentración del elicitor)

1. Descripción del diseño factorial para evaluar el efecto de la concentración del ácido salicílico (AS) en la producción de compuestos fenólicos en las suspensiones celulares de *T. peruviana*.

	Diseño experimental	
Factores	**Nivel (-)**	**Nivel (+)**
X_1: Concentración del AS (µM)	0	600
X_2: Tiempo de Cosecha (horas)	24	96

Clase de diseño: Factorial multinivel

Diseño base:

- Número de factores experimentales 2
- Número de bloques: 3
- Número de variables respuesta: 1
- Nombre de la variable respuesta: Contenido de fenoles totales
- Número de corridas: 8
- Grados de libertad del error: 3
- Aleatorización: Si

Factores	**Bajo**	**Alto**	**Niveles**	**Unidades**
Concentración del AS	-1,0	1,0	4	µM
Tiempo de exposición al AS	-1,0	1,0	2	horas

Respuesta	Unidades
Contenido de fenoles totales	mg EAG/g BS

Corridas	Concentración del elicitor (µM)	Tiempo de Cosecha (horas)
1	0	24
2	5	96
3	1	24
4	3	96
5	5	24
6	3	24
7	1	96
8	0	96

2. Descripción del diseño factorial para evaluar el efecto de la concentración del MeJA en la producción de compuestos fenólicos en las suspensiones celulares de *T. peruviana*.

	Diseño experimental	
Factores	**Nivel (-)**	**Nivel (+)**
X_1: Concentración del MeJA (µM)	0	5
X_2: Tiempo de exposición al MeJA (horas)	24	96

Clase de diseño: Factorial multinivel

Diseño base:

- Número de factores experimentales 2
- Número de bloques: 3
- Número de variables respuesta: 1
- Nombre de la variable respuesta: Contenido de fenoles totales
- Número de corridas: 8
- Grados de libertad del error: 3
- Aleatorización: Si

Corridas	**Concentración del elicitor (µM)**	**Tiempo de Cosecha (horas)**
1	0	24
2	5	96
3	1	24
4	3	96
5	5	24
6	3	24
7	1	96
8	0	96

E. Anexo: Diseño del Experimento de Elicitación (Tiempo de adición del elicitor)

Descripción del diseño factorial para evaluar el efecto del tiempo de elicitación en la producción de CF en las suspensiones celulares de *T. peruviana.*

	Diseño experimental	
Factores	**Nivel (-)**	**Nivel (+)**
X_1: Tratamiento	-1	1
X_2: Tiempo de exposición al elicitor (Horas)	24	96
X_3: Tiempo de adición del elicitor (Día)	0	8

Clase de diseño: Factorial multinivel

- Número de factores experimentales 3
- Número de bloques: 3
- Número de variables respuestas: 1
- Nombre de la variable respuesta: Contenido de fenoles totales
- Número de corridas: 18
- Grados de libertad del error: 9
- Aleatorización: Si

Factores	**Bajo**	**Alto**	**Niveles**	**Unidades**
Tiempo de adición del elicitor	-1,0	1,0	3	Días
Tiempo de exposición al elicitor	-1,0	1,0	2	Horas
Tratamiento	-1,0	1,0	3	Control, MeJA 3µM, AS 300µM

Respuesta	**Unidades**
Contenido de Fenoles Totales	mg EAG/g BS

Corridas	Tiempo de elicitación Tiempo (días)	Tiempo de Cosecha (horas)	Tratamiento
1	0	24	Control
2	4	96	Control
3	8	96	Control
4	0	96	SA
5	4	24	Control
6	0	96	Control
7	8	24	SA
8	8	96	MeJA
9	8	24	Control
10	4	24	MeJA
11	8	24	MeJA
12	0	96	MeJA
13	0	24	SA
14	4	24	SA
15	0	24	MeJA
16	8	96	SA
17	4	96	MeJA
18	4	96	SA

F. Anexo: Análisis estadístico para la optimización del tiempo de elicitación en la producción de compuestos fenólicos (CF).

1. ANOVA de una vía: CF (mg EAG/ g BS) versus Tiempo de Elicitación (días)

- **Análisis de Varianza**

Fuente	G.L	S.C	M.C	Valor-F	Valor-p
Tiempo de Elicitacion (días)	2	8,015	4,0076	11,19	0,000
Error	51	18,272	0,3583		
Total	53	26,288			

- **Análisis de Medias**

Tiempo Elicitación (días)	N	Media	DE	Int. Confianza (95%)
0	18	4,173	0,519	(3,890; 4,457)
4	18	4,812	0,599	(4,528; 5,095)
8	18	3,891	0,669	(3,607; 4,174)

- **Análisis de comparaciones pareadas de Tukey (95% de confianza)**

Tiempo de elicitación (días)	N	Media	Agrupación
4	18	4,812	A
0	18	4,173	B
8	18	3,891	B

2. Optimización de la Respuesta (Producción de CF) con MeJA 3µM y AS 300 µM.

- Parámetros

Respuesta	**Objetivo**	**Nivel Bajo**	**Target**	**Nivel Alto**	**Peso**	**Importancia**
Prod. CF	Maximizar	2,89	6,38	X	1	1

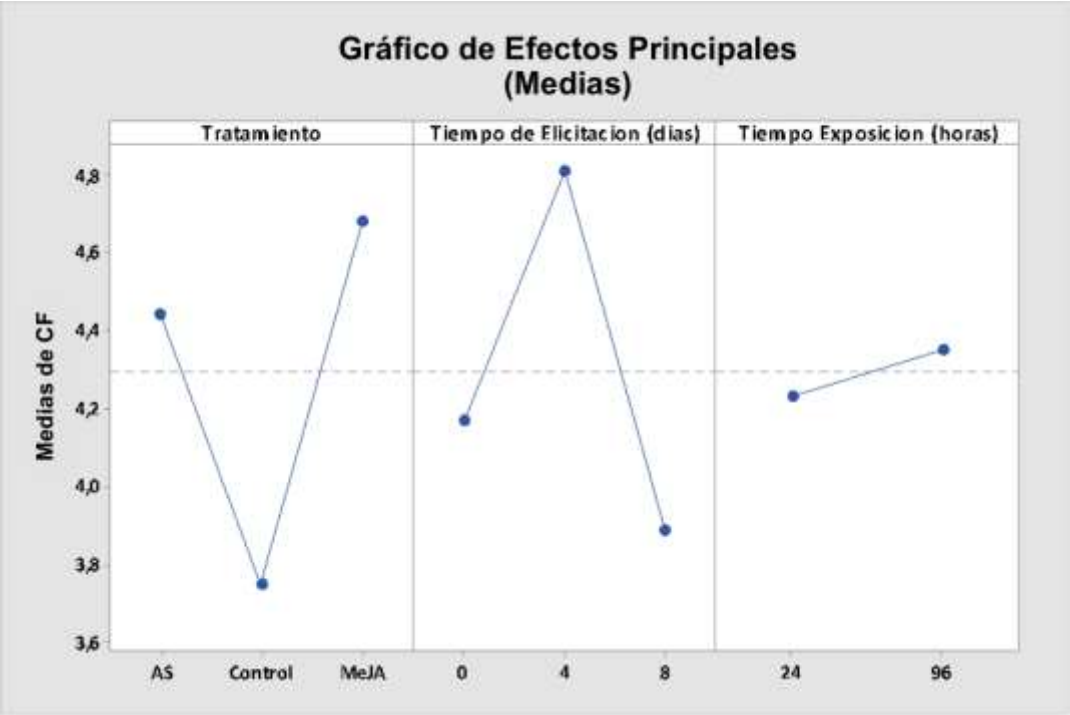
– Rangos de variables

Variable	**Valores**
Tratamiento	MeJA; AS
Tiempo de Elicitación (días)	0; 4; 8
Tiempo Exposición (horas)	24; 96

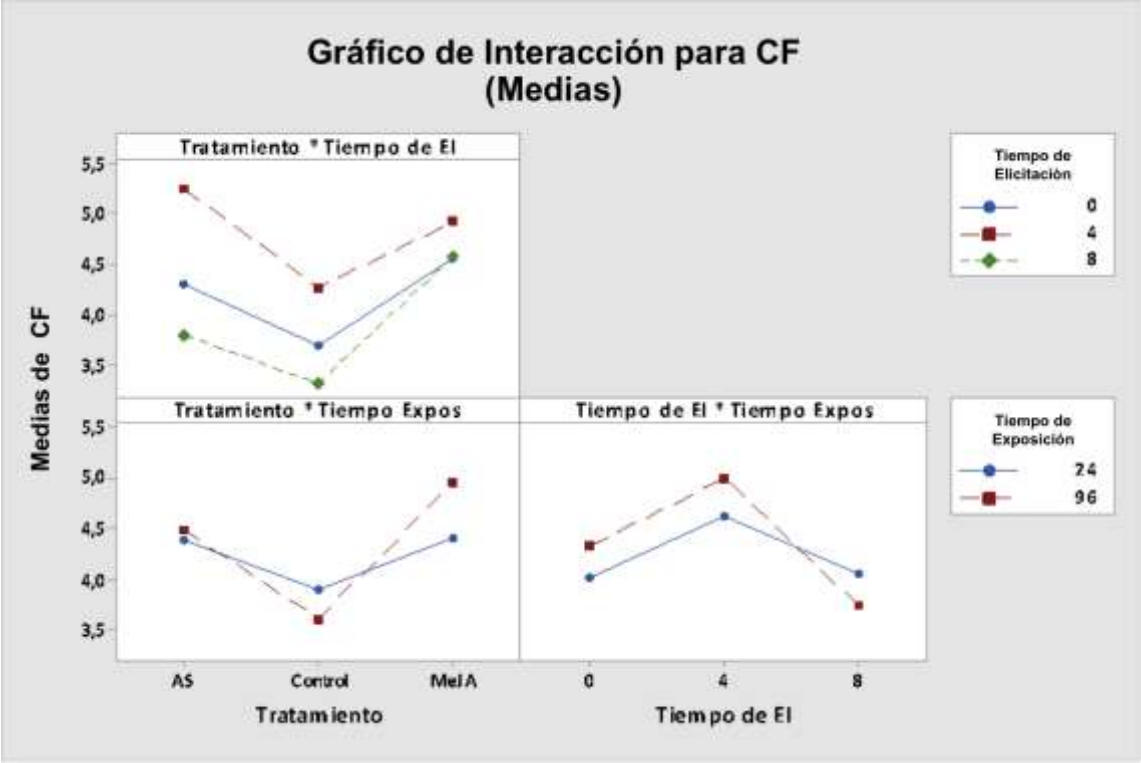
– Solución:

Solución	**Tratamiento**	**Tiempo elicitación (días)**	**Tiempo de exposición (horas)**	**Ajuste**	**Deseabilidad compuesta**
1	MeJA	4	96	5,32037	0,696381
2	AS	4	96	5,42593	0,726626

5. Gráfico de Efectos Principales para la producción de CF



5. Gráfico de Interacción de Efectos Principales para la producción de CF.



G. Anexo: Análisis estadísticos del efecto de la variable tiempo de elicitación en la producción de Biomasa.

1. ANOVA de una vía: Biomasa (g/L) versus Tiempo de Elicitacion (días)

- **Análisis de Varianza**

Fuente	G.L	S.C	M.C	Valor-F	Valor-p
Tiempo de Elicitación (días)	2	345,02	172,511	138,58	0,000
Error	51	63,49	1,245		
Total	53	408,51			

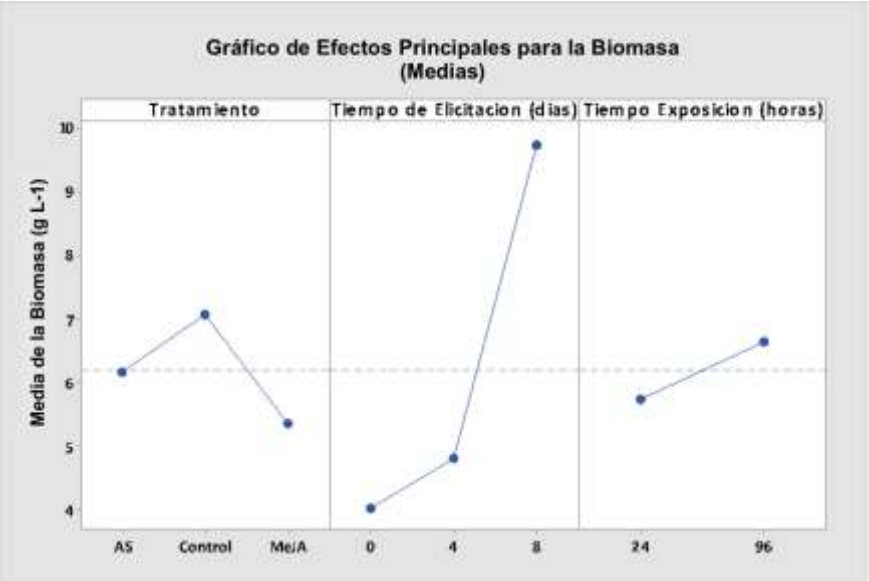
- **Análisis de Medias**

Tiempo Elicitación (días)	N	Media	DE	Int. Confianza (95%)
0	18	4,040	0,699	(3,512; 4,567)
4	18	4,814	0,998	(4,286; 5,342)
8	18	9,747	1,500	(9,219; 10,275)

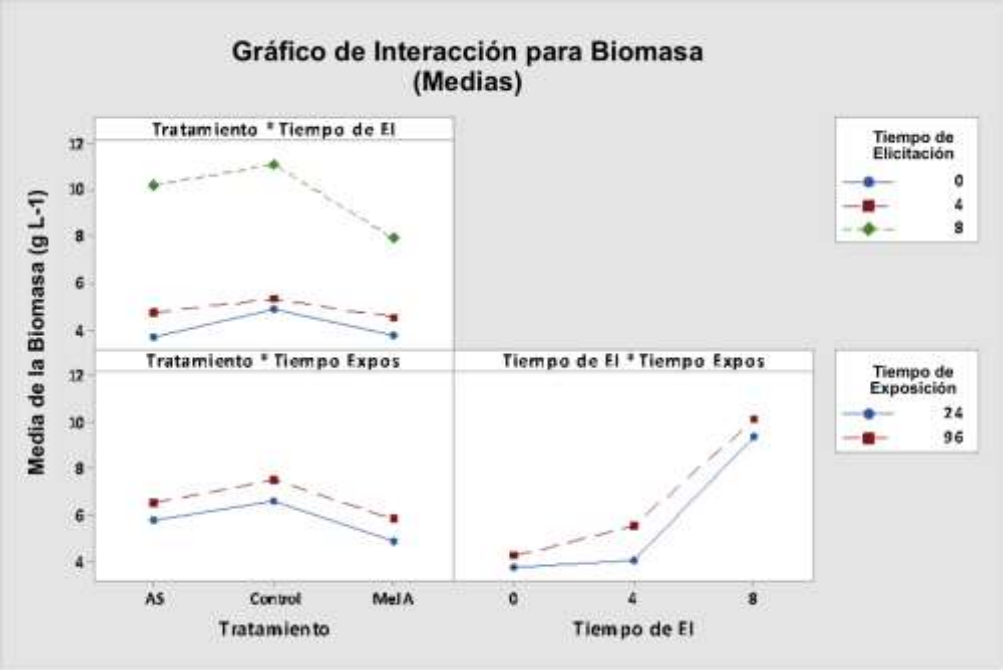
- **Análisis de comparaciones pareadas de Tukey (95% de confianza)**

Tiempo de elicitación(días)	N	Media	Agrupación
8	18	9,747	A
4	18	4,814	B
0	18	4,040	B

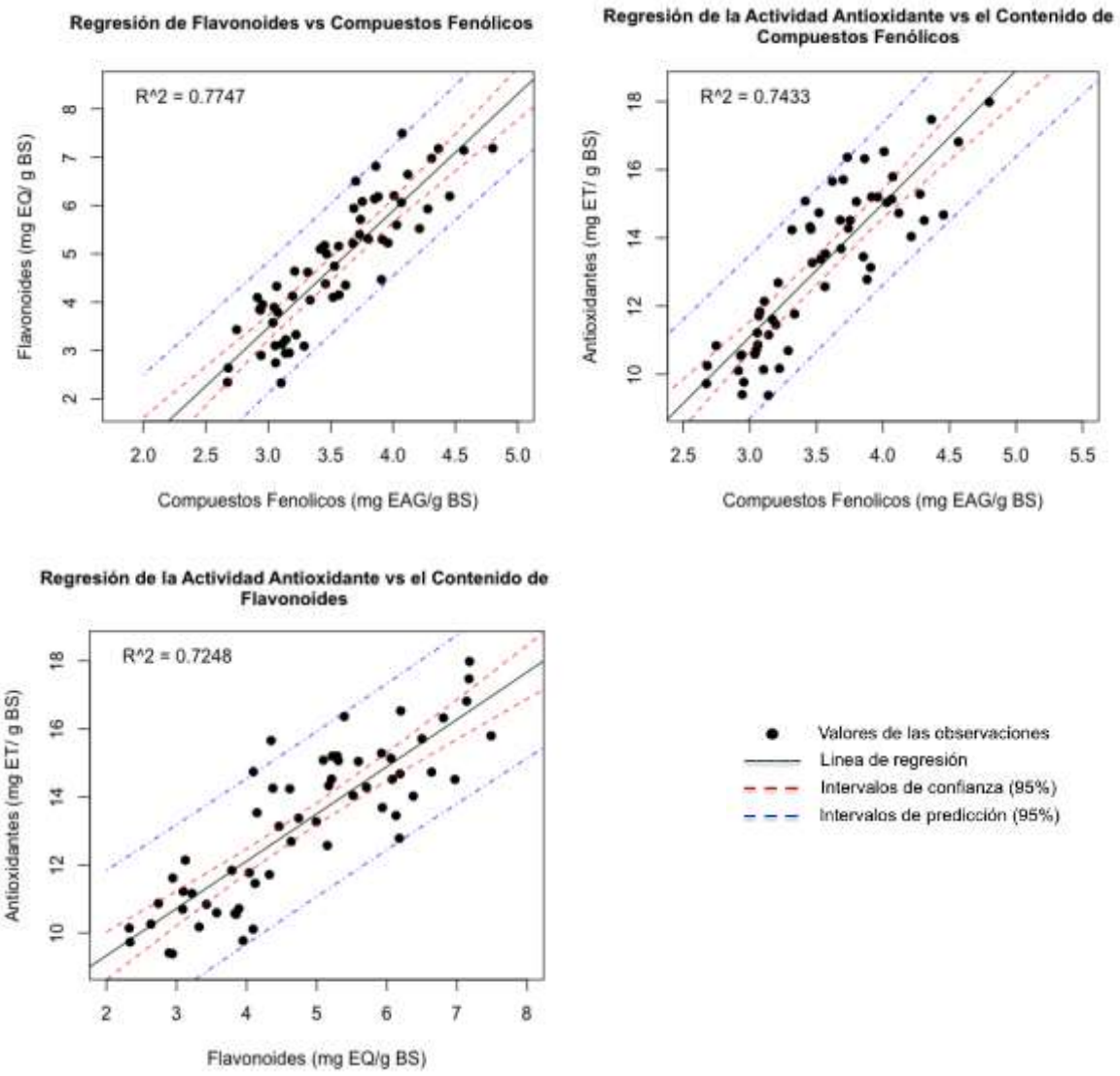
3. Gráfico de Efectos Principales para la producción de Biomasa



3. Gráfico de Interacción de Efectos Principales para la producción de Biomasa

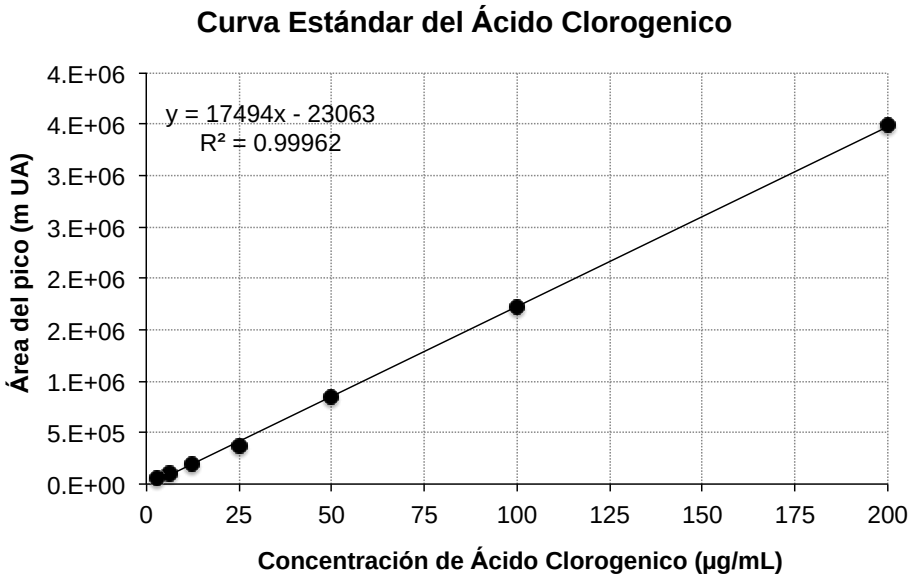


H. Anexo: Análisis de Regresión Lineal.



Gráficos de regresión líneal para los resultados del contenido intracelular de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de las suspensiones celulares de *T. peruviana* tratadas con elicitores. R^2 = coeficente de regresión lineal.

I. Anexo: Curva de Calibración Estándar del Ácido Clorogénico



Curva típica de calibración del ácido clorogénico usando RP-HPLC. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones independiente

Bibliografía general

Abe F, Iwase Y, Yamauchi T, Yahara S, Nohara T. Flavonol sinapoyl glycosides from leaves of *Thevetia peruviana*. Phytochemistry. 1995 Sep;40(2):577–81.

Afrin S, Huang J-J, Luo Z-Y. JA-mediated transcriptional regulation of secondary metabolism in medicinal plants. Science Bulletin. 2015 Jun;60(12):1062-72. doi: 10.1007/s11434-015-0813-0.

Arias JP, Zapata K, Rojano B, Arias M. Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. J Photochem Photobiol B. 2016 Oct;163:87–91. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014.

Arias JP, Zapata K, Rojano B, Peñuela M, Arias M. Cardiac glycosides, phenolic compounds and antioxidant activity from plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Rev. UDCAactual Divulg Cient. 2017; 20(2):353–62.

Arias JP. Análisis de variables de operación sobre el comportamiento de cultivos de células vegetales en suspension de *T. peruviana.* Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquía. Medellín, Colombia. 2018.

Arias M, Aguirre A, Angarita M. Cultivo *in vitro* de células vegetales. España: Académica Española, 2011.

Arias M, Angarita M, Aguirre A. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. Rev Fac Nal Agr Medellín. 2009;1:4881-95.

Arias M, Angarita M, Restrepo JM, Caicedo LA, Perea M. Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension culture of *Thevetia peruviana*. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2010; 46: 233–8. doi: 10.1007/s11627-009-9249-z.

Asghari M, Hasanlooe AR. Methyl jasmonate effectively enhanced some defense enzymes activity and total antioxidant content in harvested “Sabrosa” strawberry fruit. Food Sci Nutr. 2016;4:377–83. doi: 10.1002/fsn3.300.

Bandara V, Weinstein SA, White J, Eddleston M. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. Toxicon. 2010 Sep 1;56(3):273–81. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.026.

Bartel J, Krumsiek J, Theisa FJ. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. Comput Struct Biotechnol J. 2013; 4: e201301009. doi: 10.5936/csbj.201301009.

Beckers GJ, Spoel SH. Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. Plant Biol (Stuttg). 2006 Jan;8(1):1-10. doi: 10.1055/s-2005-872705.

Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V. The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and *Rhizobium infection*. Mol Plant Pathol. 2010;11:705–19. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x

Bhoyar S, Biradar S. Antibacterial activity of root extracts of *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. Int Res J Pharm. 2014;5(6):468-70.

Bi Y, Yuan K, Xiao W, Wu J, Shi C, Xia J, Chu G, Zhang G, Zhou G. A local pre-processing method for near-infrared spectra, combined with spectral segmentation and standard normal variate transformation. Anal Chim Acta. 2016 Feb 25;909:30-40. doi: 10.1016/j.aca.2016.01.010.

Borille BT, Marcelo MCA, Ortiz RS, Mariotti KC, Ferrão MF, Limberger RP. Near infrared spectroscopy combined with chemometrics for growth stage classification of cannabis cultivated in a greenhouse from seized seeds. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2017 Feb 15;173:318-23. doi: 10.1016/j.saa.2016.09.040.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., 2015: 984–1195.

Cárdenas López D, Castaño Arboleda N, Cárdenas-Toro J. Plantas introducidas, establecidas e invasoras en Amazonia colombiana. Bogotá, Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas –Sinchi-, 2011: 65-66, 142.

Cárdenas López D, Castaño Arboleda N, Cárdenas-Toro J. Plantas introducidas, establecidas e invasoras en Amazonia Colombiana. Bogotá, Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas –Sinchi. 2011; 65-66, 142.

Caretto S, Linsalata V, Colella G, Mita G, Lattanzio V. Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. Int J Mol Sci. 2015;16:26378–94. doi: 10.3390/ijms161125967.

Chen P, Luthria D, Harrington Pde B, Harnly JM. Discrimination among *Panax* Species using Spectral Fingerprinting. J AOAC Int. 2011 Sep-Oct;94(5):1411-21.

Chong J, Pierrel MA, Atanassova R, Werck-Reichhart D, Fritig B, Saindrenan P. Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. Plant Physiol. 2001;125:318–28. doi: 10.1104/pp.125.1.318.

Christou C, Agapiou A, Kokkinofta R. Use of FTIR spectroscopy and chemometrics for the classification of carobs origin. J Adv Res. 2017;10:1–8. doi: 10.1016/j.jare.2017.12.001.

Considine M, Gordon C, Croft K, Ching S. Salicylic acid overrides the effect of methyl jasmonate on the total antioxidant capacity of table grapes. Acta Hortic. 2009;841: 495–8. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.841.67

Cozzolino D, Smyth HE, Gishen M. Feasibility study on the use of visible and near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. J Agric Food Chem. 2003 Dec 17;51(26):7703-8. doi: doi.org/10.1021/jf034959s.

Dabur R, Gupta A, Mandal TK, Singh DD, Bajpai V, Gurav AM, Lavekar GS. Antimicrobial activity of some Indian medicinal plants. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2007 Feb; 4(3): 313–8. doi:10.4314/ajtcam.v4i3.31225.

Dave A, Graham IA. Oxylipin signaling: a distinct role for the jasmonic acid precursor cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (cis-OPDA). Front Plant Sci. 2012;3:42.

Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. Arabidopsis Book 9. 2011:e0156. doi: 10.1199/tab.0156.

Diabate S, Franqueville H, Adon B, Coulibaly OA, Ake S. The role of phenolic compounds in the determination of wilt disease tolerance of oil palm (*Elaeis guineensis* JACQ). Afr J Biotechnol. 2009; 8(21): 5679–90.

Ding J, Shi S, Jiang B. Effect of Methyl jasmonate with indole-3- acetic and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2004;40(6):581-5. doi: 10.1079/IVP2004578.

Dixit A, Singh H, Sharma RA, Sharma A. Estimation of antioxidant and antibacterial activity of crude extracts of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. Int J Pharm. 2015 Dec; 7: 55–9.

Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS, Wang L. The phenylpropanoid pathway and plant defence- a genomics perspective. Mol Plant Pathol. 2002 Sep 1;3(5):371-90.

doi: 10.3390/ijms17060767.

Dong J, Wan G, Liang Z. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. J Biotechnol. 2010 Jul 20;148(2-3):99-104. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.05.009.

Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical databases. https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search (Acceso 12 Junio 2018).

Eckardt NA. Oxylipin signaling in plant stress responses. Plant Cell. 2008 Mar; 20(3): 495–7. doi: 10.1105/tpc.108.059485.

Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. J Agric Food Chem. 2010; 58(14):8139-44. doi: 10.1021/jf1005935.

Feng Q, Leong WS, Liu L, Chan WI. Peruvoside, a Cardiac Glycoside, Induces Primitive Myeloid Leukemia Cell Death. Molecules. 2016 Apr 22;21(4):534. doi: 10.3390/molecules21040534.

Frizon CNT, Oliveira GA, Perussello CA, Peralta-Zamora P-G, Camlofski AMO, Rossa UB, Hoffmann-Ribani R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. LWT - Food Science and Technology. 2015;60:795e801. doi: 10.1016/j.lwt.2014.10.030.

Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, Hagège D, Courtois D, Joseph C. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphtodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC). 2013;113(1):25–39. doi: 10.1007/s11240-012-0248-0

Goldhaber-Pasillas GD, Mustafa NR, Verpoorte R. Jasmonic acid effect on the fatty acid and terpenoid indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Molecules. 2014;19:10242–160. doi: 10.3390/molecules190710242.

Gonçalves S, Romano A. Production of Plant Secondary Metabolites by Using Biotechnological Tools, Secondary Metabolites. In: Sources and Applications. Vijayakumar & Raja editors. IntechOpen. 2018. doi: 10.5772/intechopen.76414.

Granato D, Putnik P, Bursać Kovačević D, Sousa Santos J, Calado V, Silva Rocha R, Gomes Da Cruz A, Jarvis B, Ye Rodionova O, Pomerantsev A. Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology, and Effects of Processing. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2018 Mar; 17(3): 663–77. doi: 10.1111/1541-4337.12341.

Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:2389–93. doi: 10.1073/pnas.89.6.2389

Guo Y, Ding X, Ni Y. The combination of NIR spectroscopy and HPLC chromatography for differentiating lotus seed cultivars and quantitative prediction of four main constituents in lotus with the aid of chemometrics. Anal Methods. 2017; 9: 6420–9. doi: 10.1039/C7AY02021J.

Haldar S, Karmakar I, Chakraborty M, Ahmad D, Haldar PK. Antitumor potential of *Thevetia peruviana* on Ehrlich's ascites carcinoma-bearing mice. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2015;34(2):105–13.

Haldar S, Karmakar I, Chakraborty M, Ahmad D, Haldar PK. Antitumor potential of *Thevetia peruviana* on Ehrlich's ascites carcinoma-bearing mice. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2015;34(2):105–13. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2015012017.

Hashimoto A, Nakanishi K, Motonaga Y, Kameoka T. Sugar metabolic analysis of suspensions of plant cells using an FT-IR/ATR method. Biotechnol Prog. 2001 May-Jun;17(3):560-4. doi: 10.1021/bp010013w.

Hashimoto A, Yamanaka A, Kanou M, Nakanishi K, Kameoka T. Simple and rapid determination of metabolite content in plant cell culture medium using an FT-IR/ATR method. Bioprocess Biosyst Eng. 2005 Apr;27(2):115-23. doi: 10.1007/s00449-004-0388-7.

Hassan H, Fan M, Zhang T, Yang K. Prediction of Total Phenolics and Flavonoids Contents in Chinese Wild Rice (*Zizania latifolia*) Using FT-NIR Spectroscopy. Am J Food Tech. 2015;10:109–17. doi: 10.3923/ajft.2015.109.117.

Hassan MM, Saha AK, Khan SA, Islam A, Mahabub-Uz-Zaman M, Ahmed SSU. Studies on the antidiarrhoeal, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanol-extracted leaves of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). Open Vet J. 2011; 1(1): 28–31.

Havko NE, Major IT, Jewell JB, Attaran E, Browse J, Howe GA. Control of carbon assimilation and partitioning by jasmonate: an accounting of growth–fefense tradeoffs. Plants (Basel). 2016 Jan 15;5(1). pii: E7. doi: 10.3390/plants5010007.

He Y, Liu Y, Cao W, Huai M, Xu B, Huang B. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in *Kentucky bluegrass*. Crop Sci. 2005;45:988–95. doi:10.2135/cropsci2003.0678.

Hong J, Yang L, Zhang D, Shi J. Plant Metabolomics: An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. Int J Mol Sci. 2016 Jun 1;17(6). pii: E767. doi: 10.3390/ijms17060767.

Iwamoto R. Infrared and Near-Infrared Study of the Interaction of Amide C═O with Water in Ideally Inert Medium. J Phys Chem A. 2010;114:7398-407. doi: 10.1021/jp102479t.

Jeandet P, Clément C, Courot E, Cordelier S. Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. Int J Mol Sci. 2013 Jul 8;14(7):14136-70. doi: 10.3390/ijms140714136.

Jeandet P, Clément C, Courot E, Cordelier S. Modulation of Phytoalexin Biosynthesis in Engineered Plants for Disease Resistance. Int J Mol Sci. 2013 Jul 8;14(7):14136-70. doi: 10.3390/ijms140714136.

Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. J Med Plants Res. 2009; 3(13):1222–39.

Kaushik V, Azad N, Krishnan A, Iyer V. Antitumor effects of naturally occurring cardiac glycosides convallatoxin and peruvoside on human ER+ and triple-negative breast cancers. Cell Death Discov. 2017; 3: 17009. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.9

Khan MIR, Khan NA. Salicylic Acid and Jasmonates: Approaches in Abiotic Stress Tolerance. J Plant Biochem Physiol. 2013;1:e113. doi:10.4172/2329-9029.1000e113.

Kim HJ, Chen F, Wang X, Choi JH. Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). J Agric Food Chem. 2006 Sep 20;54(19):7263-9. doi: 10.1021/jf060568c.

Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants. Nat Protoc. 2010 Mar;5(3):536-49. doi: 10.1038/nprot.2009.237.

Kim YB, Kim JK, Uddin MR, Xu H, Park WT, Tuan PA, Li X, Chung E, Lee JH, Park SU. Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate. PLoS One. 2013 May 28;8(5):e64199. doi: 10.1371/journal.pone.0064199.

Klessig DF, Malamy J. The salicylic acid signal in plants. Plant Mol Biol. 1994 Dec;26(5):1439-58. doi: 10.1007/978-94-011-0239-1_12.

Kohls S, Scholz-Böttcher BM, Teske J, Zark P, Rullkötter J. Cardiac glycosides from yellow oleander (*Thevetia peruviana*) seed. Phytochemistry. 2012 Mar;75:114-27. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.11.019.

Kohls S, Scholz-Böttcher BM, Teste J, Rullkötter J. Isolation and quantification of six cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana* provide a basis for toxicological survey. Indian J Biochem Biophys Section B. 2015 Dec; 54: 1502–10. doi: 10.1002/chin.201611220

Kraemer K, Schenkel E, Verpoorte R. Glucosylation of ethanol in *Ilex paraguariensis* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 1999; 18: 509–13. doi: 10.1007/s002990050613.

Kramer M. Pharmacology and therapeutic use of cardiac glycoside thevetin. Arztl Wochensch. 1955 Feb 11;10(6):131–6.

Kreis W, Reinhard E. Selective uptake and vacuolar storage of primary cardiac glycosides by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. J Plant Physiol. 1987 Jun; 128: 311–26. doi: 10.1016/S0176-1617(87)80117-7.

Kreis W, Reinhard E. Selective Uptake and Vacuolar Storage of Primary Cardiac Glycosides by Suspension-cultured *Digitalis lanata* Cells. J Plant Physiol. 1987, 128: 311–26.

Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. J Exp Bot. 2005 Jan;56(410):255-65. doi: 10.1093/jxb/eri010.

Krzyzanowska J, Czubacka A, Pecio L, Przybys M, Doroszewska T, Stochmal A, Oleszek W. The effects of jasmonic acid and nethyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha piperita* cell suspension cultures. Plant Cell Tissue Org Cult. 2011;108(1):73-81. doi: 10.1007/s11240-011-0014-8

Kumar GN, Atreya A, Kanchan T. *Thevetia peruviana*. Wilderness Environ Med. 2015;26(4):590–1. doi:10.1016/j.wem.2015.07.007.

Kvesitadze G, Ramsden J, Sadunishvili T, Khatisashvili G. Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants: Basis of phytoremediation. Springer Science & Business Media. 2006;111–9.

Lapcharoensuk R, Nakawajana N. Identification of Syrup Type using Fourier transform-Near Infrared Spectroscopy with Multivariate Classification Methods. J Innov Opt Health Sci. 2018;11(2):1750019. doi: 10.1142/S1793545817500195.

Lapcharoensuk R, Nakawajana N. Identification of Syrup Type using Fourier transform-Near Infrared Spectroscopy with Multivariate Classification Methods. J Innov Opt Health Sci. 2018;11(2):1750019. doi: 10.1142/S1793545817500195.

Le Roy J, Huss B, Creach A, Hawkins S, Neutelings G. Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. Front Plant Sci. 2016 May 26;7:735. doi: 10.3389/fpls.2016.00735

Li J, Zhang J, Zhao YL, Huang HY, Wang YZ. Comprehensive Quality Assessment Based Specific Chemical Profiles for Geographic and Tissue Variation in *Gentiana rigescens* Using HPLC and FTIR Method Combined with Principal Component Analysis. Front Chem. 2017 Dec 22;5:125. doi: 10.3389/fchem.2017.00125.

Li W, Qu H. Rapid quantification of phenolic acids in *Radix Salvia Miltrorrhiza* extract solutions by FT-NIR spectroscopy in transflective mode. J Pharm Biomed Anal. 2010 Aug 1;52(4):425-31. doi: 10.1016/j.jpba.2010.01.009.

Liang YS, Choi YH, Kim HK, Linthorst HJ, Verpoorte R. Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. Phytochemistry. 2006a Nov;67(22):2503-11. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.08.018.

Liang YS, Kim HK, Lefeber AW, Erkelens C, Choi YH, Verpoorte R. Identification of phenylpropanoids in methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. J Chromatogr A. 2006b Apr 21;1112(1-2):148-55. doi: 10.1016/j.chroma.2005.11.114.

Liu Z, Wang D, Li D, Zhang S. Quality Evaluation of *Juniperus rigida* Sieb. et Zucc. Based on Phenolic Profiles, Bioactivity, and HPLC Fingerprint Combined with Chemometrics. Front Pharmacol. 2017 Apr 19;8:198. doi: 10.3389/fphar.2017.00198.

Lu B, Chen J, Huang W, Wu D, Xu W, Xie Q, Yu X, Li L, Determination of flavonoids and phenolic acids in the extract of bamboo leaves using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. Afr J Biotechnol. 2011;10(42):8448-55. doi: 10.5897/AJB11.320.

Manivannan A, Soundararajan P, Park YG, Jeong BR. Chemical Elicitor-Induced Modulation of Antioxidant Metabolism and Enhancement of Secondary Metabolite Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. Int J Mol Sci. 2016 Mar 18;17(3):399. doi: 10.3390/ijms17030399.

Manoj G, Shakti M, Arun K. Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. Appl Biochem Biotechnol. 2011 Nov;165(5-6):1342-55. doi: 10.1007/s12010-011-9351-7.

Martínez G, Regente M, Jacobi S, Del Rio M, Pinedo M, de la Canal L. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. Pest Biochem Physiol. 2017;140:30–5. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.05.012.

Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Abreu OA, Molina E, Yordi EG. Coumarins—An important class of phytochemicals. In: Rao AV & Rao LG, editor. Phytochemicals-Isolation, Characterisation and Role in Human Health. InTech: Rijeka, Croatia. 2015;113–140. doi: 10.5772/59982.

Mendoza D, Cuaspud O, Arias JP, Ruiz O, Arias M. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Biotechnol Rep (Amst). 2018 Jul 3;19:e00273. doi: 10.1016/j.btre.2018.e00273.

Miyanaga K, Seki M, Furusaki S. Quantitative determination of cultured strawberry-cell heterogeneity by image analysis: effects of médium modification on anthocyanin accumulation. Biochem Eng J. 2000 Jul 1;5(3):201–207. doi: 10.1016/S1369-703X(00)00059-0.

Moreira I, Scarminio IS. Chemometric discrimination of genetically modified Coffea arabica cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. Talanta. 2013 Mar 30;107:416-22. doi: 10.1016/j.talanta.2013.01.053.

Moura JC1, Bonine CA, de Oliveira Fernandes Viana J, Dornelas MC, Mazzafera P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. J Integr Plant Biol. 2010 Apr;52(4):360-76. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x.

Muljono RAB, Scheffer JJC, Verpoorte R. Effect of Feeding Salicylic Acid on 2,3-dihydroxybenzoic acid formation in cultured cells of *Catharanthus roseus*. Pharm Biol. 2003;41:284–90. doi: 10.1076/phbi.41.4.284.15681

Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiol. 2006 Jan; 140(1): 249–62. doi: 10.1104/pp.105.072348.

Mustafa NR, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic changes of salicylic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures monitored by NMR-based metabolomics. Biotechnol Lett. 2009 Dec; 31(12): 1967–74. doi: 10.1007/s10529-009-0107-1

Namdeo A. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharmacognosy Reviews 2007;1:69–79.

Ncho XE, Doumbia ML, Traore S, Konan YKF, Kone M, Kouakou TH. Estimation of total phenolic compounds in treated leaves with methyl jasmonate and salicylic acid of banana

(*Musa acuminata* L. AAA group cv. Grand Naine) susceptible to the black leaf streak disease. Agric Sci Res J. 2016;6:175–181.

Ncube B, Finnie JF, Van Staden J. Quality from the field: the impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. S Afr J Bot. 2012;82:11–20. doi: 10.1016/j.sajb.2012.05.009

Niki T, Mitsuhara I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leave. Plant Cell Physiol. 1998 May;39(5):500–7. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029397.

Noir S, Bömer M, Takahashi N, Ishida T, Tsui TL, Balbi V, Shanahan H, Sugimoto K, Devoto A. Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. Plant Physiol. 2013 Apr;161(4):1930-51. doi: 10.1104/pp.113.214908

Ochoa-Villarreal M, Howat S, Hong S, Jang MO, Jin YW, Lee EK, Loake GJ. Plant cell culture strategies for the production of natural products. BMB Rep. 2016 Mar 31; 49(3): 149–158. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.3.264.

Oi N, Chen H, Ok Kim M, Lubet RA, Bode AM, Dong Z. Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3-K. Cancer Prev Res (Phila). 2012 Sep;5(9):1103-14. doi: 10.1158/1940–6207.

Pan Q, Zhao J, Wang Y, Tang K. Progress in NMR-based metabolomics of *Catharanthus roseus*. Front Agr Sci Eng. 2015;2(3):195-204. doi: 10.15302/J-FASE-2015063.

Patil RA, Lenka SK, Normanly J, Walker EL, Roberts SC. Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *Taxus* cells. Plant Cell Rep. 2014 Sep;33(9):1479-92. doi: 10.1007/s00299-014-1632-5.

Pavarini D, Pavarini S, Niehues M, Lopes N. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. Animal Feed Sciences and Technology. 2012;176(1):5-16. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002

Payyavula RS, Babst BA, Nelsen MP, Harding SA, Tsai CJ. Glycosylation-mediated phenylpropanoid partitioning in *Populus tremuloides* cell cultures. BMC Plant Biol. 2009 Dec 29;9:151. doi: 10.1186/1471-2229-9-151.

Pekal A, Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. Food Anal Methods. 2014;7(9):1776–82. doi: 10.1007/s12161-014-9814-x.

Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC. Hormonal modulation of plant immunity. Annu Rev Cell Dev Biol. 2012;28:489-521. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.

Rahman N, Mahmood R, Rahman H, Haris M. Systematic screening for phytochemicals of various solvent extracts of *Thevetia peruviana* Schum. Leaves and fruit rind. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014; 6 (8): 173-9.

Rahman N, Rahman H, Haris M, Mahmood R. Wound healing potentials of *Thevetia peruviana*: Antioxidants and inflammatory markers criteria. J Tradit Complement Med. 2017 Feb 14;7(4):519-525. doi: 10.1016/j.jtcme.2017.01.005.

Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances. 2002; 20(2): 101–53. doi: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.

Ramakrishna A, Ravishankar G. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signal Behav. 2011 Nov;6(11):1720-31. doi: 10.4161/psb.6.11.17613.

Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó RM, Javier Palazon J. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. Molecules. 2016 Feb; 21(2): 182. doi: 10.3390/molecules21020182.

Ramos-Silva A, Tavares-Carreón F, Figueroa M, De la Torre-Zavala S, Gastelum Arellanez A, Rodríguez-García A, Galán-Wong LJ, Avilés-Arnaut H. Anticancer potential of *Thevetia peruviana* fruit methanolic extract. BMC Complement Altern Med. 2017;2: 241. doi: 10.1186/s12906-017-1727-y.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applyingan improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999 May;26(9-10):1231-7. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

Rejeb IB, Pastor V, Mauch-Mani B. Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. Plants (Basel). 2014 Oct 15;3(4):458-75. doi: 10.3390/plants3040458.

Repka V, Fischerová I, Šilhárová K. Methyl jasmonate is a potent elicitor of múltiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. Biologia Plantarum 48, 273–283. doi: 10.1023/B:BIOP.0000033456.27521.e5

Reymond P, Farmer EE. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. Curr Opin Plant Biol. 1998 Oct;1(5):404-11. doi: 10.1016/S1369-5266(98)80264-1.

Rincón-Pérez J, Rodríguez-Hernández L, Ruíz-Valdiviezo VM, Abud-Archila M, Luján-Hidalgo MC, Ruiz-Lau N, González-Mendoza D, Gutiérrez-Miceli FA. Fatty acids profile, phenolic compounds and antioxidant capacity in elicited callus of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. J Oleo Sci. 2016;65(4):311-8. doi: 10.5650/jos.ess15254.

Rinnan A, van den Berg F, Engelsen S. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. TrAC Trends Anal Chem. 2009;28(10): 1201-22. doi: 10.1016/j.trac.2009.07.007.

Saeed S, Ali H, Khan T, Kayani W, Khan MA. Impacts of methyl jasmonate and phenyl acetic acid on biomass accumulation and antioxidant potential in adventitious roots of *Ajuga bracteosa* Wall ex Benth, a high valued endangered medicinal plant. Physiol Mol Biol Plants. 2017 Jan;23(1):229-237. doi: 10.1007/s12298-016-0406-7

Sajca L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochem Eng J. 2000;4(2):89–99. doi: 10.1016/S1369-703X(99)00035-2.

Sajca L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochem Eng J. 2000;4(2):89–99. doi: 10.1016/S1369-703X(99)00035-2

Sakushima A, Nishibe S. Taxifolin 3-arabinoside from *Trachelospermum jasminoides* var. Pubescens. Phytochemistry. 1988; 27(3): 948-50. doi: 10.1016/0031-9422(88)84132-3.

Sanabria, A. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositeae. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1983.

Sánchez-Sampedro A1, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R, Corchete P. Metabolomic alterations in elicitor treated *Silybum marianum* suspension cultures monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy. J Biotechnol. 2007 Jun 15;130(2):133-42. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.03.007

Schenk RV, Hildebrandt AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot. 1972; 50(1):199-204. doi: 10.1139/b72-026.

Schenk RV, Hildebrandt AC. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. Can J Bot. 1972; 50:199-204.

Schmeda-Hirschmann G1, Jordan M, Gerth A, Wilken D. Secondary metabolite content in rhizomes, callus cultures and *in vitro* regenerated plantlets of *Solidago chilensis*. Z Naturforsch C. 2005 Jan-Feb;60(1-2):5-10.

Sheu MJ, Chou PY, Cheng HC, Wu CH, Huang GJ, Wang BS, Chen JS, Chien YC, Huang MH. Analgesic and anti-inflammatory activities of a water extract of *Trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae). J Ethnopharmacol. 2009 Nov 12;126(2):332-8. doi: 10.1016/j.jep.2009.08.019

Shilpa K, Varum K, Lakshmi B. An alternative methods of natural drugs production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. Journal of Plant Sciences. 2010;5(3):222-247.

Shimoda K, Yamanea S, Hirakawa H, Ohta S, Hirata T. Biotransformation of phenolic compounds by the cultured cells of *Catharanthus roseus*. J Mol Catal B Enzym. 2002 Feb;16: 275–81. doi: 10.1016/S1381-1177(01)00073-X.

Siciliano I, Amaral Carneiro G, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. Jasmonic acid, Abscisic acid, and Salicylic acid are involved in the phytoalexin responses of rice to *Fusarium fujikuroi*, a high gibberellin producer pathogen. J Agric Food Chem. 2015 Sep 23;63(37):8134-42. doi: 10.1021/acs.jafc.5b03018.

Siebert KJ. Chemometrics in Brewing — A Review. J Am Soc Brew Chem. 2001; 59(4): 147–56. doi: 10.1094/ASBCJ-59-0147.

Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am J Enol Vitic. 1977; 28: 49–55.

Smith-Moritz AM, Chern M, Lao J, Sze-To WH, Heazlewood JL, Ronald PC, Vega-Sánchez ME. Combining multivariate analysis and monosaccharide composition modeling to identify plant cell wall variations by Fourier Transform Near Infrared spectroscopy. Plant Methods. 2011 Aug 18;7:26. doi: 10.1186/1746-4811-7-26.

Sudha G, Ravishankar G. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. Plant Cell Tiss Org. 2002;71(3):181-212. doi: 10.1023/A:1020336626361.

Sudha G, Ravishankar GA. Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and the involvement of methyl jasmonate and salicylic acid. Acta Physiol Plant. 2003 sep;25(3):249–56. doi: 10.1007/s11738-003-0005-4.

Sukito A, Tachibana S. Effect of methyl jasmonate and salycilic acid synergism on enhancement of bilobalide and ginkgolide production by immobilized cell cultures of *Ginkgo biloba*. Bioresour Bioprocess. 2016;3:24. doi: 10.1186/s40643-016-0101-0

Sun YJ, He JM, Kong JQ. Characterization of two flavonol synthases with iron-independent flavanone 3-hydroxylase activity from *Ornithogalum caudatum* Jacq. BMC Plant Biol. 2019 May 14;19(1):195. doi: 10.1186/s12870-019-1787-x.

Suzuki H, Reddy MS, Naoumkina M, Aziz N, May GD, Huhman DV, Sumner LW, Blount JW, Mendes P, Dixon RA. Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. Planta. 2005 Mar;220(5):696-707. doi: 10.1007/s00425-004-1387-2.

Tabata M, Umetani Y, Ooya M, Tanaka S. Glucosylation of phenolic compounds by plant cell cultures. Phytochemistry. 1988; 27(3): 809813. doi: 10.1016/0031-9422(88)84097-4.

Tewtrakul S, Nakamura N, Hattori M, Fujiwara T, Supavita T. Flavanone and flavonol glycosides from the leaves of *Thevetia peruviana* and their HIV-1 reverse transcriptase

and HIV-1 integrase inhibitory activities. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2002; 50: 630–5. doi: 10.1248/cpb.50.630.

Tian D, Cheng H, Jiang M, Shen W, Tang J, Yao X. Cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana*. J Nat Prod. 2016 Jan 22;79(1):38-50. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00611.

Tiukavkina NA, Rulenko IA, Kolesnik IuA. Dihydroquercetina new antioxidant and biologically active food additive. Vopr Pitan. 1997; (6):125.

Tofighi Z, Ghazi Saeidi N, Hadjiakhoondi A, Yassa N. Determination of cardiac glycosides and total phenols in different generations of *Securigera securidaca* suspension culture. Research Journal of Pharmacognosy (RJP). 2016; 3(2): 25-31.

Tu X, Ma S, Gao Z, Wang J, Huang S, Chen W. One-Step Extraction and Hydrolysis of Flavonoid Glycosides in Rape Bee Pollen Based on Soxhlet-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion. Phytochem Anal. 2017 Nov;28(6):505-511. doi: 10.1002/pca.2699.

Umetani Y, Kodakari E, Yamamura T, Tanaka S, Tabata M. Glucosylation of salicylic acid by cell suspension cultures of *Mallotus japonicas*. Plant Cell Rep. 1990 Oct;9(6):325-7. doi: 10.1007/BF00232861.

Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of multienzyme pathways in plants and microbes. Biotechnol J. 2007 Oct;2(10):1235-49. doi: 10.1002/biot.200700184.

Villegas-Quiceño AP, Arias-Echeverri JP, Aragón-Mena D, Ochoa-Cáceres S, Arias-Zabala ME. Multi-objective optimization in biotechnological processes: application to plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Revista Facultad de Ingeniería-Universidad de Antioquía. 2018; 87: 35–40.

Voigtländer HW, Balsam G. Apigenin 5-methylether a new flavone from *Thevetia peruviana*. Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges. 1970 Oct;303(10):782-7.

Vuong TV, Franco C, Zhang W. Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Biotecnol Rep. 2014;1–2:15–21. doi: 10.1016/j.btre.2014.04.002

Waldi D. Spray Reagents for Thin-Layer Chromatography. In: Stahl E, editor. Thin-Layer Chromatography. Springer, Berlin, Heidelberg. 1965; 483–502. doi: 10.1007/978-3-662-01031-0_23

Wang J, Qian J, Yao L, Lu Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. Bioresour Bioprocess. 2015; 2:5. doi: 10.1186/s40643-014-0033-5

Weathers P, Towler M, Xu, J. Bench to barch: Advances in plant cell culture for producing useful products. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Feb;85(5):1339-51. doi: 10.1007/s00253-009-2354-4.

Weidmann AE. Dihydroquercetin: More than just an impurity? Eur J Pharmacol. 2012 Jun 5;684(1-3):19-26. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.03.035

Whitaker RJ, Hobbib GC, Leslie A, Steward LA. Chapter 26. Production of secondary metabolites in plant cell cultures. In: Biogeneration of Aromas. Parliament TH & Croteau R, editors. Washington, DC. 1986:347–62. doi: 10.1021/bk-1986-0317.ch026.

Widhalm JR, Dudareva N. A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. Mol Plant. 2015 Jan;8(1):83-97. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.001.

Wolska KI, Grudniak AM, Fiecek B, Kraczkiewicz-Dowjat A, Kurek A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. Cent Eur J Biol. 2010; 5(5): 543–53. doi: 10.2478/s11535-010-0045-x

Worley B, Powers R. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. Curr Metabolomics. 2016; 4(2): 97–103. doi: 10.2174/2213235X04666160613122429.

Zareef M, Chen Q, Ouyang Q, Felix YH. Kutsanedzie FYH, Md. Mehedi Hassan M, Viswadevarayalua A, Wanga A. Prediction of amino acids, caffeine, theaflavins and water extract in black tea using FT-NIR spectroscopy coupled chemometrics algorithms. Anal Methods. 2018;10: 3023–31.

Zarzycki PK. 2015. Chapter 8 - Staining and Derivatization Techniques for Visualization in Planar Chromatography. In: Poole CF, editor. Instrumental Thin-Layer Chromatography. Boston: Elsevier. 2015;191–237. doi: 10.1016/B978-0-12-417223-4.00008-X.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal traduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv. 2005 Jun;23(4):283-333. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.01.003.

Zhong J, Xu YN, Tan G, Bai L. Signal transduction engineering: a powerful platform technology for enhancing secondary metabolite production. New Biothechnology. 2014;31:S23-S24.