



**Establecimiento de suspensiones celulares y análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Origanum majorana* Linneo. cultivadas *in vitro*, para la determinación de la presencia de metabolitos secundarios**

Caiza Cuasquer Sasha Daniela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz, Ph.D.

11 de marzo de 2024

# Resultado de análisis de Copyleaks



Plagiarism and AI Content Detection Report

Caiza\_Sasha\_Tesis\_Plagio.docx

## Scan details

Scan time:	Total Pages:	Total Words:
March 4th, 2024 at 19:46 UTC	25	6191

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
● Identical	0.2%	10
● Minor Changes	0%	0
● Paraphrased	1.3%	80
● Omitted Words	4.4%	275

### AI Content Detection



Text coverage		Words
● AI text	2.6%	140
● Human text	97.4%	5776

[Learn more](#)

## 🔍 Plagiarism Results: (2)

📄 **Copyleaks Internal Database** **1.4%**

CAMILA ANAHI NARANJO LUZURIAGA  
 No introduction available.

📄 **Copyleaks Internal Database** **0.8%**

cultivadas in vitro, para determinar la presencia de metabolitos secundarios.



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura  
Carrera de Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Establecimiento de suspensiones celulares y análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Origanum majorana* Linneo. cultivadas *in vitro*, para la determinación de la presencia de metabolitos secundarios**” fue realizado por la señorita **Caiza Cuasquer Sasha Daniela**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 05 de marzo del 2024**

**Jadán Guerrero Mónica Beatriz Ph. D.**

C. C 1802278562



Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura  
Carrera de Biotecnología

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Caiza Cuasquer Sasha Daniela**, con cédula de ciudadanía n° 1727137612, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Establecimiento de suspensiones celulares y análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Origanum majorana* Linneo. cultivadas *in vitro*, para la determinación de la presencia de metabolitos secundarios** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 11 de marzo de 2024

**Caiza Cuasquer Sasha Daniela**  
C.C.: 1727137612



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Caiza Cuasquer Sasha Daniela**, con cédula de ciudadanía n° 1727137612, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Establecimiento de suspensiones celulares y análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Origanum majorana* Linneo. cultivadas *in vitro*, para la determinación de la presencia de metabolitos secundarios** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 11 de marzo de 2024**

**Caiza Cuasquer Sasha Daniela**

C.C.: 1727137612

## Dedicatoria

A mi madre, por su amor y su apoyo incondicional durante todo mi proceso de formación  
profesional

A mi padre, por el valor y el impulso a ser mejor cada día en cada aspecto de mi vida

A mi hermana, por ser mi motivación y mi mejor amiga en los días buenos y en los no tan  
buenos

A mi ángel en el cielo, mi abuelito, por su fortaleza y por sus consejos para lograr lo que me  
proponga

A mi familia y amigos, por su cariño y apoyo en cada momento que lo necesite

A Javier, por su amor, paciencia y apoyo incondicional

A Romeo, mi compañero de vida, por su compañía y apoyo emocional.

*Sasha Daniela Caiza Cuasquer*

## **Agradecimientos**

En primer lugar, le agradezco a Dios y a la Virgen María por escuchar mis oraciones dándome la fortaleza para esforzarme y permitirme lograr mis objetivos.

Agradezco a mis padres, por ser quienes me han permitido seguir mis sueños y me han motivado a conseguirlos brindándome su apoyo y amor incondicional.

A mi hermana, por ayudarme y motivarme cuando las cosas se tornaban complicadas, gracias por estar conmigo cuando más te he necesitado.

A mis amigos, Gaby, Xavi y Pao porque hicieron de esta experiencia un proceso más alegre donde me quedo con su amistad y las risas que jamás faltaron.

A mi compañera tesis y amiga Leslie, por las risas, las inquietudes, la información compartida y su motivación para lograr nuestro objetivo.

A los pasantes e Ingenieros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por su colaboración y opinión cuando lo necesite.

A la Mgtr. Andrea Ortega por creer en mi desde el principio, por su amistad y su apoyo en todo el proceso de elaboración de mi proyecto

A mi tutora Mónica Jadán Ph.D., por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente, por sus consejos y por compartir sus conocimientos para lograr un trabajo exitoso.

*Sasha Daniela Caiza Cuasquer*

## Índice

Resultado de análisis de Copyleaks .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría .....	4
Autorización de publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Resumen .....	13
Abstract .....	14
Capítulo I: Introducción .....	15
Planteamiento del problema .....	15
Justificación del problema .....	15
Objetivos .....	17
Objetivo General .....	17
Objetivos Específicos .....	17
Hipótesis .....	17
Capitulo II: Marco Teórico .....	18
Mejorana dulce ( <i>Origanum majorana</i> Linneo) .....	18
Origen y distribución .....	18

Descripción botánica .....	18
Taxonomía.....	19
Uso y propiedades.....	19
Propiedades antioxidantes.....	21
Establecimiento <i>in vitro</i> .....	21
Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales .....	22
Medios de cultivo.....	22
Callogénesis .....	23
Suspensiones celulares .....	23
Reguladores de crecimiento .....	24
Auxinas.....	24
Ácido 2,4- diclorofenoxiacético .....	25
Citoquininas.....	25
6-Bencilaminopurina (BAP).....	25
Recuento celular .....	25
Cámara Neubauer.....	25
Determinación de metabolitos secundarios.....	26
Técnicas electroquímicas .....	27
Capítulo III: Metodología.....	28
Fase de campo.....	28
Recolección del Material Vegetal.....	28

	10
Fase de Laboratorio .....	28
Selección del Material Vegetal .....	28
Desinfección .....	29
Inducción a Callogénesis .....	30
Establecimiento de Suspensiones Celulares.....	30
Conteo celular .....	31
Análisis de datos .....	32
Análisis físico-químico.....	33
Capítulo IV: Resultados .....	34
Desinfección .....	34
Inducción a Callogénesis .....	34
Establecimiento de suspensiones celulares.....	35
Recuento celular .....	35
Análisis de los tratamientos .....	38
Índice electroquímico (EI) .....	42
Capítulo V: Discusión .....	45
Establecimiento de Suspensiones Celulares .....	45
Conclusiones.....	49
Recomendaciones .....	50
Referencias.....	51

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> Taxonomía de <i>Origanum majorana</i> Linneo.....	19
<b>Tabla 2</b> <i>Medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D y 6-BAP para el establecimiento de suspensiones celulares a partir de células madre de majorana.....</i>	31
<b>Tabla 3</b> <i>Datos del recuento celular de los tres tratamientos con distintas concentraciones y el tratamiento control.....</i>	37
<b>Tabla 4</b> <i>Análisis de varianza para el conteo celular utilizando (ANOVA) .....</i>	38
<b>Tabla 5</b> <i>Test: Ducean Alfa= 0.05 .....</i>	39
<b>Tabla 6</b> <i>p-valor como resultado de la aplicación de la prueba de hipótesis Shapiro Wilks (modificado) .....</i>	41
<b>Tabla 7</b> <i>p-valor obtenido de la prueba de hipótesis de Levene .....</i>	42
<b>Tabla 8</b> <i>Propiedades antioxidantes de las muestras usando índice electroquímico (EI). .....</i>	44

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Planta de <i>Origanum majorana</i> Linneo. ....	18
<b>Figura 2</b> <i>Compuestos bioactivos presentes en mejorana (Origanum majorana Linneo.)</i> . ....	20
<b>Figura 3</b> <i>Cuadrantes de conteo de la cámara de Neubauer</i> . ....	26
<b>Figura 4</b> <i>Planta de “majorana” (Origanum majorana Linneo.) obtenidas en la provincia de Pichincha</i> . ....	28
<b>Figura 5</b> <i>Hojas de mejorana jóvenes de aproximadamente 1 cm</i> .....	29
<b>Figura 6</b> <i>a) Técnica de conteo Zig-Zag b) Límites para el conteo celular</i> .....	32
<b>Figura 7</b> <i>Inducción a callogénesis en medio MS suplementado con 2,4-D y 6-BAP</i> .....	34
<b>Figura 8</b> <i>Establecimiento de suspensiones celulares de mejorana (Origanum majorana Linneo.)</i> .....	35
<b>Figura 9</b> <i>Recuento celular utilizando la cámara de Neubauer</i> .....	36
<b>Figura 10</b> <i>Concentración de células en cada uno de los tratamientos</i> .....	38
<b>Figura 11</b> <i>Diagrama de cajas para identificar la diferencia significativa entre los tratamientos respecto a la concentración celular</i> .....	40
<b>Figura 12</b> <i>Pruebas de normalidad del Recuento celular de Origanum majorana Linneo. Para el establecimiento de la suspensión celular</i> .....	41
<b>Figura 13</b> <i>Diagrama de dispersión para corroborar la igualdad de varianza</i> .....	42
<b>Figura 14</b> <i>Voltamperogramas de pulso diferencial de extractos metanólicos de SC1 (Callo)</i> ..	43
<b>Figura 15</b> <i>Voltamperogramas de pulso diferencial de extractos metanólicos de suspensiones celulares</i> .....	43

## Resumen

*Origanum majorana* Linneo. comúnmente denominada “mejorana” es una especie vegetal distribuida a lo largo del continente asiático, africano, europeo y americano donde su uso tradicional dentro de la gastronomía y la medicina despertaron el interés en distintos campos industriales. Sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, gastrointestinales, y de regulación hormonal la han hecho llamativa para la comunidad científica, buscando los principios activos que le confieren las propiedades que posee. Existen múltiples publicaciones acerca de la importancia de los principios activos que se encuentran presentes en esta especie; sin embargo, no se encuentran publicaciones de la aplicación de la técnica de suspensiones celulares in vitro para obtener metabolitos secundarios. Por lo que el objetivo de este trabajo es establecer un medio que permita maximizar el crecimiento celular de la especie cultivada en forma de callo en un medio líquido con sales Murashige & Skoog (MS), sacarosa comercial y suplementado con una combinación de fitohormonas de 2,4-D y 6-BAP. Se estableció que el medio que maximiza la concentración celular se basa en sales MS (completo), 30 g de azúcar y la combinación de 0.2 de 2,4-D y 0.5 6-BAP mediante el recuento celular y el nivel de turbidez del tratamiento. Por otro lado, se demostró que en muestras de callo y suspensión celular se encontraban presentes compuestos bioactivos comprobándolo bajo la técnica de voltametría diferencial de pulso que mostró un mayor valor de índice electroquímico en callo (SC1) con respecto a las muestras de suspensiones (SC2) y (SC3).

*Palabras clave:* mejorana, metabolitos secundarios, antioxidantes

## Abstract

*Origanum majorana* Linnaeus. combined called “majorana” is a plant species distributed throughout the Asian, African, European and American continents where its traditional use in gastronomy and medicine aroused interest in different industrial fields. Its antioxidant, antimicrobial, gastrointestinal and hormonal regulation properties have made it attractive to the scientific community, searching for the active ingredients that give it the properties it has. There are multiple publications about the importance of the active principles that are present in this species; However, there are no publications on the application of the in vitro cell suspension technique to obtain secondary metabolites. Therefore, the objective of this work is to establish a medium that allows maximizing cell growth of the species cultivated in the form of callus in a liquid medium with Murashige & Skoog (MS) salts, commercial sucrose and supplemented with a combination of phytohormones of 2,4-D and 6-BAP. It was developed that the medium that maximizes the cell concentration is based on MS salts (complete), 30 g of sugar and the combination of 0.2 of 2,4-D and 0.5 6-BAP by cell count and turbidity level of the treatment . . On the other hand, it was demonstrated that bioactive compounds were present in callus and cell suspension samples, checking them under the differential pulse voltammetry technique that showed a higher value of electrochemical index in callus (SC1) with respect to the suspension samples (SC2) and (SC3).

*Keywords:* marjoram, secondary metabolites, antioxidants.

## Capítulo I: Introducción

### Planteamiento del problema

En las últimas décadas se han desarrollado diversas técnicas que permiten el estudio de plantas a nivel celular y molecular permitiendo abrir una importante brecha a poderosos avances entre estos; la generación de variabilidad genética, selección de características de interés, identificación de funciones y redes regulatorias (Levitus *et al.*, 2010).

*Origanum majorana* Linneo., es una especie vegetal herbácea perenne aromática, tiene su origen en Turquía y Chipre; sin embargo, hoy en día se encuentra distribuida en varias zonas del Ecuador donde se presenta un clima soleado y seco. En sus hojas, tallos y flores posee aceites esenciales y polifenoles ampliamente utilizados en la gastronomía y medicina natural (Jiang *et al.*, 2011).

Los componentes químicos que se encuentran presentes en *Origanum majorana* Linneo., comprenden principalmente aceites esenciales, entre otros elementos como polifenoles, flavonoides, esteroides, triterpenos, alcaloides, cumarinas, taninos y saponinas (Della *et al.*, 2019). Esta especie presenta una potente actividad antioxidante, que se le atribuye principalmente a su elevado contenido de ácidos fenólicos y flavonoides, convirtiéndola en una opción valiosa de suplementos para la salud y en la preservación de alimentos (Vagi *et al.*, 2005).

### Justificación del problema

Las plantas de gran importancia dentro de la agricultura y el comercio moderno van más allá de los cultivos tradicionales de alimentos, forrajes y fibras (Sangwan *et al.*, 2001). Las problemáticas actuales en diversas industrias incluyendo la farmacéutica, alimentaria, textil,

química orgánica y en las áreas de cosméticos y perfumes han provocado una búsqueda cada vez más amplia de nuevos productos y combinaciones de sustancias químicas (Roa y Portilla, 2003).

El desarrollo de distintas estrategias de protección en plantas superiores evolucionadas contra situaciones de estrés biótico y abiótico se evidencia en la activación de la producción y acumulación de compuestos de bajo peso molecular denominados comúnmente como metabolitos secundarios (Sepúlveda *et al.*, 2003). Estos compuestos son esenciales en respuesta al estrés ambiental y la defensa contra posibles depredadores y patógenos, es decir organismos que causan distintas enfermedades (Lustre Sanchez, 2022).

Durante mucho tiempo los metabolitos secundarios de gran interés se han obtenido de plantas silvestres o cultivadas; sin embargo con el tiempo se ha evidenciado que no es un proceso viable económicamente, por este motivo en la actualidad se han implementado estrategias económicas y sustentables que permitan obtener estos compuestos bioactivos (Marchev *et al.*, 2020). El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica eficiente y rápida que destaca en relación a la propagación convencional con respecto a la multiplicación masiva de las especies (Pérez *et al.*, 2018).

Una de las alternativas para implementar nuevos e innovadores procesos biotecnológicos sustentables que cumplan con las demandas actuales es el desarrollo de cultivos de tejidos y órganos vegetales *in vitro* en condiciones controladas (Marchev *et al.*, 2020). De esta manera se destacan distintos beneficios respecto a las técnicas convencionales como: la capacidad de producir de manera constante y reproducible los productos naturales de interés (Alvarez Acuña & Pozo Cruz, 2021).

## Objetivos

### Objetivo General

Establecer suspensiones celulares y realizar análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Origanum majorana* Linneo. cultivadas *in vitro*, para determinar la presencia de metabolitos secundarios.

### Objetivos Específicos

- Establecer un medio de cultivo para la producción de suspensiones celulares a partir de las células madre de “majorana” *Origanum majorana* Linneo. cultivadas *in vitro*.
- Analizar el crecimiento celular de las suspensiones mediante el conteo celular con la cámara de Neubauer.
- Realizar el análisis físico-químico de callo y la suspensión celular de *Origanum majorana* Linneo. para determinar la presencia de metabolitos secundarios.

### Hipótesis

El análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Origanum majorana* Linneo. determina la presencia de metabolitos secundarios

## Capítulo II: Marco Teórico

### Mejorana dulce (*Origanum majorana* Linneo)

#### Origen y distribución

*Origanum majorana* Linneo., es una hierba considerada medicinal de la familia Lamiaceae o labiadas que pertenece al género *Origanum* y conocida en la medicina tradicional como Shakhtar o Zaatar (Prerna & Vasudeva, 2015). Esta especie es autóctona de la región mediterránea y cultivada en varios países de Asia, África, Europa y América (Ietswaart, 1980).

#### Figura 1

Planta de *Origanum majorana* Linneo.



#### Descripción botánica

La mejorana es una planta herbácea perenne, que puede llegar a tener una altura entre 30 a 60 cm, uno de sus atributos más destacables es su olor característico en todas sus partes. Presenta tallos peludos con apariencia arbustiva, con pequeñas hojas de un tamaño aproximado de 5 a 25 mm de largo y 7 mm de ancho ovales y pecioladas de tonalidad verde blanquecino y brácteas agrupadas que rodean a las flores diminutas en forma de ramilletes en el eje principal (AGEXPORT, 2021).

## Taxonomía

El género *Origanum* es complejo por la importante variación genética que se presenta entre las especies, esto se le atribuye principalmente a la diversidad morfológica entre las plantas y la hibridación natural. Este género contiene numerosas especies, subespecies, variedades e híbridos, por otro lado, presentan numerosos nombres sinónimos lo que imposibilita su identificación particular (Jedrzejczyk, 2018).

**Tabla 1**

Taxonomía de *Origanum majorana* Linneo.

<b>Taxonomía</b>	
<b>Reino</b>	Plantas
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Lamiaceae
<b>Genero</b>	<i>Origanum</i>
<b>Especie</b>	<i>Origanum majorana</i> Linneo.

## Uso y propiedades

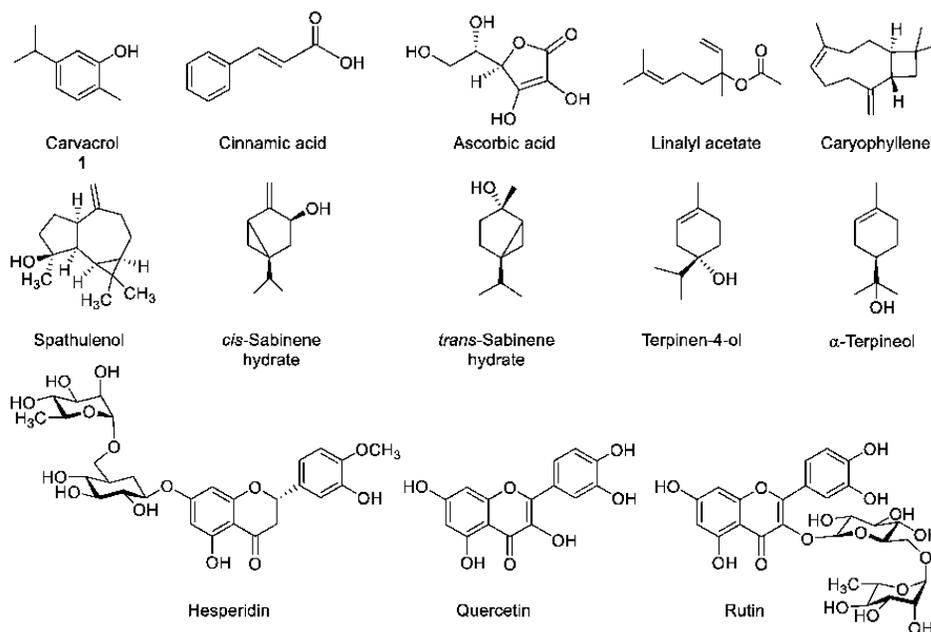
Los aceites y polifenoles presentes en las hojas, tallos y flores de la mejorana (*Origanum majorana* Linneo.) la popularizaron en la Edad Media como una especie medicinal y condimento dentro de la cocina (Jiang, 2011). Su utilidad como aditivo alimentario tiene lugar por los polifenoles presentes en la planta que exhiben fuertes propiedades antioxidantes, cuida de los niveles hormonales de las mujeres (Wang *et al.*, 2021). Por otro lado, la capacidad

antioxidante que posee esta especie ha sido considerada útil para salud humana debido a que protege el cuerpo de radicales libres y el avance de diferentes enfermedades crónicas, especialmente su elevado contenido de ácidos fenólicos y flavonoides (Vagi *et al.*, 2005; Serafini *et al.*, 2018).

La composición química de la especie puede variar según el origen de cada planta, hasta el momento se han descrito varios componentes bioactivos como carvacrol, ácido cinámico, ácido ascórbico, acetato de linalilo, cariofileno, espatulanol, entre otros (Cala *et al.*, 2021) (Figura 2).

## Figura 2

*Compuestos bioactivos presentes en mejorana (Origanum majorana Linneo.).*



*Nota.* La figura muestra los componentes bioactivos de los extractos de mejorana, por Cala *et al.*, 2021.

Su amplio perfil químico la ha convertido en una especie con importantes actividades farmacológicas, atribuyéndole varias propiedades a la fracción de metabolitos secundarios

presentes entre estas antioxidantes, antifúngica, antibacteriana, antiinflamatoria, anticancerígena, antidepresiva, analgésica, insecticida y ovicida (Kakouri *et al.*, 2022).

### **Propiedades antioxidantes**

Los radicales libres se producen de manera inevitable, debido a que son el producto del uso de oxígeno de cada organismo para producir energía (Bacallao *et al.*, 2001). Su presencia provoca cambios negativos en la estructura y composición de elementos celulares, los antioxidantes actúan como mecanismo de defensa interactuando con el radical libre cediéndole un electrón para anular y/o debilitar su acción nociva (Avello & Suwalsky, 2006).

Estas propiedades han popularizado a los antioxidantes en el campo científico, industrial y en los consumidores, por su defensa frente a enfermedades degenerativas, el desarrollo del cáncer y la preservación de la salud (García, 2002). La capacidad antioxidante está estrechamente relacionada con la presencia de metabolitos secundarios como lo son fenoles y flavonoides (Quijada Vanegas, 2018).

### **Establecimiento *in vitro***

Los métodos de propagación utilizados tradicionalmente presentan dificultades en el cultivo, predisposición a enfermedades sistémicas, productos de bajo rendimiento y calidad, por este motivo hoy en día como alternativa para la producción a gran escala se utiliza como herramienta la propagación de cultivos *in vitro* que facilita obtener especies sanas y libres de patógenos (Torres, 2011).

Se han estandarizado diferentes protocolos de micropropagación para el cultivo *in vitro* de la mejorana (*Origanum majorana* Linneo.), se han planteado varios protocolos uno de estos basados en un medio con sales Murashige y Skoog (MS) suplementado con fitohormonas 6-BAP,

2,4-D, Kin, NAA (Elgengaihi *et al.*, 2006). Por otro lado Manjarrés (2023), plantea que la mejor concentración para establecer el cultivo de la especie es a base de sales minerales Murashige & Skoog (MS) complementado con fitohormonas 2,4-D y 6-BAP.

### **Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se describe como el cultivo estéril de plantas o de sus partes en recipientes de vidrio en condiciones controladas de luz y temperatura. Esta serie de técnicas ha experimentado un continuo desarrollo a partir del siglo XX, partiendo de investigaciones que permitieron la utilización de diversos medios de cultivos enriquecidos con hormonas sintéticas y los progresos en la manipulación fisiológica de las plantas madre (Suárez, 2020).

El avance en la tecnología de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* es posible gracias a la capacidad de la totipotencia que permite la creación de un organismo biológico a partir que un órgano más simple, es decir que las células no diferenciadas pueden llegar a ser diferenciadas y desempeñar funciones específicas dentro del organismo al que pertenecen (Navarro, 2014; Acosta, 2015).

### **Medios de cultivo**

Existen diferentes tipos de medios de cultivo debido a que cada uno es condicionado por la especie y el objetivo del estudio, las diferentes formulaciones consisten son a base de medios con distintas concentraciones específicas de minerales, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos (Alcaraz, 2021). Las características del tejido que se busca cultivar y el proceso morfogénico que se busca conseguir son los factores de dependencia para la combinación de componentes del medio de cultivo (Suárez, 2020).

## **Callogénesis**

El proceso de formación de callo es utilizado con diferentes finalidades, entre estas la micropropagación que da lugar al mejoramiento vegetal (Correia & Canhoto, 2010). Este proceso implica una intensa desdiferenciación y división celular en las condiciones óptimas que dan lugar al desarrollo de conglomerados amorfos y desordenados de células no especializadas en relación con el tipo de explante, el genotipo, el medio de cultivo y la combinación de las fitohormonas (Rodríguez, 2014).

Son ampliamente utilizados como primer paso para la obtención de suspensiones celulares debido a su elevado grado de división celular y producción de embriones somáticos (Rodríguez *et al.*, 2014). Es una alternativa para el mejoramiento genético demostrando sus ventajas en el crecimiento funcional como vía para la organogénesis y embriogénesis indirecta en las condiciones apropiadas (Hernández, 2021).

## **Suspensiones celulares**

Una suspensión celular se refiere a células libres o grupos de células distribuidas en un medio líquido en constante movimiento, siendo considerado un sistema de cultivo de células conveniente para investigaciones científicas (Rodríguez, 2020). Su utilidad en diferentes investigaciones se considera de gran importancia, debido a que permite cumplir con diferentes objetivos evitando la complejidad del proceso total de un organismo vegetal (Moscatiello, 2013).

Es una poderosa herramienta utilizada como patrón que permite ejecutar estudios de ciclo celular, bioquímica, nutrición, variación somaclonal, expresión génica, embriogénesis, organogénesis y la obtención de metabolitos secundarios como antocianinas, antquinonas, flavonoides, polifenoles, entre otros (Fernández, 2012; Granger, 2016).

## Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son hormonas vegetales que controlan distintos procesos partiendo del crecimiento y desarrollo de las plantas e incluso la respuesta a diferentes factores de estrés biótico y abiótico (Chávez, 2012). La presencia y combinación de hormonas (auxinas y citocininas) en las células vegetales dan lugar a un desarrollo morfogénico alterno (Jordán & Casaretto, 2006)

El uso de los reguladores de crecimiento ha logrado potenciar el mejoramiento vegetal controlando el tiempo de crecimiento, reduciendo la presencia de agentes patógenos, aumentando o disminuyendo los metabolitos secundarios, induciendo la maduración y cruce de especies vegetales (Alcántara, 2019).

Estas fitohormonas han sido clasificadas por su aplicación a nivel de la actividad celular, inhibitoria o estimulante, las familias están agrupadas por hormonas vegetales con estructura y actividad similar entre estas auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido salicílico, poliaminas, etileno, etc (Alcántara, 2019).

En el presente estudio se utilizaron Auxinas (2,4-D) y Citoquininas (6-BAP) para el establecimiento de suspensiones celulares de *Origanum majorana* L.

## Auxinas

El nombre auxina proviene del griego “auxein” que significa crecer, sus propiedades dependen de su concentración pueden inducir al alargamiento celular, la dominancia apical, mitosis, regeneración de tejido vascular, formación de raíces, entre otras (Mejía, 2018), si se presentan a bajas concentraciones inducen la elongación raíces, tallos e hipocótilos por el contrario a elevadas concentraciones se retrasa la elongación celular (Munguía & Martínez, 2018).

Existen varias auxinas entre estas ácido indol acético (IAA), ácido indol butírico (IBA), ácido naftalen acético (ANA), dicamba 2,4-D entre otras (Borjas, 2020).

### **Ácido 2,4- diclorofenoxiacético**

Es un compuesto utilizado en la actualidad para el control de malezas en cultivos de cereales como un herbicida sistémico y selectivo debido a su fácil adquisición y bajo costo (De la Cruz, 2014), a bajas concentraciones se utiliza como una sustancia para regular el crecimiento vegetal (Organización Mundial de la Salud, 1993).

### **Citoquininas**

Son fitohormonas que promueven diferentes procesos como la división celular, el desarrollo de brotes, la diferenciación de cloroplastos, el desarrollo floral y el antagonismo de la senescencia (Flores & Pereira, 2008). Se derivan de las adeninas entre las más frecuentes se destacan la Kinetina (Kin), 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y la zeatina (Tz-Cz) (Tierra, 2009).

### **6-Bencilaminopurina (BAP)**

Es una citoquinina de gran importancia por su gran variedad de propiedades que permiten favorecer la germinación, el crecimiento de raíces, la división y elongación de células y reprimir el envejecimiento de las hojas (Campos *et al.*, 2019).

### **Recuento celular**

Para estimar el crecimiento de un cultivo este puede ser calculado mediante diversos métodos, entre estos el destacan el recuento celular mediante un microscopio debido a la sencillez de la técnica, el bajo costo y la posibilidad del reconcomiendo visual del progreso del cultivo (Arredondo Vega & Voltolina, 2007).

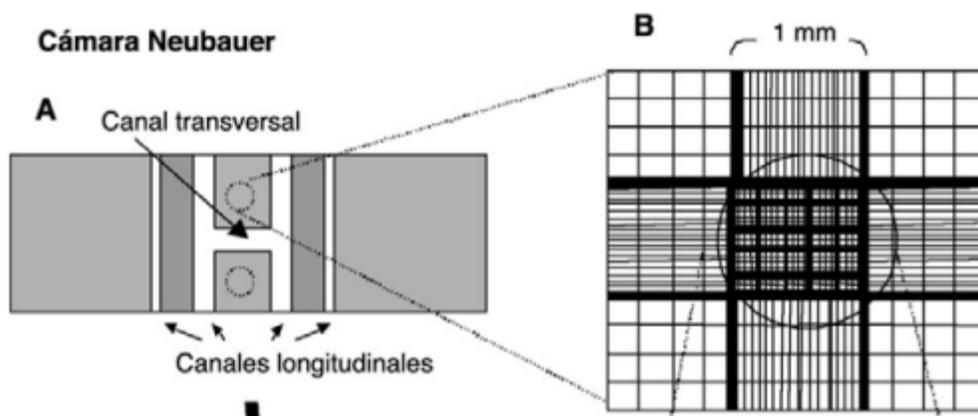
### **Cámara Neubauer**

Esta herramienta manual es conocida como hemocitómetro. Se trata de una placa de vidrio tipo portaobjetos con mayor grosor del común, en su parte central se encuentra dividida

en cuatro partes por canales la parte superior e inferior constan de una rejilla grabada con un área de  $9 \text{ mm}^2$  y esta a su vez se encuentra subdividida en áreas de  $1 \text{ mm}^2$  como se puede observar en la Figura 3.

### Figura 3

*Cuadrantes de conteo de la cámara de Neubauer*



*Nota.* A) Cámara de Neubauer y su distribución y B) Cuadrícula de área  $9 \text{ mm}^2$ , Tomado de Ensayos Toxicológicos y Método de evaluación de calidad de aguas, por Castillo, 2004.

### Determinación de metabolitos secundarios

En la actualidad existen diversos métodos que permiten medir los metabolitos secundarios a través de marchas fitoquímicas cualitativas o cuantitativas (cromatografía) en una amplia variedad de especies vegetales (Cabrera Forero, 2020). En la actualidad se destaca la importancia de los antioxidantes para evitar las reacciones de oxidación dentro de un sistema.

Debido a la variedad de técnicas para medir la capacidad antioxidante, se identifican las ventajas de cada una buscando el método más sencillo que permita analizar diferentes muestras para obtener resultados que puedan ser comparados entre sí (Méndez Rivera, 2016).

### **Técnicas electroquímicas**

Las técnicas electroquímicas han demostrado ser sencillas y económicas para determinar el potencial antioxidante, teniendo en cuenta que estos antioxidantes tienen su funcionalidad como agentes reductores mostrando una tendencia a ser oxidados al encontrarse en la superficie de un electrodo. De acuerdo a este principio se demuestra la relación existente entre la actividad del antioxidante y el comportamiento electroquímico de un compuesto de interés (Moreno Muñoz, 2021).

## Capítulo III: Metodología

### Fase de campo

#### Recolección del Material Vegetal

Las plantas de *Origanum majorana* Linneo. comúnmente conocidas como “majorana” fueron obtenidas en la parroquia rural de Nayón en el cantón Quito de la provincia de Pichincha. Las plantas fueron transportadas al en macetas al laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”.

#### Figura 4

*Planta de “majorana” (Origanum majorana Linneo.) obtenidas en la provincia de Pichincha*



*Nota.* Plantas de mejorana obtenidas en estado juvenil para futura introducción

### Fase de Laboratorio

#### Selección del Material Vegetal

Para la inducción de la respuesta in vitro se conoce que la edad fisiológica del explante es importante, de esta manera se ha comprobado que los tejidos vegetales más jóvenes y menos diferenciados presentan respuestas exitosas (Urrea, 2012). En el laboratorio se seleccionaron las hojas jóvenes de las plantas de mejorana que no presentaban contaminación, morfología uniforme y que se encontraban en buen estado.

**Figura 5**

*Hojas de mejorana jóvenes de aproximadamente 1 cm*

**Desinfección**

El protocolo de desinfección se llevó a cabo siguiendo la metodología establecida por Manjarrés (2023); sin embargo, se realizaron modificaciones por la contaminación presente y el material vegetal utilizado.

A los explantes seleccionados se los lavó con agua corriente en un frasco de 250 mL hasta que estos perdieran la película de suciedad visible, siguiendo el protocolo se les añadió una solución de detergente de 2% (p/v) con 5 gotas de Tween 20 durante 5 minutos, se agitó constantemente y se procedió a enjuagar con agua destilada hasta que no quedaran residuos de detergente. Posteriormente se le agregó alcohol al 70% por 1 minuto manteniendo en agitación constante y se enjuago con agua destilada. Para finalizar, se lavaron las hojas en hipoclorito de sodio al 3 % (v/v) más 5 gotas de Tween 20. Para la introducción de las hojas dentro de la cámara de flujo laminar ECSO previamente desinfectada con etanol al 70% y esterilizada con UV, se lavaron los explantes con agua estéril 3 veces.

### **Inducción a Callogénesis**

Una vez culminado el proceso de desinfección del explantes, las hojas fueron sembradas en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad donde contenían 30 mL de medio de cultivo semisólido estandarizado por Manjarrés (2023) este contiene sales MS completo, suplementado con 30g/L de azúcar, 2.2 g/L de Phytigel, 2 mg/L de 2,4-D y 0.23 mg/L de 6-BAP; Los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.7-5.8. Se sembraron 4 explantes por cada frasco.

Los explantes se observaron cada 7 días, evaluando la presencia de contaminación, el porcentaje de formación de células madre y la presencia de oxidación en los explantes.

### **Establecimiento de Suspensiones Celulares**

Las células madre con 42 días de introducción fueron cultivadas en una cámara de flujo laminar ESCO que previamente fue desinfectada con alcohol al 70% y esterilizada UV. Se pesó 1 g aproximadamente de el callo no friable en una balanza analítica Dhaus, seguidamente se disgregaron utilizando un método mecánico. Para finalizar se colocaron las células en matraces de Erlenmeyer de 25 mL de capacidad contenidos con 20 mL de medio de cultivo líquido MS suplementado con 30 g/L de azúcar, 2,4-D en diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.3 mg/L) y 6-BAP en distintas concentraciones (0.4, 0.5, 0.6 mg/L), los reguladores de crecimiento y su composición se establecieron a partir del estudio de *Perilla frutescens* (L.) Britt. perteneciente a la familia Lamiaceae donde (Wang *et al.*, 2004).

**Tabla 2**

*Medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D y 6-BAP para el establecimiento de suspensiones celulares a partir de células madre de majorana.*

Tratamiento	2,4-D (mg/L)	6-BAP (mg/L)
T0	0	0
T1	0.1	0.4
T2	0.2	0.5
T3	0.3	0.6

*Nota.* Los matraces Erlenmeyer inoculados se colocaron en un agitador orbital WideSake a 110 rpm

### **Conteo celular**

La metodología empleada fue la de Acosta España (2023), se tomaron muestras de las suspensiones celulares a los 17 días de su establecimiento tanto del tratamiento control como de los tres tratamientos planteados 10 $\mu$ L de cada uno con una micropipeta de 2-20  $\mu$ L. Cada una de las muestras fue colocada secuencialmente en una cámara de Neubauer y observada al microscopio óptico conectado a un monitor que permitió la captura de las fotografías con el programa Infinity-Capture y con un aumento de 40X.

Se realizó el conteo celular siguiendo el proceso establecido por Bastidas (2011), donde se contabilizan las células que se encuentran en 2 áreas de 3 mm<sup>2</sup> seleccionándolas en forma



al verificar la diferencia estadística y se procedió a realizar el cálculo de intervalos de confianza para determinar el tratamiento que maximiza la concentración celular.

Para comprobar el supuesto de normalidad se realizó un Q-Q Plot acompañado de un  $p - valor$  con la prueba de hipótesis Shapiro-Wilks modificado. Para el supuesto de homocedasticidad se realizó un diagrama de dispersión.

### **Análisis físico-químico**

Las muestras para el análisis físico-químico se enviaron a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), donde se prepararon extractos metanólicos previos del callo y las suspensiones. Para medir la capacidad antioxidante de algunos flavonoides presentes se usó el método de determinación del índice electroquímico utilizando la técnica de volumetría diferencial de pulso y el método es la disminución del radical su peróxido utilizando voltametría cíclica.

## Capítulo IV: Resultados

### Desinfección

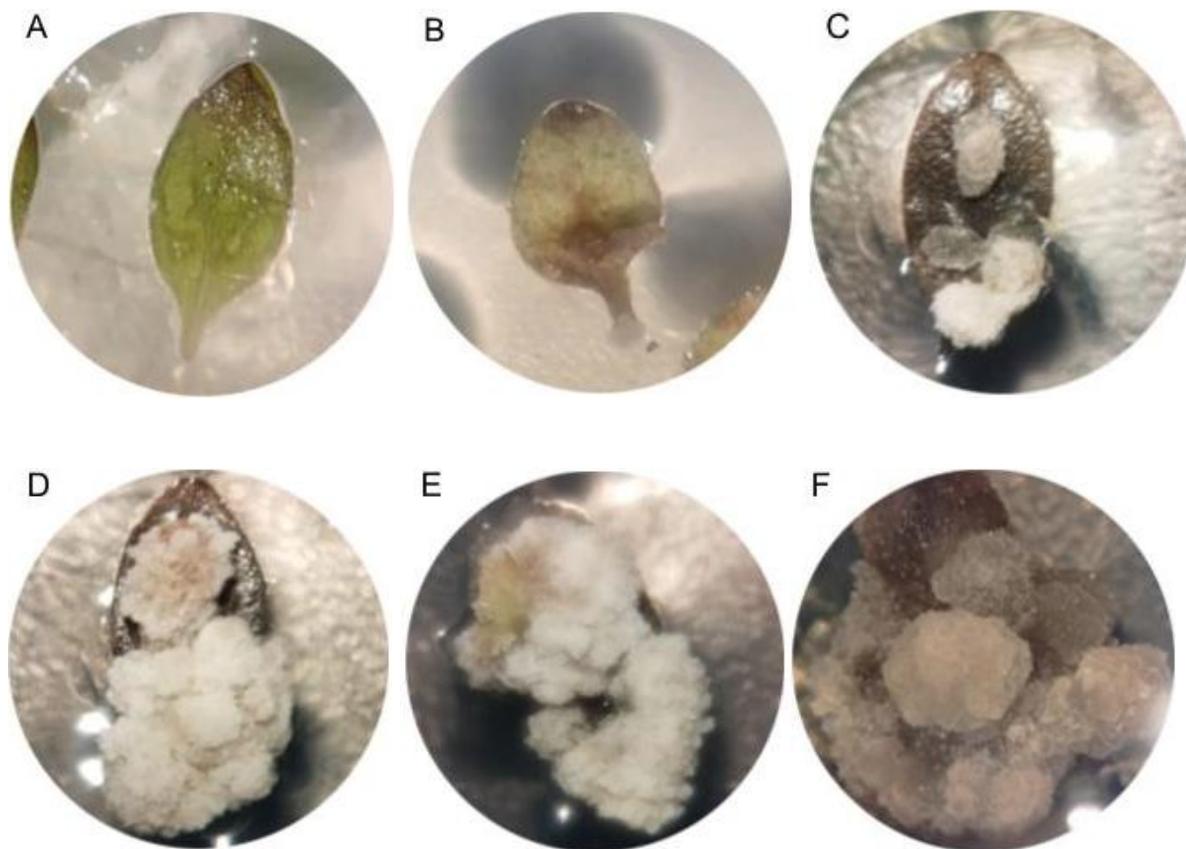
El protocolo de desinfección para las hojas de *Origanum majorana* Linneo., se siguió el de Manjarrés (2023) el cual fue optimo para el estudio.

### Inducción a Callogénesis

El medio estandarizado por Manjarrés (2023) fue de utilidad para inducción de las hojas de mejorana (*Origanum majorana* Linneo.) a callo, obteniendose un crecimiento del callo a partir de los 14 días como se puede observar en la Figura 7.

### Figura 7

*Inducción a callogénesis en medio MS suplementado con 2,4-D y 6-BAP*



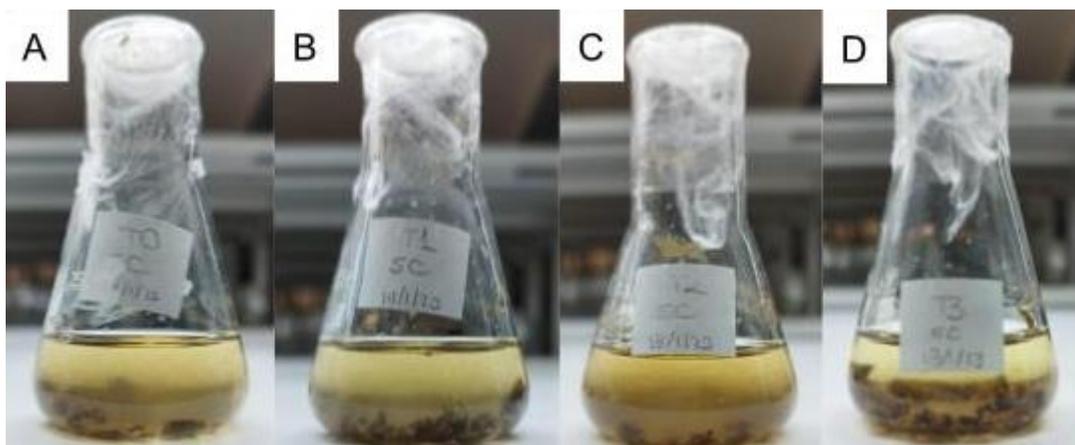
*Nota.* Células madre de mejorana con diferencia de días A) 7 días B) 14 días C) 21 días D) 28 días E) 35 días F) 42 días.

### **Establecimiento de suspensiones celulares**

De los tres tratamientos y el control realizado, se logró comprobar que el tratamiento T2 constituido de MS completo y suplementado con 0,2 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de 6-BAP fue el más exitoso al obtenerse una concentración células promedio de  $2860 \times 10^3 \text{ células/mL}$ ; sin embargo, de manera visual también se logró identificar la diferencia en turbidez que presentaban cada una de las suspensiones Figura 8.

### **Figura 8**

*Establecimiento de suspensiones celulares de mejorana (Origanum majorana Linneo.)*



*Nota.* Suspensiones celulares con diferentes concentraciones de 2,4-D y 6 BAP A) Tratamiento control. B) Tratamiento 1 C) Tratamiento 2 y D) Tratamiento 3.

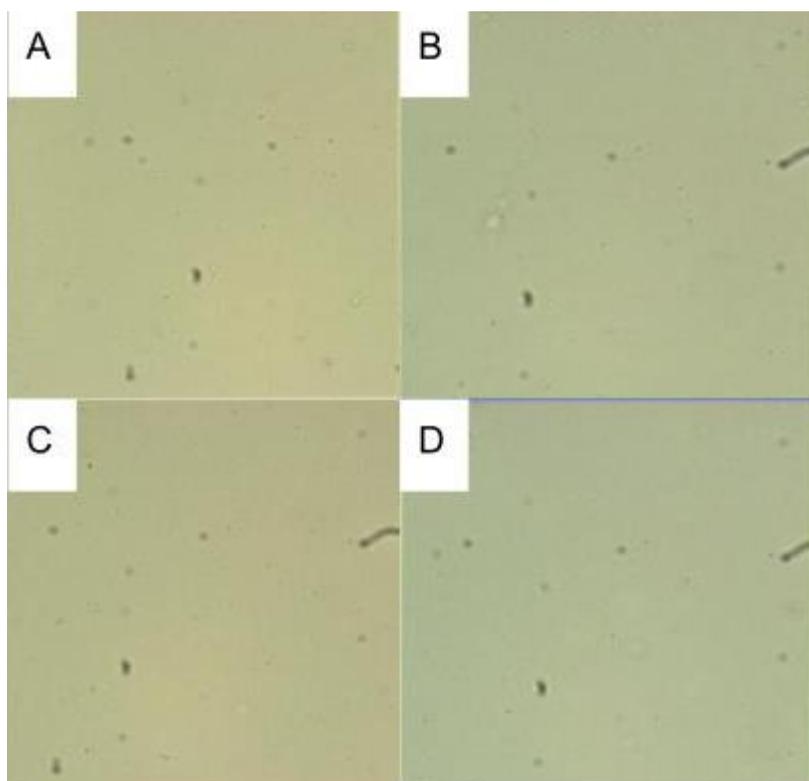
### **Recuento celular**

El recuento celular se lo realizó a los 21 días del cultivo de los callos en el medio cultivo líquido tanto de los tres tratamientos (T1, T2 y T3) como en el control (T0) Figura 9. La

concentración celular de cada uno de los tratamientos con sus repeticiones se detalla en Tabla 3. Los resultados del coteo celular mostraron un crecimiento en todos los tratamientos incluyendo al tratamiento control (T0) aun cuando la composición del medio de este tratamiento solo constaba de sales Murashige y Skoog (MS) como se puede observar en la Figura 9.

### Figura 9

*Recuento celular utilizando la cámara de Neubauer*



*Nota.* número de células presentes en las muestras de suspensión celular A) tratamiento control (T0), B) tratamiento 1, C) tratamiento 2 D) tratamiento 3

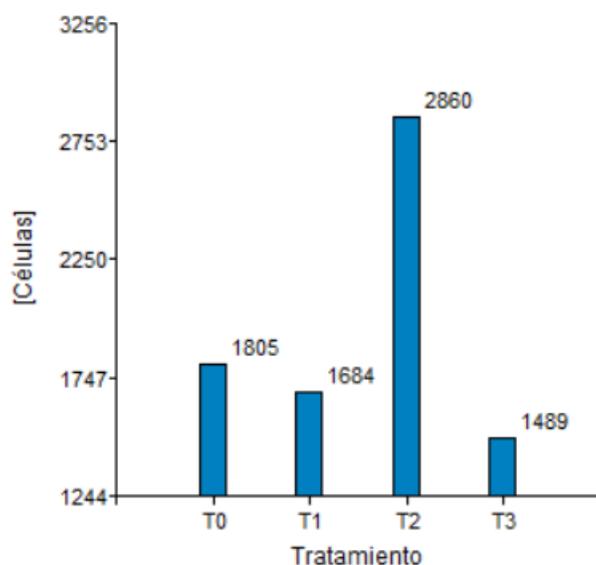
**Tabla 3**

*Datos del recuento celular de los tres tratamientos con distintas concentraciones y el tratamiento control.*

<b>Tratamiento</b>	<b>[células]/mL *10<sup>3</sup></b>
T0	1680
T0	1680
T0	3220
T0	1305
T0	1140
T1	1590
T1	1415
T1	1465
T1	2315
T1	1635
T2	2455
T2	2990
T2	3830
T2	3010
T2	2015
T3	1930
T3	1400
T3	980
T3	1575
T3	1560

**Figura 10**

Concentración de células en cada uno de los tratamientos



#### Análisis de los tratamientos

Mediante la utilización de la prueba Duncan se logró comprobar que los datos del recuento celular a los 21 días de su inoculación presentaron un p-valor  $<0.05$  mediante un ANOVA. Este valor representa la diferencia estadística significativa entre la concentración celular de acuerdo a los tratamientos, lo que concluye que no todos los tratamientos produjeron una concentración celular promedio como se puede apreciar en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Análisis de varianza para el conteo celular utilizando (ANOVA)

Tiempo de cultivo	p-valor
21 días	0.0092

*Nota.* El p-valor obtenido es menor que el nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ ), representando una diferencia estadística significativa entre los tratamientos respecto al recuento celular.

Los valores obtenidos confirmaron que el mejor tratamiento para el establecimiento de suspensiones celulares es el (T2) mostrando promedio muestral de 2860 que maximiza la producción de la concentración de células (Tabla 5). La verificación de datos se puede observar en la (Figura 9) que demuestra la relación entre el número de células y el tratamiento.

**Tabla 5**

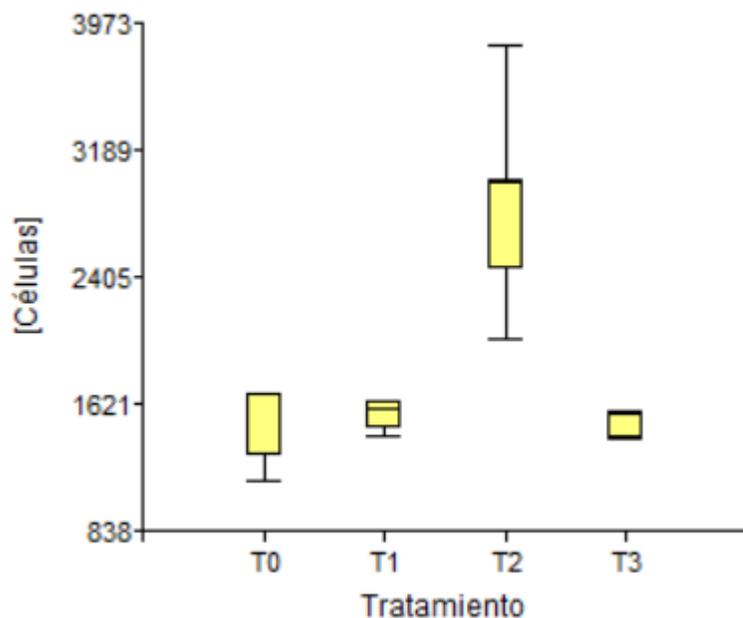
*Test: Ducan Alfa= 0.05*

<b>Tratamiento</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E.E.</b>	<b>Agrupación</b>
<b>T3</b>	1489.00	5	264.28	A
<b>T1</b>	1684.00	5	264.28	A
<b>T0</b>	1805.00	5	264.28	A
<b>T2</b>	2860.00	5	264.28	B

*Nota.* El tratamiento 2 (T2) maximiza la producción de la concentración celular; sin embargo, los otros tres tratamientos se encuentran al mismo nivel pese a la diferencia muestral que hay entre ellos. Por lo que no se puede asegurar que esta diferencia se la pueda generalizar para todo el estudio solo a nivel muestral.

**Figura 11**

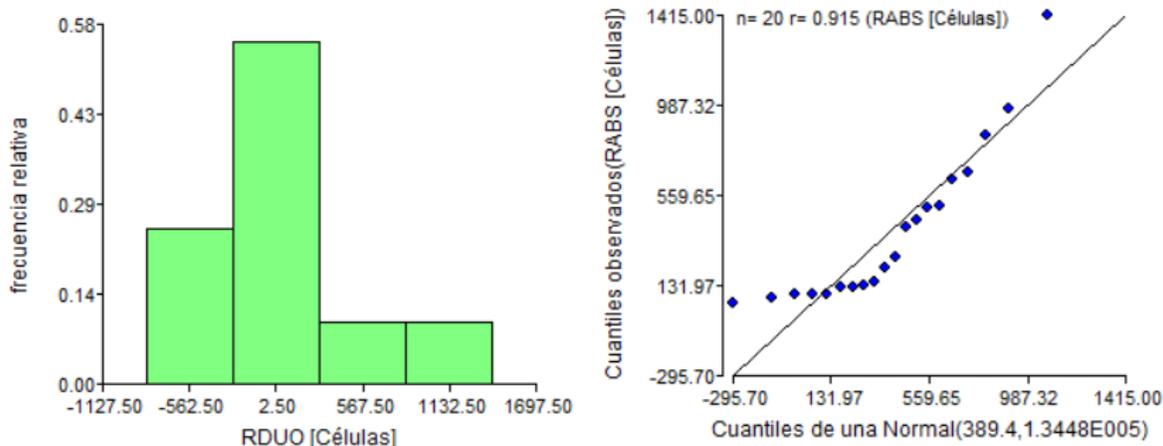
Diagrama de cajas para identificar la diferencia significativa entre los tratamientos respecto a la concentración celular.



Para el supuesto de normalidad se realizó un Q-Q Plot a los residuos ajustando los datos a una recta  $Y=X$ , al ajustarse estos datos dan como resultado una distribución normal como se puede apreciar en la (Figura 10); sin embargo, se acompaña con el valor p con la prueba de hipótesis Shapiro Wilks (modificado) donde el valor p debe ser superior para 0.01 (Tabla 6), para tener la distribución normal de los datos comprobando el supuesto de normalidad (ANEXO)

**Figura 12**

*Pruebas de normalidad del Recuento celular de Origanum majorana Linneo. Para el establecimiento de la suspensión celular.*



*Nota.* A) Histograma B) Q-Q plot, las pruebas de normalidad muestran la tendencia de los datos a una distribución normal.

**Tabla 6**

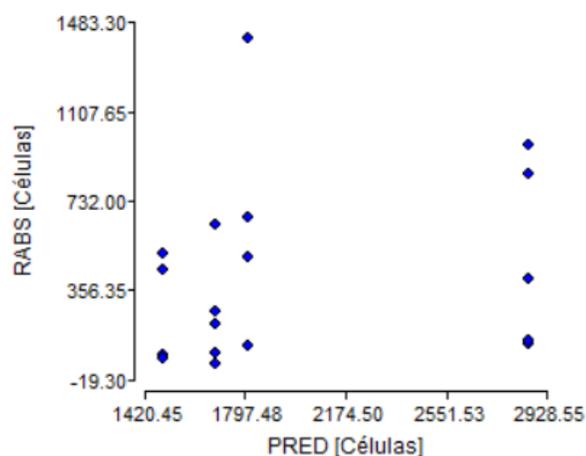
*p-valor como resultado de la aplicación de la prueba de hipótesis Shapiro Wilks (modificado)*

Variable	p-valor
RDUO [células]	0.3391

Para el supuesto de homocedasticidad (igualdad de varianza) se realizó un diagrama de dispersión como se puede observar en la (Figura 12), concluyendo que se cumple el supuesto de igualdad de varianza, se comprobó este supuesto de homocedasticidad con la prueba de hipótesis de Levene el p-valor del modelo debe ser mayor a 0.01 (Figura 13). Si el valor cumple el supuesto es válido para cualquier investigación experimental replicable (Tabla 7)

**Figura 13**

Diagrama de dispersión para corroborar la igualdad de varianza

**Tabla 7**

*p*-valor obtenido de la prueba de hipótesis de Levene

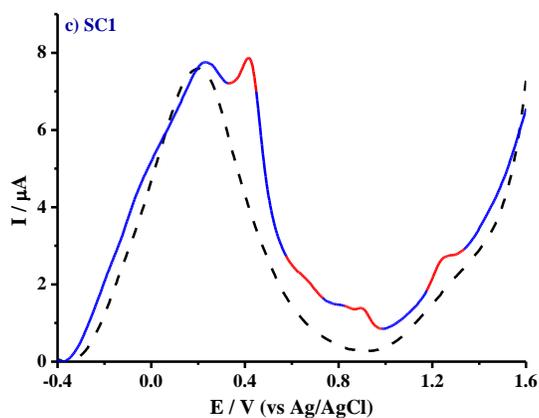
Variable	<i>p</i> -valor
Valores absolutos de los residuos	0.3934

### Índice electroquímico (EI)

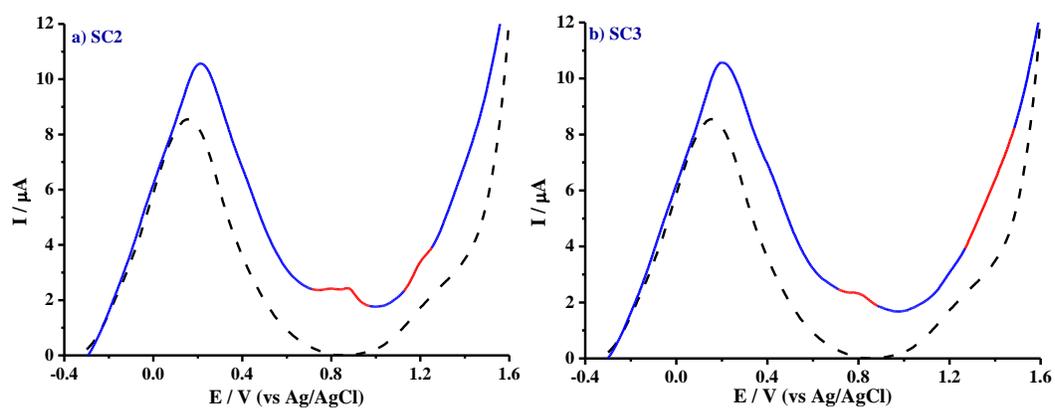
Se determinó el índice electroquímico de tres muestras mediante la técnica de voltametría de pulso diferencial donde (SC1) representa la muestra de callo mientras que (SC2) representa el tratamiento control de las suspensiones y (SC3) el tratamiento 2 de las suspensiones, el barrido de potencial de -0,5 a 1,6 V dan lugar a dos picos como se puede observar en la Figura 14 y Figura 15, simbolizando las especies antioxidantes presentes en las muestras.

**Figura 14**

*Voltamperogramas de pulso diferencial de extractos metanólicos de SC1 (Callo)*

**Figura 15**

*Voltamperogramas de pulso diferencial de extractos metanólicos de suspensiones celulares*



*Nota.* SC2 (Tratamiento control) y SC3 (Tratamiento 2)

Los datos del (EI) representados en la Tabla 8, muestran que el mayor valor corresponde a la muestra (SC1) proveniente de callo; sin embargo, la muestra (SC2) y (SC3) presentan valores de poder antioxidante.

**Tabla 8**

*Propiedades antioxidantes de las muestras usando índice electroquímico (EI).*

<b>Muestra</b>	<b>EI (<math>\mu\text{A V}^{-1}</math>)</b>
SC2	$5,63 \pm 0,19$
SC3	$7,25 \pm 0,38$
SC1 (Callos)	$23,97 \pm 1,70$

## Capítulo V: Discusión

### Establecimiento de Suspensiones Celulares

*Origanum majorana* Linneo. es conocida comúnmente en Túnez como “khezama” o “mejorana”, utilizada con fines gastronómicos y medicinales, debido a su alta diversidad taxonómica y química (Hajlaoiu, 2016). Es una especie interesante debido a su riqueza fitoquímica en compuestos como carvacrol, timol, flavonoides, taninos, hidroquinona, entre otros (Bouyahya et al., 2021).

Por su composición ha sido utilizada de manera tradicional en la medicina popular como antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, regulación hormonal problemas gastrointestinales y respiratorios y trastornos neurológicos (Yen & Park, 2021; Rababa'h & Alzoubi, 2021). Varias de estas propiedades son atribuidas por su fuerte capacidad antioxidante especialmente por su elevado contenido de flavonoides y ácidos fenólicos (Hamrouni *et al.*, 2009).

En la búsqueda de estos compuestos de interés, han surgido diferentes técnicas; sin embargo, las suspensiones celulares son consideradas un valioso método para la obtención de metabolitos activos con la finalidad de aplicarlos para análisis del fisiológicos, bioquímicos, moleculares, del ciclo celular, embriogénesis somática, etc (López do Campo, 2019; Aragón Rodríguez, 2020).

Para lograr el establecimiento de las suspensiones celulares se requirió la previa inducción a callogénesis del explante seleccionado obteniendo una combinación de callo friable y no friables para el inicio de la suspensión. Este tipo de callo se considera favorable para la obtención de metabolitos secundarios como lo menciona Montiel et al., (2007) afirmando que

las muestras de suspensión celular que contienen agregados celulares optimizan la síntesis y la acumulación de los metabolitos secundarios (MS).

Sin embargo, para lograr un cultivo de suspensión óptimo se considera necesario lograr una buena combinación entre los nutrientes, las sales y los reguladores de crecimiento (Vila Amoedo , 2020). La fuente de nitrógeno es considerado un componente que limita el crecimiento celular (Arias, 2009), por sus elevadas concentraciones de nitrógeno y sales el medio Murashige y Skoog (MS) es ampliamente utilizado (Murashige & Skoog, 1962). Con lo mencionado anteriormente se explica el crecimiento que se obtuvo en el tratamiento control (T0) respecto a los tratamientos (T1) y (T3) que contaban con reguladores de crecimiento.

Esta información indica que se considera que el crecimiento celular está ligado a diferentes factores, en esta investigación se realizaron variaciones en los reguladores de crecimiento obteniendo diferencias significativas entre los tratamientos, comparando el crecimiento celular de cada uno. Los resultados reflejados en la Figura 10 mediante el análisis de datos mostraron que el tratamiento (T2) maximiza la concentración de células por el contrario el tratamiento (T1) y (T3) no mostraron valores significativos, por lo que se puede afirmar que la presencia de reguladores de crecimiento dentro del medio de la suspensión no aseguran el aumento del crecimiento celular. Observación que lo confirman (Gómez *et al.*, 2014) afirmando que la formación de células y su crecimiento se encuentran ligadas al tipo y concentración de los reguladores de crecimiento.

Si bien los reguladores de crecimiento no son la única variable de la que depende el crecimiento y división celular como se puede apreciar si presentan resultados positivos tanto en el proceso de calogénesis como en el establecimiento de las suspensiones, por lo que se considera de gran importancia la elección de las fitohormonas y su composición.

El medio semisólido elegido para obtención de callo se encontraba ya estandarizado; sin embargo, el medio para el establecer las suspensiones celulares fue producto de una investigación taxonómica de la especie. Wang et al., 2004 mencionan en su trabajo con *Perilla frutescens* (L.) Britt. de la familia Lamiaceae un medio exitoso para suspensiones celulares basado en sales Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0,2 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de 6-BAP que dan lugar a la inducción de compuestos bioactivos. Por otro lado Gómez y Jiménez (2011), en su investigación en fresa (*Fragaria ananassa*, cv. Shikinar) señalan que la adición de una combinación de hormonas 6-BAP con 2,4-D es exitosa para aumentar callos dentro de la suspensión celular y producir siete veces más los compuestos de interés.

De esta manera se destaca la presencia de auxinas y citoquininas dentro del medio para mantener una suspensión exitosa de la especie, Kim *et al.* (2001) mencionan, que la presencia de auxinas induce la presencia de callo, intervienen en el crecimiento y el metabolismo secundario dependiendo de la concentración y la especie. Por otro lado, Arias y sus colaboradores (2009) afirman que la combinación de las citoquininas con las auxinas y otros factores regulan procesos como la mitosis, inducción a callo, metabolismo secundario entre otros, demostrando incrementos entre el 500 y 100 % en la producción comparados con distintos controles en los estudios.

Saharoo y sus colaboradores (2016), describen un crecimiento celular en las suspensiones de *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) donde la fase de retraso es hasta el día 7, la fase de crecimiento hasta el día 14 y el crecimiento máximo se lo midió a los 21 días, posteriormente el crecimiento empezó a disminuir. El rango entre 18 y 21 días fueron los considerados óptimos para tomar las muestras para el recuento celular teniendo en cuenta los datos anteriores de la curva de crecimiento celular y los datos detallados por Modarres y sus colaboradores (2018), donde describen que la más alta producción de componentes fenólicos en

suspensiones celulares de *Salvia leriifolia* Benth de la familia Lamiaceae se produjo en el día 18.

Una vez estandarizada la suspensión y el tiempo de producción de metabolitos secundarios se considera importante la medición de los mismos teniendo en cuenta que su producción puede estar ligada a la acumulación de biomasa (Arias, 2009). Se utilizó la técnica de voltametría diferencial de pulso para determinar el índice electroquímico en busca de las especies antioxidantes presentes en las muestras de callo y suspensión. Como lo indican Escarpa (2021) y Haque et al. (2021) la medida del índice antioxidante corresponde al poder antioxidante de las muestras, debido a la relación entre la corriente anódica y el potencial aplicado al mismo identificando la relación entre el poder antioxidante y el contenido fenólico y de flavonoides, donde un elevado contenido de antioxidantes puede corresponder a la presencia de flavonoides predominantes. De esta manera en el barrido de potencial de -0,5 a 1,6 V se observan los picos representativos de las especies antioxidantes presentes en las muestras y con la Ecuación 2 se midió el índice electroquímico obteniendo que la muestra de callo (SC1) supera las muestras de suspensión celular; sin embargo entre (SC2) y (SC3) la muestra (SC3) es mayor.

Trejo & Rodríguez (2007) describen que la organización celular es un factor fundamental para la inducción de diferentes clases de metabolitos secundarios (MS), por lo que las limitaciones que presentan el grado de agregación de las células influye en la presencia de los (MS). En los agregados de gran tamaño hay células que no tienen contacto directo con la iluminación,  $O_2$ , nutrientes, entre otros. El  $O_2$  es un nutriente esencial para el desarrollo de suspensiones vegetales, la obtención de energía celular y proceso de oxidación, su baja disponibilidad implicaría condiciones de estrés dando lugar a la acumulación o inhibición de los MS. La presencia de compuestos antioxidantes entre la muestra de callo y suspensiones es significativa, y la presencia de los agregados celulares Figura 8 puede implicar estos valores.

## Conclusiones

- Se determinó el medio de cultivo óptimo para el establecimiento de suspensiones celulares, siendo este el T2 compuesto de sales MS suplementado con 0.2 de 2,4-D y 0.5 de 6-BAP que permitió maximizar el crecimiento celular frente a los otros tratamientos.
- Se logró identificar el índice electroquímico de las muestras, donde el valor del callo es  $23,97 \pm 1,70 \mu\text{A V}^{-1}$  y el de la suspensión es  $7,25 \pm 0,38 \mu\text{A V}^{-1}$ , valores que relacionan el poder antioxidante con el contenido fenólico y de flavonoides.
- Se observó que la presencia de agregados celulares en las suspensiones celulares puede afectar la acumulación o inhibición de los metabolitos secundarios.

### Recomendaciones

- Se considera importante realizar más estudios de la combinación de fitohormonas para el establecimiento de suspensiones celulares para *Origanum majorana* Linneo.
- Realizar análisis comparativos de presencia de metabolitos secundarios en la planta, callo y suspensión.
- Determinar los factores que incrementan o reprimen la producción de metabolitos secundarios en el callo y la suspensión celular.
- Identificar las variables que influyen en la técnica de voltametría diferencial de pulso al medir el potencial antioxidante.

## Referencias

- Acosta España, J. A. (2023). Evaluación del medio de cultivo para el establecimiento in vitro de células madre y suspensiones celulares de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) a partir de frutos inmaduros [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE]. Obtenido de <https://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/36105/T-ESPE-052698.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- AGEXPORT. (2021). *Mejorana, Origanum majorana*. Guatemala: Asociación Guatemalteca de Exportadores. Obtenido de <https://www.export.com.gt/documentos/guia-de-cultivos/guia-de-cultivo-de-mejorana.pdf>
- Alcántara Cortés, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129. doi:[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702019000200109&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109&lng=en)
- Alcaraz Meléndez, L. (2021). Como el cultivo de tejidos vegetales ayuda a la conservación y desarrollo de plantas de interés económico. *Revista Digital de Divulgación Científica*, 7(3), 147-155. doi:<https://doi.org/10.18846/renaysoc.2021.07.07.03.0011>
- Alvarez Acuña, J. A., & Pozo Cruz, M. V. (2021). *Desarrollo de un protocolo para el cultivo in vitro de Rosa chunensis*. Universidad Politécnica Salesiana. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19601/1/UPS-TTQ185.pdf>
- Aragón Rodríguez, C. (2020). Establecimiento de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. y *Persea americana* Mill. cv. Hass [Tesis de pregrado, Centro de investigación científica de Yucatan]. Obtenido de

[https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1828/1/PCB\\_M\\_Tesis\\_2020\\_Centeotl\\_Arag%C3%B3n\\_Rodr%C3%ADguez.pdf](https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1828/1/PCB_M_Tesis_2020_Centeotl_Arag%C3%B3n_Rodr%C3%ADguez.pdf)

Arias Zabala, M., Angarita Velásquez, M. J., Aguirre Cardona, A. M., Restrepo Flóres, J. M., & Montoya Vallejo, C. (2009). Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1). Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472009000100015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472009000100015&script=sci_arttext)

Arias Zabala, M., Angarita Velásquez, M. J., Aguirre Cardona, M., Restrepo Flóres, J., & Montoya Vallejo, C. (2009). Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4881-4895.  
doi:[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-28472009000100015&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100015&lng=en&tlng=es).

Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., & Restrepo, J. (2009). Aspectos ingenieriles del cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dina*, 109-121.

Arredondo Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Concentración, Recuento celular y Tasa de Crecimiento. En B. O. Arredondo Vega, & D. Voltolina, *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*(494), 161-172. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>

- Bacallao García, L., García Gómez , V. L., Rojo Domínguez, D. M., & Sánchez García , E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(3), 231-235.  
doi:[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002001000300011&lng=es&tling=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002001000300011&lng=es&tling=es).
- Bastidas, O. (19 de Diciembre de 2011). *Universidad de Valencia*. Obtenido de <https://mural.uv.es/basgaros/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
- Borjas Ventura, R., Julca Otiniano, A., & Alvarado Huamán, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 150-164. Obtenido de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2308-38592020000200007&lng=es&tling=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592020000200007&lng=es&tling=es).
- Bouyahya, A., Chamkhi, I., Benali, T., Guaouguaou, F.-E., Balahbib, A., El Omari, N., . . . El Menyiy, N. (2021). Uso tradicional, fitoquímica, toxicología y farmacología de *Origanum majorana* L. *Journal of ethnopharmacology*, 265(113318).  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113318>
- Cabrera Forero, J. S. (2020). . Identificación primaria de metabolitos secundarios de *Ulex europaeus* L. retamo espinoso y su actividad biológica [Tesis pregrado, Uniervidad de la Salle]. *Ciencia Unisalle*. Obtenido de <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/97>
- Cala, A., Salcedo , J. R., Torres, A., Varela, R. M., Molinillo , J. M., & Macías, F. A. (2021). Un estudio sobre el potencial fitotóxico de las hojas de la hierba condimentada mejorana ( *Origanum majorana* L.). *Moléculas*, 26(11), 3356.  
doi:<https://doi.org/10.3390/molecules26113356>

- Campos León, D. J., Chávez Alcántara, C. C., López Medina, S. E., Mostacero León, J., Gil Rivero, A. E., López Zavaleta, A., & De la Cruz Castillo, A. J. (2019). Efecto de la 6-Bencilaminopurina y del medio de cultivo MS (1962) en el establecimiento in vitro de *Prosopis pallida* (Willd.) Kunth. *Revista de investigación científica (REVIOL)*, 39(2), 30-40. Obtenido de <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbbiol/article/view/2731>
- Castillo Morales, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de aguas*. México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.
- Chávez Suárez, L., Álvarez Fonseca, A., & Ramírez Fernández, R. (2012). Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 47-56.  
doi:[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362012000300007&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362012000300007&lng=es&tlng=es).
- Correia, S., & Canhoto, J. (2010). Caracterización de estructuras somáticas adheridas a embriones en *Feijoa sellowiana* Berg. (Mirtáceas). *Protoplasma*, 242(1-4), 95-107.  
doi:<https://doi.org/10.1007/s00709-010-0130-z>
- De la Cruz Castillo, J., Mejía Coico, F., Mostacero León, J., López Medina, E., & Gonza Carnero, A. (2014). Efecto de la concentración del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en el enraizamiento de estacas de *Rosa* sp.,. *Revista de Investigación para el Desarrollo Sustentable*, 2(1), 37-43. doi:10.25127/indes.20142.61
- Della, P. T., Elshafie, H. S., Capasso, R., De Feo, V., Camele, I., Nazarro, F., . . . Caputo, L. (2019). Actividad antimicrobiana y fitotóxica de los aceites esenciales de *Origanum heracleoticum* y *O. majorana* que crecen en Cilento (sur de Italia). *Moleculas*, 24(14).  
doi:<https://doi.org/10.3390/molecules24142576>

- Elgengaihi, S. E., Taha, H., & Kamel, A. M. (2006). Estudios comparativos in vivo e in vitro de *Origanum.especies*. *Revista de alimentación, agricultura y medio ambiente*comentario, 3 Y 4, 127-134. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/236593374>
- Escarpa , A. (2021). Electroanálisis de alimentos: sentido y sencillez. *The Chemical Record*, 12(1), 72-91. doi:<https://doi.org/10.1002/TCR.201100033>
- Fernández Chuyn, O., Ojito, C. E., & Pérez, A. L. (2012). Obtención de Flavonoides a partir del cultivo en suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita* L. *Revista Universidad EAFIT*, 38(127), 65-71. Obtenido de <https://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/932>
- Flores, V. J., & Pereira, M. A. (2008). Las citoquininas están asociadas al desarrollo floral de plantas de *Solidago x luteus* en días cortos. *Agronomía Colombiana*. doi:[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99652008000200007&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000200007&lng=en&tlng=es).
- García Alonso, J., Periago, M. J., Vidal Guevara, M. L., & Cantos , E. (2002). Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva y frutas rojas. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 18, 103-114. Obtenido de <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/16651>
- Gómez Torres, L. M., Moreno Gómez, B., Velásquez Lozano, M. E., Aguirre Mancilla, C., & Aguado Santacruz, G. A. (2014). Cultivos fotoautotróficos de células vegetales en suspensión: Establecimiento y perspectivas de aplicación. *Revista fitotecnica mexicana*, 37(2), 165-179. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802014000200008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802014000200008&lng=es&tlng=es).
- Granger Serrano, L. F. (2016). Evaluación del potencial del cultivo de células en suspensión de papa (*Solanum tuberosum* subsp. andígena) como plataforma de producción de

proteínas recombinantes [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].

Obtenido de

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/58848/1047422195.2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Hajlaoiu , H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2016). Composición química y evaluación in vitro de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas, citotóxicas y antiacetilcolinesterasa del aceite esencial tunecino de *Origanum majorana* L. *Microbial pathogenesis*, 95, 86-94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.03.003>
- Hamrouni Sellami, I., Maamouri, E., Chahed, T., Wannas, W. A., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2009). Efecto de la etapa de crecimiento sobre el contenido y composición del aceite esencial y fracción fenólica de mejorana dulce ( *Origanum majorana* L.). *Industrial Crops and Products*, 30(3), 395-402. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.07.010>
- Haque, M. A., Morozova, K., Ferrentino, G., & Sampicchio, M. (2021). Métodos electroquímicos para evaluar la actividad antioxidante y la capacidad de los alimentos: una revisión. *Electroanalysis*, 1419-1435. doi:<https://doi.org/10.1002/ELAN.202060600>
- Hernández Amasifuen, A. D., Arguelles Curaca, A., Cortez Lázaro, A. A., & Díaz Pillasca, H. B. (2021). Inducción in vitro de callos a partir de explantes foliares en Rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *La Granja*, 34(2). doi:<https://doi.org/10.17163/lgr.n34.2021.09>
- Ietswaart, J. (1980). *Una revisión taxonómica del género Origanum (Labiatae)* (Vol. 4). Serie Botánica de Leiden.
- Jedrzejczyk, I. (2018). Estudio de diversidad genética entre especies de *Origanum* L. basado en tamaño del genoma y marcadores ISSR. *Elsevier*, 126, 201-207. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.010>

- Jiang, Z.-T., Li, R., Wang, Y., Chen, S.-H., & Guan, W.-Q. (2011). Composición de aceite volátil de especia natural, *Origanum majorana* L. cultivada en China. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14, 458-462. doi:<https://doi.org/10.1080/0972060X.2011.10643601>
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento. En F. A. Squeo, & L. Cardemil, *Fisiología Vegetal*. La Serena, Chile: Universidad de La Serena.
- Kakouri, E., Daferera, D., Kanakis, C., Revelou, P. K., Kaparakou, E. H., Dervisoglou, S., . . . Tarantilis, P. A. (2022). Aceite esencial de *Origanum majorana*: una revisión de su perfil químico y actividad pesticida. *Vida(Basilea)*, 12(12), 1982. doi:<https://doi.org/10.3390/life12121982>
- Kim, S., Choi, H., Kim, J., Lee, H., & Hong, S. (2001). Efecto de la presión osmótica sobre la producción de paclitaxel en cultivos celulares en suspensión de *Taxus chinensis*. *Enzyme and microbial technology*, 202-209. doi:[https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00292-1](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00292-1)
- Le Bourvellec, C., Hauchard, D., Darchen, A., Burgot, J. L., & Abasq, M. L. (s.f.). Validación de un nuevo método usando la reactividad de e.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. ArgenBio.
- López do Campo, J. (2019). Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento (*Capsicum annum* L. var. *annuum*) mediante la elicitación con extractos de hoja de *Moringa oleifera* [Tesis de maestría, Universidad da Coruña]. *Máster en Biotecnología Avanzada*. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/210536278.pdf>

Lustre Sanchez, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria (RDU)*, 23(2).

doi:<http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>

Manjarrés Alomoto, M. A. (2023). Inducción a células madre en segmentos de hoja de *Origanum majorana* L. utilizando 3 [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE]. Obtenido de

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/36661/1/T-ESPE-052893.pdf>

Manjarrés Alomoto, M. A. (2023). Inducción a células madre en segmentos de hoja de *Origanum majorana* L. utilizando 3 [Tesis doctoral, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE]. Obtenido de

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/36661/1/T-ESPE-052893.pdf>

Marchev, A. S., Yordanova, Z. P., & Georgiev, M. I. (2020). Fábricas (celulares) verdes para la producción avanzada de metabolitos secundarios vegetales. *Critical Reviews in*

*Biotechnology*, 40(4), 443-458. doi:<https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1731414>

Mejía Coico, F., López Medina, E., De la Cruz Castillo, J., & Gonza Carnero, A. (2018). Efecto de la concentración del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en el enraizamiento de brotes caulinares de “frambueso” en condiciones de invernadero. *Revista de Investigaciones de la Universidad Le Cordon Bleu*, 5(2), 17-26.

doi:<https://doi.org/10.36955/RIULCB.2015v2n2.002>

Méndez Rivera, G. A. (2016). Optimización del método para la determinación de la capacidad antioxidante utilizando DPPH en mezclas etanol-agua [Tesis de pregrado, Universidad Autónoma Metropolitana]. *Casa abierta al tiempo*. Obtenido de

<https://bindani.izt.uam.mx/concern/tesiuams/fj236210v>

- Modarres, M., Esmaeilzadeh Bahabadi, S., & Taghavizadeh Yazdi, M. (2018). Producción mejorada de ácidos fenólicos en cultivos en suspensión celular de *Salvia leriifolia* Benth. utilizando reguladores de crecimiento y sacarosa. *Citotecnología*, 70, 741-750. doi:<https://doi.org/10.1007/s10616-017-0178-0>
- Montiel, G., Bretón, C., Thiersault, M., Burlat, V., Jay Allemand, C., & Pascal, G. (2007). El factor de transcripción Agamous-like 12 de *Arabidopsis* promueve la organización similar a un tejido y la biosíntesis de alcaloides en células en suspensión de *Catharanthus roseus*. *Metabolic engineering*, 9(2), 125-142. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.10.001>
- Moreno Muñoz, M. T. (2021). Nuevas técnicas electroquímicas para la determinación de la capacidad antioxidante en extractos alimentarios basadas en el método cuprac [Tesis doctoral, Universidad de Córdoba]. *Dialnet*. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=304336>
- Moscatiello, R., Baldan, B., & Navazio, L. (2013). Cultivos en suspensión de células vegetales. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 77-93. doi:[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-152-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-152-3_5)
- Munguía Rodríguez, A. G., & Martínez Trujillo, M. (2018). Las auxinas: síntesis, transporte y señalización. *Biologicas*, 20(1). doi:<https://orcid.org/0000-0002-6523-6618>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). Un medio revisado para el crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tejidos de tabaco. *Fisiología Plantarum*, 15(3), 473-497. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Organización Mundial de la Salud. (1993). Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. *Guía para la salud y la Seguridad*. Obtenido de

<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/31241/9275370621-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Pérez Molphe , B. E., Torres García, B., Morales Domínguez, J., & Fraire Velázquez, S. (2018).

Generación de raíces transformadas y análisis fitoquímico preliminar en la planta medicinal *Bidens odorata* Cav. *46*, 241-258.

Perna, P., & Vasudeva, N. (2015). *riganum majorana* L. -Revisión fitofarmacológica. *Indio J.*

*Nat. Pinchar*, *6*, 261-267.

Quijada Vanegas , A. (2018). Fenoles, Flavonoides, actividad antioxidante y antibacteriana en

extractoe de frutos de *Psidium sartorianum*, *Malpiguia mexicana* y *Sageretia* sp [Tesis de maestría, Universidad autónoma del Estado de México]. Obtenido de

<file:///C:/Users/Javier%20Ch/OneDrive/Documents/Sasha%20Princesa/TESIS%20ANTONELA%20QUIJADA%20VANEGAS%20VERSION%20FINAL-versi%C3%B3n%20para%20repositorio.pdf>

Rababa'h, A. M., & Alzoubi, M. A. (2021). El extracto de *Origanum majorana* L. protege contra

la cardiotoxicidad inducida por isoproterenol en ratas. *Cardiovascular toxicology*, *543-552*. doi:<https://doi.org/10.1007/s12012-021-09645-2>

Rodríguez Aragón, C. (2020). Establecimiento de suspensiones celulares de *Coffea* [Tesis de

pregrado]. *Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.* Obtenido de

[https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1828/1/PCB\\_M\\_Tesis\\_2020\\_Centeotl\\_Arag%C3%B3n\\_Rodr%C3%ADguez.pdf](https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1828/1/PCB_M_Tesis_2020_Centeotl_Arag%C3%B3n_Rodr%C3%ADguez.pdf)

Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K.

(2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, *35(1)*, 111-118.

doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>

- Sahraroo, A., Mirjalili, M. H., Corchete, P., Babalar, M., & Fattahi Moghadam, M. R. (2016). Establecimiento y caracterización de un cultivo en suspensión de células de *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae): una nueva fuente in vitro de ácido rosmarínico. *Cytotechnology*, 68(4), 1415-1424. doi:<https://doi.org/10.1007/s10616-015-9901-x>
- Sangwan, N. S., Arora, B., & Sangwan, R. S. (2001). Modulación espectral de la biogénesis de aceites esenciales en el geranio perfumado, *Pelargonium graveolens* L. *Hierbas, Especies y Plantas Medicinales*, 10, 85-91. doi:[https://doi.org/10.1300/J044v10n01\\_10](https://doi.org/10.1300/J044v10n01_10)
- Santos Díaz, A. M. (2022). Control de calidad microbiológico de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico. En A. M. Santos Díaz, E. P. Grijalba Bernal, L. Torres Torres, & L. A. Uribe Gutiérrez, *Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad*. Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). doi:<https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7405125>
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Serafini, L., Schmidt, C., Oldoni, T., Carpes, S., Haminiuk, C., & Ribeiro, E. (2018). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos etanólicos de mejorana (*Origanum majorana* L.) evaluados mediante diferentes métodos in vitro. *Sociedad Internacional de Ciencias Hortícolas*, 1198, 85-91. doi:<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1198.16>
- Suárez Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Colombia : Universidad de Córdoba.
- Tierra Tingo, L. E. (2009). Evaluación de diferentes niveles de fitohormonas (citoquininas, giberalina, etileno) en la producción de forraje y semilla de la Pao palustris (*Pasto poa*) [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1351/1/17T0906.pdf>

- Torres, L. E. (2011). *Caracterización y Evaluación de génotipos de Orégano cultivados en las principales zonas de producción de Argentina [Tesis doctoral]*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. Obtenido de <file:///C:/Users/Javier%20Ch/Downloads/Torres,%20L.%20Caracterizaci%C3%B3n%20y%20evaluaci%C3%B3n%20de%20genotipos%20de%20or%C3%A9gano..%20%20.pdf>
- Trejo Tapia, G., & Rodríguez Monroy, M. (2007). a agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, 32(10), 669-674. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007001000006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007001000006&lng=es&tlng=es)
- Urrea, A. I., Gómez, S., & Naranjo, E. J. (2012). Respuesta de *Zamia incognita* L. al cultivo in vitro , una alternativa para su conservación. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 121-133. doi:[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752012000200013&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000200013&lng=en&tlng=es)
- Vagi, E., Rapavi, E., Hadolín, M., Vásárhelyiné Perédi, K., Balázs, A., Blázovics, A., & Simándi, B. (2005). Antioxidantes fenólicos y triterpenoides de *Origanum majorana* L. Hierba y extractos obtenidos con diferentes disolventes. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 53(1), 17-21. doi:<https://doi.org/10.1021/jf048777p>
- Vila Amoedo , U. (2020). Diseño de un proyecto de investigación: Estudio de la inducción de resistencia en suspensiones celulares de pimiento elicidadas con extractos de ortiga [Tesis de maestría, Universidad de Coruña]]. Obtenido de [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/29205/VilaAmoedo\\_Uxia\\_TFM\\_2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/29205/VilaAmoedo_Uxia_TFM_2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

- Wang, J. W., Xia, Z. H., Chu, J. H., & Tan, R. X. (2004). Producción simultánea de antocianinas y triterpenoides en cultivos en suspensión de *Perilla frutescens*. *Tecnología enzimática y microbiana*, 34(7), 651-656. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.02.004>
- Wang, S., Zhou, L., Atiia, F., Tang, Q., Wang, M., Liu, Z., . . . Kang, W. (2021). *Origanum majorana* L.: un suplemento nutricional con efectos inmunomoduladores. *Front Nutr.* doi:<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.748031>
- Yen, L. T., & Park, J. (2021). La secuencia completa del genoma del cloroplasto de *Origanum majorana* L. *Mitochondrial DNA. Part B, Resources.* doi:<https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1778561>