



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TEMA: “Obtención de callo *in vitro* a partir de explantes de hoja del
aire (*Kalanchoe pinnata*) y su posterior determinación del contenido de
fenoles y capacidad antioxidante”.**

AUTORA: TORRES MOLINA, JENNIFER ALEJANDRA

**DIRECTORA: M.Sc JADÁN GUERRERO, MÓNICA BEATRIZ,
PhD. (c)**

SANGOLQUÍ

2017



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación **“Obtención de callo *in vitro* a partir de explantes de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata*) y su posterior determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante.”** realizado por la señorita **JENNIFER ALEJANDRA TORRES MOLINA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos científicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **JENNIFER ALEJANDRA TORRES MOLINA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 2017

M.Sc., MÓNICA BEATRIZ, JADÁN GUERRERO, Ph.D. (c)

DIRECTORA



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **JENNIFER ALEJANDRA TORRES MOLINA**, con cédula de identidad N° 1719685578 declaro que este trabajo de titulación **“Obtención de callo *in vitro* a partir de explantes de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata*) y su posterior determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante.”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, Julio del 2017

JENNIFER ALEJANDRA TORRES MOLINA

C.C. 1719685578



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **JENNIFER ALEJANDRA TORRES MOLINA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**Obtención de callo *in vitro* a partir de explantes de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata*) y su posterior determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante.**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, Julio del 2017.

JENNIFER ALEJANDRA TORRES MOLINA

C.C. 1719685578

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, por llenarme de bendiciones, por estar conmigo en cada paso que doy y jamás dejarme caer.

A toda mi familia por su infinito amor, entrega y apoyo, por cada palabra de aliento y ser la fortaleza de mi vida.

A mis padres que a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar, siendo mi apoyo incondicional, un ejemplo a seguir es por ellos que soy lo que soy ahora. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir. Les amo con mi vida.

A mi hermano Jefferson por ser mi amigo y ayudarme cuando lo necesito.

A Cristian mi novio, amigo, por estar conmigo en las buenas y malas, por alentarme y apoyarme en cada momento, por compartir este logro junto a mí.

A ellos este proyecto, ya que sin ellos no hubiese podido ser.

Jennifer

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Primero y, antes que nada, agradezco a Dios por darme la sabiduría para poder culminar esta meta, por su amor incondicional y ser la fuerza de mi camino.

Gracias a mis papitos por todo el amor y paciencia, por enseñarme que, aunque las cosas parezcan difíciles todo se logra con constancia y perseverancia. Por ser una voz de aliento, siempre apoyarme y nunca dejarme caer.

A mi Directora de Tesis M.Sc. Mónica Jadán, por brindarme su amistad, por darme la confianza, por ser un ejemplo a seguir y sobre todo por haberme ayudado a crecer como ser humano y como profesional.

A la Doctora Claudia Segovia por su apoyo, amistad y ser una persona dedicada en cada una de cosas que realiza, ser un ejemplo a seguir como madre y profesional.

A la Doctora Blanquita no solo por brindarme su amistad, sino su conocimiento, su tiempo y paciencia, y ayudarme a crecer.

A cada uno de mis profesores que de una u otra forma grabaron experiencias y conocimientos a lo largo de mi vida estudiantil, es a ellos a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza.

A mis amigos de laboratorio Dany, Kary, Denisse, Jenn Ti, Jéssica, Tiny, Majo, Cris, Joss por todos los momentos compartidos en el laboratorio, por las rías y cada conocimiento compartido.

Jennifer

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Marco teórico	4
1.4.1. Hoja del aire (<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers)	4
1.4.1.1. Origen y distribución.....	4
1.4.1.2. Clasificación taxonómica.....	5
1.4.1.3. Características Morfológicas.....	6
1.4.1.4. Ecología.....	7
1.4.1.5. Plagas y enfermedades	8

1.4.1.6. Usos y Aplicaciones	9
1.4.1.7. Constituyentes fitoquímicos.....	10
1.4.2. Cultivo <i>in vitro</i>	10
1.4.3. Etapas de la micropropagación <i>in vitro</i>	13
1.4.3.1. Fase de preparación.....	13
1.4.3.2. Fase de desinfección	13
1.4.3.3. Fase de establecimiento	14
1.4.3.4. Fase de multiplicación.....	15
1.4.4. Callogénesis	15
1.4.4.1. Mantenimiento del tejido calloso	16
1.4.5. Metabolitos Secundarios	17
1.4.5.2. Técnicas empleadas para evaluar la presencia de metabolitos secundarios.....	18
1.4.5.2.1. Contenido de fenoles.....	18
1.4.5.2.2. Capacidad antioxidante	19
1.4.6. Hipótesis.....	20
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. Localización del ensayo	21
2.2. Fase de campo – Obtención del material vegetal.....	21
2.2.1. Pre-tratamiento de desinfección y control fitosanitario	21
2.3. Fase de laboratorio	22
2.3.1. Selección de los explantes.....	22
2.3.2. Medio de cultivo	23
2.3.3. Desinfección de explantes.....	23
2.3.4. Inducción a callo	27

2.3.4.1. Formación de callo.....	28
2.3.4.2. Multiplicación de callo.....	29
2.4. Preparación de los extractos para los análisis del contenido de fenoles y actividad antioxidante	30
2.4.1. Determinación del contenido de fenoles.....	30
2.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante.....	32
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	35
3.1. Desinfección e introducción de las muestras vegetales	35
3.1.1. Contaminación	35
3.1.1.1. Análisis Exploratorio	35
3.1.1.2. Análisis Inferencial	37
3.1.2. Oxidación	39
3.1.2.1. Análisis Exploratorio	39
3.1.2.2. Análisis Inferencial	41
3.2. Inducción a callo	43
3.2.1. Presencia o ausencia de callo	44
3.2.1.1. Análisis Exploratorio	44
3.2.1.2. Análisis Inferencial	46
3.2.2. Callo no organogénico u organogénico.....	47
3.2.2.1. Análisis Exploratorio	47
3.2.2.2. Análisis Inferencial	49
3.3. Preparación de los extractos para los análisis del contenido de fenoles y de la actividad antioxidante.	52
3.3.1. Contenido de fenoles.....	53
3.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante.....	57

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	62
4.1. Desinfección e introducción de los explantes	63
4.1.1 Contaminación	63
4.1.2 Oxidación	66
4.2. Inducción a callo	67
4.3. Preparación de los extractos para los análisis del contenido de fenoles y de la actividad antioxidante.	70
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	75
5.1. Conclusiones.	75
CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES	76
6.1. Recomendaciones.....	76
BIBLIOGRAFÍA	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de desinfección de los explantes de hoja.	25
Tabla 2. Tratamientos con combinaciones de 2,4 D y 6-BAP para la fase de inducción de callos.....	28
Tabla 3. Valoración para las variables en la formación de callo.	28
Tabla 4. Datos para determinar el contenido de fenoles.	31
Tabla 5. Datos para la determinación de la actividad antioxidante.....	33
Tabla 6. Tabla de contingencia con el número de explante sin contaminación.....	36
Tabla 7. Prueba de Chi- cuadrado para la variable de contaminación y el tiempo de exposición.	37
Tabla 8. Prueba de Chi- cuadrado para la variable de contaminación y el porcentaje de NaClO.....	38
Tabla 9. Prueba de Chi- cuadrado para la variable de contaminación y los diferentes tratamientos.....	39
Tabla 10. Tabla de contingencia con el número de explantes no oxidados.....	40
Tabla 11. Prueba de Chi- cuadrado para la variable oxidación y el tiempo de exposición.	41
Tabla 12. Prueba de Chi- cuadrado para la variable oxidación y los porcentajes de NaClO.	42
Tabla 13. Prueba de Chi-cuadrado para la variable de oxidación y los diferentes tratamientos	43
Tabla 14. Tabla de contingencia para la variable presencia de callo.....	44
Tabla 15. Prueba de Chi-cuadrado para la variable de formación de callo.....	47
Tabla 16. Tabla de contingencia para la variable callo no organogénico u organogénico.	48
Tabla 17. Prueba de Chi-cuadrado para la variable callo organogénico u organogénico.	50

Tabla 18. Prueba de Chi-cuadrado para la variable de callo organogénico u organogénico, responde a la citoquinina 6-BAP.....	51
Tabla 19. Prueba de Chi-cuadrado para la variable de callo organogénico u organogénico, responde a la auxina 2,4D.	52
Tabla 20. Datos del análisis de la cuantificación de fenoles totales.	55
Tabla 21. Datos obtenidos en el análisis de la cuantificación de la capacidad antioxidante.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hoja del aire - <i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers. Fuente (Barajas, et al., 2014).....	6
Figura 2. Formación de brotes a) a partir de agua, b) a partir de tierra Fuente: (Barajas, et al., 2014).....	8
Figura 3. Explante de hoja de 7 cm de longitud.....	23
Figura 4. Proceso de desinfección a) lavado en agua corriente b) lavado en la solución de detergente al 1% c) lavado en la solución de fungicida al 0.5 % d) lavado en la solución de NaClO al 1%.....	24
Figura 5. Explantes de hoja del aire de aproximadamente 1cm ²	25
Figura 6. Contaminación de explantes a) bacteria b) hongo.....	26
Figura 7. Explante sin contaminación.....	26
Figura 8. Oxidación de explantes a) sin oxidación b) oxidado.....	27
Figura 9. Explantes de hoja a) ausencia de callo b) presencia de callo.	29
Figura 10. Explantes de hoja tomadas en el estereomicroscopio (0.65X) a) callo no organogénico b) callo organogénico (formación de raíces).	29
Figura 11. Reacción de las muestras con el método de Folin-Ciocalteu después de 30 minutos.	32
Figura 12. Muestras con el radical DPPH después de 30 minutos de reacción.	34
Figura 13. Porcentaje de contaminación con respecto a la variable NaClO y tiempos de inmersión.	36
Figura 14. Porcentaje de oxidación con respecto a la concentración de NaClO.....	40
Figura 15. Desarrollo de callo de explantes de hoja en el medio MS (1962), suplementado con 1 mg/L 2,4 D y 0,5 mg/L 6-BAP a) callo de 7 días b) callo de 15 días c) callo de 30 días d) callo de 45 días.....	45

Figura 16. Porcentaje de explantes a los 45 días de evaluación de la variable presencia o ausencia de callo.....	46
Figura 17. Explantes con formación de estructuras organogénicas (raíz).	48
Figura 18. Porcentaje de explantes a los 45 días indicando presencia de tejido no organogénico u organogénico.....	49
Figura 19. Callo utilizado para el análisis fitoquímico a) callo de 45 días, b) callo de 55 días, c) callo de 150 días, d) callo de 300 días.....	53
Figura 20. Curva de calibración para la determinación del contenido de fenoles. Eje de las X (Concentración), eje de las Y (Absorbancias).....	54
Figura 21. Comparación del contenido de fenoles de muestra in vivo e in vitro de <i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	56
Figura 22. Comparación del contenido de fenoles de muestras de callo a diferentes tiempos.	57
Figura 23. Curva de calibración del DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo). Eje de las X (Concentración), eje de las Y (Absorbancias).....	58
Figura 24. Porcentaje de reducción de la concentración de radical DPPH.	60
Figura 25. Porcentaje de reducción de la concentración de radical DPPH en callo.	61

LISTADO DE ABREVIATURAS

Medio Murashige y Skoog	MS
ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4 D
6 bencilaminopurina	6-BAP
especies reactivas de oxígeno	ROS
metabolismo ácido Crasuláceas	CAM
2,2 Difetil-1-picrihidrazilo	DPPH
Concentración encontrada del extracto	Ce
Volumen extracto utilizado	Ves
Peso muestra utilizada	Pm
hipoclorito de sodio	NaClO
ácido clorhídrico	HCl
hidróxido de sodio	NaOH
ácido naftalenacético	ANA
polifenol oxidasa	PPO
miligramos	mg
gramos	g
mililitros	mL
gramos/litro	g/L
miligramos/litro	mg/L
centímetros	cm
metros	m
centímetros cuadrados	cm ²
minutos	min
nanómetros	nm
metros sobre el nivel del mar	msnm
grados centígrados	°C
peso/volumen	p/v
volumen/volumen	v/v

RESUMEN

Muchas enfermedades están asociadas con el estrés oxidativo causado por los radicales libres, *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. es una planta utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades de tipo inflamatorias, respiratorias y crónico degenerativas. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de las combinaciones *in vitro* del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el 6 bencilaminopurina (6 BAP) sobre la inducción de callo y analizar el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante de explantes *in vivo* e *in vitro*. El contenido fenólico se determinó por el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). En la evaluación del porcentaje a callo se obtuvo un 100% con la combinación de 1 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de 6 BAP, mientras que en ausencia de reguladores de crecimiento no hubo presencia de callo. El extracto de hoja *in vivo* produjo 56,35 mg fenoles/g muestra, la hoja *in vitro* 32,34 mg fenoles/g muestra, y el callo de 42 días 0,59 mg fenoles/g muestra. La evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de hoja *in vivo* redujo la concentración de radicales libres DPPH en un 77,70%, la hoja *in vitro* un 69% y el callo de 42 días un 2,80%; demostrando que las hojas *K. pinnata* podrían ser una fuente potencial de antioxidantes naturales y prevenir enfermedades inducidas por el estrés oxidativo.

Palabras claves:

- *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers,
- 2,4-D
- 6 BAP
- MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU
- MÉTODO DE DPPH

ABSTRACT

Many diseases are associated with oxidative stress caused by free radicals, *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. is a plant used in the traditional medicine for the treatment of different diseases of type inflammatory, respiratory and chronic degenerative. The aim of this study was to evaluate the effects of *in vitro* combinations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzylaminopurine (6 BAP) on callus induction and to analyze phenols content and capacity antioxidant of explants *in vivo* and *in vitro*. The phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhyyl) method. In the evaluation of the callus percentage, 100% was obtained with the combination of 1 mg / L of 2,4-D and 0,5 mg / L of 6 BAP, whereas in the absence of growth regulators there was no presence of callus. Extract *in vivo* leaf yielded 56.35 mg phenols/g sample, *in vitro* leaf 32.34 mg phenols/g sample, and callus 42 days 0.59 mg phenols/g sample. Evaluation of the antioxidant capacity of *in vivo* leaf extract reduced the concentration of radical DPPH by 77,70%, leaf *in vitro* 69% and callus 42 days 2,80%; Demonstrating that leaves of *K. pinnata* could be a potential source of natural antioxidants and preventing diseases induced by oxidative stress.

Palabras clave:

- *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.,
- 2,4-D
- 6-BAP
- FOLIN-CIOCALTEU METHOD
- DPPH METHOD.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

La utilización excesiva de plantas para la formulación de fitofármacos, ejercen presión sobre la necesidad de una mayor biomasa en un corto periodo de tiempo, siendo esta una desventaja considerable, por las dificultades en la extracción y costos (Philips & Gamborg, 2005). Amenazando su hábitat natural y provocando que muchas especies se vean amenazadas por lo que el uso de herramientas biotecnológicas son una alternativa debido a que el cultivo *in vitro* permite obtener el cultivo masivo o producción de estos compuestos mediante diferentes técnicas (Nayvi & Jiménez, 2011).

Las plantas superiores sintetizan una gran cantidad de metabolitos secundarios, cumpliendo funciones que no resultan vitales en los tejidos, ni están involucradas en el crecimiento y desarrollo. Muchos de ellos son aprovechados por la planta ya sea; teniendo funciones específicas como: atrayentes o repelentes de insectos y otros polinizadores, o como defensa contra diferentes patógenos, teniendo una distribución restringida a fases específicas de desarrollo y a periodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes, factores ambientales o por el ataque de microorganismos (Nayvi & Jiménez, 2011; Ringuelet & Viña, 2013).

Los metabolitos secundarios se dividen de acuerdo a su naturaleza química en tres grupos: compuestos fenólicos, terpenos y compuestos nitrogenados (Buchanan, *et al.*, 2000). Las moléculas fenólicas constituyen una de las principales clases, se encuentran localizadas en todas las partes de las plantas con una concentración variable a lo largo del ciclo vegetativo y poseen muchas funciones entre ellas se destacan las propiedades

antioxidantes e antiinflamatorias (De Souza Dos Santos, *et al.*, 2011; Pattewar, 2012; Ferraro, *et al.*, 2012).

Los antioxidantes protegen a las células contra los efectos dañinos de las especies reactivas del oxígeno (ROS); siendo el exceso de estos una de las causas de mayor incidencia de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardíacas, disfunción cerebral, inflamaciones, aceleración del envejecimiento celular entre otras además que el ser humano está expuesto de forma directa o indirecta a elementos que crean radicales libres como la contaminación industrial, radiación, alimentos, tabaco, aditivos químicos en alimentos procesados y pesticidas (Llorca & Miño, 2012; Guimet, 2012; Bhatti, *et al.*, 2012).

1.2. Justificación

Las plantas superiores sintetizan una gran variedad de compuestos químicos, los cuales han sido utilizados en la medicina tradicional desde la antigüedad. (Pérez, *et al.*, 2015). Los metabolitos secundarios son usados en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y como fuentes de sustancias de interés agroquímico. Se estima que existen aproximadamente 100.000 metabolitos producidos por las plantas, donde la mayoría posee actividad biológica (Arias & Ordaz, 2011; Nayvi & Jiménez, 2011).

En los últimos años se ha demostrado que estos juegan un papel importante en la adaptación de la planta a su medio ambiente, pero también representan una fuente importante de fármacos activos (Nayvi & Jiménez, 2011). Dentro de este grupo se encuentran los fenoles o compuestos fenólicos, que se caracterizan porque se oxidan con mucha facilidad, confiriéndoles la cualidad antioxidante, siendo importantes debido a su valor nutricional y propiedades terapéuticas que ayudan a prevenir, aliviar o curar enfermedades, debido a que tienen una diversidad de actividades bioquímicas, entre ellas

la inhibición de especies reactivas de oxígeno (ROS), eliminación directa o indirecta de los radicales libres, y la alteración del potencial redox intracelular, teniendo ventajas efectivas para combatir enfermedades (Cordell, 2003; Arash, *et al.*, 2015).

Diversos autores han aislado e identificado los constituyentes químicos del género *Kalanchoe* los cuales pueden ser clasificados en alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, quinonas, esteroides, antocianinas, bufadienólidos y lípidos (Kamboj & Saluja, 2009; Cabrera, *et al.*, 2011; Rajsekhar, *et al.*, 2016). Estudios en *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers destacan compuestos como: los bufadienólidos compuestos muy activos considerados como cardioprotectores y que actúan como un potente citotóxico inhibiendo el crecimiento de células cancerígenas e impidiendo la proliferación de linfocitos entre ellos la Briofilina A y Briofilina B (Devbhuti, *et al.*, 2012; Mahata *et al.*, 2012), la quercetina un flavonoide que tiene actividad anti-leishmania, utiliza también en problemas alérgicos e inflamatorios y por su efecto antioxidante (Muzitano, *et al.*, 2006; Muzitano, *et al.*, 2009; Ferraro, *et al.*, 2012) y el escualeno que posee actividades antioxidantes y anticancerígenas (Sharadanand, 2015).

Esto hace que el estudio de los metabolitos presentes en las plantas sea un enorme reto, de ahí la necesidad de utilizar diversas tecnologías para su producción, caracterización e identificación siendo el cultivo *in vitro* una alternativa para el desarrollo de fitofármacos, debido a la rápida, eficiente producción y extracción a partir de cultivo de células o de órganos (Zabala, *et al.*, 2008), evitando barreras que impidan la obtención de dichos compuestos de forma pura, como es el caso de la interferencia de la clorofila en la extracción a partir de hojas de cultivo *in vivo*, permitiendo obtener productos con más eficiencia y en menor tiempo comparados con los métodos tradicionales (Nayvi & Jiménez, 2011).

Con este trabajo de investigación se pretende generar nuevos conocimientos y comprobar la aplicabilidad de la técnica de cultivo *in vitro*, para la cuantificación y producción de metabolitos secundarios de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., mediante cultivo de células y que se proyecten como potenciales fitofármacos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Obtener callo *in vitro* a partir de explantes de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata*) para determinar su contenido de fenoles y capacidad antioxidante.

1.3.2. Objetivos específicos

- Establecer un protocolo de desinfección adecuado para la introducción *in vitro* de explantes de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata*).
- Seleccionar un medio de cultivo con la adecuada concentración de reguladores de crecimiento que permitan la formación de callo de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata*).
- Analizar el contenido de fenoles y carácter antioxidante *in vivo* e *in vitro* a partir de explantes de hoja y callo.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Hoja del aire (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers)

1.4.1.1. Origen y distribución

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers., también es conocida con otros nombres sinónimos: *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Asch. & Schweinf, o *Bryophyllum pinnatum* (Lam.)

Kurz, *Bryophyllum calycinum* Salisb, según la base de datos del Jardín Botánico de Missouri, (2016).

Es una planta nativa de África Tropical y Madagascar, e introducida y naturalizada en los trópicos americanos, está presente en Ecuador, Colombia, Bolivia, Venezuela y Panamá (Villamizar, *et al.*, 2014).

Conocida como hoja del aire, hoja de bruja, hoja de la vida, siempreviva, inmortal, flor de aire o prodigiosa (Villamizar, *et al.*, 2014; Sharadanand & Subhash, 2015).

1.4.1.2. Clasificación taxonómica

La especie *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. se clasifica taxonómicamente según Strasburger, *et al.*, (1994) y USDA, (2005) de la siguiente forma:

- Superreino: Eukaryota
- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta/Planta con flores
- Clase: Magnoliopsida/Dicotiledónea
- Subclase: Rosidae
- Orden: Saxifragales
- Familia: Crassulaceae
- Género: *Kalanchoe*
- Sección: *Bryophyllum*
- Especie: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

1.4.1.3. Características Morfológicas

La hoja del aire es una planta suculenta perenne, que crece de 30 a 150 centímetros de altura, tiene tallos huecos y hojas carnosas de color verde oscuro que son claramente onduladas y adornadas en rojo; sus flores están agrupadas en panículas terminales y pueden ser de color verdoso, amarillento o rojizo; la corola es campanulada y rojiza, con cuatro lóbulos, con estambres en dos series de cuatro semillas numerosas (Barajas, *et al.*, 2014; González, 2015).

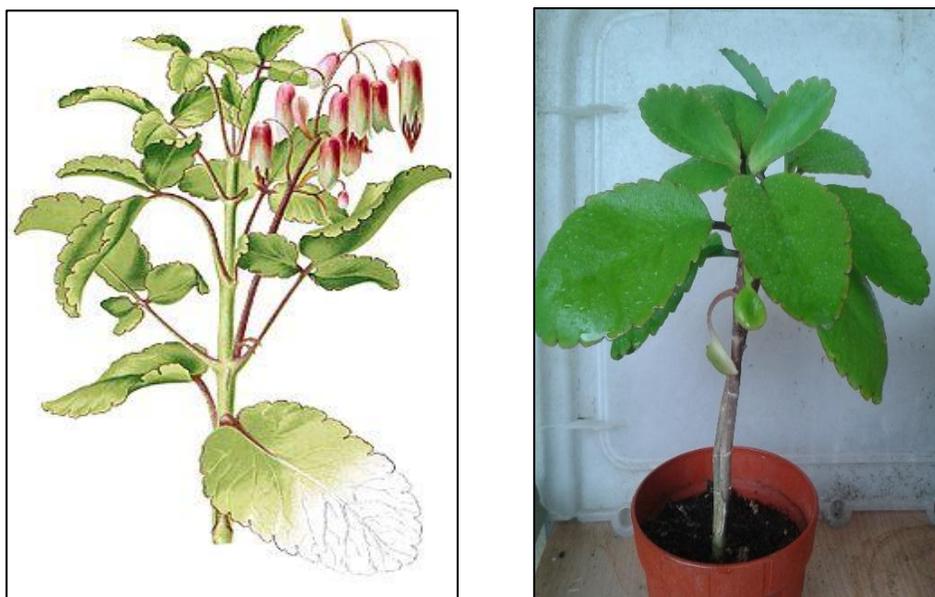


Figura 1. Hoja del aire - *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

Fuente (Barajas, *et al.*, 2014).

1.4.1.4. Ecología

Su hábitat natural incluye selvas altas perennifolias, selvas bajas caducifolias y bosques mesófilos, habita en climas cálidos, semicálidos y templados desde el nivel del mar hasta los 2600 m (Kamboj & Saluja, 2009).

Se adaptan al sol como a la sombra, al exterior o al interior, no soportan las heladas ni fuertes vientos, en invierno hay que protegerlas o mantenerlas dentro de la casa, además tiene la particularidad de limpiar el aire, no consume oxígeno, sino que lo produce (Barajas, *et al.*, 2014).

Tiene la capacidad de soportar periodos largos sin agua y su excepcional reproducción vegetativa la vuelven una planta altamente competitiva y potencial invasora, ya que este género presenta algunas adaptaciones a climas cálidos, áridos o templados; debido a la apertura nocturna de los estomas, que permanecen cerrados durante el día, reduciendo la pérdida de agua, mediante el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), siendo la ventaja del mecanismo que las plantas durante las horas calientes mantienen sus estomas cerrados, por ello se reduce considerablemente la disponibilidad de agua (Jaiswal & Sawhney, 2008; Geydan & Melgarejo, 2005; González, 2015).

Su reproducción sexual se realiza mediante la formación de flores y semillas, de cada una de sus flores se liberan semillas de un milímetro aproximadamente, cada flor puede producir hasta 900 semillas que son fácilmente dispersadas por el viento, lluvia o transportadas por animales (Jaiswal & Sawhney, 2008; Barajas, *et al.*, 2014; González, 2015).

Su reproducción asexual y la más habitual de esta especie es la propagación mediante esquejes o por plántulas que nacen de las mismas hojas (de sus bordes); debido a que, en los márgenes de cada una de las hojas, existen meristemas no diferenciados en donde nuevas plántulas se desarrollan. Las hojas que caen pueden crecer en agua o en tierra y

tener una rápida formación de brotes que nacen de los bordes de las mismas como se observa en figura 2 (Jaiswal & Sawhney, 2008; Barajas, *et al.*, 2014; González, 2015).



Figura 2. Formación de brotes a) a partir de agua, b) a partir de tierra

Fuente: (Barajas, *et al.*, 2014).

1.4.1.5. Plagas y enfermedades

Es una planta muy resistente a enfermedades, aunque ocasionalmente le afectan algunos hongos y pulgones.

Los pulgones son insectos de pequeño tamaño, chupadores que se alimentan de la savia de las plantas, pueden ser de color verde, negro, blanco y amarillo; y producen en el vegetal trastornos en su desarrollo, así como la caída de las hojas y flores. Para su eliminación se puede recurrir al uso de fitosanitarios específicos o de insecticidas anti pulgones (Fronza, 2013).

Las cochinillas algodonosas también aparecen por exceso de humedad y falta de luz. Su presencia se debe a la formación de manchas sobre el envés de las hojas que se caracterizan por tener una especie de escudo protector de color blanco. Para su

eliminación se debe sacarlas con un hisopo de algodón mojado en alcohol o si la planta es grande y en maceta, se puede lavar con agua y jabón neutro frotando muy delicadamente con una esponja para retirar los parásitos o usando productos químicos específicos (Pattewar, 2012; Ortiz, 2016).

La presencia de pequeñas áreas redondas levemente realzadas en todas las partes verdes es la sintomatología provocada por un hongo, *Puccinia spp.* más conocida como roya, si no se llega a controlar la enfermedad en uno o dos meses todas las partes atacadas se secan. Para prevenir este hongo se debe reducir la humedad ambiental, o tratarlas con fungicidas específicos después de haber eliminado todas las partes atacadas (Ortiz, 2016).

1.4.1.6. Usos y Aplicaciones

En su relación con el hombre, se utilizan las hojas para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desórdenes cardiovasculares, debido a la actividad que ejercen sobre el sistema circulatorio, mejorando la circulación periférica, la movilización del colesterol y disminuyendo la fragilidad capilar. Algunos flavonoides pueden presentar actividad hepática protectora, antialérgica, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, e incluso pueden ejercer efectos inhibidores sobre algunas enzimas (Nava, 2007).

Estudios han demostrado que el jugo de las hojas ejerce una actividad antibiótica *in vitro* frente a las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; también se reporta la presencia de actividad antifúngica en estudios *in vitro*, con un extracto acuoso de hojas de la planta (Calvopiña, *et al.*, 2010; Pattewar, 2012).

Algunas especies de *Kalanchoe* producen bufadienólidos como la Briofilina A, Briofilina B, que actúan como un potente citotóxico, inhibiendo el crecimiento de células cancerígenas e impidiendo la proliferación de linfocitos. La bryotoxina A, B y C; compuestos muy similares en estructura son aplicados en la medicina para estimular la función cardíaca (Arias & Ordaz, 2011; Devbhuti, *et al.*, 2012). El escualeno es un triterpeno que posee actividades anticancerígenas y antioxidantes (Sharadanand, 2015), y la quercetina es un flavonoide que tiene actividad anti-leishmania, antioxidante e antiinflamatoria (Muzitano, *et al.*, 2006; ; Muzitano, *et al.*, 2009).

1.4.1.7. Constituyentes fitoquímicos

Se han identificado constituyentes químicos como alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, quinonas, esteroides, antocianinas, bufadienólidos y lípidos (Kamboj & Saluja, 2009; Cabrera, *et al.*, 2011; Rajsekhar, *et al.*, 2016), macroelementos (magnesio, calcio, potasio, fósforo, sodio), microelementos (hierro, zinc) y vitaminas (ácido ascórbico, rivo flavina, tiamina piridoxina, glicina, cisteína, caseína hidrolizada, nicotinamida realizados en tamizajes fitoquímicos mediante cromatografía (Cabrera, *et al.*, 2011; Phatak & Hendre, 2014).

1.4.2. Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales consiste en tomar una porción de una planta a la que se denominará explante y colocarlo en un medio nutritivo estéril (Segretín, 2011). Permitiendo la obtención de altas tasas de multiplicación a partir de un explante inicial, gracias a la totipotencia de las células vegetales (Pereira, 2004).

Comprende una gama de técnicas, métodos y estrategias *in vitro* que son parte del grupo de tecnologías llamadas biotecnología de plantas, permitiendo el desarrollo tecnológico agrícola y la conservación de la biodiversidad de las especies vegetales, además de la obtención de plantas resistentes a patógenos y enfermedades; en estudios biogénéticos y enzimáticos como fuente para el aislamiento de metabolitos secundarios y comercialmente para la rápida propagación de las plantas de interés; teniendo en cuenta el genotipo de la planta madre utilizada para la influencia en los resultados (Carrillo, 2009, Segretín, 2011; Nayvi & Jiménez, 2011).

El éxito de la técnica depende de muchos factores, entre ellos la edad de la planta (a mayor edad, menor potencial de regeneración), el tipo de explante, ya que la elección de este depende del objetivo que se quiere conseguir, el genotipo y las condiciones ambientales (Roca & Mroginski, 1993, Góes, *et al.*, 2009).

Cuando se ha determinado los objetivos que se pretenden alcanzar en el cultivo *in vitro*, se debe considerar los componentes del medio de cultivo, debido a que las células requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos conocidos como macronutrientes y micronutrientes, indispensables para su crecimiento y diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos (Segretín, 2011).

Dentro de sus componentes tenemos:

Agua: Representa el 95% del medio de cultivo, en esta se disuelven los nutrientes que consume la planta, los cuales se transportan mediante el sistema vascular de la misma (Ayerbe, 1990; Sharry, *et al.*, 2015).

Fuente de carbono: Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono para cubrir sus necesidades, ya que no crecen en las condiciones apropiadas para realizar la fotosíntesis, siendo este el responsable de satisfacer las necesidades fotosintéticas de la planta (Ayerbe, 1990; Segretín, 2011).

Sales minerales: Se encuentran representadas por dos grandes grupos: macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre) y microelementos (hierro, cobalto, zinc, níquel, boro, aluminio, manganeso, molibdeno, cobre, yodo), que se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas (Sharry, *et al.*, 2015).

Vitaminas: aunque las plantas *in vitro* pueden producir sus propias vitaminas se añaden al medio como un suplemento, considerándose como factores alimenticios secundarios requeridos en pequeñas cantidades empleadas para su crecimiento y diferenciación con papeles catalíticos, en el metabolismo se utilizan las vitaminas B1(tiamina), B3(ácido nicotínico), B6 (piridoxina), vitamina H (biotina), vitamina E (tocoferol), entre otras (Ayerbe, 1990; Puchea & Rodriguez, 2000; Segretín, 2011).

Reguladores de crecimiento: son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por plantas superiores, influyen en el crecimiento y el desarrollo de la planta (Ayerbe, 1990).

Los tipos de hormonas más frecuentes son auxinas, citoquininas, gibelinas y brasinolidas; las mismas que se utilizan en distintas concentraciones ya sea individualmente o combinadas para inducir la respuesta que se espera (Sharry, *et al.*, 2015; Góes, *et al.*, 2009).

Agente gelificante: permite al medio de cultivo tomar una consistencia semisólida o sólida, funciona como soporte del explante permitiendo su desarrollo (Sharry, *et al.*, 2015).

Es un polisacárido con un alto peso molecular que es capaz de retener el agua y absorber compuestos, existiendo diferentes marcas comerciales que pueden usarse como la agarosa, bacto agar, phytigel, gelrite (Ayerbe, 1990).

Otros componentes: estos no forman parte de los constituyentes esenciales del medio; sin embargo, se puede añadir agua de coco, caseína hidrolizada los cuales estimulan la división celular; carbón activado, ácido cítrico, ácido ascórbico que actúan como antioxidantes (Sharry, *et al.*, 2015).

Medio de Cultivo: existen diferentes medios de cultivo dependiendo la especie con la que se trabaje, los más usados son el Murashige y Skoog, 1962 (MS), medio de Chu (N6) y medio de Gamborg (B5) (Ayerbe, 1990; Sharry, *et al.*, 2015).

1.4.3. Etapas de la micropropagación *in vitro*

1.4.3.1. Fase de preparación

En esta etapa se seleccionan y acondicionan las plantas madres, las mismas que van a ser utilizadas en el proceso de cultivo *in vitro*; es recomendable mantenerlas en cuarentena, controlando condiciones de luz, temperatura, humedad, y riego apropiado durante un periodo de tiempo (Roca & Mroginski, 1993; Daorden, 2007).

Se considera también las características fenotípicas al momento de la selección de los explantes siendo la más importante la edad de la planta (a mayor edad, menor potencial de regeneración), y que esté libre de enfermedades (Segretín, 2011).

Es la etapa fundamental para el desarrollo de un sistema de micropropagación eficiente, además tiene una alta influencia en la calidad de las plantas finalmente obtenidas (Pérez, 1998, Sharry, *et al.*, 2015).

1.4.3.2. Fase de desinfección

El propósito de esta etapa es obtener explantes viables para la multiplicación *in vitro*, para esto se selecciona partes de la planta madre; ya sean yemas, hojas, raíces, semillas, entre otras (Segretín, 2011; Sharry, *et al.*, 2015).

La contaminación es uno de los principales problemas existiendo dos fuentes donde se pueden originar: contaminación exógena o endógena.

Contaminación exógena, se encuentra en la superficie del explante, para eliminar los contaminantes externos, este proceso puede incluir lavados con tensoactivos, utilización de bactericidas y fungicidas de contacto, hipoclorito de sodio o calcio a diferentes concentraciones, alcohol, entre otros; seguidos por enjuagues con agua estéril o agua destilada (Pierik, 1990; Sharry, *et al.*, 2015).

Contaminación endógena, se encuentra en el interior de los tejidos, se puede utilizar antibióticos en el medio de cultivo o hacer lavados con los mismos por tiempos más prolongados, o con fungicidas sistémicos (Valentin, 2005; Sharry, *et al.*, 2015).

1.4.3.3. Fase de establecimiento

Después de la desinfección y en condiciones de asepsia se cultiva el tejido en el medio escogido, dentro de la cámara de flujo laminar; el tamaño del explante juega un rol importante ya que las probabilidades de propagación se reducen o aumentan, al igual que la contaminación (Simón & Lluisa, 2006). El objetivo primordial en esta etapa es establecer el explante en el medio de cultivo para su posterior multiplicación, lo que podría involucrar: estimulación en la formación de brotes axilares, iniciación en brotes adventicios (hojas, brotes) o la formación de callo para el desarrollo de suspensiones celulares, embriogénesis somática o la obtención de metabolitos secundarios (Pérez, 1998; Segretín, 2011).

1.4.3.4. Fase de multiplicación

El objetivo de esta fase es obtener la mayor cantidad de plantas o de callo a partir de cada explante que previamente se estableció. Cada una de las estructuras se divide y se trasplanta en un medio nuevo y fresco (Simón & Lluisa, 2006).

1.4.4. Callogénesis

El callo es un tejido no organizado y poco diferenciado formado por células en proliferación que se producen tanto *in vivo* como *in vitro* (Alvez, *et al.*, 2012), obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una indiferenciación celular, presentando una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido (Pérez, 2010).

Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, que varían según la textura, apariencia externa, y composición celular, pero por lo general son heterogéneos en su composición celular (Segretín, 2011).

La coloración de este tejido también varía, aun derivando de la misma especie se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras otros pueden ser de diferentes tonos amarillo, verde, café o rojo. El tipo y grado de pigmentación está influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, entre otras (Perez, 2010).

El crecimiento varía dependiendo de la especie con la que se este trabajando y esta, puede cambiar decreciendo o incrementándose de acuerdo a la especie y a los reguladores de crecimiento que se le adicionen al medio, mediante la combinación de auxinas y citocininas (Bravo, 1999; Sharry, *et al.*, 2015).

La callogénesis es ampliamente utilizada para estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares con la finalidad de clonar plantas a través de la formación de órganos y embriones (Bravo, 1999; Sharry, *et al.*, 2015).

1.4.4.1. Mantenimiento del tejido calloso

El callo toma de 3 a 8 semanas en alcanzar el tamaño suficiente para efectuar un subcultivo, transfiriéndose en éste pequeñas piezas de tejido (50 a 150 mg) a un medio nuevo. Es importante transferir fragmentos de tejido visiblemente sano sin contaminación por hongos ni bacterias y sin necrosis (fenolización). Cuando esté establecido, es necesario cambiarlo con una frecuencia que varíe de 2 a 6 semanas, porque la falta de transferencia lleva irremediablemente al debilitamiento, intoxicación y muerte del tejido. Esto es debido a que el crecimiento y la multiplicación celular son tan intensos que provocan el gasto de los nutrientes del medio, y la acumulación de metabolitos de desecho celular que se vuelven tóxicos para el tejido (Pierik, 1990; Nayvi & Jiménez, 2011; Sharry, *et al.*, 2015).

Un callo puede formar brotes, raíces, embriones, o simplemente continuar proliferando como callo, y hacer uso de cultivos celulares o cultivos en suspensión para la producción de metabolitos secundarios; dependiendo de las cantidades relativas de auxinas y citoquininas suministradas (Nayvi & Jiménez, 2011).

Por otra parte, los efectos sinérgicos de las hormonas pueden ser modificados por otros factores, como son los constituyentes del medio (azúcar, vitaminas, aminoácidos, entre otros) y las condiciones físicas (iluminación, consistencia del medio, entre otras), aunque siempre se manifestará como factor dominante el balance hormonal (Pierik, 1990).

1.4.5. Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos biosintetizados por las células vegetales, pero no son esenciales para la misma, tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente y tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales y sirven de defensa frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales, además pueden ser de gran utilidad para el ser humano al ser usados como: fármacos, pesticidas, colorantes, saborizantes, fragancias, entre otros (Ávalos & Pérez, 2009; Zabala, *et al.*, 2008).

Se dividen de acuerdo a su naturaleza química en tres grupos: compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, ligninas y taninos), terpenos (entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales) y compuestos nitrogenados (alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos) (Buchanan, *et al.*, 2000).

Se forman después de que el crecimiento ha cesado (fase estacionaria) de ahí que una de las estrategias utilizadas es el cultivo en dos fases, una para el crecimiento y otra para la producción (Pérez, 1998). La primera estrategia para lograr una línea celular altamente productora de un metabolito es la selección adecuada de la fuente de explante; recomendándose el uso de una parte de la planta donde normalmente se ha observado la acumulación del metabolito, pues está demostrado que líneas obtenidas de diferentes partes, presentan productividades diferentes de metabolitos secundarios (Nayvi & Jiménez, 2011).

Los compuestos fenólicos son los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta, actualmente hay un interés creciente debido a su amplia actividad antioxidante

dependiendo del sustituyente del hidróxilo de su anillo fenólico, pueden actuar como agentes quelantes de los iones de hierro y cobre, como captadores de radicales como es el radical hidróxilo (Ávalos & Pérez, 2009).

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios tenemos: el cultivo de células (callo, suspensiones celulares), cultivo de órganos, y como estrategias para ayudar al incremento de los metabolitos de interés se encuentran la optimización de la composición del medio, selección de líneas celulares, inmovilización celular, elicitores, biotransformación, transformación genética, entre otros (Zabala, *et al.*, 2008; Nayvi & Jiménez, 2011).

1.4.5.2. Técnicas empleadas para evaluar la presencia de metabolitos secundarios

En los últimos años ha cobrado especial interés, el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y en especial la evaluación de la capacidad antioxidante asociada a ellos (Nayvi & Jiménez, 2011).

Para evaluar la presencia de metabolitos secundarios en las plantas se usan diferentes técnicas dependiendo el interés por algún compuesto producido por estas, entre estas tenemos:

1.4.5.2.1. Contenido de fenoles

El contenido de fenoles totales se basa en el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu expresado como miligramos de equivalentes de ácido gálico/100 gramos de muestra, el ensayo mide la capacidad que tienen los polifenoles para actuar como reductores de

molibdeno (VI) en el complejo molibdotungstato, como resultado de tal reducción, el reactivo de color amarillo, adquiere un intenso color azul a violeta, que es cuantificado espectrofotométricamente a 765 nanómetros (nm) (Nava, 2007).

El ácido gálico es un compuesto fenólico simple ampliamente empleado en este ensayo como estándar de comparación. Sin embargo, ocasionalmente se emplea también como estándar de comparación y expresión de resultados polifenoles como catequina o los ácidos: tánico, clorogénico, caféico, vanílico y ferúlico (Chuquimia, *et al.*, 2008).

1.4.5.2.2. Capacidad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante se basa en la medición de la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes para reaccionar con un radical libre determinado (Medina, 2009).

Entre aquellos ensayos, cabe destacar los siguientes:

- Ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)
- Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, o Capacidad Antioxidante como Equivalentes Trolox)
- Ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil)

El ensayo de DPPH consiste en medir la capacidad de los antioxidantes de una muestra para “apagar o neutralizar” un radical libre, empleando como radicales libres moléculas que difiere totalmente de cualquier radical libre o especie reactiva generada por nuestro organismo (Medina, 2009).

1.4.6. Hipótesis

El callo *in vitro* de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata*) inducido por la adecuada combinación de auxinas y citoquininas presentan contenido de fenoles y actividad antioxidante.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.

2.1. Localización del ensayo

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, localizada en Sangolquí, Av. General Rumiñahui, s/n, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; a una altitud de 2516 msnm.

2.2. Fase de campo – Obtención del material vegetal

Se recolectó dos plantas de hoja del aire de la Reserva Biológica Jatun Sacha, ubicada en el Tena E436 en la provincia de Napo, Ecuador, a una altitud de 510 msnm, las cuales fueron trasladadas a un mini invernadero dentro de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, manteniendo condiciones de temperatura y humedad.

Se realizó la siembra en macetas y se preparó un sustrato compuesto por dos partes: una de tierra y una de abono orgánico previamente autoclavadas a 121°C durante 30 minutos.

2.2.1. Pre-tratamiento de desinfección y control fitosanitario

Para eliminar cualquier microorganismo patógeno que interfiera previo a la introducción *in vitro*, se utilizó el fungicida sistémico benomil al 0,5% p/v de gran eficacia para tratamientos preventivos como curativos, ya que este producto se absorbe por las hojas y raíces de las plantas tratadas (ICA, 2015).

Dicho tratamiento consistió en una aplicación a nivel foliar con benomil al 0.5% p/v, colocada una vez a la semana durante un mes. Adicionalmente se realizó una aspersión semanal con el bioestimulante Germa-BR02 en el área foliar a una concentración de 0.5% v/v para estimular la formación de brotes (GERMOPLANTA, 2016).

2.3. Fase de laboratorio

La fase de laboratorio de la presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales y Docencia de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí.

2.3.1. Selección de los explantes

Realizado el pre-tratamiento, se seleccionó la planta madre y se cortaron los explantes (hojas) de 7 – 9 centímetros de longitud como se observa en la figura 3.

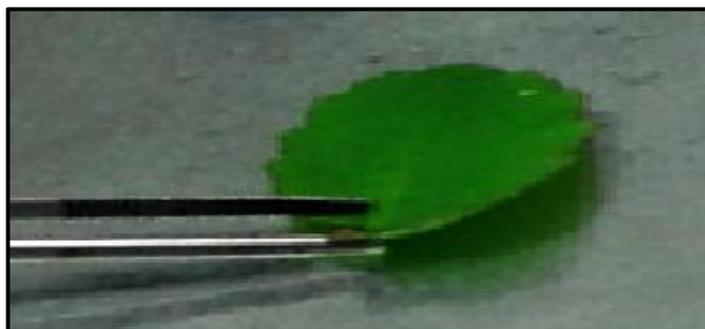


Figura 3. Explante de hoja de 7 cm de longitud.

2.3.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo para la introducción del material vegetal fue un Murashige & Skoog o MS (1962), con vitaminas cuya composición se detalla en el Anexo “A”, con 30 g/L de glucosa como fuente de carbono, ajustado a un pH de 5,75, con HCl o NaOH 1N, con 7,5 g/L de bactoagar como agente gelificante, y sometido a un proceso de esterilización en autoclave a 121° C durante 30 minutos.

2.3.3. Desinfección de explantes

Se lavó los explantes con agua corriente para eliminar el exceso de tierra o impurezas durante 30 minutos. A continuación, se sumergió los explantes en una solución de detergente al 1% p/v durante 10 minutos y se realizó tres lavados con agua destilada con el fin de remover todo el detergente remanente en los explantes.

Enseguida se sumergió en una solución de fungicida “benomil” al 0.5% p/v durante 10 minutos, inmediatamente los explantes se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) más 3 gotas de Tween 20 por litro de solución a diferentes concentraciones 0,5% ,1% y 1.5% v/v durante 10 y 20 minutos respectivamente;

consecutivamente se realizó 3 lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar, en condiciones totalmente asépticas para evitar cualquier contaminación, (figura 4). Los tratamientos de desinfección para esta etapa se observan en la Tabla 1.

Se realizaron 20 repeticiones por cada tratamiento de desinfección, teniendo como unidad experimental un explante por frasco.

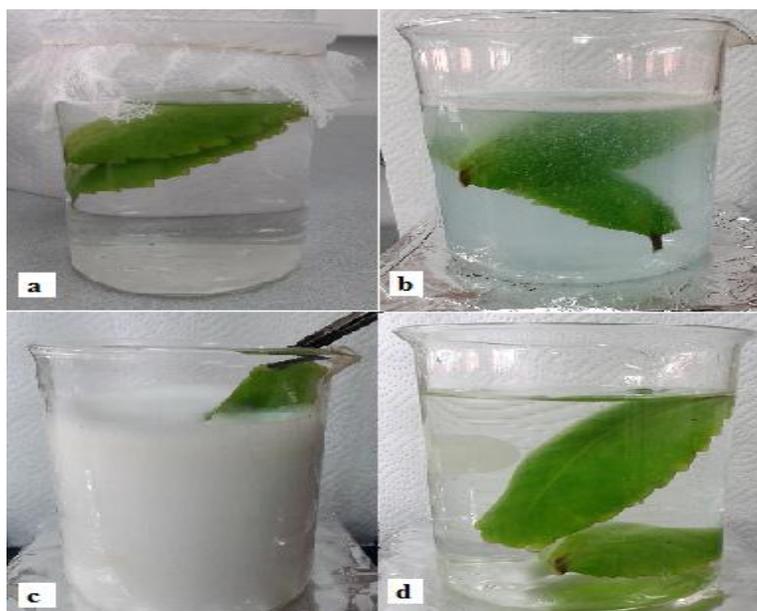


Figura 4. Proceso de desinfección a) lavado en agua corriente b) lavado en la solución de detergente al 1% c) lavado en la solución de fungicida al 0.5 % d) lavado en la solución de NaClO al 1%.

Tabla 1.
Tratamientos de desinfección de los explantes de hoja.

Tratamiento	Concentración de NaClO (v/v)	Tiempo inmersión (min)
1	1.5%	20
2	1 %	20
3	0.5%	20
4	1.5%	10
5	1 %	10
6	0.5%	10

Los explantes fueron sembrados dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones totalmente asépticas para evitar contaminación del medio ambiente y/o del operador. De cada hoja, se cortó de 8 a 12 explantes de aproximadamente 1 cm^2 (figura 5), y se colocó un explante en la superficie del medio de cultivo colocando el envés de la hoja con el mismo.

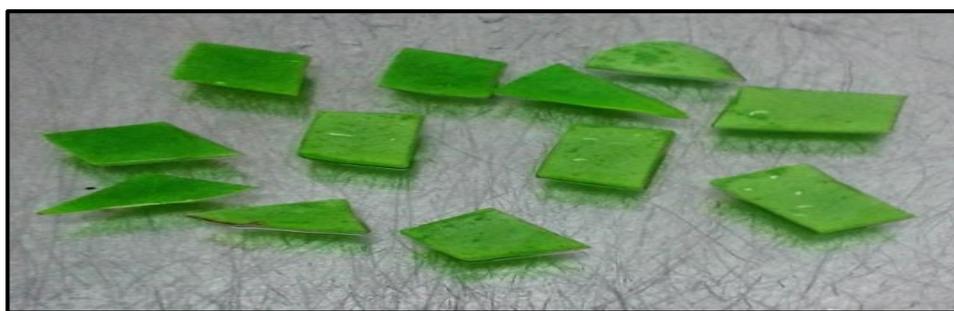


Figura 5. Explantes de hoja del aire de aproximadamente 1 cm^2 .

Los parámetros evaluados durante esta etapa fueron la contaminación y oxidación de los explantes, a los 15 días de iniciado el ensayo, donde se observó: porcentaje de explantes contaminados por hongo o bacteria y porcentaje de oxidación.

Las variables evaluadas se detallan a continuación:

La contaminación se determinó mediante observación y se asignó el valor de “1” a explantes contaminados sean por hongo o bacteria (figura 6) y con “0” a explantes sin contaminación (figura 7).



Figura 6. Contaminación de explantes a) bacteria b) hongo



Figura 7. Explante sin contaminación

La oxidación (necrosamiento) fue realizada por observación, basado en la coloración del explante, se asignó el valor de “1” a los explantes oxidados (color amarillo o café), y el valor de “0” a los no oxidados (figura 8).



Figura 8. Oxidación de explantes a) sin oxidación b) oxidado

2.3.4. Inducción a callo

Una vez que los explantes pasaron la etapa de desinfección, se eligió el mejor tratamiento y se inició la etapa de inducción de callo.

Se utilizó el protocolo de Santos, *et al.*, (2014), empleando el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962), con 30 g/L de glucosa como fuente de carbono, ajustado a un pH de 5,75, con 7,5 g/L de bactoagar como agente gelificante, y modificando las concentraciones de reguladores de crecimiento, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) y 6 bencilaminopurina (6-BAP) a diferentes concentraciones (Tabla 2), para establecer el medio adecuado en donde se van a desarrollar el callo. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121° C durante 30 minutos.

El material vegetal sembrado dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones totalmente asépticas y los medios se incubaron a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones de oscuridad, debido a que el 2,4 D es fotosensible y humedad relativa $50 \% \pm 2$.

Se realizó 30 repeticiones por tratamiento y para la muestra control se realizó 10 repeticiones bajo las mismas condiciones con excepción de la adición de los reguladores de crecimiento.

Tabla 2.
Tratamientos con combinaciones de 2,4 D y 6-BAP para la fase de inducción de callos.

Tratamiento	Concentración de 2,4 D (mg/L)	Concentración de 6-BAP (mg/L)
0 (control)	0	0
1	0.25	0.5
2	0.5	0.5
3	1	0.5
4	0.25	1
5	0.5	1
6	1	1

2.3.4.1. Formación de callo

La formación de callo se evaluó a los 30 y 45 días, mediante observación. La Tabla 3 detalla la valoración para las variables de presencia o ausencia de callo y de callo no organogénico u organogénico (figura 9 y 10).

Tabla 3.
Valoración para las variables en la formación de callo.

Formación de callo	Valor
Presencia callo	“1”
Ausencia de callo	“0”
Callo no organogénico	“1”

Callo organogénico	“0”
--------------------	-----

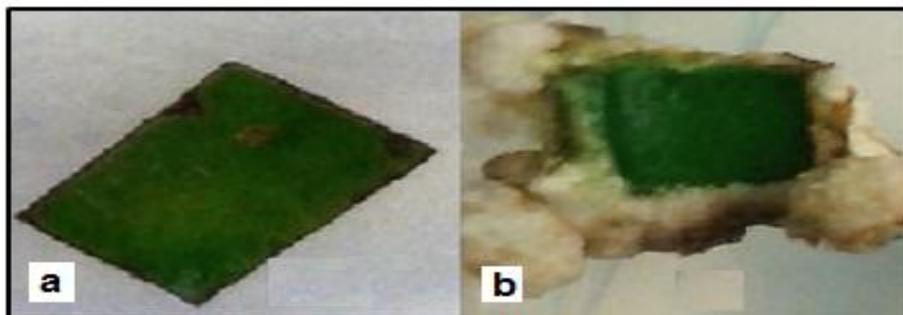


Figura 9. Explantes de hoja a) ausencia de callo b) presencia de callo.

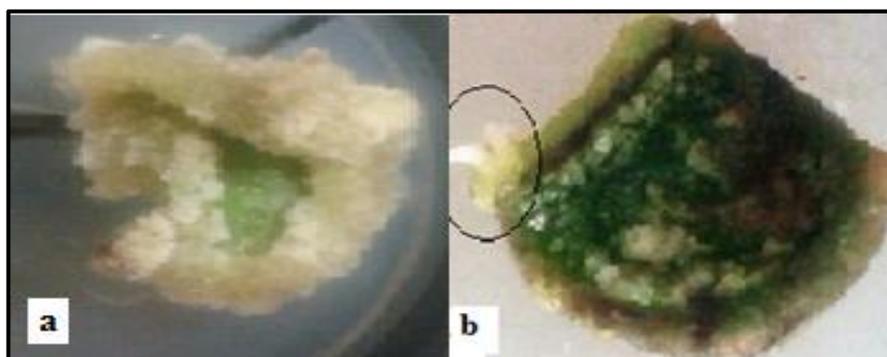


Figura 10. Explantes de hoja tomadas en el estereomicroscopio (0.65X) a) callo no organogénico b) callo organogénico (formación de raíces).

2.3.4.2. Multiplicación de callo

Cada 45 días se realizó subcultivos del callo formado, transfiriendo pequeñas piezas de tejido a un medio nuevo, que se encontraba sin contaminación sea por hongo o

bacteria y sin presencia de oxidación (necrosamiento). El callo se transfirió a un medio Murashige & Skoog (1962), suplementado con 0,5 mg/L de 6-BAP y 1 mg/L de 2,4 D, sin embargo, también se dejó crecer frascos con el callo obtenido durante varios meses para comparación en los análisis posteriores.

2.4. Preparación de los extractos para los análisis del contenido de fenoles y actividad antioxidante

Las muestras de las hojas *in vivo* e *in vitro* fueron previamente secadas en la estufa marca Memmert a 30°C hasta que hayan perdido toda su humedad, posteriormente se pulverizaron en un mortero y se guardó en un tubo Falcon hasta su análisis, los callos se mantuvieron en el medio de cultivo en condiciones de oscuridad por el uso del 2,4 D hasta su análisis.

2.4.1. Determinación del contenido de fenoles

La preparación de los extractos *in vivo* e *in vitro* consistió en tomar 0,105 g de polvo fino con 10 mL de metanol al 80%, 3g de cada muestra de callo con 5 mL de metanol al 80%, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y bajo oscuridad durante 48 horas, este método sirve para la extracción de los principios activos de la planta. Después de este tiempo, se centrifugó y se extrajo el sobrenadante con una micropipeta.

Previo al ensayo se realizó la curva de calibración, utilizando una solución estándar de ácido gálico y realizando las siguientes diluciones 0, 1, 2, 3, 5, 10 mL de agua destilada con concentraciones de 0, 50, 100, 200, 300 y 500 mg/L Para la obtención de los extractos, se centrifugó los tubos Falcon y se extrajo el sobrenadante con una micropipeta.

El ensayo consistió en colocar: 0,1 mL del extracto, 1,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, se agitó y se colocó 1,4 mL de bicarbonato de sodio (7,5%). La preparación del control consistió en agregar 0,1 mL de metanol con 1,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, este se agitó y se colocó 1.4 mL de bicarbonato de sodio (7,5%) como se detalla en la Tabla 4 (Arash, *et al.*, 2015).

Tabla 4.
Datos para determinar el contenido de fenoles.

	Extracto (mL)	Metanol (mL)	Reactivo Folin-Ciocalteu (mL)	Bicarbonato de sodio (7.5%) (mL)
Control	0	0,1	1,5	1,4
Muestra	0,1	0	1,5	1,4

Se dejó reposar durante 30 minutos en oscuridad, para permitir la reacción (figura 11) y posteriormente se midió la absorbancia a 765 nm utilizando un espectrofotómetro marca Genesys 10v, donde la concentración de fenoles de la muestra será interpolada a partir de la curva de calibración realizada (Arash, *et al.*, 2015). El ensayo se realizó por triplicado.

El contenido de fenoles se expresó en mg fenoles/g muestra calculada mediante la siguiente fórmula

$$\text{Contenido de fenoles} = \frac{C_e * V_{es}}{P_m}$$

Dónde:

Ce = concentración encontrada extracto (mg/L)

Ves = Volumen extracto utilizado (mL)

Pm = peso muestra utilizada (g)



Figura 11. Reacción de las muestras con el método de Folin-Ciocalteu después de 30 minutos.

2.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante

La preparación de los extractos consistió en 0,016 g de muestra *in vivo* con 10 mL de metanol al 80%, 0,010 g de muestra *in vitro* con 10 mL de metanol al 80%, 3g de callo con 5 mL de metanol al 80%; a temperatura ambiente y bajo oscuridad durante 48 horas, este método sirve para la extracción de los principios activos de la planta. Después de este tiempo, se centrifugó y se extrajo el sobrenadante con una micropipeta.

La capacidad antioxidante se realizó mediante el ensayo de eliminación de radicales DPPH. La técnica consiste en la captación de radicales libres, determinando la concentración de compuestos antioxidantes que son capaces de captar o eliminar los radicales libres del reactivo DPPH (Ainsworth & Gillespie, 2007).

El ensayo consistió en colocar: 0.5 mL del extracto, 3 mL de metanol y 0.3 mL de DPPH. El blanco contenía: 3.3 mL de metanol, 0.5 mL de extracto y el control consistió en: 3.5 mL metanol y 0.3 mL de DPPH como se detalla en la Tabla 5. El ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 5.
Datos para la determinación de la actividad antioxidante.

	Metanol (mL)	Extracto (mL)	DPPH (mL)
Blanco	3.3	0.5	0
Control	3.5	0	0.3
Muestra	3	0.5	0.3

La mezcla de reacción se agitó y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos (figura 12), después de este tiempo se midió la absorbancia a 517 nm utilizando un espectrofotómetro marca Genesys 10v.

El porcentaje de radicales libres DPPH eliminados puede ser calculado mediante la fórmula (Zhu, *et al.*, 2006; Marinova & Batchvarov., 2011; Arash, *et al.*, 2015).

$$\%DPPH = \frac{|Absorbancia\ del\ control - Absorbancia\ de\ la\ muestra|}{|Absorbancia\ del\ control|} \times 100$$



Figura 12. Muestras con el radical DPPH después de 30 minutos de reacción.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

El estudio investigativo para la “Obtención de callo *in vitro* a partir de explantes de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) y su posterior determinación del contenido de fenoles y de la capacidad antioxidante.”, consistió en la evaluación de cuatro etapas. Primero la estandarización del protocolo de desinfección a partir de explantes de hoja, la segunda de la inducción de callo mediante la combinación de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, seguido de la multiplicación de callo y como fase final el análisis fitoquímico.

3.

3.1. Desinfección e introducción de las muestras vegetales

Durante la fase de desinfección e introducción de explantes de hoja del aire, se evaluó la contaminación y oxidación a los 15 días de iniciado el ensayo. Se probó seis tratamientos con variaciones de hipoclorito de sodio (1,5%, 1% y 0,5%) y el tiempo de inmersión (10 y 20 minutos) detallados en la tabla 1 del capítulo 2.

3.1.1. Contaminación

3.1.1.1. Análisis Exploratorio

La tabla 6 detalla el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos empleados en la fase de desinfección, indicando el número de explantes no contaminados.

Tabla 6.
Tabla de contingencia con el número de explante sin contaminación.

		Concentración de hipoclorito de sodio		
		1.5%	1%	0.5%
Tiempo de inmersión	20 min	16	14	7
	10 min	16	15	6

En la figura 13 se observa que los tratamientos T1 (1,5% NaClO, 20 min) y T4 (1.5% NaClO, 10 min) alcanzaron una asepsia del 80% al presentar una mínima cantidad de explantes contaminados, T5 (1% NaClO, 10 min) obtuvo un 75%, y el T2 (1% NaClO, 20 min) un 70% de explantes libres de contaminación convirtiéndolos en los tratamientos más exitosos.

En los tratamientos con una menor concentración de hipoclorito de sodio se observó una mayor cantidad de explantes contaminados.

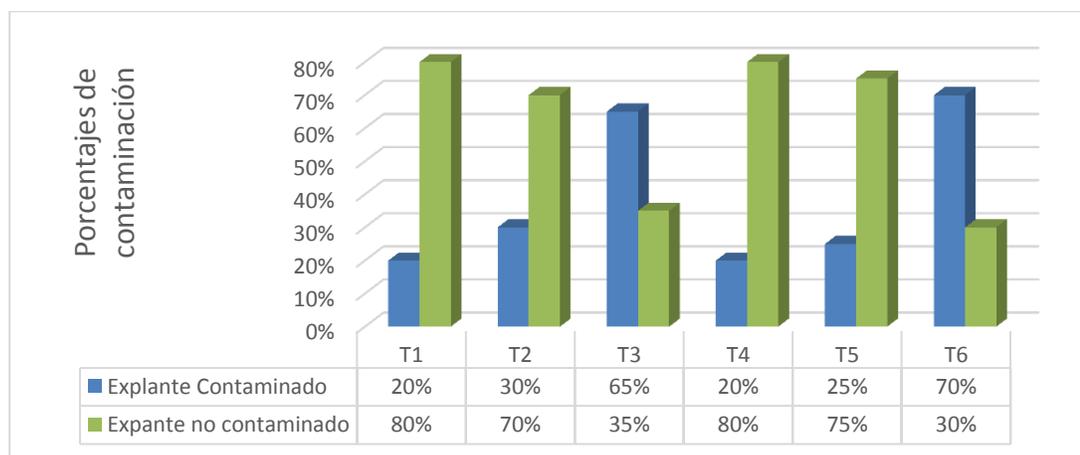


Figura 13. Porcentaje de contaminación con respecto a la variable NaClO y tiempos de inmersión.

3.1.1.2. Análisis Inferencial

Se analizó el parámetro de contaminación para ver si existe correlación con los tiempos empleados mediante la prueba de Chi-cuadrado (Cuadro 1). La tabla cruzada indica la proporción de explantes contaminados durante los 10 y 20 minutos. Al ser una tabla de 2x2 se realizó la prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher que se interpreta cuando en alguna de las celdas hay una frecuencia menor a 5.

La prueba de Chi-cuadrado obtuvo un $\chi^2 = 0,000$ y un valor $p=1$ ($p=100\%$), mayor al nivel de significancia ($\alpha = 5\%$), aceptando que el tiempo de exposición no influye en la contaminación de los explantes e indicando que estos son independientes en la respuesta.

La prueba exacta de Fisher obtuvo un valor- $p = 0,579$, mayor a ($\alpha = 5\%$), aceptando que el tiempo no interviene en la contaminación.

Tabla 7.
Prueba de Chi-cuadrado para la variable de contaminación y el tiempo de exposición.

Tabla cruzada					
		tiempo (min)			
		10	20	Total	
Contaminación	0	Recuento	42	42	84
		% dentro de tiempo (min)	70,0%	70,0%	70,0%
	1	Recuento	18	18	36
		% dentro de tiempo (min)	30,0%	30,0%	30,0%
Total		Recuento	60	60	120
		% dentro de tiempo (min)	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,000 ^a	1	1,000		
Corrección de continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,000	1	1,000		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,579
Asociación lineal por lineal	,000	1	1,000		
N de casos válidos	120				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 18,00.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Se evaluó si el parámetro de contaminación tiene correlación con los porcentajes de NaClO empleados mediante la prueba de Chi-cuadrado (Cuadro 2), La tabla cruzada indica la proporción de explantes contaminados en los diferentes porcentajes de NaClO empleados y se obtuvo un $\chi^2 = 5,952$ y un valor $p=0,051$ ($p=5,1\%$), mayor al nivel de significancia ($\alpha = 5\%$), aceptando que el porcentaje de NaClO no influye en la contaminación de los explantes.

Tabla 8.
Prueba de Chi- cuadrado para la variable de contaminación y el porcentaje de NaClO.

Tabla cruzada

		% NaClO			Total	
		,5	1,0	1,5		
Contaminación	0	Recuento	33	28	23	84
		% dentro de % NaClO	82,5%	70,0%	57,5%	70,0%
	1	Recuento	7	12	17	36
		% dentro de % NaClO	17,5%	30,0%	42,5%	30,0%
Total		Recuento	40	40	40	120
		% dentro de % NaClO	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,952 ^a	2	,051
Razón de verosimilitud	6,092	2	,048
Asociación lineal por lineal	5,903	1	,015
N de casos válidos	120		

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5.
El recuento mínimo esperado es 12,00.

Para analizar si los parámetros tienen correlación con los tratamientos empleados se realizó la prueba de Chi-cuadrado, como se observa en el cuadro 3. La tabla cruzada indica la proporción de explantes contaminados para cada tratamiento, mientras que la

prueba de Chi-cuadrado obtuvo un $\chi^2 = 7,619$ y un valor $p = 0,179$ ($p = 17,9\%$), mayor al nivel de significancia ($\alpha = 5\%$), aceptando la H_0 indicando que la variable de contaminación es independiente de los tratamientos empleados.

Tabla 9.
Prueba de Chi- cuadrado para la variable de contaminación y los diferentes tratamientos.

Contaminación * Tratamiento

Tabla cruzada

		Tratamiento						Total	
		T1	T2	T3	T4	T5	T6		
Contaminación	0	Recuento	10	15	17	13	13	16	84
		% dentro de Tratamiento	50,0%	75,0%	85,0%	65,0%	65,0%	80,0%	70,0%
	1	Recuento	10	5	3	7	7	4	36
		% dentro de Tratamiento	50,0%	25,0%	15,0%	35,0%	35,0%	20,0%	30,0%
Total		Recuento	20	20	20	20	20	20	120
		% dentro de Tratamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7,619 ^a	5	,179
Razón de verosimilitud	7,668	5	,176
N de casos válidos	120		

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5.
El recuento mínimo esperado es 6,00.

3.1.2. Oxidación

3.1.2.1. Análisis Exploratorio

A los 15 días de iniciado el ensayo se evaluó la oxidación o necrosamiento de los explantes, en la tabla 7 se observa que los tratamientos con una concentración de

hipoclorito de sodio al 1,5% provocan oxidación en el explante. Los tratamientos están detallados en la tabla 1 del capítulo 2.

La figura 14 indica que a mayor concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión la oxidación en los explantes es alta, mientras que, al disminuir la concentración y el tiempo, la oxidación es menor, presentando el tratamiento T5 (1% NaClO, 10 min) un 75% y el T6 (0,5% NaClO, 10 min) un 85% de explantes no oxidados, pero existiendo presencia de contaminación.

Tabla 10.

Tabla de contingencia con el número de explantes no oxidados.

		Concentración de hipoclorito de sodio (NaClO)		
		1.5%	1%	0.5%
Tiempo de inmersión	20 min	2	7	13
	10 min	7	15	17

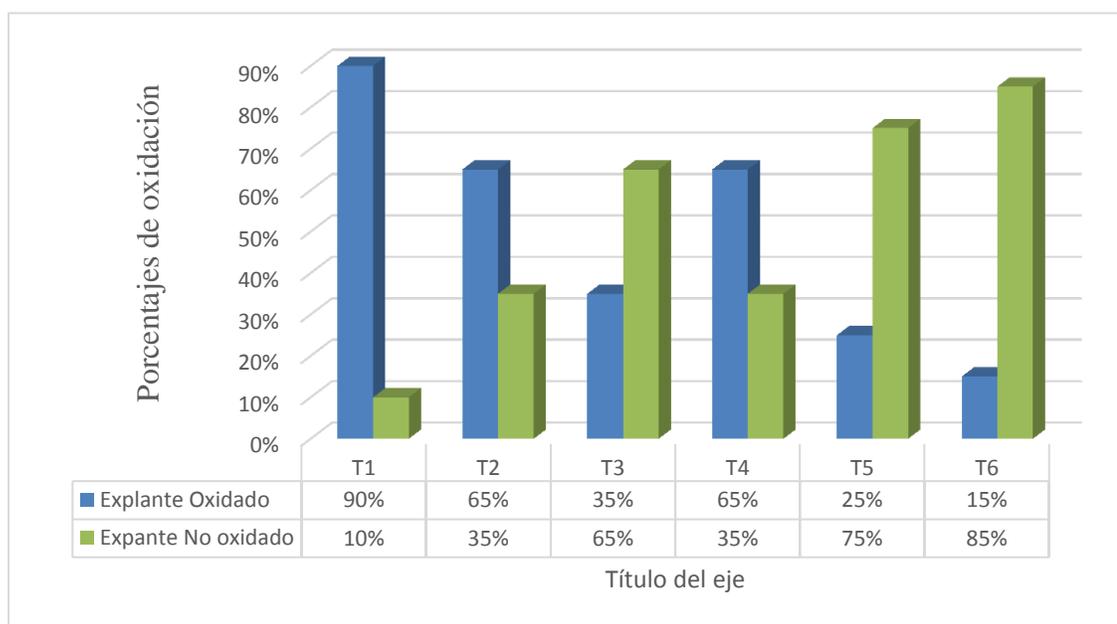


Figura 14. Porcentaje de oxidación con respecto a la concentración de NaClO.

3.1.2.2. Análisis Inferencial

Al analizar el parámetro de oxidación para ver correlación con los tiempos empleados se realizó la prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher (Cuadro 4). La tabla cruzada indica la proporción de explantes oxidados durante los tiempos de exposición de 10 y 20 minutos.

La prueba de Chi-cuadrado obtuvo un $\chi^2 = 5,673$ y un valor $p = 0,017$ ($p = 1.7\%$), menor al nivel de significancia ($\alpha = 5\%$), rechazando la H_0 y confirmando que el tiempo de exposición influye en la oxidación de los explantes e indicando que estos son dependientes en la respuesta.

La prueba exacta de Fisher obtuvo un valor- $p = 0,014$, menor a ($\alpha = 5\%$), aceptando que el tiempo interviene en la oxidación.

Tabla 11.
Prueba de Chi- cuadrado para la variable oxidación y el tiempo de exposición.

Tabla cruzada

		tiempo (min)		Total	
		10	20		
Oxidación	0	Recuento	34	21	55
		% dentro de tiempo (min)	56,7%	35,0%	45,8%
	1	Recuento	26	39	65
		% dentro de tiempo (min)	43,3%	65,0%	54,2%
Total		Recuento	60	60	120
		% dentro de tiempo (min)	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,673 ^a	1	,017		
Corrección de continuidad ^b	4,834	1	,028		
Razón de verosimilitud	5,720	1	,017		
Prueba exacta de Fisher				,027	,014
Asociación lineal por lineal	5,625	1	,018		
N de casos válidos	120				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 27,50.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Se realizó la prueba de Chi-cuadrado (Cuadro 5). La tabla cruzada indica la proporción de explantes oxidados en los diferentes porcentajes de NaClO empleados y se obtuvo un $\chi^2 = 13,159$ y un valor $p=0,001$ ($p=0,1\%$), menor al nivel de significancia ($\alpha = 5\%$), aceptando que el porcentaje de NaClO influye en la oxidación de los explantes y evaluando que el parámetro de oxidación tiene correlación con los porcentajes de NaClO empleados.

Tabla 12.
Prueba de Chi- cuadrado para la variable oxidación y los porcentajes de NaClO.

Tabla cruzada

		% NaClO			Total	
		,5	1,0	1,5		
Oxidación	0	Recuento	27	17	11	55
		% dentro de % NaClO	67,5%	42,5%	27,5%	45,8%
	1	Recuento	13	23	29	65
		% dentro de % NaClO	32,5%	57,5%	72,5%	54,2%
Total		Recuento	40	40	40	120
		% dentro de % NaClO	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	13,158 ^a	2	,001
Razón de verosimilitud	13,473	2	,001
Asociación lineal por lineal	12,782	1	,000
N de casos válidos	120		

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5.
El recuento mínimo esperado es 18,33.

Para analizar si el parámetro de oxidación tiene correlación con los tratamientos empleados se realizó la prueba de Chi-cuadrado, como se observa en el cuadro 6. La tabla cruzada indica la proporción de explantes oxidados para cada tratamiento, mientras que la prueba de Chi-cuadrado obtuvo un $\chi^2 = 19,905$ y un valor $p= 0,001$ ($p=0,1\%$),

menor al nivel de significancia ($\alpha=5\%$), rechazando la H_0 e indicando que la variable de oxidación es dependiente de los tratamientos empleados.

Tabla 13.
Prueba de Chi-cuadrado para la variable de oxidación y los diferentes tratamientos

Tabla cruzada

		Tratamiento						Total	
		T1	T2	T3	T4	T5	T6		
Oxidación	0	Recuento	2	7	12	9	10	15	55
		% dentro de Tratamiento	10,0%	35,0%	60,0%	45,0%	50,0%	75,0%	45,8%
	1	Recuento	18	13	8	11	10	5	65
		% dentro de Tratamiento	90,0%	65,0%	40,0%	55,0%	50,0%	25,0%	54,2%
Total		Recuento	20	20	20	20	20	20	120
		% dentro de Tratamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	19,905 ^a	5	,001
Razón de verosimilitud	21,955	5	,001
N de casos válidos	120		

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5.
El recuento mínimo esperado es 9,17.

Los análisis estadísticos realizados muestran que el mejor tratamiento evaluando las variables de contaminación y oxidación es el T5 con una concentración de hipoclorito de sodio de 1% durante 10 minutos inmersión, debido a que presentó una baja contaminación y oxidación de los explantes indicando que la viabilidad de estos es alta.

3.1.

3.2. Inducción a callo

La fase de inducción a callo se realizó a partir de explantes de hoja, evaluando la presencia o ausencia de callo y si esta forma callo organogénico (formación de brotes o

raíces) o no organogénico, a los de 45 días de su siembra, en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento 6-BAP y 2,4 D, detallados en la Tabla 2 del capítulo 2.

3.2.1. Presencia o ausencia de callo

3.2.1.1. Análisis Exploratorio

El crecimiento de callo varió dependiendo la concentración de los reguladores de crecimiento, iniciando con una baja formación de callo por la baja concentración de la auxina 2,4 D e incrementando con el aumento de la misma hasta 1 mg/L de 2,4 D (Tabla 8). La figura 15 muestra como el callo aumentó conforme los explantes permanecían en el medio, a los 7 días se observó el encorvamiento y la presencia de exudado en los bordes de los explantes, a los 15 días de incubación el callo se formó alrededor de los explantes, a los 30 días el callo cubrió la mayor parte de la superficie del explante y a los 45 días este cubrió totalmente el explante.

Tabla 14.
Tabla de contingencia para la variable presencia de callo.

Tratamiento	Presencia de callo
T0 (control)	0
T1	13
T2	22
T3	30
T4	29
T5	29
T6	29

En la figura 16, se muestra que en los tratamientos T3, T4, T5 y T6 el porcentaje de formación de callo supero el 90 % a los 45 días de su evaluación, indicando que en estas concentraciones los reguladores de crecimiento ayudan en formación de callo.



Figura 15. Desarrollo de callo de explantes de hoja en el medio MS (1962), suplementado con 1 mg/L 2,4 D y 0,5 mg/L 6-BAP a) callo de 7 días b) callo de 15 días c) callo de 30 días d) callo de 45 días.

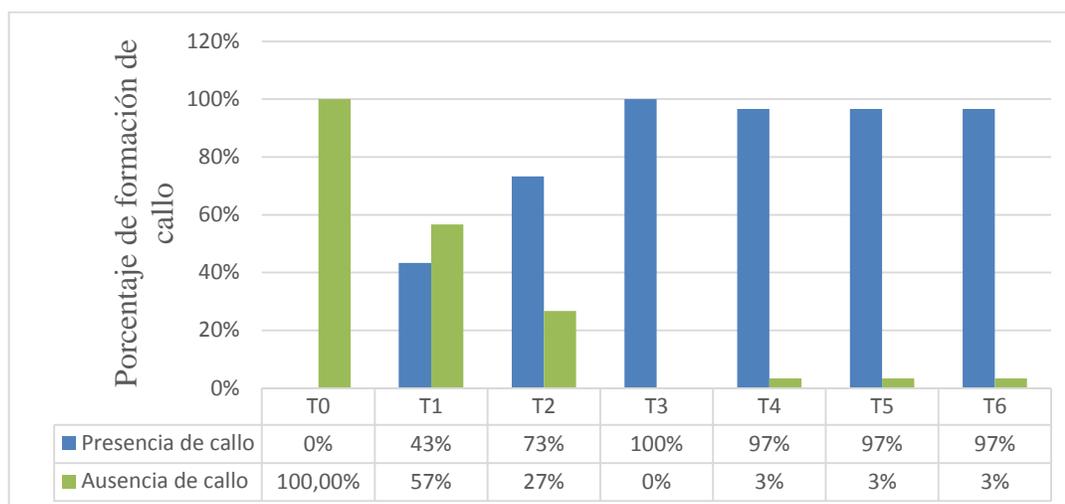


Figura 16. Porcentaje de explantes a los 45 días de evaluación de la variable presencia o ausencia de callo.

3.2.1.2. Análisis Inferencial

Para analizar si la variable de formación de callo tiene correlación con los tratamientos empleados se realizó la prueba de Chi-cuadrado, como se observa en el cuadro 7. La tabla cruzada indica la proporción de explantes que formaron callo en cada tratamiento, la prueba de Chi-cuadrado obtuvo un $\chi^2 = 89,262$ y un valor $p = 0,000$ ($p=0\%$), menor al nivel de significancia ($\alpha=5\%$), indicando que la variable de formación de callo depende de la cantidad de auxinas y citoquinas suministradas en cada tratamiento.

Tabla 15.
Prueba de Chi-cuadrado para la variable de formación de callo.

Tabla cruzada

		Tratamiento							Total	
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6		
Formación de callo	0	Recuento	10	18	7	1	1	1	1	39
		% dentro de Tratamiento	100,0%	60,0%	23,3%	3,3%	3,3%	3,3%	3,3%	20,5%
	1	Recuento	0	12	23	29	29	29	29	151
		% dentro de Tratamiento	0,0%	40,0%	76,7%	96,7%	96,7%	96,7%	96,7%	79,5%
Total		Recuento	10	30	30	30	30	30	30	190
		% dentro de Tratamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	89,262 ^a	6	,000
Razón de verosimilitud	84,841	6	,000
N de casos válidos	190		

a. 1 casillas (7,1%) han esperado un recuento menor que 5.
El recuento mínimo esperado es 2,05.

3.2.2. Callo no organogénico u organogénico

3.2.2.1. Análisis Exploratorio

En los tratamientos se apreció encorvamiento y desarrollo de tejido callogénico, sin embargo, en algunos se mostró la formación de raíces después de la formación de callo indicando que este no puede considerarse para la obtención de metabolitos secundarios porque generan órganos como se observa en la Tabla 9 y figura 18.

Tabla 16.**Tabla de contingencia para la variable callo no organogénico u organogénico.**

Tratamiento	Explante no organogénico
T0 (control)	10
T1	30
T2	30
T3	30
T4	24
T5	19
T6	18

**Figura 17. Explantes con formación de estructuras organogénicas (raíz).**

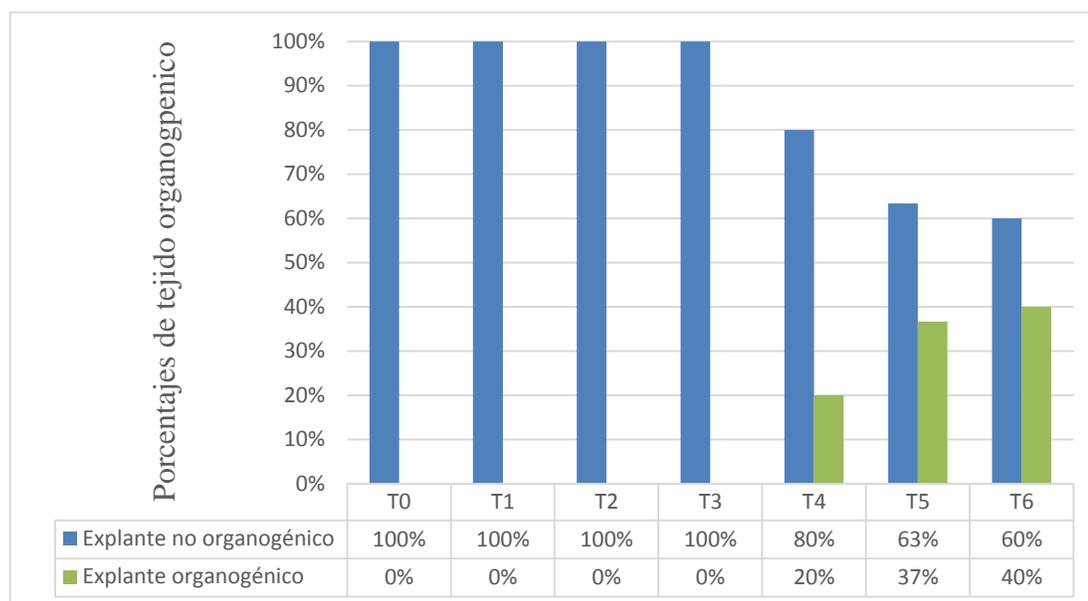


Figura 18. Porcentaje de explantes a los 45 días indicando presencia de tejido no organogénico u organogénico.

3.2.2.2. Análisis Inferencial

En el cuadro 8 se observa la tabla cruzada que indica la proporción de explantes que formaron callo no organogénico en cada tratamiento; la prueba de Chi-cuadrado obtuvo un $\chi^2 = 43,353$, y un valor $p = 0,000$ ($p = 0\%$), menor al nivel de significancia ($\alpha = 5\%$), rechazando la H_0 indicando que al evaluar la presencia de callo no organogénico la concentración de auxinas y citoquinas influye en la presencia de órganos (raíces).

Tabla 17.
Prueba de Chi-cuadrado para la variable de callo organogénico u organogénico.

Tabla cruzada No organogénico o organogénico*Tratamiento

		Tratamiento							Total	
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6		
No organogénico o organogénico	0	Recuento	0	0	0	0	6	11	12	29
		% dentro de Tratamiento	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	20,0%	36,7%	40,0%	15,3%
	1	Recuento	10	30	30	30	24	19	18	161
		% dentro de Tratamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	80,0%	63,3%	60,0%	84,7%
Total		Recuento	10	30	30	30	30	30	30	190
		% dentro de Tratamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
→ Chi-cuadrado de Pearson	43,353 ^a	6	,000
Razón de verosimilitud	52,519	6	,000
N de casos válidos	190		

a. 7 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5.
El recuento mínimo esperado es 1,53.

AL analizar si la variable de formación de callo tiene correlación con los reguladores de crecimiento empleados se realizó la prueba de Chi-cuadrado, como se observa en el cuadro 9. La tabla cruzada indica la proporción de explantes que formaron callo no organogénico en cada tratamiento, la prueba de Chi-cuadrado obtuvo un $x^2 = 38,026$ y un valor $p = 0,000$ ($p = 0\%$), menor al nivel de significancia ($\alpha = 5\%$), indicando que la variable de formación de callo no organogénico depende de la cantidad de citoquinas suministradas en cada tratamiento.

Tabla 18.
Prueba de Chi-cuadrado para la variable de callo organogénico u organogénico, responde a la citoquinina 6-BAP.

No organogénico o organogénico * concentración 6-BAP

Tabla cruzada

		concentración 6-BAP			Total
		0	1	1	
No organogénico o organogénico	0	Recuento	0	0	29
		% dentro de concentración 6-BAP	0,0%	0,0%	32,2%
	1	Recuento	10	90	61
		% dentro de concentración 6-BAP	100,0%	100,0%	67,8%
Total	Recuento	10	90	90	
	% dentro de concentración 6-BAP	100,0%	100,0%	100,0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	38,026 ^a	2	,000
Razón de verosimilitud	49,218	2	,000
Asociación lineal por lineal	32,693	1	,000
N de casos válidos	190		

a. 1 casillas (16,7%) han esperado un recuento menor que 5.
 El recuento mínimo esperado es 1,53.

Al analizar si la variable de formación de callo tiene correlación con los reguladores de crecimiento empleados se realizó la prueba de Chi-cuadrado (Cuadro 10). La tabla cruzada indica la proporción de explantes que formaron callo no organogénico en cada tratamiento, la prueba de Chi-cuadrado obtuvo un $\chi^2 = 4,565$ y un valor $p = 0,207$ ($p = 20,7\%$), mayor al nivel de significancia ($\alpha = 5\%$), aceptando la H_0 , indicando que la variable de formación de callo no organogénico es independiente de la cantidad de auxinas suministradas en cada tratamiento.

Tabla 19.
Prueba de Chi-cuadrado para la variable de callo organogénico u organogénico, responde a la auxina 2,4D.

No organogénico o organogénico * Concentración 2,4D

Tabla cruzada

		Concentración 2,4D				Total	
		0	0	1	1		
No organogénico o organogénico	0	Recuento	0	6	11	12	29
		% dentro de Concentración 2,4D	0,0%	10,0%	18,3%	20,0%	15,3%
	1	Recuento	10	54	49	48	161
		% dentro de Concentración 2,4D	100,0%	90,0%	81,7%	80,0%	84,7%
Total	Recuento	10	60	60	60	190	
	% dentro de Concentración 2,4D	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,565 ^a	3	,207
Razón de verosimilitud	6,126	3	,106
Asociación lineal por lineal	3,282	1	,070
N de casos válidos	190		

a. 1 casillas (12,5%) han esperado un recuento menor que 5.
 El recuento mínimo esperado es 1,53.

Mediante los resultados del análisis estadístico, el mejor tratamiento es el T3 (1 mg/L 2,4-D y 0,5 mg/L 6-BAP) al presentar un 100% de formación de callo no organogénico.

3.1.

3.2.

3.3. Preparación de los extractos para los análisis del contenido de fenoles y de la actividad antioxidante.

Este ensayo se realizó utilizando callo de hoja *in vitro* de 45, 55, 150 y 300 días, de hoja *in vivo e in vitro*, se observó el estado en que se encontraba el callo antes del análisis, el de 45 y 55 días tenía una coloración blanquecina, se encontraba hidratado y

sin oxidación, el callo de 150 días tenía una coloración amarillenta, y el callo de 300 días se encontraba deshidratado y muy oxidado presentando una coloración café oscura, se lo considero muerto como se observa en la figura 23.

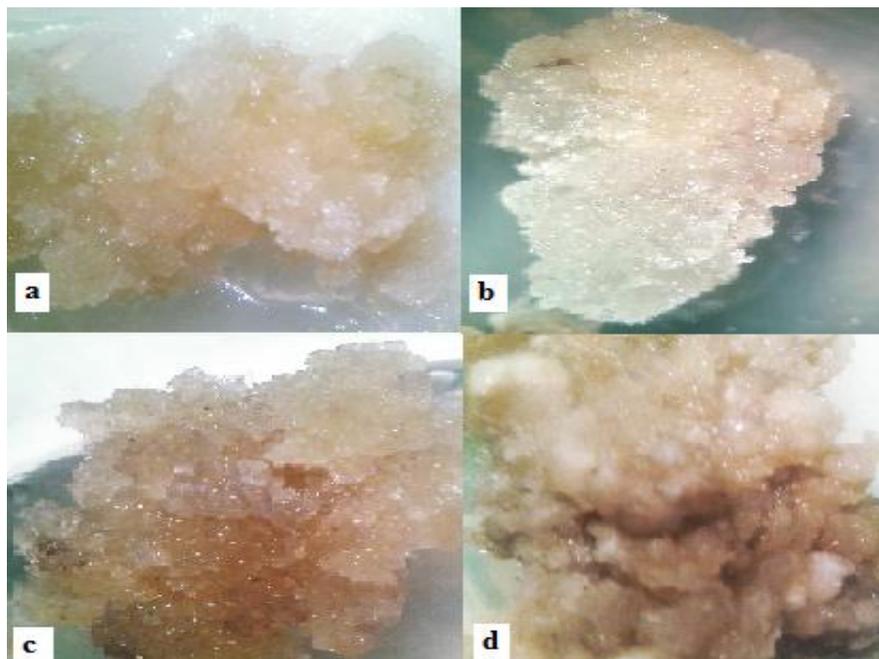


Figura 19. Callo utilizado para el análisis fitoquímico a) callo de 45 días, b) callo de 55 días, c) callo de 150 días, d) callo de 300 días.

3.3.1. Contenido de fenoles

El contenido de fenoles se cuantificó usando el método de Folin- Ciocalteu, se determinó la concentración de fenoles totales presentes en las muestras expresándolas en mg fenoles/g muestra seca o fresca según el caso; se preparó la curva de calibración utilizando como estándar el ácido gálico de la que se obtuvo la ecuación 1, como se

indica en la figura 24, a partir de la regresión lineal de los datos obteniendo un R^2 0,99919.

Los ensayos se realizaron por triplicado, y se presentan en la Tabla 10.

Ecuación 1 $y = 1,28015 * 10^{-3}x - 4,786227 * 10^{-2}$

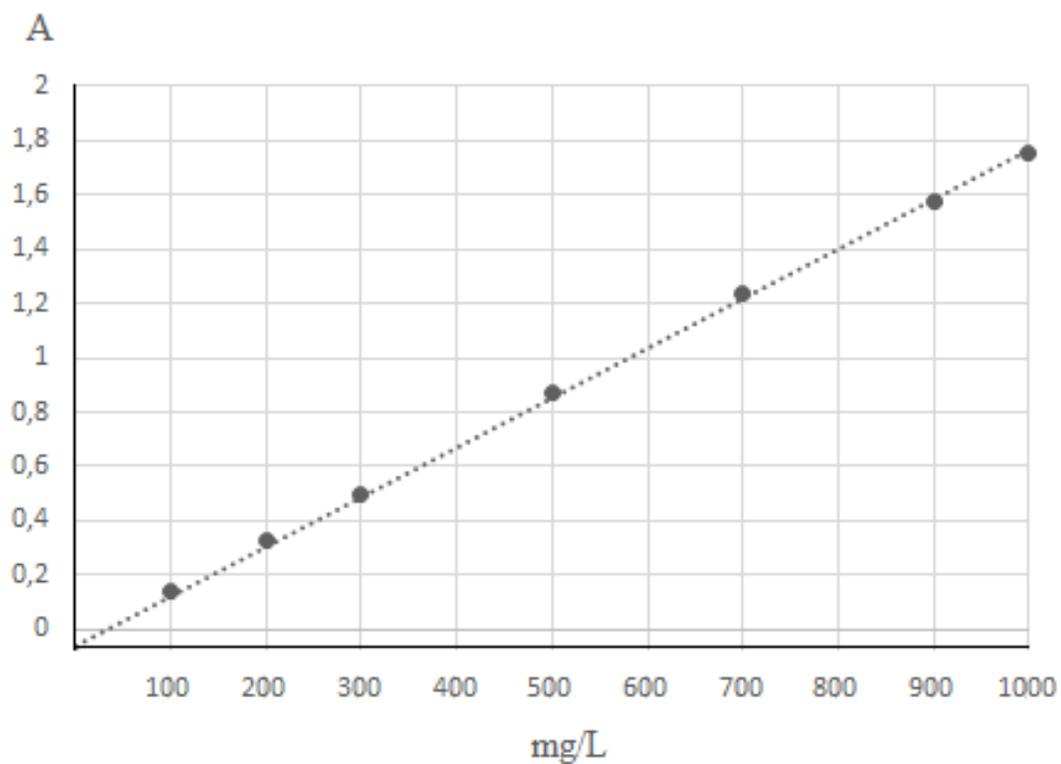


Figura 20. Curva de calibración para la determinación del contenido de fenoles. Eje de las X (Concentración), eje de las Y (Absorbancias).

Tabla 20.
Datos del análisis de la cuantificación de fenoles totales.

Muestra	Absorbancias (A)	Concentración (mg/L)	Promedio concentración (mg/L)	Contenido de fenoles (mg fenoles/ g muestra)	Desviación estándar
hoja <i>in vivo</i>	0,713	598	591,67	56,35	10,97
	0,690	579			
	0,713	598			
hoja <i>in vitro</i>	0,267	345	345,67	32,34	3,06
	0,400	343			
	0,393	349			
callo 42 días	0,332	296	296,67	0,59	2,08
	0,336	299			
	0,331	295			
callo 55 días	0,318	291	293,33	0,47	6,81
	0,297	288			
	0,291	301			
callo 150 días	0,195	189	195,00	0,33	7,94
	0,198	192			
	0,214	204			
callo 300 días	0,11	124	130,67	0,21	6,51
	0,12	131			
	0,127	137			

El análisis del contenido de fenoles presentada en la figura 21 y 22, indica que el extracto que presenta mayor concentración es el de hoja *in vivo* (56,35 mg fenoles/g de

muestra seca), seguido de la hoja *in vitro* (32,34 mg fenoles/g muestra seca) y continuando con el callo de hoja de 42 días (0,59 mg fenoles/g de muestra fresca), callo de 55 días (0,57 mg fenoles/g de muestra fresca), callo de 150 días (0,33 mg fenoles/g de muestra fresca), callo de 300 días (0,22 mg fenoles/g de muestra fresca).

A medida que transcurre el tiempo el contenido de fenoles presentes en los callos va decreciendo, lo cual se puede evidenciar por el aspecto que presentan desde un color claro y fresco hasta un color oscuro y seco considerándolo como muerto, además que el máximo contenido fenólico se presenta en la muestra *in vivo* probablemente debido a que la planta está bajo las condiciones climatológicas naturales, sometida a un mayor grado de estrés y usa a los fenoles como defensa al estrés ambiental o causado por patógenos.

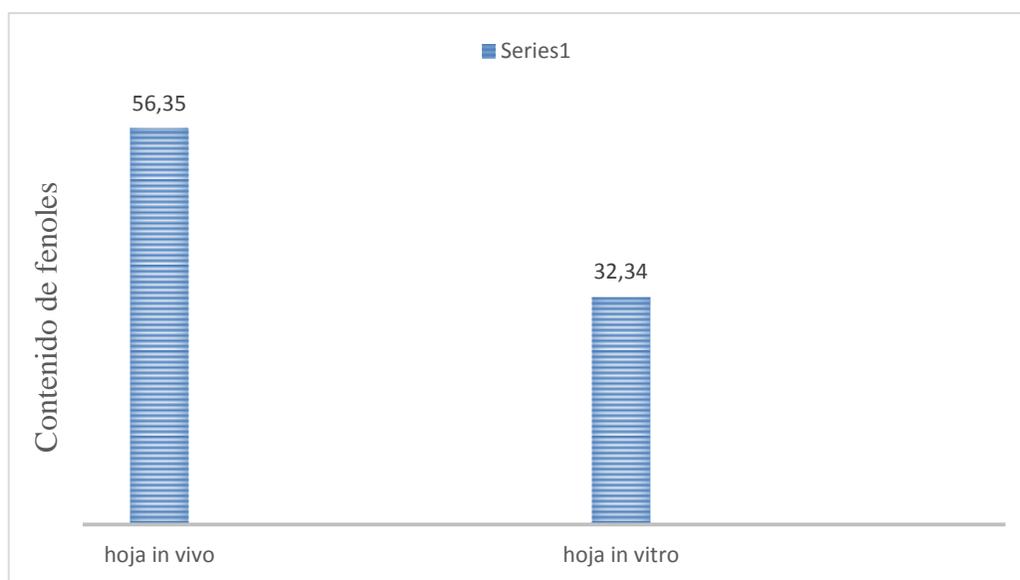


Figura 21. Comparación del contenido de fenoles de muestra *in vivo* e *in vitro* de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

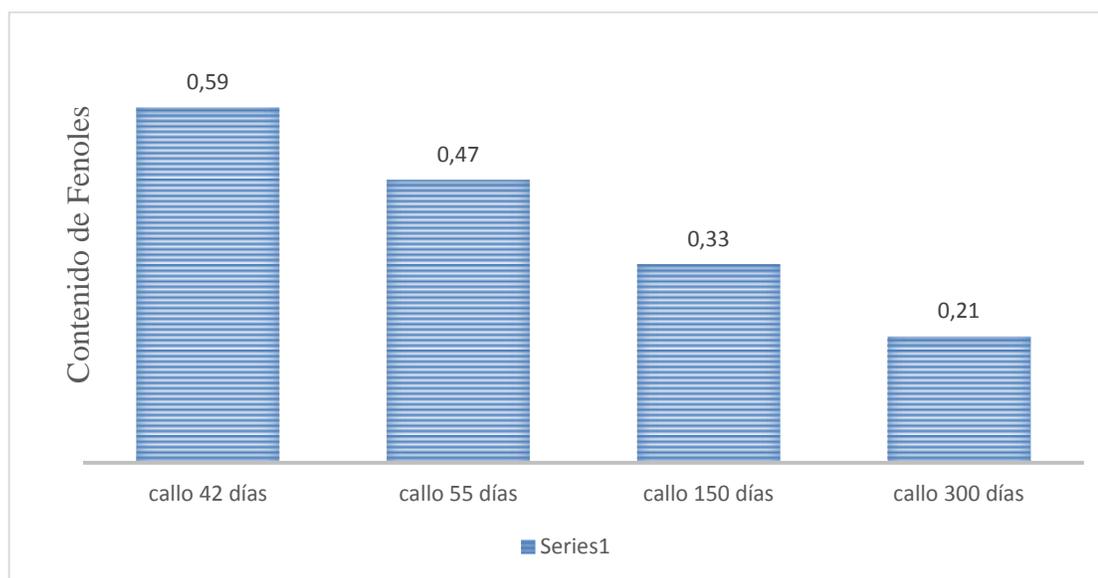


Figura 22. Comparación del contenido de fenoles de muestras de callo a diferentes tiempos.

3.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante

El análisis de la capacidad antioxidante se realizó usando el reactivo 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo llamado DPPH. Se realizó una curva de calibración mostrada en la figura 23, donde se obtuvo la ecuación 2 con un $R^2 = 0,99987$.

$$\text{Ecuación 2. } y = 10,75903x - 1,765342 * 10^{-2}$$

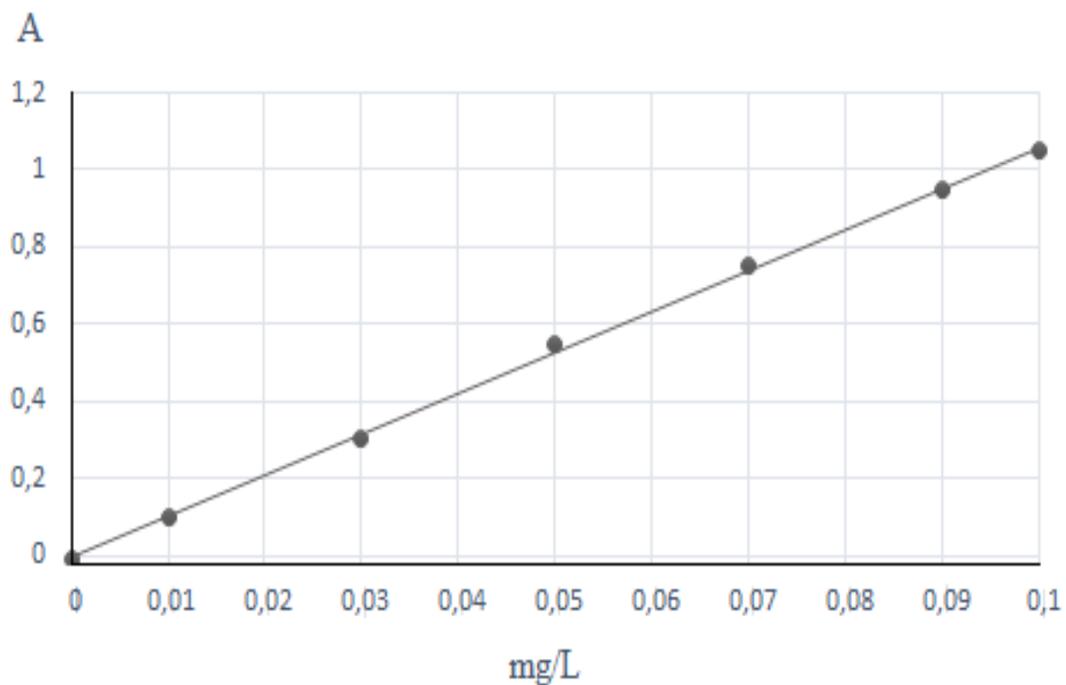


Figura 23. Curva de calibración del DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo). Eje de las X (Concentración), eje de las Y (Absorbancias).

Los ensayos se realizaron por triplicado y en la tabla 11, se detallan los valores de absorbancias y las concentraciones obtenidas presentes en los extractos para secuestrar los radicales libres DPPH.

Tabla 21.
Datos obtenidos en el análisis de la cuantificación de la capacidad antioxidante.

Muestras	Absorbancia (A)	Concentración (mg/L)	Porcentaje DPPH (%)	Promedio DPPH	Desviación estándar
blanco	0,006	0,001			
control	0,429	0,041			
hoja <i>in vivo</i>	0,089	0,008	79,254	77,70	0,001
	0,099	0,01	76,923		
	0,099	0,009	76,923		
blanco	0,078	0,007			
control	0,429	0,041			
hoja <i>in vitro</i>	0,112	0,011	73,893	69,00	0,003
	0,175	0,017	59,207		
	0,112	0,011	73,893		
control	0,478	0,026			
blanco	0,000	0,000			
callo 42 días	0,077	0,022	2,796	2,803	0,001
	0,076	0,022	2,803		
	0,075	0,021	2,810		
control	0,065	0,006			
blanco	0,000	0,000			
callo 55 días	0,015	0,001	2,564	2,769	0,000
	0,015	0,001	2,564		
	0,003	0,001	3,179		
control	0,478	0,026			
blanco	0,000	0,000			
callo 150 días	0,117	0,017	2,517	2,519	0,000
	0,116	0,017	2,524		
	0,117	0,017	2,517		
blanco	0,000	0,000			
callo 300 días	0,184	0,011	2,050	2,061	0,000
	0,182	0,011	2,064		
	0,181	0,011	2,071		

En la tabla 11, se observan los datos de la actividad antioxidante, el extracto de hoja *in vivo* reduce la concentración del radicales libre DPPH en un 77,70%, el de hoja *in vitro* 69 %, para comparar las muestras de hoja con las muestras de callo se realizó una relación con los 0,010 gramos pesados inicialmente, teniendo como resultados que el callo de 42 días reduce la concentración del radicales libre DPPH en un 2,80%, el callo de 55 días un 2,77%, el callo de 150 días un 2,52%, el callo de 300 días 2,06% como se indica en la figura 24 y 25; para comparar su actividad antioxidante.

Demostrando la alta capacidad de capturar radicales libres en los extractos de hoja y que en el callo la capacidad antioxidante disminuye de igual manera con el tiempo demostrando relación con el contenido de fenoles presente en el mismo.

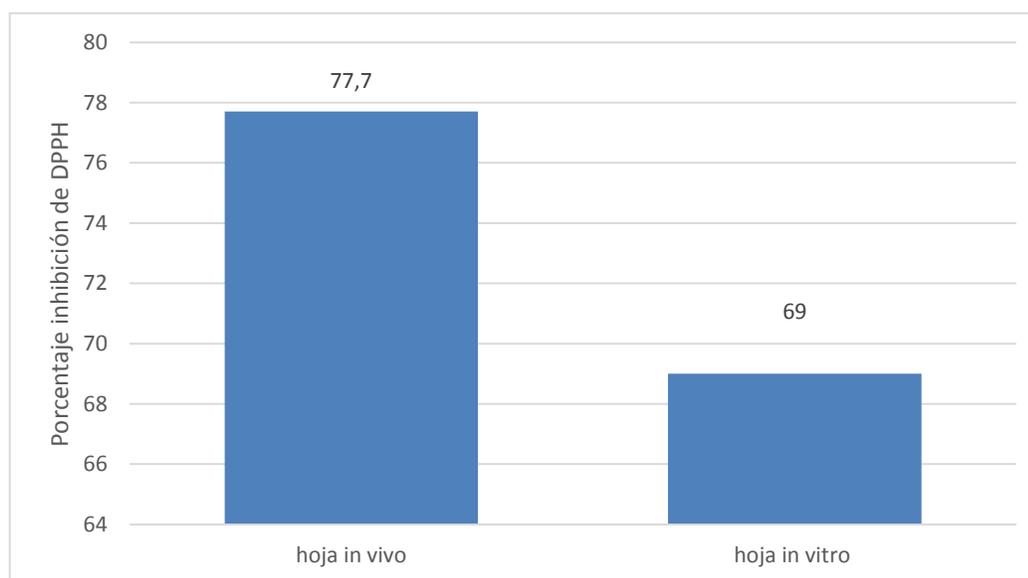


Figura 24. Porcentaje de reducción de la concentración de radical DPPH.

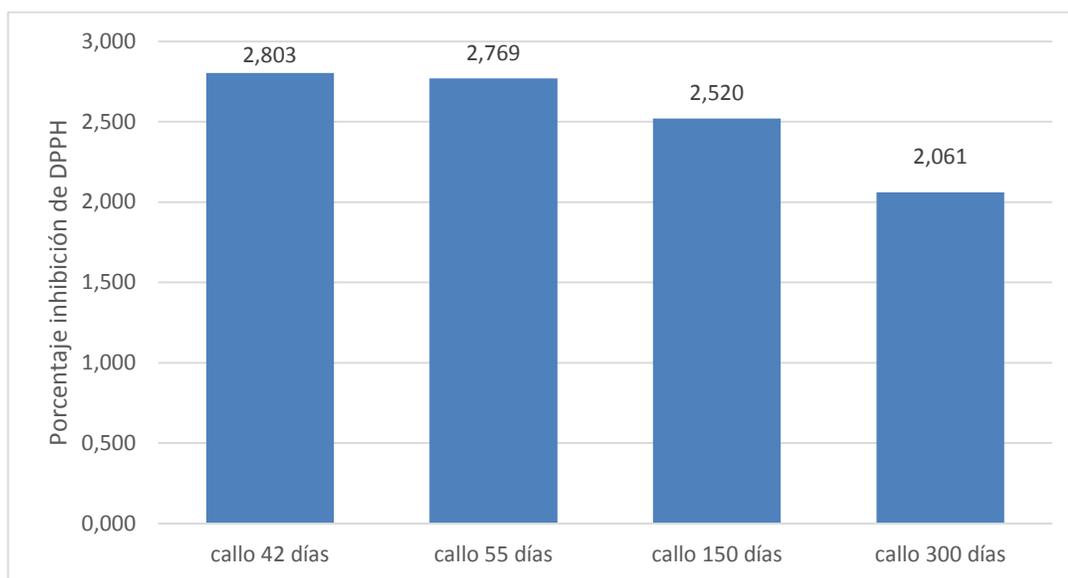


Figura 25. Porcentaje de reducción de la concentración de radical DPPH en callo.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Varios estudios realizados en la planta conocida como hoja del aire (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) demuestran que esta especie tiene diferentes principios activos ricos en: alcaloides, triterpenos, quinonas, glucósidos, flavonoides, cardenólidos, esteroides, componentes fenólicos, bufadienolidos y lípidos, demostrando diversas actividades farmacológicas tales como, antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral, antihelmíntica, antihipertensiva, insecticida y citotóxica (Nava, 2007; Phatak & Hendre, 2014; Bogucka-Kocka, *et al.*, 2016).

Estudios del contenido de fenoles totales y de la capacidad antioxidante presentes en esta planta a nivel *in vitro* no ha sido reportado, la bibliografía indica que existen investigaciones a nivel *in vivo* demostrando que tiene muchas de las propiedades antes mencionadas; por estas razones su estudio debe ser considerado de carácter prioritario debido a que en los últimos años se ha demostrado que los antioxidantes naturales descubiertos en las plantas han atraído cierto interés debido a su valor nutricional y propiedades terapéuticas (Arash, *et al.*, 2015).

El cultivo *in vitro* es una alternativa para el desarrollo de fitofármacos debido a la rápida producción y extracción de metabolitos secundarios a partir diferentes técnicas como el cultivo de células, de órganos, elicitación, entre otras; evitando barreras que impidan la obtención de dichos compuestos de forma pura, como es el caso de la interferencia de la clorofila en la extracción a partir de hojas de cultivo *in vivo*. (Cordell, 2003; Arash, *et al.*, 2015).

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

4.1. Desinfección e introducción de los explantes

4.1.1 Contaminación

Uno de los principales problemas dentro del cultivo *in vitro* es la contaminación de los explantes debido a que la planta madre constituye una fuente de agentes contaminantes (Pérez, 1998). Lumsden *et al.*, (2012), listan a varios tipos de contaminantes como ácaros, pulgones, insectos, virus, hongos, levaduras entre otros que llegan a ser un problema grave en los cultivos, si no han sido eliminados por completo en el tratamiento fitosanitario y pueden causar molestias a lo largo de la investigación, por esta razón es importante seleccionar las plantas donadoras y mantenerlas en un ambiente aislado en condiciones fitosanitarias y ambientales controladas.

En este estudio las plantas madres seleccionadas se encontraban sanas libres de patógenos, estas permanecieron en un mini invernadero dentro de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE y se les aplicó un control fitosanitario durante un mes que consistió en una aplicación a nivel foliar con el fungicida local sistémico “benomil” al 0,5 % v/v, debido a que este es absorbido fácilmente por la planta a través de sus hojas y raíces, se transporta por el xilema y se distribuye por los tejidos de la planta eliminando cualquier patógeno (ICA, 2015), ayudando a disminuir la contaminación en los explantes a introducirse.

La aplicación de un tratamiento fitosanitario no es suficiente para garantizar un cultivo libre de contaminantes, Ramirez *et al.*, (2005), recomiendan usar agentes desinfectantes que tienen la finalidad de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, sin alterar la estructura celular de los tejidos vivos, debido a que estos interactúan con la membrana celular del microorganismo, seguida de la penetración dentro de la célula y luego su acción sobre un blanco, alterando las funciones normales del microorganismo.

El protocolo de desinfección de los explantes previo a la etapa de introducción es fundamental para el éxito del cultivo *in vitro*, teniendo como objetivo eliminar todos los microorganismos que se encuentren en la superficie del explante, sin que este sufra daño y comprometa su viabilidad para el establecimiento del cultivo (Pérez, 1998). Existen diversas técnicas para el control de la contaminación *in vitro*, tales como el uso de desinfectantes, fungicidas y antibióticos en la planta madre, el explante y/o el medio de cultivo (Pierik, 1990).

Los agentes desinfectantes más empleados en la micropropagación vegetal, teniendo en cuenta su bajo costo, fácil adquisición y menor efecto fitotóxico sobre los tejidos son el hipoclorito de sodio y el alcohol al 70%. Sin embargo, se utilizan también hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, cloruro de mercurio, fungicidas, entre otros; su elección dependerá del tipo de tejido o la cantidad del agente patógeno en el explante (Sánchez & Sáenz, 2005; Brenes & Gullén, 2014).

El protocolo utilizado para la desinfección de explantes de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) en el estudio consistió en varios tratamientos con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio al 0,5%, 1% y 1,5% v/v con variaciones de los tiempos de inmersión de 10 y 20 minutos, y con la combinación de diferentes soluciones como el fungicida benomil al 0,5% p/v y la solución de detergente al 1% p/v.

Philips & Gamborg, (2005), comentan que el fungicida es aplicado para eliminar cualquier patógeno que pudo atacar a la planta madre y no se eliminó durante el control

fitosanitario, mientras que el detergente se utiliza debido a que tiene la función de disminuir la tensión superficial, favoreciendo el contacto entre el explante y el desinfectante.

Según Pérez (1998), el hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes más utilizados en el cultivo *in vitro* ya que actúa como un potente agente germicida con amplio espectro de actividad, frente a bacterias, esporas, hongos, virus y protozoos, Sánchez & Sáenz (2005), mencionan además que el hipoclorito de sodio tiene como mecanismo de acción sobre los microorganismos la inhibición de las reacciones enzimáticas y desnaturalización de las proteínas.

En el estudio realizado por Santos, *et al.*, (2014), se reportó un eficiente protocolo de desinfección para explantes de hoja del aire (*K. pinnata* (Lam.) Pers.) combinando soluciones de detergente 1% p/v durante 5 minutos, etanol al 70% v/v durante 1 minuto e hipoclorito de calcio 1% p/v durante 30 minutos logrando un 80% de explantes libres de contaminación, confirmando la eficacia de estas soluciones desinfectantes para controlar la proliferación de microorganismos.

En esta investigación tomando en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes análisis estadísticos, se determinó que los mejores tratamientos para la fase de desinfección evaluando la variable de contaminación fueron los tratamientos con una concentración de hipoclorito de sodio al 1.5% y 1% durante 20 y 10 minutos de inmersión respectivamente; para ambos casos teniendo entre el 80% - 70% de explantes libres de contaminación.

Ramírez *et al.*, (2005), menciona que existe una estrecha correlación entre la concentración del agente desinfectante y el tiempo necesario para matar una determinada fracción de la población bacteriana o fúngica, además Sánchez & Sáenz (2005), comentan que, refiriéndose al tiempo, no todas las bacterias o hongos mueren simultáneamente, ni siquiera cuando se aplica un exceso del agente. Debido a eso no es

conveniente la aplicación en una concentración alta por un menor tiempo de acción. Santos, *et al.*, (2014) afirman además que mientras más alta es la concentración de hipoclorito de sodio más efectiva es la desinfección del material vegetal, recalando que la concentración de NaClO influye en el nivel de contaminación por lo que la utilización de una baja concentración mostrará un explante contaminado. Según los resultados encontrados en este estudio la concentración de NaClO al 1%, durante 10 minutos de inmersión permite la adecuada desinfección de los explantes con un bajo porcentaje de contaminación.

4.1.2 Oxidación

De los ensayos realizados al evaluar la variable de oxidación se obtuvo como resultados estadísticos que los explantes de hoja del aire desinfectados en concentraciones elevadas de NaClO al 1.5 y 1% junto con el mayor intervalo de tiempo (20 minutos) sufrieron oxidación o necrosamiento en el tejido, siendo poco tolerante al desinfectante en esta concentración y tiempo de exposición, siendo el mejor resultado cuando se utilizó una concentración de NaClO al 1% durante 10 minutos, mostrando un menor grado de oxidación de los explantes.

Azofeifa, (2009), indica que los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, además de otros factores como los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo que pueden ayudar en la oxidación de los explantes.

Sánchez & Salaverría, (2004), manifiestan que la oxidación es un problema bastante frecuente en el cultivo *in vitro* teniendo como estrategias para evitar los procesos de

oxidación el uso de medio líquido, cambio del agente gelificante, uso de sustancias antioxidantes al medio de cultivo y al explante, como ácido cítrico, ácido ascórbico, carbón activado, polivinil pirrolidona o PVP, entre otros, la sustitución del regulador de crecimiento, o disminuir la intensidad de la luz.

Factores ambientales como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo (Pompeu, *et al.*, 2008). La implementación de subcultivos (transferencias) frecuentes a un medio de cultivo fresco en poco tiempo se torna imperativo si el medio de cultivo donde se encuentra el explante muestra indicios de oscurecimiento (Azofeifa, 2009).

La producción de polifenoles también está influenciada por los reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo, no obstante, su efecto y relación con el oscurecimiento de explantes no es consistente, pues un mismo regulador que induce oscurecimiento en una especie en otra no tiene igual efecto (Sánchez & Salaverría, 2004). Esto se debe, según Sánchez & Sáenz (2005), a las diferencias genéticas entre los materiales, además señalan, que un desbalance hormonal, debido al tipo, combinación y concentración de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo, puede generar un estrés oxidativo, de tal manera, que las especies reactivas de oxígeno generados alteran diferentes vías metabólicas y respuestas fisiológicas del explante, pudiendo incluso matarlo. Dentro de las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y en las citoquininas, el 6-bencilaminopurina (6-BAP), son los reguladores que cuentan con un mayor número de referencias que asocian su uso con el problema del oscurecimiento.

4.2. Inducción a callo

El callo es un tejido desorganizado que nace a partir de una herida producida por un corte o lesión en el explante, en este estudio se pudo observar el crecimiento a partir de los 7 días de realizada la siembra en los bordes de corte de la hoja y debido al encorvamiento del explante, y a los 45 días el crecimiento de tejido callogénico en toda la superficie de la hoja (Bravo, 1999).

En general, un balance de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo promueve la inducción del callo, pero las respuestas a las interacciones de las diferentes clases de reguladores de crecimiento varían según, el explante y el genotipo (Santos, *et al.*, 2014). El regulador de crecimiento 2,4 D es la auxina más frecuentemente usada en callogénesis, las auxinas comienzan la división celular y controlan los procesos de crecimiento y elongación celular. (Nogueira, 2007).

En este estudio se comparó la actividad de la auxina 2,4 D y la citoquinina 6-BAP donde se encontró que para una concentración de 1 mg/L de 2,4 D y 0,5 mg/L de 6-BAP fue el mejor tratamiento para la inducción de callo no organogénico a partir de explantes de hoja, sin embargo, y a pesar de que a concentraciones de 1 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de 6-BAP también se reportó la formación de callo hubo en algunos explantes la formación de pequeñas raíces de color blanco, indicando que este no puede utilizarse para la obtención de metabolitos secundarios debido a que a estas concentraciones se promueve la organogénesis indirecta.

Santos, *et al.*, (2014), realizaron la callogénesis en *K. pinnata*, recomiendan que los explantes de hojas deben cortarse en fragmentos de 1cm² y que contenga la nervadura central, para favorecer la inducción de callo, reportando la formación desde los 15 hasta los 45 días de realizada la siembra en toda la superficie del explante, mediante el uso de los reguladores de crecimiento en concentraciones de 1 mg/L 2,4 D y 2 mg/L 6-BAP obteniendo un 91% de callo.

López *et al.*, (2015), realizaron el establecimiento de callogénesis de *Kalanchoe Daigremontiana* (Aranto) a partir de la obtención de plántulas obtenidas a partir de

explantes de hoja, obteniendo callo en combinación de 0,5 mg/L de 2,4 D y 1 mg/L de 6-BAP a los 14 días de haber realizado la siembra, mientras que en concentraciones mayores de 6-BAP se veía favorecida la generación de brotes.

Otro estudio realizado por Thomé *et al.*, (2004), sobre la micropropagación de *Kalanchoe Blossfeldiana* Poelin observaron el 100 % de callogénesis mediante el uso de 1 mg/L 6-BAP y 0,3 mg/L de ANA (ácido naftalenacético) con posterior organogénesis.

Por otro lado, independientemente del explante utilizado, la edad de este tiene un rol importante en el tipo de respuesta *in vitro*, según Pérez (1998), la tendencia es emplear tejidos indiferenciados o los más jóvenes posibles para obtener éxito en el cultivo de callos, es por eso que para estos estudios se efectuó la obtención de callo con uso de hojas jóvenes.

Para los posteriores análisis se dejó el callo obtenido crecer durante varios meses y otros se hicieron subcultivos cada 45 días para comparar el contenido de fenoles y la actividad antioxidante presente en estos, una de las principales diferencias mediante observación fue la coloración, oxidación y la forma del callo debido al transcurso del tiempo como se visualiza en la figura 23. Siendo el callo de 300 días (10 meses) de color café oscuro, sin hidratación y considerándolo como un tejido muerto.

George, *et al.*, (2011), recomiendan realizar subcultivos en un nuevo medio cada 30 o 45 días, después de conseguir la inducción de callo si se quiere aumentar el volumen de un cultivo y evitar la oxidación, separando pequeñas fracciones de 2 a 5 mm por esta razón se fraccionaron los callos inducidos a partir de hoja en un medio suplementado con de 1 mg/L de 2,4 D y 0,5 mg/L de 6-BAP.

Pierik (1990), menciona además que es importante transferir fragmentos de tejido visiblemente sano (sin contaminación por hongos ni bacterias, sin necrosis, etc.), y cuando esté establecido, es necesario cambiarlo a medio nuevo con una frecuencia que

varíe de 2 a 6 semanas, ya que la falta de transferencia lleva irremediablemente al debilitamiento, intoxicación y muerte del tejido.

4.3. Preparación de los extractos para los análisis del contenido de fenoles y de la actividad antioxidante.

Varios estudios realizados en *Kalanchoe pinnata* indican la presencia de varios componentes, como alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, quinonas, esteroides, antocianinas, bufadienólidos y alcaloides (Kamboj & Saluja, 2009; Cabrera, *et al.*, 2011; Rajsekhar, *et al.*, 2016), y variada actividad farmacológica como antioxidante (Bhatti *et al.*, 2012), anticancerígena (Devbhuti, *et al.*, 2012; Mahata *et al.*, 2012), antiinflamatoria (Ojewole, 2005; Gupta, *et al.*, 2010), antimicrobiana (Okwu & Nnamdi, 2011), antiviral (Supratman, *et al.*, 2001; Mahata *et al.*, 2012), anti-leishmania (Muzitano *et al.*, 2006; Muzitano *et al.*, 2009), insecticida (Supratman, *et al.*, 2000), antialérgica (Cruz, *et al.*, 2008), analgésica (Afzal, *et al.*, 2012), antidiabética (Goyal, *et al.*, 2013).

Bhatti *et al.*, (2012), recomiendan que las muestras de hojas previamente deben ser limpiadas, secadas a temperatura ambiente y lejos de la luz del sol o secadas en una estufa a una baja temperatura alrededor de 25 -30 °C. En este estudio las muestras de hojas *in vivo* se secaron en la estufa marca Memmert a 30°C para acelerar el proceso de secado durante 15 días.

Calvopiña, *et al.*, (2010), comentan que la presencia o ausencia de un metabolito puede influir de forma determinante según la época de recolección, el estado vegetativo de la planta, las variaciones ocurridas por una deficiente recolección, secado y/o conservación, la concentración de metabolitos, la solubilidad en el solvente empleado y las interferencias de otros metabolitos.

Bhatti *et al.*, (2012), realizaron la evaluación y comparación del contenido de fenoles y la actividad antioxidante de extractos de hojas de *K. pinnata* donde mencionan que el proceso de extracción juega un rol importante en la actividad de los extractos, considerando la polaridad tanto del disolvente como la de los compuestos fenólicos presentes en las muestras.

Para el aislamiento de sustancias vegetales se usa el método de extracción líquido-sólido usando solventes para la maceración de las muestras los mismos que pueden ser polares o no polares como el metanol, etanol, benceno, cloroformo, entre otros (Ávila, 2001). Los disolventes más utilizados para la determinación de compuestos fenólicos y de la actividad antioxidante por el método de DPPH son el metanol y etanol (Marinova & Batchvarov, 2011). En esta investigación para obtener el máximo contenido de fenoles se maceró las muestras de hojas *in vivo* y de callo fresco en metanol al 80%.

Ricco, *et al.*,(2010), menciona que al utilizar un solvente de alta polaridad puede ocurrir que se rompa la membrana celular y mejore la extracción. Además, Jang, *et al.*, (2002), menciona que el metanol podría reducir la actividad de las polifenoloxidasas, enzimas propias de los tejidos vegetales, que catalizan la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos endógenos y contribuyen al proceso de pardeamiento (oxidación).

En el estudio planteado por (Kamboj & Saluja, (2009), mencionan, que el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante depende del tipo y la polaridad del solvente y que los solventes más polares presentan un mayor contenido fenólico y mayor actividad antioxidante.

La cuantificación del contenido de fenoles mostró que en los extractos analizados existe una concentración de 56,35 mg fenoles/g de muestra seca para hoja *in vivo*, 32,34 mg fenoles/ g muestra seca para hoja *in vitro*, 0,59 mg fenoles/g muestra fresca para el callo de 42 días, 0,47 mg fenoles/g muestra fresca para el callo de 55 días, 0,33 mg fenoles/ g muestra fresca para el callo de 150 días (5 meses) y 0,21 mg fenoles/ g muestra fresca para el callo de 300 días (10 meses).

En la investigación realizada por Asiedu-Gyekye, *et al.*, (2012), demuestran que el extracto en metanol de *K. pinnata* a partir de hoja contiene flavonoides mientras que el extracto acuoso contiene otros compuestos fenólicos.

Estudios realizados por Muzitano *et al.*, (2006) y Asiedu-Gyekye, *et al.*, (2012), han identificado que *K. pinnata* contiene compuestos polifenólicos tales como flavonoides y ácidos fenólicos (p-hidroxicinámico, cafeico, p-cumárico, ferúlico, p-hidroxibenzoico, quercetina, kaempferol, luteolina, astragalina, rutina y patuletina). Por otra parte en la investigación por Bogucka-Kocka, *et al.*, (2016), demostraron que los extractos de *K. pinnata* y *K. daigremontiana* poseen compuestos fenólicos encontrando al ácido ferúlico y protocatequídico un ácido dihidroxibenzoico en mayor concentración, siendo estos los responsables de la actividad antioxidante.

Nascimento, *et al.*, (2013) mencionan que *K. pinnata* es rica en compuestos fenólicos, las cuales son responsables de algunas de las actividades biológicas de la especie y que el potencial antiinflamatorio y cicatrizante de esta especie puede ser el resultado de la actividad antioxidante proporcionada por estos compuestos, además que los flavonoides y otros polifenoles exhiben una actividad antioxidante reduciendo la concentración de especies reactivas de oxígeno. Encontrando a la quercetina en mayor concentración por determinación de HPLC Y TLC.

Bhatti, *et al.*, (2012), en su estudio al comparar el contenido de fenoles y de flavonoides de varios extractos de *K. pinnata* encontraron el siguiente orden siendo el etanol el mejor solvente seguido de acetona, cloroformo y el benceno; y que el alto contenido de fenoles puede explicar la alta actividad antioxidante obteniendo un 64,4% de reducción de radicales libres DPPH con el extracto de etanol.

Cabrera, *et al.*, (2011), manifiestan que el ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales y Rice-Evans, *et al.*, (1997), comentan que la mayor parte del potencial antioxidante en las plantas se debe a las propiedades redox de los compuestos

fenólicos que actúan como agentes reductores, por la capacidad de eliminar los radicales libres, quelar iones metálicos, actuar como cofactores de las enzimas que catalizan las reacciones oxidativas, inhibición de las oxidasas y estabilización de los radicales libres.

Para determinar la actividad antioxidante por el método de DPPH el rango de longitudes de onda varía entre los 525 y 540 m (Bogucka-Kocka, *et al.*, 2016), en este estudio se midió a 517 nm donde presenta su máxima absorción. La solución de DPPH además se preparó minutos antes de realizar el ensayo, debido a que este compuesto se degrada rápidamente por efectos de la luz y la temperatura (Marinova & Batchvarov, 2011).

Los resultados de la capacidad antioxidante muestran que el extracto de hoja *in vivo* redujo la concentración de radicales libres DPPH en un 77,70%, la hoja *in vitro* un 69%, el callo de 42 días un 84,10%, el callo de 55 días un 83,08%, el callo de 150 días (5 meses) un 75,59% y el callo de 300 días (10 meses) un 65,85%.

En la literatura *Kalanchoe pinnata* se ha caracterizado por tener altos porcentajes de inhibición de DPPH, en el estudio de Asiedu- Gyekye, *et al.*, (2012), alcanzó un 84 %, en otro estudio realizado por Bhatti, *et al.*, (2012), mostró un 64,4% en solución de etanol; demostrando que la actividad antioxidante incrementa con el incremento de la concentración utilizada en los análisis.

En la investigación realizada por Sharadanand & Subhash, (2015), analizaron la actividad antioxidante de fracciones ricas en flavonoides, fenoles y saponinas de hojas frescas de *K. pinnata* mediante diferentes métodos, encontrando relación entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante, comentan que los compuestos fenólicos y flavonoides podrían ser responsables de los potenciales antioxidantes de esta planta pero debe realizarse una evaluación adicional de su bioactividad.

Ricco, *et al.*, (2010), mencionan que los fenoles juegan un rol importante en la captación del radical DPPH, demostrándose así la actividad antioxidante, confirmado

por Hernández, *et al.*, (2012) que menciona que la actividad antioxidante depende moderadamente de su contenido de fenoles. Debido a esto, diferentes estudios los relacionan; considerando que cada compuesto fenólico contribuye de forma y proporción diferente. Sendra *et al.*, (2006) comentan además que la actividad antioxidante puede depender del tipo (posición y número de hidroxilos en la molécula), concentración de compuestos fenólicos, y de la presencia de metales de transición.

Al comparar la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante entre el callo de 45 y 55 días, y el de 300 días (10 meses); se puede decir que mientras más tiempo se mantiene el callo, van a disminuir sus componentes fenólicos, debido a las características que presenta este al transcurrir el tiempo porque actúan enzimas oxidasas que ayudan a su fenolización y por su aspecto puede ser considerado como oxidado o muerto, y que su actividad antioxidante es menor.

Según Hernández & Gonzáles (2010), indican que la acumulación de sustancias fenólicas liberadas por el tejido vegetal en el medio de cultivo, son con frecuencia inhibidores del crecimiento y constituyen uno de los problemas más frecuentes asociados con la propagación clonal, ya que alteran y deterioran la composición química del medio de cultivo, causando progresivamente la muerte del material vegetal, además Azofeifa (2009), menciona que la oxidación u oscurecimiento de tejidos, se puede definir como la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular. Gonzáles *et al.*, (2000), menciona también que la variación del callo en su aspecto general depende del tejido madre, la edad y las condiciones de crecimiento a las que se mantenga.

En la presente investigación se analizó el contenido de fenoles y la actividad antioxidante de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata* Lam. (Pers.)), mediante el uso del cultivo *in vitro* y se comparó con la planta cultivada en condiciones *in vivo*, se comprobó la aplicabilidad de la técnica de cultivo *in vitro* para la cuantificación y producción de metabolitos secundarios a partir de callo; encontrando que el callo de menor tiempo

presenta alta capacidad antioxidante y conforme transcurre el tiempo este pierde sus funciones disminuyendo el contenido de fenoles y la actividad antioxidante al superar el 80% de captación de DPPH, considerando la planta como una fuente natural de antioxidantes

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

5.

5.1. Conclusiones.

1. El mejor tratamiento de desinfección de explantes fue el que utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 1 % v/v con 10 minutos de inmersión en los que se observó bajo índice de contaminación bacteriana o fúngica y de oxidación fenólica considerando los explantes viables para la etapa de inducción de callo.

2. El uso de la auxina 2,4 D resulto favorable para la inducción de callo friable a partir de explantes de hoja teniendo como mejor tratamiento para la inducción y obtención de callo el tratamiento T3 (0,5 mg/L BAP y 1 mg/L 2,4 D); ya que a los 45 el crecimiento del callo cubría todo el explante.

3. EL método Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido de fenoles demostró que los extractos de hoja *in vivo* presentan una concentración de fenoles de 56,35 mg fenoles/g muestra seca, hoja *in vitro* de 32,34 mg fenoles/g muestra seca; en los callos a medida que transcurre el tiempo el contenido de fenoles va decreciendo, lo cual se puede evidenciar por el aspecto y coloración , presentando una concentración de 0,59 mg fenoles/g muestra fresca a los 42 días, 0,57 mg fenoles/g muestra fresca a los 55 días, 0,33 mg fenoles/g muestra fresca a los 150 días (5 meses), 0,21 mg fenoles/g muestra fresca a los 300 días (10 meses); evaluando la capacidad antioxidante en el extracto de hoja *in vivo* redujo la concentración de radical DPPH en 77,70 %, el de hoja *in vitro* un 69%, el callo de 45 días un 84,10 %, el callo de 55 días un 83,08%, el callo de 150 días un 75,59% y el callo de 300 días un 65,85% demostrando que el callo posee la capacidad de capturar radicales libres.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

6.1. Recomendaciones.

1. Se recomienda realizar ensayos adicionales para la conservación de este material vegetal, como un tamizaje fitoquímico o la cromatografía en capa fina (CCF), para identificar los principales metabolitos secundarios presentes en la hoja y el callo.

2. Se sugiere realizar la determinación del IC50 que mide la cantidad antioxidante necesaria para disminuir en un 50 % la absorbancia inicial del DPPH.

3. Se aconseja que se continúe con el estudio de los metabolitos secundarios de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata* Lam, (Pers.)) a nivel in vitro; ya que esta planta posee principios activos que pueden ser utilizadas con fines biomédicos como son los compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes y son capaces de capturar radicales libres.

4. Se recomienda evaluar la técnica de elicitación o biotransformación que son los métodos más efectivos establecidos en procesos a gran escala para inducir la expresión de genes asociados con enzimas responsables de la síntesis de metabolitos secundarios, para evaluar y comparar la concentración de metabolitos secundarios producidos por el callo.

BIBLIOGRAFÍA

- Afzal, M., Gupta, G., Kazmi, I., Rahman, M., Afzal, O., Alam, J., . . . Anwar, F. (2012). Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. . *Fitoterapia*, 853-858.
- Ainsworth, E., & Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols.*, 875-877.
- Alvez, B., Olmos, S., & Luciani, G. (2012). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Obtenido de Universidad Central de Venezuela:

9tt"□))JJJ\$ciens\$ucv\$ve□4'4')generador)sites)andrea\$menende2)arc9ivos)GuiaI
+'CultivoI+'deI+'TejI+'0egI+'##I+'+',+ \$"d7

- Arash, K., Rosna, M., Sadegh, M., & Behrooz, B. (2015). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from In Vivo and In Vitro Grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). *BioMed Research International*.
- Arias, I., & Ordaz, C. (2011). Evaluación de la actividad antitumoral de diferentes extractos de varias especies de *Kalanchoe* en una línea celular de Cáncer de Próstata. *Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Sección de estudios de Posgrado e investigación. Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular*.
- Asiedu-Gyekye, I., Antwi, D., B. K., & Awortwe, C. (2012). Comparative study of two *kalanchoe* species: total flavonoid, phenolic contents and antioxidant properties. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 65-63.
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*.
- Ávila, Z. (2001). *Química orgánica: experimentos con un enfoque ecológico*. Monterrey: Dirección general de publicaciones y fomento editorial.
- Ayerbe, L. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*.
- Barajas, L., Herreño, N., Mejía, L., Borrego, P., & Pombo, L. (2014). *Biocomercio Colombia. Fundación Universitaria Juan N. Corpas. Kalanchoe pinnata*.
Obtenido de

http://www.biocomerciolombia.com/docs/biocomercio_andino/Componente%201/Monografias/Monografia%20Kalanchoe%20pinnata.pdf

- Bhatti, M., Kamboj, A., Kumar, A., & Jain, U. (2012). In vitro evaluation and comparison of antioxidant activities of various extracts of leaves and stems of *Kalanchoe pinnatum*. *International Journal of Green Pharmacy*, 340-347.
- Bogucka-Kocka, A., Zidorn, C., Grazuna, M., & Szewezyk, K. (2016). Phenolic acid content, antioxidant and activities of four *Kalanchoe* species. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Bourgaud, F., Gravot, A., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Review. Plant Science*, pp. 839 -851.
- Bravo, O. (1999). *Obtención de callo a partir de *Astrophytum myriostigma**.
- Brenes, J., & Gullén, A. (2014). *Establecimiento de un protocolo in vitro para el cultivo del ajo (*Allium sativum*) en Costa Rica*. Obtenido de Tecnología en marcha. : revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/download/208571891
- Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of plants*. Chapter 24, Natural products (Secondary Metabolites). American Society of Plant Physiologists .
- Cabrera, D., Sánchez, Y., Guerra, D., Espinosa, A., & Almeida, M. (2011). Tamizaje fitoquímico y actividad antibacterial de extractos de *Bryophyllum pinnata*. *Química Viva*.
- Calvopiña, G., Hermosillo, R., Perdomo, R., & Viera, Y. (2010). *Determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Kalanchoe pinnata* (*siempreviva*)*. Obtenido de Universidad Técnica Cotopaxi. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/869/1/T-UTC-1207.pdf>

- Carrillo, L. (2009). Biotecnología vegetal: aplicaciones del cultivo de meristemas apicales de tallo. Córdoba, AR: El Cid Editor. Obtenido de <http://www.ebrary.com>
- Chuquimia, F., Alvarado, J., Peñarrieta, J., Bergentahl, B., & Akesson, B. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoidicos de cuatro especies vegetales de la región andina de Bolivia. . *Revista Boliviana de química.*, 75-83.
- Cordell, G. (2003). Discovering our gifts from nature, now and in the future. *Revista de Química*, Part II. (3–15).
- Cruz, E., Da-Silva, S., Muzitano, M., Silva, P., Costa, S., & Rossi-Bergmann, B. (2008). Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *Int Immunopharmacol.*, 1616 - 1621.
- Daorden, M. E. (2007). *Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Estación Experimental Agropecuaria*. Obtenido de INTA San Pedro.: <http://docplayer.es/4377236-Cultivo-in-vitro-de-tejidos-vegetales.html>
- De Souza Dos Santos, M., Goncalves, C., Vaisman, M., Ferreira, A., & Carvalho, D. (2011). Impact of flavonoids on thyroid function. . *Food and Chemical Toxicology*, 2495-2502.
- Devbhuti, D., Gupta, J., & Devbhuti, P. (2012). Studies on antitumour activity of *Bryophyllum calycinum* Salisb. against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss Albino mice. *J PharmaSciTech*, 31-33.
- Ferraro, G., Martino, V., & Bandoni, A. (2012). Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales. Buenos Aires: AR: Eudeba.

- Fronza, A. (2013). *Plagas y Enfermedades*. Obtenido de <http://www.fronza.com/plagas-y-enfermedades>
- George, D., Babalola, O., & Gatehouse, A. (2011). Differential protein expression in maize (*Zea mays*) in response to insect attack. *African Journal of Biotechnology*, 7700-7709.
- GERMOPLANTA. (2016). *GERMOPLANTA- Biotecnología en el Ecuador*. Recuperado el 28 de Septiembre de 2016, de http://germoplanta.com/index.php?option=com_content&view=frontpage
- Geydan, T., & Melgarejo, L. M. (2005). Metabolismo ácido de las Crasuláceas. *Acta Biológica Colombiana.*, 3-16.
- Giulianelli, D., Rodríguez, R., & Vera, P. (2006). Protocolo IPv6 para la realización de Videoconferencias. *Grupo de Investigación, Desarrollo y Formación en Innovación de Software. Departamento de Ingeniería e Investigaciones Tecnológicas. Universidad Nacional de La Matanza*.
- Góes, J., Da Silva Souza, A., & Dos Santos, J. V. (2009). Aspectos Prácticos de la Micropropagación de Plantas. Brasil: EMBRAPA.
- González, L. (2015). Distribución potencial de la especie invasora *Kalanchoe pinnata* ¿Un ejemplo de expansión de nicho? *Revista de invasiones biológicas de América Latina y el Caribe*.
- Goyal, P., Jain, N., Panwar, N., Singh, G., & Nagori, B. (2013). Investigation of hypoglycemic and antidiabetic activities of ethanol extracts of *Kalanchoe pinnata* leaves in streptozocin-induced diabetic rats. *Int J Pharm Toxicol Sci.*, 9-18.
- Guimet, R. (2012). *Evaluación de la actividad antioxidante y determinación de polifenoles totales in vitro de hojas de ocho morfotipos de Bixa Orellana L.*

Obtenido de Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Gupta, R., Lohani, M., & Arora, S. (2010). Anti-inflammatory activity of the leaf extracts/fractions of *Bryophyllum pinnatum*. *Int J Pharm Sci Rev Res.*, 16-18.

Hernández, S., Peña, A., Obreque, E., Loyola, E., & Prat del Río, L. (2012). *RELACIÓN ENTRE LA Capacidad antioxidante y composición fenólica en vinos tintos del CV. CARMENSE*. Obtenido de Tesis para optar al grado de Magister en Enología y Vitivinicultura. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/116346/Sofia%20Hernandez%20Dominguez.pdf?sequence=1>

Hernández, Y., & Gonzáles, M. E. (2010). EFFECTS OF OXIDATION microbial contamination and phenol in vitro establishment of perennial fruit. *Cultivos tropicales*.

ICA, R. N. (2015). *Ficha técnica fungicida : Benomil*. Obtenido de <http://www.phytocaregroup.com/files/insecticidas/Benomil.pdf>

Jaiswal, S., & Sawhney, S. (2008). Thidiazuron-induced hypertrophic growth from foliar disks of *Kalanchoe pinnata* leads to visualization of a bioactive auxin gradient across the leaf plane. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 65-68.

Jang, M., Sanada, A., Ushio, H., Tanaka, M., & Ohshima, T. (2002). Inhibitory effects of "Enokitake" mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. *LWT - Food Sci Technol*.

Jaramillo, A. (2007). *Proyecto para la elaboración de una bebida funcional de manzana enriquecida con Dulcamara*. Quito.

- Kamboj, A., & Saluja, A. K. (2009). Bryophyllum pinnatum (Lam.) Kurz.: Phytochemical and pharmacological profile : A review. *Pharmacognosy Review*, 364-374.
- Liu, K., Lu, J., & Ji, Y. (2014). Formation of brominated disinfection by-products and bromate in cobalt catalyzed peroxymonosulfate oxidation of phenol. *Environmental Research and Public Health*, 9325-9344.
- Loor, R., & Miño, N. (2012). *Determinación de la capacidad antioxidante de la nuez de macadamia mediante el método de DPPH, obtención de su aceite aplicando la técnica Soxhlet y sus aplicaciones en los productos alimenticios y cosméticos*. Obtenido de Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/463/1/Macadamia.pdf>
- López, D., Jimenez, A., Orbe, C., Vanegas, P., Bonfill, M., & Del Villar, A. (2015). Establecimiento de cultivo in vitro y de células desdiferenciadas de Aranto (Kalanchoe daigremontiana). *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras*.
- Lumsden, P., Nicholas, J., & Davies, W. (2012). Physiology, Growth and Development of Plant in Culture. *Springer Science & Business Media*.
- Mahata S, M. S. (2012). Anticancer property of Bryophyllum pinnata (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complement Altern Med.*, 12-15.
- Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science.*, 11-24.
- Medina, L. (2009). *Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos*. Obtenido de

http://www.anpebadajoz.es/autodidacta/autodidacta_archivos/numero_9_archivos/1_a_medina.pdf

Missouri Botanical Garden. (Noviembre de 2016). Obtenido de Plant Science Search: <http://www.missouribotanicalgarden.org/plant-science/plant-science/about-plant-science.aspx>

Muzitano, M., Falcao, C., Cruz, E., Bergon, M., Bilia, A., Vincieri, F., . . . Costa, S. (2009). Oral Metabolism and Efficacy of *Kalanchoe pinnata* Flavonoids in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Planta médica Thieme*, 307-311.

Muzitano, M., Tinoco, L., Guette, C., Kaiser, C., Rossi-Bergmann, B., & Costa, S. (2006). The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Science Direct* , 2071-2077.

Nascimento, L., Leal, M., Coutinho, M., Moreira, N., LAge, C., Barbi, N. C., & Tavares, E. (2013). Increased Antioxidant Activity and Changes in Phenolic Profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) Specimens Grown Under Supplemental Blue Light. *Photochemistry and Photobiology*, 391-399.

Nava, M. A. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO*.

Nayvi, A., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 195 - 211.

Nogueira, R. (2007). Inducción de callos en explantes foliares de Murici-pequeña (*Byrsonima intermedia* A. Juss) . *Ciencia y Agrotecnología*, 366-370.

Ojewole, J. (2005). Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *J Ethnopharmacol.*, 13-19.

- Okwu, D., & Nnamdi, F. (2011). Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. *J Chem Pharm Res.*, 1-10.
- Ortiz, C. (2016). *Revista sobre el entorno y la naturaleza. Cuidados de la especie Kalanchoe*. Obtenido de http://www.elicriso.it/es/como_cultivar/kalanchoe/
- Pattewar, S. (2012). *Kalanchoe pinnata. Phytochemical and Pharmacological Profile*.
- Pereira, C. (2004). Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies. *Revista de Biología y Ciencias de la Tierra*.
- Pereira, M. (2016). *Determinación de la capacidad antioxidante de productos alimenticios derivados de plantas. Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales*.
- Pérez, J. (1998). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Cuba: GEO.
- Pérez, J. (2010). *Evaluación de la Producción de fitoquímicos a partir del tejido de células en Suspensión de Nerium oleander*. Obtenido de Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
- Pérez, M., Del Villar, A., & Vanegas, P. (2015). Perfil fitoquímico de cultivos en suspensión de *Kalanchoe daigremontiana*. *Instituto Tecnológico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos*.
- Phatak, R. S., & Hendre, A. S. (2014). Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*.
- Philips, G., & Gamborg, O. (2005). *Plant cell tissue and organ culture. (Eds.): N.K. Mehra*.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Mundi-Prensa.

- Pompeu, G., Gratao, P., Vitorello, V., & Azevedo, R. (2008). Antioxidant isoenzyme responses to nickel . induced stress in cell suspension culture. *Scientia Agricola*.
- Rajsekhar, P., Arvind, R., Ramachandran, M., Jini, K., & Sharadha, P. (2016). The “Wonder Plant” *Kalanchoe pinnata* (Linn.) Pers.: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 151-158.
- Ramirez, L., Carreño, N., & Granados, J. (2005). *Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de Guadua angustifolia para el establecimiento del cultivo in vitro*. Obtenido de Universidad Nacional Abierta y a Distancia. (UNAD). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de: <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/1069/2/Tesis%20Final%20mayo%202013.pdf>
- Ricco, R., Wagner, M., Portmann, E., Reides, C., & Llesuy, S. (2010). Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies Argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). *Bol Latinoamer Caribe Plant Med Aromat*.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, 152-159.
- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). *Productos naturales vegetales*. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. La Plata, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.
- Roca, W., & Mroginski. (1993). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. . Cali, Colombia: CIAT. Centro Internacional de la Agricultura Tropical.
- Sánchez, L., & Sáenz, E. (2005). *Antisépticos y desinfectantes utilizados en cultivo in vitro*. Obtenido de Universidad Nacional. Colombia.

- Sánchez, M. C., & Salaverría, J. L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa*). *Revista UDO Agrícola*, 21-26.
- Santos, M., Ferreira, M., Guimaraes, M., Lima, M., & Oliveira, C. (2014). Callogenesis in leaves of *Kalanchoe pinnata* Lam. by 2,4-D and BA action. *Rev. Bras. PI. Med*, 760-764.
- Segretín, M. (2011). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)* Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA . Obtenido de <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
- Sendra, J., Sentandreu, E., & Navarro, J. (2006). Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydracyl (DPPH) for determination of the antiradical of citrus juices. *Eur. Food Res. Technol*, 615-624.
- Sharadanand, R. (2015). GC-MS analysis of bioactive compounds in the methanolic extract of *Kalanchoe pinnata* fresh leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 34-37.
- Sharadanand, R., & Subhash, H. (2015). Free radical scavenging activities of different fractions of *Kalanchoe pinnata*. *International Journal of Pharm Tech Research*, 854-863.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta; manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.
- SIGMA-ALDRICH. (2015). Folin-Ciocalteu's phenol reagent. Product Information, 1-2.

- Simón, E., & Lluisa, M. (2006). *Práctica de crecimiento y Desarrollo de los Vegetales. Universidad de Barcelona. Departamento de Biología Vegetal. Colección: Textos de docentes: pp 248.*
- Singab, A., El-Ahamdy, S., Labib, R., & Fekry, S. (2011). Phenolics from *Kalanchoe marmorata* Baker, family Crassulaceae. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University.*, 1-5.
- Strasburger, E. N., Schenck, H., & Schimper, A. (1994). *Tratado de Botánica. Barcelona, ES.*
- Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., & Hayashi, H. (2000). New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. . *Biosci Biotechnol Biochem*, 1310-1312.
- Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., Hayashi, H., Murakami, A., Sakai, H., . . . Ohigashi, H. (2001). Anti-tumour promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontian tubiflora*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 947-949.
- Taha, A. (2003). Chemical Constituents from the *Hydrangea chinensis*. *Pharmaceutical Research*, 15-20.
- Thomé, C., Gressler, P., & Santos, G. (2004). Propagación in vitro de *Kalanchoe Blossfeldiana* Poelin vía organogénesis. *Revista Brasileira de Agrociencia*, 197-202.
- USDA. (2005). *United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. National Plant Germplasm System.* . Obtenido de <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?21076>
- Valentin, J. (2005). *Respuesta de dos genotipos de Aguacate a la micropropagación utilizando diferentes combinaciones de auxinas y citocininas, Universidad de*

San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas.

- Valko, M., Leibfritz, D., & Moncol, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiologicla functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39-44.
- Van Staden, J. F., & Taylo, N. (2006). Plant stress in vitro: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*.
- Villamizar, L., Mosquera, N., Mejía, A., Muñoz, P., & Pombo, L. (2014). Kalanchoe pinnata. . *Investigadores del Departamento de Ciencias Básica. Fundación Universitaria Juan N. Corpas*. Bogotá, D.C.
- Zabala, M., Angarita, M., Aguirre, A. M., Restrepo, J., & Montoya, C. (2008). Estrategías para incrementar la producción de Metabolitos Secundarios en cultivos de células vegetales. *Fac. Nal. Agr. Medellín*, 4881-4895.
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radicalscavenging activities of wheat germ protein hydrolyses (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 1296-1302.