



Establecimiento de suspensiones celulares y análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. cultivadas *in vitro*, para determinar la presencia de metabolitos secundarios

Sánchez Carrera, Leslie Valeria

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph. D.

11 de marzo de 2024

Resultado de análisis de Copyleaks



Plagiarism and AI Content Detection Report

Tesis_Leslie Sánchez_CopyLeaks.docx

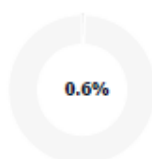
Scan details

Scan time:
March 4th, 2024 at 19:28 UTC

Total Pages:
21

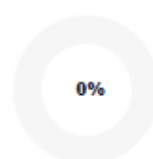
Total Words:
5021

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.2%	12
Minor Changes	0%	1
Paraphrased	0.3%	17
Omitted Words	6%	300

AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	0%	0
Human text	100%	4721

[Learn more](#)

🔍 Plagiarism Results: (1)

🌐 Kalanchoe pinnata | Kalanchoe pinnata, comúnmente llamado ho... | Fli...

0.6%

<https://www.flickr.com/photos/pedroysergio/8485555204>

Explore Recent Phot...

.....

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz, PhD.

C. C.: 1802278562



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Establecimiento de suspensiones celulares y análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. cultivadas *in vitro*, para determinar la presencia de metabolitos secundarios”** fue realizado por la señorita **Sánchez Carrera, Leslie Valeria**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 04 de marzo del 2024

.....
Jadán Guerrero, Mónica Beatriz, PhD.

C. C.: 1802278562



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Sánchez Carrera, Leslie Valeria**, con cédula de ciudadanía n° 1805445010, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Establecimiento de suspensiones celulares y análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. cultivadas *in vitro*, para determinar la presencia de metabolitos secundarios**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 04 de marzo del 2024

.....
Sánchez Carrera, Leslie Valeria

C. C.: 1805445010



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Sánchez Carrera, Leslie Valeria**, con cédula de ciudadanía n° 1805445010, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Establecimiento de suspensiones celulares y análisis físico-químico del callo y suspensiones de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. cultivadas *in vitro*, para determinar la presencia de metabolitos secundarios”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 04 de marzo del 2024

.....
Sánchez Carrera, Leslie Valeria

C. C.: 1805445010

Dedicatoria

“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”.

Filipenses 4:13

Este trabajo de investigación está dedicado a:

En primer lugar, a Dios, porque siempre serás mi principio y prioridad, mi vida e integridad está dedicada a Ti, por ser mi todo, no hay palabras para expresar todo el amor que tengo por ti y tengo la certeza que me amas incluso más.

En memoria de mi abuelita Martha, mi hermosa mamita Patín, porque fuiste y serás mi ejemplo de amor y servicio a los demás, por tu fuerza y amor, porque te amo y te extraño.

A mis papis, Franklin y Susana, por su apoyo, ánimos, oraciones, llamadas y amor, los amo y admiro. Son el pilar que me impulsa a seguir adelante.

A mi hermana Angie, por tu apoyo y siempre hacerme ver en qué puedo mejorar, te amo.

A mi abuelita Lourdes, por tus oraciones y tu amor. Te amo.

A mis tías Paty, Wilma, Jeaneth, Lula, a mi tío Roberto, y a mis primos, por su confianza, apoyo, oraciones y sobre todo por amarme, sin duda, Dios nos ha hecho una familia bendecida y unida, los amo.

A la CECE y amigos cecenianos, por demostrarme que Dios está en todos los aspectos de mi vida, incluso en la universidad, que hermoso ministerio, y además, porque es posible encontrar amigos de verdad, que te apoyan y oran por ti. A todos ustedes, los amo.

A Nayeli, por tu hermosa amistad y apoyo.

Con mucho amor para todos ustedes.

Leslie Valeria Sánchez Carrera.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios desde el fondo de mi corazón, por darme su fortaleza cada día y por darme sueños y metas por cumplir, y sobre todo por amarme.

A mi hermosa familia, mis padres, Franklin y Susana, y mi hermana Angie, gracias por sus oraciones, llamadas, mensajes y atención, sin ustedes esto no sería posible. Los amo.

A la hermosa tutora de tesis, Mónica Jadán, Ph.D, una guerrera y sierva de Dios, que ha formado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales, un lugar seguro en el cual podemos ser una familia, su ministerio en la Universidad es increíble y de bendición.

A la Mgtr, Andrea Ortega, que se ha convertido en una gran amiga, y que, a través de sus consejos, este ha sido uno de los procesos de aprendizaje, compañía y amistad más significativos.

A mi amiga Nayeli, con la cual he cursado este periodo académico, desde el principio hasta el final de nuestra carrera universitaria.

A mi querida compañera de tesis Sasha, por tu tiempo, consejos, conversaciones profundas y sobre todo el “intercambio de información”.

A los queridos pasantes del laboratorio, que con su apoyo, compañía, risas, preguntas, y el nunca olvidable “jefa”, me han permitido disfrutar de este tiempo.

Leslie Valeria Sánchez Carrera

Índice de contenido

Resultado de análisis de Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenido	8
Índice de tablas	10
Índice de figuras	11
Resumen	12
Abstract.....	13
Capítulo I: Introducción	14
Planteamiento del problema.....	14
Justificación del problema	15
Objetivos	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	16
Hipótesis	16
Capítulo II: Marco Teórico.....	17
<i>Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers.</i>	17
Origen y distribución	17
Taxonomía	17
Descripción botánica	18
Cultivo in vitro.....	19
Callogénesis.....	20
Suspensiones celulares.....	20
Recuento celular	21
Metabolitos secundarios	22
Técnicas para el análisis de metabolitos secundarios.....	23
Espectrofotometría.....	23
Capacidad antioxidante	24
Ensayos de transferencia de electrones	24
Ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno.....	25
Capítulo III: Materiales y métodos	27
Localización del laboratorio	27
Fase de campo	27
Obtención del material vegetal.....	27
Selección del material vegetal.....	27
Fase de laboratorio.....	27

Desinfección del material vegetal.....	27
Medio para la inducción a callo	28
Inducción a callo	28
Optimización de medio de cultivo para suspensiones celulares	28
Establecimiento de suspensiones celulares	29
Análisis de varianza (ANOVA).....	29
Análisis de físico-químico	30
Capítulo IV: Resultados	31
Establecimiento de suspensiones celulares	31
Recuento celular	32
Análisis físico-químico	36
Capítulo V: Discusión.....	38
Establecimiento de suspensiones celulares	38
Análisis físico-químicos del callo y las suspensiones celulares	40
Capítulo VI: Conclusiones	42
Conclusiones.....	42
Capítulo VII: Recomendaciones.....	43
Recomendaciones	43
Bibliografía	44

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Indicadores sugeridos para la selección de las cámaras para recuento celular.....</i>	22
Tabla 2. <i>Compuestos analizados por espectrofotometría con su descripción y reactivo característico.....</i>	24
Tabla 3. <i>Ensayos de transferencia de electrones para determinar la capacidad antioxidante, la técnica se realiza por medio de espectrofotometría.....</i>	25
Tabla 4. <i>Descripción y características de los ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno.....</i>	26
Tabla 5. <i>Tratamientos aplicados para el establecimiento de suspensiones celulares.....</i>	29
Tabla 6. <i>Resultados del conteo de células con cámara de Neubauer a los tratamientos.....</i>	34
Tabla 7. <i>Análisis de los tratamientos.....</i>	35
Tabla 8. <i>Propiedades antioxidantes determinadas usando el índice electroquímico (EI).....</i>	37

Índice de figuras

Figura 1. <i>Distribución de Kalanchoe pinnata L. en América</i>	17
Figura 2. <i>Kalanchoe pinnata L.</i>	19
Figura 3. <i>Callos de Kalanchoe pinnata (Lam) Pers.</i>	31
Figura 4. <i>Suspensiones celulares de Kalanchoe pinnata (Lam) Pers.</i>	32
Figura 5. <i>Células de la suspensión de Kalanchoe pinnata (Lam) Pers.</i>	33
Figura 6. <i>Representación del crecimiento en los tratamientos (T0, T1, T2, T3) de suspensiones celulares</i>	35
Figura 7. <i>Gráfico Q-Q plot y diagrama de dispersión para comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad</i>	36
Figura 8. <i>Voltamperogramas de pulso diferencial de extractos metanólicos del segundo tratamiento (T2) y del callo, en buffer de acetato, pH 4.5</i>	37

Resumen

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. conocida como hoja de aire, es una planta suculenta originaria de Madagascar y el sur África, y se la considera como una especie invasora en Ecuador. Es ampliamente estudiada por sus propiedades medicinales, atribuidas a sus metabolitos secundarios como flavonoides, antioxidantes y fenoles. La presente investigación busca establecer suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. y analizar físico-químicamente el callo y las suspensiones celulares por medio de la técnica de voltametría de pulso diferencial. Para el establecimiento de suspensiones celulares se evaluaron tres tratamientos y un tratamiento control, el medio de cultivo estaba enriquecido con sales Woody Plant Medium (WPM) y la variación en la combinación de los reguladores de crecimiento 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (6-BAP). Para el análisis físico-químico se envió 30 gramos de callo y 20 mL de la suspensión celular de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Se determinó que el tratamiento con mejor resultado, fue el medio de cultivo suplementado con 1 mg/L de 6-BAP y 0,5 mg/L de 2,4-D, obteniendo una concentración celular de 2442000 células/mL. Con relación al análisis físico-químico, se determinaron tres picos anódicos en los voltamperogramas tanto del callo como de la suspensión celular, adicionalmente, el callo tenía un mayor índice electroquímico con 15,75 $\mu A/V$, en relación a la suspensión celular con 9,34 $\mu A/V$.

Palabras clave: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., suspensión celular, voltametría de pulso diferencial, índice electroquímico.

Abstract

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. known as air leaf, is a succulent plant native to Madagascar and southern Africa, and is considered an invasive species in Ecuador. It is widely studied for its medicinal properties, attributed to its secondary metabolites such as flavonoids, antioxidants and phenols. The present research seeks to establish cell suspensions of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. and physically-chemically analyze the callus and cell suspensions through the differential pulse voltammetry technique. For the establishment of cell suspensions, three treatments and a control treatment were evaluated. The culture medium was enriched with Woody Plant Medium (WPM) salts and the variation in the combination of the growth regulators 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4- D) and 6-benzylaminopurine (6-BAP). For physical-chemical analysis, 30 grams of callus and 20 mL of the *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. cell suspension were sent to the Pontifical Catholic University of Ecuador (PUCE). It was determined that the treatment with the best results was the culture medium supplemented with 1 mg/L of 6-BAP and 0.5 mg/L of 2,4-D, obtaining a cell concentration of 2442,000 cells/mL. In relation to the physical-chemical analysis, three anodic peaks were determined in the voltammograms of both the callus and the cell suspension. Additionally, the callus had a higher electrochemical index with 15.75 $\mu\text{A/V}$, in relation to the cell suspension with 9.34 $\mu\text{A/V}$.

Keywords: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., cell suspension, differential pulse voltammetry, electrochemical index.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

Las plantas medicinales son ampliamente utilizadas en los países en desarrollo (Tres, 2006), debido al acceso, bajo costo (Bussmann & Sharon, 2018), variedad y actividad biológica de uso tradicional (Monge, 2003). No existen regulaciones que limiten su uso (Tres, 2006), y no hay un control de los efectos tóxicos o terapéuticos de los principios activos (Tres, 2006), por lo que, en la actualidad no se han encontrado pruebas científicas que promuevan el uso de medicinas alternativas (Vallejo & Peral, 2012).

Tuta *et al.*, (2021) mencionan que, en la búsqueda de un remedio para el dolor de cálculos en la vejiga o en el riñón entre los siglos XVIII y XIX, los médicos realizaban extractos de plantas con uso terapéutico en el Nuevo Reino de Granada, que, al obtener resultados favorables, el conocimiento fue llevado a América. Las plantas tienen compuestos con actividad biológica y principios activos, por lo tanto, al realizar un extracto, es difícil relacionar la presencia de un compuesto específico (Monge, 2003).

Ecuador es considerado un país con megadiversidad en especies, un ejemplo es el género *Kalanchoe*, teniendo a *Kalanchoe blossfeldiana*, *Kalanchoe daigremontiana*, *Kalanchoe pinnata* y un híbrido conocido como *Kalanchoe x houghtonii* en las regiones Costa, Sierra y Amazonía, mientras que en Galápagos se han registrado siete especies, entre ellas: *Kalanchoe blossfeldiana*, *Kalanchoe daigremontiana*, *Kalanchoe eriophylla*, *Kalanchoe Fedtschenkoii*, *Kalanchoe gastonis-bonnierii*, *Kalanchoe pinnata* y *Kalanchoe tubiflora* (Vargas *et al.*, 2022).

Kalanchoe pinnata es una especie antigua, cuyos primeros registros se mencionan en las Islas Galápagos en el año 1905 (Vargas *et al.*, 2022). Florece desde noviembre hasta marzo y se reproduce fácilmente por semillas, o regeneración clonal a partir de hojas caídas o raíces (González de León *et al.*, 2016).

Los metabolitos secundarios son utilizados en varias industrias, por lo tanto, la biotecnología y el cultivo de tejidos son beneficiosos, debido a que, permiten un rápido crecimiento, optimización, extracción de metabolitos secundarios de callo, y por consiguiente, una mayor producción de las características o principios bioactivos de plantas u organismos (N. Pérez & Jiménez, 2011).

Justificación del problema

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. es utilizada, por sus principios activos, para el tratamiento de heridas, inflamaciones (Dos Santos *et al.*, 2018), y enfermedades incluido el cáncer (Hernández *et al.*, 2022). En Ecuador es utilizada para moretones y aliviar el dolor de fracturas (Ahamad *et al.*, 2011). Su extracto es estudiado por su riqueza en flavonoides, fenoles y antioxidantes (Rao *et al.*, 2023).

Kalanchoe pinnata L. es una planta medicinal tradicional presente en países como África, India y Brasil, en donde realizan extractos acuosos, orgánicos y etanólicos de hojas enteras (Saravanan *et al.*, 2020), convirtiéndose en una fábrica de productos químicos verdes (Niazian, 2019).

Los metabolitos secundarios obtenidos a partir de una muestra vegetal pueden ser bajos en términos de producción, por tal motivo, el uso de células en suspensión es el método utilizado en industrias para una mayor obtención de compuestos bioactivos (García *et al.*, 2019).

Objetivos

Objetivo general

Establecer suspensiones celulares y analizar físico-químicamente el callo y suspensiones de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. cultivadas *in vitro*, para determinar la

presencia de metabolitos secundarios.

Objetivos específicos

- Optimizar un medio de cultivo para suspensiones celulares a partir del callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. cultivado *in vitro*, en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en Sangolquí, provincia de Pichincha.
- Realizar el análisis físico-químico de callo y la suspensión celular de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. para determinar la presencia de metabolitos secundarios en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en Sangolquí, provincia de Pichincha.

Hipótesis

El callo y las suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. presentan metabolitos secundarios, determinados por medio de un análisis físico-químico.

Capítulo II: Marco Teórico

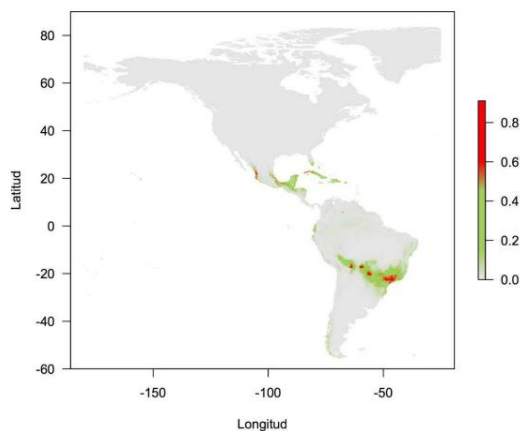
Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers.

Origen y distribución

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. u hoja de aire, es una planta originaria de Madagascar y el sur de África (Smith, 2004), y se la considera como una especie invasora en Asia, Australia, Nueva Zelanda, Indias Occidentales, Macaronesia, Mascareñas, Galápagos, Melanesia, Polinesia y Hawai (Ahamad *et al.*, 2011), Panamá, Ecuador, Colombia, México y Venezuela (Navarro *et al.*, 2023).

Figura 1

Distribución de Kalanchoe pinnata L. en América.



Nota. Tomado de Gonzalez (2015).

Taxonomía

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. tiene como clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta (Ahamad *et al.*, 2011).

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Saxifragales

Familia: Crassulaceae

Subfamilia Kalanchoe

Género: *Kalanchoe*

Especie: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Guillot *et al.*, 2009).

Descripción botánica

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. es una suculenta, que generalmente se cultiva en jardines, como hierba o arbusto (Hernández *et al.*, 2022), o también, se la puede encontrar de forma silvestre (Ahamad *et al.*, 2011).

Crece entre 0,3 a 1,5 metros de alto, con tallos huecos, que muestran coloración clara si es tejido viejo, y coloración rojiza moteada con blanco, si su tejido es joven (Ahamad *et al.*, 2011). Sus hojas son verdes, opuestas, compuestas, simples y festoneadas, con bordes rojo oscuro, y con una ligera tendencia a morado oscuro (Hernández *et al.*, 2022).

Sus flores son generalmente rojizas, colgantes (Ahamad *et al.*, 2011), y acampanadas (Hernández *et al.*, 2022).

Se reproduce por medio de semillas pequeñas o por medio de sus hojas (Ahamad *et al.*, 2011).

Figura 2

Kalanchoe pinnata L.



Nota. A) Planta de *Kalanchoe pinnata* L. con un mes de crecimiento, B) Planta de *Kalanchoe pinnata* L. con 3 meses de crecimiento.

Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta que ayuda a potenciar la teoría celular y la totipotencia (Loyola & Ochoa, 2018). Permite la producción de compuestos bioactivos utilizando como materia prima a las plantas (N. Pérez & Jiménez, 2011). Entre las aplicaciones de cultivo de tejidos *in vitro* se destaca, el estudio en biogenética y enzimas, para aislar metabolitos secundarios (Loyola & Ochoa, 2018).

El cultivo de tejidos *in vitro* permite un mayor control de factores bióticos y abióticos, mejorando el rendimiento de multiplicación y producción de especies vegetales (N. Pérez & Jiménez, 2011). Los factores necesarios para desarrollar y utilizar cultivo *in vitro* son: seleccionar un explante con las características requeridas en el experimento, eliminar contaminantes a través de protocolos de desinfección, utilizar un medio de cultivo con los nutrientes necesarios para la especie y controlar las condiciones en un cuarto de incubación (Loyola & Ochoa, 2018).

Callogénesis

Un callo es una agrupación de células no diferenciadas (Alcantara *et al.*, 2019). En la naturaleza, las plantas generan callo como resultado del exceso de auxinas (Roca & Mroginski, 1993). La callogénesis es un proceso de dediferenciación, en el que las células se encuentran en división activa (Beraud *et al.*, 2014). A nivel de laboratorio, las especies vegetales pueden ser inducidas a callo en dependencia al tipo de explante, medio de cultivo enriquecido con variación en la concentración de reguladores de crecimiento, características genéticas, entre otros (Beraud *et al.*, 2014). La velocidad de aparición del callo dependerá de la especie introducida.

Los callos pueden mantenerse si se utiliza un medio fresco, o a su vez se pueden inducir a formar brotes, embriones, raíces, etc., si se enriquece el medio con los reguladores de crecimiento adecuados (Alcantara *et al.*, 2019).

Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares permiten observar el estado metabólico, fisiológico y bioquímico de la especie estudiada, además, optimiza la producción de metabolitos secundarios en un medio con nutrientes necesarios (Sánchez *et al.*, 2015).

Las células se distribuyen de manera homogénea en el medio de cultivo, por lo tanto, mejora la captación de oxígeno y nutrientes (Arias *et al.*, 2009).

En las suspensiones se forman agregados naturalmente, debido a la incorrecta separación celular, este hecho afecta a la capacidad metabólica, sin embargo, uno de los factores controlables que ayudan a que no ocurra esto en específico es la agitación, ya que, homogeniza el medio debido a la velocidad constante (Arias *et al.*, 2009).

Recuento celular

El crecimiento celular se observa a través de un incremento del número de células (Arredondo & Voltolina, 2007). La densidad celular es la cantidad de células presentes en un volumen determinado, existen varios métodos para medir la densidad celular, sin embargo, el método más utilizado es el recuento celular por medio de un microscopio óptico, debido a la sencillez y bajo costo (Hoffman, 2006).

Para realizar un conteo celular mediante un microscopio óptico se pueden utilizar varias cámaras comunes, como Petroff Hauser, Speirs Levy, Hematocitómetro Neubauer, Hematocitómetro Fuchs-Rosenthal, Palmer Maloney y Sedgwick-Rafter (Arredondo & Voltolina, 2007).

A pesar de que el conteo celular por microscopía es el método más utilizado (Hoffman, 2006), se deben tener en cuenta varios parámetros para obtener resultados reproducibles, estos parámetros conllevan la selección de la muestra, la dilución, la cámara de recuento, el objetivo (4x, 10x, 40x, 100x) del microscopio y la técnica con la cual se llenará la cámara seleccionada (Arredondo & Voltolina, 2007).

La cámara de conteo celular más utilizada en cultivo de tejidos es el hematocitómetro de Neubauer, con una área de recuento de 0,9 mm² (Arredondo & Voltolina, 2007). Para seleccionar una cámara de recuento celular se deben tomar en cuenta los indicadores destacados en la Tabla 1.

Tabla 1.

Indicadores sugeridos para la selección de las cámaras para recuento celular.

Cámara	Volumen (μL)	Profundidad (mm)	Área (mm²)	Objetivos	Tamaño celular (μm)	Densidad (cél/mL)
Petroff Hauser	0,2	0,02	10	40-100	0,5-5	106-108
Speirs Levy	0,4	0,2	2	10-20	5-75	104-106
Hematocítom metro (Neubauer)	0,9	0,1	9	20-40	2-30	104-107
Hematocítom metro (Fuchs- Rosenthal)	3,2	0,2	16	10-20	5-75	104-106
Palmer Maloney	100	0,4	250	10-45	5-150	102-105
Sedgwick- Rafter	1000	1	1000	2,5-10	50-500	30-104

Nota. Recuperado de Guillard & Sieracki (2005).

Metabolitos secundarios

Las plantas son consideradas fuentes de un gran porcentaje de metabolitos secundarios, utilizados en varias industrias (N. Pérez & Jiménez, 2011). Cada año se descubren más de estos compuestos, lo que, tiene un gran impacto debido al costo de los biofármacos, su biodisponibilidad y las plantas que se encuentran en peligro de extinción, por lo tanto, su distribución es limitada (N. Pérez & Jiménez, 2011).

Los metabolitos secundarios son componentes que provienen del metabolismo primario (N. Pérez & Jiménez, 2011), tienen peso molecular bajo y son variables entre una especie y otra (Wink, 2006). Son producto de adaptaciones, simbiosis, defensa contra ataques de otros

organismos, atracción de polinizadores, competencia por el hábitat y exposición a diferentes factores abióticos (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Dentro de una planta, los metabolitos secundarios se encuentran en diferentes sitios, sin embargo, la mayoría se almacena en tejidos bajos como flores, semillas, corteza, en especies perennes, etc, es decir, en lugares importantes para la supervivencia y reproducción (Wink, 2006).

Cada grupo de metabolitos secundarios tiene funciones específicas, siendo los alcaloides los encargados de las funciones fisiológicas, las pectinas transportan nitrógeno y componentes almacenados, los fenoles y flavonoides protegen de los rayos ultravioletas (Wink, 2006).

Entre una de las propiedades bioactivas de *Kalanchoe pinnata* L. está su actividad antiinflamatoria, debido a la presencia de flavonoides y terpenos, además, los metabolitos secundarios más abundantes y destacados de esta planta son la quercetina y la rutina (Escobar *et al.*, 2022).

Técnicas para el análisis de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios han sido estudiados a lo largo de los años con diferentes técnicas que dependen del tipo de compuesto que se requiera analizar.

Espectrofotometría

La espectrofotometría es una técnica cuantitativa que indica la concentración del compuesto a analizar (Díaz *et al.*, 2010). Para esta técnica se necesita un espectrofotómetro, una balanza, un potenciómetro y un agitador, además, se necesita conocer parámetros específicos para cada compuesto que se proceda a analizar, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2

Compuestos analizados por espectrofotometría con su descripción y reactivo característico.

Compuesto	Reactivo	Descripción	Longitud de onda (nm)
Alcaloides	Verde de bromocresol (BCG)	Complejo alcaloide-verde Color amarillo	470
Alcaloides	Dragendorff	Complejo bismuto- alcaloide. Color amarillo	435
Fenoles	Folin-Ciocalteu	Color azul	700
Taninos	Folin-Ciocalteu	Para secuestrar a los taninos se una gelatina al 10 %	700
Flavonoides	Cloruro de aluminio	Se usa metanol	420
Flavononas	2,4- dinitrofenilhidrazonas	Selectivo No es visible para flavonas y flavonoides	470
Glucósidos cianogénicos	Picrato de sodio	Libera el HCN Color amarillo a naranja- rojo	495

Nota. Recuperado de Rojas *et al.*, (2015).

Capacidad antioxidante

Ensayos de transferencia de electrones

Los ensayos de transferencia de electrones son técnicas que cuantifican la actividad antioxidante (Fernández *et al.*, 2006). Los compuestos antioxidantes reaccionan ante la presencia de un agente oxidante, es decir, un radical que al ser liberado será inhibido o reducido por la capacidad antioxidante de los compuestos analizados, este radical debe ser específico para cada compuesto como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3

Ensayos de transferencia de electrones para determinar la capacidad antioxidante, la técnica se realiza por medio de espectrofotometría.

Ensayo	Especie iniciadora	Descripción	Longitud de onda (nm)
DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	Radical DPPH⁺	Se observa cuando existen un descenso en DPPH⁺	515
ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))	Ferrilmioglobina H₂O₂ K₂S₂O₈ ABTS⁺	Se observa cuando existen un descenso en ABTS⁺	414
FRAP (Poder antioxidante reductor férrico)		Cuando hay reducción de TPTZ – Fe³⁺ y TPTZ – Fe²⁺	593

Nota. Recuperado de Fernández *et al.*, (2006)

Ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno

Este tipo de ensayos cuantifican la capacidad antioxidante, y van a depender del número y ubicación de los grupos hidroxilo (Fernández *et al.*, 2006), o en su caso los grupos que contengan hidrógeno en su estructura, como los polifenoles, entre otros.

Tabla 4

Descripción y características de los ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno.

Ensayo	Especie	Descripción	Técnica	Longitud de
--------	---------	-------------	---------	-------------

	iniciadora			onda (nm)
TRAP (Capacidad antioxidante equivalente de TROLOX)	AAPH (radicales peroxilo)	Consumo de oxígeno	Electrodo de oxígeno	Fase de retraso
ORAC (Capacidad de Absorción de radicales oxígeno)	AAPH $H_2O_2-Cu^{2+}$ $CuSO_4$	Reducción de la caída de fluorescencia	Fluorimetría	540 565
DCFH-DA (2,7-diclorodihidrofluoresceína de diacetato)	AAPH (radicales peroxilo)	Inhibición de oxidación DCFH-DA	Espectrofotometría Fluorimetría	504 529
Crocina	ABAP (radicales peroxilo)	Inhibición de la oxidación de crocina	Espectrofotometría	443

Nota. Recuperado de Fernández *et al.*, (2006).

Capítulo III: Materiales y métodos

Localización del laboratorio

El laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, sede Matriz, se ubica la Avenida General Rumiñahui en Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha. La parte experimental del trabajo de integración curricular se llevó a cabo en este laboratorio.

Fase de campo

Obtención del material vegetal

El material vegetal se obtuvo de plantas de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. aclimatizadas en Sangolquí, Pichincha.

Selección del material vegetal

El material vegetal para el establecimiento *in vitro*, fue seleccionado de hojas de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. de un tamaño de 6 a 8 centímetros, las cuales se encontraban en un estado intermedio entre jóvenes y maduras.

Fase de laboratorio

Desinfección del material vegetal

El protocolo de desinfección para las hojas de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. consistió, en primer lugar, en un lavado con agua corriente para eliminar las impurezas de mayor tamaño. En segundo lugar, el material vegetal fue sumergido durante 10 minutos en una solución de detergente al 1%, posteriormente se lavó con agua corriente. En tercer lugar, el material vegetal fue colocado en una solución de pesticida "Naturam" al 1% de concentración por 10

minutos, a continuación se retiró la solución. En cuarto lugar, se colocó al material vegetal, una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos. Finalmente, en una cámara de flujo laminar se realizaron tres lavados con agua destilada estéril (Torres, 2017).

Medio para la inducción a callo

El medio de cultivo utilizado para la obtención de callo fue el descrito por Masabanda (2023), se utilizaron 30 g/L de sacarosa comercial, 2,41 g/L de sales minerales WPM, 1,5 mg/L del regulador de crecimiento 2,4-D. Como agente gelificante se utilizó 2,1 g/L de Phytigel y se ajustó el pH entre 5,7 y 5,8. El medio de cultivo y sus componentes se autoclavaron a 121°C.

Inducción a callo

En las hojas de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. desinfectadas, se realizaron cortes en los bordes y se formaron segmentos de hojas de 2 centímetros. Se sembraron dos segmentos de hoja por frasco con 30 ml de medio de cultivo. Posteriormente, los frascos fueron incubados en la sala de incubación.

Optimización de medio de cultivo para suspensiones celulares

El medio de cultivo para el establecimiento de suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. fue descrito por (Pérez, 2015), se utilizaron 30 g/L de sacarosa comercial, 2,41 g/L de sales minerales WPM, con 3 variaciones en la concentración de los reguladores de crecimiento 6-BAP y 2,4-D para cada tratamiento, como se describió en la Tabla 2. Para cada uno de los tratamientos se aplicó 5 repeticiones. Se ajustó el pH entre 5,7 y 5,8. Posteriormente, el medio de cultivo se autoclavó a 121°C.

Tabla 5.

Tratamientos aplicados para el establecimiento de suspensiones celulares.

Tratamiento	6-BAP (mg/L)	2,4-D (mg/L)
T0 (control)	0	0
T1	0,5	0,25
T2	1	0,5
T3	1,5	0,75

Establecimiento de suspensiones celulares

Las suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., se establecieron a partir de callo friable sin oxidación. En la cámara de flujo laminar se pesó 1 g de callo friable y se sembró en matraces de 50 ml, con 20 ml de medio de cultivo. Las suspensiones celulares se incubaron en oscuridad y con agitación constante a 110 rpm en un agitador orbital.

Análisis de varianza (ANOVA)

Para realizar el análisis estadístico, se eligió un diseño experimental completamente al azar (DCA), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba de Duncan, tomando en cuenta las variaciones en la concentración de los reguladores de crecimiento 2,4-D y de 6-BAP, en el medio de cultivo para suspensiones celulares, además, cumple con las características de los factores y tratamientos sobre la variable de respuesta, que en este caso es el crecimiento celular, el cual se evaluará por medio de un recuento celular por cámara de Neubauer, utilizando un microscopio electrónico Olympus BX41.

Análisis de físico-químico

Para el análisis físico-químico del callo y las suspensiones de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., se enviaron 30 g de callo y 20 ml de suspensión celular a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en Quito, con lo que se realizaron los análisis para determinar el índice electroquímico por medio de voltametría diferencial de pulso.

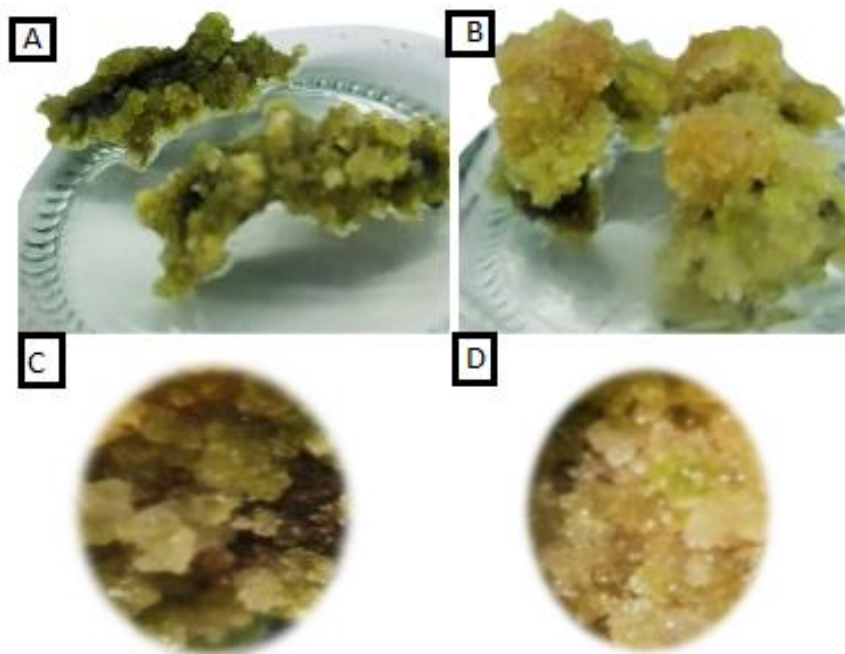
Capítulo IV: Resultados

Establecimiento de suspensiones celulares

Para el establecimiento de las suspensiones celulares, se evaluó la optimización de los medios de cultivo, en los cuales se cambió la concentración de los reguladores de crecimiento 2,4-D y 6-BAP, mediante un recuento celular por cámara de Neubauer con un microscopio electrónico Olympus BX41.

Figura 3

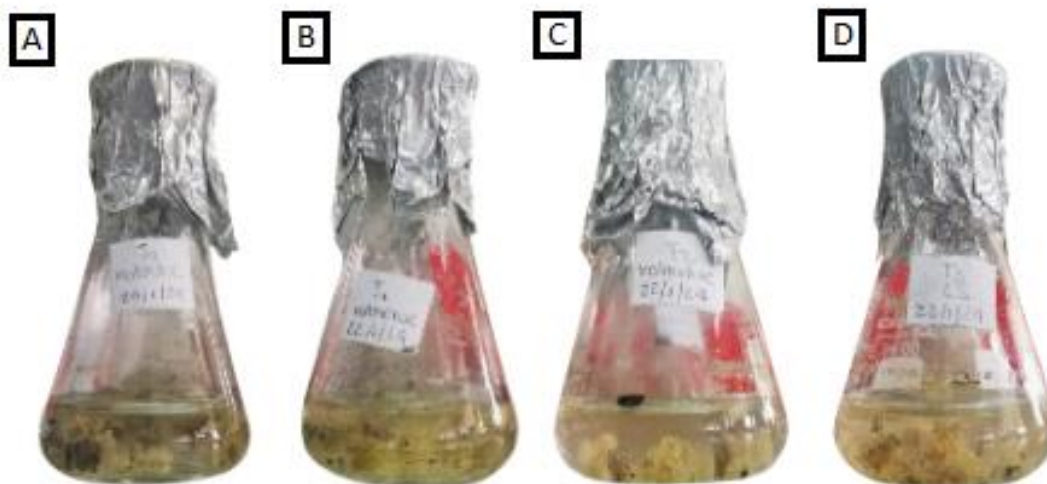
Callos de Kalanchoe pinnata (Lam) Pers.



Nota. Callos de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. utilizados para el establecimiento de suspensiones celulares. A) Callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. a los 2 meses y 15 días de cultivo, B) Callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. a los 3 meses y 15 días de cultivo, C) Callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. a los 2 meses y 15 días de cultivo, observado en el estereomicroscopio, D) Callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. a los 3 meses y 15 días de cultivo, observado en el estereomicroscopio.

Figura 4

Suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers.



Nota. Suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. a los 7 días de cultivo.

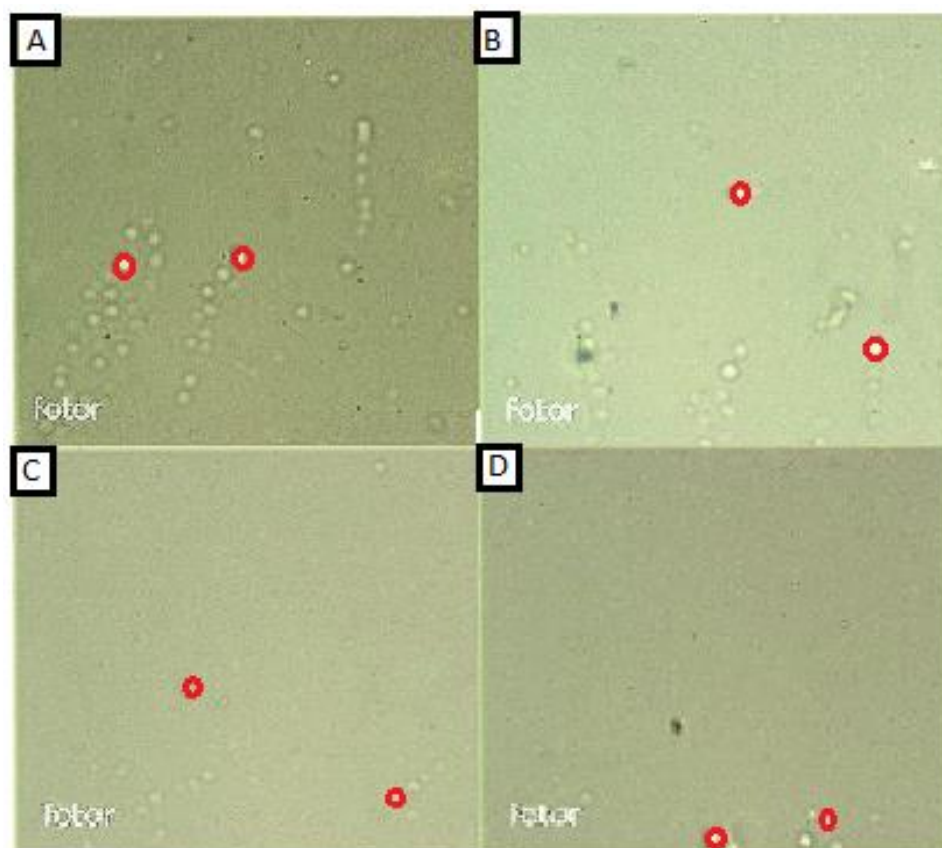
Recuento celular

El conteo de células se efectuó a los 21 días de cultivados los callos en el medio de cultivo para la suspensión celular. Las concentraciones celulares de los tratamientos se detallan en la Tabla 6. Se contó con el crecimiento celular en todos los tratamientos (T0, T1, T2, T3) y sus respectivas repeticiones.

La concentración celular se obtuvo realizando un conteo de las células de los cuadrantes exteriores, posteriormente se sumó y dividió el total para el número de cuadrantes utilizados para el recuento, y finalmente se multiplicó por 10000, no se realizó dilución por lo que no se multiplicó por un factor de dilución.

Figura 5

Células de la suspensión de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers.



Nota. Células de la suspensión de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. observadas a través de un microscopio electrónico Olympus BX41. A) Células en el primer cuadrante del T2, B) Células en el primer cuadrante del T1, C) Células en el primer cuadrante del T0, D) Células en el primer cuadrante del T3.

Tabla 6

Resultados del conteo de células con cámara de Neubauer a los tratamientos.

Tratamiento	Repetición	Concentración celular (células/mL) × 10³
T0 (control)	1	1120
	2	1150
	3	1130
	4	2015
	5	1245
T1	1	1065
	2	1590
	3	1805
	4	1960
	5	1905
T2	1	3040
	2	2025
	3	3095
	4	2020
	5	2030
T3	1	1005

2	935
3	1820
4	1015
5	1055

Una vez realizado el análisis estadístico (DCA), se observó que a los 21 días de cultivo, existió mayor crecimiento en el tratamiento T2 (2442×10^3 células/mL), en los tratamientos T1, T0 y T3, las medias no muestran diferencias significativas como se destaca en la Tabla 7. Para el análisis estadístico se realizó una ANOVA en la que se comprobó que la p sea menor a 0,05, lo que se cumplió con una p igual a 0,0012, por lo que se acepta el análisis.

Tabla 7

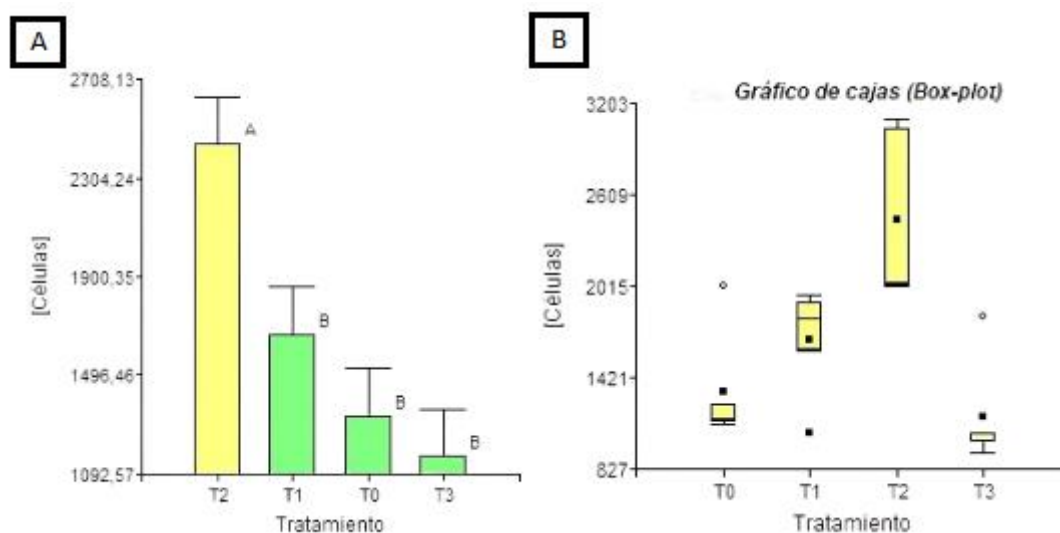
Análisis de los tratamientos.

Tratamiento	Medias $\times 10^3$	Categoría
T2	2442	A
T1	1665	B
T0	1332	B
T3	1166	B

Nota. Detalle de las medias de los tratamientos, los que tienen una letra común no son significativamente diferentes.

Figura 6

Representación del crecimiento en los tratamientos (T0, T1, T2, T3) de suspensiones celulares.

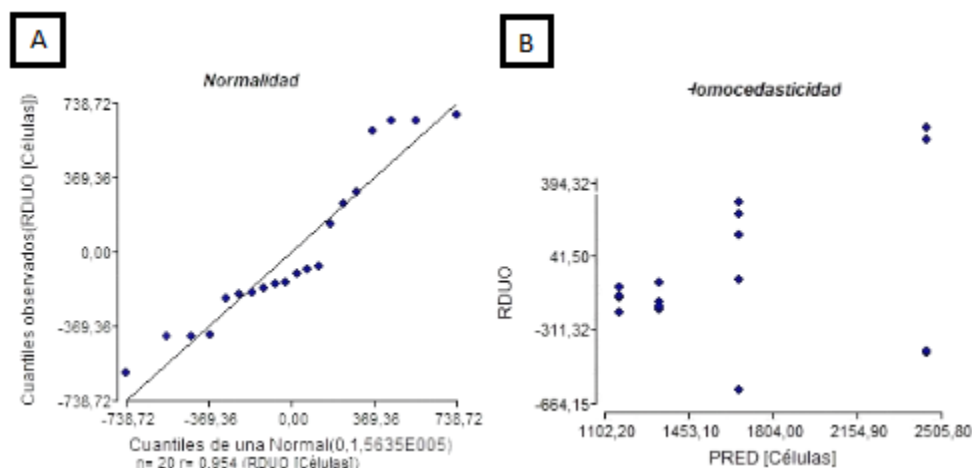


Nota. A) Diagrama de barras que representa las medias de la concentración celular de los tratamientos de suspensiones celulares, B) Gráfico de cajas en donde se visualiza la concentración celular con respecto a los tratamientos aplicados.

Se comprobaron los supuestos para normalidad y homocedasticidad. Con la prueba de Shapiro-Wilks, se obtuvo una p de 0,022, es decir, los datos son normales, ya que la p debe ser mayor a 0,001. Con respecto a la prueba de homocedasticidad, se obtuvo una p de 0,2091, es decir, los datos son homocedásticos. Se comprueba que los datos tienen una distribución normal y tienen la misma varianza.

Figura 7

Gráfico Q-Q plot y diagrama de dispersión para comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad.



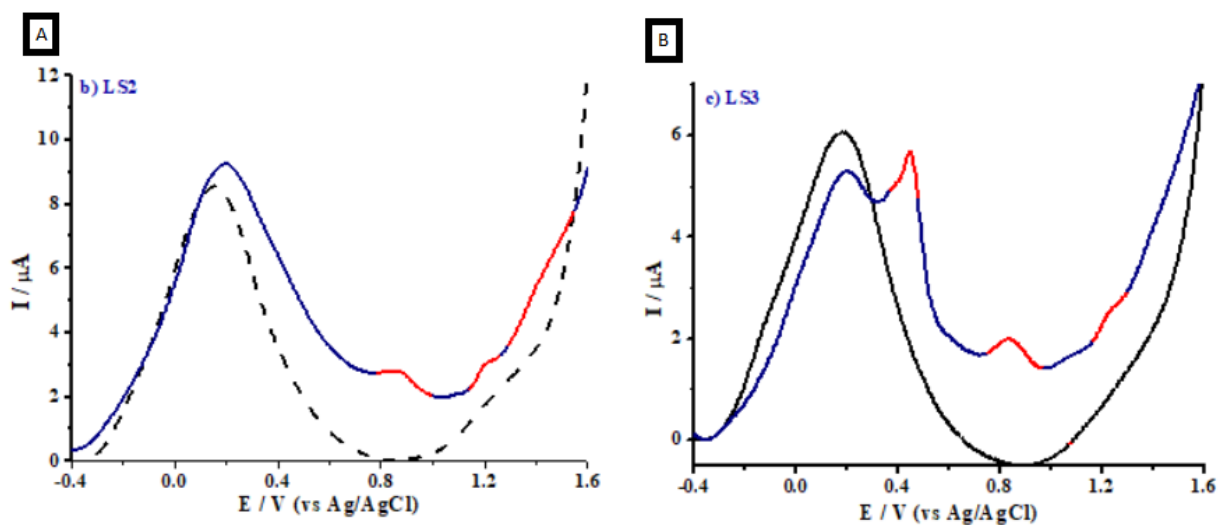
Nota. A) Gráfico Q-Q plot para comprobar la distribución normal de datos, B) Diagrama de dispersión para comprobar la homocedasticidad de datos.

Análisis físico-químico

Para el análisis físico-químico de las suspensiones celulares y el callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., se realizó la técnica de voltametría de pulso diferencial, para obtener el índice electroquímico, en un barrido de potencial de -0.5 a 1.6 V. Para la suspensión celular se analizó el tratamiento (T2), que obtuvo mayor concentración celular, en el cual se observaron tres picos diferenciados (Figura 8A), mientras que en el callo se observaron tres picos diferenciados (Figura 8B).

Figura 8

Voltamperogramas de pulso diferencial de extractos metanólicos del segundo tratamiento (T2) y del callo, en buffer de acetato, pH 4.5.



Nota. A) Voltamperograma del tratamiento (T2) de la suspensión celular, B) Voltamperograma del callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers.

Los picos diferenciados en los voltamperogramas representan a las especies antioxidantes, por lo tanto, se determinó el índice electroquímico (EI), en donde el callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. tiene un mayor poder antioxidante, en contraste, con el tratamiento (T2) de la suspensión celular (Tabla 8).

Tabla 8

Propiedades antioxidantes determinadas usando el índice electroquímico (EI).

Muestra	EI ($\mu\text{A V}^{-1}$)
Suspensión celular (T2)	9.34 ± 0.48
Callo	15.75 ± 1.61

Nota. Índice electroquímico del tratamiento (T2) de las suspensiones celulares y del callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers.

Capítulo V: Discusión

Establecimiento de suspensiones celulares

Para que un medio sea viable y guíe el tipo de crecimiento que se desea, es necesario poner los nutrientes y requerimientos propios del objetivo que se persiga en la investigación o experimento (Abdelnour & Escalant, 1994), además, se debe considerar parámetros que influyen en la naturaleza del medio, como, los reguladores de crecimiento, las sales, los minerales, la fuente de carbono y el pH.

El establecimiento de suspensiones celulares en *Kalanchoe*, tiene un estudio preliminar por Pérez (2015), en el que se reportó que el tratamiento con 0,5 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de BAP, mostró crecimiento celular observado por la turbidez, morfología y viabilidad celular, además, se detalló que en los días 19 y 21, la suspensión entró en fase estacionaria.

En este experimento, se realizó un control (T0) y tres tratamientos (T1, T2 y T3), con diferentes combinaciones de concentraciones de 2,4-D y 6-BAP, en el cual se reportó que el segundo tratamiento (T2), con 1 mg/L de 6-BAP y 0,5 mg/L de 2,4-D, tuvo una mayor concentración celular, con una media de 2442×10^3 (células/mL). Las variaciones en la combinación de los reguladores de crecimiento, influyen en la división y tamaño celular, lo que es un factor clave para aumentar la densidad celular en las suspensiones vegetales (Jamil *et al.*, 2018).

La proporción en que se colocan los reguladores de crecimiento, determinará la diferenciación o desdiferenciación celular (Ikeuchi *et al.*, 2013), las auxinas con las citocininas promueven la diferenciación de células (Abdelnour & Escalant, 1994) y la concentración celular (Jamil *et al.*, 2018).

El tratamiento (T2) de las suspensiones celulares, que obtuvo mayor concentración celular con respecto al tratamiento control (T0) y demás tratamientos (T1, T3), tenía una proporción de 1 mg/L de 6-BAP y 0,5 mg/L de 2,4-D, cuando la concentración de 2,4-D es

menor que la de 6-BAP, además de favorecer la división y concentración celular (Abdelnour & Escalant, 1994).

Según Abdelnour & Escalant (1994), la relación del volumen de medio con la masa de callo, debe ser proporcional, y entre más pequeños sean, el crecimiento celular se mostrará con mayor rapidez, en este experimento se utilizó 1 g de callo friable de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. en 20 ml de medio de cultivo. El callo friable promueve la liberación de las células al medio de cultivo (Abdelnour & Escalant, 1994).

Para el recuento celular se utilizó una cámara de Neubauer, la cual se recomienda utilizar cuando las células tienen un tamaño celular de 2 a 30 μm (Arredondo & Voltolina, 2007), y se contaron las células de los cuadrantes exteriores, lo aconsejable cuando se tienen células más grandes de 6 μm y cultivos poco concentrados, que no necesitan dilución.

El crecimiento en una suspensión celular se puede medir por medio de la cinética de crecimiento, que consta de las fases de adaptación, crecimiento, estacionaria y muerte celular, las mismas que ocurren generalmente del día 0 al día 25, lo que puede variar según la especie y el consumo de nutrientes del medio de cultivo (Pérez, 2015).

Para el género *Kalanchoe*, existen dos estudios (Mejía, 2021; Pérez, 2015), que cuentan con la cinética de crecimiento en suspensiones celulares, en los cuales del día 17 al 21, las células se encuentran en fase estacionaria, es decir, el crecimiento es constante y el volumen no aumenta (Abdelnour & Escalant, 1994) además, en esta fase hay una mayor cantidad de metabolitos secundarios (Bourgaud *et al.*, 2001). En este experimento se realizó el conteo celular a los 21 días.

Análisis físico-químicos del callo y las suspensiones celulares

Kalanchoe pinnata (Lam) Pers., es una especie vegetal estudiada por sus propiedades medicinales, tales como, antiinflamación, cicatrizante, antitumoral, cardiotónica, anticancerígena y antibacteriana (Navarro *et al.*, 2023).

Las propiedades medicinales cardiotónicas y anticancerígenas, se atribuyen a la presencia de bufadienólidos, un conjunto de polihidroxi esteroides y sus respectivos glucósidos, un ejemplo, es la briofilina A y briofilina C (Cardozo & Gómez, 2018) , además, sus hojas son estudiadas por sus brotoxinas A, B y C (Navarro *et al.*, 2023)., a quienes se les atribuye sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y anticancerígenas (Pattewar, 2012).

En el estudio de Navarro *et al.*, (2023), se identificaron en *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., taninos, polifenoles, terpenoides, glucósidos, esteroides y fenoles, concluyendo que las hojas de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. tienen propiedades antioxidantes, las cuales pueden compararse con los ácidos gálico y ascórbico.

El índice electroquímico fue determinado utilizando la técnica de voltametría de pulso diferencial (DPV), en donde los callos y la suspensión celular (T2) de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., tuvieron 3 picos anódicos diferenciados, los cuales representan las especies antioxidantes.

En varios estudios (David *et al.*, 2019; Escarpa, 2012; Piljac *et al.*, 2010), se han reportado valores de potencial para diferentes antioxidantes vistos en los voltamperogramas, para galatos y orto-dihidro-fenoles es 0.44 V, ácido ascórbico en 0.13 V, monofenoles y meta-difenoles de 0.67 V a 0.7 V, catecol de 0.18 a 0.22 V, ácido ferúico en 0.53 V, ácido p-cumárico en 0,73 V.

El índice electroquímico en el tratamiento (T2) de las suspensiones celulares fue de 9.34 ± 0.48 ($\mu\text{A V}^{-1}$), y el del callo fue de 15.75 ± 1.61 ($\mu\text{A V}^{-1}$), de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., se observa que en el callo el valor del índice electroquímico es mayor con relación al de la suspensión celular, lo que detalla un mayor poder antioxidante y predominancia de flavonoides y contenido fenólico, observado en los potenciales anódicos bajos del voltamperograma (David *et al.*, 2019).

Según (Chattopadhyay *et al.*, 2002), los metabolitos secundarios en células vegetales se producen y originan de manera intracelular y en pequeñas cantidades. Los metabolitos

intracelulares se encuentran en mayor concentración con respecto a los metabolitos extracelulares (Villas *et al.*, 2007). Tomando en cuenta que el callo con respecto a la suspensión celular de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., tiene mayor poder antioxidante y mayor cantidad de flavonoides, fenoles y polifenoles, los metabolitos secundarios intracelulares predominan con respecto a los extracelulares en esta especie.

Capítulo VI: Conclusiones

Conclusiones

Se establecieron suspensiones celulares a partir de callo friable de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., en todos los tratamientos (T0, T1, T2 y T3) evaluados de suspensiones celulares, se observó crecimiento celular en el recuento con la cámara de Neubauer.

Se determinó que el segundo tratamiento (T2), obtuvo una mayor concentración de células con 2442000 células/mL, el medio de cultivo para este tratamiento fue enriquecido con 2,41 g/L de WPM, 30 g/L de sacarosa, 1 mg/L de 6-BAP y 0,5 mg/L de 2,4-D.

En el callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., se evidenció un mayor índice electroquímico de $15,75 \mu\text{A V}^{-1}$, en relación al de la suspensión celular con $9,34 \mu\text{A V}^{-1}$.

Capítulo VII: Recomendaciones

Recomendaciones

Es recomendable utilizar elicitores en la suspensión celular, para evaluar si existirá una mayor concentración de metabolitos secundarios y por consiguiente un aumento en el índice electroquímico.

Para el establecimiento de suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., se recomienda realizar una curva de crecimiento por medio de un recuento celular cada dos días, adicionalmente, subcultivar la suspensión celular cada 17 días debido a que los nutrientes del medio de cultivo son consumidos.

Es recomendable evaluar con ensayos adicionales, los metabolitos secundarios presentes tanto en el callo como en las suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., para un análisis más profundo.

Bibliografía

- Abdelnour, A., & Escalant, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales: Vol. ORTON IIA* (CATIE).
- Ahamad, Q., Tatiya, A., Khurshid, M., Nazim, S., & Siraj, S. (2011). The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): A phytochemical and pharmacological review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2.
- Alcantara, J., Acero, J., Alcántara, J., & Sánchez, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., & Restrepo, J. (2009). *Aspectos ingenieriles del cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios*.
- Arredondo, B., & Voltolina, D. (2007). *Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento*.
- Beraud, M., Vidal, M., Brevis, P., & Fuentes, M. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *BOSQUE*, 35(1), Article 1. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Bussmann, R., & Sharon, D. (2018). Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía—La flora mágica y medicinal del Norte del Perú. *Ethnobotany Research and Applications*, 15. <https://doi.org/10.32859/era.15.1.001-293>
- Cardozo, J., & Gómez, M. (2018). Contribución al estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier. *Rev. Asoc. Col. Cienc.(Col.)*, 2018; 30: 74-83, 30, 74-83.

- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A., & Bisaria, V. (2002). Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7(3), 138-149. <https://doi.org/10.1007/BF02932911>
- David, M., Serban, A., Radulescu, C., Danet, A., & Florescu, M. (2019). Bioelectrochemical evaluation of plant extracts and gold nanozyme-based sensors for total antioxidant capacity determination. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 129, 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.05.011>
- Díaz, N., Ruiz, A., Reyes, E., Cejudo, A., Novo, J., Peinado, J., Meléndez, F., & Fiñana, I. (2010). *Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*.
- Dos Santos, L., Fernández, P., Leal, M., Soares, M., Gonçalves, M., Rossi, B., Schwartz, E., & Soares, S. (2018). Optimization of Aqueous Extraction from *Kalanchoe pinnata* Leaves to Obtain the Highest Content of an Anti-inflammatory Flavonoid using a Response Surface Model. *Phytochemical Analysis*, 29(3), 308-315. <https://doi.org/10.1002/pca.2744>
- Escarpa, A. (2012). *Food Electroanalysis: Sense and Simplicity*. 12, 20. <https://doi.org/10.1002/tcr.201100033>
- Escobar, I., Guerrero, J., Mendoza, M., & Ortiz, J. (2022). *Actividad antiinflamatoria de Kalanchoe Pinnata. Revisión bibliográfica*.
- Fernández, S., Villaño, D., Troncoso, A., & García, C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2), 110-122.
- García, P., Losada, S., Gallego, P., & Bravo, C. (2019). Cyclodextrin-Elicited *Bryophyllum* Suspension Cultured Cells: Enhancement of the Production of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5180. <https://doi.org/10.3390/ijms20205180>

- González de León, S., Herrera, I., & Guevara, R. (2016). Mating system, population growth, and management scenario for *Kalanchoe pinnata* in an invaded seasonally dry tropical forest. *Ecology and Evolution*, 6(13), 4541-4550. <https://doi.org/10.1002/ece3.2219>
- Gonzalez, S. (2015). Distribución potencial de *Kalanchoe pinnata*. ¿Un ejemplo de expansión de nicho? *Instituto de Ecología A.C., Red de Biología Evolutiva*.
- Guillard, R., & Sieracki, M. (2005). Counting Cells in Cultures with the Light Microscope. *Algal Culturing Techniques*, 239-252. <https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50017-2>
- Guillot, D., Laguna, E., & Rosselló, J. (2009). *La familia Crassulaceae en la flora alóctona valenciana*. Bouteloua, 4.
http://www.floramontiberica.org/bouteloua/monogbouteloua_04_crassulaceae.pdf
- Hernández, M., Sierra, J., Villalobos, R., & Seseña, E. (2022). Potential of *Kalanchoe pinnata* as a Cancer Treatment Adjuvant and an Epigenetic Regulator. *Molecules*, 27(19), 6425. <https://doi.org/10.3390/molecules27196425>
- Hoffman, T. (2006). *Counting Cells* (pp. 21-24). <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50004-6>
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression[OPEN]. *The Plant Cell*, 25(9), 3159-3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- Jamil, S., Rohani, E., Baharum, S., & Noor, N. (2018). Metabolite profiles of callus and cell suspension cultures of mangosteen. *3 Biotech*, 8(8), 322. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1336-6>
- Loyola, V., & Ochoa, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. En *Plant Cell Culture Protocols* (Vol. 1815, pp. 3-13). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1
- Masabanda, K. (2023). *Inducción a células madre en Kalanchoe pinnata (Lam) Pers., a partir de hojas*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

- Mejía, D. (2021). *Efecto del metil jasmonato sobre la producción de compuestos fenólicos de un cultivo celular de Kalanchoe daigremontiana Raym.-Hamet y H. Perrier*. Universidad autónoma del estado de México.
- Monge, A. (2003). *El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales*. 6(1), 36-39(6(1), 36-39).
- Navarro, L., Agosto, J., & Hipólito, C. (2023). Composición fitoquímica y propiedades antioxidantes de la planta mala madre (*Kalanchoe pinnata*). *South Florida Journal of Development*, 4(1), 201-214. <https://doi.org/10.46932/sjdv4n1-014>
- Niazian, M. (2019). Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*, 249(4), 953-973. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03099-1>
- Pattewar, S. (2012). *Kalanchoe pinnata: Phytochemical and pharmacological profile*. 3. <https://doi.org/IJPSR> (2012), Vol. 3, Issue 04
- Pérez, M. (2015). *Perfil fitoquímico de cultivos en suspensión de Kalanchoe daigremontiana*. Instituto Politécnico Nacional.
- Pérez, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), Article 4. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255>
- Piljac, J., Valek, L., Stipčević, T., & Martinez, S. (2010). Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chemistry*, 121, 820-825. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.090>
- Rao, H., Rao, I., Saeed, L., Aati, H., Aati, S., Zeeshan, M., & Rehman, K. (2023). Phytochemical analysis and bioactivity assessment of five medicinal plants from Pakistan: Exploring polyphenol contents, antioxidant potential, and antibacterial activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(10), 103783. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103783>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. L. A. (eda).

- Rojas, L., Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). *Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas*. Machala : Ecuador.
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6653>
- Sánchez, L., Alvarenga, S., Sánchez, L., & Alvarenga, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa*(Willd.) D.C. (uña de gato). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120.
- Saravanan, V., Murugan, S., & Kumaravel, T. (2020). Genotoxicity studies with an ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* leaves. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 856-857, 503229.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503229>
- Sepúlveda, G., Porta, H., & Rocha, M. (2003). *La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas*.
- Smith, G. (2004). *Kalanchoe species poisoning in pets*.
<https://doi.org/10.1002/9783527619771.ch6>
- Torres, J. (2017). *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*". Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Tres, J. (2006). Interacción entre fármacos y plantas medicinales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 29(2), Article 2.
- Tuta, E., Martínez, J., Briceño, I., Guerron, G., & Gómez, A. (2021). Management of “stone pain” between the 18th and 19th centuries: A brief history of a medical prescription in the Viceroyalty of New Granada. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, 45(7), 507-511. <https://doi.org/10.1016/j.acuroe.2021.06.003>
- Vallejo, J., & Peral, D. (2012). Medicina alternativa y sida: Hacia una comunicación más eficaz sobre las plantas medicinales. *Medicina Clínica*, 138(3), 110-111.
<https://doi.org/10.1016/j.medcli.2011.07.004>

- Vargas, A., Herrera, I., Nualart, N., Guézou, A., Gómez, C., Freire, E., Jaramillo, P., & López, J. (2022). The Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae) in Ecuador: From Gardens to the Wild. *Plants*, 11(13), 1746. <https://doi.org/10.3390/plants11131746>
- Villas, S., Nielsen, J., Smedsgaard, J., Hansen, M., & Roessner, U. (2007). *Metabolome Analysis: An Introduction*. John Wiley & Sons.
- Wink, M. (2006). Bioprospecting: The Search for Bioactive Lead Structures from Nature. En O. Kayser & W. J. Quax (Eds.), *Medicinal Plant Biotechnology* (1.^a ed., pp. 97-116). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527619771.ch6>