



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS-ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTENOLOGÍA
TRABAJO DE UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA BIOTECNOLOGA

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

Autora: Caiza Cuasquer Sasha Daniela

Directora de Trabajo de Integración Curricular: Jadán Guerrero Mónica Beatriz Ph.D.

11 de marzo de 2024



1

Introducción

2

Objetivos

3

Metodología

4

Resultados y Discusión

5

Conclusiones y Recomendaciones

6

Agradecimientos



1

Introducción

2

Objetivos

3

Metodología

4

Resultados y Discusión

5

Conclusiones y Recomendaciones

6

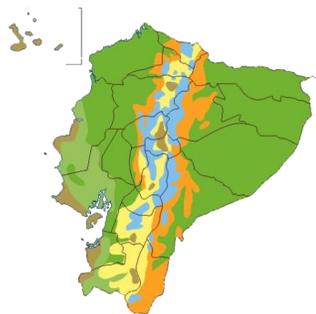
Agradecimientos



Origen y distribución

Origanum majorana Linneo.

- Medicina tradicional
- Condimento



Distribución en Ecuador

Zonas cálidas y secas

Distribución de *Origanum majorana* Linneo.



Taxonomía y distribución botánica

Origanum majorana Linneo.

Olor característico



Morfología

- Tallos entre 30-60 cm
- Hojas pequeñas ovales y pecioladas
- Flores en forma de ramilletes

Taxonomía

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

Origanum

Variación genética

Diversidad morfológica



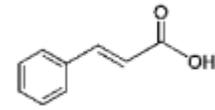
Uso y propiedades

Composición química de *Origanum majorana* Linneo.

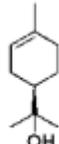


Amplio perfil químico

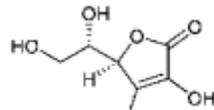
- Antioxidante
- Antiinflamatoria
- Antifúngica



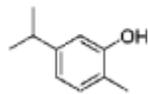
Cinnamic acid



α -Terpineol

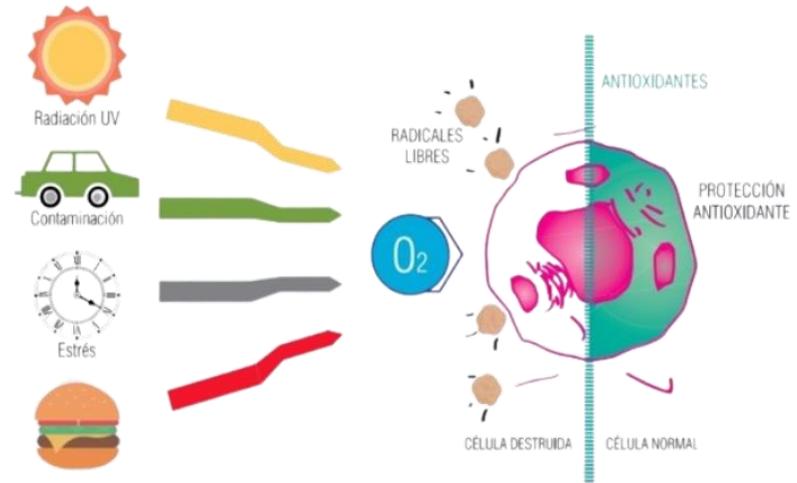


Ascorbic acid

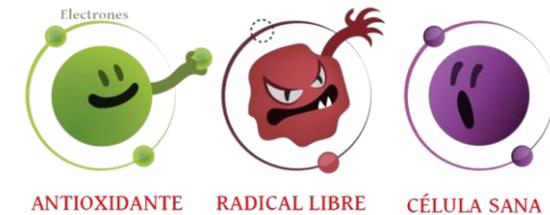


Carvacrol

Capacidad antioxidante



Anular y/o debilitar

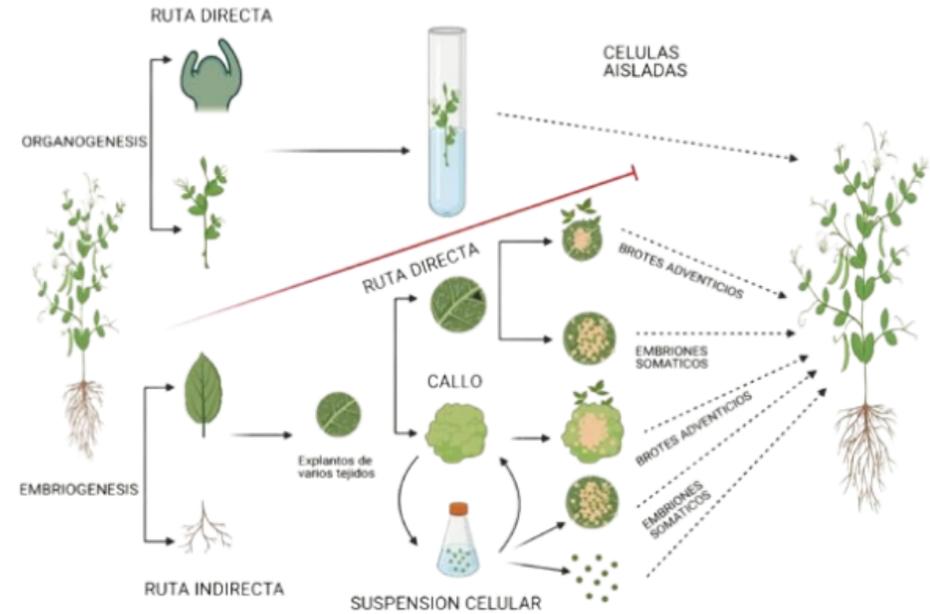


Cultivo in vitro de tejidos vegetales

Cultivo tradicional



Cultivo de tejidos *in vitro*



Totipotencia → De un organismo simple a un organismo complejo

1

Introducción

2

Objetivos

3

Metodología

4

Resultados y Discusión

5

Conclusiones y Recomendaciones

6

Agradecimientos



Objetivos

Objetivo General

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



Objetivos

Objetivos específicos

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

Hipótesis

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



1

Introducción

2

Objetivos

3

Metodología

4

Resultados y Discusión

5

Conclusiones y Recomendaciones

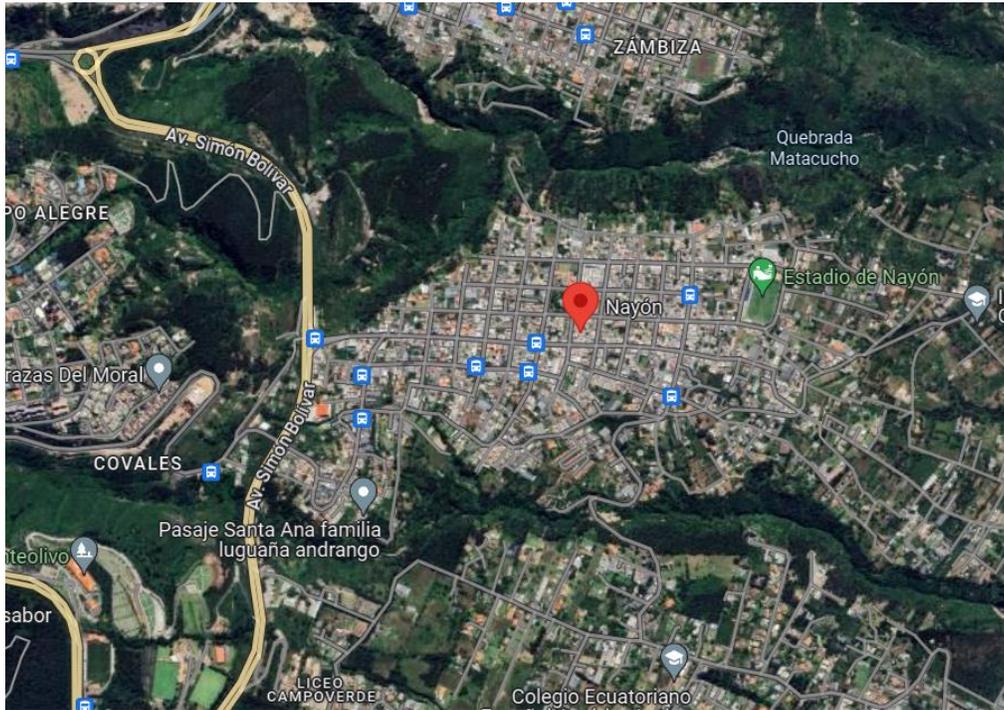
6

Agradecimientos



Fase de campo

Recolección del material vegetal



Plantas de *Origanum majorana* Linneo.



Fase de laboratorio: Etapas previas



Selección del explante



Desinfección

Detergente 2% + Tween 20 5 min

Etanol 70% 1 min

Hipoclorito de sodio 3% +
Tween 20 5 min



Inducción a callogénesis

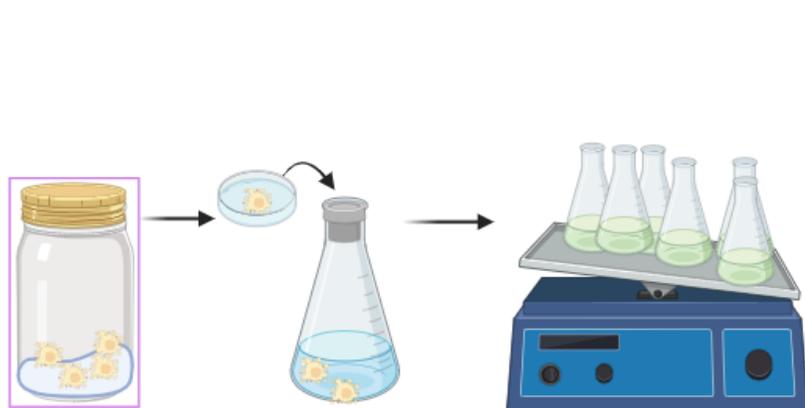
MS (completo) 30 g/L azúcar

2 mg/L 2,4-D y 0,23 mg/L 6-
BAP

2,2 g/L Phytigel

Fase de laboratorio: Establecimiento de suspensiones celulares

Medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D y 6-BAP para el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callo



Condiciones

- Tipo de callo (Friable/No friable)
- 1g en 20 mL de medio
- Agitación 110 RPM

Tratamiento

2,4-D (mg/L)

6-BAP (mg/L)

T0

0

0

T1

0.1

0.4

T2

0.2

0.5

T3

0.3

0.6

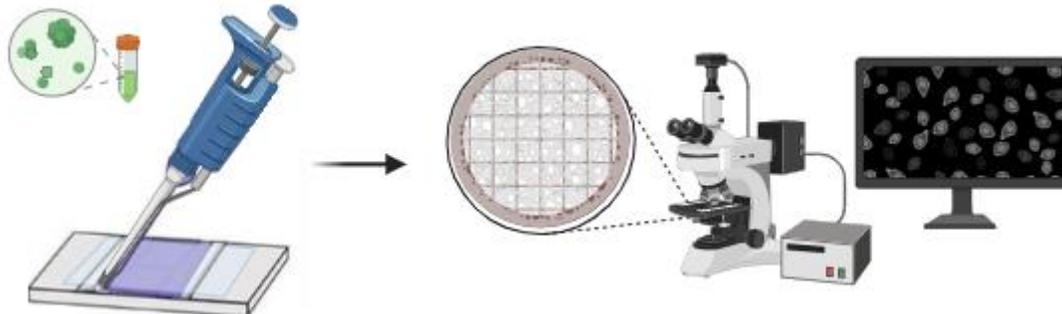
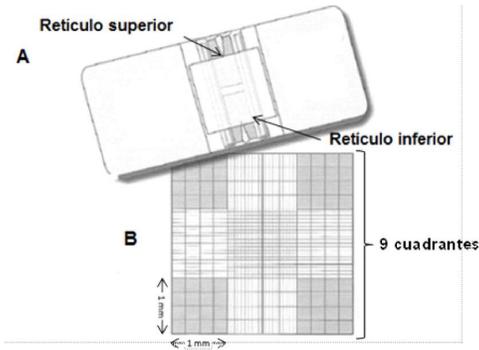
Variables de respuesta

Crecimiento celular



Fase de laboratorio: Recuento celular

Cuadrantes de conteo de la cámara de Neubauer



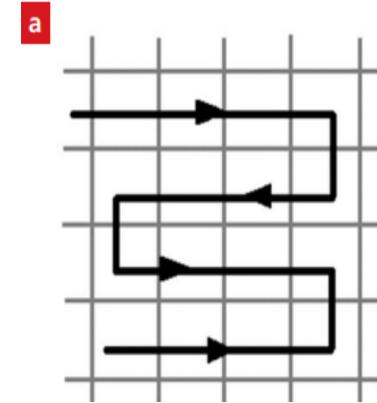
Condiciones

- Factor de dilución
- Tipo de célula

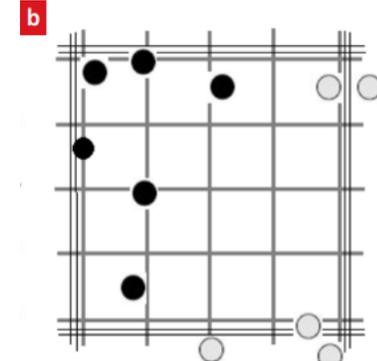
Variables de respuesta

Concentración celular

a) Técnica de conteo Zig-Zag

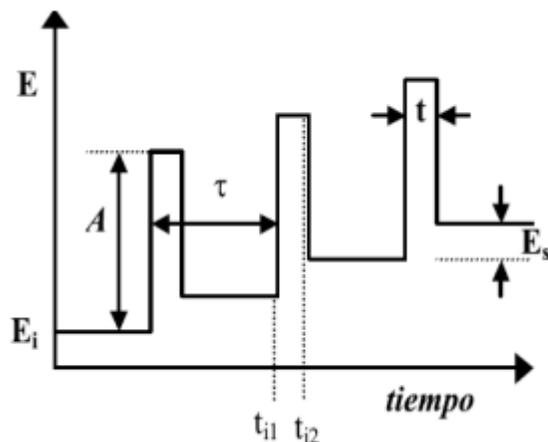


b) Límites para el conteo celular



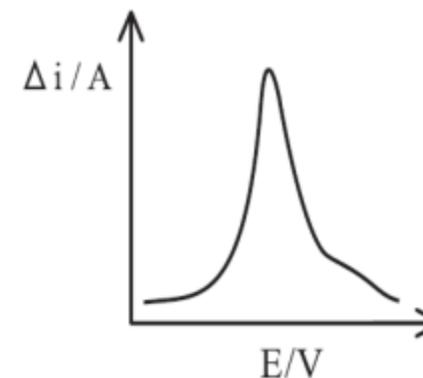
Fase de laboratorio: Análisis físico-químico

Técnica Voltametría Diferencial de Pulso



- τ : intervalo de tiempo relativo al periodo del ciclo
- t : tiempo de duración del impulso
- E_i : potencial inicial
- E_s : paso de potencial entre cada ciclo
- A : amplitud del impulso
- t_{i1}, t_{i2} : instantes en que se efectúa la medición de la intensidad de corriente

Voltagrama



Variables de respuesta

- Incrementos de amplitud
- 2 intensidades de corriente en el mismo pulso
- Voltagrama en forma de pico

1

Introducción

2

Objetivos

3

Metodología

4

Resultados y Discusión

5

Conclusiones y Recomendaciones

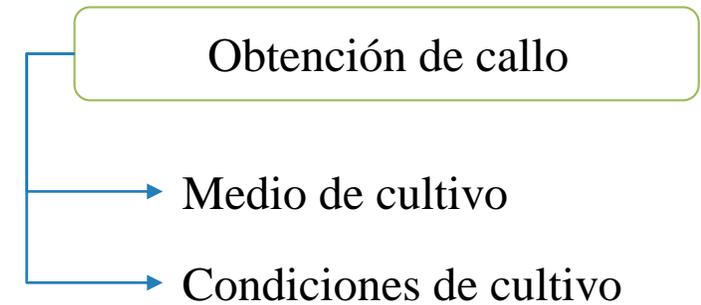
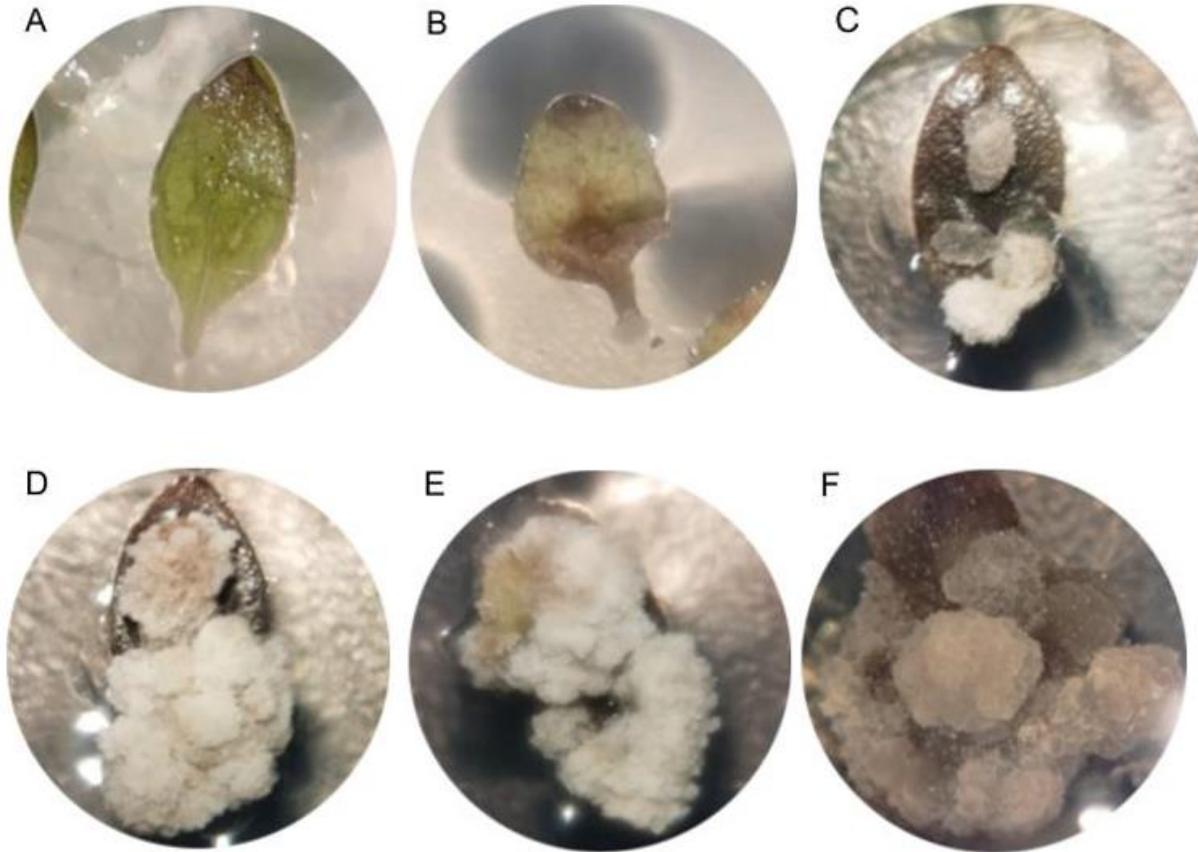
6

Agradecimientos



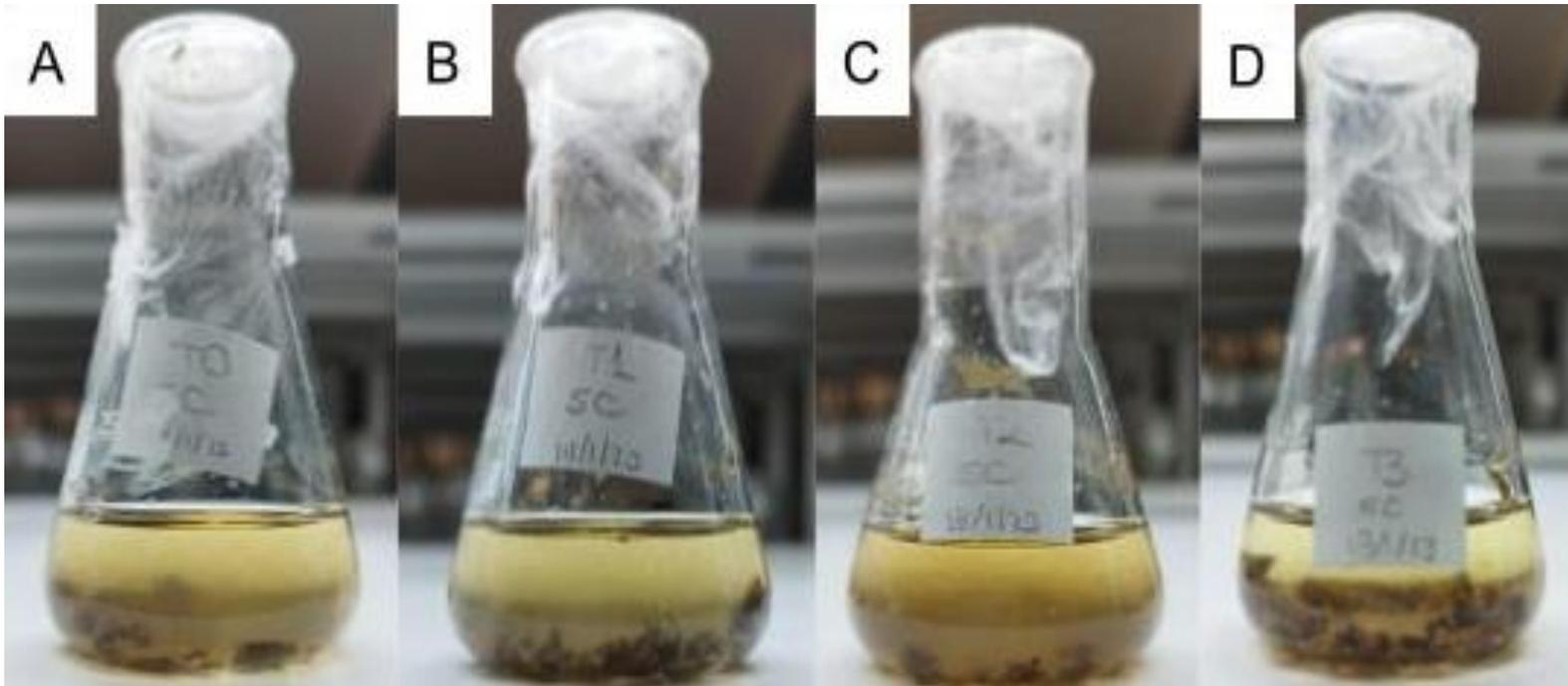
Callogénesis

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



Suspensión celular

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

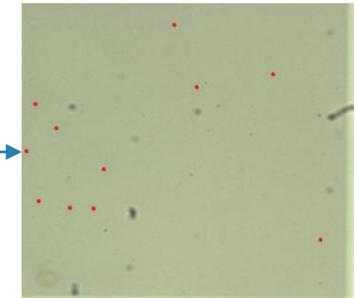


Suspensiones celulares

No presentan
contaminación visible

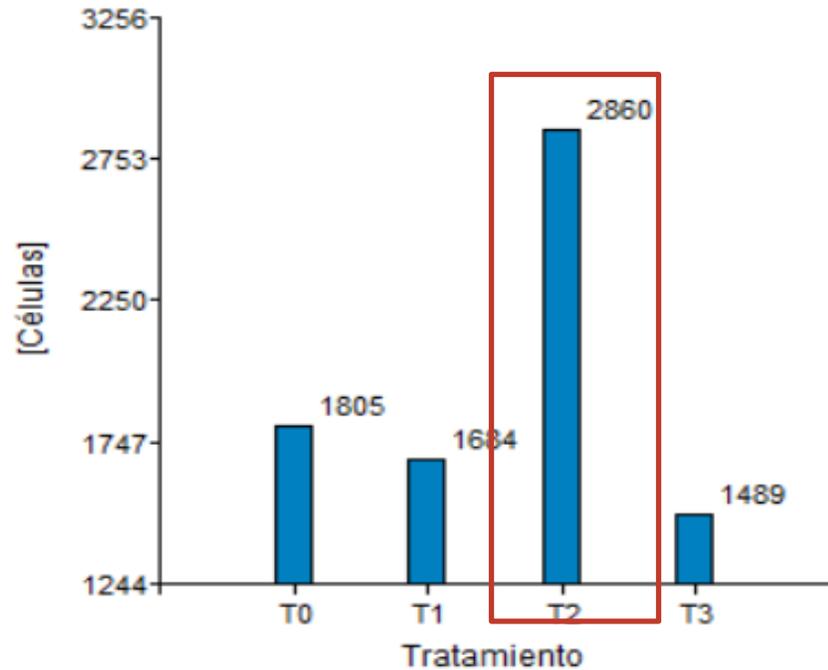
Diferencias de turbidez

Recuento celular



Recuento celular

Concentración de células en cada uno de los tratamientos

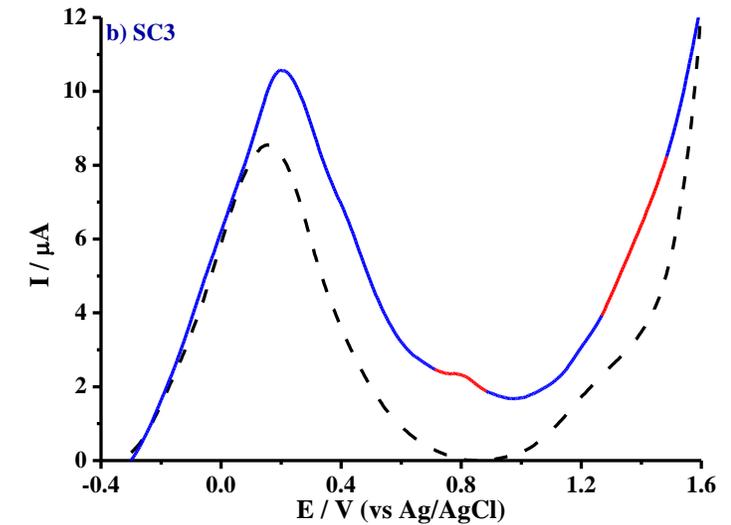
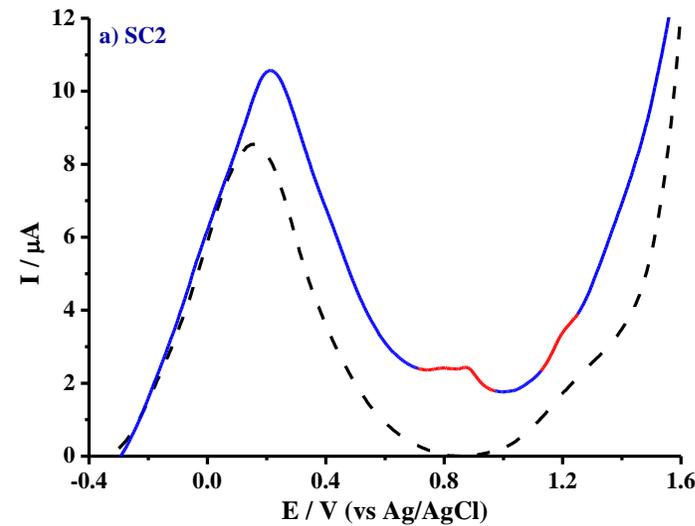
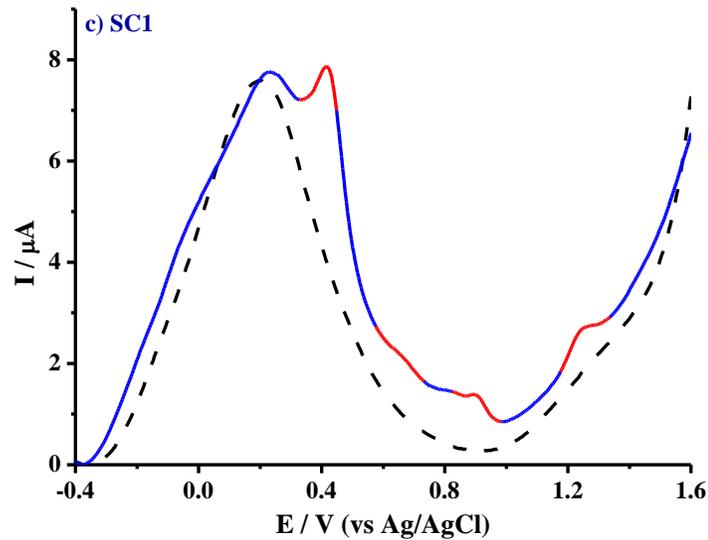


Medios de cultivo con combinaciones de hormonas

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

Análisis físico-químico

Voltamperogramas de pulso diferencial de extractos metanólicos de SC1 (Callo) y Suspensiones celulares



IE:

SC2: $5,63 \pm 0,19 \mu\text{A V}^{-1}$

SC3: $7,25 \pm 0,38 \mu\text{A V}^{-1}$

SC1 (Callos): $23,97 \pm 1,70 \mu\text{A V}^{-1}$



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

1

Introducción

2

Objetivos

3

Metodología

4

Resultados y Discusión

5

Conclusiones y Recomendaciones

6

Agradecimientos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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



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



1

Introducción

2

Objetivos

3

Metodología

4

Resultados y Discusión

5

Conclusiones y Recomendaciones

6

Agradecimientos





ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Mónica Jadán, Ph.D.

Directora del Proyecto de Investigación

Andrea Ortega, Mgtr

Técnica del laboratorio de cultivo de tejidos

Pedro Romero Saker

Docente Analista

Patricio Espinoza P.h.D. y Alisson Cunalata, Ing

Pontificia Universidad Católica

Tesistas y pasantes

Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales

Familia y Amigos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Muchas gracias



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA