



# 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 BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA  
BIOTECNÓLOGA

**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**

**Autor:** Sánchez Carrera, Leslie Valeria

**Director:** Jadán Guerrero, Mónica Beatriz, Ph.D.

Sangolquí, 11 de marzo 2024



Introducción	01	07	Agradecimientos
Objetivos	02	06	Recomendaciones
Materiales y métodos	03	05	Conclusiones
Resultados y Discusión	04		

# 01 INTRODUCCIÓN

## Taxonomía

**Familia** Crassulaceae

**Género** *Kalanchoe*

**Especie** *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers.

## Propiedades medicinales

- Anticancerígeno
- Antiinflamatorio

## Suculenta



## Florecimiento

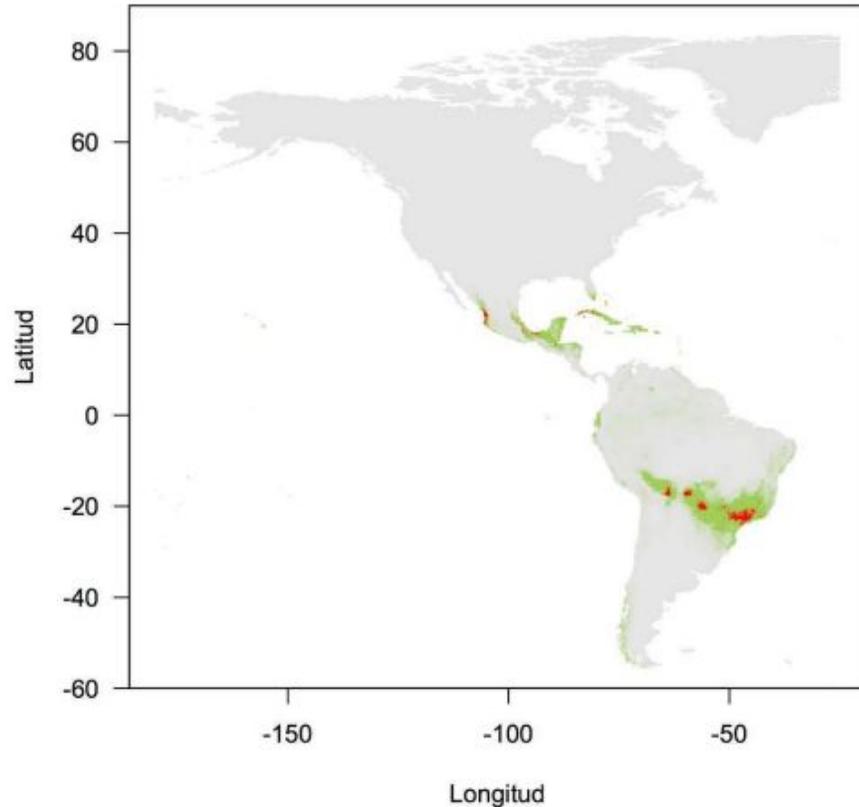
## Reproducción

- Semillas
- Hojas caídas o raíces

## Metabolitos secundarios

- Flavonoides
- Fenoles
- Antioxidantes

## Distribución de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers.



Distribución de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. en el continente Americano

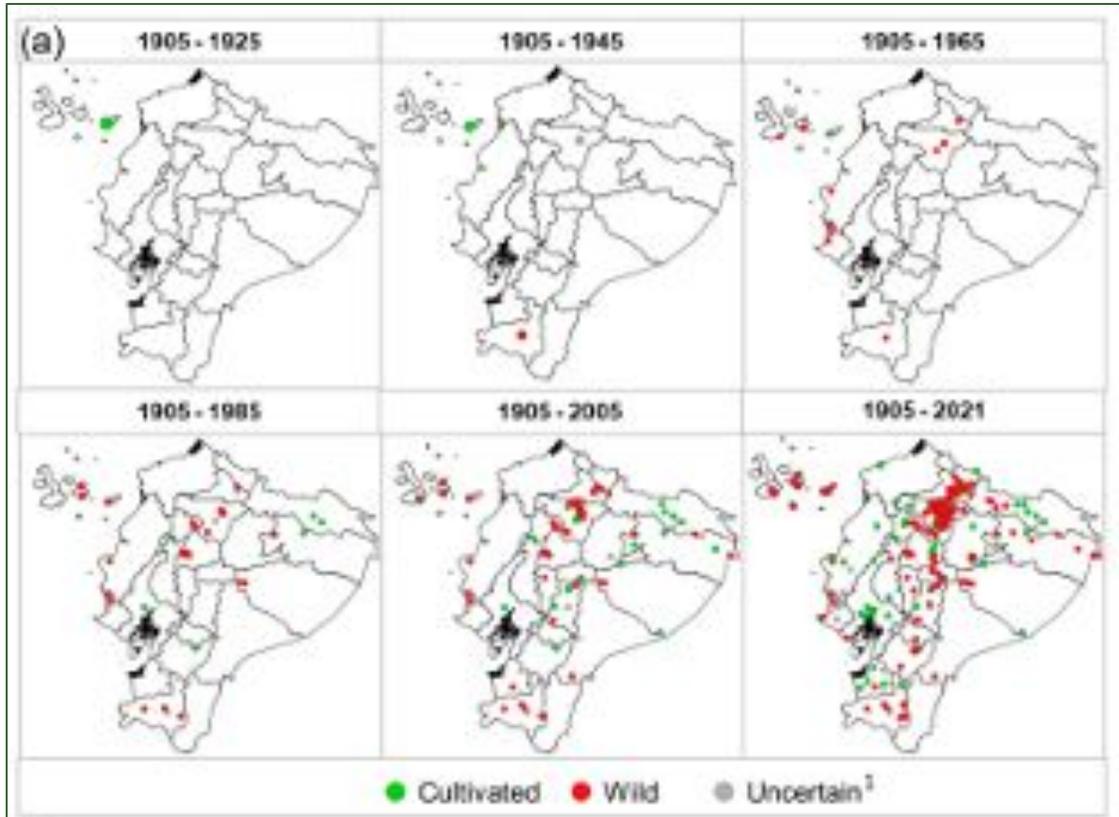
### Origen

- Madagascar
- Sur de África

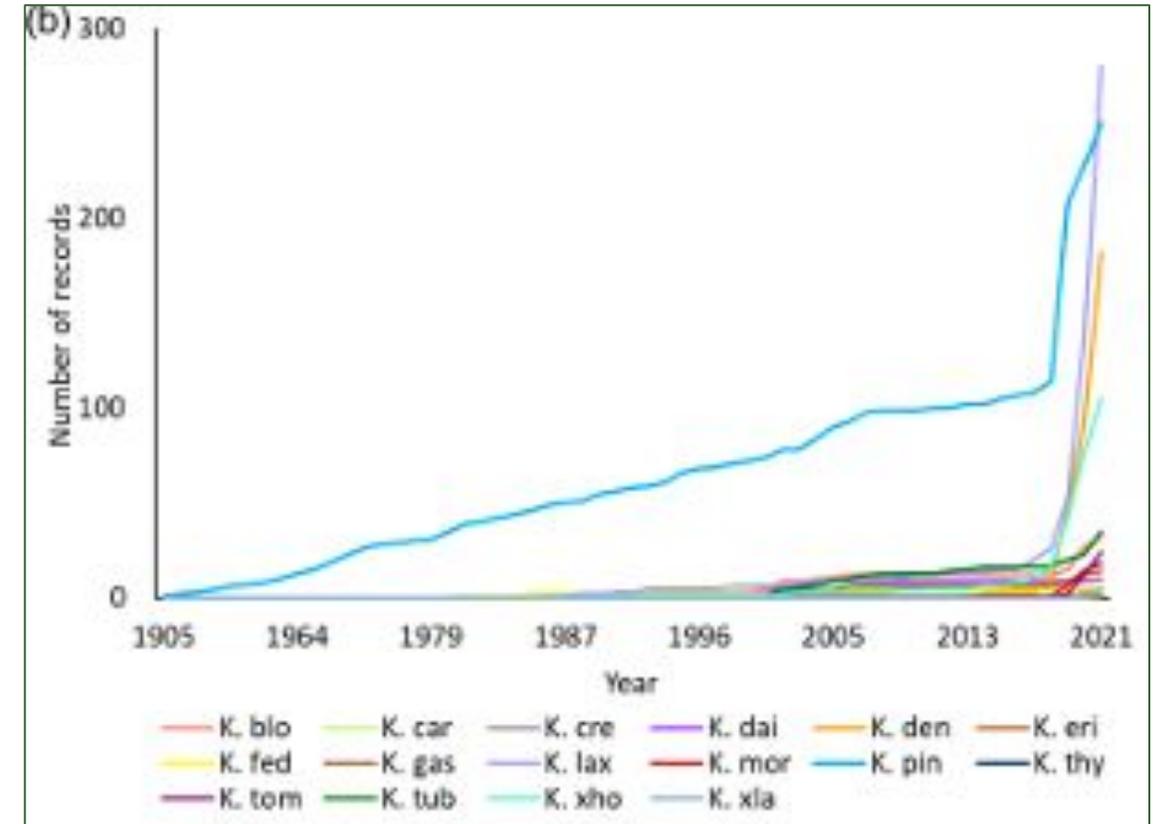
### Estado

- Jardines
- Silvestre

## *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. en Ecuador



*Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., acumulación espacial y temporal en Ecuador.



*Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. a y su acumulación en el tiempo.

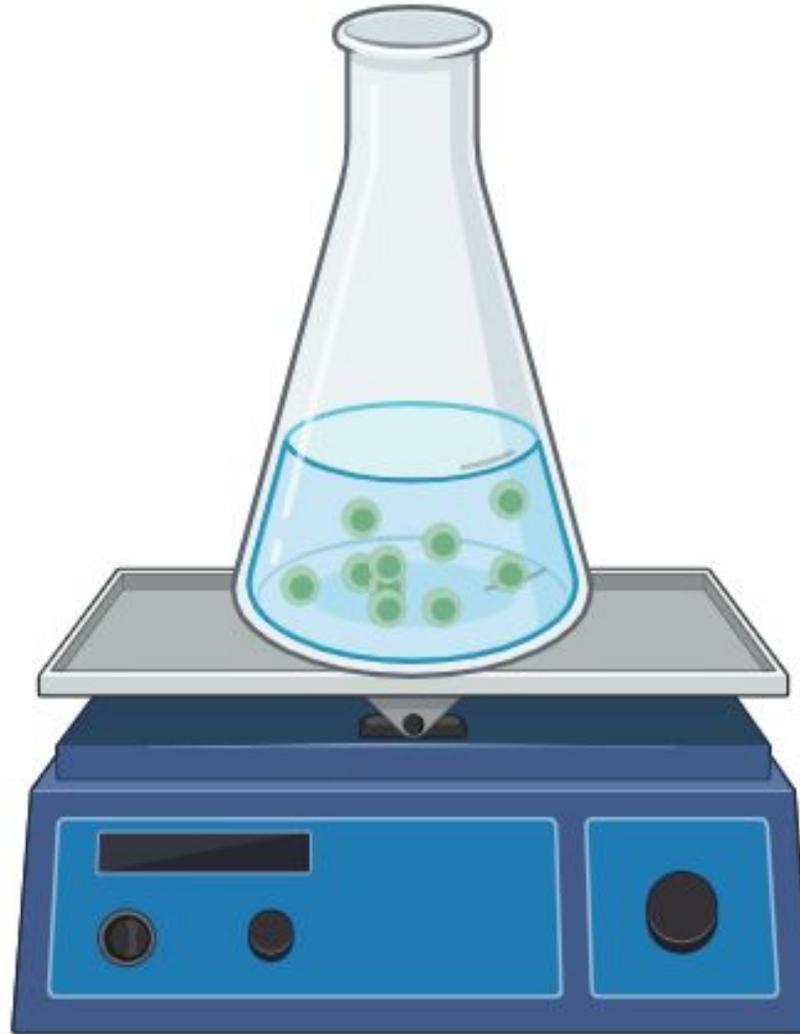
## Suspensión celular

### Mayor captación

- Nutrientes
- Oxígeno

### Agregados

- Separación celular



### Distribución homogénea

- Capacidad metabólica
- Agitación

## Recuento celular

Cámara	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Profundidad (mm)	Área ( $\text{mm}^2$ )	Objetivos	Tamaño celular ( $\mu\text{m}$ )	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
Hematocítómetro (Neubauer)	0,9	0,1	9	20-40	2-30	104-107
Hematocítómetro (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

## Densidad celular

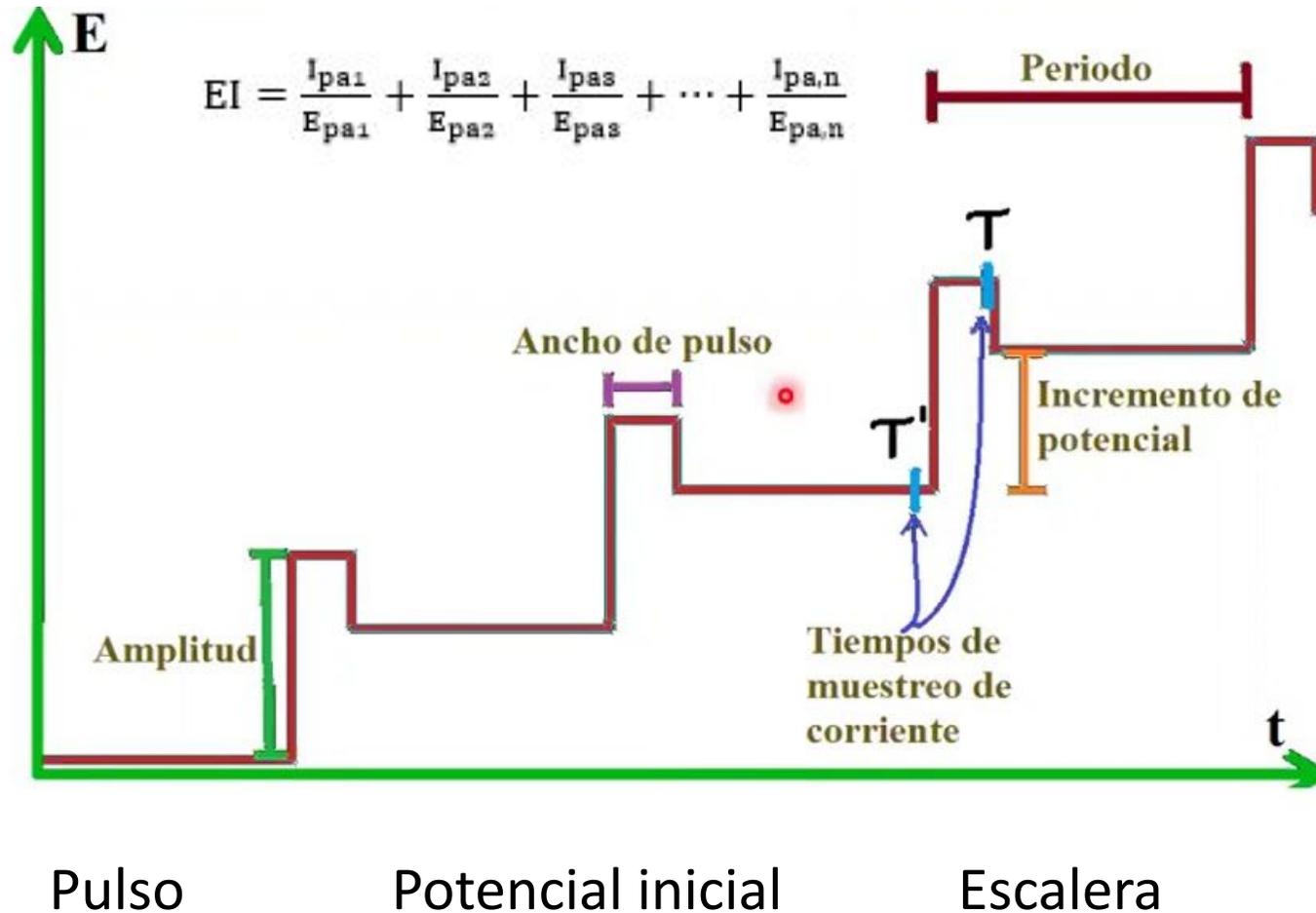
- N° células
- Volumen

- Sencillo
- Bajo costo

## Resultados

- Dilución
- Cámara
- Objetivo
- Técnica

## Voltametría diferencial de pulso



### Característica

- Pulsos de voltaje
- Barrido de potencial

● Mediciones electroquímicas

- Potencial
- Electrodo
- Oxidación
- Corriente electrones

02

# 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.

03

# MATERIALES Y MÉTODOS

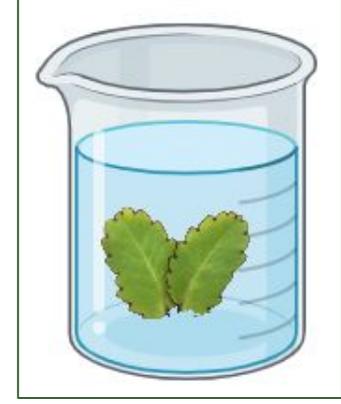
Recolección



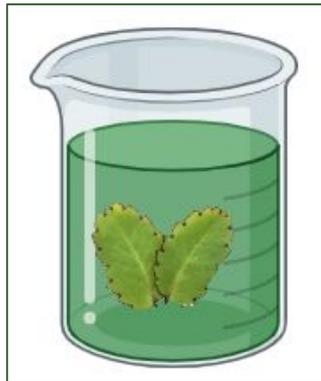
Selección



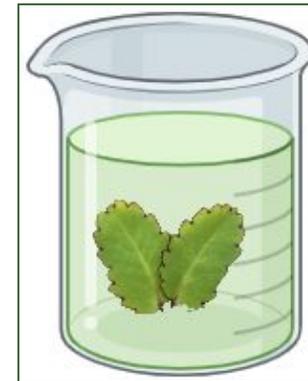
Detergente 1%



Fungicida 1%



Hipoclorito de Sodio 1%



## Inducción a callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers.



### Medio de cultivo

30 g/L sacarosa

2.41 g/L WPM

1.5 mg/L 2,4-D

2.1 g/L Phytigel

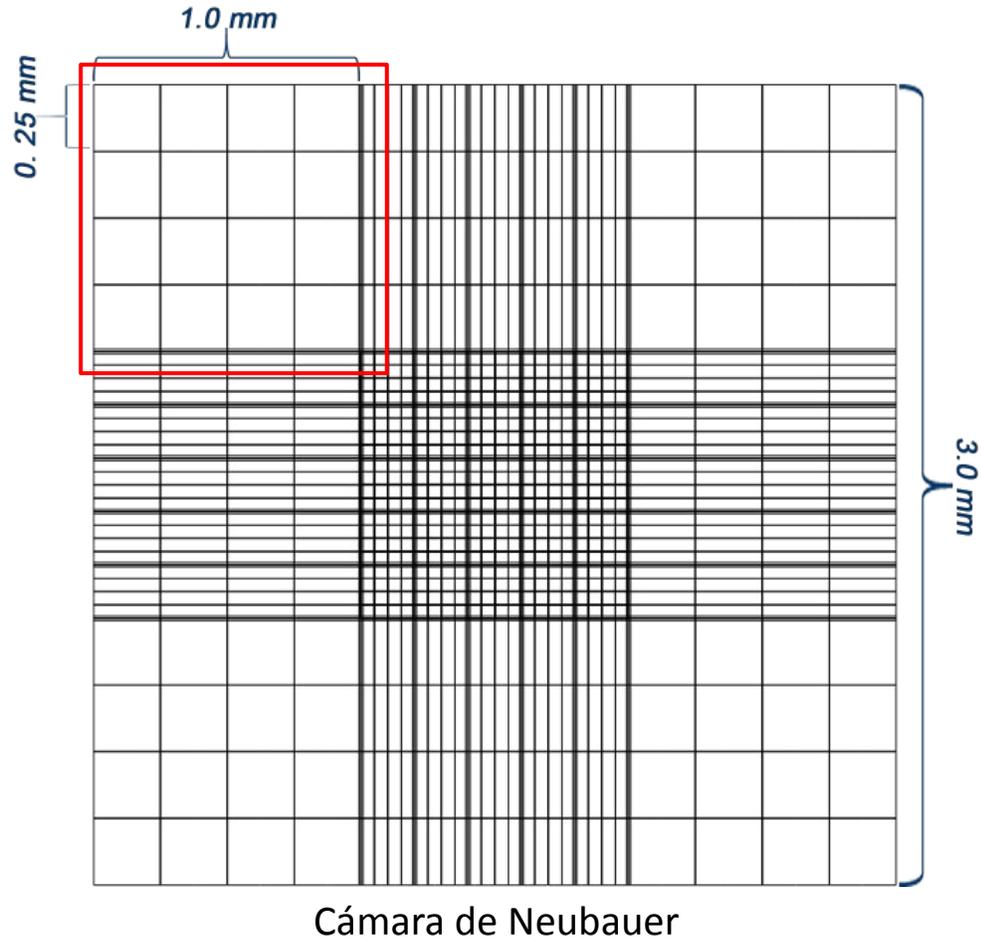
## Establecimiento de suspensiones celulares

Tratamiento	6-BAP (mg/L)	2,4-D (mg/L)
T0	0	0
T1	0.5	0.25
T2	1	0.5
T3	1.5	0.75

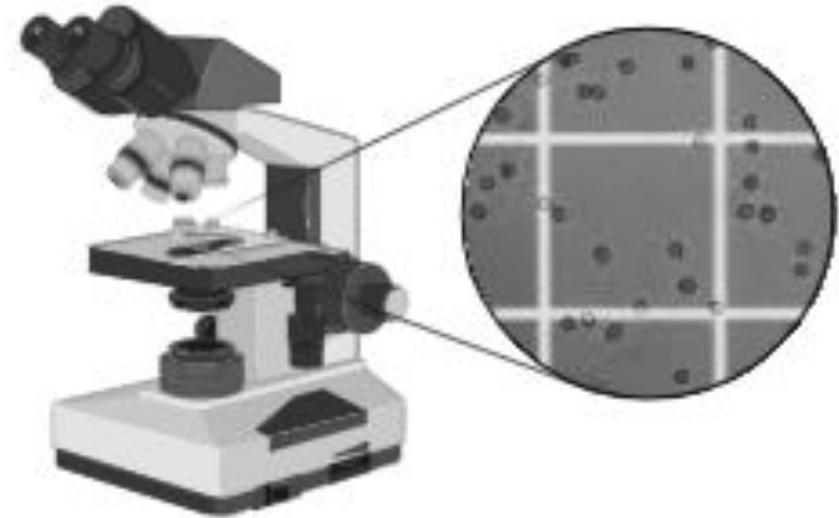
Medio de cultivo para las suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers.



## Recuento celular



$$\text{Células/mL} = \frac{\#células \times 10000}{\#cuadros} \times \text{factor de dilución}$$

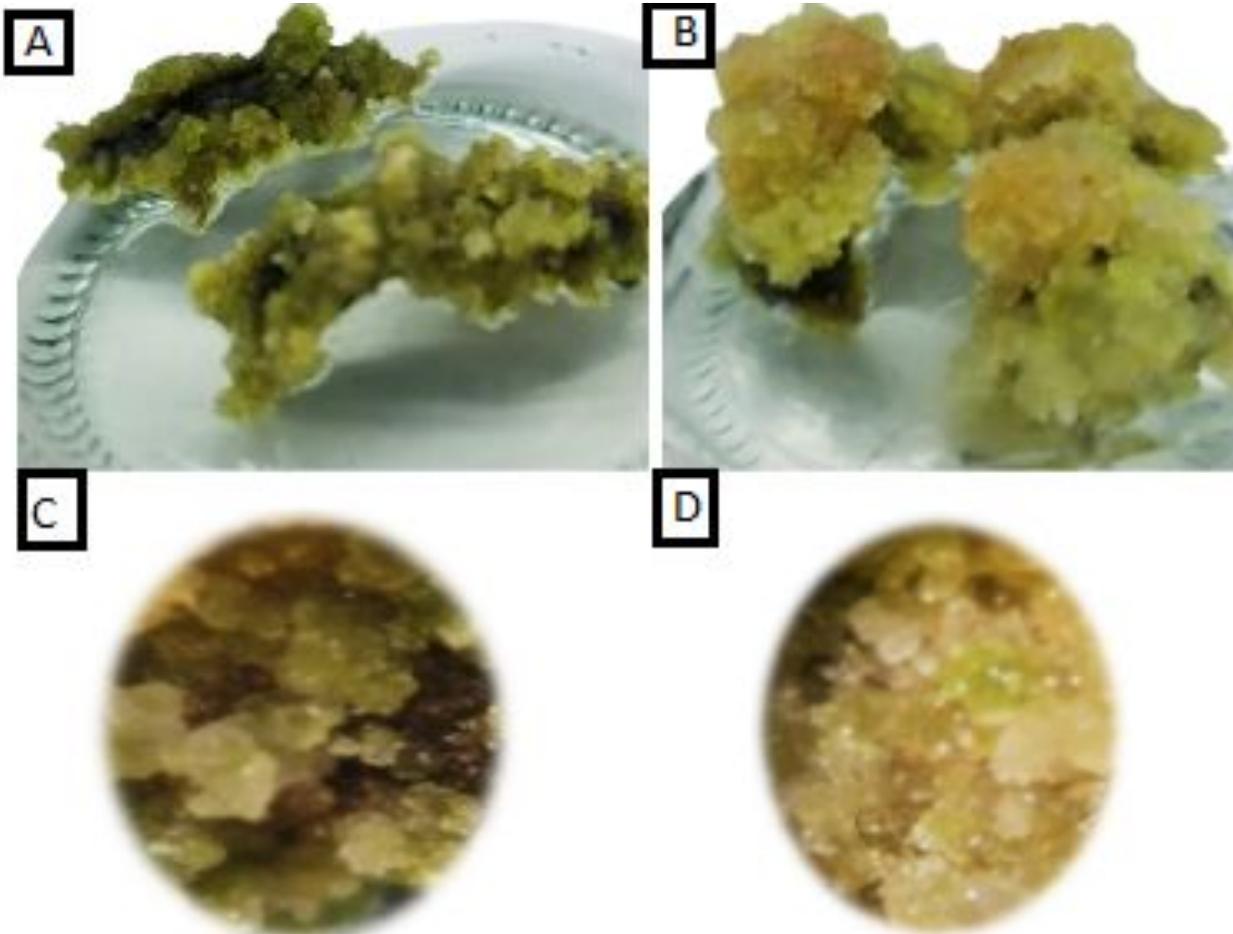


Recuento celular por cámara de Neubauer con un microscopio Olympus BX41

04

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

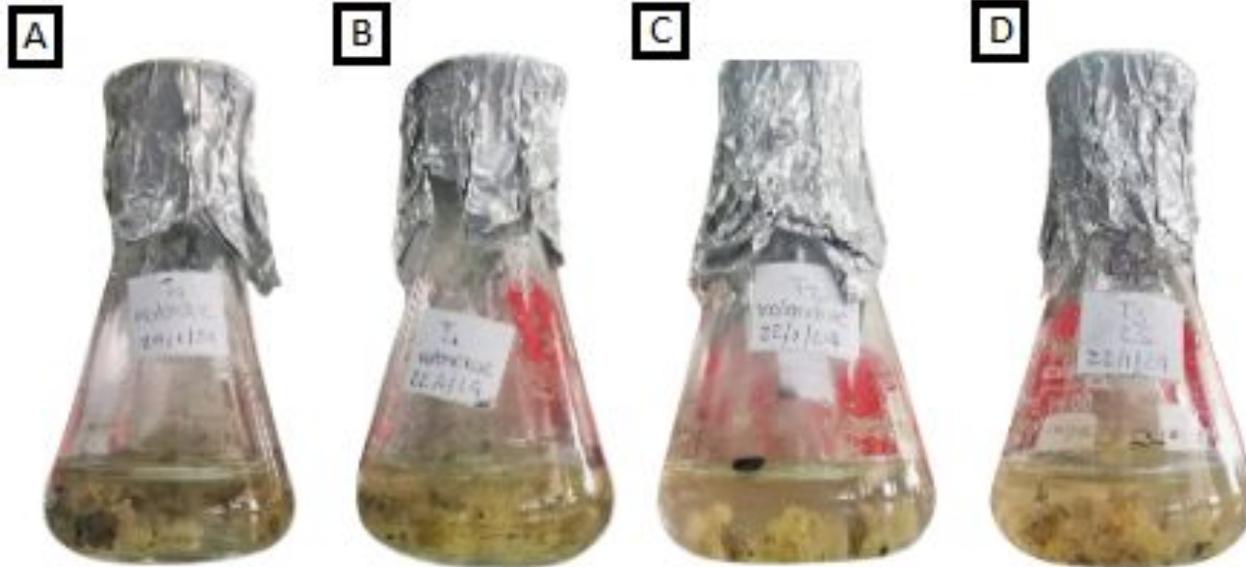
## Callo de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers.



- Callo friable
- Relación volumen/callo
- 20 mL de medio de cultivo
- 1 gramo de callo

Callos de *Kalanchoe pinnata* L. A) a los 2 meses y medio y, B) a los 3 meses y medio.

## Establecimiento de suspensiones celulares



Suspensiones celulares de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. A) Tratamiento control, B) Tratamiento uno, C) Tratamiento dos, D) Tratamiento tres

Nutrientes

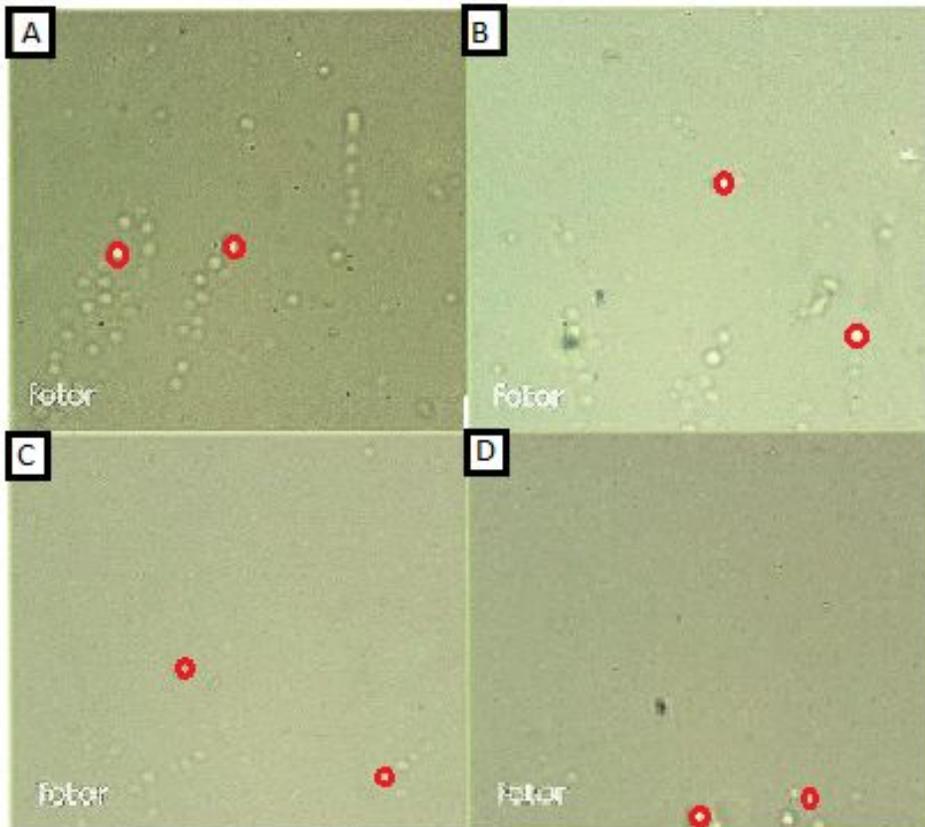
- División celular
- Tamaño celular

Concentración celular = Auxinas + Citocininas

Tratamiento	Medias	Categoría
T2	2442	A
T1	1665	B
T0	1332	B
T3	1166	B

Nota. Medio T2 1 mg/L de 6-BAP y 0.5 mg/L de 2,4-D.

## Recuento celular



Recuento celular de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. A) Tratamiento dos, B) Tratamiento uno, C) Tratamiento control, D) Tratamiento tres

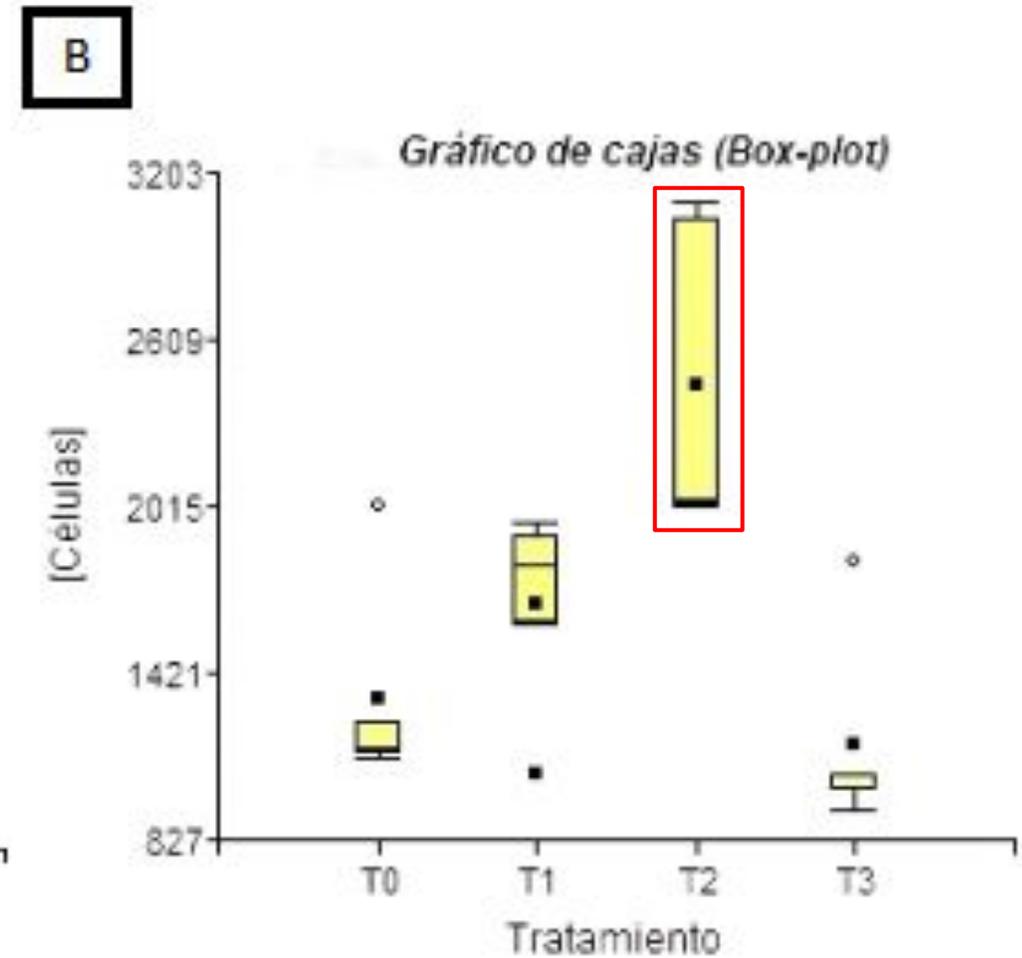
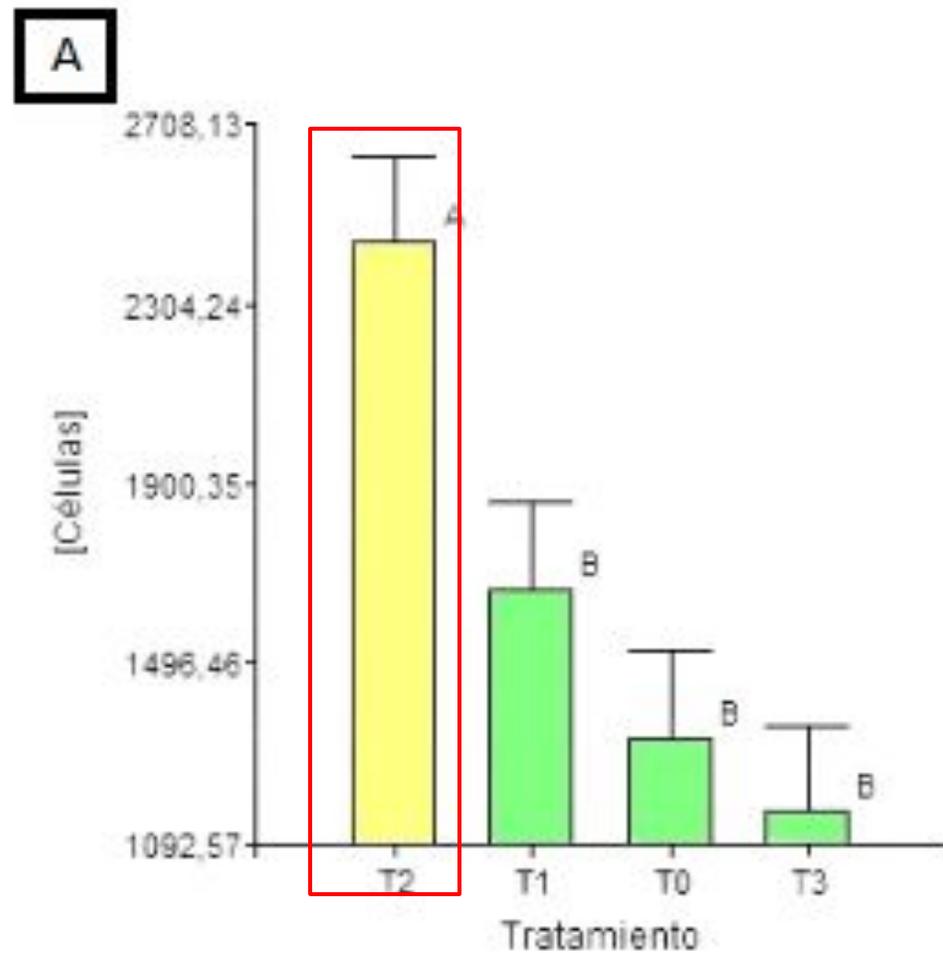
Cuadrantes exteriores  
Poco concentrados

0 a 25 días

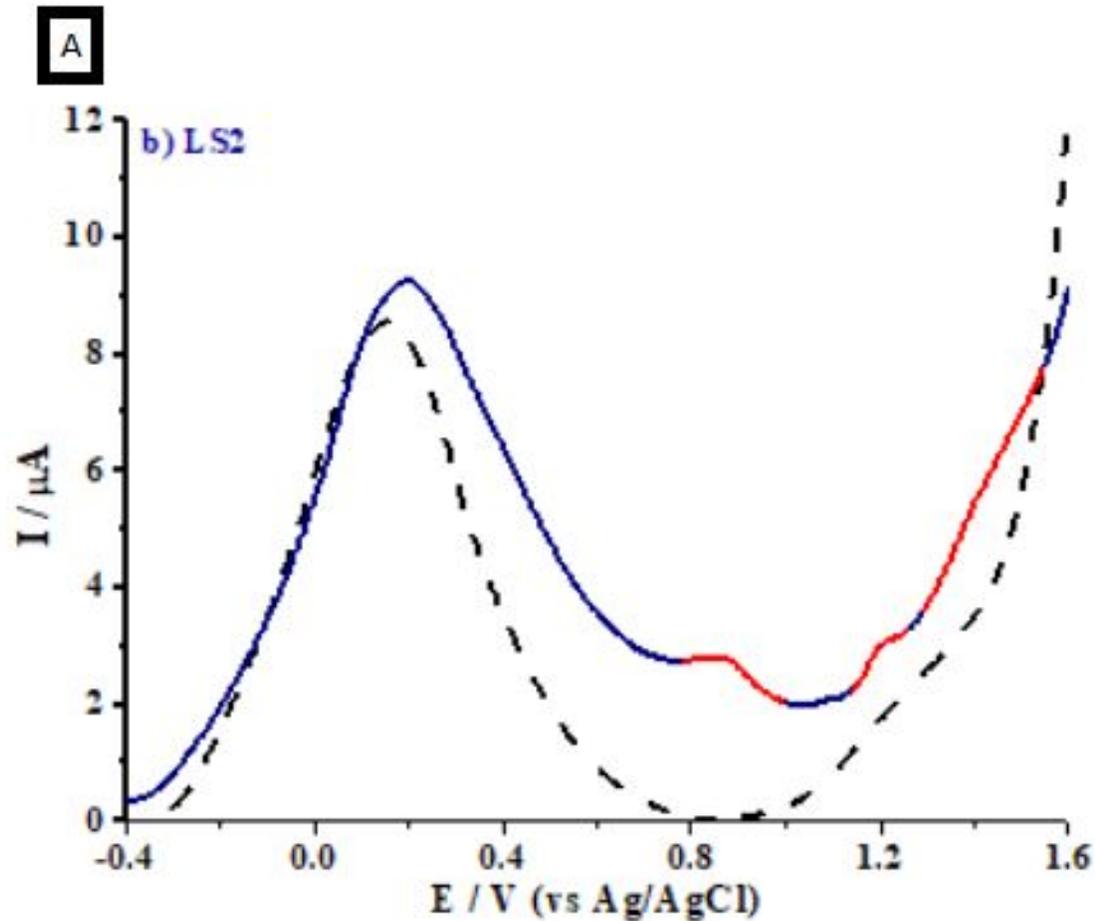
- Especie
- Consumo de nutrientes

- Volumen no aumenta
- Más metabolitos secundarios

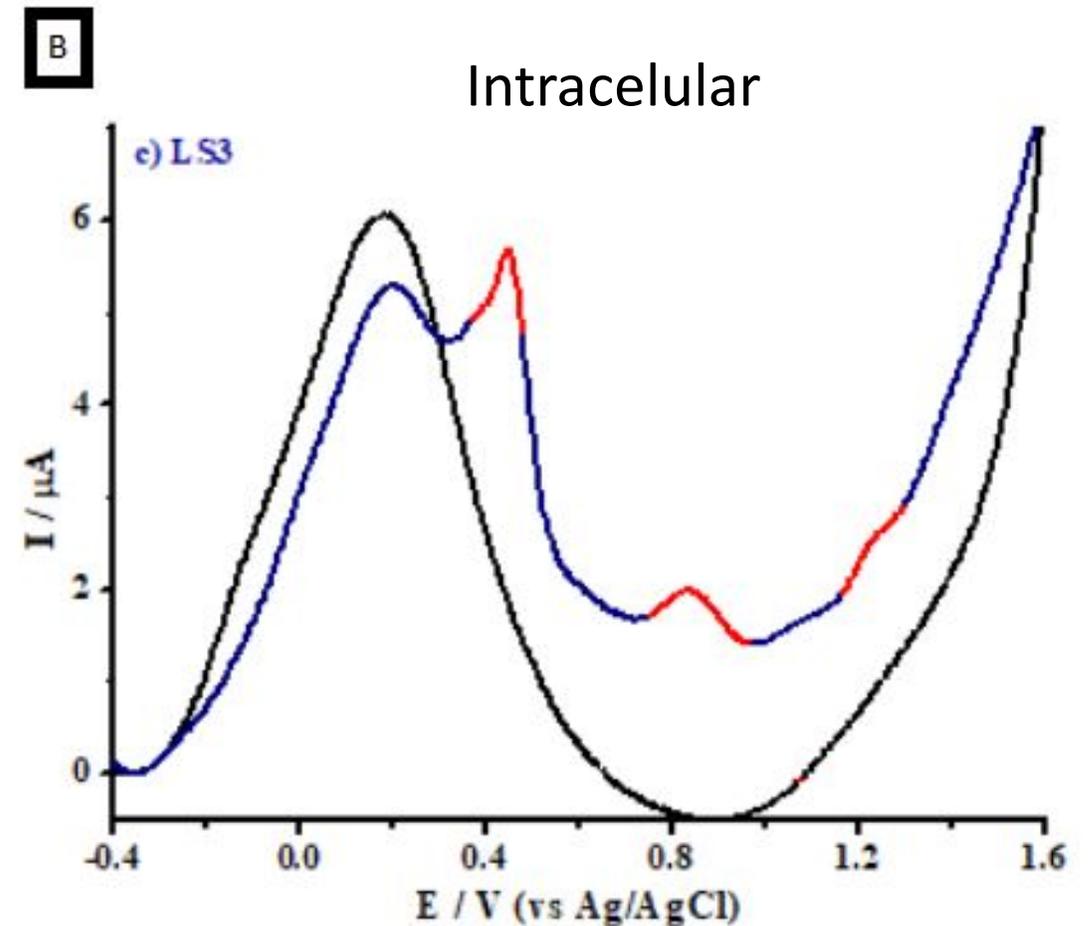
## Análisis ANOVA



## Análisis de la capacidad antioxidante por Voltametría de pulso diferencial


 $9,34 \mu\text{A V}^{-1}$ 

Antioxidantes


 $15,75 \mu\text{A V}^{-1}$

05

# 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  $\mu\text{A V}^{-1}$** .

# 06 RECOMENDACIONES

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

# 07 AGRADECIMIENTOS

## DIOS

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz, Ph.D.  
**Directora del Proyecto de  
 Investigación**

Ortega Andrea, Mgtr  
**Técnica del Laboratorio de Cultivo de  
 Tejidos Vegetales**

Pedro Romero, Ing.  
**Docente de la Universidad de las  
 Fuerzas Armadas ESPE**

Espinoza Patricio  
 Cunalata Alisson, Ing.  
**Pontificia Universidad Católica del  
 Ecuador**

Tesista y pasantes  
**Laboratorio de Cultivo de Tejidos  
 Vegetales**

## FAMILIA Y AMIGOS



**¡Muchas gracias!**