



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE QUÍMICA.**



**“Establecimiento de cultivos *in vitro* de raíces adventicias de *Salvia hispanica* L. (Chía) para la producción de ácidos grasos Omega 3”.**

TRABAJO RECEPCIONAL EN LA MODALIDAD DE:

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**JESÚS HERNÁNDEZ RAMÍREZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE**

ASESOR ADJUNTO:

**DRA. LETICIA BUENDÍA GONZÁLEZ**

**TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2016.**

---

## ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS E IMÁGENES.....	5
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1. Biotecnología.....	11
2.1.1. Cultivo de tejidos vegetales.....	15
2.1.2. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales.....	16
2.2. Producción de metabolitos secundarios.....	17
2.2.1. Cultivo de órganos.....	18
2.2.2. Cultivo de raíces adventicias.....	19
2.3. Medios de cultivo para el cultivo de tejidos vegetales.....	22
2.3.1. Composición de los medios de cultivo usados en el cultivo de tejidos vegetales.....	22
2.3.2. Fuentes de carbono.....	22
2.3.3. Reguladores del crecimiento vegetal.....	25
2.3.3.1. Auxinas.....	27
2.3.3.1. Citocininas.....	29
2.4. Otros componentes.....	30
2.4.1. Vitaminas.....	30
2.4.2. Antioxidantes.....	30
2.4.5. Condiciones ambientales para la incubación.....	32
3. <i>SALVIA HISPANICA</i> L. (CHÍA).....	33
3.1. Usos, interacción biológica, farmacología y fitoquímica.....	36
3.2. Metabolitos secundarios producidos por <i>Salvia hispanica</i> L.....	37
4. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA (AGPICL).....	40

---

5. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.....	42
5.1. Capacidad antioxidante.....	44
6. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS.....	46
6.1. Extracción por métodos tradicionales:.....	46
6.2. Técnicas de extracción no convencionales:.....	47
7. CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	50
8. JUSTIFICACIÓN.....	52
9. OBJETIVOS.....	53
9.1. OBJETIVO GENERAL.....	53
9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
10. HIPÓTESIS.....	54
11. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
11.1. Diagrama general de la metodología.....	55
11.1.1. Material vegetal.....	55
11.1.2. Establecimiento del cultivo aséptico de plántulas.....	56
11.1.3. Porcentaje de germinación.....	57
11.1.4. Medio de inducción de raíces adventicias y condiciones de incubación.....	60
11.1.5. Establecimiento de cultivos en suspensión de raíz.....	63
11.2. Determinación de cinéticas de crecimiento.....	63
11.2.1. Obtención de los extractos.....	64
11.3. Extracción de grasas.....	64
11.3.1. Extracto etéreo.....	64
11.4. Determinación de la composición de ácidos grasos.....	66
11.4.1. Esterificación de aceite.....	66
11.4.2. Cromatografía de gases.....	67
11.5. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	67

---

---

11.6. Capacidad antioxidante.....	69
11.6.1. DPPH .....	69
11.6.2. ABTS.....	69
12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
12.1. Establecimiento del cultivo aséptico de plántulas. ....	71
12.2. Porcentaje de germinación. ....	71
12.3. Inducción de raíces adventicias.....	75
12.4. Cinética de crecimiento. ....	79
12.5. Contenido de fenoles.....	82
12.6. Ácidos grasos.....	84
12.7. Capacidad antioxidante. ....	85
13. CONCLUSIONES. ....	88
14. PERSPECTIVAS.....	89
15. REFERENCIAS.....	90
16. ANEXOS.....	96
Anexo 1. Preparación del medio de cultivo MS .....	96
Anexo 2. Elementos esenciales en la mayoría de las plantas, formas de absorción y concentraciones que se consideran adecuadas (las formas preferentes de absorción se resaltan en negrita). ....	99
Anexo 3. Composición de algunos medios de cultivo usados en el cultivo de tejidos vegetales (mg/L). ....	100
Anexo 4. Curvas de patrón.....	101

## ÍNDICE DE TABLAS.

---

### ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Aplicaciones de la Biotecnología .....	14
Tabla 2. Lista de plantas en las que se han inducido raíces adventicias y se han cultivado con éxito para la producción de metabolitos secundarios altamente valorados.....	21
Tabla 3. Composición de algunos medios de cultivo usados en el cultivo de tejidos vegetales (mg/L).....	100
Tabla 4. Algunas reacciones de plantas superiores seguidas por la aplicación de reguladores de crecimiento. ....	26
Tabla 5. Generalidades de la planta.....	35
Tabla 6. Compuestos activos identificados en <i>Salvia hispanica</i> L. y su estructura química.....	38
Tabla 7. Tratamientos usados para el ensayo de germinación. ....	58
Tabla 8. Tratamientos usados para la inducción de raíces adventicias. ....	61
Tabla 9. Porcentajes de germinación de las semillas de <i>Salvia hispanica</i> L.....	72
Tabla 10. Porcentajes de inducción de raíces adventicias en explantes de tallo y hoja. ....	76
Tabla 11. Resultados de la cinética de crecimiento (Código de tratamiento AIB4R-2 mg/L de AIB). ....	80
Tabla 12. Muestras examinadas. ....	83
Tabla 13. % de grasas totales (aceite) en raíz de Chía.....	84
Tabla 14. % (promedio de los ésteres de ácido graso) contenido en el aceite. ....	85
Tabla 15. Resultados de resultados de la actividad antioxidante.....	86

## ÍNDICE DE FIGURAS E IMÁGENES.

---

### ÍNDICE DE FIGURAS E IMÁGENES.

Figura 1. Desarrollo de una plántula y tipos de raíz. ....	19
Figura 2. Raíces adventicias en tallo de <i>Oplismenus hirtellus</i> .....	20
Figura 3. Estructura química de algunas auxinas. A: AIA; B: AIB; C: 2,4-D; D: ANA; E: APCF; F: 2, 4, 5-T; G: Dicamba; H: Picloram.....	28
Figura 4. Estructura química de algunas citocininas. A: Adenina; B: Zeatina; C: Cinetina; D: BAP; E: 2iP; F: TDZ.....	29
Figura 5. Descripción botánica de <i>S. hispanica</i> y su distribución geográfica. A flor, B semillas, C, D distribución geográfica. ....	34
Figura 6. Planta de <i>Salvia hispanica</i> L. ....	35
Figura 7. Ejemplo del Códice Florentino escrito originalmente 1575-1577 o 1578-1580. La imagen representa a mujeres moliendo semillas de <i>Salvia hispanica</i> para formar la harina <i>chiappinoli</i> .....	36
Figura 8. Usos médicos de <i>Salvia hispanica</i> L.....	37
Figura 9. Las familias de los ácidos grasos poliinsaturados.....	40
Figura 10. Clasificación general de los compuestos fenólicos totales.....	43
Figura 11. Diferencias estructurales de taninos. ....	44
Figura 12. Equipo de extracción Soxhlet.....	46
Figura 13. Diagrama de fase del CO <sub>2</sub> .....	48
Figura 14. Equipos experimentales utilizados para la extracción por ultrasonido. ....	49
Figura 15. Sistema de Cromatografía de gases. ....	51
Imagen 1. Raíces de <i>S. hispanica</i> en suspensión.....	54
Imagen 2. Semillas chía premium (AGROBECK).....	56
Imagen 3. A) Semillas oscuras de la planta madre. B) Semillas blancas de la planta madre .....	56
Imagen 4. Semillas de <i>S. hispanica</i> inoculadas en medio MS. ....	71
Gráfica 1. Porcentaje de germinación de los diferentes tratamientos. ....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS E IMÁGENES.

---

Imagen 5. Plántulas de <i>S. hispanica</i> de dos semanas de desarrollo en medio MS control. ....	74
Imagen 6. (A) Explantes de tallo de <i>S. hispanica</i> ; (B) Raíces adventicias formadas en explante de tallo (tratamiento AIB4R).....	75
Imagen 7. (A) Explantes de hoja de <i>S. hispanica</i> ; (B) Raíces adventicias formadas en explante hoja (tratamiento AIB4R). ....	78
Imagen 8. Raíces generadas en los medio de cultivo semisólidos. ....	79
Imagen 9. Iniciación y establecimiento de cultivos de raíces de <i>S. hispanica</i> . (A) Raíz proveniente de cultivos semisólidos de 4 semanas de crecimiento; (B) Crecimiento de la raíz en medio líquido. ....	79
Gráfica 2. Cinética de crecimiento.....	81
Gráfica 3. Velocidad de crecimiento.....	81
Gráfica 4. Producción de CFT vs. Tiempo.....	82
Imagen 10. Contenido total de los compuestos fenólicos de las infusiones.....	84
Gráfica 5. Extractos vs %I de DPPH y ABTS .....	87

## ABREVIATURAS.

---

### ABREVIATURAS.

RA: Raíces adventicias.

RCV: Reguladores del crecimiento vegetal.

CTV: Cultivo de tejidos vegetales.

MS: Murashige & Skoog.

APCF: Ácido p-clorofenoxiacético.

AIB: Ácido 3-indolbutírico.

ANA: Ácido 1-naftalenacético.

AIA: Ácido 3-indolacético.

BAP, BA: 6-bencilamino purina, o, 6-benciladenina

CIN: Cinetina (6-furfuril aminopurina).

2iP: 6-( $\gamma, \gamma$ -dimetilalilamino) purina, o, 2-isopenteniladenina.

TDZ: 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

2,4,5-T: Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético.

Dicamba: Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico.

Picloram: Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.

EtOH: Etanol.

NaClO: Hipoclorito de sodio.

PS: Peso seco.

PF: Peso fresco.

EMAG: Ésteres metílicos de los ácidos grasos

Td: Tiempo de duplicación.

$\mu$ : Velocidad específica de crecimiento.

CFT: Compuestos fenólicos totales.

EAG: Equivalentes de ácido gálico.

FRAP: Poder antioxidante reductor del hierro, por sus siglas en inglés.

DPPH: Depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

ABTS: Depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico.

N.D.: No disponible.



## RESUMEN.

---

### RESUMEN.

La *Salvia hispanica* mejor conocida como chía, es una planta nativa del centro y sur de México, que recientemente ha adquirido notoria importancia dado que su semilla posee un alto contenido de ácidos grasos omega-3, los cuales promueven efectos benéficos para la salud y la nutrición humana; así mismo algunos estudios han demostrado la buena estabilidad oxidativa de la semilla, la cual contiene ácido clorogénico, ácido cafeico y los flavonoides miricetina, quercetina y kaempferol. El presente trabajo tuvo como objetivo el establecer cultivos de raíces adventicias de chía potencialmente productores de ácidos grasos polinsaturados del tipo Omega 3 y compuestos fenólicos. Para tal efecto se establecieron cultivos asépticos a partir de semillas. Una vez desarrolladas las plántulas, se tomaron hojas, tallos y raíces como fuentes de explantes, los cuales se sembraron en medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) suplementado con diferentes reguladores del crecimiento vegetal, esto con la finalidad de promover la formación de raíces adventicias. Los resultados obtenidos mostraron que los tallos tomados como fuente de explantes, en conjunto con los reguladores del crecimiento vegetal de manera individual fomentaron la formación de raíces adventicias, siendo el medio de cultivo suplementado con 2 mg/L de AIB (ácido 3-indolbutírico), el tratamiento que produjo la mayor cantidad de raíces. Las raíces adventicias generadas fueron subcultivadas en medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) líquido (suplementado con 2 mg/L de AIB) y colocados en un agitador orbital operando a 110 rpm, e incubados a 25 °C bajo un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad durante 31 días. Durante el periodo de incubación se tomaron muestras cada 3 días, a las cuales se les determinó el peso fresco y seco, con la finalidad de estudiar y observar el crecimiento y desarrollo de los cultivos y de esta manera establecer una cinética de crecimiento, cuyos resultados obtenidos indicaron que el tiempo de duplicación se alcanzó a los 4.6 días de cultivo, mientras que la fase estacionaria se obtuvo a los 21 días. La biomasa obtenida fue acondicionada, liofilizada y finalmente sometida a dos diferentes procesos de extracción, el primero consistió en una extracción acuosa asistida por ultrasonido, para ser posteriormente

## RESUMEN.

---

analizada por dos diferentes pruebas fitoquímicas, las cuales comprendieron el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante; el segundo procedimiento extractivo se realizó a través de un equipo soxhlet, con la finalidad de conocer el contenido de aceite, así como el contenido y tipo de ácidos grasos presentes en el aceite extraído. Los resultados arrojados por las pruebas fitoquímicas indicaron que los cultivos líquidos de raíces adventicias de *Salvia hispanica*, no perdieron su capacidad natural de biosintetizar ácidos grasos Omega3, obteniéndose 1.5% de contenido de aceite, del cual el ácido linolénico fue el más abundante con un porcentaje del 56%, y con respecto al contenido de compuestos fenólicos, se encontró un contenido máximo de 21.52 mg EAG (equivalentes de ácido gálico)/g; los cuales exhibieron una actividad antioxidante de un porcentaje de inhibición de DPPH (2, 2-difenil 1-1-picrilhidrazil) máximo de 13.85% y de un mínimo de 2%, y un porcentaje de inhibición de ABTS (2, 2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico) máximo de 38.83% y de un mínimo del 8.06 %

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la producción de ácidos grasos del tipo Omega3 y los compuestos fenólicos presentes de manera natural en la semilla de chía, pueden ser producidos de manera alternativa en cultivos líquidos de raíces adventicias de *Salvia hispanica*.

# INTRODUCCIÓN.

---

## 1. INTRODUCCIÓN.

La Chia, *Salvia hispanica* L., fue un cultivo que se desarrolló bien y un componente importante de culturas y nutrición mesoamericanas. La Chía (*Salvia hispanica* L.). Pero en últimos tiempos, la semilla de la Chía ha adquirido notoria importancia como una excelente fuente de aceites altamente insaturados, los cuales tienen un gran contenido de ácidos grasos omega-3 los cuales promueven efectos beneficiosos para la salud (Jamboonsri, *et al.* 2012; Ayerza, 2005); así como también una cantidad de estudios que han demostrado la buena estabilidad oxidativa de la semilla, la cual contiene ácido clorogénico, ácido cafeico y los flavonoides miricetina, quercetina y kaempferol (Taga *et al.*, 1984). Además de los anteriormente señalado tales aceites también son materiales de partida útiles para muchos productos químicos renovables(Jamboonsri, *et al.* 2012).

Hablando de las cuestiones agronómicas, el cultivo de *Salvia hispanica* L. se ve limitado ya que su cultivo se desarrolla adecuadamente en condiciones tropicales y subtropicales, y no es tolerante al frío (la planta no produce semillas ya que la planta muere por enfriamiento antes de florecer) (Jamboonsri, *et al.* 2012; Ayerza, 2005). Por ende, una vez expuestas las limitaciones agronómicas para el cultivo de la *Salvia hispanica* L. sale a relucir como una alternativa de importancia el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para la propagación de la especie, así como de la producción de los distintos metabolitos secundarios de interés de la misma. Teniendo como ventajas que el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es independiente de las variaciones geográficas y estacionales y de diversos factores ambientales, además de ofrecer un sistema de producción definido, que garantiza el suministro continuo de productos, calidad y rendimiento uniformes, etc (Ramachandra, 2002).

---

## **2. MARCO TEÓRICO.**

### **2.1. Biotecnología.**

La palabra “biotecnología” fue acuñada en idioma Alemán, *biotechnologie*, por Karl Ereky, un ingeniero Húngaro, en 1917, para describir todo el proceso por medio del cual los productos son elaborados a partir de materias primas con la ayuda de organismos vivos. Sin embargo, la biotecnología el uso de tecnologías basadas en sistemas biológicos tiene una larga y arraigada historia en las actividades humanas. Por ejemplo, los antiguos Egipcios, documentaron el proceso de elaboración del pan, y las etapas del proceso de la elaboración de la cerveza desde hace alrededor de 4000 años. Ellos no identificaron el microorganismo exacto involucrado, o tenían controladas todas las condiciones de esos procesos, pero no puede ser disputado que al “final” los productos no podrían ser obtenidos sin el uso de microorganismos vivos (El-Gewely, 1995).

La biotecnología, en este amplio sentido, ha sido utilizada a través de los siglos en su aplicación en la fabricación de cerveza, para la elaboración del vino, la elaboración del pan, la preservación de alimentos y el tratamiento de residuos, e incluso las prácticas agrícolas por sí mismas, incluso antes del redescubrimiento de las Leyes de Genética de Mendel en 1900, reflejan en las actividades humanas el aprovechamiento de la fabulosa energía solar a través de catálisis biológica para producir valiosos productos directamente de las plantas tales como carbohidratos, aceites, proteínas, fibras y miles de químicos que incluyen químicos medicinales.

Hoy en día existen varias definiciones para biotecnología en la literatura. Esto es el reflejo de que el campo está cambiando con mucha dinámica como para una tener una definición concluyente. Por ejemplo el diccionario Webster define biotecnología como “el uso de datos y técnicas de ingeniería y tecnología para el estudio y solución de problemas concernientes con organismos vivos”. El Convenio sobre la diversidad biológica (CDB) define la biotecnología como: "toda

---

aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos" (FAO, 2016), mientras que la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) especifica que la "biotecnología es la aplicación de la ciencia y la tecnología a organismos vivos, así como a las piezas, productos y modelos, para alterar materiales vivos o no vivos para la producción de conocimiento, bienes y servicios"(OECD, 2009). Esas definiciones dan una descripción global del campo sin realmente revelar demasiado acerca de su naturaleza (El-Gewely, 1995).

Actualmente la biotecnología es una de las áreas del conocimiento científico de más relevante evolución en las últimas décadas y que mayor impacto ha tenido en el desarrollo de diversos sectores (salud, agrícola, pecuario, medio ambiente, industrial, etc.). Sus aplicaciones involucran e inciden de manera simultánea y novedosa en estos sectores, y vienen alcanzando progresivamente una mayor variedad de acciones y de productos en diferentes ramos de actividad, todos ellos de gran importancia en la economía nacional e internacional, como lo son el farmacéutico, la producción y procesado de alimentos, la industria química y la remediación de ecosistemas, entre otros. En este sentido la biotecnología moderna se puede definir como una actividad multidisciplinaria, cuyo sustento es el conocimiento de frontera generado en diversas disciplinas (entre otras, biología molecular, ingeniería bioquímica, microbiología, inmunología, bioquímica, genómica, bioinformática, ingeniería de proteínas), que permite el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos (microbios, plantas y animales). A partir de dicho estudio integral y del uso de los sistemas biológicos, sus productos y sus partes, la biotecnología moderna busca hacer una utilización inteligente, respetuosa y sustentable de la biodiversidad, mediante el desarrollo de tecnología eficaz, limpia y competitiva para facilitar la solución de problemas importantes en sectores tales como el de la salud, el agropecuario, el industrial y del medio ambiente (Bolívar & Col., 2003).

---

Por lo mencionado anteriormente se puede dilucidar que la biotecnología tiene una amplia gama de aplicaciones las cuales se pueden agrupar en varios sectores, tales como (Duque, 2010):

- Biotecnología blanca: también llamada Biotecnología industrial. La Biotecnología blanca es la aplicación de técnicas biotecnológicas para mejorar procesos industriales o crear nuevos procesos.
- Biotecnología roja: o la Biotecnología de la salud, es la más visible y se dedica a la prevención, diagnóstico y tratamiento de un gran número de enfermedades nuevas o conocidas.
- Biotecnología verde: la biotecnología también se puede poner al servicio de la mejora de características de plantas o animales de un modo más rápido y eficiente.
- Biotecnología azul: se dedica a las aplicaciones de los microorganismos y productos de origen marino, especialmente en el diseño de nuevos fármacos.
- Biotecnología gris: dedicada a las aplicaciones ambientales de manera específica.

**Tabla 1. Aplicaciones de la Biotecnología**

<b>Clasificación de las aplicaciones de la Biotecnología.</b>		
Salud, medicina, farmacia	Productos terapéuticos para humanos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fármacos, medicamentos huérfanos y a medida.</li> <li>• Terapias celulares.</li> <li>• Terapias génicas.</li> <li>• Vacunas terapéuticas.</li> </ul>
	Productos terapéuticos para animales.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hormonas y sustancias recombinantes.</li> <li>• Antiinfecciosos.</li> </ul>
	Diagnóstico molecular.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test de proteínas.</li> <li>• Imagen molecular.</li> <li>• Test basados en ADN.</li> <li>• Test genéticos.</li> </ul>
	Vacunas.	
Agricultura y alimentación	Aplicaciones en ganadería, piscicultura, acuicultura, apicultura.	
	Cultivos y explotaciones forestales.	
	Biorrefinerías.	
Procesos industriales, medioambiente y energía	Carburantes, productos químicos y materiales.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biocarburantes.</li> <li>• Productos químicos.</li> <li>• Polímeros.</li> <li>• Catalizadores.</li> </ul>
	Procesos de la industria alimentaria.	
	Procesos de la industria textil y curtidos.	
	Papel y cartón.	
	Biorremediación.	

**Fuente: (Duque, 2010)**

---

### **2.1.1. Biotecnología vegetal.**

Desde el inicio de los tiempos, la humanidad ha utilizado las plantas para su beneficio como alimento, vestido, material de construcción, fuente de energía, obtención de productos terapéuticos, ornamento, etc. El mayor conocimiento, no sólo de la diversidad de las plantas, sino también de su funcionamiento en distintos niveles de integración (molecular, celular, organismo y población) ha permitido diseñar mejores estrategias para aumentar su producción, así como mejorar su calidad.

En los últimos años hemos asistido al vertiginoso despegue de la biología molecular de las plantas y su aplicación biotecnológica. Al menos en teoría, cualquier ruta metabólica puede someterse a manipulación, para modificar la producción de los distintos metabolitos primarios y secundarios. (Azcón-Bieto, *et al.* 2000). Es así que la biotecnología vegetal que usa ingeniería genética y biología molecular para introducir genes foráneos a las plantas es una alternativa viable para seguir incrementando su productividad (Calva & Pérez 2005).

#### **2.1.1. Cultivo de tejidos vegetales.**

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos. Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (“siendo así entonces la organogénesis el proceso involucrado en la transformación de una célula a una planta u órgano”) (Calva & Pérez, 2005).

Generalmente todas estas técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos -células desprovistas de pared celular -, células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Echenique, *et al.* 2004).



---

Habitualmente es común dividir las técnicas del cultivo de tejidos en dos grandes grupos: a) cultivos en medios semisólidos y b) cultivos en medios líquidos, los que a su vez pueden ser agitados (mediante el empleo de agitadores de uso continuo) o estacionarios. También es frecuente dividir al cultivo de tejidos atendiendo a los niveles de complejidad en cultivo de órganos, cultivos celulares y cultivo de protoplastos (Echenique *et al.* 2004).

### **2.1.2. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales.**

#### **1. El mejoramiento y la genética:**

- Micropropagación, con ayuda del cultivo de meristemas y de brotes para producir un gran número de individuos idénticos; las plantas pueden propagarse mediante dos ciclos de vida; la vía sexual y la asexual. En la vía asexual o vegetativa, los caracteres individuales de las plantas madres son mantenidas en sus descendientes, dado que el proceso ocurre a través de células somáticas que se copian exactamente y no recombinan ni segregan como ocurre en la vía sexual (semillas). Muchas selecciones se han obtenido sobre la base de mutaciones espontáneas que han ocurrido en algunos tejidos. Tales características pueden igualmente perpetuarse, usando estos como material madre. Al grupo de plantas reproducidas a partir de esta manera, se denomina clon. Las técnicas de micropropagación, no sólo permiten mantener la homogeneidad o constancia del genotipo (salvo excepciones), sino que también perpetúan la condición fisiológica de los explantes. La micropropagación es, además, la herramienta central en la amplificación de material genético de alta calidad, permitiendo además, el establecimiento y perpetuación de germoplasma o genotipos modificados a través de la ingeniería genética.

- Selección, y detección de las células, en lugar de las plantas, para los caracteres ventajosos.

- 
- Cruzar especies lejanamente relacionadas, por fusión de protoplastos y la regeneración del nuevo híbrido.
  - Producción de plantas dihaploides a partir de cultivos haploides para lograr líneas homocigóticas con mayor rapidez en los programas de mejoramiento.
  - La transformación, seguido de las pruebas a corto plazo de constructos genéticos o la regeneración de plantas transgénicas.
  - Eliminación de virus por la propagación de los tejidos meristemáticos; Las virosis son enfermedades bastante frecuentes en vegetales. Aunque por semillas se transmiten solamente un 5% de ellas, los problemas por contaminación son muy importantes en especies que se propagan vegetativamente.

2. Sistema modelo para el estudio de la genética de células vegetales, la fisiología, la bioquímica y la patología.

3. La producción de metabolitos secundarios; crecimiento de cultivos en medio líquido como una fuente de productos (Smetanska, 2008; Agro, 2015).

## **2.2. Producción de metabolitos secundarios.**

La evolución de la demanda de metabolitos secundarios en los últimos años resultó en un gran interés en el metabolismo secundario. Recientemente, estos compuestos se aislaban por extracción con disolvente de las plantas completas crecidas naturalmente, y se usan como productos farmacéuticos, nutracéuticos, pigmentos, alimentos y cosméticos, etc. Sin embargo la biosíntesis de metabolitos en plantas cultivadas en la naturaleza se restringe a menudo a especies o géneros, o puede ser activada sólo durante una temporada específica en una etapa particular de crecimiento y desarrollo (Baque, *et al.* 2012), siendo entonces los cultivos de células vegetales una fuente alternativa atractiva a la planta entera para la producción de metabolitos secundarios de alto valor (Ramachandra, 2002).

Las ventajas de esta tecnología sobre la producción agrícola convencional son las siguientes (Ramachandra, 2002):

- 
- Es independiente de las variaciones geográficas y estacionales y de diversos factores ambientales.
  - Ofrece un sistema de producción definido, que garantiza el suministro continuo de productos, calidad y rendimiento uniformes.
  - Es posible producir nuevos compuestos que no se encuentran normalmente en la planta madre.
  - Recuperación y producción eficiente. Rapidez de producción.
  - Además, la célula vegetal puede realizar biotransformaciones estereo (se refiere a la distribución geométrica de los compuestos químicos) y regioespecíficas (se refiere a la orientación, de las reacciones que dan exclusiva o casi exclusivamente uno de varios productos isómeros posibles (Morrison & Boyd, 1998)) para la producción de nuevos compuestos a partir de precursores baratos.

Desventajas (Ramachandra, 2002):

- Existen varios cultivos de células vegetales que producen una mayor cantidad de metabolitos secundarios que en plantas intactas. Sin embargo, todavía existen problemas en la producción de metabolitos por cultivos celulares como resultado de la inestabilidad de líneas celulares, rendimientos bajos, crecimiento lento y problemas de escalado.

### **2.2.1. Cultivo de órganos**

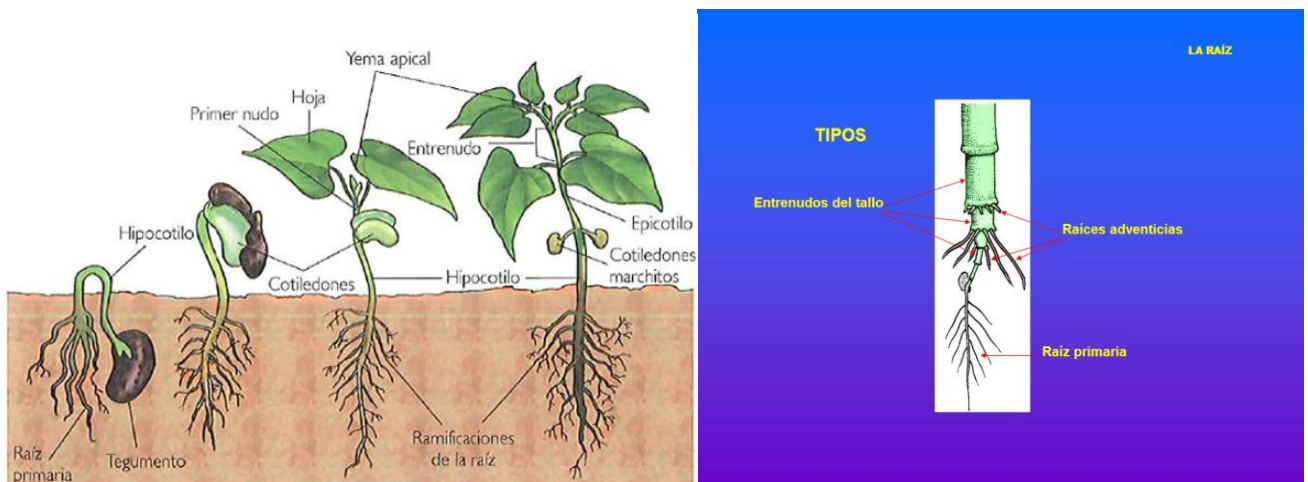
La producción de ciertos metabolitos está asociada a células muy especializadas o a la interacción de células en la planta, que en algunos casos pueden ser de diferentes tipos celulares; en estos casos resulta útil cultivar el órgano o tejido completo. Existen dos tipos de órganos que usualmente son cultivados para la producción de metabolitos secundarios: raíces y brotes; éstos se caracterizan por tener un patrón metabólico muy similar al de los órganos en la planta y pueden o no estar transformados genéticamente; en el caso de células no transformadas el

---

tejido se obtiene a partir de un explante y la diferenciación se logra utilizando una combinación apropiada de hormonas; los órganos transformados se obtienen utilizando *Agrobacterium rizhogenes*, en el caso de raíces, o *Agrobacterium tumefaciens* en el caso de brotes (Arias *et al.*, 2009).

### 2.2.2. Cultivo de raíces adventicias.

Las raíces adventicias (RA) se definen como raíces que se desarrollan de otras estructuras que no son las raíces de la planta tales como hojas, hipocótilos, tallos y brotes (figura 1). El proceso de formación de RA es distinto de otros procesos de organogénesis, ya que implica la iniciación de *ново* de un meristemo. Raíces que surgen, por ejemplo, de hojas o tallos (figura 2) (Yadav *et al.* 2013).



**Figura 1. Desarrollo de una plántula y tipos de raíz. Fuentes:**

[http://semanaeconomica.com/transformandotalento/wp-content/uploads/sites/58/2015/11/kguk.jg\\_.kjgb\\_.png](http://semanaeconomica.com/transformandotalento/wp-content/uploads/sites/58/2015/11/kguk.jg_.kjgb_.png)

<http://slideplayer.es/slide/109242/>



**Figura 2. Figura Raíces adventicias en tallo de *Oplismenus hirtellus*. Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema1/1-7raiz.htm>**

Las raíces adventicias inducidas bajo condiciones asépticas en un medio suplementado con la fitohormona adecuada mostraron una mayor tasa de crecimiento y metabolismo secundario activo. Además, las raíces adventicias son el material biológico potencial para la producción comercial estable de valiosos metabolitos secundarios sin genes extraños en condiciones *in vitro*. En comparación con los cultivos celulares, las raíces adventicias mostraron mayor estabilidad en su entorno de crecimiento y sintetizan grandes cantidades de metabolitos secundarios en sus espacios intercelulares, que pueden extraerse más fácilmente y pueden crecer en un medio modificado con fitohormona con bajo inóculo pero una alta tasa de crecimiento (Baque *et al.*, 2012).

**Tabla 2. Lista de plantas en las que se han inducido raíces adventicias y se han cultivado con éxito para la producción de metabolitos secundarios altamente valorados.**

Especies de plantas.	Metabolitos.	Importancia.
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenósidos	Anticancerígeno, antifatiga, inmunoestimulante, antiinflamatorio, antioxidante
<i>Panax notoginseng</i>	Saponinas	Inmunostimulante, anticancerígeno
<i>Morinda citrifolia</i>	Antraquinona, rubiadina, compuestos fenólicos, flavonoides	Anticancerígeno, antibacteriano, antiviral, hepatoprotector, antioxidante, antialérgico
<i>Echinacea purpuria</i> <i>E. angustifolia</i>	Derivados del ácido cafeico	Inmunoestimulante, anti-inflamatorio, antioxidante
<i>Hypericum perforatum</i>	Hipericina	Antidepresivos, antifúngicos, antiinflamatorios, antimicobacterianos
<i>Eleutherococcus koreanum</i>	Eleuterósido B, E, Ácido clorogénico	Antifatiga, analgésico
<i>Pelargonium sidoides</i>	Cumarina	Antivirus, antibiótico
<i>Scopolia parviflora</i>	Hiascinamina (Alcaloide)	Actividad anticolinérgica
<i>Iris germanica</i>	Irigenina, Iristectorigenina A (flavonoides)	-----
<i>Raparus sativus L. cv. Peking koushin</i>	Antocianina	Colorante de alimentos
<i>Rhu javanica</i>	Glucogalina, riccionidin A (polifenoles)	Antioxidante
<i>Dubosia myoporoides</i> <i>D. leichhardtii</i>	Escopolamina, hiosciamina.	Espasmolítico
<i>Cornus capitata</i>	Taninos	Antioxidantes
<i>Anthemis nobilis</i>	Geranyl isovalerte	Anti-inflamatorio, fragancia, aceite esencial
<i>Andrographis paniculata</i>	Andrografólido	Antimalárico, antipirético

**Fuente: (Baque et al. 2012)**

---

### **2.3. Medios de cultivo para el cultivo de tejidos vegetales.**

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos.

#### **2.3.1. Composición de los medios de cultivo usados en el cultivo de tejidos vegetales.**

Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos.

Básicamente, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran (Echenique *et al.*, 2004):

- Una fuente de carbono
- Nutrientes minerales
- Sustancias vitamínicas
- Sustancias reguladoras del crecimiento
- Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)

#### **2.3.2. Fuentes de carbono.**

El explante o las plántulas que se generan *in vitro*, generalmente presentan una baja tasa fotosintética debido a sus condiciones especiales de desarrollo, no siendo completamente autotróficos, y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono (Echenique *et al.*, 2004). La sacarosa generalmente es la fuente más adecuada de carbono para el cultivo de células vegetales (Gamborg *et al.* 1968), su empleo varía en concentraciones que van del 2 al 5%. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También mio-inositol (100 mg/L) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos (Echenique *et al.* 2004).

#### **2.1.1. Componentes minerales.**

Las necesidades nutricionales de las plantas se estudian de forma separada en dos grandes grupos: nutrientes orgánicos e inorgánicos. Los primeros representan entre el 90 y 95% del peso seco de las plantas y están constituidos por los

---

elementos carbono, oxígeno e hidrógeno obtenidos a partir del CO<sub>2</sub> de la atmósfera.

A finales del siglo XVIII, De Saussure (1767-1845), que estudió tanto la fotosíntesis como la absorción de nutrientes, introdujo nuevas técnicas y métodos que le convirtieron en uno de los pioneros en el análisis elemental de las plantas e introductor de la idea de que algunos, pero no todos los elementos pueden ser indispensables. Surge así el concepto de elemento esencial para el crecimiento de las plantas.

El término elemento mineral esencial fue propuestos por Arnon y Stout (1934). Estos investigadores defienden que para que un elemento pueda ser considerado esencial debe cumplir estos tres criterios:

1. Una planta será incapaz de completar su ciclo vital en ausencia del elemento mineral considerado.
2. La función que realice dicho elemento no podrá ser desempeñada por otro mineral de reemplazo o de sustitución.
3. El elemento deberá estar directamente implicado en el metabolismo –por ejemplo, como componente de una molécula esencial de la planta-, o deberá ser requerido en una fase metabólica precisa, tal como una reacción enzimática.

De acuerdo con esta estricta definición, aquellos elementos minerales que compensen los efectos tóxicos de otros elementos o aquéllos que, simplemente, reemplacen a nutrientes minerales en algunas de funciones específicas menores, tales como el mantenimiento de la presión osmótica, no son esenciales, pero pueden ser descritos como elementos beneficiosos , como sería el caso del Si, Na, Al, Co, Ti y, Se..

Los elementos esenciales se dividen en dos categorías: 1) los macronutrientes y, 2) los micronutrientes, elementos traza u oligoelementos (Azcón-Bieto *et al.*, 2000).



---

### 2.1.2. Macronutrientes (Macroelementos).

Los macronutrientes son los elementos presentes en mayor cantidad en las plantas, constituyentes de biomoléculas estructurales, tales como proteínas, lípidos o carbohidratos, o actúan como osmolitos. Los seis siguientes elementos N, P, K, S, Ca, y Mg constituyen, junto con H, C y O, la totalidad de macroelementos. En gran parte, pero no de forma exclusiva, están implicados en la estructura de las moléculas, y su presencia en los tejidos está siempre por encima del 0.1 % ( $30 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$  de peso seco) (Azcón-Bieto *et al.* 2000).

### 2.1.3. Micronutrientes (Microelementos).

Los microelementos se requieren en pequeñas cantidades (se encuentran en los tejidos, inferior al 0.1 %, que representan menos de  $3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$  de peso seco (Azcón-Bieto *et al.* 2000) para el crecimiento y desarrollo de las plantas, y tienen muchos y diversos roles. El Mn, I, Cu, Co, B, Mo, Fe y Zinc por lo general comprenden los microelementos, aunque otros elementos, tales como el Ni y el Al, se encuentran con frecuencia en algunas formulaciones. El hierro generalmente se añade como sulfato de hierro, citrato de hierro, aunque también se puede utilizar el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en conjunción con el sulfato de hierro. Los complejos de EDTA permiten la liberación lenta y continua de hierro en el medio (El hierro no complejo puede precipitar fuera del medio como óxido férrico) (Smetanska, 2008).

### 2.1.4. Agentes gelificantes.

Los medios para cultivo de células vegetales *in vitro* se pueden utilizar en forma líquida o sólida, dependiendo del tipo de cultivo. Para cualquier cultivo que requiere ser cultivado en la superficie, el medio debe ser solidificado o gelificado (Smetanska, 2008). El agente gelificante es un carbohidrato (heteropolisacárido) cuya concentración puede variar entre 50 a 90 %. Estos agentes son necesarios para dar consistencia al medio nutritivo, de modo que el explante quede en la superficie. En el mercado se ofrece en diferentes marcas y precios. El agente gelificante se disuelve en el agua a 100° C y solidifica alrededor de los 45° C. Este

---

último dato es importante, porque en el caso de que sustancias termolábiles deban adicionarse al medio después de autoclavado, esto debe hacerse un poco antes de que la temperatura del medio llegue a ese valor. Otras preocupaciones respecto a este tipo de ingrediente es que puede ir acompañado de sales, y producir vitrificación en las plantas obtenidas, y dependiendo del pH puede ser hidrolizado en su paso por el autoclave (Agro, 2015). Las cantidades de agente gelificante por litro de medio de cultivo pueden variar: el agar (entre 0,6 y 1%) es el compuesto más utilizado, también pueden emplearse «Agargel» (0,40-0,60%), «Transfergel» (2,0-2,60%), «Phytigel» (0,25- 0,40%), agarosa (0,80-0,90%) y «Gelrite» (0,10-0,20%) (Echenique *et al.*, 2004).

### **2.3.3. Reguladores del crecimiento vegetal.**

Las fitohormonas ocupan una posición central en la regulación del crecimiento, y especialmente en la diferenciación de las plantas en general, tanto en células como en sistemas de cultivo de tejidos. Aunque existe abundante literatura sobre las reacciones que se llevan a cabo en los cultivos de células y tejidos después de suministrar uno u otro regulador de crecimiento al medio nutritivo, nuestro conocimiento de un sistema hormonal endógeno de cultivos celulares es bastante limitado. En analogía a las hormonas animales, las fitohormonas se definen como sustancias producidas en algunos tejidos en ciertas etapas del desarrollo de una planta, y que una vez producidas entonces son distribuidas por el sistema vascular, seguido de lo cual ejercen sus funciones en tejidos remotos en muy bajas concentraciones. Actualmente, las fitohormonas son un tipo de sistema de señalización para coordinar el crecimiento y el desarrollo de las plantas. En sistemas animales, las funciones hormonales generalmente son bastante específicas y localizadas, mientras que en sistemas vegetales las fitohormonas son algo inespecíficas, y son más seguidamente relacionadas a estados fisiológicos, o a su posición en los tejidos o células objetivo. Una reacción específica puede ser inducida por varias de esas sustancias, y dadas fitohormonas pueden inducir varias reacciones. En base a tales reacciones, las fitohormonas se dividen usualmente dentro de cinco grupos, auxinas, citocininas, giberelinas, algunos

compuestos gaseosos como el etileno, y el grupo asociado con el retraso del crecimiento y la senescencia, tal como el ácido abscísico (AAB), y en base a datos recientes, el ácido jasmónico y los brasinosteroides, así como también el ácido salicílico. Tanto el ácido jasmónico como el ácido salicílico son importantes en los mecanismos de defensa en las plantas (Kumar & Imani, 2009).

**Tabla 4. Algunas reacciones de plantas superiores seguidas por la aplicación de reguladores de crecimiento.**

	<i>Auxinas</i>	<i>Giberelinas</i>	<i>Citocininas</i>	<i>Etileno</i>
<i>Formación de raíz (Root formation)</i>	+	-	-	+
<i>Rompimiento de la dormición de los órganos almacenados</i>	+	+	-	-
<i>Crecimiento de área foliar (Growth of leaf area)</i>	-	-	-	+
<i>Desarrollo de brotes foliares (Development of leaf buds)</i>	-	+	-	-
<i>Longitud internodal (Internode length)</i>	-	+	+	-
<i>Senescencia foliar (Leaf senescense)</i>	+	-	-	+
<i>Rompimiento de la dormición de los brotes foliares (Breaking dormancy of leaf buds)</i>	+	+	-	-

(+, reacción positiva; -, reacción negativa). Fuente: (Kumar & Imani, 2009).

El establecimiento del sistema fitohormonal envuelve áreas metabólicas completamente diferentes. Las auxinas son sintetizadas a partir del triptófano, un

---

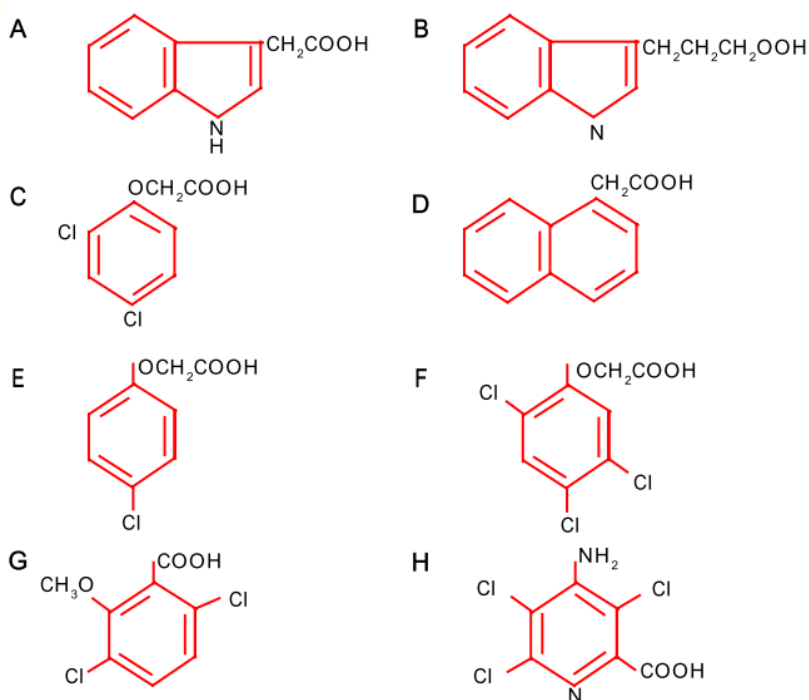
aminoácido; las giberelinas son diterpenos; las citocininas son producto del metabolismo de los nucleótidos; y el etileno es sintetizado a partir de la metionina, de nuevo un aminoácido. La síntesis del ácido abscísico se origina del metabolismo de los diterpenos. Actualmente, las fitohormonas podrían también ser clasificadas como producto del "metabolismo secundario". Sin embargo, el metabolismo secundario es característico de células más viejas con baja o nula división, pero las fitohormonas la mayoría de las veces son sintetizadas en tejidos más jóvenes con elevadas tasas de división celular, por ejemplo, los meristemas.

Las fitohormonas, y hasta cierto punto, también los reguladores de crecimiento sintéticos se pueden encontrar en las células en (hablando en términos generales) tres formas: primero, como moléculas libres; segundo, como conjugados, en los cuales los compuestos se encuentran enlazados a moléculas de bajo peso molecular como aminoácidos o carbohidratos; y tercero, como moléculas enlazadas a estructuras de elevado peso molecular (principalmente péptidos y proteínas). En base a ideas actuales, las moléculas libres son compuestos activos fisiológicamente, mientras que los conjugados con pequeñas moléculas funcionan como formas de transporte inactivo. Las moléculas enlazadas a estructuras de elevado peso molecular podrían posiblemente funcionar por almacenamiento inmóvil e inactivo en las células. Ésta clasificación es bastante esquemática, y seguido ocurren desviaciones, especialmente por las citocininas. Si un regulador de crecimiento entra a una célula, este se puede encontrar como una molécula libre y funcionar en consecuencia, o estará conjugada con pequeñas moléculas, o enlazada a grandes moléculas y será inactivada. Eventualmente, la molécula puede ser rota, o pasar inalterada a través de la célula. Todas esas reacciones son catalizadas por enzimas, y por consecuencia el destino de la molécula será determinado por la diferenciación molecular de una determinada célula (Kumar & Imani, 2009).

#### **2.3.3.1. Auxinas.**

Entre éstas, está el ácido indolil-3-acético (AIA), cuya síntesis es realizada a partir del triptófano, el cual dependiendo de la planta, por vía enzimática puede

primeramente descarboxilarse o desaminarse, para después dar origen al indol-3-acetaldehído, el cual, por oxigenación da origen al AIA. Esta hormona es sintetizada a partir de tejidos meristemáticos en la planta (meristema apical, radicular, yemas embriones, etc.). El ácido naftalenacético (ANA), picloram (ácido 3, 5,6 tricloropicolínico), ácido indolbutírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-cloroindol-3-acético (4- Cl-AIA), etc., son ejemplos de auxinas (figura 3). La cantidad de auxinas usadas en los medios nutritivos es baja, con concentraciones en el orden micromolar ( $\mu\text{M}$ ). En cantidades mayores, producen efectos de herbicida y por lo mismo, son tóxicas. Pueden ser disueltas en KOH o NaOH 0,1 N y almacenadas en congelador como una solución madre. Entre las acciones fisiológicas promovidas por las auxinas están: la inducción de callos, inducción de raíces, establecimiento de suspensión celular, metilación de la citocina, formación de frutos, etc. (Echenique *et al.*, 2004; Agro, 2015).



**Figura 3. Estructura química de algunas auxinas. A: AIA; B: AIB; C: 2,4-D; D: ANA; E: APCF; F: 2, 4, 5-T; G: Dicamba; H: Picloram (Agro, 2015).**

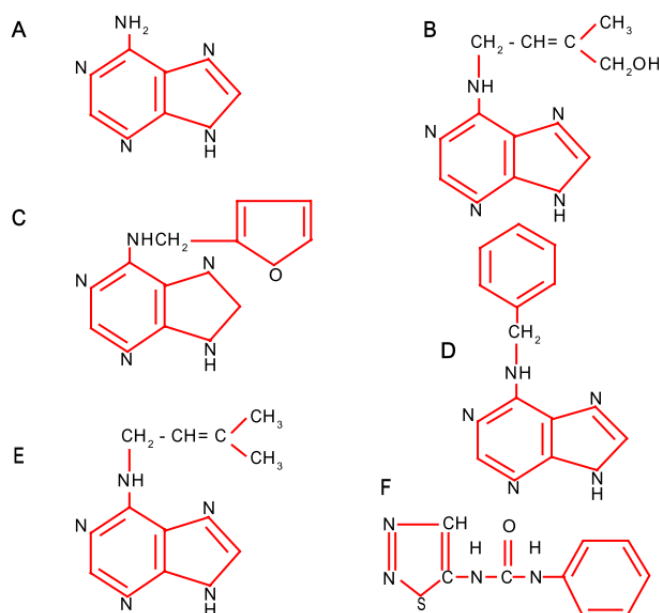
---

### 2.3.3.1. Citocininas.

Este grupo de hormonas es normalmente usado en el cultivo de tejidos para promover el desarrollo de yemas adventicias a partir de callos o embriogénesis somática (figura 4) (Barrueto *et. al.*, 2004).

Las citocininas también son usadas en pequeñas cantidades ( $\mu\text{M}$ ), son solubles en HCl 0,1 N y mantenidas como solución madre congeladas.

Las citocininas, a pesar de ser un componente fundamental en los protocolos de micropropagación, pueden estimular la hiperhidricidad, fenómeno en el cual la planta toma un aspecto vitrificado. La hiperhidricidad es un desorden fisiológico de la planta *in vitro*, caracterizado por hojas rígidas y quebradizas, anomalía estomática y deficiente formación de la cutícula. La vitrificación puede tener otras causas también, por ejemplo, exceso de humedad relativa dentro del frasco, altos niveles de  $\text{NH}_4$  y citocininas (Daguin y Letouzé, 1986; Leshem, *et al.*, 1988; Agro, 2015).



**Figura 4. Estructura química de algunas citocininas. A: Adenina; B: Zeatina; C: Cinetina; D: BAP; E: 2iP; F: TDZ (Agro, 2015)**

---

## 2.4. Otros componentes.

### 2.4.1. Vitaminas.

Las vitaminas son una denominación genérica que incluye un grupo de sustancias orgánicas presentes en pequeñas cantidades dentro de la célula, participando de determinadas funciones dentro de ella, como por ejemplo, ser un cofactor no proteico de enzimas, por lo que son importantes para desempeñar una acción catalítica normal.

Las vitaminas se dividen en liposolubles (A, D, E, K) e hidrosolubles. Entre estas últimas tenemos: B1: tiamina; B2: riboflavina; B3: niacina; B6: piridoxina; biotina; ácido fólico; B12: cobalamina; ácido ascórbico: vitamina (Agro, 2015).

Y para el caso del cultivo de células vegetales *in vitro* básicamente son utilizadas las del complejo B, tales como la tiamina (vitamina B1). Sin embargo, a menudo se añaden otras vitaminas a los medios de cultivo de células vegetales (Smetanska, 2008), como por ejemplo, la vitamina B6 (piridoxina), la cual es grupo prostético de varias enzimas, siendo el piridoxalfosfato la forma más activa como grupo prostético de enzimas que catalizan reacciones de aminoácidos, como por ejemplo, las transaminaciones; El ácido pantoténico es otra vitamina con función de coenzima, pues, es un cofactor importante de la Coenzima A, molécula que desempeña un papel importante entre la interfase de la glicólisis y el ciclo de Krebs (piruvato → oxaloacetato); además de otras vitaminas importantes del complejo B (ácido fólico, vitamina B12) y vitamina C (ácido ascórbico), no son frecuentemente citadas en la literatura del cultivo de tejidos vegetales. A pesar de esto, el ácido ascórbico puede ser usado como antioxidante (100-200 mg/L) de explantes, antes de que éstos sean inoculados en el medio nutritivo (Agro, 2015)

### 2.4.2. Antioxidantes.

Los explantes de diferente origen, aunque predominantemente de material leñoso o especies particulares y, según condiciones de cultivo, no prosperan muchas veces a causa de un pardeamiento (“browning”) de sus tejidos, el cual se manifiesta superficial o internamente comprometiendo varios estratos de células,

---

superficiales y/o más profundas. Los explantes de especies que muestran pardeamiento a causa de un metabolismo fenólico oxidativo, generalmente no prosperan.

En algunas especies el efecto de pardeamiento puede ser reducido lavando con agua corriente esterilizada la zona de corte o escisión del explante por tiempos diversos (2-4 horas), antes de proceder al cultivo. Con ello, los compuestos fenólicos presentes en las células dañadas son retirados. Si es posible, conviene realizar este proceso con una menor tensión de O<sub>2</sub>, pues este gas eleva el potencial redox, haciendo la oxidación de fenoles más rápida (George, 1993). En la práctica, se usan los antioxidantes (o reductores), los cuales pueden aplicarse durante las fases de desinfección o incorporarlas a los medios de cultivo (Bonga, 1982a). Dentro de los productos más comúnmente usados se tiene: PVP o polivinilpirrolidona, de diferentes pesos moleculares; entre ellos PVP-360 o PVP-6755; cisteína; glutatión; DIECA (Dietilditiocarbamato de sodio); ácido aminooxiacético; mezclas de ácido ascórbico con ácido cítrico, (durante la desinfección o en el cultivo); β-mercaptoetanol; tiourea y carbón activado. Este último, junto a PVP, parece adsorber varios compuestos fenólicos que producen tejidos heridos en el medio, conjuntamente con productos de carácter tóxico derivados de la transformación de azúcares (sacarosa) por autoclavado (hidroximetilfurfural). Los otros antioxidantes actúan en forma reductora, impidiendo, ya sea la generación de quinonas o de peróxido de hidrógeno, o bien manteniendo los grupos tioles en forma reducida, activando en este caso la síntesis de proteínas (George, 1993). Lo anterior implica que, indirectamente, también varios compuestos de acción antioxidante pueden promover crecimiento u organogénesis en algunas especies (glutatión, ácido ascórbico, tiourea), como también activar el crecimiento en condiciones de receso (tiourea) (Agro, 2015).

Y finalmente el carbón activado, el cual suele ser incorporado al medio en proporciones que van del 0.1 al 5% p/v, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos gaseosa o el exceso de reguladores del crecimiento presentes en el medio de cultivo, pero E.K. Pettersson y su equipo de



---

colaboradores de la Swedish University of Agriculture, demostraron que puede promover la embriogénesis somática debido a la incorporación de ciertos compuestos al medio de cultivo por difusión (Echenique *et al.*, 2004).

#### **2.4.5. Condiciones ambientales para la incubación.**

La incubación de los cultivos se debe llevar a cabo en condiciones controladas. Por lo menos en lo que se refiere a temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperíodo, humedad atmosférica e higiene. Estas condiciones se logran con el empleo de cámaras climatizadas o cuartos especialmente preparados con aire acondicionado (frío-calor) y una buena y uniforme circulación de aire en el interior y dotados de un buen sistema de alarma para cortar la iluminación en caso de no funcionar el aire acondicionado. En general, los cultivos son incubados a temperatura constante de 25-28 °C, con ciclo de luz/oscuridad de 16/8horas. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes del tipo «luz día» con una irradiancia de entre 50 y 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La humedad atmosférica debe ser elevada (80- 90%) (Echenique *et al.*, 2004).

El pH del medio se suele ajustar entre cinco y seis, evitándose los pH extremos, debido a que en el medio, la concentración de iones de hidrógeno cambia durante el crecimiento del cultivo, disminuyendo durante la asimilación de amoníaco y aumentando durante la captación de nitrato (Smetanska, 2008).

---

### 3. *SALVIA HISPANICA* L. (CHÍA).

La *Salvia hispanica* conocida como “salvia española”, “artemisa española”, “chía mexicana”, “chía negra” o simplemente “chía”, es una planta herbácea anual, perteneciente a la familia de las Labiatae ó Lamiacea (Bueno *et al.*, 2010a), superdivisión de Spermatophyta y el reino Plantae (Mohd Ali *et al.* 2012), es una especie originaria de las áreas montañosas que se extienden desde el oeste central de México hasta el norte de Guatemala (Ayerza, 1995)(figura 5).

La planta tiene de hasta 1 m de altura que presenta hojas opuestas de 4 a 8 cm de largo y 3 a 5 de ancho (SAGARPA, 2014). Sus flores son hermafroditas, purpúreas a blancas y aparecen en cimas terminales con tamaños que oscilan entre los 3 a los 4 mm; la floración se produce entre julio y agosto en el hemisferio norte (figura 6). Los frutos (clusas) habitualmente llamados “semillas” son indehiscentes, monospermicos, ovals, suaves y brillantes, de color negro grisáceo con manchas irregulares rojizas en su mayoría y algunos blancos; remojados en agua originan un líquido gelatinoso debido a la presencia de mucílagos en su superficie (Bueno *et al.*, 2010b). La forma de propagación de esta especie es a través de sus semillas (Ayerza y Coates, 2006).

*S. hispanica* es originaria de Mesoamérica y su mayor diversidad genética se presenta en la vertiente del Océano Pacífico (Miranda, 1978; Cahill, 2004; Cahill, 2003;Hernández, 2008; Alfonso *et al.*, 2008); pudiéndose cultivar en climas tropicales y subtropicales donde su desarrollo es más propicio; no así en climas fríos, dado que no puede producir semillas debido a que la planta muere por enfriamiento antes de florecer (Ayerza, 2005).

Prefiere suelos ligeros a medios, bien drenados, no demasiado húmedos; como la mayoría de las salvias, es tolerante respecto a la acidez y a la sequía, pero no soporta las heladas. Requiere abundante sol, y no fructifica en la sombra (SAGARPA, 2014).

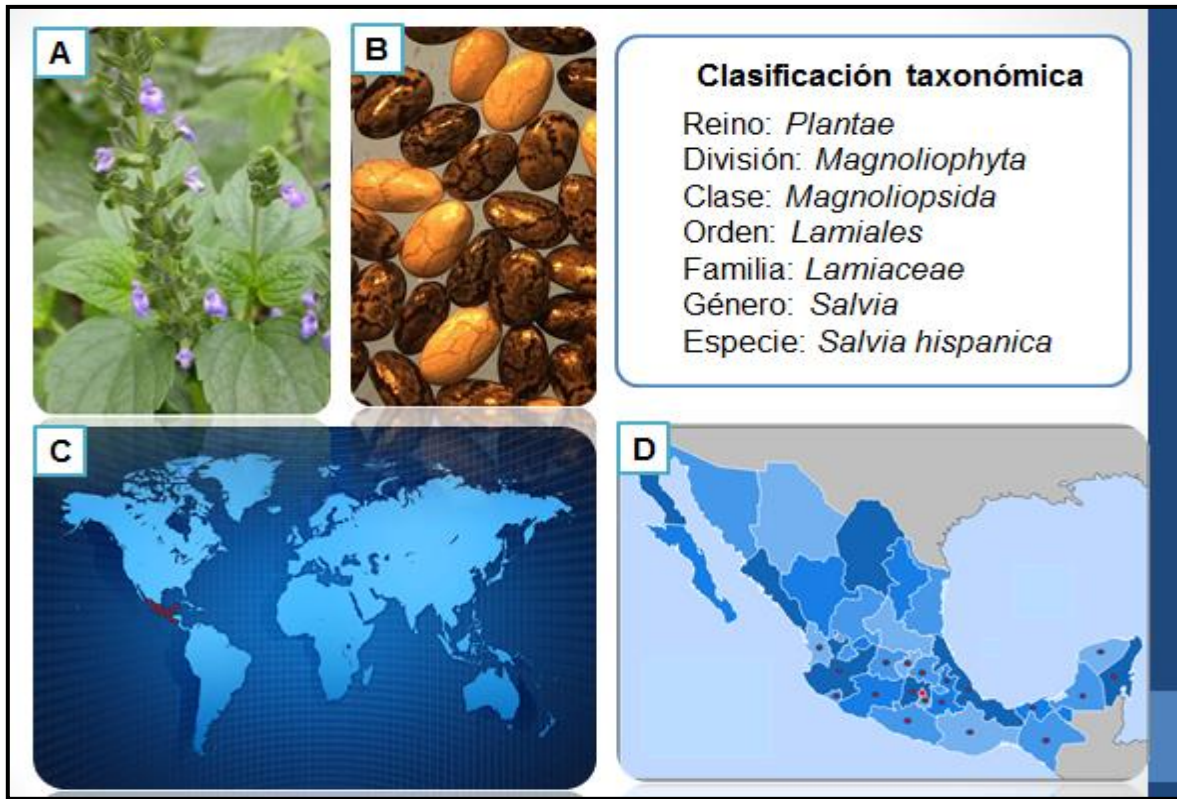



Figura 5. Descripción botánica de *S.hispanica* y su distribución geográfica. A flor, B semillas, C, D distribución geográfica (Jaramillo, 2013; <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extencion/Agromensajes/24/imagenes/f1a3r24.jpg>, <http://www.abc.es/Media/201312/03/beneficios-semillas-chia--644x362.jpg>, Haque y Ghoshal, 1981).

**Tabla 5. Generalidades de la planta.**

 <p><b>Figura 4. Planta de <i>Salvia hispanica</i> L (Mohd Ali, 2012).</b></p>	Generalidades planta	Herbácea anual de 1 m de altura (aprox.)
	Flores	Hermafroditas: purpureas a blancas y brotan en ramilletes terminales.
	Hojas	Opuestas de 4 a 8 cm de largo y 3 a 5 cm de ancho.
	Fruto	Las flores dan lugar a un fruto indehisciente, cuya semilla es rica en mucílago, fécula y aceite.
	Siembra	Julio
	Floración	Agosto a septiembre
	Cosecha	Noviembre
	Siembra	Julio
	Clima	Tropical sub-tropical
	Suelo	Arcilloso, arenoso y drenado.
Con luz solar.		
Germinación de la semilla	2 semanas (aprox.)	

**Fuente:** (SAGARPA, 2014, <http://www.oeidrus-jalisco.gob.mx/agricultura/chia/?id=Generalidades#Generalidades>).

---

### 3.1. Usos, interacción biológica, farmacología y fitoquímica.

La planta de chía tiene varios usos; las semillas se utilizan para preparar bebidas refrescantes, en la época precolombina era común tostar y moler las semillas de chía para preparar una harina conocida como Chianpinolli y utilizarla como materia prima para incorporarla en tortillas, tamales y diversas bebidas aztecas conocidas como Chianatoles (figura 7) (Cahill, 2003).



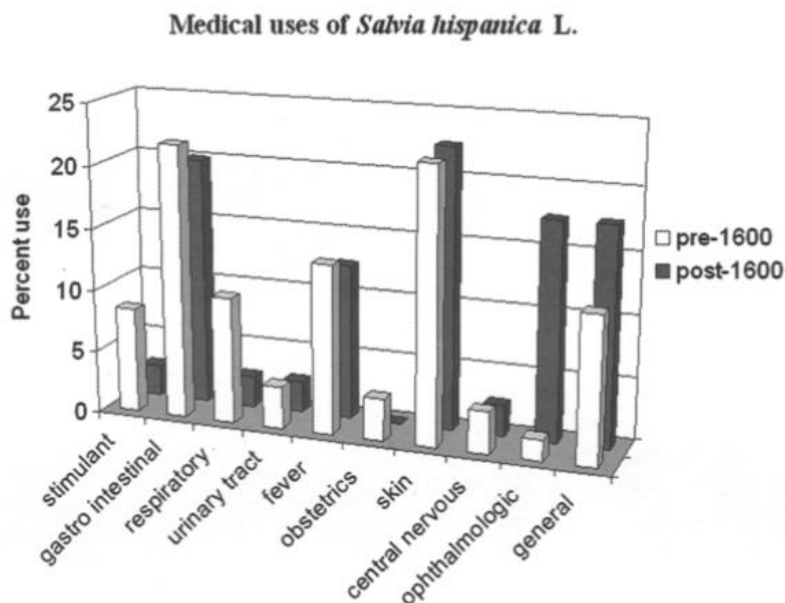
**Figura 7. Ejemplo del Códice Florentino escrito originalmente 1575-1577 o 1578-1580. La imagen representa a mujeres moliendo semillas de *Salvia hispanica* para formar la harina *chiappinolli* (Sahagun 1950-1982)(Cahill, 2003).**

Los usos medicinales se han dividido en las categorías basadas en partes de las plantas, incluidas las semillas, raíces, partes vegetativas, y las partes no descritas, siendo estas categorías divididas en dos periodos de años, uno previo al 1600 y otro posterior al 1600 (figura 8).

La asociación de las raíces y el tratamiento de las infecciones respiratorias se reflejan en la mayor prevalencia de tratamientos respiratorios en el período pre-1600. Este caso representa la única aparición de un tratamiento específico correlacionado repetidamente con una parte específica de la planta. Las partes vegetativas de las plantas, incluyendo tallos y hojas, estaban fuertemente asociadas con usos medicinales en general, sin embargo no con tratamientos específicos (Cahill, 2003). Siendo utilizada para tratar enfermedades

---

gastrointestinales, del tracto urinario, respiratorias, de la piel, oftalmológicas y del sistema nervioso central. Asimismo se usa como estimulante, antipirético y para inducir la labor de parto en mujeres embarazadas (Cahill, 2003).

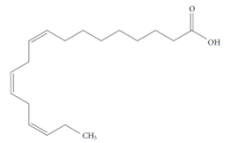
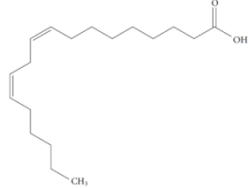
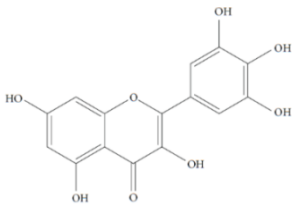
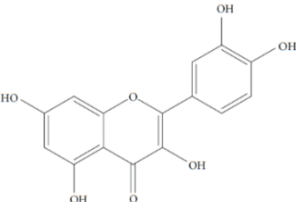


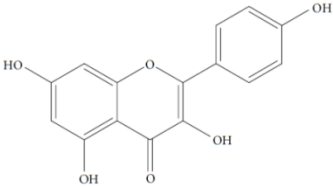
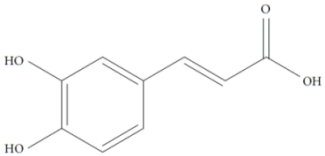
**Figura 8. Usos médicos de *Salvia hispanica* L. (Cahill, 2003).**

### **3.2. Metabolitos secundarios producidos por *Salvia hispanica* L.**

Dentro de los principales compuestos químicos que se han aislado de *S. hispanica* se encuentran: ácidos grasos esenciales (ácido  $\alpha$ -linolénico (Omega 3) y ácido linoleico (Omega 6)) y compuestos fenólicos (ácido cafeico, kaempferol, miricetina y quercetina)(Mohd, *et. al.*, 2012) Además de su alto contenido de Omega-3 presenta en su composición otros componentes de gran interés para la nutrición humana, como la fibra, las proteínas, los antioxidantes, las vitaminas y algunos minerales (Jaramillo, 2013).

**Tabla 6. Compuestos activos identificados en *Salvia hispanica* L. y su estructura química.**

Compuestos activos en <i>Salvia hispanica</i> L.	Estructura química	Actividades
<p><b>Ácido <math>\alpha</math>-linolénico</b>  <b>Omega 3 (AAL, C18:3, n-3)</b>  <b>(AGPICL)</b></p>	<p>(C18H30O2; PM: 278.42)</p> 	<p>Reduce los niveles de colesterol y triacilglicéridos. Previene enfermedades cardiovasculares. Posee actividades antiinflamatorias, cardioprotectoras y hepatoprotectoras antidiabéticas</p> <p>Protección contra la artritis autoinmune y cáncer.</p>
<p><b>Ácido linoleico</b>  <b>Omega 6 (AL, C18:2, n-6)</b>  <b>(AGPICL)</b></p>	<p>(C18H32O2; PM: 280.44)</p> 	<p>Estos ácidos grasos esenciales tienen propiedades inflamatorias, hipertensivas y trombóticas. Los eicosanoides producidos a partir de ácido linoleico (AL) se han asociado con enfermedades cardiovasculares y cáncer.</p> <p>Sin embargo, funciona inversamente con el ácido <math>\alpha</math>-linolénico (AAL); de esta manera, una equilibrada proporción de AAL a AL es importante para mantener un buen estado de salud.</p>
<p><b>Miricetina (flavonoles y ácidos fenólicos)</b></p>	<p>(C15H10O8; PM: 318.23)</p> 	<p>Aleloquímico: IC82=1 mM</p> <p>Antibacteriano: MIC=20-500 <math>\mu</math>g/mL;</p> <p>Antialimentario: IC52=&lt;1,000 ppm diet</p> <p>Antimutagénico: ID50=2-5 nM</p> <p>Antioxidante: IC50=3.9 <math>\mu</math>g/mL</p> <p>Inhibidor de Topoisomerasa-I: IC50=11.9 <math>\mu</math>g/mL</p> <p>Otras: antihistamínico, AntiHIV, antiinflamatorio, antimutagénico, antiséptico, antiviral, diurético, hipoglucémico, pesticida, vasodilatador.</p>
<p><b>Quercetina (flavonoles y ácidos fenólicos)</b></p>	<p>(C15H10O7; PM: 302.23)</p> 	<p>Inhibidor de 5-lipoxygenasa: IC50 (<math>\mu</math>M)=4</p> <p>Inhibidor de aldehído oxidasa: IC70-96=10 <math>\mu</math>M</p> <p>Inhibidor de aldosa reductasa: 4<math>\mu</math>g/mL</p> <p>Antihistamínico: IC50=&lt;10 <math>\mu</math>M</p> <p>Antiinflamatorio: 20-150 mg/kg</p> <p>Antiviral: 48-150 <math>\mu</math>g/mL</p>

		<p>Antiherpético: 48-150 µg/mL</p> <p>Hipoglucémico: 100 mg/kg (en ratas)</p> <p>Otras: antianafiláctico, antibacteriano, antidepresivo, antimutagénico, hepatoprotector, antitumoral, antipolio.</p>
<p><b>Kaempferol (flavonoles y ácidos fenólicos)</b></p>	<p><b>(C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>; PM: 286.23)</b></p> 	<p>Inhibidor de 5-lipoxigenasa: IC<sub>50</sub> (µM)=20</p> <p>Inhibidor de aldosa-reductasa: 100 µM</p> <p>Antiaflatoxina: IC<sub>50</sub>=3.28 ppm</p> <p>Antiagregante: 30 µM</p> <p>Antibacteriano: 20 µg/mL</p> <p>Antiinflamatorio: 20 mg/kg</p> <p>Antileucémico: IC<sub>50</sub>=3.1 µg/mL</p> <p>Antimutagénico: ID<sub>50</sub>=10-40 nM</p> <p>Antioxidante: IC<sub>50</sub>=1.2 µg/mL</p> <p>Antiviral: 23-92 µg/mL</p> <p>Funguicida: 20 µg/mL</p> <p>Inhibidor de TNF-α: IC<sub>50</sub>=3.99</p> <p>Inhibidor de tirosinasa: ID<sub>50</sub>=230 µM</p> <p>Otras: anticancerígeno, antihistamínico, antiespasmódico, diurético, pesticida, vasodilatador.</p>
<p><b>Ácido cafeico (flavonoles y ácidos fenólicos)</b></p>	<p><b>(C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>; PM: 180.16)</b></p> 	<p>Inhibidor de aldosa reductasa: 4 µg/mL (débil actividad)</p> <p>AntiHIV: EC<sub>50</sub>=200 µg/mL</p> <p>Antioxidante: 1/2 BHA; 1/3 quercetina; 30 mM; 50 µM; IC<sub>57</sub>=30 ppm</p> <p>Antitumoral (piel): 200 ppm (dieta)</p> <p>Citotóxico: TC<sub>50</sub>=200 µg/mL</p> <p>Funguicida: MIC=0.4 mg/mL;</p> <p>Protector solar: IC<sub>50</sub>=2.5 mg/L; IC<sub>91</sub>=5 mg/L; IC<sub>98</sub>=25 mg/L</p> <p>Otras: analgésico, antibacteriano, quelante, antihepatotóxico, antiinflamatorio, diurético.</p>

**Fuente: (Duke´s Handbook of Medicinal Plants of Latin America; Mohd, et. al., 2012).**



---

#### 4. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA (AGPICL).

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) son componentes dietarios que participan en múltiples procesos fisiológicos, donde cumplen un rol estructural en los fosfolípidos de las membranas celulares y son sustratos para la síntesis de diversos mediadores fisiológicos (Valenzuela B *et al.*, 2011). Dentro de los AGPICL encontramos dos grupos principales; n-3 y n-6, la distinción entre n-3 y n-6 se basa en la localización del primer doble enlace contando a partir del átomo de carbono del metil terminal de la molécula del ácido graso. Las diferentes posiciones y números de dobles enlaces nos dan las diferentes propiedades fisiológicas de los ácidos grasos. Ambos, ácidos grasos n-3 y n-6 son ácidos grasos esenciales (AGE), porque humanos, así como todos los mamíferos, no pueden sintetizar sus propios ácidos grasos, del tipo ácido linoleico (AL, C18:2, n-6) y ácido  $\alpha$ -linolénico (AAL, C18:3, n-3), los cuales es necesario ser suministrados por la dieta. Los ácidos grasos n-3 y n-6 no pueden ser interconvertidos (figura 9) (Trautwein, 2001).

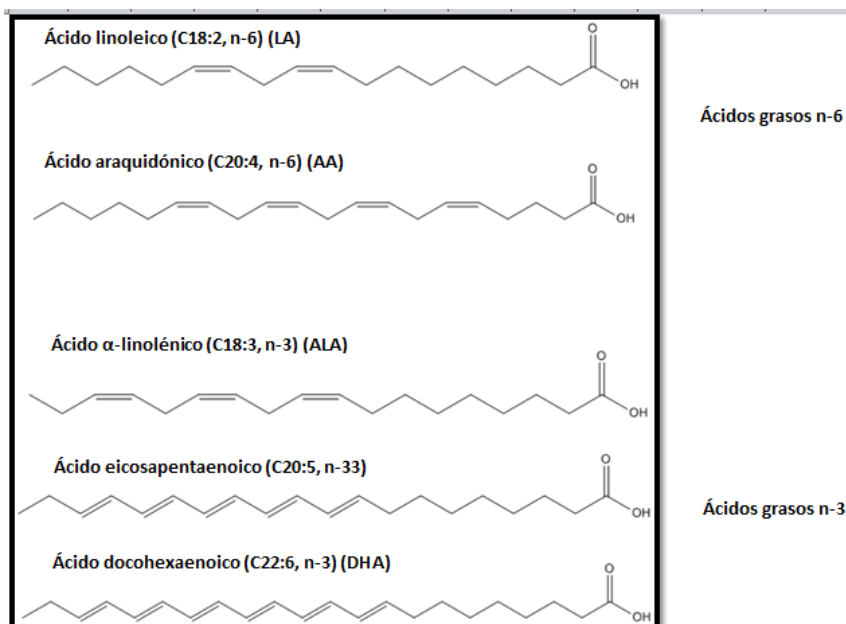


Figura 9. Las familias de los ácidos grasos poliinsaturados (Trautwein, 2001)

---

Ambos AL y AAL son metabolizados en ácidos grasos de cadenas más largas de 20 o más átomos de carbono. El AL es metabolizado en ácido araquidónico (AA, C20:4, n-6) y AAL en ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5, n-3), ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6, n-3) por elongación (alargamiento de la cadena) y desaturación (introducción de dobles enlaces) (Trautwein, 2001). Todos ellos emplean las mismas rutas metabólicas y compiten por las mismas enzimas elongasas y desaturasas (Carrero *et al.*, 2005).

Los ácidos grasos n-3 y n-6 tienen tres diferentes funciones: su función como fuente de energía, como componentes estructurales de la membrana, y su rol como precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), que intervienen en numerosos procesos fisiológicos tales como la coagulación de la sangre o las respuestas inflamatoria e inmunológica (Trautwein, 2001; Carrero *et al.*, 2005). Dos ácidos grasos AA y EPA compiten por el conjunto de enzimas para la síntesis de los eicosanoides principalmente para la producción de diferentes tromboxanos y prostaglandinas. Las prostaglandinas y tromboxanos tienen efectos fisiológicos opuestos. En general, los eicosanoides sintetizados a partir del EPA son menos potentes en su capacidad para provocar la agregación plaquetaria o una respuesta inflamatoria en comparación de la correspondiente a los eicosanoides derivados de AA. En adición, EPA inhibe la síntesis de tromboxanos A<sub>2</sub> por la sustitución del AA en la membrana plaquetaria fosfolipídica. El tromboxano A<sub>3</sub> es producido y efectuado sobre la agregación plaquetaria, activación y vasoconstricción son reducidas. De manera similar, EPA inhibe la formación del leucotrieno B<sub>4</sub>, un inductor de la inflamación, y produce leucotrieno B<sub>5</sub>, el cual tiene una respuesta inflamatoria débil (Trautwein, 2001).

Por consiguiente, las cantidades relativas de los dos distintos precursores de los ácidos grasos provistos por la ingesta dietaria y los presentes en los tejidos son determinantes importantes de las respuestas fisiológicas. (Trautwein, 2001).

---

## 5. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.

Los compuestos polifenólicos (CPF) son metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo. Los CPF se clasifican como ácidos fenólicos (AF), flavonoides (FLA) (figura 10) y taninos (TAN) (figura 11).

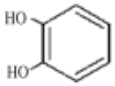
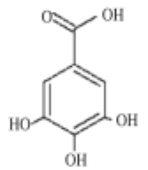
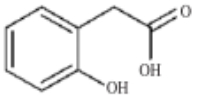
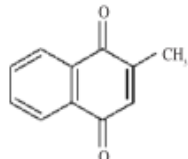
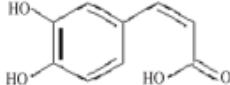
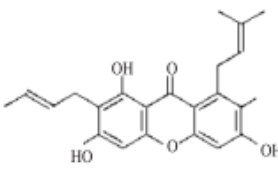
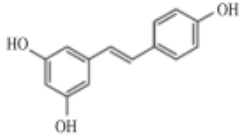
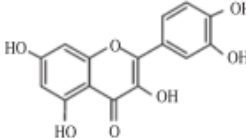
Existen alrededor de 8.000 CPF identificados y la mayoría de estos poseen una estructura de 3 anillos, dos aromáticos (anillos A y B) y uno heterociclo oxigenado (anillo C). Los CPF más sencillos poseen solo un anillo aromático y conforme aumenta el número de sustituyentes, se va incrementando la complejidad de la estructura. Previendo la gran diversidad de estructuras derivadas, a los CPF se les ha agrupado en 12 familias.

Así, los flavonoides tienen dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (C6, C3, C6). Por su parte, los taninos son compuestos poliméricos más complejos que se clasifican en hidrolizables y condensados. Los taninos hidrosolubles están constituidos por unidades de ácido elágico, y pueden estar unidos a una molécula de glucosa. En cambio, los taninos condensados resultan de la condensación de unidades de flavan-3-oles, tales como la catequina que tienden a polimerizarse.

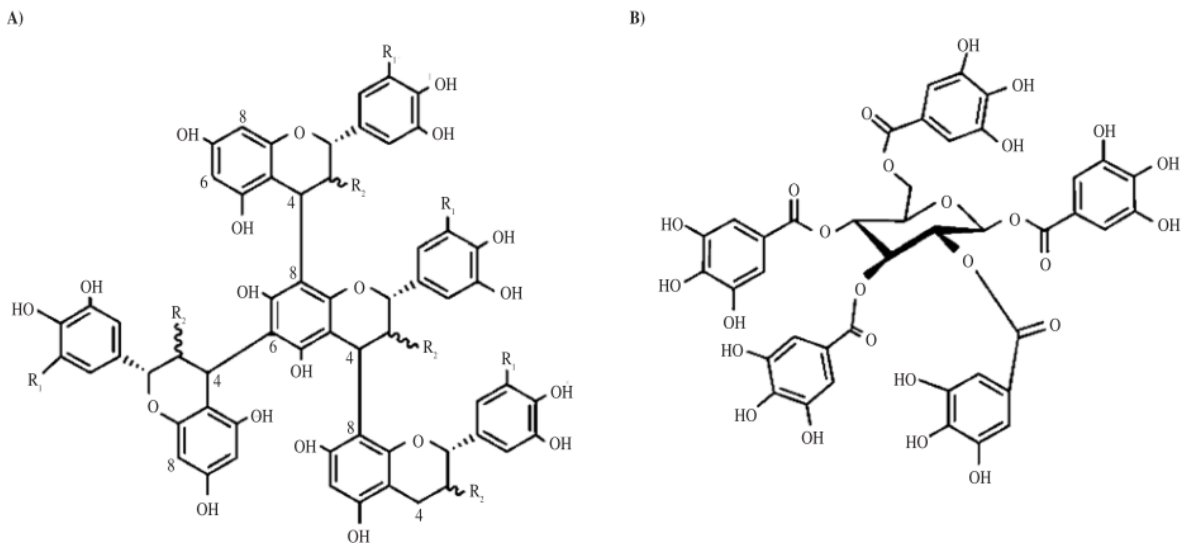
Los CPF son sustancias biológicamente activas y existen numerosas evidencias, epidemiológicas, estudios *in vitro*, estudios en modelos animales e intervenciones en humanos, que indican que estos compuestos proporcionan un beneficio al organismo en contra diversas enfermedades. Entre las propiedades benéficas de los CPF están la protección contra lesiones celulares y subcelulares, inhibición del crecimiento de tumores, activación de los sistemas de detoxificación hepáticos y bloqueo de las vías metabólicas que pueden ocasionar carcinogénesis.

La mayoría de los métodos *in vitro* han demostrado que los polifenoles son efectivos como antioxidantes, sin embargo se ha propuesto que, además de su capacidad antioxidante los compuestos polifenólicos deben poseer otros

mecanismos de acción que expliquen sus diversos efectos benéficos. Algunos de estos mecanismos complementarios incluyen regulación de la expresión de determinados genes, regulación de la inflamación, etc. (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

Clase	Estructura	Ejemplo	Clase	Estructura	Ejemplo
Fenoles simples	C <sub>6</sub>	 Catecol	Ácidos hidroxibenzoicos	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	 Ácido gálico
Ácidos fenilacéticos	C <sub>8</sub> -C <sub>1</sub>	 Ácido 2-hidroxi-fenilacético	Naftoquinonas	C <sub>8</sub> -C <sub>1</sub>	 Menadiona
Ácidos hidroxicinámicos	C <sub>8</sub> -C <sub>3</sub>	 Ácido caféico	Xantomas	C <sub>8</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	 Mangostina
Estibenos	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	 Resveratrol	Flavonoides	(C <sub>7</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>7</sub> )	 Quercetina

**Figura 10. Clasificación general de los compuestos fenólicos totales (CFT) (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).**



**Figura 11. Diferencias estructurales de taninos (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).**

### 5.1. Capacidad antioxidante.

Como se ha venido mencionando, los posibles efectos útiles para la salud de los CPF radican en su potencial antioxidante. Los fitoquímicos bioactivos neutralizan a las especies reactivas al oxígeno (ROS), responsables de la degradación de biomoléculas necesarias para el buen funcionamiento del organismo. La capacidad antioxidante evaluada *in vitro* puede usarse como un indicador indirecto de la actividad *in vivo*. La mayoría de los métodos para determinar capacidad antioxidante consisten en acelerar la oxidación en un sistema biológico.

La capacidad antioxidante de un producto está determinada por interacciones entre diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción. Por esto mismo, la determinación de la capacidad antioxidante de extractos complejos se lleva a cabo usualmente por diferentes métodos complementarios, que evalúen diversos mecanismos de acción. Algunos de los métodos más utilizados, por su simplicidad y reproducibilidad, son FRAP (Poder antioxidante reductor del hierro, por sus siglas en inglés), DPPH (depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ABTS (depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfónico). El método FRAP se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias

---

capaces de reducir el ion férrico al estado ferroso; en esta forma, el ion forma un complejo coloreado con el compuesto 2, 4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ). El método FRAP es, por tanto, un método que no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones. Por el contrario, los métodos ABTS y DPPH evalúan la capacidad de la muestra para neutralizar radicales libres modelo. El DPPH• es un radical libre estable soluble en metanol que es neutralizado mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno, principalmente; por otra parte, el ABTS•+ es generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobina) o electroquímica y su mecanismo de neutralización es principalmente por transferencia de electrones. En el método ABTS, también conocido en la literatura científica como el método TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox, por sus siglas en inglés) se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos; en cambio, el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares. Otra diferencia entre ambos métodos es que el radical ABTS•+ tiene la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

---

## 6. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS.

Compuestos presentes en los vegetales con propiedades funcionales o tecnológicas de gran importancia en las industrias farmacéuticas, cosmética y de alimentos. El mecanismo de acción de extracción de tales compuestos involucra dos fenómenos físicos: la difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto (Vinatoru, 2001).

### 6.1. Extracción por métodos tradicionales:

- Extracción por solventes. Se basan principalmente en la selección de solventes, temperatura o agitación, con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa (Gao & Liu, 1997)
- Extracción Soxhlet. El proceso se basa en la transferencia de los componentes parcialmente solubles de un sólido a la fase líquida utilizando un extractor Soxhlet (figura 12). El sólido se coloca en un dedal de papel de filtro que se coloca entonces en la cámara principal del extractor Soxhlet. El disolvente (calentado a reflujo) viaja a la cámara principal y los componentes parcialmente solubles se transfieren lentamente al disolvente (Royal Society of Chemistry).

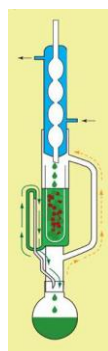


Figura 12. Equipo de extracción Soxhlet (Royal Society of Chemistry

<https://www.chemistryworld.com/opinion/classic-kit-soxhlet-extractor/1014879.article>)

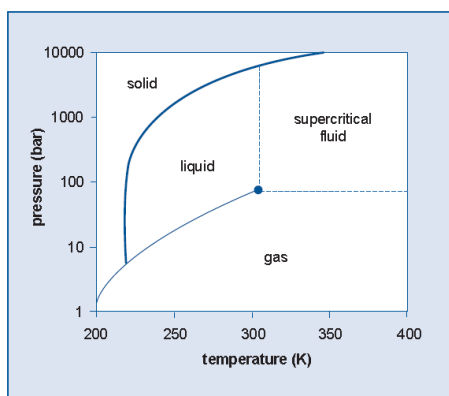
- 
- Destilación. La destilación significa que los materiales vegetales se mezclan (o no) con agua seguida por calentamiento o por la introducción de vapor de agua. Los vapores resultantes son enfriados y colectados en un separador y el aceite esencial se separa del agua.
  - Maceración. Es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción (Fernaroli's, 1975). Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura, caliente y frío.

## 6.2. Técnicas de extracción no convencionales:

- ✚ Extracción asistida por microondas. La irradiación de microondas causa movimiento molecular por la migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y materia vegetal.
- ✚ Extracción por fluidos supercríticos. Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico. Tiene una habilidad única para difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver materiales como un líquido, generando solvente de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial.

Se utilizan, principalmente, dióxido de carbono y agua (figura 13). Se puede realizar una extracción selectiva de diferentes compuestos utilizando distintas presiones del fluido supercrítico.





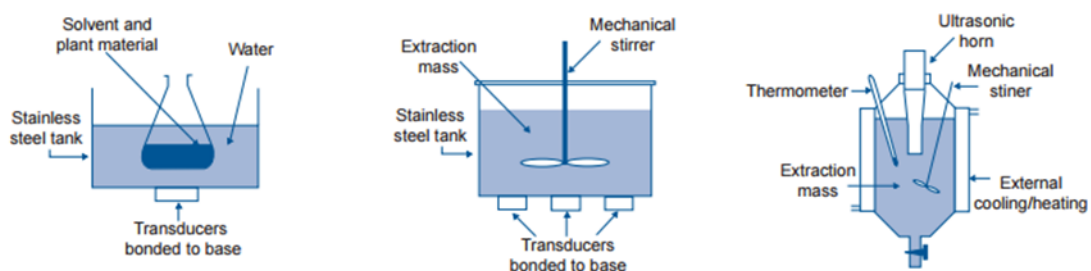
**Figura 13. Diagrama de fase del CO<sub>2</sub> (Azuola *et.al.*, 2007).**

- ✚ Extracción turbo. Utiliza un agitador de alta velocidad, que induce cavitación hidrodinámica, aumentando el rendimiento de extracción, ya que se aumenta el contacto entre el material vegetal, el solvente y el proceso de difusión a través de las paredes celulares se incrementa.
- ✚ Extracción eléctrica. Se aplican descargas eléctricas a la mezcla de extracción, incrementando la extracción hasta un 25% al formarse burbujas de cavitación.
- ✚ Extracción asistida por ultrasonido. La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal (figura 14). Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente. Según el Centro de Sonoquímica de la Universidad de Coventry en el Reino Unido, el ultrasonido es utilizado por la posibilidad de realizar evaluaciones no invasivas ni destructivas, y por ser fuente de energía (2006). Según este criterio, sus aplicaciones pueden dividirse en ultrasonido de señal y de potencia:
  - a) Ultrasonido de señal (100 KHz a 1 MHz). En el ultrasonido de señal, el producto modifica la señal, y esta proporciona información sobre dicho producto. Son utilizadas para monitorear un proceso o producto y son

---

señales de ultrasonido de baja intensidad. Ejemplos de sus aplicaciones en la industria alimentaria incluyen: medida del grosor del cascarn del huevo. Determinación de propiedades reológicas en quesos, etc.

- b) Ultrasonido de potencia (18-100 kHz). Utiliza señales de alta intensidad que se utilizan para modificar un proceso o un producto. Con una frecuencia más baja y mayor potencia producen cambios físicos y químicos en el medio a través de la generación y el subsecuente colapso de burbujas de cavitación, las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del líquido. Esto ocurre asimétricamente cerca de las interfaces y golpes sobre la superficie sólida. Se requiere de un medio líquido, un generador de energía y un transductor, el cual convierte energía eléctrica, magnética o cinética en energía acústica (Mulet *et. al.*, 2003). Algunos posibles usos del ultrasonido de potencia son: limpieza y desinfección, por remoción de contaminación biológica debido al colapso cavitacional cerca de la superficie, alcanzando puntos que difícilmente son cubiertos por métodos de limpieza convencionales; mezclado y emulsificación; la extracción, Vinatoru *et.al.* en 1997, demostró que la extracción por solvente de compuestos orgánicos en materiales vegetales es significativamente más eficiente utilizando el ultrasonido de potencia (Mason, 1999; Azuola *et.al.*, 2007).



**Figura 14. Equipos experimentales utilizados para la extracción por ultrasonido (Vinatoru, 2001)**

---

## 7. CROMATOGRAFÍA DE GASES.

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tasas de migración (IUPAC). La cromatografía puede ser clasificada por su utilidad y en base al material que se utilice como eluyente para separar los solutos. De acuerdo a su utilidad la cromatografía se clasifica en: analítica, utilizada para determinar los químicos presentes en una mezcla y en que concentración; y preparativa, utilizada para purificar grandes cantidades de químicos.

Mecanismos de la cromatografía.

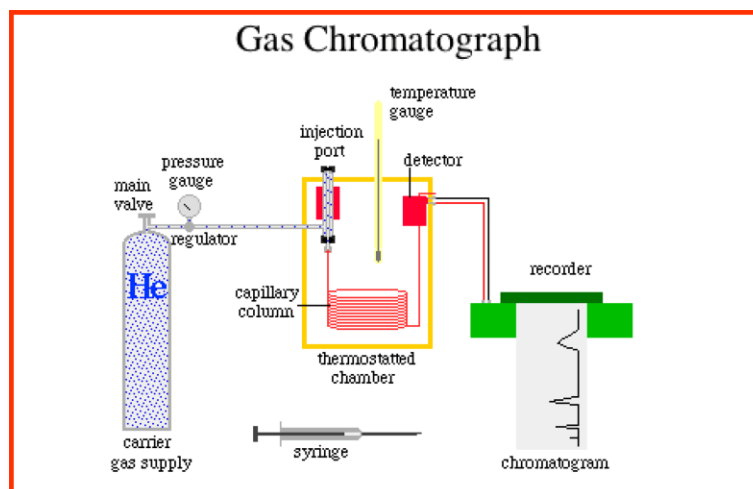
El movimiento de las sustancias durante la cromatografía es el resultado de dos fuerzas oponibles, la fuerza de manejo de la fase móvil y la fuerza resistente o acción de retardo del sorbente. La fuerza de manejo mueve las sustancias del origen de la columna en dirección del flujo de la fase móvil. La acción de retardo impide el movimiento de las sustancias arrastrándolas del flujo y adhiriéndolas al adsorbente. Las moléculas se encuentran alternando entre estar pegadas al adsorbente o despegadas en el flujo, esto da como consecuencia que pese a que el flujo es constante, solo una fracción de las moléculas se están moviendo. Las sustancias que se mueven más lentamente es porque están siendo unidas más fuertemente a la fase estacionaria, mientras que aquellas que se mueven más rápidamente es porque son menos solubles o de poca afinidad. La habilidad de tener una migración diferencial entre los componentes de la mezcla es el resultado de la selectividad del sistema cromatográfico. El flujo de la fase móvil no es selectivo en el sentido de que no afecta el movimiento de los solutos. Como parte del sistema cromatográfico, sin embargo, la fase móvil debe ser un poco selectiva para ayudar a la absorción de los solutos con la fase estacionaria. La fase estacionaria también juega un papel importante dentro del cromatograma debido a

---

su acción resistiva como una fuerza selectiva de la velocidad de flujo de los solutos.

La cromatografía de gases es una técnica analítica que puede ser utilizada para separar compuestos orgánicos basada en sus volatilidades. También provee información cualitativa y cuantitativa de los componentes presentes en una mezcla. Los componentes son separados por sus diferencias de partición entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria en la columna, permitiendo que sean separados en tiempo y espacio. Un cromatógrafo de gases consiste de (figura 15) (UNAM, 2004):

- Fase móvil.
- Puerto de inyección.
- Horno de la columna.
- Columnas
- Fase estacionaria.
- Detector.
- Sistema de registro de datos.



**Figura 15. Sistema de Cromatografía de gases. Fuente:**  
[http://www.rabfis15.uco.es/labquimica/tutorial/marco\\_inferior.htm](http://www.rabfis15.uco.es/labquimica/tutorial/marco_inferior.htm)

---

## 8. JUSTIFICACIÓN.

La Chía (*Salvia hispanica* L.) es un cultivo endémico Mexicano muy extendido en el Sureste del país. Esta especie ha sido utilizada tradicionalmente con fines religiosos, medicinales y con propósitos nutricionales por las antiguas culturas Mesoamericanas por miles de años (Ayerza, 2005a). Recientemente la semilla de la Chía ha adquirido notoria importancia para la salud y la nutrición humana por su contenido de ácidos grasos omega-3, los cuales promueven efectos beneficiosos para la salud (Ayerza, 2005b); así mismo algunos estudios han demostrado la buena estabilidad oxidativa de la semilla, la cual contiene ácido clorogénico, ácido cafeico y los flavonoides miricetina, quercetina y kaempferol (Taga *et al.*, 1984). Por otra parte, el cultivo de la chía se ve limitado dado que su cultivo se desarrolla adecuadamente en condiciones tropicales y subtropicales, no es tolerante al frío, la planta muere por enfriamiento antes de florecer, por lo que no produce semillas (Ayerza, 2005<sup>a</sup>; Murashige & Skoog, 1962). Por todo lo anterior el cultivo de tejidos vegetales sobresale como una alternativa importante, desde el punto de vista de la micropropagación de la especie, así como en la producción de los distintos metabolitos secundarios presentes en la misma.

Por ello el objetivo del presente trabajo fue generar un protocolo que permitiese establecer cultivos raíces adventicias de *Salvia hispanica*, potencialmente productores ácidos grasos omega-3 y de compuestos fenólicos.

---

## 9. OBJETIVOS.

### 9.1. OBJETIVO GENERAL.

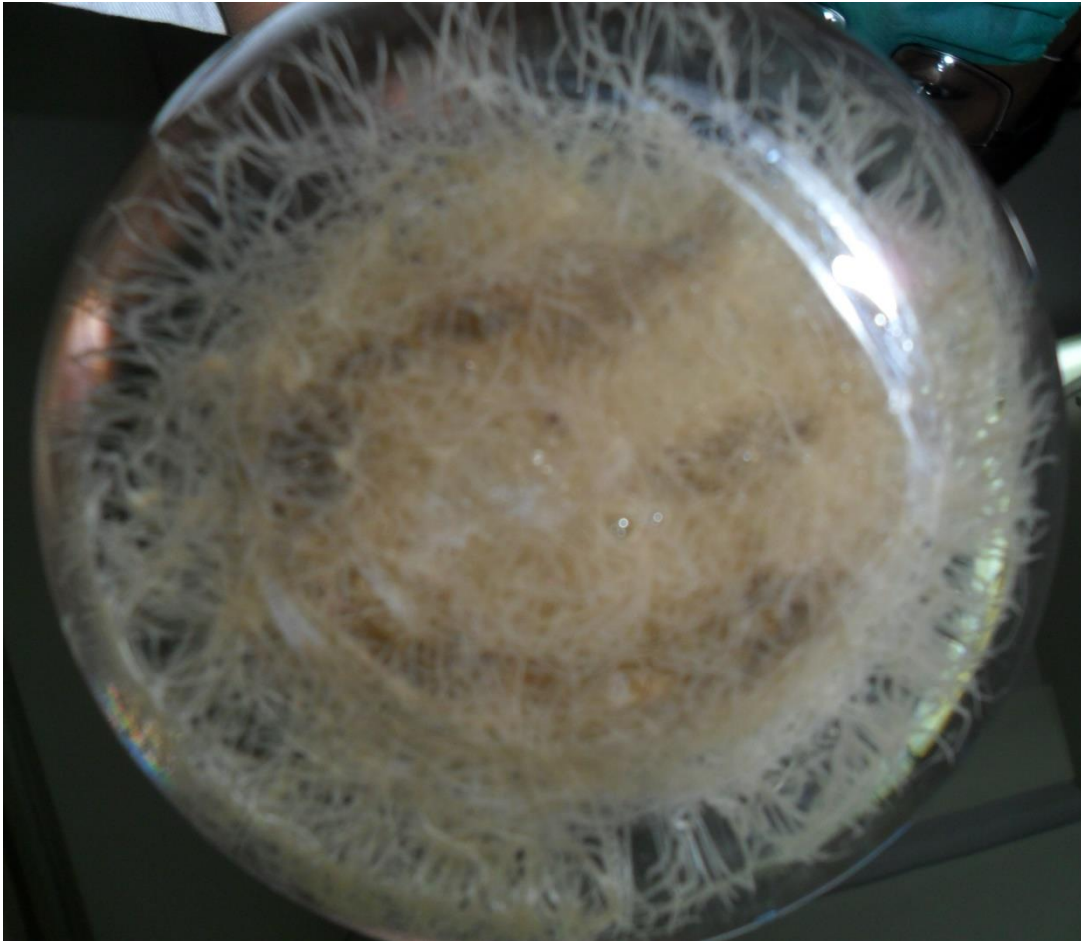
Establecer cultivos *in vitro* de raíces adventicias de *Salvia hispanica* (chía).

### 9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ❖ Inducir el fenómeno de rizógenesis en diferentes explantes de chía tomados de plántulas generadas *in vitro*.
- ❖ Establecer cultivos de raíces adventicias, tanto en medio sólido como en líquido.
- ❖ Evaluar la producción de ácidos grasos omega 3 en los cultivos de raíces generados.

---

## 10. HIPÓTESIS.



**Imagen 1. Raíces de *S. hispanica* en suspensión.**

Los cultivos de raíces de chía generados *in vitro*, retendrán la capacidad para producir ácidos omega 3, tal y como lo hace la planta completa a través de sus semillas (Imagen 1).

---

## 11. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 11.1. Diagrama general de la metodología.



#### 11.1.1. Material vegetal.

Para el establecimiento de los cultivos *in vitro* asépticos de plántulas se utilizaron semillas de *Salvia hispanica* L. de la marca comercial AGROBEC (Imagen 2), de las cuales se seleccionaron únicamente las semillas de color negro grisáceo, excluyendo todas aquellas que fueran blancas (Imagen 3).





Imagen 2. Semillas chía premium (AGROBECK).

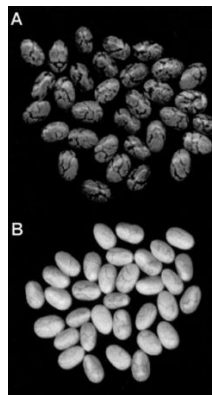


Imagen 3. A) Semillas oscuras de la planta madre. B) Semillas blancas de la planta madre (Cahill & Provance, 2002)

#### 11.1.2. Establecimiento del cultivo aséptico de plántulas.

Para facilitar el manejo de las semillas se introdujeron en sobres de papel filtro los cuales fueron sellados y posteriormente colocados en una solución jabonosa durante 5 minutos, y una vez transcurrido dicho tiempo se realizaron enjuagues

---

suficientes para eliminar la mayor parte de los restos de solución jabonosa. Subsecuentemente, bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, los sobres fueron sumergidos durante 30 segundos en una solución etanólica al 70% (v/v) y lavados con agua destilada estéril. Inmediatamente después, fueron sumergidos durante 10 minutos en una solución hipoclorito de sodio comercial al 10 % (v/v) en adición de 3 gotas de Tween-20 por cada 100 mL de solución preparada. En todas las soluciones se llevó a cabo una agitación moderada. Transcurridos los 10 min, se decantó la solución de cloro, seguida de tres enjuagues con agua destilada estéril con la finalidad de eliminar las trazas de los agentes desinfectantes que fueron empleados.

Ulteriormente los sobres fueron abiertos y colocados sobre cajas de petri estériles en las cuales se extrajeron las semillas para poder ser inoculadas sobre el medio de cultivo correspondiente (medio control o de inducción), para más tarde ser incubadas en una cámara de crecimiento para plantas a 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 h luz (fluorescente blanca) por un periodo de 2 semanas.

### **11.1.3. Porcentaje de germinación.**

La viabilidad de la semilla fue determinada mediante un ensayo de germinación, el que permite determinar el potencial máximo de germinación de las semillas. Este ensayo determina, en un determinado número de semillas, lo siguiente: la proporción de plántulas normales producidas, valor que indica el porcentaje de germinación (PG); la proporción de plántulas anormales, definidas como aquellas que no manifiestan capacidad para desarrollar una plántula normal bajo condiciones favorables y la proporción de semillas no germinadas (semillas duras, frescas y muertas) (Tucumán, 2009).

Tabla 7. Tratamientos usados para el ensayo de germinación.

Código del tratamiento	Reguladores del crecimiento vegetal (mg/L)				
	AIB	ANA	AIA	2,4-D	CIN
Control	-----	-----	-----	-----	-----
AIB1G	0.5	-----	-----	-----	-----
AIB2G	1	-----	-----	-----	-----
AIB3G	1.5	-----	-----	-----	-----
AIB4G	2	-----	-----	-----	-----
ANA1G	-----	0.5	-----	-----	-----
ANA2G	-----	1	-----	-----	-----
ANA3G	-----	1.5	-----	-----	-----
ANA4G	-----	2	-----	-----	-----
AIA1G	-----	-----	0.5	-----	-----
AIA2G	-----	-----	1	-----	-----
AIA3G	-----	-----	1.5	-----	-----
AIA4G	-----	-----	2	-----	-----
2D1G	-----	-----	-----	0.5	-----
2D2G	-----	-----	-----	1	-----
2D3G	-----	-----	-----	1.5	-----
2D4G	-----	-----	-----	2	-----
CIN1G	-----	-----	-----	-----	0.5

CIN2G	-----	-----	-----	-----	1
CIN3G	-----	-----	-----	-----	1.5
CIN4G	-----	-----	-----	-----	2
CD1G	-----	-----	-----	0.5	0.5
CD2G	-----	-----	-----	0.5	1
CD3G	-----	-----	-----	0.5	1.5
CD4G	-----	-----	-----	0.5	2
CD5G	-----	-----	-----	1	0.5
CD6G	-----	-----	-----	1	1
CD7G	-----	-----	-----	1	1.5
CD8G	-----	-----	-----	1	2
CD9G	-----	-----	-----	1.5	0.5
CD10G	-----	-----	-----	1.5	1
CD11G	-----	-----	-----	1.5	1.5
CD12G	-----	-----	-----	1.5	2
CD13G	-----	-----	-----	2	0.5
CD14G	-----	-----	-----	2	1
CD15G	-----	-----	-----	2	1.5
CD16G	-----	-----	-----	2	2

**Nota: 40 semillas por cada tratamiento. AIB, ácido 3-indolbutírico; ANA, ácido 1-naftalenacético; AIA, ácido 3-indolacético; 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; CIN, cinetina.**

---

#### **11.1.4. Medio de inducción de raíces adventicias y condiciones de incubación.**

El medio de cultivo basal utilizado fue el MS (Murashige & Skoog, 1962) al 100%, suplementado con sacarosa al 30 g/L, PVP (polivinilpirrolidona) al 300 mg/L, carbón activado al 1000 mg/L, ácido cítrico y ácido ascórbico al 150 mg/L., y agente gelificante Phytigel al 2.5 g/L.

Los tratamientos de inducción de raíces adventicias consistieron en la adición de diferentes combinaciones de diferentes reguladores del crecimiento vegetal: una citocinina, CIN (cinetina); y las auxinas AIA (ácido 3-indolacético), ANA (ácido 1-naftalenacético), AIB (ácido 3-indolbutírico) y 2,4-D (2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético) a la formulación del medio basal.

Los explantes a utilizar (hipocótilos y primeras hojas) fueron tomados de plántulas desarrolladas *in vitro* a partir de semillas, posteriormente los explantes se inocularon en medios de cultivo de inducción y de control, fueron incubados durante 4 semanas a 25°C bajo un fotoperiodo de 16 h luz (fluorescente blanca). Para finalmente realizar el registro de los tratamientos que indujeron la formación de raíces adventicias, expresado como un porcentaje con respecto al total de explantes empleados por tratamiento.

**Tabla 8. Tratamientos usados para la inducción de raíces adventicias.**

Código del tratamiento	Reguladores del crecimiento vegetal (mg/L)				
	AIB	ANA	AIA	2,4-D	CIN
Control	-----	-----	-----	-----	-----
AIB1R	0.5	-----	-----	-----	-----
AIB2R	1	-----	-----	-----	-----
AIB3R	1.5	-----	-----	-----	-----
AIB4R	2	-----	-----	-----	-----
ANA1R	-----	0.5	-----	-----	-----
ANA2R	-----	1	-----	-----	-----
ANA3R	-----	1.5	-----	-----	-----
ANA4R	-----	2	-----	-----	-----
AIA1R	-----	-----	0.5	-----	-----
AIA2R	-----	-----	1	-----	-----
AIA3R	-----	-----	1.5	-----	-----
AIA4R	-----	-----	2	-----	-----
2D1R	-----	-----	-----	0.5	-----
2D2R	-----	-----	-----	1	-----
2D3R	-----	-----	-----	1.5	-----
2D4R	-----	-----	-----	2	-----
CIN1R	-----	-----	-----	-----	0.5
CIN2R	-----	-----	-----	-----	1

CIN3R	-----	-----	-----	-----	1.5
CIN4R	-----	-----	-----	-----	2
CD1R	-----	-----	-----	0.5	0.5
CD2R	-----	-----	-----	0.5	1
CD3R	-----	-----	-----	0.5	1.5
CD4R	-----	-----	-----	0.5	2
CD5R	-----	-----	-----	1	0.5
CD6R	-----	-----	-----	1	1
CD7R	-----	-----	-----	1	1.5
CD8R	-----	-----	-----	1	2
CD9R	-----	-----	-----	1.5	0.5
CD10R	-----	-----	-----	1.5	1
CD11R	-----	-----	-----	1.5	1.5
CD12R	-----	-----	-----	1.5	2
CD13R	-----	-----	-----	2	0.5
CD14R	-----	-----	-----	2	1
CD15R	-----	-----	-----	2	1.5
CD16R	-----	-----	-----	2	2

**Nota: 16 de explantes de tallo u hoja por tratamiento. AIB, ácido 3-indolbutírico; ANA, ácido 1-naftalenacético; AIA, ácido 3-indolacético; 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; CIN, cinetina.**

---

### 11.1.5. Establecimiento de cultivos en suspensión de raíz.

Se seleccionaron los tratamientos que indujeron los más altos porcentajes de raíces adventicias en los cultivos semisólidos, con la finalidad de “garantizar el establecimiento de los cultivos en suspensión; primero transfiriéndose la biomasa (raíces de plántulas generadas *in vitro* de 4 semanas de crecimiento) a matraces de bola con fondo plano de 500 mL con 100 mL de medio de inducción fresco y después colocados en un agitador orbital a 110 rpm e incubados a 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 h luz. Los cultivos fueron subcultivados cada 4 semanas, con tres diferentes propósitos: 1) conservar la línea celular, 2) multiplicación de la biomasa y 3) “estabilidad de los cultivos”.

### 11.2. Determinación de cinéticas de crecimiento.

Una vez transcurridos varios ciclos de subcultivo se procedió a la realización de las cinéticas de crecimiento. Para tal fin se estableció un lote de cultivos, en el que se utilizaron matraces de bola de fondo plano de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio líquido fresco (medio MS (Murashige & Skoog)) suplementado con 2 mg/L de AIB). El inóculo para cada matraz consistió en 2g de raíces en peso fresco (PF) (provenientes de matraces de 500 mL incubados por 30 días). Los cultivos fueron incubados 31 días bajo las condiciones de agitación e incubación descritas anteriormente. Durante los 31 días de incubación, se tomaron muestras cada 3 días. Cada una de las muestras colectadas se sometió al siguiente proceso: cada punto de medición consistió en la obtención del peso fresco (realizando una filtración al vacío de los cultivos en suspensión), y el peso seco una vez que la biomasa filtrada fuera liofilizada, esto con la finalidad de tener los datos pertinentes para poder realizar los cálculos necesarios y poder obtener los parámetros de la cinética de crecimiento, velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), y el tiempo de duplicación (Td): la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de raíces adventicias se define como (Jeong *et al.*, 2006):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$



---

Donde X es el peso de la raíz adventicia (g / L), t es el tiempo (día) y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) ( $\text{día}^{-1}$ ). El tiempo de duplicación ( $T_d$ ) de las raíces adventicias se define como  $T_d = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$  (Jeong *et al.*, 2006).

### **11.2.1. Obtención de los extractos.**

Las raíces generadas fueron cosechadas, y liofilizadas (durante 36 horas) y sometidas a una extracción acuosa asistida por ultrasonido (Corona *et.al.*, 2016):

- 1) Pesar y pulverizar 100 mg de la biomasa liofilizada y aforar a un volumen final de 10 mL con metanol en un tubo para centrifuga.
- 2) Homogeneizar en Vórtex.
- 3) Colocar en agitación constante en agitador orbital a 150 rpm, 37 °C por 90 minutos.
- 4) Colocar dicha mezcla en un baño ultrasónico (frecuencia 53 kHz, potencia 75 W, 40 minutos, temperatura 40°C).
- 5) Al término de la extracción asistida con ultrasonido, se dejó enfriar la mezcla aproximadamente por 70 minutos.
- 6) Finalmente se procedió a microfiltrar el extracto, desechándose los sólidos. El extracto líquido se almacenó en frascos de vidrio color ámbar y se refrigeró a 4°C.

**Nota: Procedimiento basado con modificaciones en metodología de Corona *et.al.* 2016.**

### **11.3. Extracción de grasas.**

#### **11.3.1. Extracto etéreo**

Se utilizó el método Soxhlet de acuerdo a la NMX-F-615-NORMEX-2004. Mediante la extracción continua con éter de petróleo. Se utilizaron 2g de muestra (raíces producidas en cultivos en suspensión) previamente liofilizada.

Procedimiento:

1. Se utilizaron guantes de látex durante todo el procedimiento y los vasos del equipo se manipularon con pinzas.

- 
2. Los 4 vasos del equipo soxtherm, se pusieron a peso constante (con 2 piedras de ebullición cada uno) por 1h/100°C
  3. Posteriormente se enfriaron hasta temperatura ambiente en el desecador por 30 minutos, y se pesaron registrando el peso con cuatro cifras decimales (P1).
  4. La biomasa liofilizada fue molida por 20 segundos.
  5. Se pesaron 2g de muestra (PM) por triplicado en los cartuchos de extracción y sobre ésta se colocó un poco de fibra de vidrio.
  6. Los cartuchos se colocaron sobre su base para ambos introducirlos en los vasos del equipo.
  7. Se agregó a cada vaso 110mL de éter de petróleo, de tal manera que el solvente cubriera la muestra por fuera.
  8. Se colocaron los cuatro vasos en el equipo soxtherm, Este se encendió: en el equipo de reflujo/extracción conectar el software, se encendió la computadora y se abrió el programa soxtherm manager. El programa se utilizó a las siguientes condiciones:

- T-Clasificación = 200°C
- Temperatura de Extracción= 170°C
- Intervalo de reducción = 1min 30s
- Pulso de reducción = 4s
- Extracción caliente = 1h 30 min
- Evaporación A = 3 x Intervalo
- Tiempo de Extracción = 1h 0 min
- Evaporación B = 2.0 x Intervalo
- Evaporación C = 1 min
- Duración del programa = 2h 38 min

- I. Se encendió el refrigerante y se programó a 10°C

- 
- II. El programa se inició y se dejó correr, verificando constantemente que éste no se detuviera.
  - III. Terminando el proceso, los vasos secos de éter y con la grasa de la muestra, se retiraron utilizando pinzas o guantes
  - IV. Se trasladaron 15min. a la estufa para evaporar el éter remanente, después se enfriaron hasta temperatura ambiente en el desecador por 1 hora
  - V. Se pesó cada vaso con la grasa de la muestra, y el peso se registró con cuatro cifras decimales (P2).

### *Cálculos*

El % de grasa en las muestras se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de grasa} = \frac{(P2 - P1)}{PM} \times 100$$

En donde:

P1= Peso del vaso a peso constante

P2=Peso del vaso con grasa

PM= Peso de la muestra

## **11.4. Determinación de la composición de ácidos grasos.**

### **11.4.1. Esterificación de aceite**

Reacción de Saponificación

- ✚ Se colocaron 100µL de aceite, en tubos de ensaye de 15 cm de longitud x 2 cm de diámetro exterior
- ✚ Se agregó a cada tubo 2 mL de una solución de NaOH en metanol 0.5N, se calentaron los tubos en baño María a 70°C durante 15 minutos para formar una pasta blanca jabonosa.

Reacción de esterificación

- ✚ Se agregó a cada tubo 2mL de una solución al 5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en metanol
- ✚ Se calentaron nuevamente en baño María 70°C/15 min para formar los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG).

- 
- ✚ Se adicionó a cada tubo 2mL de agua para neutralizar los reactivos y finalmente se agregó 1mL de hexano para solubilizar los EMAG.

#### **11.4.2. Cromatografía de gases**

Se trasvasó con pipetas Pasteur, 1mL de los EMAG (con hexano) de cada tubo a viales con capacidad de 2mL

Dichas muestras, se analizaron mediante cromatografía de gases/ espectrometría de masas. Se utilizó un Cromatógrafo de gases (7890) acoplado a un Espectrómetro de masas (5977A) y una columna DB WAX de 30 m de longitud, con diámetro interior de 250  $\mu\text{m}$  con espesor de 0.25  $\mu\text{m}$ .

Procedimiento:

- ✚ Inyección automática de la muestra (1.0 $\mu\text{L}$ )
- ✚ Modo de entrada Split
- ✚ Temperatura de análisis 150°C Temperatura inicial – 235°C Temperatura final. Con una duración en el análisis de aprox. 34 minutos por muestra
- ✚ Registro de tiempo de retención, % de área relativa y certeza comparativa (identificación de compuestos).

#### **11.5. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.**

La determinación de Fenoles Totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu descrita por Trejo (2010) con algunas modificaciones utilizando como patrón una solución de ácido Gálico 0.1mg/mL.

Preparar las siguientes soluciones:

- Solución patrón de ácido gálico 0.1mg/mL
  - 1) Pesar 0.005g de ácido gálico
  - 2) Disolver en 1 mL de etanol
  - 3) Aforar a 50mL con agua destilada.

- 
- Carbonato de sodio anhidro 20% p/v
    - 1) Pesar 20g de carbonato de sodio anhidro
    - 2) Disolverlo en 80mL de agua destilada hirviendo
    - 3) Enfriar a temperatura ambiente
    - 4) Dejar reposar 24 horas
    - 5) Filtrar la solución
    - 6) Aforar a 100mL con agua destilada.

Procedimiento de la curva patrón (ver anexo de [curvas patrón](#)):

- 1) 1.- Adicionar en tubos de ensaye la solución de ácido gálico, el agua destilada y el reactivo de Folin-Ciocalteu, homogeneizar y dejar reposar 8 min en oscuridad.
- 2) 2.- Después, agregar la solución de carbonato de sodio, el agua destilada y homogeneizar.
- 3) 3.- Dejar reposar 30 min a 40°C
- 4) 4.- Leer absorbancia a 765nm

Procedimiento para la determinación en la muestra/extracto

- 1) Adicionar en tubos de ensaye 200µL del extracto obtenido y 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, homogeneizar y dejar reposar 8 min en oscuridad.
- 2) Después, agregar 200 µL de la solución de carbonato de sodio, 1500 µL agua destilada y homogeneizar.
- 3) Dejar reposar 30 min a 40°C
- 4) Leer absorbancia a 765nm

---

## 11.6. Capacidad antioxidante

### 11.6.1. DPPH

La determinación de capacidad antioxidante se realizó por el método de DPPH descrito por Brad-Williams y col. (1995) con modificaciones. Se preparó una solución metanólica de DPPH a una concentración de 0.1 mM. Se pesaron 0.0025 g de reactivo DPPH y se disolvieron en 100 mL de metanol, la solución se mantuvo protegida de la luz hasta su utilización.

En tubos de ensaye se colocaron 100  $\mu$ L de la solución TROLOX a las diferentes concentraciones (ver anexo de [curvas patrón](#)) y se agregaron 3.9 mL de la solución DPPH 0.1 mM, se homogenizaron y se dejaron en reposo por 30 min en oscuridad. La absorbancia se midió a 515 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS). Como blanco se utilizó metanol.

Para la determinación en las muestras, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L del extracto obtenido y se realizó el mismo procedimiento que para los puntos de la curva.

$$\%Inhibición = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

*Ab, Absorbancia del blanco; Am, Absorbancia de la muestra.*

### 11.6.2. ABTS

Se siguió la metodología descrita por López-Martínez y col. (2010) con modificaciones. Se preparó una solución stock de ABTS 7 mM en metanol (mantener protegida de la luz) y una solución de persulfato de potasio 140 mM en agua destilada, de estas soluciones se tomaron 5 mL y 88  $\mu$ L respectivamente, para hacer una nueva mezcla, la cual se almacenó en un frasco ámbar y se dejó reposar en refrigeración durante 12 horas como mínimo. Pasado ese tiempo se midió la absorbancia y se hicieron diluciones en metanol hasta obtener una absorbancia de 0.740 a 734 nm.

---

En tubos de ensaye se colocaron 100 µL de cada solución de TROLOX (ver anexo de [curvas patrón](#)) por separado y 3 mL de la solución ABTS (con absorbancia 0.74) se homogenizaron y se mantuvieron en oscuridad por 10 minutos, la absorbancia se midió a 734 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific-Genesis 10S UV-VIS) calibrado con metanol.

Como blanco se utilizó la solución de ABTS (con absorbancia de 0.74 en reposo por 10 minutos).

Para la determinación en las muestras, se tomó una alícuota de 100 µL del extracto obtenido y se realizó el mismo procedimiento que para los puntos de la curva.

Se determinó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente formula:

$$\%Inhibición = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

*Ab*, Absorbancia del blanco (absorbancia del testigo (ABTS)); *Am*, Absorbancia de la muestra.

---

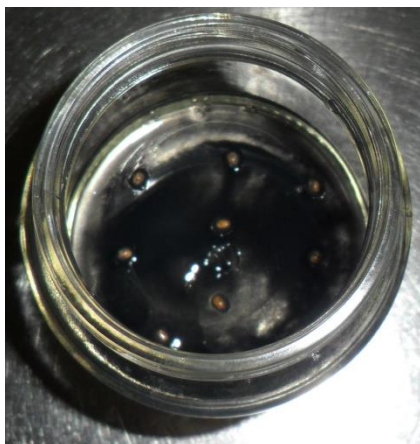
## 12.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 12.1. Establecimiento del cultivo aséptico de plántulas.

Partiendo de semillas como fuente de explante y utilizando el método de asepsia descrito en la metodología se establecieron cultivos asépticos de plántulas de *S. hispanica* los cuales tuvieron contaminación casi nula (menores al 10%), coincidiendo con los resultados obtenidos por Marconi *et.al.* (2015) cuyo método conlleva la desinfección superficial de las semillas por inmersión durante 20 segundos en etanol, seguido de un tratamiento durante 5-10 minutos con una solución de hipoclorito de sodio (4% de cloruro activo) más 0.1% de Triton X-100, seguido de lavados con agua destilada hasta la eliminación completa del agente esterilizante.(Marconi *et al.*, 2015).

### 12.2. Porcentaje de germinación.

Se evaluó el efecto de los diferentes reguladores del crecimiento vegetal (RCV) sobre la germinación de las semillas (Imagen 4), obteniendo los resultados que se muestra en la tabla 9.



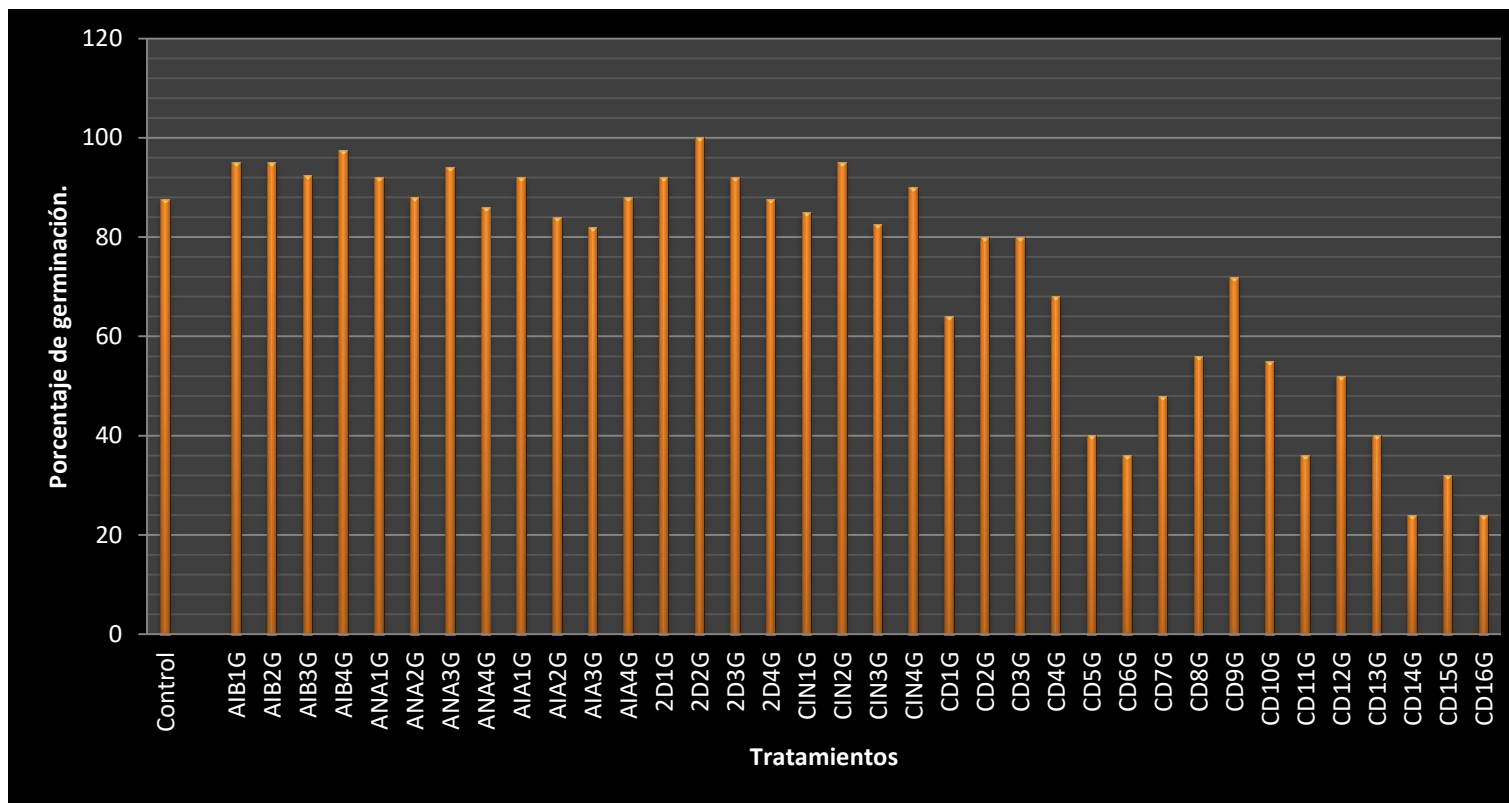
**Imagen 4. Semillas de *S. hispanica* inoculadas en medio MS.**



Tabla 9. Porcentajes de germinación de las semillas de *Salvia hispanica* L.

Código-del-tratamiento	Porcentajes-de-germinación
Control	87.5
AIB1G	95
AIB2G	95
AIB3G	92.5
AIB4G	97.5
ANA1G	92
ANA2G	88
ANA3G	94
ANA4G	86
AIA1G	92
AIA2G	84
AIA3G	82
AIA4G	88
2D1G	92
2D2G	100
2D3G	92
2D4G	87.5
CIN1G	85
CIN2G	95
CIN3G	82.5
CIN4G	90
CD1G	64
CD2G	80
CD3G	80
CD4G	68
CD5G	40
CD6G	36
CD7G	48
CD8G	56
CD9G	72
CD10G	55
CD11G	36
CD12G	52
CD13G	40
CD14G	24
CD15G	32
CD16G	24

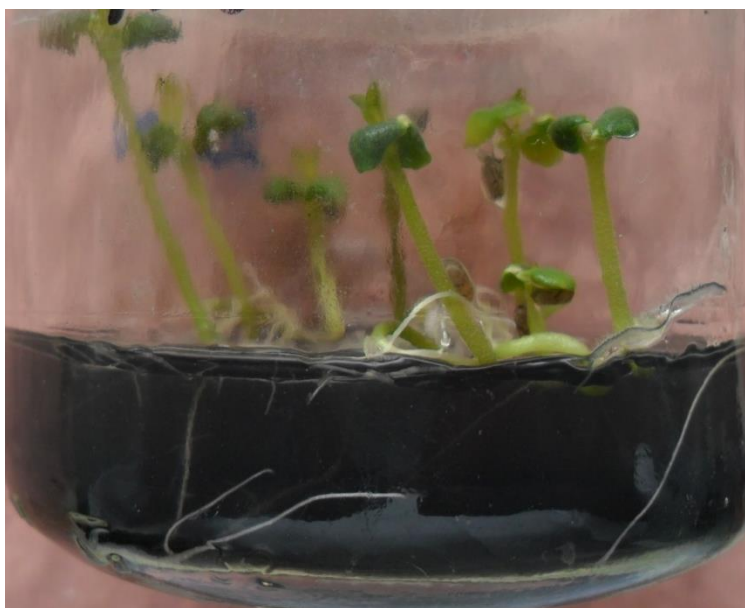
Nota: 40 semillas por cada tratamiento. Ver tratamientos en [tabla 7](#).



**Gráfica 1. Porcentaje de germinación de los diferentes tratamientos.**

---

El porcentaje de germinación para los tratamientos en los que se usaron los RCV de manera individual tuvieron valores de porcentaje que fueron en un intervalo de un porcentaje mínimo de 82% (para el tratamiento con código AIA3G) a un máximo del 100 % (para el tratamiento con código 2D2G), que en comparación con el control que fue del 87.5% (Imagen 5) no presenta una gran variación; además de que no se notaron diferencias en las características de las plántulas, tales como su talla, color y morfología (grosor de tallo, longitud de raíz, tamaño de hojas, etc). Mientras que para los tratamientos de la combinación de los RCV CIN (cinetina) y 2, 4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (tratamientos de la tabla 9 que van en orden descendente del código CD1G al código CD16G) los porcentajes tanto como las características de las plántulas son más variables (encontrando una relación de la disminución del tamaño de las plántulas con la disminución de la germinación); partiendo de un valor mínimo de 24% de germinación (para los tratamientos con código CD14G y CD16G) a un máximo de 80% (para los tratamientos con código CD2G y CD3G) (Gráfica 1).



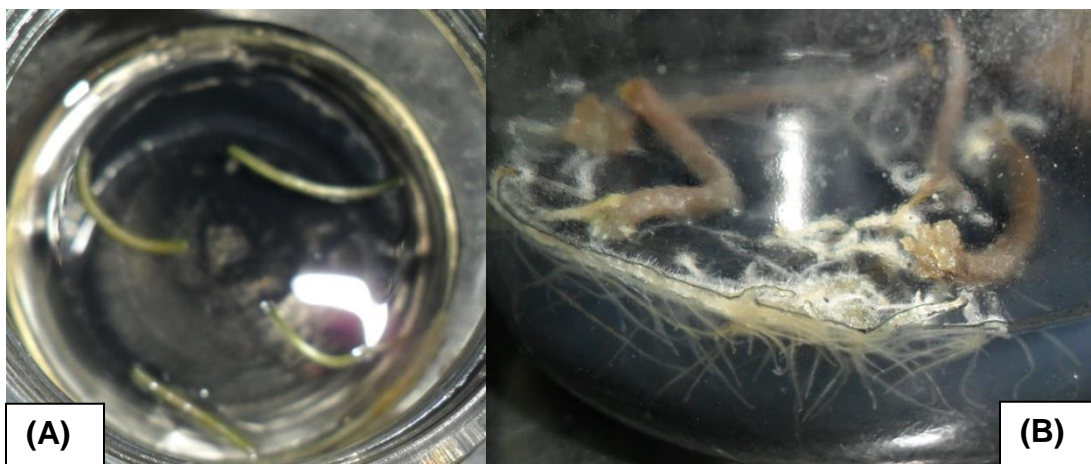
**Imagen 5. Plántulas de *S. hispanica* de dos semanas de desarrollo en medio MS control.**

---

### 12.3. Inducción de raíces adventicias.

Todos los tratamientos indujeron la formación de raíces adventicias en los explantes de tallo (obtenidos de plántulas de dos semanas de desarrollo). Sin embargo las características fenotípicas de las raíces adventicias no fueron las mismas para todos los tratamientos.

Siendo los tratamientos que tuvieron un porcentaje de inducción de raíces adventicias (para explantes de tallo) mayor al 90% los de código AIB3R (93.75%), AIB4R (93.75%), 2D1R (95%), 2D2R (100%), 2D4R (100%), CIN1R (100%), CIN2R (100%), CIN3R (100%), CIN4R (100%). Sin embargo, el tratamiento que mejores características fenotípicas (raíz fue pilosa, blanca, y larga) tuvo fue el de código AIB4R (Imagen 6), lo cual concuerda con lo reportado por Arikat *et.al.* (2004), que informaron un alto porcentaje de enraizamiento en *S. fruticosa* cultivada en medio MS (Murashige & Skoog) con 2.7  $\mu$ M de ácido indol-3-butírico (AIB) (Para este estudio, se indujo la rizogénesis directa de los brotes en el mismo medio de cultivo) (Arikat *et al.*, 2004).



**Imagen 6. (A) Explantes de tallo de *S. hispanica*; (B) Raíces adventicias formadas en explante de tallo (tratamiento AIB4R).**

**Tabla 10. Porcentajes de inducción de raíces adventicias en explantes de tallo y hoja.**

Código del tratamiento	% de inducción de raíces adventicias.		% de inducción de callo.	
	Explante.		Explante.	
	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja
Control	100	50	12.5	25
AIB1R	31.25	6.25	0	12.5
AIB2R	81.25	18.75	0	50
AIB3R	93.75	6.25	18.75	6.25
AIB4R	93.75	50	6.25	12.5
ANA1R	85	10	0	0
ANA2R	70	0	0	0
ANA3R	75	30	5	20
ANA4R	85	0	0	10
AIA1R	80	0	10	0
AIA2R	70	30	10	50
AIA3R	85	40	10	0
AIA4R	0	0	100	60
2D1R	95	70	90	30
2D2R	100	70	5	40
2D3R	80	30	5	0
2D4R	100	40	0	20
CIN1R	100	43.75	18.75	6.25
CIN2R	100	56.25	43.75	12.5
CIN3R	100	18.75	6.25	18.75

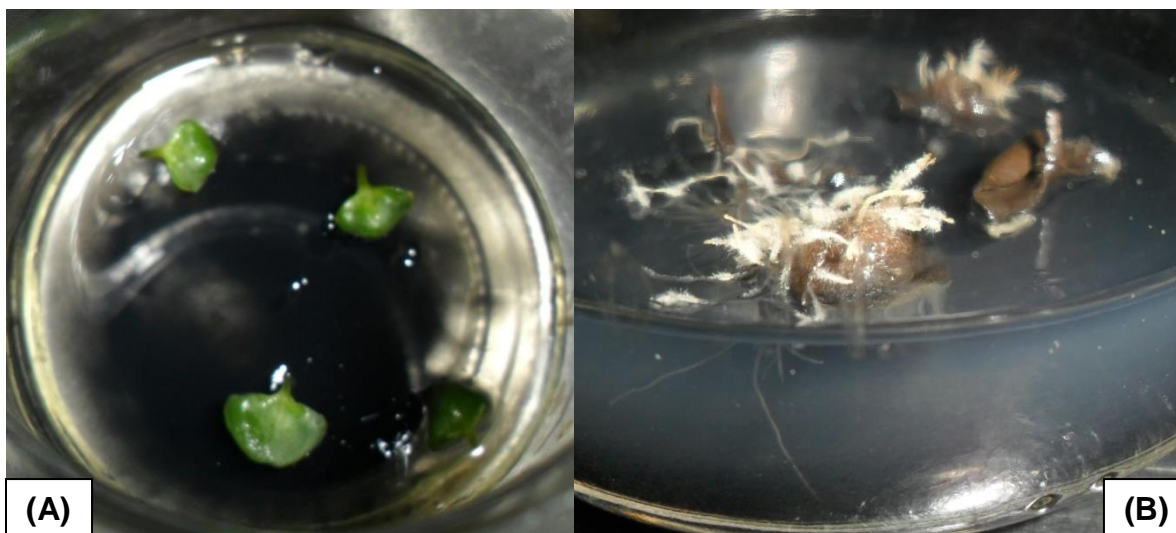
---

CIN4R	100	43.75	0	6.25
CD1R	50	ND	50	ND
CD2R	70	ND	0	ND
CD3R	50	ND	0	ND
CD4R	55	ND	0	ND
CD5R	70	ND	0	ND
CD6R	50	ND	8.33	ND
CD7R	81.82	ND	0	ND
CD8R	50	ND	0	ND
CD9R	66.67	ND	6.67	ND
CD10R		ND	ND	ND
CD11R	81.82	ND	ND	ND
CD12R	50	ND	0	ND
CD13R	72.73	ND	0	ND
CD14R	ND	ND	ND	ND
CD15R	ND	ND	ND	ND
CD16R	ND	ND	ND	ND

**AIB, ácido 3-indolbutírico; ANA, ácido 1-naftalenacético; AIA, ácido 3-indolacético; 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; CIN, cinetina. Nota. Para cada tratamiento se usaron como explantes los tallos y hojas generadas *in vitro*, utilizándose 16 explantes por tratamiento (hoja o tallo). Ver tratamientos en [tabla 8](#).**

---

También se indujo formación de raíces adventicias en los explantes de hoja en casi todos los tratamientos de los distintos reguladores del crecimiento vegetal (RCV), más sin embargo sus características fenotípicas no fueron las óptimas; obteniendo raíces blancas, y pilosas pero de muy corta longitud (Imagen 7).



**Imagen 7. (A) Explantes de hoja de *S. hispanica*; (B) Raíces adventicias formadas en explante hoja (tratamiento AIB4R).**

#### **11.5. Cultivos raíces en suspensión.**

El tratamiento elegido por lo discutido anteriormente fue el AIB4R (AIB al 2 mg/L). Una porción de raíces generadas en los medio de cultivo semisólidos (Imagen 8) fue transferido a medios de cultivo líquido, esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de las raíces en suspensión (Imagen 9), todo esto con la finalidad de generar biomasa en cantidades importantes y de esta forma obtener suficiente material para realizar diversos análisis fitoquímicos posteriores.





**Imagen 8. Raíces generadas en los medio de cultivo semisólidos.**



**Imagen 9. Iniciación y establecimiento de cultivos de raíces de *S. hispanica*.**

**(A) Raíz proveniente de cultivos semisólidos de 4 semanas de crecimiento;**

**(B) Crecimiento de la raíz en medio líquido.**

#### **12.4. Cinética de crecimiento.**

Una vez establecidos los cultivos en suspensión de la biomasa (raíces) se procedió a realizar la cinética de crecimiento y se caracterizó su patrón de producción compuestos fenólicos (Gráfica 2).

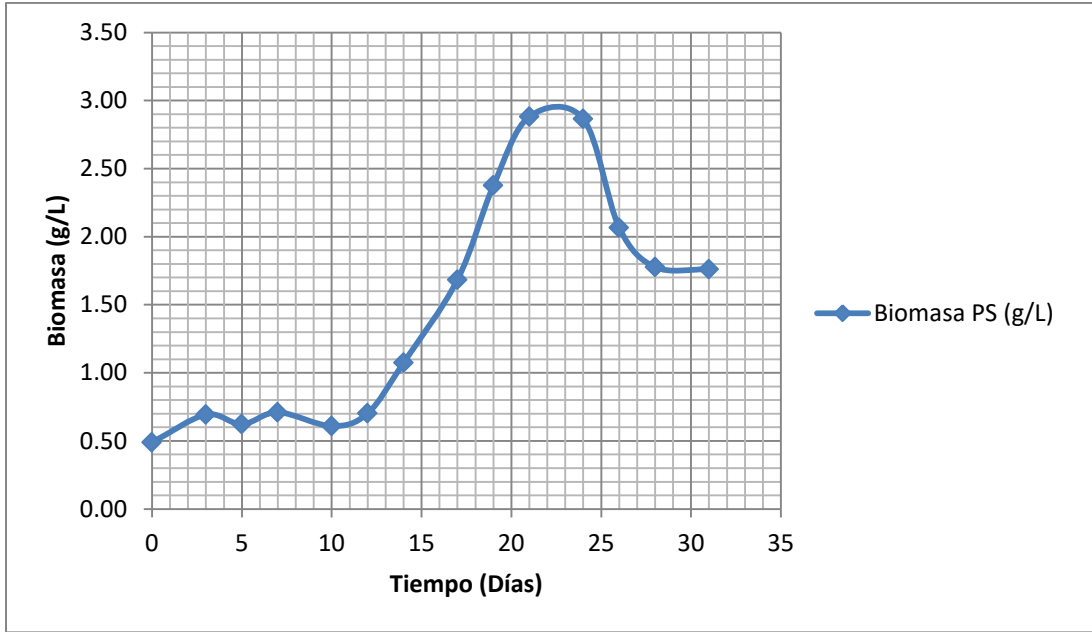
Se observó un patrón típico de crecimiento. Observándose una fase de latencia de 7 días, con una consiguiente fase de crecimiento exponencial (días 10 a 21 de cultivo) se obtuvo una máxima concentración de biomasa (BM) de 2.88 g PS/L (tabla 11.) después de 21 días de cultivo (Gráfica 2). Mientras que tasa de duplicación fue de 4.6 días y la velocidad específica de crecimiento alcanzada fue de 0.1507 días<sup>-1</sup> (Gráfica 3).



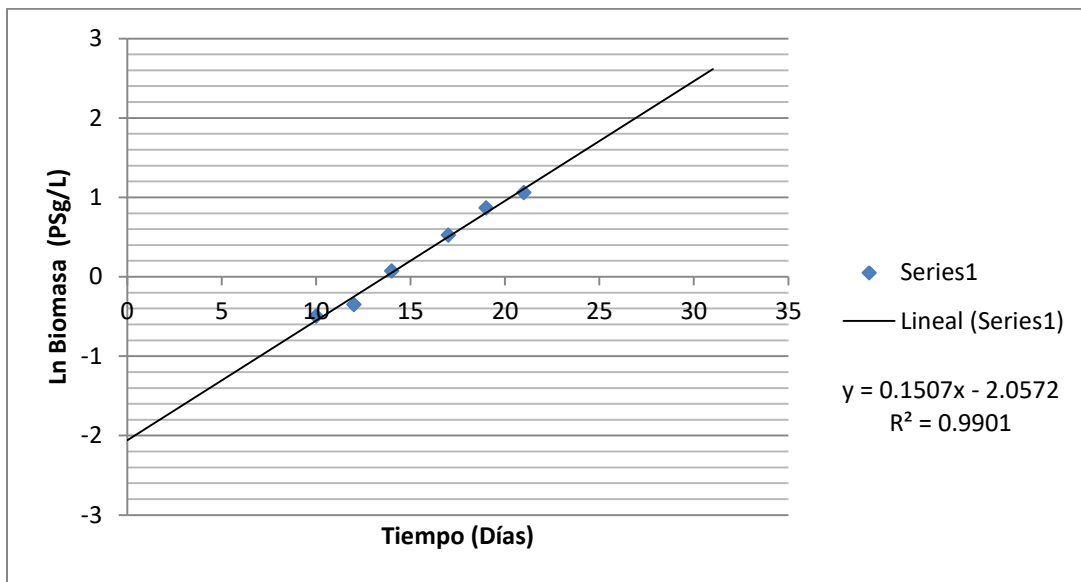
**Tabla 11. Resultados de la cinética de crecimiento (Código de tratamiento AIB4R-2 mg/L de AIB).**

<b>Tiempo (Días).</b>	<b>Biomasa PF (g/L)</b>	<b>Biomasa PS (g/L)</b>	<b>CFT (mg EAG/g PS)</b>
0	7.49	0.49	20.55
3	6.13	0.69	20.94
5	5.62	0.62	20.67
7	6.03	0.71	18.92
10	6.29	0.61	21.52
12	5.67	0.70	12.81
14	10.08	1.08	15.44
17	21.47	1.68	15.32
19	25.97	2.38	11.44
21	32.87	2.88	11.82
24	31.72	2.86	12.15
26	25.21	2.07	13.19
28	17.08	1.78	10.21
31	17.06	1.76	6.69

PF, peso fresco; PS, peso seco; CFT, compuestos fenólicos totales; EAG, equivalentes de ácido gálico. Nota: El explante utilizado provino de raíces cultivadas en suspensión.



**Gráfica 2. Cinética de crecimiento. PS, peso seco.**

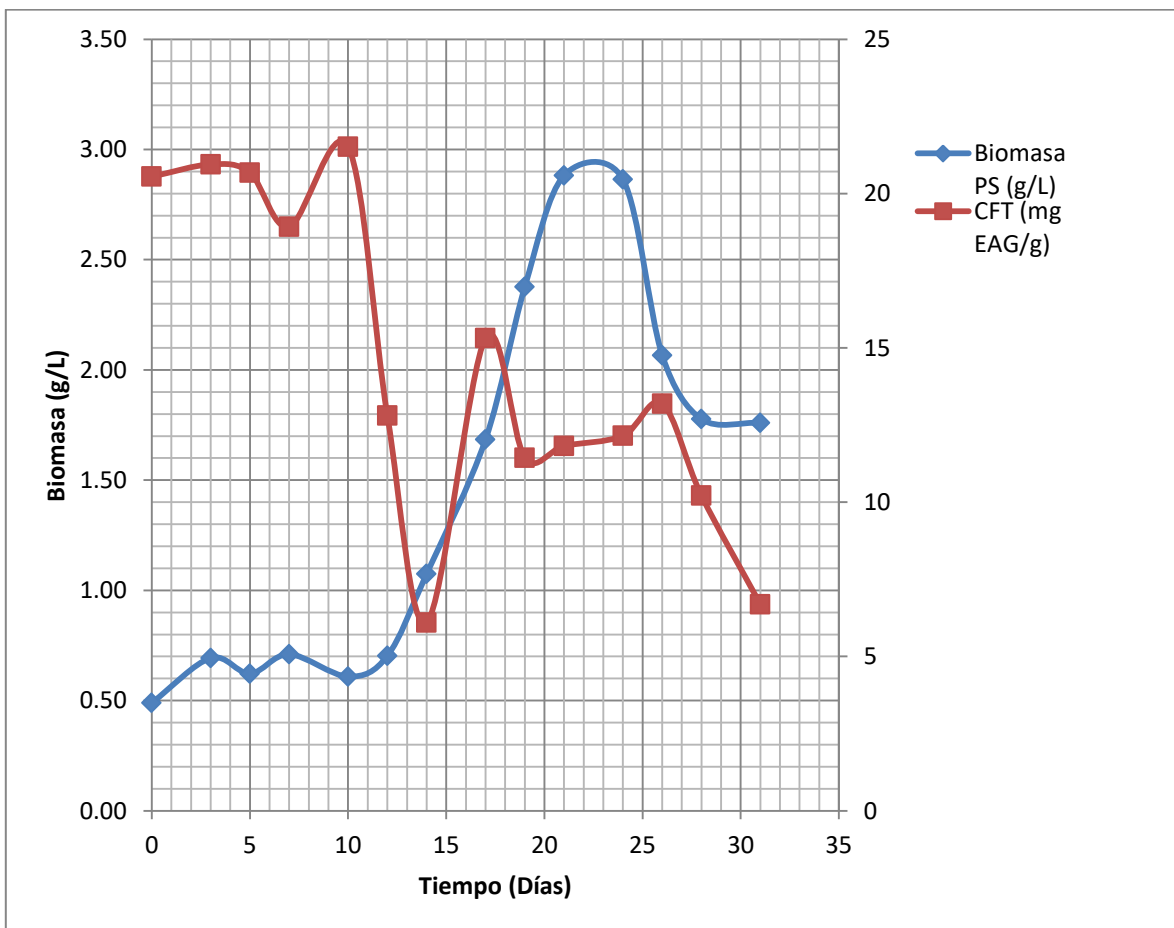


$$\mu = 0.1507 \text{d}^{-1}; T_d = \ln(2) / 0.1507 \text{d}^{-1} = 4.6 \text{d}$$

**Gráfica 3. Velocidad de crecimiento. PS, peso seco;  $\mu$ , velocidad específica de crecimiento;  $T_d$ , tiempo de duplicación.**

### 12.5. Contenido de fenoles.

Al evaluar el contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos de cada uno de los puntos de la cinética de crecimiento. Los extractos de los puntos de cultivo que fueron del día 0 al día 10 correspondientes a la fase de latencia de la cinética mostraron los mayores valores en contenido de compuestos fenólicos: 20.55 (día 0), 20.94 (día 3), 20.67 (día 5), 18.92 (día 7), y 21.52 (día 10) expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa en peso seco (mg EAG/g PS), con respecto al resto de los otros extractos evaluados pertenecientes a las otras fases de la cinética (fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte) (Gráfica 4).



**Gráfica 4. Producción de CFT (mg EAG/g) vs. Tiempo (días). CFT, compuestos fenólicos totales; EAG, equivalentes de ácido gálico.**

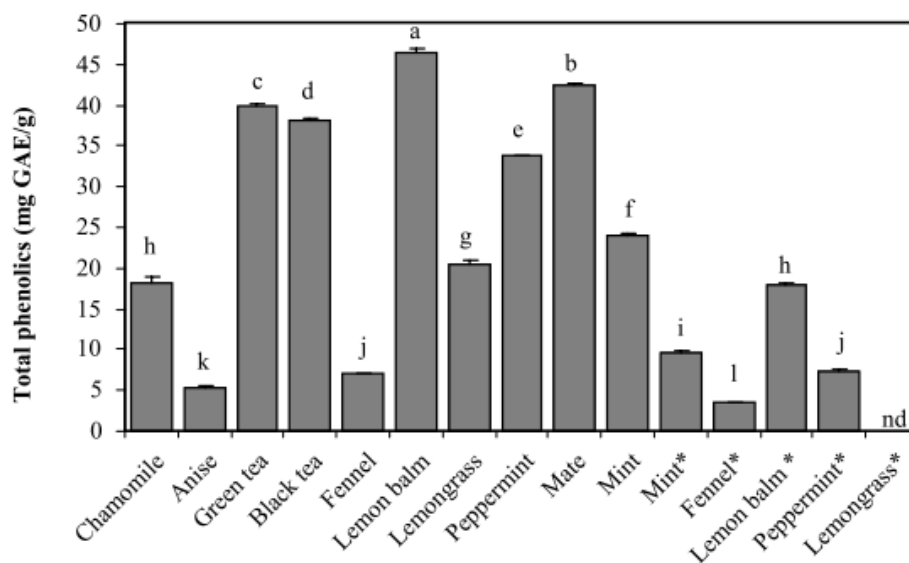
La cantidad de CFT obtenidos en los cultivos de raíces son comparables y entran en el rango con el contenido de fenoles totales reportado por Morales de Souza & col. en 2008 para tés procesados e infusiones herbarias consumidas en Brasil (tabla 12), cuyos valores variaron desde N.D. hasta  $46.46 \pm 0,44$  EAG mg/g (Morales de Souza & Col., 2008).

**Tabla 12. Muestras examinadas.**

Nombre común.	Nombre científico.	Familia.	Parte utilizada.
Hinojo	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Apiaceae	Fruto
Anís	<i>Pimpinella anisum</i> L.	Apiaceae	Fruto
Mate	<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Aquifoliaceae	Hojas y tallos
Manzanilla	<i>Matricaria recutita</i> L.	Asteraceae	Cabeza de flor
Bálsamo de limón	<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	Hojas y ramas
Menta	<i>Mentha arvensis</i> L.	Lamiaceae	Hojas y ramas
Hierbabuena	<i>Mentha x piperita</i> L.	Lamiaceae	Hojas y ramas
Hierba de limón	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	Poaceae	Hojas
Té verde	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	Theaceae	Hojas y tallos
Té negro	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze Family	Theaceae	Hojas y tallos

**Fuente:(Morales de Souza & Col., 2008).**

Entre los tés procesados, el bálsamo de limón, el mate, el té verde, el té negro, y la hierbabuena mostraron los mayores contenidos de compuestos fenólicos (> 30 mg/g de hierba), en magnitudes decrecientes del primero al quinto (Imagen 10) (Morales de Souza & Col., 2008).



**Imagen 10. Contenido total de los compuestos fenólicos de las infusiones.**

**Fuente: (Morales de Souza & Col., 2008).**

### 12.6. Ácidos grasos.

Los resultados de la extracción de grasas totales por el método de soxhlet (tabla 13), indican que tanto los cultivos de callo así como los de raíces produjeron una cantidad pequeña de grasas (1.5% de grasas totales) en comparación con la contenida en las semillas (40% de grasas totales) (Busilacchi *et al.*, 2013).

**Tabla 13. % de grasas totales (aceite) en raíz de Chía.**

Muestra	% de grasas totales (aceite)
Raíz.	1.5
Semilla.	40 (Busilacchi <i>et al.</i> , 2013)

Debido al bajo porcentaje de ácidos grasos podría pensarse que estos podrían pertenecer únicamente a los lípidos propios de la célula vegetal (membranas celulares y organelos), sin embargo, la elaboración de la cromatografía de gases confirmó que la biomasa si retuvo la capacidad biosintetizar los ácidos grasos (tabla 14), ya que su composición es similar a la reportada por Ayerza en 1995

---

para la aceite de semilla cuyos principales componentes son el ácido linoleico (17-26%) y el ácido linolénico (50-57%) (Ayerza, 1995) .

**Tabla 14. % (promedio de los ésteres de ácido graso) contenido en el aceite.**

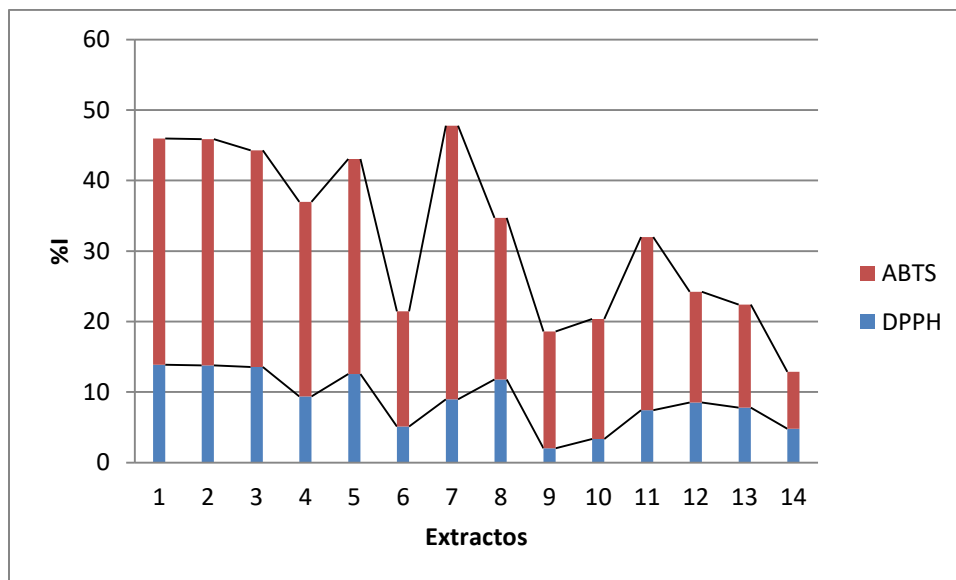
<b>Éster de ácido graso</b>	<b>% (promedio) de contenido en el aceite</b>
<b>Ácido palmítico (16:0)</b>	21.8
<b>Ácido oleico (18:1)</b>	4.05
<b>Ácido linoleico (18:2)</b>	12.26
<b>Ácido <math>\alpha</math>-linolénico (18:3)</b>	56.67
<b>Ácido esteárico (20:0)</b>	5.19

### **12.7. Capacidad antioxidante.**

Se observó una actividad antioxidante de un porcentaje de inhibición de DPPH máximo de 13.85% y de un mínimo de 2%, y un porcentaje de inhibición de ABTS máximo de 38.83% y de un mínimo del 8.06 % (tabla 15), porcentajes que son comparables con los reportados por Mercado-Mercado *et al.* en 2013, los cuales son de 2.43-69.26% para la técnica de ABTS, y 4.72-47.58% para la técnica de DPPH.

**Tabla 15. Resultados de la actividad antioxidante.**

Códigos de los extractos.	Tiempo (Días).	Técnica.	
		DPPH	ABTS
		% de inhibición	% de inhibición
1	0	13.85	32.09
2	3	13.76	32.09
3	5	13.54	30.74
4	7	9.39	27.57
5	10	12.57	30.47
6	12	5.10	16.35
7	14	8.95	38.83
8	17	11.78	22.91
9	19	2.00	16.60
10	21	3.33	17.01
11	24	7.40	24.59
12	26	8.53	15.70
13	28	7.80	14.60
14	31	4.81	8.06



**Gráfica 5. Extractos vs %I de DPPH y ABTS**

La actividad antioxidante es de gran importancia debido a que el alto grado de insaturación del aceite podría resultar en una rápida auto-oxidación si el aceite no está protegido adecuadamente (Gráfica 5) (Taga *et.al*, 1984).



---

### 13. CONCLUSIONES.

- ✚ Se establecieron cultivos asépticos de *Salvia hispanica* a partir de semillas.
- ✚ Se establecieron cultivos de raíces adventicias.
- ✚ Los cultivos de raíces de *S. hispanica* mantuvieron su capacidad de sintetizar ácidos grasos y compuestos fenólicos, tal y como lo hacen las semillas de dicha especie.
- ✚ La producción de compuestos fenólicos totales fue asociada al crecimiento, alcanzando su producción más alta (de 21.52 mgEAG/g) cuando el cultivo se encontraba en la etapa de latencia.
- ✚ El establecimiento exitoso de los cultivos de raíces de *S. hispanica* en suspensión proporciona una valiosa fuente de producción de ácidos grasos de tipo Omega 3, así como también de compuestos fenólicos.

---

## 14.PERSPECTIVAS.

- ✚ Las concentraciones obtenidas por los cultivos de raíces en suspensión podrían ser potenciadas mediante la aplicación de factores estresantes (elicitores), o bien por el empleo de la ingeniería genética mediante el control de la ruta de biosíntesis de los metabolitos secundarios deseados.
- ✚ La técnica de transformación de raíces (“Hairy roots”) puede representar un sistema adecuado para la producción de los metabolitos secundarios de interés.

---

## 15. REFERENCIAS.

Actual versión modificada de: Barrueto Cid, L., Machado, A., Carvalheira, S. y Brasileiro, A. 1999. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56:17-23.

Agro, I., 2015. *Biotecnología Vegetal ( texto básico biotecnología en español )*,

Alfonso, J. et al., 2008. Redalyc. Caracterización morfológica de chía (*Salvia hispanica*). , 31, pp.105–113.

Arias, M. et al., 2009. Engineering aspect of the in vitro plant cell culture for the production of secondary metabolites. *Dyna*, (157), pp.109–121. Available at: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0012-73532009000100011](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532009000100011).

Ayerza, R. & Coates, W. 2005. Chia Rediscovering a Forgotten Crop of the Aztecs. Pp. 215. Tucson, AZ, USA: The University of Arizona Press.

Ayerza, R. y Coates, W., 2006, Chía. Redescubriendo un olvidado alimento de los aztecas. Buenos Aires, Editorial Nuevo Extremo S. A.

Ayerza, R., 1995. Oil content and fatty acid composition of Chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(9), pp.1079–1081.

Azcón-Bieto, J. et al., 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal* 1st ed.,

Azuola, R. & Vargas Aguilar, P., 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, 20(4), p.1. Available at: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4835781&info=resumen&idioma=SPA>.

Baque, M.A. et al., 2012. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*, 30(6), pp.1255–1267. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011001960>.

- 
- Bolivar & Col., 2003. *Recomendaciones para el desarrollo de la Biotecnología en México*, Conacyt, Academia Mexicana de Ciencias, México
- Brad-Williams W., Cuveller ME., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenswissenschaften – Food Science and Technology*. 25-30.
- Bueno, M. et al., 2010a. Análisis de la calidad de los frutos de salvia hispanica L. (Lamiaceae) comercializados en la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 9(July), pp.221–227.
- Bueno, M. et al., 2010b. Análisis de la calidad de los frutos de salvia hispanica L. (Lamiaceae) comercializados en la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 9, pp.221–227.
- Busilacchi, H. et al., 2013. EVALUACIÓN DE Salvia hispanica L . CULTIVADA EN EL SUR DE SANTA FE ( REPÚBLICA ARGENTINA ) Evaluation of Salvia hispanica L . cultivated in the south of Santa Fe ( Argentina ). *Cultivos Tropicales*, 34(4), pp.55–59.
- Cahill, J.P., 2003. Ethnobotany joseph p. cahill of chia,. *Economic Botany*.
- Cahill J P (2004) Genetic diversity among varieties of chia (Salvia hispánica L.). *Gen. Res. Crop Evol.* 51:773-781.
- Cahill, J.P. & Provance, M.C., 2002. Genetics of qualitative traits in domesticated chia (Salvia hispanica L.). *The Journal of heredity*, 93(1), pp.52–55.
- Calva, G. & Pérez, J., 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), pp.1–16.  
Available at:  
<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm%5CnResumen%5Cnhttp://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r102683.PD>
-

---

F.

Carrero, J.J. et al., 2005. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutrición Hospitalaria*, 20, pp.63–69.

Corona-Jiménez Edith, Martínez-Navarrete Nuria, Ruiz-Espinosa Héctor, C.-C.J., 2016. Ultrasound-assisted extraction of phenolics compounds from chia (. , pp.403–412.

Duque, P.J., 2010, Biotecnología panorámica de un sector, Netbiblo, España

Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America

Echenique, V., Rubinstein, C. & Mroginski, L., 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. , pp.229–238.

El-Gewely, M.R., 1995. Biotechnology annual review. , I, p.497. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161>.

Gamborg, O.L., Miller, R. a. & Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), pp.151–158.

Haque M S, K K Ghoshal (1981) Floral biology and breeding system in the genus *Salvia* L. Proc. Indian Nat. Sci. Acad. B47:716-724.

Hernández-Gómez, J., 2008. Cruzamiento natural de chia (*Salvia hispanica* L.). *Revista Chapingo*. ..., 14(3), pp.331–337. Available at: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1027-152X2008000300015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1027-152X2008000300015&script=sci_arttext).

<http://www.abc.es/Media/201312/03/beneficios-semillas-chia--644x362.jpg>

<http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema1/1-7raiz.htm>

<http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/24/imagenes/f1a3r24.jpg>

[http://semanaeconomica.com/transformandotalento/wp-content/uploads/sites/58/2015/11/kguk.jg\\_.kjgb\\_.png](http://semanaeconomica.com/transformandotalento/wp-content/uploads/sites/58/2015/11/kguk.jg_.kjgb_.png)

---

<http://slideplayer.es/slide/109242/>

Jamboonsri, W. et al., 2012. Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L.-a new  $\omega$ 3 source. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(2), pp.171–178.

Jaramillo, Y., 2013. La chía (*salvia hispanica* L.), una fuente de nutrientes para el desarrollo de alimentos saludables. , pp.1–43.

Jeong, C.-S. et al., 2006. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), pp.252–263.  
Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X05002445>.

Kumar, K.-H.N. • A. & Imani, J., 2009. *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology*,

López-Martínez L.X., García-Galindo H.S. 2010. Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano. *Nova Scientia Revista de Investigación de la Universidad De La Salle Bajío*. Vol. 2. No. 3. Versión On-line

Marconi, P., Scientific, N. & Scientific, A.N., 2015. In vitro establishment of *Salvia hispanica* L . plants and callus. , (August).

Mercado-Mercado, G. et al., 2013. [Polyphenolic compounds and antioxidant capacity of typically consumed species in Mexico]. *Nutrición hospitalaria*, 28(1), pp.36–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23808428>.

Mohd Ali, N. et al., 2012. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, pp.1–10.

Morales de Souza, R.A; Oldoni, T.L.C.; Regitano d'Arce, M.A.B.; Alencar, S.M., 2008. ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOSITION OF HERBAL INFUSIONS CONSUMED IN BRAZIL. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 6(1), pp.41–47.

- 
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15, pp.473–497. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/full>.
- NMX-F-615-NORMEX-2004. Determinación de extracto etéreo en alimentos. Método Soxhlet.
- OECD, 2009. OECD Biotechnology Statistics 2009. *Statistics*, p.103. Available at: [http://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/oecd-biotechnology-statistics-2009\\_9789264073937-en](http://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/oecd-biotechnology-statistics-2009_9789264073937-en).
- Ramachandra Rao, S. & Ravishankar, G. a., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), pp.101–153.
- Royal Society of Chemistry <https://www.chemistryworld.com/opinion/classic-kit-soxhlet-extractor/1014879.article>
- SAGARPA, 2014, <http://www.oeidrus-jalisco.gob.mx/agricultura/chia/?id=Generalidades#Generalidades>
- Smetanska, I., 2008. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111(July), pp.187–228.
- Taga, M.S., Miller, E.E. & Pratt, D.E., 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), pp.928–931.
- Trautwein, E., 2001. n-3 Fatty acids — physiological and technical aspects for their use in food. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(1), pp.45–55. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/1438-9312%28200101%29103%3A1%3C45%3A%3AAID-EJLT45%3E3.0.CO%3B2-9>.
- Trejo Márquez Ma. A., Pascual Bustamante S. 2010. Taller Multidisciplinario de

---

Procesos Tecnológicos de Frutos y Hortalizas. Práctica 4 Evaluación de capacidad antioxidante y determinación de fenoles totales para frutos. 10-11

Tucumán, L., 2009. Metodología alternativa para evaluar la calidad de la semilla de chía ( *Salvia* , 33(Figura 1), pp.44–46.

UNAM, 2004,

[http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf)

Valenzuela B, R. et al., 2011. Ácidos Grasos Omega-3 (Epa Y Dha) Y Su Aplicación En Diversas Situaciones Clínicas. *Revista chilena de nutrición*, 38(3), pp.356–367.

Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), pp.303–313.

Yadav, R.K. et al., 2013. Plant Organogenesis. *Plant Organogenesis: Methods and Potocols, Methods in Molecular Biology*, 959(2), pp.235–245. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-221-6>.



---

## 16. ANEXOS.

### Anexo 1. Preparación del medio de cultivo MS

Soluciones Stock concentradas (X) de los componentes del medio de cultivo MS al 100%:

Componente	Composición en el medio MS (1X)	Stock : Concentración
<b>Macronutrientes (mg/L)</b>		
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>1650</b>	<b>16500 (16.5)</b>
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	<b>332.22</b>	<b>3322 (3.322)</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	<b>370</b>	<b>3700 (3.7)</b>
<b>KNO<sub>3</sub></b>	<b>1900</b>	<b>19000 (19)</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>170</b>	<b>1700 (1.7)</b>
Volumen de aforo 1000mL		
<b>Fe-EDTA (mg/L)</b>		
<b>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	<b>27.8</b>	<b>556 (0.556)</b>
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	<b>37.3</b>	<b>746 (0.746)</b>
Volumen de aforo 100 mL		
<b>Micronutrientes (mg/L)</b>		
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	<b>6.2</b>	<b>620 (0.620)</b>
<b>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.025</b>	<b>2.5 (0.0025)</b>
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.025</b>	<b>2.5 (0.0025)</b>
<b>MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	<b>16.9</b>	<b>1690 (1.69)</b>
<b>KI</b>	<b>0.83</b>	<b>83 (0.083)</b>
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.25</b>	<b>25 (0.025)</b>
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	<b>8.6</b>	<b>860 (0.860)</b>
Volumen de aforo 100 mL		
<b>Orgánicos (mg/L)</b>		
<b>Mio-inositol</b>	<b>100</b>	<b>10000 (10)</b>
<b>Glicina</b>	<b>2.0</b>	<b>200 (0.2)</b>
<b>Ácido nicotínico</b>	<b>0.5</b>	<b>50 (0.05)</b>
<b>Piridoxina.HCl</b>	<b>0.5</b>	<b>50 (0.05)</b>
<b>Tiamina.HCl</b>	<b>0.1</b>	<b>10 (0.01)</b>
Volumen de aforo 100 mL		

Fuente: (Murashige & Skoog 1962)

---

---

---

### **Preparación de soluciones Stock concentradas de los RCV.**

Se prepararon las soluciones Stock concentradas (100 mg/L) de los RCV: AIB, ANA, AIA, 2,4-D y CIN. Se pesaron 10 mg de cada RCV, se disolvieron con 1 mL de solución NaOH 1 N para el caso de los RCV AIB, ANA, AIA y CIN; y 1 mL de EtOH para el 2, 4-D. Finalmente se adicionó agua para obtener un aforo de 100 mL de solución.

### **Medio basal.**

Por cada litro de medio de cultivo MS al 100% se adicionaron los siguientes volúmenes de las soluciones stock previamente preparadas:

<b>Solución stock</b>	<b>Volumen de la solución stock para preparar 1 L de medio MS al 100%</b>
<b>Stock Macronutrientes</b> 1000mL/10X	<b>100 mL/1X</b>
<b>Stock Micronutrientes</b> 100mL/100X	<b>1 mL/1X</b>
<b>Stock Fe-EDTA</b> 100mL/20X	<b>5 mL/1X</b>
<b>Stock Orgánicos</b> 100mL/100X	<b>1 mL /1X</b>

**Fuente: (Murashige & Skoog 1962)**

- 1) Se agregaron 30 g de sacarosa hasta su disolución.
- 2) Se adicionaron 150 mg de ácido cítrico.
- 3) Se adicionaron 150 mg de ácido ascórbico.
- 4) Se adicionaron 300 mg de PVP.
- 5) Se aforó a un volumen final de 1 L.
- 6) Se ajustó el valor de pH del medio de cultivo a 5.7-5.8 mediante la adición de soluciones de NaOH 1N óHCl 1N.

- 
- 7) Se adicionaron 1000 mg de carbón activado hasta completa disolución.
  - 8) Se adicionaron 2.5 g de Phytigel para obtener medio de cultivo sólido, dejándose hervir por 1 min.
  - 9) Se vertieron 25 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio traslucidos, mismos que fueron tapados una vez enfriado el medio de cultivo.
  - 10) Una vez enfriado el medio de cultivo y tapado se procedió a su esterilización por calor húmedo.

### **Medios de inducción.**

- I. Se adicionaron a los componentes del medio basal (puntos 1) al 3)) los volúmenes correspondientes de las soluciones stock de RCV para obtener los tratamientos de inducción (1 L de medio de cultivo):
- II. Una vez adicionados las respectivas alícuotas de RCV, se continuó el procedimiento descrito desde el punto 5.

### **Medios líquidos**

Para la obtención de medios líquidos, de los puntos indicados previamente (2 y 3) se omitió la adición tanto de Phytigel como de carbón activado, y posteriormente se procedió a vaciar en matraces de bola con fondo plano (de 250, 125 ó 500 mL), mismos que fueron cubiertos con tapas de aluminio y esterilizados por calor húmedo.

### **Esterilización por calor húmedo.**

El material conteniendo el medio de cultivo (sólido o líquido) fue esterilizado en un periodo de tiempo de 15 a 20 min a una temperatura de 121 °C y a una presión de 15 psi.

Anexo 2. Elementos esenciales en la mayoría de las plantas, formas de absorción y concentraciones que se consideran adecuadas (las formas preferentes de absorción se resaltan en negrita).

Elemento Símbolo químico	Formas de absorción	Peso atómico	Concentración en peso seco			N.º relativo átomos respecto al Mo	
			$\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{Kg}}$ (ppm)	%		
Molibdeno	Mo	$\text{MoO}_4^{2-}$	95.95	0.001	0.1	—	1
Níquel	Ni	$\text{Ni}^{2+}$	58.70	~0.001	~0.1	—	1
Cobre	Cu	$\text{Cu}^+$ , <b><math>\text{Cu}^{2+}</math></b>	63.54	0.10	6	—	100
Zinc	Zn	$\text{Zn}^{2+}$	65.38	0.30	20	—	300
Manganeso	Mn	$\text{Mn}^{2+}$	54.94	1.0	50	—	1000
Hierro	Fe	$\text{Fe}^{3+}$ , <b><math>\text{Fe}^{2+}</math></b>	55.85	2.0	100	—	2000
Boro	B	$\text{H}_3\text{BO}_3$	10.82	2.0	20	—	2000
Cloro	Cl	$\text{Cl}^-$	35.46	3.0	100	—	3000
Azufre	S	$\text{SO}_4^{2-}$	32.07	30	—	0.1	30000
Fósforo	P	<b><math>\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}</math></b> , $\text{HPO}_4^-$	30.98	60	—	0.2	60000
Magnesio	Mg	$\text{Mg}^{2+}$	24.32	80	—	0.2	80000
Calcio	Ca	$\text{Ca}^{2+}$	40.08	125	—	0.5	125000
Potasio	K	$\text{K}^+$	39.10	250	—	1.0	250000
Nitrógeno	N	<b><math>\text{NO}_3^-</math></b> , $\text{NH}_4^-$	14.01	1000	—	1.5	1000000
Oxígeno	O	$\text{O}_2$ , $\text{H}_2\text{O}$	16.00	30000	—	45	30000000
Carbono	C	$\text{CO}_2$	12.01	40000	—	45	40000000
Hidrógeno	H	$\text{H}_2\text{O}$	1.01	60000	—	6	60000000

Fuente: (Azcón-Bieto *et al.*, 2000)

### Anexo 3. Composición de algunos medios de cultivo usados en el cultivo de tejidos vegetales (mg/L).

Componentes	MS <sup>1</sup>	B5 <sup>2</sup>	White <sup>3</sup>	Heller <sup>4</sup>	SP <sup>5</sup>	N6 <sup>6</sup>
<b>Macronutrientes</b>						
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		134				463
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650				825	
NaNO <sub>3</sub>				600		
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	80		950	2830
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>			300			
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	150		75	220	166
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250	720	250	185	185
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			200			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170			125	85	400
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O		150	16.5			
KCl			65	750		
<b>Micronutrientes</b>						
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8			13.9	27.85
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.3			18.65	37.25
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O				1		
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>			2.5			
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3		7	0.01	22	4.4
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O		10				
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	2	3	1	8	1.5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3	1.5	1	6	1.6
KI	0.83	0.75	0.75	0.01		0.8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25			0.25	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025		0.03	0.25	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025			0.25	
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O				0.03		
AlCl <sub>3</sub>				0.03		
<b>Orgánicos</b>						
Mio-inositol	100	100			50	
Acido nicotínico	0.5	1	0.5	0.5	1	0.5
Piridoxina.HCl	0.5	1	0.1	0.1	1	0.5
Tiamina.HCl	0.1	10	0.1	0.1	1	1
Glicina	2		3	3		2
Pantotenato de Calcio			1	1	1	
Sacarosa	30000	20000	20000	20000	20000	30000
Cinetina	0.04-10	0.1				
2,4-D		0.1-1	6			
AIA	1-30					
pH	5.7-5.85	5.5	5.5		5.8	5.8

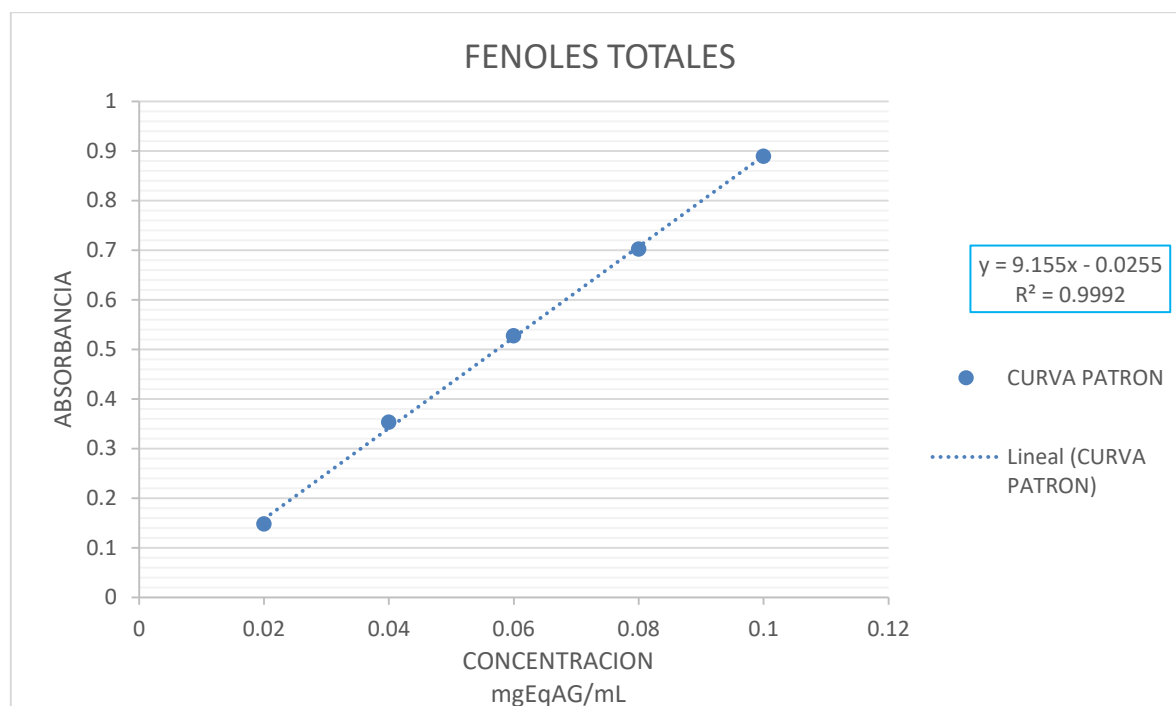
Fuente: (Agro, 2015)

---

## Anexo 4. Curvas de patrón.

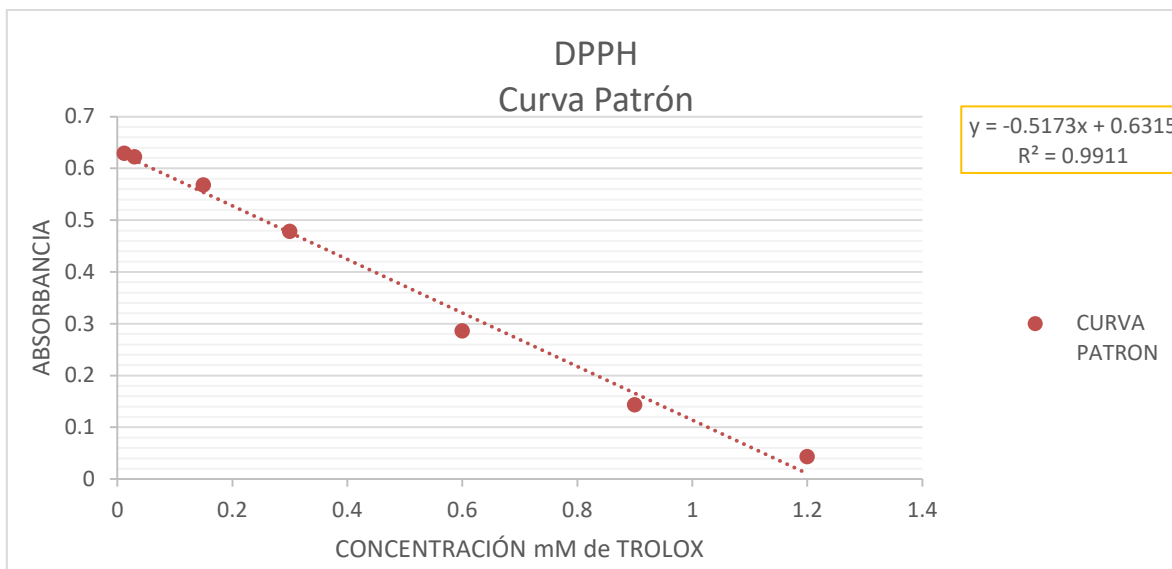
### Curva patrón de CFT.

Para la curva patrón se utilizaron soluciones de ácido gálico a diferentes concentraciones: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/mL.



### Curva patrón de DPPH.

Se construyó una curva patrón donde se pesó 0.0030 g de TROLOX y se disolvieron en 10 mL de metanol para obtener una concentración de 1.2 mM, a partir de esta solución madre, se prepararon las diferentes concentraciones: 0.012, 0.03, 0.15, 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 mM.



### Curva patrón de ABTS.

Para la curva patrón se prepararon soluciones de TROLOX (como antioxidante) en concentraciones de 0.01 mM hasta 0.8 mM (proteger de la luz).

