



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO *IN VITRO* DE
TAMARINDUS INDICA L. PARA LA OBTENCIÓN DE
ANTIOXIDANTES”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

FRANCELVIA PÉREZ HERNÁNDEZ

ASESOR ACADÉMICO:

DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE

ASESOR ADJUNTO:

DRA. ANDREA JAZMIN GUADARRAMA LEZAMA



Toluca, México Diciembre 2016

Índice General

Resumen.....	6
Introducción.....	7
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO.....	8
1.1 Biotecnología.....	8
1.1.1 Biotecnología vegetal.....	10
1.1.2 Cultivo de tejidos vegetales.....	11
1.1.2.1 Tipos de cultivo <i>in vitro</i>	11
1.1.3 Medio de cultivo para tejidos vegetales <i>in vitro</i>	13
1.1.3.1 Reguladores de crecimiento vegetal.....	15
1.1.4 Establecimiento de cultivo de tejidos.....	19
1.1.4.1 Selección del explante.....	19
1.1.4.2 Estado fisiológico de la planta donadora de explante.....	19
1.1.4.3 Factores físicos (condiciones de almacenamiento).....	19
1.1.5 Establecimiento de cultivos en suspensión.....	20
1.1.6 Metabolitos secundarios.....	21
1.2 Tamarindo.....	22
1.2.1 Origen y distribución.....	22
1.2.2 Clasificación taxonómica.....	23
1.2.3 Descripción morfológica.....	23
1.2.4 Requerimientos agroecológicos.....	25
1.2.5 Producción de tamarindo.....	26
1.2.6 Composición nutricional.....	26
1.2.6.1 Fitoquímica del tamarindo.....	29
1.2.7 Propiedades atribuidas.....	28
1.2.8 Usos.....	29
1.2.9 Cultivo de Tamarindo por técnicas tradicionales.....	30
1.2.9.1 Latencia en semillas.....	31
1.2.9.2 Tratamientos pre-germinativos.....	32
1.2.10 Cultivo de tejidos vegetales de <i>Tamarindus indica</i> . L.....	34

1.3 Antioxidantes.....	36
1.3.1 Clasificación.....	36
1.3.2 Polifenoles.....	37
1.3.3 Flavonoides.....	37
1.3.4 Actividad antioxidante.....	41
1.3.4.1 Método DPPH.....	41
1.3.4.2 Método ABTS.....	41
CAPÍTULO 2 JUSTIFICACIÓN.....	43
CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS.....	44
CAPÍTULO 4 OBJETIVOS.....	45
CAPÍTULO 5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
5.1 Material vegetal.....	47
5.2 Escarificación.....	47
5.3 Establecimiento de cultivos asépticos.....	47
5.4 Germinación <i>in vitro</i> de semillas de tamarindo.....	48
5.5 Establecimiento de cultivos de callo.....	50
5.6 Establecimiento de cultivo de células en suspensión.....	50
5.7 Cinética de crecimiento.....	51
5.8 Análisis fitoquímico de los cultivos generados.....	51
5.8.1 Extracción de compuestos bioactivos.....	51
5.8.2 Determinación de Fenoles totales.....	52
5.9 Actividad antioxidante.....	52
5.9.1 Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.....	52
5.9.2 Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS.....	53
CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
6.1 Establecimiento de cultivos asépticos.....	54
6.2 Germinación <i>in vitro</i> de semillas de tamarindo.....	56
6.3 Establecimiento de cultivos de callo.....	57
6.4 Establecimiento de cultivo de células en suspensión.....	60
6.5 Cinética de crecimiento.....	61

6.6 Análisis fitoquímico de los cultivos generados.....	62
6.7 Determinación de Fenoles totales.....	62
6.8 Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.....	63
6.9 Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS.....	64
CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES.....	66
CAPÍTULO 8 PERSPECTIVAS.....	67
CAPÍTULO 9 REFERENCIAS.....	68
CAPÍTULO 10 ANEXOS.....	75
10.1 Anexo 1 Solución fungicida (antibióticos).....	75
10.2 Anexo 2 Composición del medio MS.....	76
10.3 Anexo 3 Solución Antioxidante.....	77
10.4 Anexo 4 Determinación de Fenoles Totales.....	77
10.5 Anexo 5 Determinación de actividad Antioxidante método DPPH.....	79
10.6 Anexo 6 Determinación de actividad antioxidante método ABTS.....	81

RESUMEN

El tamarindo (*Tamarindus indica* L.) es una especie vegetal utilizada tradicionalmente en México como materia prima en el procesamiento de dulces y bebidas; diversos estudios fitoquímicos han evidenciado que es una buena fuente de antioxidantes, los cuales se pueden encontrar en el fruto, semillas y hojas. El presente trabajo tuvo como objetivo el desarrollo de diversos experimentos encaminados a establecer cultivos *in vitro* de *Tamarindus indica* L. productores de metabolitos secundarios como son los compuestos fenólicos (antioxidantes). Para lo cual se establecieron cultivos asépticos a partir de semillas, las cuales se colocaron en medio MS, suplementado con carbón activado, ácido cítrico, ácido ascórbico y PVP, además de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (BAP, 2,4-D, Cinetina y Thidiazuron). Se evaluó el porcentaje de germinación en donde se observó que el mayor porcentaje se obtuvo en el medio de cultivo carente de reguladores del crecimiento, mientras que los porcentajes registrados por los cultivos suplementados con los diferentes reguladores del crecimiento ensayados, variaron entre un 40 a un 80%. Una vez germinadas las semillas y desarrolladas las respectivas plántulas, se tomaron hipocótilos, cotiledones y hojas como fuentes de explantes, los cuales se sembraron en medio de cultivo MS suplementado con los mismos componentes utilizados en la germinación. Los cultivos se incubaron durante 30 días, al término de los cuales se registró el porcentaje de explantes con formación de callo, así como la cantidad de callo formado. Los resultados obtenidos indican que los tratamientos suplementados con 2,4-D 1.5 mg/L, BAP/2,4-D en concentración 1:1 mg/L y Thidiazuron en concentración 0.5 mg/L, estimularon la mayor formación de callo. A partir de los cultivos de callo generados se establecieron cultivos de células en suspensión, lo cual se realizó colocando 4g de callo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo MS líquido, suplementado con de 0.5mg/L de thidiazuron. Los cultivos se colocaron en un agitador orbital a 110 rpm. Durante 28 días se llevó el seguimiento de una cinética de crecimiento a través de las variables peso fresco y seco, la cual nos arrojó que la velocidad de crecimiento del cultivo es de 0.187 g/día con una tasa de duplicación de 3.7 días. Las células en suspensión, resultado de la cinética fueron cosechadas, liofilizadas y sometidas a una extracción metanólica, asistida por ultrasonido. A los extractos obtenidos se les determinó el contenido de fenoles totales por el Método de Folin- Ciocalteu dando una concentración máxima de 14.35 mg/L de medio, con un porcentaje de inhibición del radical DPPH del 46.70%.

INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años el cultivo de tejidos vegetales o también llamado cultivo *in vitro* de plantas ha sido una de las áreas de mayor aprovechamiento de la biotecnología, debido a que gracias a su aplicación se pueden obtener plantas mejoradas y libres de factores contaminantes, así como productos de alto valor añadido, entre los cuales podemos mencionar a los metabolitos secundarios los cuales son sustancias que no intervienen directamente en el crecimiento y desarrollo de la planta, pero que son de importancia para la planta en ciertas condiciones.

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o no de nitrógeno en su composición, no obstante, los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides (o isoprenoides), fenilpropanoides (o compuestos fenólicos) y los alcaloides (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura).

Los fenilpropanoides (polifenoles) se clasifican principalmente en ligninas, lignanos, suberinas, flavonoides, coumarinas, furanocoumarinas y estilbenos. Los flavonoides están dentro de los metabolitos secundarios más importantes ya que son considerados antioxidantes, los cuales son compuestos químicos utilizados para combatir a los radicales libres; ayudan a prevenir y/o retardan el daño oxidativo que principalmente afecta a los lípidos y a algunas proteínas de los alimentos.

El tamarindo es una especie vegetal de la cual principalmente se aprovecha el fruto, pero que de acuerdo a su composición fitoquímica es una buena fuente de antioxidantes (Flavonoides); los cuales se encuentran presentes en las hojas, el fruto, la cascara y la semilla. En diferentes estudios realizados dichos antioxidantes son extraídos mediante el uso de solventes, sin embargo, siguiendo este procedimiento se somete a la planta a un daño irreversible, sacrificándola completamente; debido a esto lo que se pretende en el presente trabajo es obtener antioxidantes mediante la técnica de cultivo *in vitro* la cual permitirá un mejor manejo de la especie.

CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

1.1 Biotecnología

La Biotecnología es definida por la OCDE como “La aplicación de la ciencia y la tecnología a los organismos vivos, así como a partes, productos y modelos de los mismos, para alterar materiales vivos o no, con el fin de producir conocimientos, bienes o servicios” (OCDE, 2005). Es un área multidisciplinaria, que se apoya en ciencias como la biología, química y procesos, con gran uso en agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, ciencias forestales y medicina.

La biotecnología es una actividad antigua, que comenzó hace miles de años cuando el hombre descubrió que al fermentar las uvas se obtenía un producto como el vino. También es biotecnología la fabricación de cerveza a partir de la fermentación de cereales que el hombre empezó a elaborar hace 4.000 años, y la fermentación de jugo de manzanas para la fabricación de sidra. En estos procesos intervienen microorganismos que transforman componentes del jugo de frutas o de cereales en alcohol. La fabricación de pan mediante el uso de levaduras, la elaboración de quesos y yogurt mediante el agregado de bacterias forman parte de las actividades de la biotecnología.

Aunque en ese entonces los hombres no entendían cómo ocurrían estos procesos, ni conocían la existencia de microorganismos, podían utilizarlos para su beneficio. Estas aplicaciones constituyen lo que se conoce como biotecnología tradicional y se basa en la obtención y utilización de los productos del metabolismo de ciertos microorganismos; en otras palabras se puede definir la biotecnología tradicional como “la utilización de organismos vivos para la obtención de un bien o servicio útil para el hombre”.

Al paso de los años y con diversos estudios, los científicos comprenden mucho más cómo ocurren los procesos biológicos que permiten la fabricación de productos biotecnológicos. Esto les ha permitido desarrollar nuevas técnicas a fin de modificar o imitar algunos de esos procesos y lograr una variedad mucho más amplia de productos. Los científicos hoy saben, además, que los microorganismos sintetizan compuestos químicos y enzimas que pueden emplearse eficientemente en procesos industriales. Estos conocimientos dieron lugar al desarrollo de la biotecnología moderna.

A diferencia de la biotecnología tradicional, la biotecnología moderna surge en la década de los '80,

y utiliza técnicas, denominadas en su conjunto ingeniería genética, para modificar y transferir genes de un organismo a otro (ArgenBio, 2007).

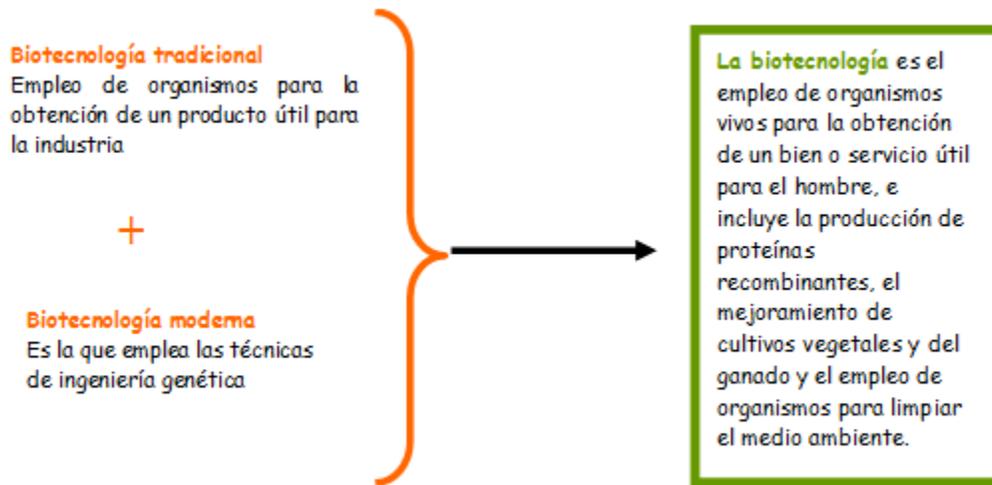


Figura 1. Biotecnología. ArgenBio, 2007.

Las aplicaciones de la biotecnología son numerosas y estas ayudan a establecer su clasificación (Da Silva, 2004):

- ✚ Biotecnología Blanca: mejora de procesos industriales, bioindustrias, bioprocesos, bioplásticos, bioenergía y cultivos celulares.
- ✚ Biotecnología Gris: soluciones para el ambiente, limpieza de contaminantes, biofiltros, biorremediación y biolixiviación; mejora del ambiente.
- ✚ Biotecnología Verde: mejora de los cultivos, clonación vegetal, biofertilizantes, biopesticidas, plantas que producen nuevos compuestos, o metabolitos secundarios aprovechables.
- ✚ Biotecnología Marrón: fármacos veterinarios, vacunas, pruebas de diagnóstico, clonación y biofactorías; aplicaciones veterinarias.
- ✚ Biotecnología Azul: nuevos productos de la biodiversidad marina como cosméticos, fármacos y alimentos.
- ✚ Biotecnología Violeta: bioseguridad, propiedad intelectual, patentes.
- ✚ Biotecnología Roja: genómica, terapia génica, huellas de ADN, kits de diagnóstico y vacunas; es la que comprende todas las aplicaciones relacionadas con la salud.

- 🚦 Biotecnología Dorada: usa bioinformática y nanotecnología, nano-robots, nano capsulas, biosensores, metagenómica, bases de datos de ADN.
- 🚦 Biotecnología Amarilla: se aplica a la industria de los alimentos, nuevos y mejores alimentos, técnicas para asegurar calidad e inocuidad, alimentos funcionales.

1.1.1 Biotecnología vegetal o Biotecnología verde

La biotecnología vegetal constituye el empleo de las plantas para la producción de bienes y servicios, incluyendo todas las técnicas agronómicas y hortícolas tradicionales, pues sin éstas, no podría alcanzarse el objetivo de la biotecnología que es la producción de cultivos de mayor calidad y más alto rendimiento (Robert, *et al.* 1993).

La biotecnología vegetal comprende una serie de técnicas y procesos como el cultivo y modificación en el laboratorio de las plantas o de partes de ellas (células, tejidos u órganos). Esto con el fin de multiplicarlas masivamente, hacerlas mejores, más productivas y obtener productos útiles a partir de ellas.

Considerando una descripción actual de las áreas de aplicación de esta amplia multidisciplina, bajo un “código de colores”, la biotecnología verde equivalente a la “agrícola”, que se relaciona también con la producción agropecuaria sustentable con fines alimentarios, industriales y ambientales. Cada vez más se integran estrategias con enfoque productivo y de sustentabilidad en la producción de bienes y servicios a través de la aplicación de procesos biológicos. Nominalmente, la biotecnología verde incluye:

- ✓ Aplicaciones para la biosíntesis, procesamiento y almacenamiento de bienes agrícolas y pecuarios.
- ✓ Biofertilizantes y agrobio-químicos (no sintéticos), para control de plagas y enfermedades.
- ✓ Técnicas para registro, monitoreo y manejo de vida silvestre y conservación de ecosistemas.
- ✓ Productos auxiliares para la reproducción, buena nutrición, mantenimiento de la salud, control de enfermedades, clonación y modificación genética de cultivos, ganado y mascotas.
- ✓ Cultivo de tejidos vegetales y micropropagación de plantas.
- ✓ Modelos vegetales para biorremediación y gestión ambiental.
- ✓ Generación directa (algas) o indirecta (almidón, aceites) de biocombustibles

1.1.2 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos, células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Mroginsk, 1993).

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 (Street, 1977; Calva y Ríos, 1999). Considerando la presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas.

Se le llama también cultivo *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente.

Esta técnica 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 (Ferl y Paul, 2000).

Al igual que en otros métodos de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes de una planta madre propagada *in vitro* son clones, es decir, son copias genéticamente idénticas entre ellas e idénticas a la planta madre. En plantas propagadas por semilla (propagación sexual), la descendencia no es clónica ya que cada semilla tiene su propia base genética que resulta de la mezcla de ambos progenitores, por lo tanto, cada individuo es *único* (Abdelnour, *et al.*, 1994).

1.1.2.1 Tipos de cultivo *in vitro*

Cultivo de órganos

Corresponde al cultivo de un órgano de la planta con el fin de propagarla. Cultivo de meristemas o de ápices, micro estacas y cultivo de embriones.

Callos

Son un conjunto de células procedentes de la desorganización de un tejido o de una suspensión de células. El callo tiene la peculiaridad de presentar células no diferenciadas para su última función pero que conservan el poder de dividirse.

✚ Suspensión de células

Las suspensiones celulares se componen de células libres y micro agregado de células en medio líquido en movimiento.

✚ Cultivo de protoplastos

Es el cultivo de células sin pared pectocelulósica, es decir células con los componentes vivos rodeados solamente por la membrana citoplásmica; debido a esto los protoplastos son adecuados para trabajos en manipulación genética.

✚ Cultivo de anteras

Consiste en el cultivo de anteras enteras con polen inmaduro, el polen se divide para formar embriones o callo; por lo general este tipo de cultivo se utiliza para la obtención de plantas aploides.

El crecimiento de los tejidos *in vitro*, puede desarrollarse de dos formas:

✚ Crecimiento organizado

Hace referencia al tipo de cultivo que se inicia con una parte organizada de la planta, ya sean ápices, hojas, brotes, semillas y esa parte u órgano sigue creciendo *in vitro* manteniendo sus características estructurales. Se aplica también cuando se desarrolla una estructura a partir de un tejido desorganizado (organogénesis).

✚ Crecimiento desorganizado

Este tipo de crecimiento se caracteriza porque a partir de fragmentos de tejidos u órganos, se produce un tejido sin estructura específica que contiene un número limitados de algunos tipos de células especializadas encontradas en una planta intacta. Un tejido desorganizado (o callo) puede crecer con sub cultivos y puede ser mantenido en medio sólido o líquido durante varios meses o años (Abdelnour A, 1994).

Las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales son en los campos de micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos e investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica (Fowler 1987; Carpita y McCann 2000).

Entre las principales ventajas del cultivo de células y tejidos vegetales en la investigación básica, se encuentran la micropropagación y la producción de compuestos con actividad biológica como metabolitos secundarios, proteínas y productos transgénicos, destaca el hecho de que permiten realizar estudios en un tiempo mucho menor y bajo condiciones más controladas que con plantas cultivadas por métodos tradicionales (Twyman, 2003).

1.1.3 Medio de cultivo para tejidos vegetales *in vitro*

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.

Los medios de cultivo para tejidos *in vitro* pueden ser de dos tipos: Medios semisólidos; donde generalmente se lleva a cabo la germinación de semillas y el cultivo de explantes y Medios líquidos donde se colocan explantes con la formación de callo para generar sistemas de células en suspensión.

Básicamente, los medios de cultivo se integran de compuestos que suministran:

- **Una fuente de carbono:** la mayoría de los cultivos son heterótrofos y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También myo-inositol (100 mg/L) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos.

- **Nutrientes minerales:** Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro (nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre) y micronutrientes (hierro, níquel, cloro, manganeso, cinc, boro y cobre) que junto con el carbono, oxígeno e hidrógeno constituyen los 17 elementos esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado juntamente con un agente quelante (Na_2EDTA).

- **Sustancias vitamínicas:** Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, las vitaminas más usadas son:

-Tiamina (vitamina B1): es la vitamina más importante, se añade como hidrocloreuro de tiamina y constituye una vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales.

-Ácido Nicotínico: forma parte de las coenzimas NAD y NADP que intervienen en la transferencia de hidrógeno.

-Piridoxina (Vitamina B6): Es añadida como hidrocloreuro de Piridoxina (Piridoxina-HCl). Participa como coenzima en el metabolismo de los aminoácidos, entre ellos el triptófano, precursor de AIA y ácido nicotínico, favorecer la formación de raíces.

-Myo-inositol: No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis.

-Ácido ascórbico y ácido cítrico: Son añadidos a los medios de cultivo en ocasiones no como vitaminas sino como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos.

- **Agente gelificante** (en el caso de medios semisólidos): 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%).

- **Reguladores del crecimiento vegetal**

Los reguladores del crecimiento vegetal se agrupan en cinco categorías: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, en la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA, Dicamba, Picloran) y/o citocininas (BAP, Kinetina, ZEA, 2iP, Thidiazuron). Las giberelinas (especialmente GA3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemos o para la elongación de brotes.

Otros compuestos: Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar a los medios, es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína, aunque hay que tener presente que en dosis altas pueden inhibir el crecimiento de los cultivos. El carbón activado (0,1 a 5%) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos.

En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. También en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido cítrico, ácido ascórbico y

polivinilpirrolidona) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes.

Agua: Es de vital importancia la calidad del agua empleada para realizar los medios de cultivo la cual debe ser destilada. Siempre que se realicen trabajos con cultivo de tejidos y células *in vitro* el agua a usar debe tener la mayor calidad posible.

Carbón activado: Mediante la adición de Carbón Activado al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos, evitando o disminuyendo el deterioro del explante. El efecto benéfico del CA se atribuye a su capacidad para remover sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante la esterilización del medio o liberadas por el explante (Azofeif, 2009).

PVP: Es una poliamida, utilizada en la prevención del oscurecimiento de tejidos, ya sea, aplicado como enjuague al explante o mediante su incorporación al medio de cultivo. El PVP se ha aplicado como tratamiento al momento de separar el explante de la planta donadora (Amin y Jaiswal 1988), como pretratamiento anterior o posterior al proceso de desinfección (Figueiredo *et al.* 2001).

1.1.3.1 Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento son fitohormonas u hormonas vegetales que constituyen un grupo de compuestos orgánicos que influyen en diversos procesos fisiológicos, principalmente crecimiento, diferenciación y desarrollo vegetativo. Estas pequeñas moléculas químicas actúan a muy bajas concentraciones y son sintetizadas en las plantas, aunque también se han creado reguladores sintéticos que actúan de forma positiva al usarse en el cultivo de tejidos vegetales.

En las plantas solo 5 tipos de sustancias se reconocen como fitohormonas: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, todas son moléculas que se encuentran en un rango de peso molecular entre 28 Da (etileno) y 346 Da (GA) y además son todas activas entre 10^{-6} y 10^{-8} M.

- 🚦 Auxinas: son compuestos derivados del triptófano o del indol-glicerol fosfato (IGP), se sintetizan mayormente en los ápices (brotes jóvenes) y son distribuidos a toda la planta (Saini, 2013). Son consideradas como el regulador maestro en las plantas, participan en el aumento del crecimiento de los tallos, promueven la división celular en el cambio vascular

y la diferenciación del xilema secundario, estimulan la formación de raíces adventicias, inhiben la elongación de raíces y estimulan el desarrollo de frutos y floración en algunas especies.

En cultivo de tejidos vegetales se utiliza para la inducción de callos, embriogénesis somática y formación de raíces (Vanneste, 2009).

Se clasifican en dos tipos: naturales, sintetizadas por la planta: AIA, IBA, PAA y Cl-AA; y sintéticas como ANA, Dicamba, 2,4-D y 2,4,5-T.

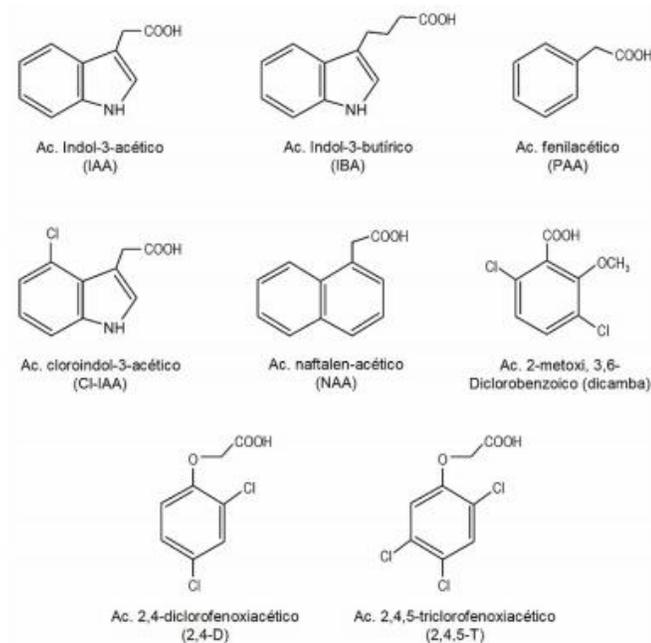


Figura 2. Estructura de algunas auxinas naturales y sintéticas

🌈 Citocininas: son hormonas esenciales en el accionar de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes. Se trata de derivados de la base adenina por sustitución de un isopreno o cadena lateral aromática en la posición N⁶; las citocininas son producidas en varios sitios en la planta incluyendo raíces, brotes y semillas inmaduras (Moubayidin, 2009). En cultivos celulares, promueve la división y proliferación celular, induce la formación de brotes en los explantes y participa en la re diferenciación de los callos a los explantes (Haberer y Kieber, 2002).

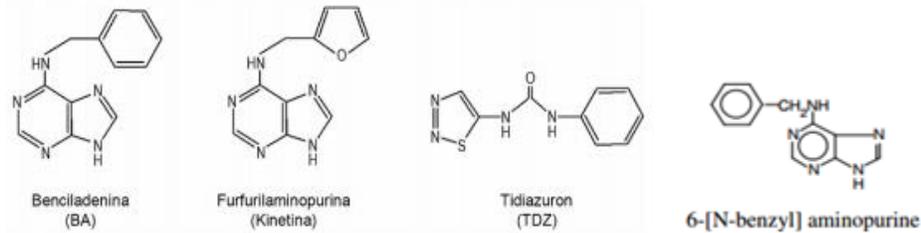


Figura 3. Estructura de citocininas sintéticas y naturales

- Giberelinas: el ácido giberélico participa en la interrupción del período de latencia de las semillas y brotes, haciéndolos germinar, estimula la elongación de hojas, induce el desarrollo de yemas, ayuda a regular el crecimiento longitudinal del tallo, la elongación de órganos axiales: pecíolos, pedúnculos y promueve el desarrollo de los frutos.

En el cultivo de tejidos vegetales se utiliza para la elongación de los brotes y para inhibir la formación de raíces adventicias. Se han identificado más de un centenar de estas fitohormonas en las plantas, de las cuales solo pocas son biológicamente activas, la giberelina más usada es el AG₃ (Weis, 2007; Yamaguchi, 2008).

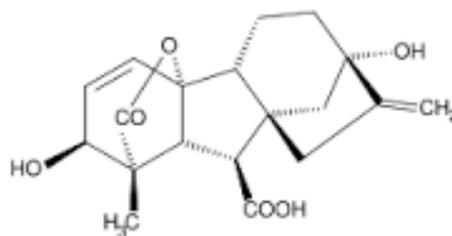


Figura 4. Estructura del ácido giberélico.

- Ácido abscísico: pertenece a los metabolitos llamados isoprenoides y se sintetiza en tejidos vasculares. Regula diversos procesos de desarrollo y adaptación, induce tolerancia al estrés hídrico (ayuda a adaptarse a la escasez de agua), controla el movimiento estomático, induce la senescencia y abscisión foliar; inhibe la germinación, floración y elongación de las raíces, por lo que se considera como antagonico de las giberelinas (Cutler, 2010).

Promueve la producción de proteínas de reserva en la semilla y aumenta su concentración a medida que la semilla madura, impide la germinación durante los periodos de

temperaturas frías, hasta que un aumento en la síntesis de giberelinas permite a las semillas germinar.

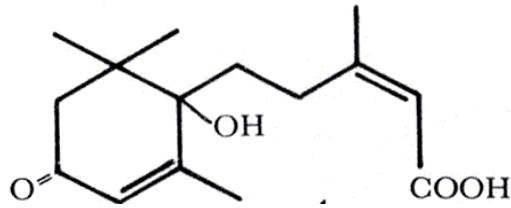


Figura 5. Estructura del ácido abscísico (ABA).

TABLA 1. Clasificación, abreviatura y principal función de los RCV

Grupo del RCV	Compuesto	Abreviatura	Función
<u>Auxinas</u>	Ácido 3- indolbutírico	AIB	Alargamiento celular
	Ácido α -naftalenacético	ANA	
	Ácido 3-indolacético	AIA	
	Ácido 2,4- diclofenoxiacético	2,4-D	
<u>Citocininas</u>	6-bencilaminopurina	BAP	Promueven la división celular
	Thidiazuron	TDZ	
	Kinetina	K o 6-KT	
	Zeatina	Z	
<u>Giberelinas</u>	Ácido giberélico	AG ₃	Elongación de brotes
<u>Ácido abscísico</u>	Ácido abscísico	ABA	Regula la apertura de los estomas

1.1.4 Establecimiento de cultivo de tejidos

El establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, depende en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, lo que a su vez dependerá del objetivo perseguido. (Roca W, 1991).

1.1.4.1 Selección del explante

Un explante es una parte de tejido u órgano vegetal que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo (García, 2013). El explante debe responder eficientemente a las condiciones *in vitro* considerando que el aislamiento ocasionara un estrés que alterara su metabolismo celular y balance hormonal.

El tamaño del explante no tiene influencia aparente, salvo cuando se desea obtener plantas libres de virus y se emplean meristemos foliares los cuales presentan una elevada probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos (Villalobos y Thorpe, 1991).

A pesar de que técnicamente cualquier tejido es capaz de responder al tratamiento que se le exponga, los explantes más usados son: semillas, embriones, cotiledones, órganos reproductores o segmentos de tejido vegetativo como hoja, tallo o raíz.

1.1.4.2 Estado fisiológico de la planta que dona el explante

Los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos provienen de plantas con distinta edad fisiológica. Se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis ya que mientras más joven y menos diferenciado este el tejido a cultivar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos, 1991).

1.1.4.3 Factores físicos (condiciones de almacenamiento)

La luz y temperatura son los factores físicos más estudiados en el cultivo de tejidos. Las cámaras o cuartos de crecimiento permiten controlar la luz asignando un fotoperiodo, tipo e intensidad luminosa y establecer una temperatura de incubación con el fin de encontrar las condiciones ambientales óptimas para obtener una respuesta eficiente del cultivo *in vitro*. Generalmente la temperatura de incubación para el cultivo de tejidos vegetales de la mayoría de las especies vegetales oscila entre los 24 y 28°C y un fotoperiodo es de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad.

1.1.5 Establecimiento de cultivos en suspensión

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento; estas suspensiones pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrimentos.

A menudo los medios óptimos para la inducción y crecimiento de callos a partir de explantes primarios no son los mismos que para el establecimiento de suspensiones celulares; el nivel óptimo de auxinas y citocininas por ejemplo puede ser diferente (Torrey *et al*, 1961).

Las suspensiones celulares se inician generalmente mediante la incubación de trozos de callos friables en medios líquidos que están en movimiento continuo.

Comúnmente se emplean matraces Erlenmeyer, en los cuales se deposita el medio líquido en 1/5 de su capacidad y los trozos de callo friable, se ponen un agitador orbital a 80-150 rpm a 25 °C bajo luz continua. Mediante subcultivos semanales, las suspensiones celulares quedan establecidas después de varios días. (Mroginski, *et al*, 1991)

Para ello, es necesario conocer la cinética de crecimiento de las células y su comportamiento en estos sistemas, para así estimar el tiempo requerido de subcultivo y los días en que se produce el crecimiento activo del cultivo celular (George, 2008).

Para obtener células finamente suspendidas son necesarios varios repiques y generaciones celulares, a pesar de esto los cultivos en suspensión son una mezcla de agregados celulares y células simples en el medio líquido; el tamaño de los agregados celulares está gobernado por el grado de unión entre las células, en función de la composición de las paredes celulares, fundamentalmente de las pectinas, lo cual está muy relacionado con el nivel de diferenciación. Con frecuencia se observa en cultivos de agregados cierto grado de organización morfológica como vascularización o zonas de funcionamiento especializadas como las de síntesis de clorofilas (Roca, 2010).

El cultivo de células vegetales en suspensión es una herramienta que permite conocer diversos aspectos del cultivo, como su comportamiento metabólico, fisiológico y bioquímico, así como controlar y optimizar las condiciones de cultivo para la producción de biomasa, o bien la producción de metabolitos secundarios empleando diferentes elicitores (Moscatiello *et al*, 2013).

1.1.6 Metabolitos secundarios

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como los azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros), esenciales para la vida celular y, en general, de la planta (Piñol *et al.* 2000). Estos procesos constituyen, en su conjunto, el metabolismo primario, y a los compuestos indicados se denominan metabolitos primarios, los cuales están involucrados directamente en el crecimiento y en el metabolismo; además, en las plantas se pueden desarrollar otras rutas que conducen a la formación de compuestos usualmente peculiares de ciertos grupos taxonómicos vegetales (género, especie o familia) (Ramawat, 2007).

Estas rutas constituyen el metabolismo secundario y sus productos secundarios se denominan metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales (Piñol *et al.* 2000). Estos compuestos están considerados como productos finales del metabolismo primario y por lo general no están involucrados en procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación, formación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Taiz y Zeiger, 2006). Sin embargo, tienen importancia ecológica, debido a que funcionan como defensas contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos (Bourgaud *et al.*, 2001).

Los compuestos secundarios de plantas de interés comercial, han sido incluidos en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas:

Terpenos

Se forman por la polimerización de unidades de isopreno y esteroides (Sarin, 2005) y se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides (Shilpa, *et al.*, 2010).

Compuestos fenólicos

Se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antitumorales, inmunoestimulantes, y antioxidantes, (Gurib- Fakim, 2006). Por ejemplo, los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas (Wink, 2007).

Además, son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos (Goossens, *et al.*, 2003).

🚩 Compuestos nitrogenados (Chinou, 2008).

Son principalmente: Glucósidos cianogénicos; que se consideran posiblemente los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa (Bennett y Wallsgrave, 1994). Y Alcaloides; compuestos con cerca de 4 000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacológica (Sajc *et al.*, 2000).

1.2 Tamarindo

1.2.1 Origen y distribución

Tamarindus indica L. es un árbol de gran tamaño, larga vida y usualmente siempre verde, perennifolio bajo óptimas condiciones o sub caducifolio, nativo de las sabanas secas del África tropical, desde Sudán, Etiopía, Kenia y Tanzania, hacia el oeste a través del África sub-Saheliana hasta Senegal. El árbol fue introducido a Egipto, el Medio Oriente y Asia por comerciantes árabes en tiempos antiguos, actualmente el árbol se ha plantado y naturalizado extensamente en las regiones tropicales y subtropicales, incluyendo la región del Caribe, América Central y el norte de América del Sur.

El tamarindo se ha adaptado a regiones que poseen estaciones secas de larga duración, en las regiones tropicales húmedas con precipitación continua los árboles tienden a crecer de manera pobre y generalmente sin producción de fruta, las plántulas son sensibles a las heladas, pero pueden soportar las sequías.

1.2.2 Clasificación taxonómica

Reino: Vegetal

División: *Tracheophyta*

Subdivisión: *Spermatophytina*

Clase: *Angiospermae*

Subclase: *Dicotiledóneas*

Orden: FABALES

Familia: *Leguminosae (Fabaceae)*

Subfamilia: *Caesalpinioideae*

Género: *Tamarindus*

Especie: *indica*

Nombre común: Tamarindo

Nombre científico: *Tamarindus indica* L.

1.2.3 Descripción morfológica

Los árboles maduros crecen comúnmente hasta una altura de 25 m, con diámetros del tronco de hasta 150 cm, se caracterizan por una copa redondeada, esparcida y densa con cobertura de aproximadamente 6 a 10 m. Sus ramas son bajas y ampliamente extendidas, con las ramillas en forma de zigzag (Figura 6).

Las hojas son alternas, paripinadas, corto pecioladas, de 5 a 15 cm de largo; con 10 a 20 pares de pinnas enteras, oblongas, con la base oblicua y el ápice redondeado, casi sésiles, con longitud fluctuante de 0.3 a 2.5 cm y un ancho de 2 a 8 mm, de color verde pálido. La corteza es gruesa, gris y con fisuras profundas (Figura 7).



Figura 6. Tamarindo árbol



Figura 7. Hojas de tamarindo

Presenta también inflorescencias, en racimos cortos y laxos, axilares o terminales, pendulosos, de 5 a 10 cm de largo por 2.2 cm de diámetro, con 8 a 14 flores. Flores zigomórficas, vistosas (los botones, rojos o rosas); cáliz 4-lobulado, blanco amarillento con tonos rojizos; corola con 5 pétalos de diferentes tamaños, 2 reducidos y escamiformes y 3 grandes, oblanceolados, glabros, de color amarillo pálido matizados de naranja o rojo, de 0.5 a 1 cm de largo y unidos a la mitad.

El fruto es una vaina indehisciente, oblonga o linear, algo comprimida lateralmente y comúnmente curvada, con una capa externa delgada color pardo (epicarpio, crustácea seca y escamosa (se quiebra irregularmente al secarse), una capa mediana (mesocarpio) pulposa combinada con fibras y una capa coriácea interna (endocarpio) septada entre las semillas, de 1.7 a 15 cm de largo por 2 a 3.5 cm de ancho y 1.5 cm de espesor; conteniendo 1 a 12 semillas.



Figura 8. Inflorescencia del Tamarindo



Figura 9. Fruto del Tamarindo

Las semillas son indehiscentes, ovaladas, comprimidas lateralmente, lisas, con la testa café lustrosa, de 1 cm de largo y unidas entre sí, carecen de endospermo como reserva nutritiva, presentan un par de cotiledones gruesos y la radícula es pequeña y recta.



Figura 10. Semillas de Tamarindo

El sistema radicular del tamarindo es muy profundo y extenso, lo cual lo hace tolerante a ráfagas o vientos fuertes, así como a condiciones de sequía.

1.2.4 Requerimientos agroecológicos

El tamarindo es un cultivo ampliamente adaptado a las regiones semiáridas de los trópicos; prospera en lugares con clima cálido semi seco, con invierno y primavera secos y sin una estación invernal definida. Bajo estas condiciones, la producción de fruta es excelente, tanto en cantidad y calidad de los frutos (Parrotta, 1990).

El tamarindo requiere de suelos bien drenados y crece mejor en suelos aluviales profundos. La especie puede prosperar en una variedad de suelos, incluyendo las arenas costeras y los suelos rocosos, aunque se ha reportado un crecimiento pobre en sitios caracterizados por capas inferiores sólidas, calcáreas y poco profundas (SAGARPA, 2001).

1.2.5 Producción de tamarindo

Los países productores más importantes de tamarindo son: la India, México, Brasil, Belice, Guatemala, Costa Rica y otros países de América Central, Sudamérica, Asia y África, donde los climas son cálidos semiáridos o húmedos.

En la República Mexicana el tamarindo se encuentra en 21 entidades federativas, tanto en forma silvestre como en cultivo, principalmente en las costas del Pacífico y del Golfo de México (Orozco, 2001). La superficie sembrada en 2009 fue de 8 599.43 hectáreas, de las cuales 25.5% era superficie de riego y sólo 83.43% era cosechada, con una producción de 38,390.07 t y un valor de 145 millones de pesos (SIACON, 2010).

El principal productor de tamarindo en México es Colima, con una superficie de 2,075 hectáreas establecidas (53% de riego), lo cual representa el 35% de la superficie total nacional. En segundo lugar se encuentra Guerrero con 1,929 hectáreas, Oaxaca con 513, Michoacán con 330, Chiapas con 298, Jalisco con 265 y Veracruz con 205 hectáreas (SAGARPA, 2001).

1.2.6 Composición nutricional

La pulpa constituye un 40% de la vaina y es fuente importante de vitaminas, minerales y pectinas; la pulpa de color rojo de algunos tipos de tamarindo contiene un pigmento llamado Chrysanthemín. Las hojas jóvenes son ricas en minerales (calcio, fósforo y azufre) y vitaminas (vitamina A y niacina), mientras que las flores poseen altas concentraciones de calcio, fósforo y ácido ascórbico.

Las semillas de tamarindo son también una rica fuente de almidón, proteína y aceite. Su composición química es: agua 11.3%, proteína 13.3%, grasa 5.4%, carbohidratos 57.1%, ceniza 4.1% y fibra cruda 8.8 %. La proteína de la semilla es rica en ácido glutámico (18 %), ácido aspártico (11.6 %), glicina (9.1%) y leucina (8.2%). La proporción de aminoácidos esenciales en la proteína es de 33.6%.

Tabla 2. Composición nutricional del Tamarindo

Compuesto	Valor de 100 gramos de porción comestible		
	Pulpa madura	Hojas jóvenes	Flores
Calorías	115		
Humedad	28.2- 52.0 g	70.5 g	80 g
Proteína	3.1 g	5.8 g	0.45 g
Grasa	-	2.1 g	1.54 g
Fibra	5.6 g	1.9 g	1.5 g
Carbohidratos	67.4 g	18.2 g	-
Azúcar	39 -41 g	-	-
Ceniza	2.9 g	1.5 g	0.72 g
Calcio	35-170 mg	101 mg	35.5 mg
Magnesio	-	71 mg	-
Fósforo	54-110 mg	140 mg	45.6 mg
Hierro	1.3 – 10.9 mg	5.2 mg	1.5 mg
Cobre	-	2.1 mg	-
Cloro	-	94 mg	-
Azufre	-	63 mg	-
Sodio	24 mg	-	-
Potasio	375 mg	-	-
Vitamina A	151 U	250 mg	0.31 mg
Tiamina	0.16 mg	0.24 mg	0.072 mg
Riboflavina	0.07 mg	0.71 mg	0.148 mg
Niacina	0.6 – 0.7 mg	4.1 mg	1.14 mg
Ácido ascórbico	0.7- 3.0 mg	3.0 mg	13.8 mg
Ácido tartárico	8.0 23.8 mg	-	-
Ácido oxálico	-	196 mg	-

Fuente: Morton (1987).

1.2.6.1 Fitoquímica del Tamarindo

En el árbol (hojas) se han encontrado los siguientes compuestos:

- ✚ Flavonoides orientín, iso-orientín, saponaretín y vitexín
- ✚ Ácidos: hidrocianico, málico, cítrico, tartárico, bitartato de potasio.
- ✚ Carbohidratos: pectina

De la flor se han aislado las siguientes sustancias químicas:

- ✚ Ácidos orgánicos: α -oxo-glutarico, glioxálico, oxaloacético, oxalosuccínico.

En el fruto se han identificado: Alcaloides;

- ✚ ácidos: parasórbico, acético, cítrico, málico, succínico, tartárico.
- ✚ Ácidos orgánicos: α -oxo-glutarico, glioxálico, oxaloacético, oxalosuccínico.

En el endocarpio se han encontrado:

- ✚ Carbohidratos: pectinas y monosacáridos
- ✚ Ácidos: tartárico, málico, cítrico, acético, succínico
- ✚ Esteroles: β -sitosterol, insaturados
- ✚ Grasas, minerales, proteínas, compuestos volátiles y vitaminas
- ✚ Fenoles, flavonoides y taninos

De la semilla se han aislado:

- ✚ Proteínas, lípidos, fibras, carbohidratos: pectina, aceite fijo: ácidos grasos.

En el endospermo se encontraron algunas gomas. (Osuna, *et al.*, 2005)

1.2.7 Propiedades atribuidas

El tamarindo tiene diversos y variados usos medicinales; es una droga oficial en la industria farmacéutica de los Estados Unidos de América. Inglaterra y otros países de Europa y Asia. Se estima que alrededor de 90 toneladas de fruta descascarada son exportadas anualmente por México y algunas islas de las Antillas menores hacia los Estados Unidos de América. El mercado Europeo es cubierto principalmente por la India, Egipto y las Antillas mayores.

Las preparaciones de tamarindo son universalmente reconocidas como atenuante de malestares febriles y como un laxante efectivo. Sólo o en combinación con jugo de lima, miel, leche, dátil, saborizantes o alcanfor, la pulpa es considerada efectiva como un tratamiento digestivo, desordenes biliares y antiescorbútico.

La pulpa del fruto puede ser aplicada sobre inflamaciones, usada en gárgaras para disminuir el dolor de garganta y mezclada con sal se utiliza como ungüento para el reumatismo.

1.2.7.1 Usos del tamarindo

Los productos o subproductos de tamarindo tienen una gran diversidad de usos, tanto en la industria como en el hogar. Del árbol de tamarindo se puede aprovechar la mayor parte de su estructura (frutos, semilla, flores, follaje, corteza, madera y raíces).

En México se utiliza en la elaboración de aguas frescas, refrescos embotellados, nieves, dulces, jaleas, pulpas, salsas, elaboración de postres y recetas de cocina. Asimismo, la fruta madura tiene un rico sabor la cual se puede consumir directamente como dulce (SAGARPA).

En países de Asia, África y América, el tamarindo forma parte en la dieta de los habitantes, siendo preparado y consumido de diferentes maneras.

En la India, las flores, hojas y brotes muy jóvenes se cosen y se consumen como legumbres; el fruto tierno de sabor agrio se utiliza como condimento para alimentos como el arroz, pescado y carnes rojas.

En Zimbabwe, las hojas se adicionan a sopas y las flores son un ingrediente de ensaladas.

Las semillas de tamarindo se pueden consumir de diferentes maneras; pueden ser remojadas para remover la cubierta y se molerse para hacer harina.

Las semillas de tamarindo contienen de 46 a 48% de una sustancia que forma una especie de gel; en la India, se ha patentado la producción de un producto purificado llamado "Jellosa", "polyosa", el cual es de calidad superior a la pectina obtenida de otras frutas. Se usa en la manufactura de jaleas, confituras y mermeladas. Además puede ser usada para preservar alimentos con y sin la adición de ácidos y gelatiniza con concentrados de azúcar en agua o leche fría. Se recomienda como estabilizador en nieves, mayonesas y quesos; además es ingrediente importante en una gran diversidad de productos farmacéuticos.

1.2.8 Cultivo de Tamarindo por técnicas tradicionales

De manera tradicional, el Tamarindo se puede propagar por dos métodos, 1) por semilla y 2) por injerto, en ambos casos se deben seleccionar previamente los árboles “madre” que tengan características de altos productores, con frutos de buena calidad y sanos (Parrotta, 1990).

- 1) Propagación por semilla: Se deben preparar semilleros o canteros con un alto porcentaje de arena, debidamente desinfectado y protegido del daño de animales y tener acceso a agua para su riego. La siembra se efectúa colocando las semillas cada 3 o 5 cm entre sí, y a no menos de 10 cm entre cada hilera. Una vez germinada la semilla tarda de 8 a 10 días en alcanzar una altura de 3 a 5 cm, que es la adecuada para el trasplante al vivero.
- 2) Propagación por injerto: Las plantas en el vivero estarán listas para ser injertadas, cuando hayan alcanzado una edad de 8 a 12 meses, o un grosor de 1 cm con una altura de 10 a 15 cm del cuello de la planta. El método de injertación que mejores resultados ha dado es de aproximación.

La siembra de tamarindo puede hacerse al Cuadro o al tresbolillo, a una distancia que puede oscilar entre 7 y 10 mts, dependiendo de la topografía del terreno, manejo y si la planta es injertada o proveniente de semilla.

Para un buen manejo de la plantación es necesario llevar a cabo prácticas de fertilización, de forma general la planta de tamarindo tiene una respuesta favorable a aplicaciones de nitrógeno y fosforo que van desde 50g/árbol/año hasta 3.5 o 4 kg/árbol/año y 30 o 40 gr/árbol/año hasta 2 kg/árbol/año respectivamente.

Es conveniente también hacer uso de las técnicas de poda, sobre todo durante los primeros años de vida de la planta para proporcionarle la arquitectura deseable para la vida útil de la planta; la poda se restringe a la eliminación de ramas secas y mal orientadas procurando que tenga buena aireación y penetración de luz, facilitando el control de plagas y enfermedades del follaje y la producción de mejores cosechas.

El control de malezas puede realizarse en forma manual, con cobertura vegetal o de forma química mediante el uso de herbicidas ya sea de contacto o sistémicos y dependiendo también del tipo de malezas presente en la plantación.

El tamarindo, es una planta que no presenta mayores problemas fitosanitarios, a excepción del daño de la mosca de la fruta, cuyo combate se limita al uso de trampas y liberación de parasitoides.

1.2.8.1 Latencia en semillas

Las semillas de muchas especies germinan cuando se les somete a condiciones de humedad y temperatura favorables, sin embargo, en algunos casos poseen un determinado grado de latencia de semilla; la latencia, dormancia o letargo, es un estado natural que se genera en las semillas durante sus procesos evolutivos y que sucede con un fin específico: servir como mecanismo de supervivencia o adaptación frente a ciertas condiciones ambientales o de sitio que se dan en la naturaleza.

La latencia se puede clasificar dependiendo de donde se localice la inhibición que presente la semilla y a veces la misma semilla presenta más de un tipo.

Tipos de latencia de acuerdo con Nikolaeva (1969):

Exógena o por la cubierta de las semillas, es la latencia que se presenta específicamente en el pericarpio o parte externa de la semilla, generada por varios factores y que se clasifica a su vez en:

- ◆ Latencia física, aquella en la que la testa de la semilla es dura e impermeable al agua
- ◆ Latencia química, que se propicia por la presencia o acumulación de inhibidores o sustancias químicas en la cubierta
- ◆ Latencia mecánica, que se da cuando la testa es extremadamente dura y no permite el crecimiento del embrión
- ✚ Endógena morfológica, se presenta cuando hay un subdesarrollo del embrión y se genera específicamente por la presencia de embriones rudimentarios llamados también proembriones, o por la presencia de embriones poco desarrollados que sólo ocupan la mitad de la cavidad de las semillas; en ninguno de los dos casos las semillas están listas para la germinación.
- ✚ Endógena fisiológica, el periodo se presenta en el interior de los tejidos, por dos fenómenos principalmente, el primero, ocasionado por la semipermeabilidad en las cubiertas de las

semillas, y el segundo, por la dormancia del embrión. Específicamente, este grupo se divide en cuatro categorías dependiendo de la debilidad o fuerza del mecanismo inhibidor.

- ◆ Latencia fisiológica: mecanismo fisiológico inhibidor que impide la germinación.
- ◆ Latencia superficial: mecanismo inhibidor débil
- ◆ Latencia intermedia: mecanismo inhibidor intermedio
- ◆ Latencia profunda: mecanismo inhibidor fuerte

Algunas semillas pueden presentar combinaciones de tipos de latencia, por ejemplo:

- ✚ Latencia morfo fisiológica: subdesarrollo del embrión más la aparición de un mecanismo inhibidor fuerte.
- ✚ Latencia endógena-exógena: subdesarrollo del embrión más la impermeabilidad del pericarpio.

Las semillas de tamarindo presentan latencia exógena de tipo física, específicamente en el pericarpio o parte externa de la semilla, la testa de la semilla es dura e impermeable al agua; lo que les confiere una dificultad para embeberse e inducir rápidamente la germinación.

Para contrarrestar este fenómeno, es necesario recurrir a estímulos o tratamientos pre germinativos que garanticen la correcta germinación de las semillas.

1.2.8.2 Tratamientos pre-germinativos

Cuando la latencia no termina aun teniéndose las condiciones favorables propicias para el desarrollo de la planta, es necesario realizar prácticas artificiales o tratamientos pre-germinativos que ayuden a las semillas a germinar. Estos tratamientos pueden ser de los siguientes tipos:

✚ Tratamientos Fisicomecánicos

- ✓ Escarificación: Es uno de los procesos más utilizados y consiste en raspar vigorosamente las semillas con una lija para metales u otro elemento abrasivo, hasta que pierdan su brillo natural y adquieran un aspecto poroso.
- ✓ Lijado de Puntas: Tratamiento aconsejado para semillas grandes, consiste en desgastar la punta de las semillas con lijas o piedras de superficie rugosa hasta volverla más delgada y permeable.

- ✓ Quemado: Consiste en emplear un cautín para quemar la testa, en un punto distinto a donde se ubica el embrión, quemadura que facilitará el intercambio de agua y oxígeno.
- ✓ Estratificación: Se almacenan las semillas a temperaturas adecuadas y procurando condiciones propicias de humedad, alternando capas de semilla y musgo con arena húmeda. Este método no es muy utilizado por cuanto demanda tiempo y se expone a la semilla a la aparición de hongos.

Tratamientos con Agua

Al utilizar agua como tratamiento pre germinativo, se busca producir la penetración del líquido y oxígeno en el interior de la semilla para posibilitar los procesos de germinación. Los métodos de tratamiento en húmedo, son efectivos para resolver tanto la latencia exógena física como la exógena química, o la combinación de ambas, ya que ablandan la corteza o testa de la semilla y remueven las sustancias presentes en ellas, que inhiben la germinación.

- ✓ Inmersión en agua: En un recipiente con agua, se sumergen las semillas y se remojan durante 24 horas o más, según sea la necesidad de la especie a tratar. Después del tiempo de remojo se ponen a secar a la sombra para prepararlas para la siembra.
- ✓ Hervido de las semillas: En un recipiente con agua hirviendo, se introducen las semillas guardadas en una bolsa de lona y se dejan sumergidas de 2 a 3 minutos; independientemente de la especie, el tiempo de hervido debe controlarse minuciosamente pues sobrepasarse, puede causar la muerte del embrión por calentamiento excesivo.

Tratamientos Químicos

Son tratamientos que, mediante la utilización de ácidos, debilitan la testa de las semillas, sin embargo, pueden ser riesgosos si no se tiene conocimiento y cuidados adecuados. En la actualidad, son muy poco aplicados por las condiciones de manejo y por los costos elevados que implica adelantarlos.

✚ Tratamientos Hormonales

Existen en el mercado sustancias como la giberelina (ácido giberélico), las auxinas y las citocininas que generan procesos bioquímicos y estimulan la germinación, para este tratamiento es necesario realizar una evaluación y cálculo de las dosis a utilizar dependiendo de cada semilla.

En el caso del tamarindo los tratamientos pre-germinativos que se han probados son:

- ✓ La inmersión en agua a 75 °C durante 3 a 8 minutos. Los porcentajes de ruptura de testa y germinativo alcanzados son superiores al de las semillas sin tratamiento.
- ✓ Sumergir una hora en ácido sulfúrico concentrado.
- ✓ Incubación con temperaturas hasta de 40 °C para eliminar la impermeabilidad.
- ✓ Estratificación en arena, las semillas deben estar desinfectadas y se debe mantener la humedad necesaria hasta el inicio de la germinación.
- ✓ Estratificación con temperatura constante. En pruebas *in vitro* los mejores resultados de germinación se obtuvieron a temperatura constante de 36 °C.
- ✓ Escarificación. Las semillas presentan una cubierta impermeable al agua, que se resuelve mecánicamente rompiendo la testa. Se perforan manualmente haciéndoles una ranura, grieta o fisura en la areola con una lima de mano. Con este método se obtiene el 100 % de ruptura y 98.7 % de germinación en comparación con semillas sin tratamiento (66 %).
- ✓ En la India, han utilizado diferentes tratamientos que consisten en a) Imbibición de las semillas en agua por 24 horas (63.6 % de germinación); b) Colocar las semillas en una solución de excremento de vaca (500 g de excremento disueltos en 10 litros de agua) durante 24 horas (72.6 %); c) Sumergir las semillas en orina de vaca (un litro de orina mezclada en 10 litros de agua) por 24 horas (82.8 %).

1.2.9 Cultivo de tejidos vegetales de *Tamarindus indica* L.

Los informes sobre el cultivo de tejidos de Tamarindo son limitados; sin embargo, se han encontrado reportes sobre el efecto de algunos reguladores sobre la germinación en semillas de esta especie donde se probaron diferentes concentraciones (4.54, 9.08, 13.12, 18.16 M) de Thidiazuron como regulador de crecimiento vegetal; la aparición de la radícula se observó en las semillas después de 20 días de cultivo en medio MS con 2% de sacarosa y con o sin TDZ. Esta observación se hizo presente

en los cultivos incubados ya sea en la luz o en la oscuridad. Esto sugiere que TDZ no restringe la germinación de semillas de tamarindo. Sin embargo, después de la incubación durante 6 semanas, las plántulas en un medio que contiene TDZ-exhibieron un crecimiento atrofiado; Además de que en presencia de TDZ las yemas axilares existentes en los nodos de cotiledones de plántulas de tamarindo no diferenciaron pero se desencadenó la multiplicación de los brotes meristemáticos que aparecieron en un patrón radial alrededor del nodo. En todas las concentraciones de TDZ, la morfogénesis *in vitro* se observó en cultivos incubados a la luz en comparación con aquellos en la oscuridad (Mehta, *et al.*, 2004).

Como seguimiento a este trabajo se realizó un intento para inducir *de novo morphogenesis* en plantas intactas por germinación y el cultivo de plantas de semillero de tamarindo en medio que contiene Thidiazuron (TDZ; N-fenil-N'1,2,3-tiadiazol-5-ilurea). En el presente experimento, las plantas de semillero se germinaron en dos concentraciones (9,08 y 18,16 M) seleccionados de la gama de concentraciones usadas en experimentos anteriores. La tasa de división celular aumentó con el aumento de concentración de TDZ de 9,08 M a 18,16 M, resultando en un mayor número de brotes meristemáticos en el meristemo y una capa más gruesa de células meristemáticas en el hipocótilo; Capas de células meristemáticas y protuberancias se observaron en la región entre los dos meristemas axilares, puesto que no había meristemas preexistentes en esta región, la presencia de células meristemáticas indica la inducción de la *de novo morphogenesis* (Mehta, *et al.*, 2005).

Otra de las investigaciones en torno al tamarindo fue la desarrollada por Farooq y Talat (2003) quienes micropropagaron la especie a través de brotes adventicios o la proliferación de yemas axilares de nodos de árboles adultos (10-15 años) en medio MS con BAP y Kinetina, para la proliferación de los brotes usaron niveles reducidos de reguladores de crecimiento y vitaminas. El enraizamiento se obtuvo utilizando AIB como regulador. Encontraron también que los segmentos nodales de los brotes jóvenes respondieron mejor en comparación con los explantes de brotes maduros en las primeras etapas del establecimiento de cultivos y el enraizamiento de los brotes.

Pawan y Gulati (1991) Establecieron las condiciones de cultivo óptimas para la regeneración de plántulas a partir de cotiledones extirpados de *Tamarindus indica* y encontraron que cuando la superficie nodal de todo el cotiledón tomado de plántulas con 12 días de crecimiento estaba en contacto con BAP en concentración 5×10^{-6} M en medio MS; después de 16 semanas se tiene una alta frecuencia de surgimiento de brotes adventicios y raíces.

1.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son un grupo de sustancias químicas que tienen la capacidad de retardar el proceso oxidativo bioquímico dentro del organismo, pues son ellos quienes soportan el ataque proveniente de los radicales libres, los cuales son moléculas o fragmentos de ellas que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Este electrón desapareado confiere un grado considerable de reactividad al radical libre logrando además que pueda existir de forma independiente por cortos períodos de tiempo (Kutaiba *et al.*, 2012; Carlsen, 2010).

Varios autores están de acuerdo en que los antioxidantes pueden reducir el estrés oxidativo, es decir el aumento en los agentes oxidantes, principalmente Especies Reactivas del Oxígeno-EROs, y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de ellas, así como limitar la velocidad de propagación y terminación de las reacciones en cadena de radicales libres, mediante el aumento de la defensa natural de las células o el barrido de radicales libres y prevenir la oxidación de biomoléculas, y así evitar que se generen enfermedades coronarias y cáncer (Zapata, *et al.*, 2014).

1.3.1 Clasificación

Los diferentes antioxidantes pueden categorizarse ya sea por su peso molecular, sus características fisicoquímicas y sus mecanismos de acción. Dentro de los antioxidantes que presentan alto peso molecular se encuentran las enzimas cuyas estructuras son en su mayoría de carácter proteico. Entre ellas se destacan la peróxido dismutasa, la catalasa y la peroxidasa glutatión, las cuales atenúan el efecto de la proliferación de ROS y RNS removiendo oxidantes potenciales o transformándolos a especies más estables. Entre las proteínas de alto peso molecular se tiene la albumina, la ceruloplasmina, la transferrina y la haptoglobulina, las cuales están todas presentes en el plasma. Estos se enlazan a metales redox activo, los cuales ganan electrones, a través del enlace compartido y limitan la producción de radicales libres. En el grupo de los antioxidantes de bajo peso molecular se encuentran los liposolubles como α -tocoferol, carotenoides, quinonas, bilirrubina y algunos polifenoles. Los principales antioxidantes solubles en agua y de bajo peso molecular que se encuentran en el plasma son la vitamina C y el ácido úrico y algunos polifenoles. Se ha encontrado que las frutas y las verduras son fuente de antioxidantes de alto y bajo peso molecular como las vitaminas, los carotenoides, los minerales y los polifenoles (Rathore *et al.*, 2011).

1.3.2 Polifenoles

Los polifenoles normalmente se generan como resultado de derivados glicosilados en plantas. Estos constituyen la mayoría de los metabolitos secundarios de las plantas y también de los antioxidantes dietéticos (Zapata, *et al.*, 2014).

Forman parte de una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.).

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Figura 11).

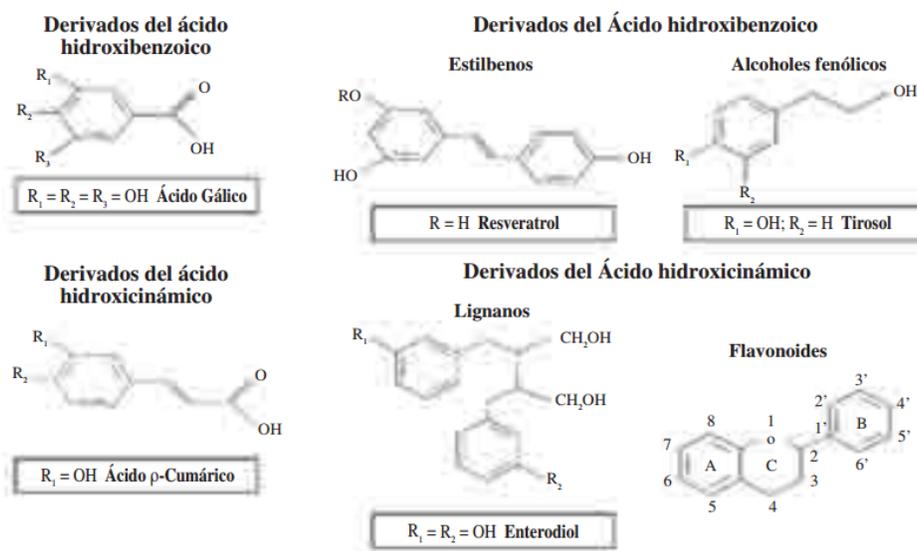


Figura 11. Grupos de Polifenoles.

1.3.3 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los

flavonoides", cuyo producto final o estructura base consta de un esqueleto C6-C3-C6, el cual puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, los cuales determina finalmente su actividad, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua (Culebras & Tuñón, 2002).

Químicamente los flavonoides se componen de un esqueleto de quince átomos de carbono que constan de dos anillos de benceno (A y B como se muestra en la Figura 12) unido a través de un anillo de pirano heterocíclico (C).

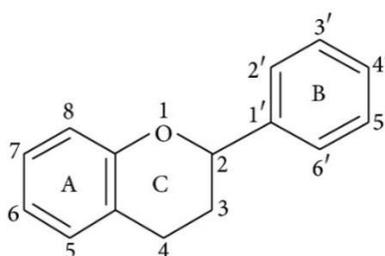


Figura 12... Estructura base de los flavonoides

Se pueden dividir en una variedad de clases, tales como:

- ✚ **Flavonas:** flavona, apigenina y luteolina
- ✚ **Flavonoles:** quercetina, kaempferol, miricetina, y fisetina
- ✚ **Flavanonas:** flavanona, hesperetina, y naringenina y otros.
- ✚ **Antocianidinas:** que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Culebras & Tuñón, 2002).

Las diversas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo de C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B (Kumar, *et al.* 2013) (Figura 13).

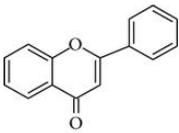
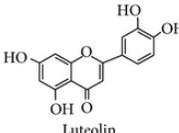
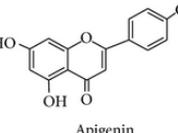
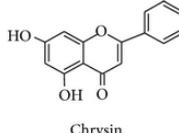
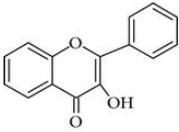
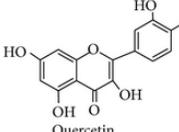
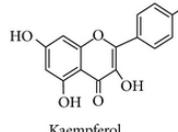
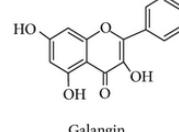
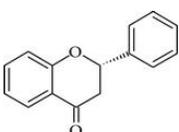
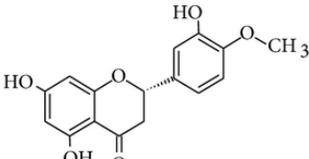
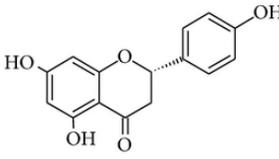
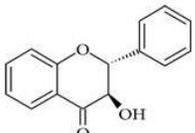
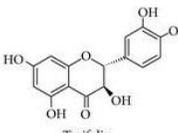
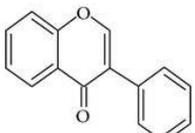
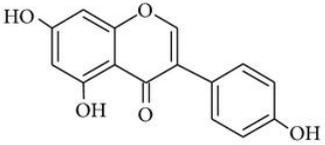
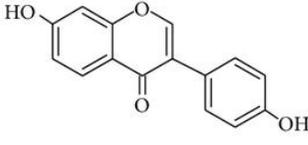
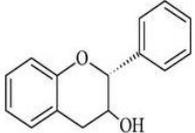
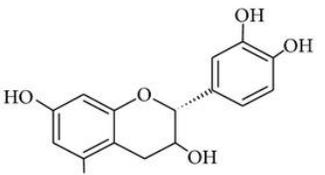
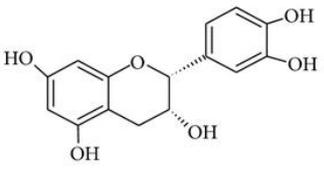
Group of flavanoid	Structure backbone	Examples		
Flavones		 Luteolin	 Apigenin	 Chrysin
Flavonols		 Quercetin	 Kaempferol	 Galangin
Flavanones		 Hesperetin	 Naringenin	
Flavanonol		 Taxifolin		
Isoflavones		 Genistein	 Daidzein	
Flavan-3-ols		 Catechin	 Epicatechin	

Figura 13. Clasificación de Flavonoides

Los flavonoides son el grupo más común y ampliamente distribuidos de compuestos fenólicos de origen vegetal, se producen prácticamente en todas las partes de la planta, en particular en células vegetales fotosintéticas. Son un importante componente de color en las plantas con flores (Kumar, *et al.* 2013)

Los flavonoles son los flavonoides más abundantes en los alimentos. Los flavonoides presentes en los alimentos son generalmente responsables del color, el sabor, la prevención de la oxidación de las grasas, y la protección de vitaminas y enzimas (Yao, 2004).

Los flavonoides que se encuentran en mayores cantidades en la dieta humana incluyen las isoflavonas de soja, flavonoles y flavonas. Aunque la mayoría de las frutas y algunas legumbres contienen catequinas, los niveles varían de 4,5 a 610 mg / kg (Arts, 2000).

Como componente de la dieta, se cree que los flavonoides tienen propiedades promotoras de la salud debido a su alta capacidad antioxidante tanto *in vivo* como en sistemas *in vitro*. Los flavonoides tienen la capacidad de inducir sistemas enzimáticos de protección humana. Varios estudios mencionan los efectos protectores de los flavonoides contra muchas enfermedades infecciosas (bacterianas y virales) y enfermedades degenerativas como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y otras enfermedades relacionadas con la edad (Kumar, *et al.*, 2013).

Los flavonoides también actúan como un sistema de defensa antioxidante secundario en los tejidos de las plantas expuestas a diferentes tipos de estrés abiótico y biótico; además regulan factores de crecimiento en las plantas (funcionan como auxinas).

Los flavonoides poseen muchas propiedades bioquímicas, pero la propiedad mejor descrita de casi todos los grupos de flavonoides es su capacidad para actuar como antioxidantes. La actividad antioxidante de los flavonoides depende de la disposición de grupos funcionales sobre la estructura nuclear. La configuración, la sustitución, y el número total de grupos hidroxilo influyen sustancialmente en varios mecanismos de la actividad antioxidante, tales como eliminación de radicales y la capacidad de quelación de iones metálicos (Heim, *et al.*, 2002).

Dar una estimación precisa de la ingesta dietética promedio de flavonoides es difícil, debido a la amplia variedad de flavonoides disponibles y la extensa distribución en diversas plantas y también el consumo diversos en los seres humanos (Barberán, *et al.*, 2000).

1.3.4 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia para disminuir la presencia de las especies reactivas de oxígeno antes de su ataque a diversos sustratos (lípidos, proteínas, ADN). Esto es de suma importancia debido a que las especies reactivas de oxígeno producen diversas acciones sobre el metabolismo que pueden ser el origen del daño celular (González, *et al.*, 2001).

La actividad antioxidante de un compuesto puede evaluarse por medio de experimentos sencillos que examinan directamente dicha habilidad y que a la vez evalúan el posible efecto prooxidante sobre diferentes moléculas. De acuerdo con Marco (1968) los métodos aplicados deben ser rápidos, reproducibles y deben requerir cantidades pequeñas de los compuestos químicos por analizar, además de que no deben estar influenciados por las propiedades físicas de dichos compuestos.

1.3.4.1 Método DPPH

Se basa en la estabilidad del radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R.) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia. El parámetro IC₅₀, que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, es generalmente usado para la interpretación de este método (Marina, *et al.*, 2008).

Otra forma por la que se conoce este método es como el método del radical libre (DPPH) el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en la 2,2-difenil-1-picril-hidrazina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos –OH que decoloran el reactivo DPPH (Soto, 2007).

1.3.4.2 Método ABTS

El compuesto ABTS presenta una coloración azul/verde con un máximo de absorción a 342 nm, es soluble en agua y es químicamente estable. Sin embargo, se presentan otras absorciones a 645, 734 y 815 nm. La acumulación del radical ABTS puede ser inhibido por la presencia de un antioxidante en el medio de reacción. La capacidad relativa de los antioxidantes donadores de hidrogeno para

secuestrar ABTS se genera en una fase acuosa y puede ser medido espectrometricamente cerca de la región infrarroja a 734 nm (McDonald, *et al.*, 2001).

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN

Desde hace algunos años y tras la problemática de salud que aqueja a la población, ha surgido un interés por el estudio de los antioxidantes, sustancias caracterizadas por tener por función primordial impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias principalmente de los ácidos grasos cuyas reacciones se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano, en el cual pueden surgir alteraciones fisiológicas desencadenantes de diversas enfermedades.

Una de las principales fuentes de extracción de estos principios activos es a partir de productos vegetales, lo que provoca una disminución importante de recursos naturales, ya que se requiere de grandes cantidades de material vegetal, el cual se somete a procesos que lo destruyen y es imposible su regeneración.

El Tamarindo (*Tamarindus indica* L.) es una especie vegetal utilizada tradicionalmente en México como materia prima en el procesamiento de dulces y bebidas, sin embargo, diversos estudios realizados en otros países reportan que es una especie con propiedades terapéuticas, como hepatoprotectora y antimicrobiana, además de que posee propiedades antioxidantes y una potencial capacidad para reducir el radical DPPH e inhibir la peroxidación lipídica, producto de la presencia de (-) epicatequina y (+) catequina (Piloto, 2008).

Ante la problemática antes mencionada, el presente proyecto plantea el desarrollo de diversos experimentos encaminados a establecer cultivos *in vitro* de *Tamarindus indica* L. productores de metabolitos secundarios como antioxidantes.

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS

Los cultivos *in vitro* de tamarindo generados retendrán la capacidad de producir antioxidantes como lo hacen los cultivos tradicionales.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

General

Establecer cultivos de tejido de *Tamarindus indica* L. productores de antioxidantes

Específicos

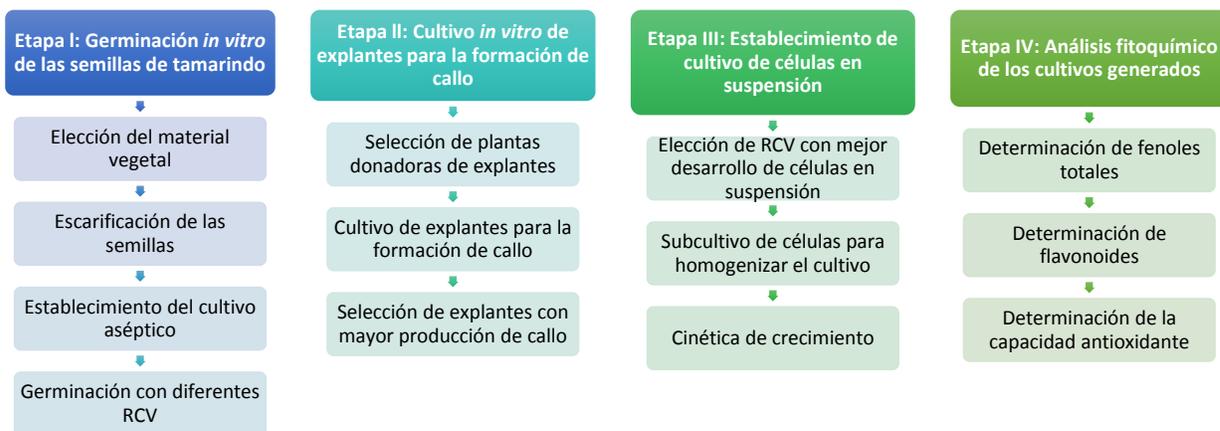
- Establecer cultivos asépticos de tamarindo a partir de semillas.
- Evaluar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal para la formación de callo de tamarindo.
- Establecer cultivos de células en suspensión de *Tamarindus indica* L.
- Evaluar la producción de metabolitos secundarios con actividad antioxidante en los cultivos en suspensión de tamarindo.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

La realización de esta investigación se llevó a cabo en cuatro etapas, las cuales se describen a continuación:

- ✚ Etapa I: Germinación *in vitro* de las semillas de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) para la obtención de plántulas asépticas donadoras de explantes.
- ✚ Etapa II: Cultivo *in vitro* de explantes para la formación de callo con diferentes concentraciones de Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV).
- ✚ Etapa III: Establecimiento de cultivo de células en suspensión.
- ✚ Etapa IV: Análisis fitoquímico de los cultivos generados.

Diagrama general



5.1 Material vegetal

Se utilizó semilla de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) distribuida por la empresa, Viveros El Guardián ubicado en la ciudad de Puebla; con un porcentaje de germinación del 95%.

5.2 Escarificación (Tratamiento pre germinativo)

Para favorecer la germinación de las semillas, se llevó a cabo un proceso pre-germinativo fisicomecánico; el cual consiste en lijar las puntas o bordes de la semilla cuidando de no dañar el área donde se encuentra el embrión.

Seguido de esto las semillas se pusieron en remojo en agua fría durante 3 horas, para promover la absorción de agua y la remoción de la capa cerosa de la testa.

Una vez transcurrido este tiempo las semillas se lavaron y frotaron para eliminar los fragmentos de testa que se desprenden con el remojo.

5.3 Establecimiento de cultivos asépticos

Actualmente no se conocen reportes respecto a las condiciones para establecer cultivos asépticos de *Tamarindus indica* L. por lo que se probaron al azar diferentes tratamientos. Se utilizaron semillas de tamarindo viables, las cuales fueron lavadas con una solución jabonosa en agitación constante por 5 minutos y fueron enjuagadas con agua corriente. Posteriormente el tratamiento de desinfección consistió en sumergir las semillas en solución Bravo 40% (v/v) , probándose diferentes tiempos de exposición (Tabla 3), seguido de esto se sumergieron en una solución de antibióticos (Anexo 1) donde de igual forma se probaron diferentes tiempos de exposición. Después de cada lavado se hicieron enjuagues con agua estéril para eliminar el exceso de producto.

En condiciones estériles el procedimiento consistió en sumergir las semillas en una solución de etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto, seguido de esto, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (grado comercial) probándose las concentraciones y tiempo de exposición señaladas en la Tabla 3, en adición a este tratamiento se utilizaron 3 gotas de tween 80 por cada 100 ml de solución de hipoclorito de sodio preparada. Después del último lavado, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio.

Durante todo el tratamiento las semillas se mantuvieron en agitación constante.

Se sembró 1 semilla por frasco y 12 frascos para cada tratamiento; los frascos contenían 30 ml del medio MS previamente preparado sin reguladores se sellaron con Parafilm®. Todo el proceso de manipulación para la siembra de la semilla se realizó dentro de la campana de flujo laminar, usando pinzas y material de cristalería previamente esterilizado y flameado para evitar la suma factores de contaminación en el cultivo.

Todos los cultivos generados se incubaron a 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Evaluándose el porcentaje de contaminación de la semilla.

TABLA. 3 Tratamientos de desinfección

Tratamiento	Solución Bravo (min)	Solución de antibióticos (min)	Etanol (% v/v)	Exposición (min)	Hipoclorito de sodio (% v/v)	Exposición (min)	Tween (gotas)
T1	---	---	70	1	100	15	---
T2	---	---	70	1	50	30	---
T3	10	15	70	1	75	20	3
T4	15	15	70	1	75	25	3
T5	15	20	70	1	80	25	3
T6	15	15	70	1	100	30	3
T7	15	15	70	1	95	25	3

5.4 Germinación *in vitro* de semillas

Una vez desinfectadas las semillas, se germinaron *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g/L de sacarosa, 1 g/L de carbón activado, 150 mg/L de ácido cítrico, 150 mg/L de ácido ascórbico y gelificado con 2.6 g/L de phytigel. (Anexo 2)

Se probaron Reguladores de crecimiento vegetal; BAP, 2,4-D, Kinetina (Kin), y Thidiazuron (TDZ) a diferentes concentraciones y combinaciones (auxina/citoquinina) mostradas en la Tabla 4.

Se tomó como experimento control, las semillas sembradas en medio sin RCV.

A todos los tratamientos se les ajusto el pH en un rango de 5.7 - 5.8, previo a la esterilización, que fue en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

TABLA 4 Concentraciones de los diferentes RCV

		2,4-D (mg/L)						
		Auxina						
		0.0	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	
Citoquinina	BAP (mg/L)	0.0	0.0/0.0	0.0/0.1	0.0/0.5	0.0/1.0	0.0/1.5	0.0/2.0
		0.1	0.1/0.0	0.1/0.1	0.1/0.5	0.1/1.0	0.1/1.5	0.1/2.0
		0.5	0.5/0.0	0.5/0.1	0.5/0.5	0.5/1.0	1.5/1.5	0.5/2.0
		1.0	1.0/0.0	1.0/0.1	1.0/0.5	1.0/1.0	1.0/1.5	1.0/2.0
		1.5	1.5/0.0	1.5/0.1	1.5/0.5	1.5/1.0	1.5/1.5	1.5/2.0
		2.0	2.0/0.0	2.0/0.1	2.0/0.5	2.0/1.0	2.0/1.5	2.0/2.0
	Kinetina (mg/L)	0.1	0.1/0.0	0.1/0.1	0.1/0.5	0.1/1.0	0.1/1.5	0.1/2.0
		0.5	0.5/0.0	0.5/0.1	0.5/0.5	0.5/1.0	0.5/1.5	0.5/2.0
		1.0	1.0/0.0	1.0/0.1	1.0/0.5	1.0/1.0	1.0/1.5	1.0/2.0
		1.5	1.5/0.0	1.5/0.1	1.5/0.5	1.5/1.0	1.5/1.5	1.5/2.0
		2.0	2.0/0.0	2.0/0.1	2.0/0.5	2.0/1.0	2.0/1.5	2.0/2.0
	Thidiazuron (mg/L)	0.1	0.1/0.0	0.1/0.1	0.1/0.5	0.1/1.0	0.1/1.5	0.1/2.0
		0.5	0.5/0.0	0.5/0.1	0.5/0.5	0.5/1.0	0.5/1.5	0.5/2.0
		1.0	1.0/0.0	1.0/0.1	1.0/0.5	1.0/1.0	1.0/1.5	1.0/2.0
		1.5	1.5/0.0	1.5/0.1	1.5/0.5	1.5/1.0	1.5/1.5	1.5/2.0
2.0		2.0/0.0	2.0/0.1	2.0/0.5	2.0/1.0	2.0/1.5	2.0/2.0	

Se sembró 1 semilla por frasco y 5 frascos para cada tratamiento; los frascos contenían 30 ml del medio previamente preparado, y se sellaron con Parafilm®.

Todo el proceso de manipulación para la siembra de la semilla se realizó dentro de la campana de flujo laminar, usando pinzas y material de cristalería previamente esterilizado y flameado para evitar la suma de factores de contaminación en el cultivo.

Todos los cultivos generados se incubaron a 25 °C bajo un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Evaluándose el porcentaje de germinación de la semilla y crecimiento de la plántula con relación al tiempo.

5.5 Establecimiento de cultivos de callo

Una vez que se obtuvieron los cultivos libres de contaminación, se iniciaron los experimentos de inducción de callo; las plántulas elegidas para ser donadoras de explantes tenían aproximadamente de 5 a 6 semanas de edad fisiológica, dependiendo de su crecimiento.

Como explantes se tomaron: cotiledones, hojas, segmentos nodales, tallos y raíces; se procuró que los explantes tuvieran el mismo tamaño, para reducir la variación de los resultados, en el caso de los tallos y raíces estos fueron seccionados a un tamaño de 2 cm de largo; las hojas y cotiledones se separaron del tallo, posteriormente todos los explantes fueron sumergidos en una solución antioxidante (Anexo 3) por 1 minuto y fueron sembrados en frascos con 25 ml de medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa, 1 g/L de carbón activado, 150 mg/L de ácido cítrico, 150 mg/L de ácido ascórbico, 500mg/L de PVP, gelificado con 2.6 g/L de phytigel y se adicionaron los reguladores en los que se desarrolló cada plántula respectivamente.

Cada frasco contenía de dos a tres secciones de explantes, perfectamente etiquetados para darle seguimiento por separado.

Los cultivos fueron monitoreados cada 7 días después de su siembra durante un mes para evaluar el crecimiento de callo, sus características fenotípicas como el color, la friabilidad así como la aparición de microorganismos contaminantes.

5.6 Establecimiento de cultivo de células en suspensión

De los cultivos en medio sólido se seleccionaron los tratamientos que indujeron los más altos porcentajes de callo friable con la finalidad de establecer estas líneas celulares en medio líquido.

Los callos generados se transfirieron a matraces de bola con fondo plano de 500 ml con 100 ml de medio MS líquido suplementado con 30 g/L de sacarosa, 150 mg/L de ácido cítrico, 150 mg/L de ácido ascórbico y 500mg/L de PVP; se usaron los RCV en los que hubo un mayor crecimiento de tejido callogénico en medio sólido. Los cultivos se mantuvieron en un agitador orbital a 105 rpm a una temperatura de incubación de 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Posteriormente a este proceso las suspensiones se subcultivaron cada 30 días en medio MS fresco para favorecer la duplicación y evitar la oxidación de las células.

Después de dos ciclos de subcultivo, se evaluó el crecimiento de las células en suspensión y se eligió el RCV que mayor crecimiento de biomasa presentó, para continuar con los experimentos.

Una vez que se logró obtener un cultivo visualmente homogéneo la biomasa se propagó colocando 8 g de inóculo peso fresco en matraces de 500 mL con 100 mL de medio MS líquido antes mencionado.

Se realizaron varios ciclos de subcultivo cada 28-30 días con la finalidad de proliferar la biomasa para poder caracterizar el crecimiento celular y realizar los análisis fitoquímicos correspondientes.

5.7 Cinética de crecimiento

Una vez establecido el medio de cultivo óptimo para la mayor producción de células vegetales, se inició la prueba de cinética de crecimiento, para evaluar la producción de células en un determinado tiempo; se estableció un cultivo en lote, el cual tuvo una duración de 28 días, divididos en 12 intervalos de medición. Se utilizaron matraces de bola fondo plano de 250 mL con 20 % de medio fresco (MS+ TDZ [0.5 mg/L]) el inóculo para cada punto fue de 4 g de células (provenientes de matraces de 500 mL incubados por 30 días) filtradas con un disociador celular, el procedimiento se hizo por duplicado.

La metodología seguida para cada punto de medición consistió en: la obtención del peso fresco realizando una filtración al vacío de los cultivos de células en suspensión, posteriormente se tomó el peso seco una vez que las células filtradas fueron liofilizadas.

Se realizaron los cálculos pertinentes de velocidad de crecimiento y tasa de duplicación de las células.

5.8 Análisis fitoquímico de los cultivos generados

5.8.1 Extracción de compuestos bioactivos.

Los extractos se hicieron colocando 100 mg de biomasa liofilizada con 10 mL de solvente en un tubo para centrifuga de 10 mL, estos se incubaron a 40 °C con agitación constante de 150 rpm; posteriormente se colocaron en un baño ultrasónico por 40 minutos a 40 °C, con una frecuencia de

53 KHz y 100% de potencia para una mejor extracción. Finalmente se micro filtraron y se almacenaron en frascos ámbar y en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

Se realizó una prueba preliminar donde se probaron diferentes solventes: Agua 100%; Metanol 100%; Metanol 50%; Etanol 100% y Etanol 70% (v/v) con la finalidad de elegir el que presentara una mejor y mayor extracción, mediante una prueba de barrido a 765 nm en el espectrofotómetro se determinó que el Metanol fue el que mejor respuesta tuvo.

5.8.2 Fenoles totales

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.

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. Como blanco se utilizó agua destilada.

Se colocaron en tubos de ensaye las soluciones de ácido gálico, se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio anhidro 20% p/v y agua destilada, se homogenizaron y se dejaron reposar una hora a temperatura ambiente y en obscuridad. Leer absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS). Para la determinación en las muestras, se tomó una alícuota de 200 µL del extracto obtenido y se realizó el mismo procedimiento que para los puntos de la curva. (Anexo 4)

5.9 Actividad antioxidante

5.9.1 Método DPPH

La determinación de capacidad antioxidante se realizó por el método de DPPH descrito por Brad-Williams y col. (1995) con modificaciones. Se tomaron 0.1 mL de cada muestra y se les añadió 3.9 mL de solución del radical DPPH (0.025 g/L) para la curva patrón se utilizó una solución stock 1.2 mM de TROLOX. Todas las reacciones se homogenizaron y se dejaron en reposo por 30 min en obscuridad. La absorbancia se midió a 515 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS). Como blanco se utilizó metanol. (Anexo 5)

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración.

5.9.2 Método ABTS

Se siguió la metodología descrita por López- Martínez y col. (2010) con modificaciones. Se preparó una solución stock de ABTS 7 mM y una solución de persulfato de potasio 140 mM, de estas soluciones se tomaron 5 mL y 88 μ L de cada solución respectivamente, para hacer una nueva mezcla, la cual se almaceno en un frasco ámbar y se dejó reposar en refrigeración durante 12 horas. Pasado ese tiempo se midió la absorbancia y se hicieron diluciones en metanol hasta obtener una absorbancia de 0.74 a 734 nm. Se tomaron 100 μ L de las diferentes muestras y se les adicionaron 3 mL de la solución ABTS. Para la curva patrón se prepararon soluciones de TROLOX en concentraciones de 0.01 mM hasta 0.8 mM y se realizó el mismo procedimiento que para las muestras. Todas las reacciones se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS).

Como blanco se utilizó la solución de ABTS con absorbancia de 0.74 (Anexo 6).

CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento de cultivos asépticos

Debido a que no se encontraron reportes en la literatura sobre el CTV de *Tamarindus indica* L, la etapa de establecimiento de cultivos asépticos consistió en evaluar la acción de la solución de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y en diferentes tiempos, como podemos observar en la Tabla 5 una inmersión por 30 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 95% fue el mejor tratamiento ya que el porcentaje de contaminación fue el menor (8.33 %), no se observó ningún daño en la semilla que impidiera su germinación. Así mismo, se obtuvo un buen resultado cuando se suman al protocolo de desinfestación la solución Bravo y la solución de antibióticos.

Tabla 5 Resultados del proceso de desinfestación

Tratamiento		Contaminación %
T1	Lavado con agua y jabón por 10 minutos + etanol 70% -1 min + hipoclorito de sodio 100% -15 min	83.33
T2	Lavado con agua y jabón por 10 min + etanol 70% - 1 min + hipoclorito de sodio 50% -30min + 3 gotas tween	91.6
T3	Lavado con agua y jabón por 10 min + Bravo 40% - 10 min + antibióticos -15 min + etanol 70% por 1 min + hipoclorito de sodio 75% -20 min+ 3 gotas de tween	83.33
T4	Lavado con agua y jabón por 10 min + Bravo 40% - 15 min + antibióticos - 15 min + etanol 70% por 1 min + hipoclorito de sodio 75% - 25 min+ 3 gotas de tween	75
T5	Lavado con agua y jabón por 10 min + Bravo 40% - 15 min + antibióticos - 20 min + etanol 70% - 1 min + hipoclorito de sodio 80% 25 min + 3 gotas de tween	58.33
T6	Lavado con agua y jabón por 10 min + Bravo 40% - 15 min + antibióticos - 15 min + etanol 70% - 1 min + hipoclorito de sodio 100% -25 min + 3 gotas de tween	25
T7	Lavado con agua y jabón por 10 min + Bravo 40% - 15 min + antibióticos - 15 min + etanol 70% - 1 min + hipoclorito de sodio 95% - 30 min + 3 gotas de tween	8.33

El hecho de que no se alcanzó un porcentaje de contaminación de 0 % puede ser debido a la contaminación endógena, la cual empieza a manifestarse aproximadamente después de varias horas de sembradas las semillas y no puede ser eliminada mediante tratamientos de superficiales como los anteriores (Collin y Edwards, 1998). Por lo anterior se requiere el

monitoreo de las semillas durante los siguientes días, para detectar este tipo de contaminación y eliminar las semillas que la presenten.

6.2 Germinación *in vitro* de semillas

El porcentaje de germinación de las semillas se tomó después de 30 días a partir de su siembra, una vez que las plántulas habían crecido aproximadamente 3 cm, en la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para cada tratamiento de reguladores.

Tabla 6 Porcentaje de germinación de la semilla en los diferentes tratamientos

		2,4-D (mg/L)						
		Auxina						
		0.0	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	
Citoquinina	BAP (mg/L)	0.0	100%	60%	60%	80%	60%	60%
		0.1	40%	20%	40%	40%	*--	20%
		0.5	40%	20%	60%	60%	*--	40%
		1.0	80%	40%	60%	80%	60%	40%
		1.5	40%	40%	60%	60%	60%	60%
		2.0	60%	20%	60%	60%	60%	60%
	Kinetina (mg/L)	0.1	40%	20%	20%	20%	*--	40%
		0.5	40%	20%	20%	20%	40%	40%
		1.0	60%	40%	40%	40%	40%	60%
		1.5	60%	40%	20%	60%	40%	60%
		2.0	60%	60%	40%	40%	40%	40%
	Thidiazuron (mg/L)	0.1	20%	40%	*--	20%	40%	20%
		0.5	40%	40%	60%	60%	40%	40%
		1.0	60%	40%	60%	60%	40%	60%
		1.5	60%	40%	40%	60%	40%	40%
2.0		40%	60%	40%	40%	40%	60%	

*No se obtuvieron resultados de germinación.

El porcentaje de germinación obtenido en el tratamiento control sin reguladores de crecimiento vegetal, fue del 100%, mientras que los porcentajes registrados por los cultivos suplementados con los diferentes reguladores del crecimiento ensayados, variaron entre un 40 a un 80% de germinación. Lo que nos indica que la presencia de los reguladores ocasiona un efecto de inhibición

de la germinación en diferentes magnitudes dependiendo de su concentración; además de que también se observaron cambios en la morfología de plántula (Fig. 14)



Figura 14. Cambio en la morfología de las plántulas con la aplicación de RCV

6.3 Establecimiento de cultivos de callo

Después de la segunda semana en el medio de inducción los explantes presentaron problemas de oxidación en el área del corte, este problema se agudizó conforme transcurrían los días de incubación ocasionando que se iniciara el proceso de muerte del explante, impidiendo así la formación de callo (Fig. 15). Con el fin de eliminar la oxidación de los explantes, estos se colocaron en una solución antioxidante de ácido cítrico, ascórbico y PVP al momento de realizar la segmentación y se dejaron ahí por un minuto más. Este procedimiento disminuyó considerablemente la oxidación, de acuerdo con Buchanan y col (2000) los procesos de inmersión y segmentación con la solución antioxidante eliminan los compuestos tóxicos producidos por estrés de corte, como lo son los polifenoles característicos de las plantas leñosas.



Figura 15 Oxidación del área de corte de los explantes

Una vez solucionado el problema de oxidación se continuó con el experimento. En el caso de los cotiledones se observó un cambio de coloración de verde a café oscuro y un crecimiento en grosor, pero no hubo formación de callo; en los segmentos de hojas, solo se observó crecimiento en tamaño y grosor pero tampoco hubo formación de tejido callogénico (Fig. 16) por lo que las tablas de resultados no se encuentran reportadas. Los explantes de hipocótilos se mantuvieron verdes desde el momento de la inoculación hasta la segunda semana, a partir de la cual se hicieron presentes los primeros cambios, que consistieron en un aumento de grosor y en algunos casos en la abertura de algunos segmentos de hipocótilos, para finales de la tercer semana se pudo observar la formación de callo principalmente cerca de las regiones de corte, y a partir de la quinta semana el tejido callogénico ya cubría más del 50% del explante, en la Tabla 7 se presentan los porcentajes de formación y cantidad de callo producido en relación a la combinación y concentración de los reguladores de crecimiento probados.

En el tratamiento control (desprovisto de reguladores de crecimiento) la producción de callo fue mínima (no representativa) (Fig. 17), los explantes se mantuvieron verdes durante las primeras dos semanas y a partir de mediados de la semana 3 comenzaron a necrosarse por sectores, hasta que murieron.



Figura 16. Explantes de Cotiledones



Figura 17 Explante en medio sin reguladores

Tabla 7 Porcentajes (%) de Formación de callo y cantidad presente en Hipocótilos

		2,4-D (mg/L)						
		Auxina						
		0.0	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	
Citoquinina	BAP (mg/L)	0.0	—	66.6 ++	100 ++	100 +	100 +++	50 +++
		0.1	75 +	50 +	50 +	66.6 ++	ND ND	50 +
		0.5	75 ++	50 ++	75 ++	83.3 +++	ND ND	100 ++
		1.0	100 ++	33.3 ++	33.3 ++	100 +++	66.6 +++	100 ++
		1.5	50 +	33.3 ++	33.3 +	83.3 +++	66.6 ++	50 +
		2.0	100 ++	50 ++	50 +++	75 +++	50 ++	66.6 ++
	Kinetina (mg/L)	0.1	100 +	66.6 +	33.3 +	50 +	ND ND	33.3 +
		0.5	100 ++	66.6 ++	33.3 +	50 +	33.3 ++	66.6 +
		1.0	50 +	75 +	33.3 ++	66.6 ++	66.6 ++	66.6 ++
		1.5	100 ++	100 ++	66.6 +	66.6 ++	33.3 ++	66.6 ++
		2.0	75 +	75 +	33.3 +	66.6 +++	66.6 ++	66.6 ++
	Thidiazuron (mg/L)	0.1	75 ++++	75 ++	ND ND	33.3 ++	50 ++	50 ++
		0.5	100 +++	100 ++	33.3 +	66.6 +++	50 ++	66.6 ++
		1.0	50 +++/>++	66.6 ++	33.3 +	100 +++	100 +++	100 ++
		1.5	100 ++++	100 +++	66.6 +++	66.6 +++	66.6 +++	77.7 ++
2.0		83.3 ++++	66.6 ++++/>++	66.6 +	66.6 +++	66.6 ++	100 +++	

La categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de callo en el explante es la siguiente: A (-) cero ACC; B (+) ACC 1-25%; C (++) ACC 26-50%; D (+++) ACC 51-75%; E (++++ ACC 76-100%.

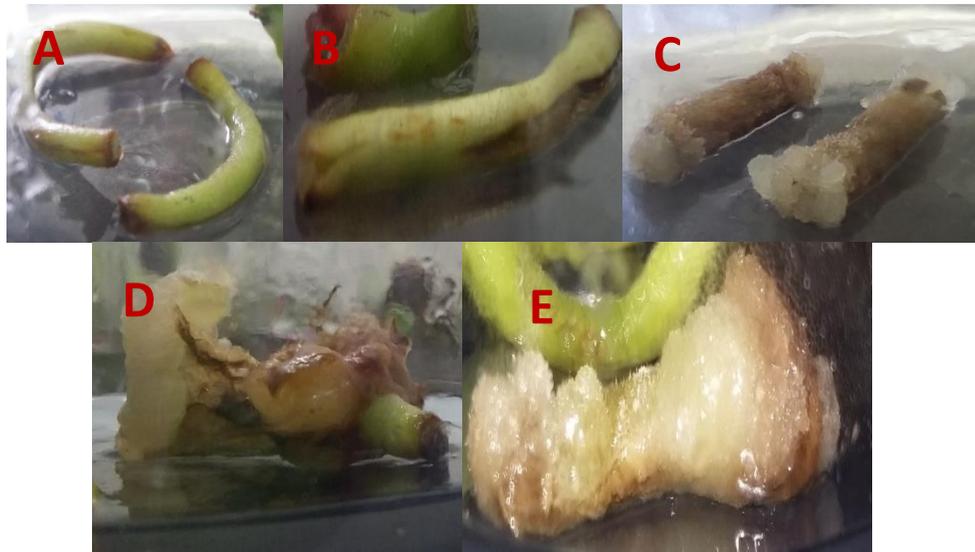


Figura 8 Detalle de la categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de callo en explantes (hipocótilo) A (--) cero ACC; B (+) ACC 1-25%; C (++) ACC 26-50%; D (+++) ACC 51-75%; E (++++) ACC 76-100%.

Como podemos observar la formación de tejido callogénico se presentó en todos los tratamientos ensayados, sin embargo, hubo diferencias en cuanto a la cantidad de callo producido de acuerdo al regulador decrecimiento vegetal que se utilizó; dieciocho de los noventa y cinco tratamientos presentaron un 100 % de formación de callo, en cantidad variada, se presentaron diferencias también en la morfología de los mismos, considerando estos tres parámetros se eligieron los tratamientos que presentaban los mejores resultados tanto en porcentaje de formación como cantidad de tejido callogénico y además se priorizaron aquellos cuyas características morfológicas (friabilidad) y de color eran mejores, siendo estos los ensayos en los que se aplicó al medio de cultivo los siguientes reguladores; 2,4-D (1.5 mg/L), BAP/2,4-D (1/1 mg/L) y Thidiazuron (0.5 mg/L).

Con estos resultados hacemos incapie en la importancia que tiene el ensayo de los diferentes reguladores de crecimiento vegetal dado que las respuestas morfogénicas presentadas o la capacidad de inducción de un explante depende de sus características genéticas, bioquímicas, fisiológicas y totipotenciales (Pierik, 1990).

6.4 Establecimiento de cultivo de células en suspensión

Para el cultivo de células en suspensión, se probaron 3 tratamientos distintos con reguladores de crecimiento vegetal que fueron los que presentaron mayor formación de callo y con las mejores

características morfológicas en medio sólido. De este experimento, se eligió el medio en donde la línea celular presento mejor uniformidad y crecimiento y fue Thidiazuron en una concentración de 0.5 mg/L.

En las primeras siembras las suspensiones celulares de *Tamarindus indica* L. presentaban una coloración marrón posiblemente por la liberación de compuestos fenólicos de los tejidos y la consecuente oxidación del medio de cultivo (Park, *et al.*, 2000), había también bastantes agregados celulares (microcallos) y no había uniformidad en el cultivo, a partir de la 5ta resiembra la oxidación comenzó a disminuir, hasta que se obtuvo una coloración más clara (Fig. 19) , los agregados disminuyeron y hubo una mayor homogeneidad en el cultivo.

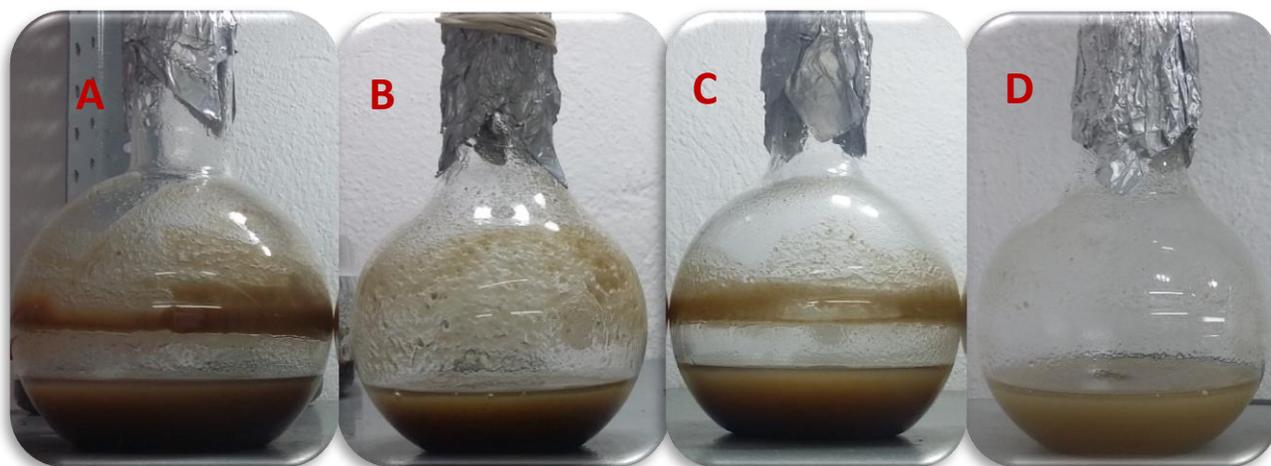


Figura 19 Comparación de la coloración del medio de cultivo de células en suspensión. A) Primera resiembra B) tercera resiembra C) Sexta resiembra D) novena resiembra.

6.5 Cinética de crecimiento

La Figura 20 corresponde a la curva de crecimiento de las células en suspensión de *Tamarindus indica* L. en medio MS en las condiciones establecidas previamente; puede apreciarse una fase de latencia de aproximadamente 5 días, una fase de crecimiento exponencial entre los días 5 y 14, dando un peso seco máximo de biomasa de 18.706 g, la fase estacionaria se observa entre los días 14 - 17 y una fase de decline a partir del día 17. La velocidad de crecimiento del cultivo fue de 0.187 g/día con una tasa de duplicación de 3.706 días.

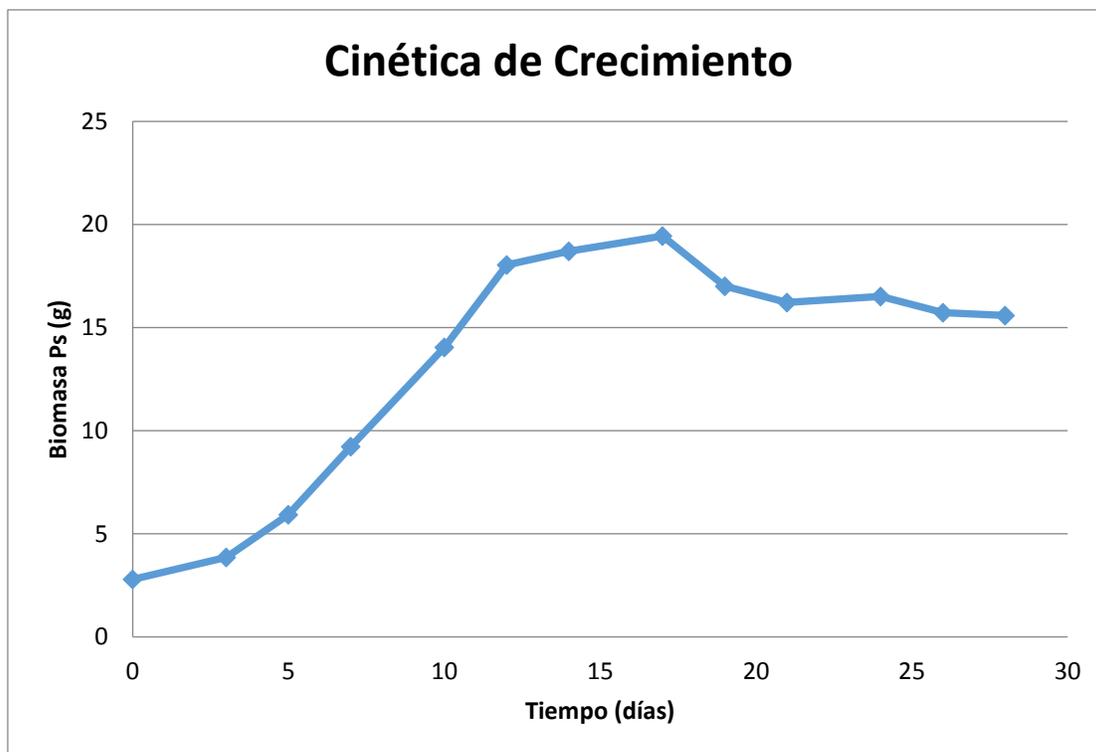


Figura 20 Grafica de la cinética de crecimiento de biomasa.

6.6 Análisis fitoquímico de los cultivos generados

El análisis fitoquímico se realizó a partir de extractos metanólicos de cada punto de la cinética con la finalidad de establecer el patrón de producción de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidantes.

6.7 Fenoles totales

La producción de fenoles en el cultivo de células de *Tamarindus indica* L. sigue la tendencia de la cinética de crecimiento celular, en donde se observa un aumento de la producción durante la fase exponencial y llegando a un punto máximo de 71.76 mgEqAG/g muestra, por lo que podemos decir que la producción de estos metabolitos está asociada al crecimiento, es decir hay producción y crecimiento celular simultáneos.

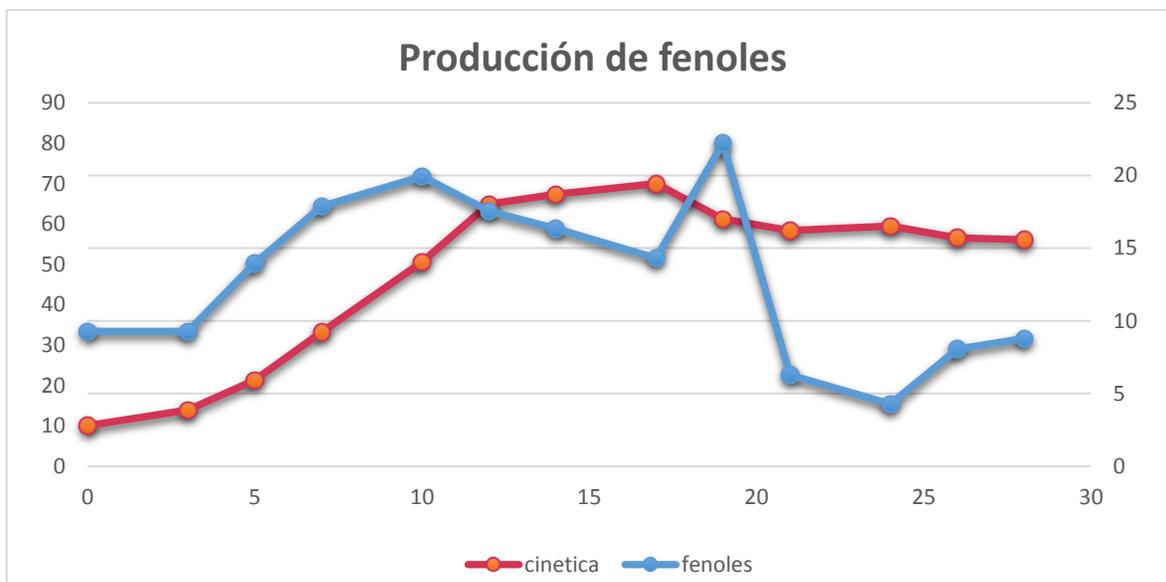


Figura 21 Grafica de producción de compuestos fenólicos.

En las investigaciones de Repo de Carrasco y col. (2008) se reporta que la cantidad de fenoles totales para frutas como papaya de monte y tropical es de 1.67 y 0.576 mgEAG/g respectivamente, así como de la tuna roja, cuya concentración es de 0.52 mgEAG/g; Si realizamos una comparación de la producción de fenoles por células de tamarindo con estas especies vegetales podemos darnos cuenta de que el tamarindo tiene una producción considerablemente mayor.

6.8 Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

Una de las formas habituales en las que se reporta la capacidad antioxidante es términos de porcentaje de inhibición del radical DPPH, en la figura 22 se muestra gráficamente la relación de la capacidad antioxidante del extracto de *Tamarindus indica L.* con la cantidad de fenoles totales encontrados en dicho extracto, como podemos observar, la relación entre ellos proporcional, a medida que aumenta el contenido fenólico, aumenta la capacidad de estos compuestos de inhibir el radical DPPH, hasta un punto máximo de 53.18% de inhibición.

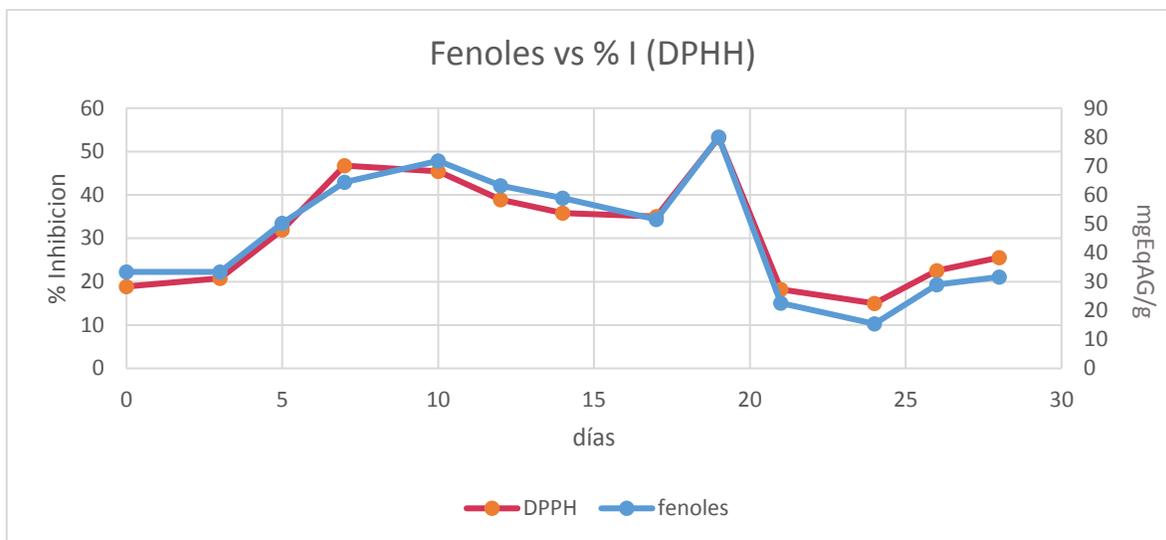


Figura 22 Grafica de comparación entre producción de fenoles e inhibición del radical DPPH.

En la literatura se encuentran reportados valores de capacidad antioxidante para diferentes frutos, Figueroa y Tamayo (2011) reportan que la capacidad antioxidante de la cascara de pitahaya (*Hylocereus undatus*) es de 31.51%; Repo de Carrasco reporta para el caso de la tuna naranja y verde porcentajes de 41,65% y 34.20% respectivamente, haciendo una comparación de los resultados obtenidos del extracto de tamarindo con estas frutas observamos que el tamarindo posee mayor capacidad antioxidante.

6.9 Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

La figura 23 muestra los valores en % de inhibición del radical ABTS para determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de células en suspensión de tamarindo, como podemos observar al igual que para el método por DPPH, la relación de la capacidad antioxidante con la cantidad de fenoles totales presentes es proporcional, dando como valor máximo un porcentaje de inhibición del 71.70 %.

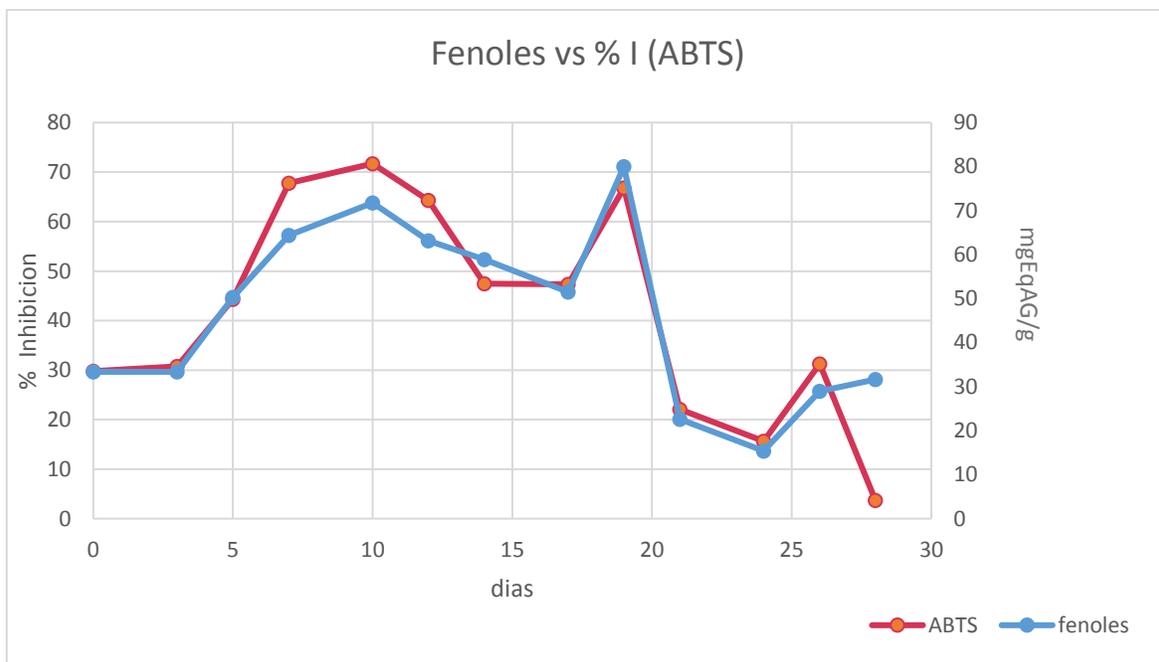


Figura 23 grafica de comparación de producción de fenoles con porcentaje de inhibición del radical ABTS.

En el estudio de Figueroa y col. (2011) se evaluó también el porcentaje de inhibición del radical ABTS por la cascara de pitahaya cuyo valor reportado es de 12.17%, siguiendo esta metodología, el extracto de células de tamarindo sigue presentando una ventaja considerable en cuanto a actividad antioxidante.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

- Se establecieron cultivos *in vitro* de *Tamarindus indica* L. tomando como fuente de explantes semillas.
- Se establecieron cultivos de callo, siendo el hipocotilo el explante que favoreció la mayor producción (100%).
- El regulador de crecimiento vegetal que promovió la mayor formación de callo con las mejores características morfológicas fue el thidiazuron en una concentración de 0.5 mg/L
- Se establecieron cultivos de células en suspensión de *Tamarindus indica* L.
- Los cultivos en suspensión no perdieron su capacidad natural de biosintetizar metabolitos con capacidad antioxidante, como lo son los fenoles.
- La producción de los compuestos antioxidantes por parte de los cultivos, está asociada al crecimiento.
- La producción de metabolitos con actividad antioxidante de *Tamarindus indica* L., tiene una alternativa viable en las metodologías desarrolladas por el “Cultivo de Tejidos Vegetales”.

CAPÍTULO 8. RECOMENDACIONES

- Aplicar un análisis fitoquímico más profundo y detallado a los cultivos generados, con la finalidad de identificar diferentes metabolitos de interés y con potencial uso por la industria alimentaria y farmacéutica.
- Realizar estudios de Elicitación para mejorar la producción de los metabolitos de interés.

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour A, Vincent Escalant Jean (1994). Conceptos Básicos Del cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial CEE. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=T9QOAQAIAAJ&pg=PP8&dq=cultivo+de+tejidos+in+vitro&hl=es&sa=X&ved=0CDAQ6AEwAmoVChMIqbDNza-kyAIVQdWACH2ebA->
- Aceves, L.A et al (2008). Estudio para determinar zonas de alta potencialidad del cultivo del tamarindo (*Tamarindus indica* L.) en el estado de Tabasco. SAGARPA. Consultado en línea: [http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2611/tamarindo\[1\].pdf](http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2611/tamarindo[1].pdf)
- AgroBio México (n.d) Biotecnología Verde. Disponible en: http://www.agrobiomexico.org.mx/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=22&Itemid=16#sthash.nizbxRIY.dpuf
- Amin, M.; Jaiswal, V. (1988). Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae* 36: 89-95.
- Azofeif Álvaro. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 153-175. 2009 ISSN: 1021-7444
- Barba AA, Luna RBS (2001). Micropropagación de plantas. Trillas. México, D.F 107pp.
- Baskin C, Baskin J (2001) SEEDS: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Editorial Academic Press. Pag 27-42
- Bennett, RN, Wallsgrove RM (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633
- Bourgaud, F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161:839-851
- Bourgaud, F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161:839-851
- Brad-Williams W., Cuveller ME., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LebensonWissTechnol – Food Science and Technology*. 25-30.
- Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plants Physiologists, Maryland

- Calva C, Rios L. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. Aspectos aplicados de la biotecnología. pag 267- 301.
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages,spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9, 3. doi:10.1186/1475-
- Carpita N., Mccann M. (2000). The cell wall. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pag. 52-108.
- Castillo A (n.d) Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA
- Chinou, I (2008) Primary, secondary metabolites, and their biological activity. En: Waksmundzka- Hajnos M, Sherma J, Kowalska T (Eds) *Thin layer chromatography in phytochemistry*, pp. 59-76. CRS Press, Boca Raton
- Collin HA, Edwards SG, (1998). *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers. Arts,I.C.W, “Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 5, pp. 1746–1751, 2000.
- Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (2007). ¿Por qué Biotecnología? Disponible en: <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=1>
- Cook, N. C. and Samman, S. “Review: flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources,” *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 7, no. 2, pp. 66–76, 1996
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) *Natural products: secondary metabolites*. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plants Physiologists, Maryland USA. pág. 1250- 1318.
- Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 6, pág. 271–278
- Cutler S, Rodríguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signal network. *Annual Reviews of Plant Biology*. Vol 61, pag 651-679
- Da Silva E. (2004), *The Colors of biotechnology: Science, Development and Humankind*. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol.7 No.3

- FAO (1991) Guía para la manipulación de semillas forestales. Capítulo 8. Tratamiento previo de la semilla. Disponible en línea: <http://www.fao.org/docrep/006/ad232s/ad232s10.htm>
- Farooq, S.A., Farooq, T.T (2003). Rapid Clonal Propagation of *Tamarindus indica* (L) Using Explants from Adult Trees. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(18): 1591-1592.
- Ferl R., Paul A. (2000). Genome organization and expression. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pag. 312-357.
- Figueiredo, SFL; Albarello, N; Viana, VRC. 2001. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JACQ.) BAILL. *In vitro Cellular and Development Biology – Plant* 37: 471-475.
- Figueroa, R., Tamayo, J., González, S., Moreno, G., Vargas, L. (2011). Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (*Hylocereus undatus*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 12, núm. 1, pp. 44-50 Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C. Hermosillo, México
- Fowler M. W. (1987). Products from plant cells. *Basic Biotechnology*. Academic Press, M., London, England. pag. 525-544.
- Garcia, JA (2013) Establecimiento de un Sistema de Regeneración *in vitro* de *Cempaxúchitl* (*Tagetes erecta*) Vía Organogénesis Indirecta. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.
- George, E. F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. En E. F. George, M. A. Hall y G. De Klerk (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. The Netherlands: Springer.
- Goossens, A, Häkkinen S, Laakso I, Seppänen- Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Söderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey K (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8595-8600
- Gurib-Fakim, A (2006) Medicinal plants: Tradition of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27:1-93
- Gutierrez, D.M., et al (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario Cerro de las Campanas, Querétaro México.
- Haberer G, Kieber JJ (2002) Ciytokinins. *New Insights in to Classic Phytohormone*. *Plant Physiology*. Vol 128 pag 354-362

- Heim, K., Tagliaferro, A., and Bobilya, D. "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 572–584, 2002.
- Kutaiba Ibrahim, A., & Mohamed Abdalkarim, M. (2012). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Antioxidant activity. *Journal of Pharmacy Research*, 5(8), 4013–4020.
- Liu, M.; Li, X. Q.; Weber, C.; Lee, C. Y.; Brown, J. and Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 50:2926-2930.
- 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
- McDonald, S. et al (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* Vol. 73 Pages 73-84
- Mehta, U., BARRETO, S., HAZRA, S. (2004) EFFECT OF THIDIAZURON IN GERMINATING TAMARIND SEEDLINGS. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 40(3):279-283. 2004
- Mehta, U., BARRETO, S., HAZRA, S. (2005) Thidiazuron-Induced Morphogenesis in Tamarind Seedlings. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41(3):240-243.
- Montoya, L. 1991. *Cultivos de Tejidos Vegetales*. Editorial EALON. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. Pag 77
- Morton, J.F. 1987. Tamarind. p. 115-121. *In: Fruits of warm climates*. Julia F. Morton, Miami, FL, USA. 2891-9-3
- Moscatiello, R., Baldan, B. & Navazio, L. (2013). Plant Cell Suspension Cultures. En Maathuis, F. J. M. (Ed.). *Plant Mineral Nutrients: Methods in Molecular Biology*. Vol. 953. Springer
- Moubayadin L, Di Mambro R, Sabatini S (2009) cytokinin an auxin crosstalk. *Trends in plant science*. Vol 14 No. 10, pag 557-562
- Mroginski, L (1993) *Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales*. Biotecnología y Mejoramiento vegetal II. Editorial INTA Argentina pag. 17
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, pag. 473-497.
- Nikolaeva, M (1969) *Physiology of Deep dormancy un sedes*. National Science Foundation, Washington, DC

- Olmos S, Luciani G (buscar año en el libro) Biotecnología y mejoramiento vegetal II. PARTE IV Métodos de propagación y conservación de germoplasma Capítulo 1 Micropropagación pag. 351-358
- Osuna, L., Tapia, M.E (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Ediciones de la Universidad de Barcelona. Pag 127
- Park, S. Y.; Murthy, H. N.; Paek, K. Y. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 63 (1): 67-72.
- Parrotta, J.A. 1990. *Tamarindus indica* L. Tamarind. SO-ITF-SM-30. New Orleans, LA: US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. Pag 5
- Pawan, K. Gulati, A. (1991). *In vitro* high frequency plant regeneration of a tree legume *Tamarindus indica* (L). *Plant Cell Reports* 10: 569-573.
- Piloto, J. et al (2008). *Tamarindus indica* L. ("tamarindo"): Evaluación del Potencial Mutagénico y Antioxidante. *Latin American Journal of Pharmacy.* 27 (3): 375-9 Güira de Melena. Cuba
- Piñol MT, Palazon J, Cusidó RM (2000) Introducción al metabolismo secundario. *Fundamentos de Fisiología Vegetal.* Editorial McGraw-Hill Interamericana, Barcelona, España pág. 261-283.
- Ramawat KG (2007) Secondary plant products in nature. *Biotechnology: Secondary metabolites.* Editorial Science Publisher, Enfiel, NH, USA. pág. 21-57.
- Rathore, G. S., Suthar, M., Pareek, A., & Gupta, R. N. (2011). Nutritional antioxidants : A battle for better health. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 2(1).
- Repo de carrasco R., Encina Z, C.R. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria. *Rev Soc Quím Perú.* 2008, 74, Nº 2 (108-124) Lima Perú
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Broamley, P. M. and Pridham, J. B. "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids," *Free Radical Research*, vol. 22, no. 4, pp. 375–383, 1995.
- Robert ML, Arce MM, Eastmond A (1993) Biotecnología vegetal. En: Biotecnología alimentaria., Edit Limusa, Mexico. pp 69-102.

- Roca W. (1991) Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Capitulo 2: Establecimiento de Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro. Editorial CIAT. Cali, Colombia pag 20
- Saini s, Sharma I, Kaur N, Pati PK. (2013) Auxin a master regulator in plant root development. *Plan Cell Reports*. Vol 32, No 6 Pag 741-757
- Sajc, L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal* 4:89-99
- Sarin, R (2005) Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology* 4:79-93
- Shilpa, K, Varun K, Lakshmi BS (2010). An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J Plant Sci* 5:222-247
- Soto H. Marcos Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*lippia graveolens* hbk var. *berlandieri schauer*) *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30 (2007) 43-49
- Staba EJ (1982) *Plant tissue culture as a Source of Biochemicals*. CRC Press. Florida
- Street H.1977). *Cell (suspension) cultures techniques*. *Plant tissue and cell culture*. Blackwell Scientific Publishing, Oxford., England. pag. 61-102.
- Tomás-Barberán, F. and Clifford, M. N. “Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, pp. 1073–1080, 2000.
- Torrey, J.G y Reinert, J. (1961). Suspension cultures of higher plant cells in synthetic media. *Plant Physiol*. 36:483-491.
- 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
- Trujillo Navarrete, E (1986). *Manual general sobre el uso de semillas forestales*. Editorial Instituto Nacional de los Recursos Naturales Renovables y del Medio Ambiente (INDERENA). Bogotá Colombia
- Twyman R. M., STOGER E., SCHILLBERG S., CHRISTOU P., FISCHER R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, pag. 570-578.
- Vanisree, M, Lee C-Y, Lo S-F, Nalawade SM, Lin CY, Tsay H-S (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica* 45:1-22

- Vanneste S, Friml J. (2009) auxin a trigger for change in plant development. Cell. Vol. 136, pag 1005-1006
- Villalobos VM, Thorpe Ta (1991) Micropropagacion: conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Editorial CIAT Cali, Colombia pag 127-141
- Viveros, J.C. et al (2012). Sistemas de manejo y comercialización de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) en tres municipios de Veracruz*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas vol.3 no.6 Texcoco Estado de México. Versión en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000600012
- Weiss D, Ori N (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellins and other hormones. Plant physiology. Vol 144, pag 1240-1246
- Wink, M (2007) Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, pp. 97-116. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Yamaguchi S (2008) Gibberellin Metabolism and its Regulation. Annual Review of Plant Biology. Vol 59, pag 225-251
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J. et al., "Flavonoids in food and their health benefits," Plant Foods for Human Nutrition, vol. 59, no. 3, pp. 113–122, 2004.
- Zapata, C., Cardona M. (2014) "Estudio de la biodisponibilidad de los antioxidantes hidrosolubles tipo flavonoides para su utilización en la industria de las bebidas" Corporación Universitaria Lasallista. Caldas Antioquia

CAPÍTULO 10. ANEXOS

ANEXO 1

Solución fungicida (antibióticos)

	Cantidad
Ampicilina	1000 mg/L
Kanamicina	100 mg/L
Tetraciclina	100 mg/L
Cloranfenicol	100 mg/L
Neomicina	100 mg/L
Picloran	10 mL
Benimilo	100 mg/L
Fosfato de sodio	210 mg/L
Cloruro de sodio	850 mg/L
Ketoconazol	1000 mg/L
Dihydro-estreptomicina	100 mg/L

Se mezclan todas las sustancias y se disuelven; para facilitar la disolución se recomienda moler en el mortero las pastillas hasta obtener un polvo.

Aforar a 1 litro con agua destilada y almacenar en refrigeración.

ANEXO 2

MEDIO MS + antioxidantes

	Concentración
Macronutrientes	100 mL/L
Fe-EDTA	5 mL/L
Vitaminas	1 mL/L
Micronutrientes	1 mL/L
Sacarosa	30 g/L
Ácido cítrico	150 mg/L
Ácido Ascórbico	150 mg/L
Carbón activado	500 mg/L
Phytigel	2.6 g/L

ANEXO 3

Solución Antioxidante

	Cantidad
Ácido cítrico	150 mg/L
Ácido ascórbico	150 mg/L
Polivinilpirrolidona (PVP)	500 mg/L

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L; posteriormente esterilizar a 121 °C (presión) por 15 minutos.

ANEXO 4

Determinación de Fenoles totales

Solución de carbonato anhidro 20% p/v

- Pesar 20g de carbonato de sodio anhidro y disolverlo en 80ml de agua destilada hirviendo
- Enfriar a T ambiente y almacenar durante 24 horas
- Filtrar la solución y aforar a un volumen de 100 mL con agua destilada.
- Almacenar en frasco ámbar.

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

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. Como blanco se utilizó agua destilada

Concentraciones de la curva patrón de Ácido Gálico

No. De tubo	Concentración de Ac. Gálico (mg/mL)	Ac. Gálico (µL)	Agua destilada (µL)	Volumen Total (µL)
Blanco	0	0	200	200
1	0.02	40	160	
2	0.04	80	120	
3	0.06	120	80	
4	0.08	160	40	
5	0.1	200	0	

Se colocaron en tubos de ensaye las soluciones de ácido gálico, se agregaron 100 µL reactivo de Folin-Ciocalteu, se homogenizo la mezcla y se dejó reposar 8 minutos en obscuridad. Pasado ese tiempo se colocaron 200 µL de carbonato de sodio anhidro 20% p/v y 1500 µL de agua destilada a cada tubo, se homogenizaron en un vortex y se dejaron reposar una hora a temperatura ambiente y en obscuridad. Leer absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS).

Para la determinación en las muestras, se tomó una alícuota de 200 µL del extracto obtenido y se realizó el mismo procedimiento que para los puntos de la curva.

Para el cálculo de la concentración de fenoles totales tenemos que:

$$\text{Ácido gálico (mg/ml)} = ((D.O. + b)/m) * FD$$

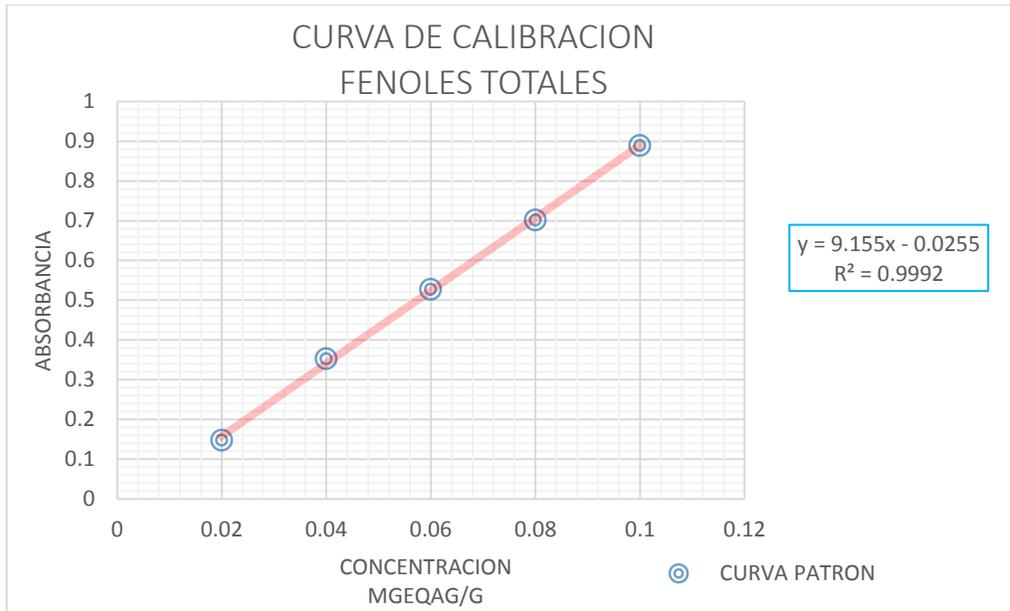
Donde

b = ordenada al origen

m = pendiente

FD = factor de dilución

Curva de calibración



ANEXO 5

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

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.

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

En tubos de ensayo protegidos de la luz se colocaron 100 μ L de la solución TROLOX a las diferentes concentraciones y se agregaron 3.9 mL de la solución DPPH 0.1 mM, se homogenizaron y se dejaron en reposo por 30 min en obscuridad. 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 μ L del extracto obtenido y se realizó el mismo procedimiento que para los puntos de la curva.

Por último se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula mostrada a continuación:

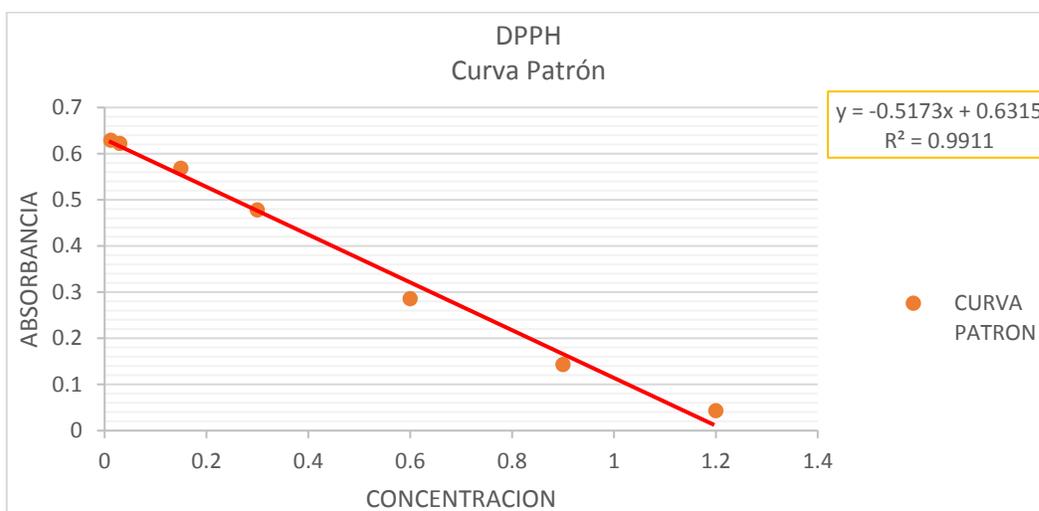
$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Donde:

Ab= absorbancia del blanco a 515 nm

Am=absorbancia de la muestra a 515 nm

CURVA DE CALIBRACION DEL RADICAL DPPH



ANEXO 6

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ABTS

Se preparó una solución stock de ABTS 7 mM en metanol la cual se mantuvo 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 µl respectivamente, para hacer una nueva mezcla, la cual se almaceno en un frasco ámbar y se dejó reposar en refrigeración durante 12 horas como mínimo. Pasado ese tiempo se midió la observancia y se hicieron diluciones en metanol hasta obtener una absorbancia de 0.74 a 734 nm.

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).

En tubos de ensaye protegidos de la luz se colocaron 100 µL de cada solución de TROLOX por separado y 3 mL de la solución ABTS (con absorbancia 0.74) se homogenizaron y se mantuvieron en obscuridad 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:

$$\% \text{ inhibición} = (A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) \times 100 / A_{\text{blanco}}$$

En donde A_{blanco} es la absorbancia del testigo (ABTS); A_{muestra} es la absorbancia obtenida de cada muestra (o punto de la curva patrón).

CURVA DE CALIBRACION ABTS

