

ESTUDIO MICROMORFOLOGICO, ESTRUCTURAL Y
CARACTERIZACION MOLECULAR DE LAS RESERVAS DE SEMILLAS DE
Scutellaria incarnata Vent.



LEYDY LORENA MENDOZA TOBAR.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2010

ESTUDIO MICROMORFOLOGICO, ESTRUCTURAL Y
CARACTERIZACION MOLECULAR DE LAS RESERVAS DE SEMILLAS DE
Scutellaria incarnata Vent.



LEYDY LORENA MENDOZA TOBAR.

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

DIRECTOR:

Ms. NELSON BOLIVAR ROJAS MARTINEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2010

NOTA DE ACEPTACIÓN

Mg. Nelson Bolivar Rojas Martinez
Director Trabajo de Grado

Lic. Bernardo Ramirez
Jurado

Mg. Diego Macias
Jurado

Fecha de sustentación: Popayán, 16 de Marzo 2010.

DEDICATORIA

A Dios.

Por darme la fortaleza para levantarme y seguir adelante, ante cada obstáculo, Por llenarme de bendiciones y mostrarme el camino que me ha traído hasta el cumplimiento de una de mis primeras metas.

A mi Familia.

Por su apoyo incondicional y por su voz de ánimo que me daban impulso para seguir adelante, por creer en mi y estar siempre conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Cauca, especialmente al grupo de investigación en Celular y Molecular CELMOLEC, por permitirme realizar mi trabajo y facilitarme los recursos para llevarlo a cabo.

A los profesores pertenecientes al programa de Biología de la Universidad del Cauca, que compartieron sus conocimientos a los largo de 5 años, lo cual ha hecho posible que llegue a la primera meta de un largo camino que me espera por recorrer.

A la Universidad de Nariño y al centro de investigaciones del café CENICAFE, por permitirme la realización de técnicas moleculares avanzadas, que hicieron posible la obtención de algunos resultados.

CONTENIDO

1. INTRODUCCION	10
2. JUSTIFICACION	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 OBJETIVO GENERAL	13
3.2 OBJETIVO ESPECIFICO	13
4. MARCO TEORICO	14
4.1 UBICACIÓN TAXONOMICA DE <i>Scutellaria incarnata</i> Vent	14
4.1.1 Familia <i>Lamiaceae</i> (Labiadas).	14
4.1.2 Género <i>Scutellaria</i>	15
4.2 . DISTRIBUCION EN COLOMBIA	15
4.3 . CICLO DEL DESARROLLO DE LAS ANGIOSPERMAS	20
4.4 . LA SEMILLA.....	21
4.4.1 Embrión	21
4.4.2 Testa.....	22
4.4.3 Endospermo.	23
4.4.3.1 Carbohidratos.	24
4.4.3.2 Lípidos	24
4.4.3.3 Proteínas	26
4.5 PROPAGACIÓN DEL LAS PLANTAS DEL GENERO <i>Scutellaria</i>	26
4.6 DORMANCIA DE SEMILLAS	27
5. METODOLOGÍA	29
5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO SEM	29
5.2 HISTOLOGÍA	30
5.3 CARBOHIDRATOS	31
5.4 LÍPIDOS	32
5.5 PROTEÍNAS	34
6. RESULTADO Y DISCUSION DE RESULTADOS	35
6.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO SEM E HISTOLOGIA	35
6.2 CARBOHIDRATOS	39
6.3 LÍPIDOS	41

6.4 PROTEÍNAS	44
7. CONCLUSIONES	52
8. BIBLIOGRAFIA	54
9. ANEXOS	59

TABLAS

Tabla 1. Distribución geográfica de <i>Scutellaria incarnata</i> . Vent. en Colombia	16
Tabla 2. Distribución geográfica de <i>Scutellaria incarnata</i> Vent. en el Cauca según Registros del CAUP	19
Tabla 3. Algunos ácidos grasos asociados con plantas	25
Tabla 4 Abundancia de los ácidos grasos importantes en hortalizas comerciales	26
Tabla 5. Azúcares Detectados en la Muestra de Semilla de <i>Scutellaria incarnata</i> vent. ..	39
Tabla 6. Ácidos grasos encontrado en la Muestra lipídica de Semilla de <i>S.incarnata</i> . Extracción en Frío.	42
Tabla 7. Absorbancia y cálculos para la determinación de la concentración de carga de muestra para la electroforesis	44
Tabla 8. Determinación de la concentración de carga de de muestra para la electroforesis	45
Tabla 9. Cálculos para la obtención de la Movilidad Relativa de la Bandas obtenidas en el gel de agarosa	46
Tabla 10. Datos para la obtención de la curva de calibración con los marcadores moleculares	47
Tabla 11. Datos para la determinación del peso molecular teniendo en cuenta la ecuación de la recta.....	48

FIGURAS

Fig 1 Micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	35
Fig 2 Histología	37
Fig 3 Cromatograma de HPLC de azúcares para la muestra de <i>S. incarnata</i> Vent	39
Fig 4. Cromatograma de la Muestra lipídica de semilla de <i>Scutellaria incarnata</i>	41
Fig 5 Movilidad relativa de cada una de las bandas observadas tanto para la muestra de <i>Scutellaria incarnata</i> Vent., como las del marcador molecular.	46
Fig 6 Curva de calibración de marcadores Moleculares teniendo en cuenta Log del peso molecular Vs Movilidad Relativa	47
Fig 7. Peso Molecular aproximada de las proteínas observadas en el electroferograma de la extracción proteínica de <i>Scutellaria incarnata</i> Vent.....	49

1. INTRODUCCION

El género *Scutellaria* pertenece a la familia *Lamiaceae*, de distribución cosmopolita que comprende alrededor de 350 especies (Vargas, 2002).

Este género ha adquirido una gran importancia en el campo médico, después de numerosos estudios de los principios activos de diversas especies, los cuales han sido utilizados para tratamiento de enfermedades y sintomatologías como antidepresivo (Joshee, *et al.* 2002), anticancerígenos (Bonham, *et al.* 2005; Liu, *et al.* 2003; Wozniak, 2004 ; Ong, *et al.* 2005; Ikemoto, *et al.* 2000; Shieh, *et al.* 2000); antiinflamatorios (Chi, *et al.* 2003; Shen, *et al.* 2003), protectores del hígado (Jang, *et al.* 2003), Antibacterianos (Liu, *et al.* 2000; Yang, *et al.* 2005), y para el tratamiento del VIH (Li, *et al.* 1993).

En Colombia se encuentra la planta ***Scutellaria incarnata*** Vent., especie nativa perteneciente a este género, distribuida ampliamente en Antioquia, Caldas, Cauca, Cundinamarca, Huila, Nariño, Putumayo y Tolima; según registros del Missouri Botanical Garden (2008).

La planta ***Scutellaria incarnata*** Vent., Es una especie arvense de amplia distribución en la meseta de Popayán y sus alrededores (1000 – 1900 msnm), según registros del Missouri Botanical Garden (2008). Comúnmente se conoce en el Cauca y en diferentes partes del país como “alegría” y otras especies de este género como “alegría de monte” por sus características antidepresivas, las cuales son de gran valor medicinal (Austin, 2002).

Debido a su importancia medicinal, se requiere una masificación del cultivo lo cual se ha dificultado debido al bajo porcentaje de germinación que presenta la semilla y que ha sido reportada por los cultivadores de la planta y comprobado después

de varios ensayos realizados en el laboratorio, relacionados con procesos de activación ya establecidos como solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). Estos procesos mostraron prácticamente la inviabilidad de la germinación de la semilla bajo las condiciones anteriormente nombradas; Por lo tanto, se requiere una investigación exhaustiva de la semilla tratando de encontrar los posibles causantes de este bajo porcentaje germinativo.

Por lo anteriormente dicho, la importancia del trabajo radica en entender mediante los estudios celulares y moleculares, los posibles procesos metabólicos o estructurales que dificultan la germinación de esta especie.

Inicialmente se realizó la caracterización micromorfológica, histológica e histoquímica, por medio de las técnicas de microscopia de barrido SEM, inclusión en parafina y tinciones histoquímicas como shiff, safranina, fast green, tinción de yodo y sudan III, respectivamente; Posteriormente la cualificación y cuantificación a nivel molecular de los componentes de semilla tales como lípidos, proteínas, proteínas totales y azúcares, por medio de técnicas como la electroforesis, cromatografía de gases y espectroscopia, para una mejor interpretación de eventos metabólicos implicados en los procesos de germinación, y finalmente se obtuvieron resultados que puedan contribuir a nivel académico y científico para lograr la masificación del cultivo y posteriores investigaciones en el campo Medicinal, Molecular, entre otros. Debido a que a nivel bibliográfico es mínima la literatura que se puede encontrar, en cuanto a investigaciones a nivel fisiológico, estructural y medicinal, en esta especie nativa del país.

2. JUSTIFICACIÓN

Este estudio se realizó con el fin de caracterizar morfológicamente, histoquímicamente y a nivel molecular, la semilla de *Scutellaria incarnata* Vent., debido a que presenta un bajo porcentaje de germinación (según pruebas de laboratorio CELMOLEC de la Universidad del Cauca) que se podría explicar mediante esta investigación y a su vez, teniendo en cuenta la importancia medicinal (Austin, 2002) y la necesidad de masificación de la producción.

Además es importante recalcar que a nivel bibliográfico es mínima la literatura que se puede encontrar en cuanto a investigaciones a nivel fisiológico, estructural y medicinal, de la planta *Scutellaria incarnata* Vent., especie nativa del país, por lo tanto, por medio de este estudio se pretende contribuir a nivel académico y científico, con el fin de que sea de gran ayuda para posteriores investigaciones sobre esta especie.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización micromorfológica de la semilla de *Scutellaria incarnata* Vent., y sus principales componentes de reserva a nivel molecular.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar un estudio morfológico o anatómico mediante técnicas histológicas e histoquímicas, de la semilla de *Scutellaria incarnata* Vent.

Determinar de forma cuantitativa y cualitativa proteínas, azúcares, almidones y lípidos.

Proponer explicaciones preliminares que contribuyan al esclarecimiento de los mecanismos fisiológicos, celulares y moleculares que impiden la germinación de la semilla.

4. MARCO TEORICO

4.1. UBICACIÓN TAXONÓMICA DE *Scutellaria incarnata* Vent

Scutellaria incarnata Vent, es una especie perteneciente a la clase Magnoliopsida, subclase Asteridae; Orden Lamiales, familia Lamiaceae o Labiatae y al género *Scutellaria*, el cual está compuesto de alrededor de 300 especies.

La sinonimia que ha sido reportada en la base de datos de Missouri Botanical Garden: *Scutellaria amarantina* Planch. & Linden ex Galeotti (1858), *Scutellaria lehmannii* Regel. (1884), *Scutellaria scarlatina* Planch., Linden ex Lem. (1855), *Scutellaria trianae* Planchon & Linden, (1851-57), *Scutellaria trianae* Planch. & Linden (1856), *Scutellaria ventenatii* Hook. (1846).

En la colección iconográfica de la Expedición Botánica aparecen representadas seis especies del género (*S. racemosa*, *S. pseudocoleus*, *S. purpurascens* subsp. *verecunda*, *S. ventenata*, *S. incarnata* y *S. coccinea*); de las mismas existen pliegos en el Herbario de Mutis del Real Jardín Botánico de Madrid, y algunos duplicados en el herbario US y una en el herbario de Linneo en Londres, la cual proviene de los envíos efectuados por Mutis a Suecia (Savege, 1945)

Scutellaria incarnata se encuentra citada en el folleto de estudios de mercadeo mundial para plantas medicinales como una planta utilizada para trastornos del sistema nervioso (Antidepresivo) (Austin, 2002)

4.1.1. Familia *Lamiaceae* (Labiadas). Familia formada por hierbas pequeñas o subarbustos, más o menos glandulosas y aromáticas. Tienen hojas simples por lo común, sin estípulas y opuestas. Las flores son zigomorfas y se reúnen en cimas en las axilas de las brácteas formando un pseudovercilo o verticilastro, que se

reúnen a su vez en inflorescencias de tipo espiga reunidas en racimos, corimbos o panículas, raramente en cimas verdaderas; las brácteas son similares a las hojas. El cáliz está formado por cuatro o cinco lóbulos a menudo dispuestos en dos labios, el superior con tres dientes y el inferior con dos.

La corola es simpétala, con el limbo 5-lobulado, y al igual que el cáliz muchas veces bilabiado, teniendo el labio superior 2 lobulos y el inferior 3, aunque en algunas especies el lóbulo inferior está formado por los 5 lóbulos. El androceo consta de 4 estambres didínamos, raramente 2, y el gineceo tiene un ovario súpero, bicarpelar, que externamente parece tetralobulado; el estilo es simple, normalmente ramificado en el ápice y gimnobásico. El fruto está formado por 4 núculas de una semilla (Croquist, 1981; Croquist, 1988, Glimn-lacy, y Jaufman, 2006).

4.1.2 Género *Scutellaria*. Según el Catálogo de especies vegetales amenazadas de la comunidad extremeña (2009), el género *Scutellaria* son hierbas perennes, rizomatosas, hojas simples, alternas. Inflorescencia en racimos densos. Flores de tubo campanulado, de pétalos soldados y con corola bilabiada. Estambres 4 paralelos. Fruto en cápsula; Se extiende en regiones templadas y en montañas tropicales. La mayoría son plantas herbáceas anuales o perennes de 5 cm a 1 metro de altura, algunos son subarbustos, otros son acuáticos. Tiene tallos con hojas opuestas y decusadas. El género es fácilmente reconocible por la típica protección del cáliz que ha propiciado su nombre.

4.2 DISTRIBUCION EN COLOMBIA

Scutellaria incarnata es una planta silvestre de amplia distribución en Colombia, especialmente en la meseta de Popayán y sus alrededores, lo cual podemos encontrar reportado en la base del Missouri Botanical Garden (2008) y en los registros de la colección herbario de la Universidad del Cauca CAUP (Tabla 1 y 2)

Tabla 1. Distribución geográfica de *Scutellaria incarnata* en Colombia

PAIS	DEPTO.	LOCALIDAD	ELEVACION	LATITUD	LONGITUD	FECHA	COLECTORES	Nº COL	INSTITUCIÓN
<u>Colombia</u>						22 July 1928	Toro, R.A.	<u>1370</u>	NY
<u>Colombia</u>	<u>Antioquia</u>	<u>Valparaiso</u>					Rafael Toro	<u>1370</u>	MEDEL
<u>Colombia</u>	<u>Caldas</u>		1300 - 1500 m			31 Aug. 1922	Francis W. Pennell	<u>10181</u>	GH
<u>Colombia</u>	<u>Cauca</u>					14 April 1876	André, E.	<u>2740</u>	NY
<u>Colombia</u>	<u>Cauca</u>		1000 - 1200 m			19 Jan. 1884	Lehmann, F.C.	<u>3449</u>	BM
<u>Colombia</u>	<u>Cauca</u>		1000 m			1851 - 1857	Triana, J.	<u>2032</u>	BM
<u>Colombia</u>	<u>Cauca</u>	<u>Popayán</u>	2800 m			1851 - 1857	Triana, J.	<u>2033</u>	BM
<u>Colombia</u>	<u>Cauca</u>	<u>Popayán</u>	1700 - 1800 m	02°26'00"N	075°37'00"W		Lehmann, F.C.	<u>7865</u>	F
<u>Colombia</u>	<u>Cauca</u>	<u>Popayán</u>	1650 - 1750 m	02°26'00"N	075°37'00"W	12 July 1922	Pennell, F.W. & E.P. Killip	<u>8285pp</u>	GH

<u>Colombia</u>	<u>Cundinamarca</u>		1300 m	04°36'00"N	074°05'00"W	1851 - 1857	Triana, J.	<u>8028b</u>	BM
<u>Colombia</u>	<u>Cundinamarca</u>	<u>Arbelaez</u>	1000 - 1010 m	04°11'00"N	074°25'00"W	2 Aug. 1987	Fuertes, J. et al.	<u>146</u>	NY
<u>Colombia</u>	<u>Cundinamarca</u>	<u>Fusagasuga</u>	1000 - 1200 m	04°20'00"N	074°22'00"W	30 Nov. 1917	Francis W. Pennell	<u>2752</u>	GH, NY
<u>Colombia</u>	<u>Cundinamarca</u>	<u>Fusagasuga</u>		04°20'00"N	074°22'00"W	23 Dec. 1852	Isaac F. Holton	<u>489</u>	NY
<u>Colombia</u>	<u>Cundinamarca</u>	<u>Pandi</u>	1800 - 2000 m	04°11'00"N	074°29'00"W	1 Dec. 1917 - 3 Dec. 1917	Francis W. Pennell	<u>2823</u>	NY
<u>Colombia</u>	<u>Cundinamarca</u>	<u>Soacha</u>	2100 m	04°35'00"N	074°13'00"W	1983	Wood, J.R.I.	<u>3988</u>	F
<u>Colombia</u>	<u>Cundinamarca</u>	<u>Viota</u>	1500 m	04°26'00"N	074°31'00"W	1983	Wood, J.R.I.	<u>3788</u>	NY
<u>Colombia</u>	<u>Cundinamarca</u>	<u>Viota</u>	1500 - 1600 m	04°22'00"N	074°30'00"W	30 dic. 1967	Uribe Uribe, L.	<u>6042</u>	MO, NY
<u>Colombia</u>	<u>Cundinamarca</u>	<u>Zipacón</u>	2100 m	04°45'00"N	074°28'00"W	16 Oct. 1989	Alonso, F. & J.L.	<u>8193</u>	BM, NY
<u>Colombia</u>	<u>Huila</u>	<u>Colombia</u>	1400 - 1500 m	03°22'00"N	074°48'00"W	29 Abril 1989	Llanos H., F. & J. Camacho	<u>1420</u>	MO
<u>Colombia</u>	<u>Huila</u>	<u>Neiva</u>	1500 - 2000 m			1 Aug. 1917 - 8 Aug.	Henry H. Rusby & Francis W.	<u>587</u>	NY

						1917	Pennell		
<u>Colombia</u>	<u>Huila</u>	<u>Neiva</u>	800 - 1000 m	02°55'00"N	075°19'00"W	13 July 1917	Henry H. Rusby & Francis W. Pennell	<u>422</u>	GH, MO, NY
<u>Colombia</u>	<u>Narino</u>	<u>Pasto</u>	2000 - 2200 m	01°25'00"N	077°05'00"W		Lehmann, F.C.	<u>6174</u>	F, MO
<u>Colombia</u>	<u>Putumayo</u>	<u>Mocoa</u>	1350 - 1420 m	01°12'00"N	076°38'00"W	20 Abril-1 Mayo 1994	J. Fernandez et al.	<u>10746</u>	COL, MO
<u>Colombia</u>	<u>Tolima</u>		800 - 1000 m	03°24'00"N	074°51'00"W	29 Dec. 1917 - 30 Dec. 1917	Francis W. Pennell	<u>3500</u>	NY
<u>Colombia</u>	<u>Tolima</u>		2200 m			9 Jan. 1883	Lehmann, F.C.	<u>2338</u>	BM
<u>Colombia</u>	<u>Tolima</u>	<u>Venadillo</u>		04°47'00"N	075°03'00"W	1 Agosto 1991	F.J. Roldan, W. Quinones & G. Cardona	<u>1630</u>	HUA, MO

Tomado de la Base de datos del Missouri Botanical Garden (2009)

Tabla 2. Distribución geográfica de *Scutellaria incarnata* en el Cauca según Registros del CAUP

Localidad	Elevación msnm	Latitud	Longitud	Fecha	Colectores	N° Colección
Bolívar	1777			18 Julio 2001	E.L Muñoz	018
Cajibío	1800			25 Abril 2003	S. Camargo. R	0010
Cajibío	1700			6 Oct. 2005	N. Otálora	0035
El Tambo	1760			25 Julio 1996	EMG	88A
El Tambo	1300			29 Abril 1999	C.E. Gonzales	1.482
El Tambo	1410			01 Nov 2003	L.D. Jaramillo R. & J.A Sánchez C	005
La Sierra	1500	02°9'24"N	74°12'15"W	10Feb 2005	W.O. Castillo O	020
Piendamó	1820			14 Oct de 2002	Carlos E. Ceballos	017
Popayán	1800-1850	02°26'74"N	076°35'66"W	02 Nov. 2000	B.R.Ramirez P.	13.617
Popayán	1920	02°30'42"N	076°31'42"W	23 junio 2001	Edith Chito C., C. Feullet, B. Ramírez & D. Macías	106
Popayán	1750	02°26'N	076°37'W	29 Junio 2001	B.R. Ramírez P.	14.211
Santa Rosa	1695			16 Mayo 2004	S.L Cabezas	009

Registros del Herbario de la Universidad del Cauca CAUP (2010)

4.3 CICLO DEL DESARROLLO DE LAS ANGIOSPERMAS

Las angiospermas (del griego «angion»: Vaso recipiente, y «esperma»: semilla) son plantas cuyos óvulos están encerrados en el ovario. Los órganos reproductores son las flores. El esporofito, que es un árbol, una mata o una hierba es la generación diploide. En él se forman unas estructuras especializadas en donde ocurre la meiosis, con reducción del número de cromosomas, dando lugar a las meiosporas, que son haploides. Estas, al dividirse originan el gametofito, haploide, en donde se diferencian unas estructuras reproductoras que dan lugar a los gametos. Las meiosporas masculinas (microsporas) originan el gametofito masculino, que es el grano de polen (Fuentes, 2001).

La polinización consiste en el traslado de los granos de polen desde los estambres hasta el estigma de los carpelos. Los agentes polinizadores más importantes son el viento y los animales. En el primer caso las flores carecen de vistosidad y producen gran cantidad de polen. En el segundo caso las flores atraen a los animales polinizadores (entre los que destacan los insectos) mediante varios procedimientos: son vistosas, emiten fragancia o segregan un líquido azucarado —el néctar— que sirve de alimento a los animales polinizadores (Fuentes, 2001).

Cuando el grano de polen cae sobre el estigma de una flor de la misma especie (o de otra afín a ella) emite una prolongación (tubo polínico) que se introduce por el hueco del estilo, llega al ovario y penetra en el óvulo. Al final de esa prolongación se forma una estructura reproductora que origina los gametos masculinos. Cada grano de polen da lugar a dos gametos masculinos. Las meiosporas femeninas (megasporas) originan el gametofito femenino, que es el saco embrionario —situado en el cuerpo central del óvulo— que al madurar da lugar al gameto femenino, llamado ovocélula. En las angiospermas ocurre una doble fecundación: Uno de los gametos masculinos se une a la ovocélula para formar el cigoto, que inicia de nuevo una generación del esporofito: primero en estado embrionario, el

embrión contenido en el interior de la semilla— y posteriormente en estado de árbol, mata o hierba. El otro cigoto masculino se une a otros núcleos del gametofito femenino para formar el tejido nutricional (endosperma) de la semilla (Fuentes, 2001).

4.4 LA SEMILLA

Las semillas son las unidades de reproducción sexual de las plantas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen. Es la fase de la vida de la planta mejor adaptada para resistir condiciones adversas; en las plantas anuales es la única fase que perdura durante la estación desfavorable. La semilla, además, hace posible el desplazamiento del embrión con respecto a la planta donde se originó, lo que le permite colonizar nuevos espacios (Fuentes, 2001).

A nivel morfológico se puede denominar como un óvulo maduro y fertilizado contenido dentro del fruto que se compone de las siguientes partes: una cubierta o testa que protege las partes internas. El endospermo o tejido de reserva o alimento, que en muchas semillas rodean a los cotiledones o al embrión (Villareal, 2002).

Estas tres partes genéticamente diferentes interactúan de forma cercana durante el desarrollo y la germinación de la semilla (Kingel y Galili, 1995).

4.4.1. Embrión. Cuando el embrión está completamente formado, este básicamente se compone de un eje hipocótilo-radícula con uno o dos cotiledones y con un meristema apical caulinar y un meristema apical radicular. Los cotiledones de la mayoría de las dicotiledóneas son carnosos y contienen las reservas alimenticias de la semilla. En otras dicotiledóneas y en la mayoría de las monocotiledóneas los nutrientes se encuentran en el endosperma, y los cotiledones absorben los nutrientes digeridos de este endosperma. Luego los

nutrientes digeridos se transportan a las zonas del embrión que están creciendo (Santamarina, 2005).

4.4.2. Testa. La testa consiste en una serie de tipos de células maternas especializadas, que proporcionan una importante interfase entre el embrión y el medio externo, durante la embriogénesis, dormancia y germinación. La diferenciación de la testa desde el integumento del ovulo, incluye uno de los más dramáticos cambios celulares observados durante el desarrollo de la semilla y culmina en la muerte programada de las células de la testa. Incluso en la muerte, los tipos de células especializadas imparten protección, mejoran la latencia y la germinación y aumentan la dispersión de las semillas.

Algunas diferencias entre las distintas plantas, en cuanto a la cubierta de la semilla pueden ser inferidas de diferencias en la estructura del óvulo, tales como el número y espesor de los tegumentos y disposición de los tejidos vasculares. Sin embargo algunos óvulos similares pueden llegar a ser muy diferentes durante el desarrollo. Pueden existir variaciones en la intensidad de la destrucción celular; en el grado de esclerificación y distribución de las células mecánicas; en la disposición de colorantes y otras sustancias orgánicas, y en la diferenciación de tricomas especializados tales como pelos, papilas y ganchos. La epidermis de la semilla desarrolla frecuentemente membranas muy gruesas y se llena de materia colorante.

Las semillas están también protegidas por cutículas que se originan en el óvulo. Las cutículas de la semilla forman usualmente una membrana continua (probablemente interrumpida en la región hilar) la cual incluye el embrión y el endospermo asociado.

4.4.3. Endospermo. Forma el tejido de almacenamiento de alimento de la semilla, no promueve solamente el crecimiento y longevidad de la semilla, sino

que también facilita la dispersión, con un atractivo para los animales. Las semillas contienen cantidades relativamente importantes de reservas alimenticias, que permitirán el crecimiento y el desarrollo de la plántula, hasta que esta sea capaz de alimentarse por si misma. Estas reservas se encuentran en su mayor parte, formando cuerpos intracelulares que contienen lípidos, proteínas, carbohidratos y compuestos inorgánicos (Breijio, 2006).

Según el tipo de compuesto que almacenan, existen grandes diferencias entre las semillas. Así, en cereales predominan los hidratos de carbono, especialmente almidón, aunque también contienen proteínas y lípidos. En muchas semillas de importancia agrícola (avellana, almendro, ricino, girasol, soja, etc) se almacenan mayoritariamente lípidos (triglicéridos) como compuestos de reserva. Además estas semillas suelen tener un alto contenido de proteínas. Un tercer grupo de semillas donde se encuentran las leguminosas, almacenan proteínas junto con cantidades considerables de almidón, siendo en estas los lípidos muy escasos. Los compuestos de reserva pueden estar almacenados en el embrión (cotiledones) o en tejidos extraembrionarios, principalmente en el endospermo (Breijio, 2006).

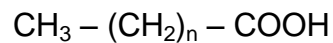
Al iniciarse la germinación de las semillas y cuando las células están suficientemente hidratadas, se produce una activación de la síntesis proteica y por lo tanto, la formación de enzimas hidrolíticas que son las que promueven la movilización de las sustancias de reserva.

La movilización de las reservas requiere un proceso previo de hidrólisis, para liberar los compuestos de menos peso molecular, que pueden ser utilizados durante el crecimiento inicial de la plántula. Además, en muchos casos, los productos de la hidrólisis sufren una serie de transformaciones metabólicas antes de ser transportados al eje embrionario en desarrollo (Breijio, 2006).

Las principales sustancias de reserva son:

4.4.3.1 Carbohidratos. El hidrato de carbono más extendido en las semillas, como principal reserva energética, es el almidón. Está formado por los denominados granos de almidón (corpúsculos intracelulares). Dichos granos muestran una apariencia característica en cada especie, pudiendo tener formas esféricas, elípticas, poligonales, etc. En la hidrólisis del almidón sus componentes (amilasa y amilopectina) son hidrolizados por la α -amilasa y la β -amilasa para generar glucosa. La degradación del almidón se incrementa progresivamente durante el proceso de germinación, primero lentamente y luego de una forma más rápida que termina con la práctica desaparición del polisacárido (Breijio, 2006).

4.4.3.2 Lípidos. Los lípidos son un gran grupo heterogéneo de compuestos de origen natural, algunos de los cuales tienen pocas características comunes estructurales, pero todos los lípidos son moderadamente solubles en agua, son hidrofóbicos pero tienen un gran gusto por los solventes no polares (éter y éter de petróleo), debido a una o más cadenas hidrocarbonadas u otros residuos los transmiten propiedades alifáticas a una parte de la molécula. Como mucho la fuente más común de cadenas carbonadas son los ácidos grasos de la estructura



Pero otro tipo de moléculas (por ejemplo largas cadenas de alcoholes) pueden también estar involucradas (Anderson y Beardall, 1991).

Los ácidos grasos aparecen en las plantas como constituyentes de lípidos de membrana y lípidos de reserva; pequeñas cantidades pueden también estar libres. Las membranas lipídicas en plantas y algas son mayormente glicerolípidos, esteroel y esfingolípidos que proporciona un menor componente. Los glicerolípidos son de dos principales tipos: Glicolípidos los cuales proporcionan el mayor componente de las membranas lipídicas de cloroplastos (o plastidios), y fosfolípidos el cual es el principal constituyente de membranas en otras partes de

la célula. Los lípidos de reserva sintetizados en órganos tal como semillas son exclusivamente triglicéridos (TAGs) (Breijjo, 2006).

Los ácidos grasos se diferencian el uno del otro, en el número de átomos de carbono, desde 22-C a 24-C, y en sus grados de insaturación, desde ninguno hasta uno, dos, tres o cuatro (Tabla 3). Los tres ácidos grasos insaturados- Acido oleico (18:1), Ácido linoléico (18:2) y ácido linolénico (18:3), predominan en plantas (Tabla 4), Mientras ácidos grasos de membrana son restringidos a unos pocos tipos debido a razones estéricas y estructurales, los lípidos de almacenamiento muestran una gran variedad de ácidos grasos (Breijjo, 2006).

Tabla 3. Algunos ácidos grasos asociados con plantas. Los ácidos grasos inusuales, a menudo se encuentran en concentraciones muy altas en algunas especies (ej. ácido ricinoleico en *Ricinus communis*) no se muestran.

Tamaño de la cadena	Símbolo*	Nombre común
6	6:0	Acido caprónico
8	8:0	Acido caprílico
10	10:0	Acido cáprico
12	12:0	Acido láurico
14	14:0	Acido mirístico
16	16:0	Acido palmítico
	16:1(9c)	Acido pamitoléico
18	18:0	Acido estérico
	18:1 (9c)	Acido oleico
	18:2(9c, 12c)	Acido linoleico
	18:2(9c, 12c, 15c)	Acido linolénico
20	29:0	Acido araquídico

*El símbolo 18:1 (9c) denota un ácido graso de 18 átomos de carbonos con un único enlace doble *cis* entre el carbono 9 y 10 (Anderson y Beardall, 1991).

Tabla 4. Abundancia de los ácidos grasos importantes en hortalizas comerciales.

Acido Graso	Simbolo	Abundancia (% del total)
Acido láurico	12:0	4
Acido mirístico	14:0	2
Acido palmítico	16:0	11
Acido estérico	18:0	4
Acido oleico	18:1 (9c)	34
Acido linoleico	18:2(9c, 12c)	34
Acido linolénico	18:3(9c, 12c, 15c)	5
Acido araquídico	20:0	1

Tomado de Molecular activities of plant cell of Anderson y Beardall,1991.

4.4.3.3 Proteínas. La hidrólisis de las proteínas de reserva esta catalizada por diferentes tipos de enzimas proteolíticas, agrupadas bajo el nombre de proteasas. A medida que progresa la germinación las fracciones proteínicas de reserva se transforman en otras de menor peso molecular, especialmente pequeños péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos liberados pueden ser utilizados en la síntesis de nuevas proteínas en la plántula en desarrollo o para proporcionar energía mediante la oxidación de su esqueleto de carbono. En los cereales las proteínas se almacenan en los granos de aleurona, acumulados, a su vez, en la capa de aleurona. En las semillas de dicotiledóneas, la degradación de las proteínas de reserva se corresponde, generalmente, con una acumulación de aminoácidos libres en los cotiledones (Breijio, 2006).

4.5. PROPAGACIÓN DEL LAS PLANTAS DEL GENERO *Scutellaria*

Esfuerzos en la propagación de *Scutellaria* se han realizado en la Universidad de Estado del Valle de la Fortaleza localizada en Perú, Semillas de dos especies se plantaron para germinación en invernadero pero solamente *S. integrifolia* L. var. *Hispida*, Benth germinó. Algunos sucesos en micropropagación de *Scutellaria* se

reportaron (Stojakowska, *et al.* 1999; Sinha, *et al.* 1999). Brotes de plantas de *S. montana* y *S. integrifolia* se cultivaron *in vitro* en medio basal MS, enriquecido con 0.5 mg /L⁻¹ de BA (6-benzilamino purina) y .0.1 mg/L⁻¹ de NNA (ácido naftalenacético). Un grupo múltiple de brotes permitieron el alargamiento en el medio basal MS alcanzando una longitud de 4 a 6 cms. Algunos brotes pequeños se enraizaron cuando se cultivaron en MS medio (M527) en los laboratorio de fitotecnología Shawnee, Kansas, o MS con 1 mg/L⁻¹ de IBA. (Joshee y Yadav, 2002).

4.6 DORMANCIA DE LAS SEMILLAS

La dormancia es observada como la interrupción de una semilla intacta viable, para su germinación en condiciones favorables, este fenómeno es dependiente de factores, tales como, la estructura de la semilla, y las características intrínsecas de la semilla.

Existe una evidencia fisiológica que indica que el ABA (Acido abscisico) está involucrado en la regulación y el mantenimiento de la dormancia en muchas especies de plantas (Bewley, 1997; Hilhorst y Downye, 1995; Koornneef, *et al.* 2002; Leubner-Metzger, 2003; Nambara y Marion-Poll, 2003). Este proceso no es muy bien documentado a nivel molecular, sin embargo, este regulador de crecimiento es un factor de control muy importante en la dormancia de la mayoría de las semillas.

En la mayoría de las plantas durante los primeros estados de desarrollo la síntesis de ABA es bajo, incrementándose en la etapa intermedia, cuando se sintetizan las proteínas de almacenamiento y disminuye durante la maduración (Berry y Bewley, 1992).

De acuerdo a la hipótesis del balance hormonal realizado para el balance de semillas propuesto por Karssen y Lacka (1986), ABA y GA actúan en diferentes tiempos y sitios durante la vida de la semilla, mientras que ABA se relaciona con la dormancia de las semillas durante la maduración, GA juegan un papel clave en la liberación de la dormancia y en la activación de la germinación.

5. METODOLOGÍA

El reconocimiento de la planta se hizo a través del Herbario de la Universidad del Cauca CAUP y donde se encuentra un duplicado de la planta con código L.Mendoza # 1.

El material vegetal que se va a utilizar, para la realización de este estudio proviene de la colecta de plantas del sotobosque a 1787msn con una ubicación geográfica de 2°32'520"N y 76°32'128"W, en el resguardo Indígena de Novirao.

Las plantas colectadas se trasladaron a un pequeño cultivo (50 plantas) en 6 eras y abonado orgánicamente que se tiene en una finca ubicada dentro del resguardo indígena de Novirao de donde fueron tomadas.

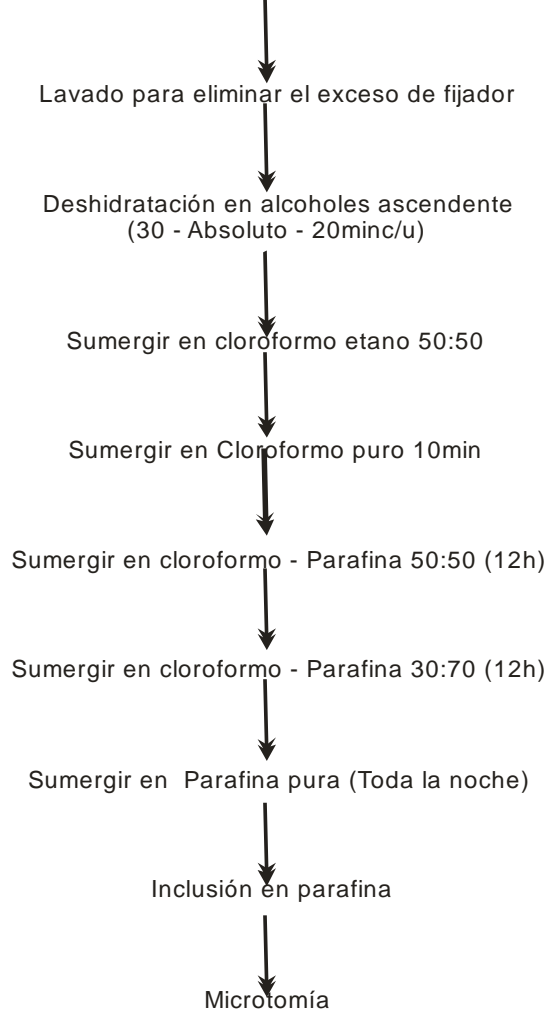
5.1 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)

- Fijar con 2% glutaraldehido en tampón Cacodilato 0.1 M a pH=7.4, 1 h a T^a ambiente.
- Lavar 3x 10 min con Tampón Cacodilato + Sacarosa isosmolar con el fijador
- Postfijar con 1% OsO₄ en Cacodilato, 1 h en oscuridad a 4 °C
- Lavar 3x con Cacodilato, 10 min
- Deshidratar en serie creciente de EtOH (30%, 50, 70, 90, 96, 100 y 2 veces 100 absoluto), 10 min en cada
- Desecado al punto crítico.
- Colocar las muestras sobre soportes de microscopio electrónico de barrido utilizando cemento conductor.
- Recubrimiento metálico con oro en atmósfera de Argon.
- Visualizar y fotografiar en un microscopio electrónico de barrido.

(Burdiles, *et al.* 2007)

5.2 HISTOLOGÍA

Fijación de muestras en Glutaraldehido 2% en cacodilato de sodio 0.



Se realizó la tinción de Shiff para carbohidratos, Sudan III para lípidos, tinción de yoduro de potasio para almidones y una tinción diferencial de safranina-Fast green para el endospermo y cutícula.

La observación de los cortes se realizó utilizando un fotomicroscopio Nikon E400, Para identificar histoquímicamente los componentes moleculares, que podrían de alguna manera ayudar a la comprensión de la baja viabilidad que presenta la semilla de *Scutellaria incarnata*. (Protocol de Celmolec, 1999).

5.3 CARBOHIDRATOS.

Pesar 0.5g de la muestra



Liofilizar



Extraer en etanol 80%



Filtrar



Someter a Rota evaporación

(Norton, 1944 y Somogy, 1952)

La determinación de la composición de azúcares, se realizó por medio de la técnica de HPLC.

5.4. LÍPIDOS.

Extracción y caracterización de Lípidos y almidones de Semillas



Colectar y secar semillas maduras 1gr a 40°C - 48H



Pulverizar en mortero



Extraer en Cloroformo mediante agitación durante 15 min en frio



Filtrar y concentrar el Extracto

(Christie y Dobson,1999)

Posterior a la extracción de los lípidos, la muestra fue analizada por cromatografía de Gases – FID, para lo cual se tuvo en cuenta el siguiente protocolo de preparación y análisis de esta:

5.4.1 Preparación de la Muestra: Se procedió a realizar la esterificación del aceite de la semilla de *S. incarnata*. Se adicionó 10 ml de la mezcla HCl/Metanol 5% p/v a 50 µl del aceite. La mezcla se llevó a sistema de reflujo por 2 horas. Posteriormente se dejó reposar y se realizó la extracción de los metil ésteres de los ácidos grasos con 1 ml de n-Hexano (Mallinckrodt Grado HPLC). El extracto se conservó en refrigeración hasta el momento de su análisis. 1 µl del extracto se inyectó al cromatógrafo en teniendo en cuenta ciertas condiciones.

5.4.2 Condiciones de Análisis.

Equipo: Cromatógrafo de Gases con detector de ionización en llama FID SHIMADZU GC-17 A.

Columna: Columna Capilar DB-5 (J&W Scientific . 30 m x 0,25 mm ID 0,25 µm)

Gas Carrier: Helio UAP (99,995%) a flujo de 1.0 ml/min. Presión de entrada de la columna: 80 kPa.

Inyector: Temperatura Inyector: 250° C Modo Inyección: Split, relación 20:1

Detector: Detector FID Temperatura: 280° C

Programación de Temperatura Columna: 150° C (4 min) hasta 250° C (5 min) a razón de 4° C/ min.

5.4.3 Análisis de las Muestras: La identificación de los metil ésteres de los ácidos grasos de las muestras de semilla *S. incarnata* se realizó usando el método de comparación de sus tiempos de retención con los de estándares de FAMES alta pureza (Alltech) analizados a las mismas condiciones, y mediante el cálculo de sus índices de retención (Adams 2004- NIST 2008) usando una serie homóloga de n-Alcanos C6-C32 (Restek, Bellefonte).

5.5. PROTEINAS

Colectar muestras de distintos estados de desarrollo y liofilizar

↓

Macerar y pesar 10mg de muestra

↓

Extraer en amortiguador de extracción

↓

Correr en minigeles según la técnica de Laemmly (1973)

↓

Teñir con azul de Coomassie

↓

Desteñir y digitalizar los geles

↓

Calcular el peso molecular aparente de cada banda

La cuantificación se realizara por medio del método de Bradford (Bradford, 1976)

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 MICROMORFOLOGÍA E HISTOLOGÍA

La micromorfología se realizó por medio de Microscopía electrónica de Barrido (SEM), obteniendo las siguientes imágenes.

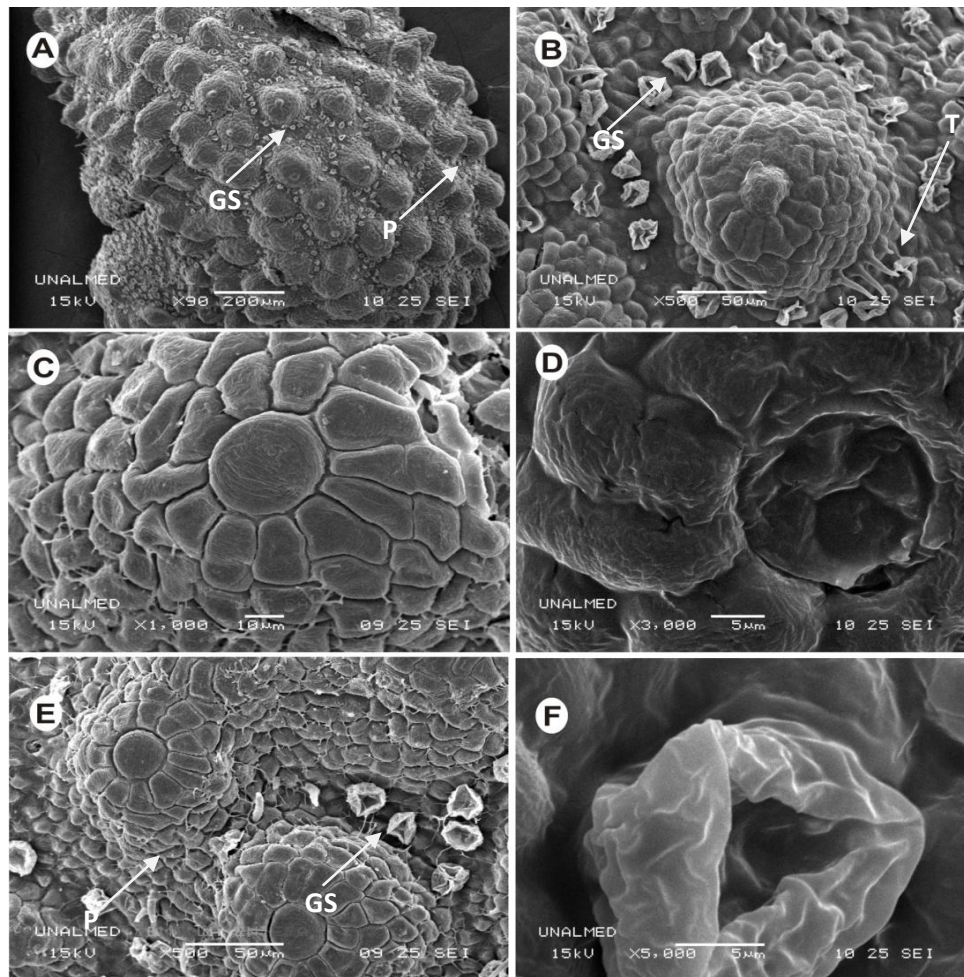


Figura 1. Micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Vista parcial de la semilla. **A y B** epidermis con numerosas glándulas sésiles. **B**. Tricomas no glandulares en la base de la papila. **A y E** Mericarpio con papilas cónicas rodeado de glándulas sésiles. **C y D**. Papila cónica en crecimiento. **F** Glándula Sésil con invaginaciones; (P) Papilas; (GS) Glándulas sésiles; (T) Tricomas.

El estudio Micromorfológico de la semilla utilizando microscopia electrónica de barrido, permitió observar que la testa de la semilla presenta una superficie irregular debido a un sin número de papilas cónicas las cuales se encuentran rodeadas de abundantes glándulas sésiles (Fig 1. A, B y E), que se caracterizan por presentar invaginaciones apicales (Fig 1. F). Además de las glándulas, el mericarpio está provisto aunque en menor proporción de pelos o tricomas simples (Fig 1B).

Las glándulas sésiles encontradas en las semillas contribuyen a la secreción de sustancias que protegen a la semilla de agentes patógenos como por ejemplo las lectinas, que son consideradas importantes en la defensa ante microorganismos y que su presencia en la semilla de *Scutellaria incarnata* ya fue estudiada (Perez, Vega y Fernandez, 2007); También por medio de las glándulas sésiles puede haber la secreción de sustancias que pueden impermeabilizan la semilla, como por ejemplo los fenoles (Santamarina, 2005), Además es importante recalcar que a la presencia de este tipo de glándulas en la semilla es característico de algunas especies del genero *Scutellaria*, como por ejemplo *S. galericulata* y que su presencia o ausencia ha demostrado ser útiles taxonómicamente (Lane,1983 y Paton, 1990)

Los tricomas simples no glandulares encontrados en la testa de la semilla tiene la función de protección contra agentes patógenos y ambientales, así como un medio de comunicación entre el medio interno y externo y al tiempo ayudan en la protección contra la luz del sol y absorción de agua aspecto necesario para desencadenar una serie de eventos metabólicos, relacionados con la germinación de la semilla (Mauseth, 2008).

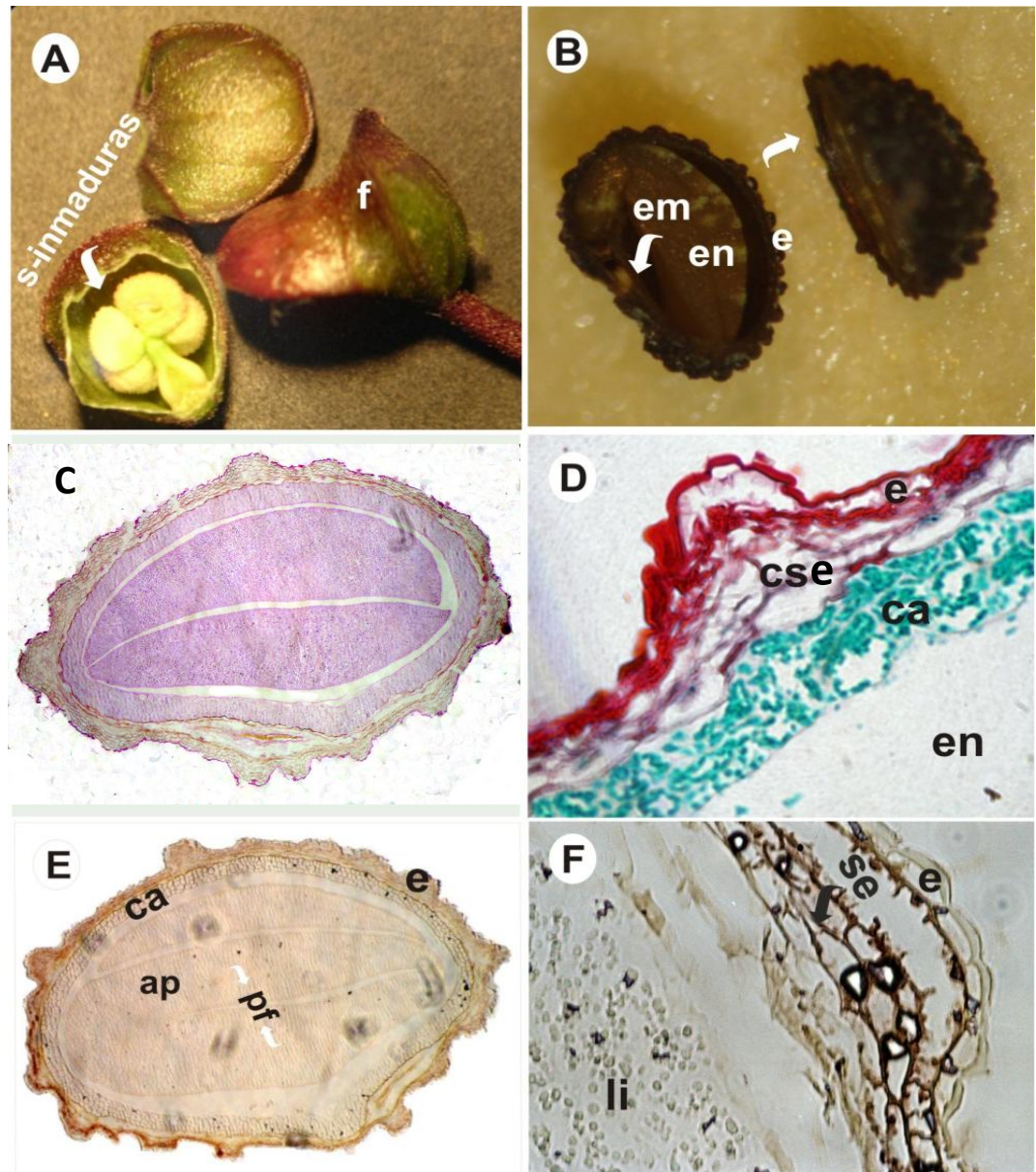


Figura 2. **A** frutos y semilla inmaduros (5X), **B**. Semillas Inmaduras (5X), **C**. Sección Transversal de la semilla Tinción de shiff (10X), **D**. Tinción diferencial de cutícula y capa de aleurona (40X) tinción Safranina – Fast green. **E**. Semilla en desarrollo, diferenciación de primordios foliares (10X) Tinción Lugol, **F**. Identificación de lípidos en testa y capa de aleurona (10X) tinción Sudan III. (f) Fruto; (em) embrión, (en) endospermo, (ca) capa de aleurona, (ap) ápice, (pf) Primordios foliares, (li) lípidos, (e) epidermis, (cse o se) capa sub epidérmica, (Co) Cotiledones.

Las semillas de *Scutellaria incarnata*, presentan una coloración marrón en su estado maduro (Fig 2B) con un peso promedio de 1.5gr.

A nivel histoquímico se realizaron diferentes tinciones que constataron la presencia de los diferentes componentes de las reservas de semilla y estructuras, las cuales fueron identificadas teniendo en cuenta la etapa de desarrollo en el que se encontraba la semilla.

Por medio de la tinción de Schiff se observó la presencia y la amplia localización de carbohidratos, distribuidas en los cotiledones, en la capa de aleurona y adicionalmente se denota en la cutícula. (Fig 2.C).

La tinción realizada con Sudan III para lípidos, pudimos observar su presencia en la capa de aleurona y en la testa de la semilla (Fig 2F),

Por medio de la tinción de lugol se observó la amplia distribución de los almidones en todas las estructuras que conforman la semilla, con excepción de la testa y la cutícula (Fig 2E) y finalmente por medio de la tinción diferencial de safranina-Fast Green se observó la capa de aleurona y la testa de la semilla.

En las diferentes tinciones realizadas, se observó la presencia de una capa de aleurona (Fig 2C, D, E y F), la cual es muy poco común en dicotiledones, pero si se encuentra registradas, como por ejemplo en *Brassica napus* L. (Lersten, 2004).

La capa de aleurona es una estructura que se encuentra rodeada de gruesas paredes celulares primarias y contienen un gran número de vacuolas para almacenar proteínas llamadas cuerpos proteicos, encerrados en una única membrana (Taiz y Zeiger, 2006).

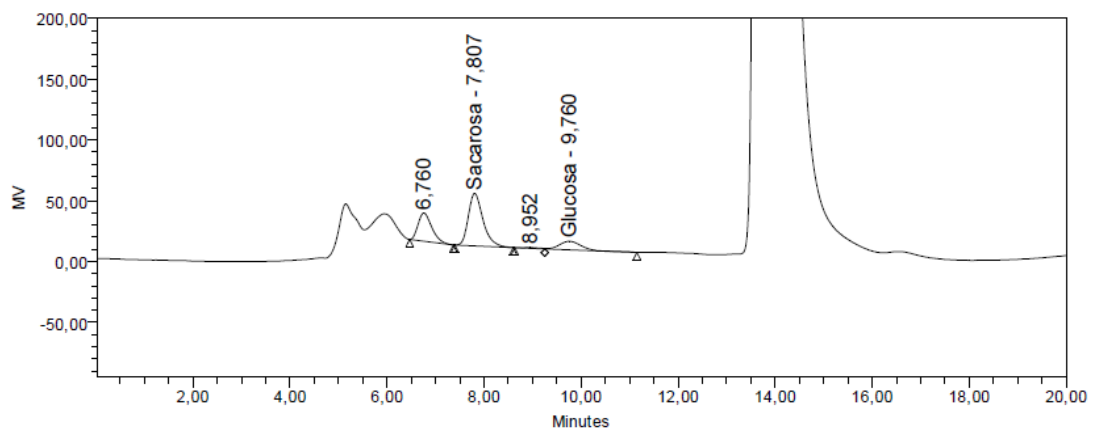
En la capa de aleurona también suele almacenarse lípidos y almidones en menor proporción lo cual se constata con las tinciones realizadas con Sudan y yoduro de potasio.

La capa de aleurona cumple una función importante debido a que es la encargada de la producción y liberación de enzimas responsables de la digestión de almidón de las células del endospermo. Cuando el embrión es rehidratado en el tiempo de la germinación, las giberelinas son liberadas y difundidas fuera de la capa de aleurona, estimulando la producción y liberación de enzimas hidrolíticas que digieren el almidón, las cuales convierten el almidón del endospermo en azúcar para el crecimiento de la plántula (Lersten, 2004).

6.2 AZUCARES

Por medio de la técnica de HPLC para la detección de azúcares en extracción realizada a las semillas de *Scutellaria incarnata* Vent., se encontraron los siguientes resultados:

Figura. 3 Cromatograma de HPLC de azúcares para la muestra de *Scutellaria incarnata* Vent.



Del cromatograma de HPLC para carbohidratos (Fig. 3) se pudo determinar la presencia de sacarosa y glucosa, los cuales se encuentran representados por dos picos con un tiempo de retención que coincide con los estándares utilizados para la detección de cada uno de ellos (Tabla 5).

A pesar de que se utilizó un estándar de Fructosa, no se encontró la presencia de este azúcar en la muestra y la ausencia de otros estándares para carbohidratos, no permitió la identificación de los picos restantes (Fig 3).

Tabla 5. Azúcares Detectados en la Muestra de Semilla de *Scutellaria incarnata*.

	Nombre Estándar	Tiempo de retención Min	Cantidad relativa en la muestra (%)
1	Sacarosa	7.807	0.209
2	Glucosa	9.760	0.048
3	Fructosa	11.630	Ausente

Los glúcidos son una de las fuentes más importante de energía, que el embrión necesita para iniciar su desarrollo.

Por medio de la técnica de HPLC se hizo el estudio de azúcares, teniendo en cuenta para el análisis los estándares de sacarosa, fructosa y glucosa.

En los resultados encontramos presencia de Glucosa con un tiempo de retención de 9.760 en un porcentaje de 0.048% y sacarosa con un tiempo de retención de 7.807 en un porcentaje de 0.209%, pero ausencia de fructosa el cual es un componente de la sacarosa, formada por la unión de la glucosa y la fructosa (Tabla 5).

Los análisis indican que la sacarosa puede ser el mayor componente de la fracción de azúcar libre en el endospermo, y que la ausencia de fructosa, se puede deber a que la hidrólisis de la sacarosa no se está llevando a cabo.

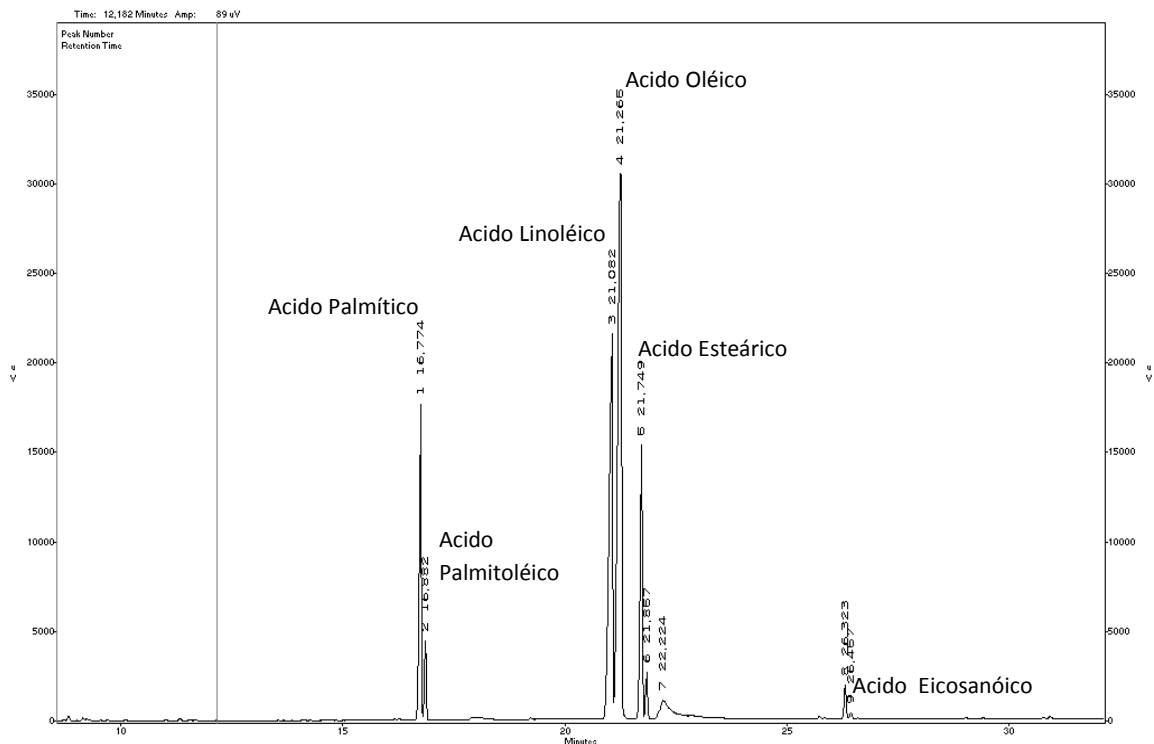
Es importante tener en cuenta que la glucosa es el producto de la hidrólisis del almidón, por medio de enzimas hidrolíticas sintetizadas como las amilasas, que se difunden hacia el endospermo, para hidrolizar los granos de almidón a glucosa. Las moléculas de glucosa liberadas son utilizadas por el embrión como fuente de energía (ATP), las cuales llegan hasta el mismo por difusión (Breijjo,2006).

La presencia de almidón se constato por medio de las tinción histoquímica realizada con lugol (Fig 2E).

6.3 LIPIDOS

El estudio realizado se llevo a cabo por medio de la de la técnica de Cromatografía de Gases GC-FID, encontrándose una variedad de ácidos grasos tanto saturados como insaturados, observando la predominancia de algunos de ellos lo cual concuerda con lo reportado para la familia Labiatae, en especial para estudios realizados en el género *Scutellaria* (Hagemann, *et al.*1967).

Fig 4. Cromatograma de la Muestra lipidica de semilla de *Scutellaria incarnata*.



El cromatograma obtenido, dió como resultado la identificación y cuantificación de la composición de ácidos grasos de la muestra lipídica (Tabla 6), los cuales se encontraban representados por diferentes picos, que fueron identificados teniendo en cuenta el tiempo de retención de forma comparativa con los estándares utilizados (Fig 4).

Tabla 6. Ácidos grasos encontrado en la Muestra lipídica de Semilla de *S. incarnata*. Extracción en Frío.

Pico N°	Tr Min	*Cantidad Relativa %	Identificación	Indice de Retención
1	16,774	16,606	Acido Palmitico ME	1918
2	16,882	2,534	Acido Palmitoleico ME	1922
3	21,082	24,097	Acido Linoléico ME	2096
4	21,265	39,719	Acido Oleico ME	2104
5	21,749	10,900	Acido Esteárico ME	2125
6	21,857	1,574	NI	2130
7	22,224	3,200	NI	2145
8	26,323	1,182	NI	2322
9	26,457	0,190	Acido Eicosanoico ME	2328

ME= Metil Ester NI = No Identificado. * Normalizado respecto a todos los picos

A nivel histoquímico la tinción con Sudan III (2F) reveló la presencia de lípidos en la semilla de *Scutellaria incarnata*, lo cual se constató a nivel molecular al estudiar los ácidos grasos que pueden ser considerados como combustibles biológicos y bloques de construcción de lípidos.

En este estudio se pudo determinar la presencia de ciertos ácidos grasos y porcentaje en el cual se encontraba cada uno de ellos, obteniendo un mayor porcentaje u concentración de ácido linoleico, seguido por el ácido oleico, ácido palmítico y finalmente estérico (Tabla 6).

A pesar de que los resultados no concuerdan totalmente con los reportados para la mayoría de las especies de *Scutellaria*, si coinciden con unas pocas como *Scutellaria drumonni* que aunque no con el mismo porcentaje, si en el mismo orden de mayor porcentaje a menor (Hagemann, *et al.* 1967).

Es importante recalcar que los porcentajes solo difieren para el ácido linoléico y oleico, pues para el ácido palmítico y estérico para las especies reportadas según el estudio realizado con la familia Labiatae, en el cual se toma como estudios algunos especímenes del género *Scutellaria*, estos ácidos grasos si se encuentran entre los de menor concentración en los aceites extraídos de la semilla de estas especies.

Es fundamental recalcar que la semilla de *Scutellaria incarnata* cuenta con un mayor porcentaje de ácidos grasos que se caracterizan por ser insaturados, es decir por presentar dobles enlaces en su cadena carbonada y debido a los dobles enlaces que constituyen su estructura, se presentan de forma aceitosa, y su punto de fusión es más bajo que los saturados, el rompimiento de los mismos es más fácil de realizarse debido a que están más expuestos y durante su degradación genera una gran fuente de energía, que es el potencial para germinación de la semilla.

6.4 PROTEINAS

Por medio de la electroforesis de proteínas se pudo observar la presencia y abundancia de proteínas de bajo peso molecular.

Para determinar la concentración proteica total de la muestra se utilizo el método colorimétrico de Bradford (1976), Inicialmente se peso una fracción de la muestra y se diluyo en agua destilada y de esta solución se realizaron 3 diluciones diferentes y se les adicono el reactivo del Bradford.

2 μ l de muestra + 198 μ l H₂Od+ 800 μ l Brandford (1:5)

4 μ l de muestra + 194 μ l H₂Od+ 800 μ l Brandford (1:5)

8 μ l de muestra + 192 μ l H₂Od+ 800 μ l Brandford (1:5)

- 200 μ l H₂Od+ 800 μ l Brandford (1:5) Blanco

La diluciones realizadas se pasaron por el espectrofotómetro, con el cual se tomaron registros de absorbancia teniendo en cuenta dos longitud de onda diferentes 590 y 450nm, y posteriormente por medio de la ecuación de la recta se determino la concentración de proteína en cada dilución (Tabla 7)

Tabla 7. Absorbancia y cálculos para la determinación de la concentración de carga de muestra para la electroforesis.

Vol	Absorbancia		Y 590/450	X= μ g	PT μ g	PT mg	Mg/ml
	590	450					
2 μ l	1.011	0.71	1.423944	5.819917	2909.958	2.909958	2.909958295
4 μ l	1.381	0.577	2.393414	11.45965	2864.913	2.864913	2.864913047
8 μ l	1.755	0.453	3.874172	20.07372	2509.215	2.509215	2.509214795

Teniendo en cuenta los valores obtenidos en cuanto a la concentración proteica total de las diluciones, se calculo la concentración de carga para el gel de acrilamida (Tabla 8), teniendo en cuenta que queríamos cargar 20, 40, 50, 60 y 80 µg de proteína en los diferentes pozos del gel de Acrilamida (Fig 7).

Tabla 8. Determinación de la concentración de carga de de muestra para la electroforesis.

	<u>20 µg</u>	<u>40 µg</u>	<u>50 µg</u>	<u>60 µg</u>	<u>80 µg</u>
2 µl	6.872951 µl	13.7459 µl	20.61885 µl	27.4918 µl	27.49180 µl
4 µl	6.981015 µl	13.96203 µl	20.94304 µl	27.92406 µl	27.92406 µl
8 µl	7.970621 µl	15.94124 µl	23.91186 µl	31.88248 µl	31.88248 µl
Promedio	7.274862 µl	14.54972 µl	21.82459 µl	29.09945 µl	29.09945 µl

Después de obtener la composición proteica, se realizaron los cálculos para la determinación del Peso Molecular aproximado de las bandas obtenidas en el gel de electroforesis (Tabla 9).

Inicialmente se determino el desplazamiento relativo de cada banda obtenida en el gel (M_r), tanto de la muestra como la del marcador utilizado (Fig 5).

$$M_r = \frac{\text{Desplazamiento Proteina}}{\text{Recorrido Total}}$$

Figura 5. Movilidad relativa de cada una de las bandas observadas tanto para la muestra de *Scutellaria incarnata* Vent., como las del marcador molecular.

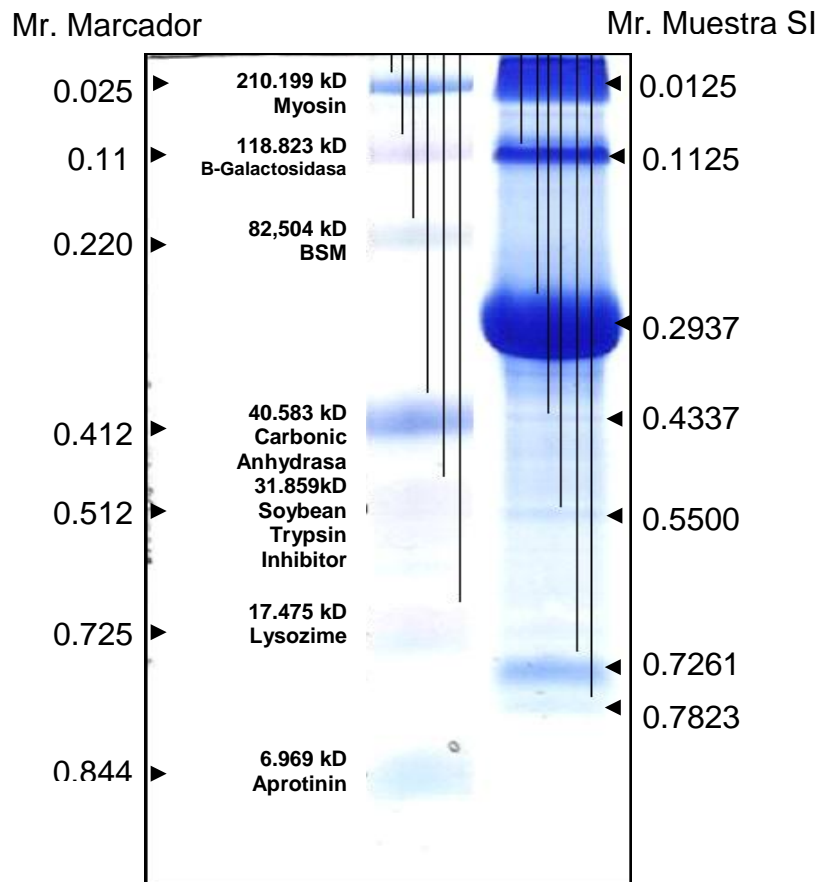


Tabla 9. Cálculos para la obtención de la Movilidad Relativa de la Bandas obtenidas en el gel de agarosa

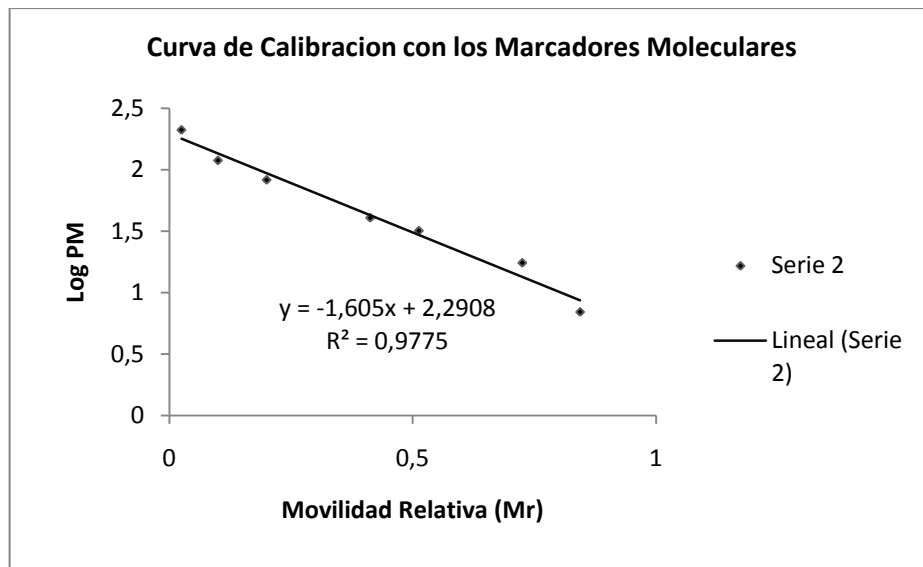
Desplazamiento Marcador (CM)	Recorrido Total (CM)	Desplazamiento Proteínas de SI (CM)	Desplazamiento Total (CM)	Mr. Marcador	Mr. Proteínas SI
0,4	16	0,2	16	0,025	0,0125
1,6	16	1,8	16	0,1	0,1125
3,2	16	4,7	16	0,2	0,29375
6,6	16	7	16	0,4125	0,4375
8,2	16	8,8	16	0,5125	0,55
11,6	16	11,617	16	0,725	0,7260625
13,5	16	12,517	16	0,84375	0,7823125

Teniendo en cuenta la movilidad relativa de los marcadores moleculares y el logaritmo del peso molecular de los mismos (Tabla 10), se realizó una curva de calibración (Fig 6).

Tabla 10. Datos para la obtención de la curva de calibración con los marcadores moleculares

Peso Molecular de Marcadores	Log Peso Molecular (Log PM)	Movilidad Relativa Marcadores (Mr)
210,199	2,322630646	0,025
118,823	2,074900513	0,1
82,504	1,916475005	0,2
40,583	1,608344148	0,4125
31,859	1,50323214	0,5125
17,475	1,242417184	0,725
6,969	0,843170465	0,84375

Figura 6. Curva de calibración de marcadores Moleculares teniendo en cuenta Log del peso molecular Vs Movilidad Relativa



X = Movilidad relativa (Mr).

Y = log (PM)

La curva de calibración realizada (Fig. 6), permitió obtener datos importantes que se tomaron en cuenta para la determinación de los pesos moleculares de las bandas obtenidas con la muestra de *Scutellaria incarnata*. (Tabla 11), lo cual se realizó teniendo en cuenta la ecuación de la recta:

$$Y = AX + B$$

Donde:

A=Pendiente de la Recta; X= Movilidad Relativa de los Marcadores Moleculares;
B : Intercepto, Y= Log Peso molecular de la banda

Tabla 11. Datos para la determinación del peso molecular teniendo en cuenta la ecuación de la recta.

A	X	B	AX+B	Peso Molecular Proteínas de SI
-1,605	0,0125	2,29	2,2699375	186,181918
-1,605	0,1125	2,29	2,1094375	128,658209
-1,605	0,29375	2,29	1,81853125	65,8462808
-1,605	0,4375	2,29	1,5878125	38,7090488
-1,605	0,55	2,29	1,40725	25,5417118
-1,605	0,7260625	2,29	1,12466969	13,3250758
-1,605	0,7823125	2,29	1,03438844	10,8240163

$$Y = -1,605X + 2,290$$

$$Y = -1,605(0,4375) + 2,290$$

$$Y = 1,5878125$$

$$\text{LogP.M} = 10^{1,5878125} = 38,7090488\text{Kd}$$

$$Y = -1,605X + 2,290$$

$$Y = -1,605(0,29375) + 2,290$$

$$Y = 1,81853125$$

$$\text{LogP.M} = 10^{1,81853125} = 65,8462808\text{Kd}$$

$$Y = -1,605X + 2,290$$

$$Y = -1,605(0,1125) + 2,290$$

$$Y = 2,1094375$$

$$\text{LogP.M} = 10^{2,1094375} = 128,658209\text{Kd}$$

$$Y = -1,605X + 2,290$$

$$Y = -1,605(0,0125) + 2,290$$

$$Y = 2,2699375$$

$$\text{LogP.M} = 10^{2,2699375} = 186,181918\text{Kd}$$

$$Y = -1,605X + 2,290$$

$$Y = -1,605(0.7260625) + 2,290$$

$$Y = 1.12466969$$

$$\text{LogP.M} = 10^{1.12466969} = 13.3250758\text{Kd}$$

$$Y = -1,605X + 2,290$$

$$Y = -1,605(0.55) + 2,290$$

$$Y = 1.40725$$

$$\text{LogP.M} = 10^{1.40725} = 25,5417118\text{Kd}$$

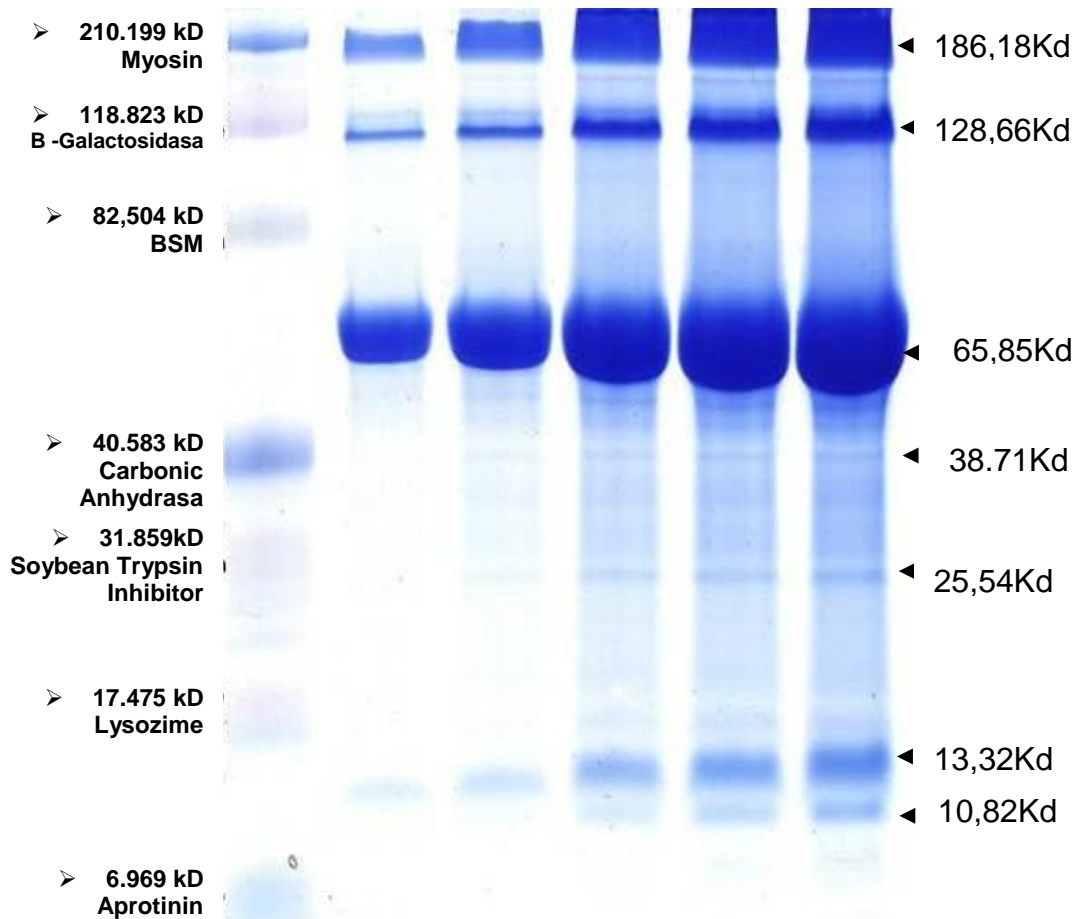
$$Y = -1,605X + 2,290$$

$$Y = -1,605(0,7823125) + 2,290$$

$$Y = 1,03438844$$

$$\text{LogP.M} = 10^{1,03438844} = 10,8240163\text{Kd}$$

Figura 7. Peso Molecular aproximada de las proteínas observadas en el electroferograma de la extracción proteínica de *Scutellaria incarnata* Vent.



El interés de el estudio de este tipo de proteínas se debe a que se ha reportado en la literatura su importancia como barrera biológica para la defensa de diferentes agentes patógenos ya que las plantas carecen de un sistema inmune que las proteja, por lo que han desarrollado una variedad de mecanismos de protección, dentro de los cuales se incluyen la síntesis de compuestos de bajo peso molecular, proteínas, péptidos que actúa ante diferentes patógenos, (Rivillas-Acevedo y Soriano-Garcia, 2007), impidiendo el ingreso o inhibiendo el desarrollo de microorganismos en la planta huésped (Alvarez y Monthehirfo, 2003).

Estas proteínas de reservas de bajo peso molecular incluyen enzimas hidrolíticas quitinasas y gluconasas, inhibidores de amilasas y péptidos antimicrobianos, compuestos que han sido aislados de diferentes tejidos vegetales, especialmente de las semillas de las plantas, mostrando estas sustancias actividad antifúngico y antibacteriana, sobre diferentes especies fitopatógenas (Álvarez y Monthehirfo, 2003).

A pesar de que se observan un rango amplio de pesos moleculares con respecto a las bandas observadas en el electroferograma obtenido (Fig 8), es importante tener en cuenta que debido al tamaño y porcentaje de acrilamida del gel que se pudieron pasar por alto bandas de un menor peso molecular de las cuales muchas de ellas se encuentran relacionadas como inhibidoras de agentes patógenos, como la 1.3 B-Glucanasas las cuales se encuentran en un rango de 21-40Kd, y se describen como proteínas degradadoras de paredes celulares de hongos, otra de ellas son las permatins una familia de peso molecular alrededor de los 22Kb y se caracterizan por poseer una actividad antifúngica potente , Las endoquitinasas que se encuentran en un rango de 26 a 36Kd y pueden encontrarse en la planta o pueden ser producidas en el momento de la infección; entre otras encontramos las RIPs (Ribosome Inactivating Protein) con un peso molecular que oscila entre los 21 – 36 Kd. (Darnetty, *et al.*1993) por lo anterior y teniendo en cuenta el rango de

las bandas observadas en el electroferograma obtenido es posible que podamos contar con proteínas de este tipo.

La aparición de bandas de bajo peso molecular también puede ser un indicador que si se está llevando a cabo la hidrólisis de proteínas por enzimas proteolíticas agrupadas bajo el nombre de proteasas, las proteínas de reservas son hidrolizadas a pequeños péptidos o aminoácidos, lo cuales proporciona una fuente de energía cuando se da la oxidación de su esqueleto carbonado (Breijio, 2006).

EL gel electroforético mostro bandas de diferentes peso moleculares las cuales sobresalieron 7 de ellas y en una de ellas se pudo observar una sobreproducción proteica, con un peso molecular aproximado de 65.85Kd (Fig 8), el cual podría corresponder con las proteínas de tipo albuminoide de la capa de aleurona, por lo tanto la histoquímica y la electroforesis se complementarían, en este aspecto.

7. CONCLUSIONES

- La semilla de *Scutellaria incarnata*, presenta una gran cantidad de glándulas sésiles que secretan sustancias que protegen pero que pueden llegar a impermeabilizar la semilla evitando la absorción de agua, proceso esencial para el desencadenamiento de los procesos metabólicos implicados en la germinación de la misma.
- La secreción de sustancias por las glándulas sésiles puede ser un mecanismo de protección ante agentes patógenos.
- Las pruebas histoquímicas indicaron la presencia de los diferentes componentes moleculares esenciales en las reservas de las semillas que se encuentran implicados en el metabolismo para el desarrollo de esta.
- Las pruebas moleculares indicaron que a pesar de haber encontrado un porcentaje de glucosa, su bajo valor indica la carencia de síntesis de este tipo de reserva energética, lo cual se puede deber a que las rutas metabólicas como el ciclo del glioxilato que permite la obtención de glucosa a partir de lípidos o la hidrólisis de almidón, no se están llevando a cabo de manera eficiente, dejando sin producto a la glicolisis, ciclo importante en la generación de ATP principal fuente de energía en las semillas.
- La prueba de electroforesis de proteínas indicó que la semilla posee una cantidad considerable de proteínas de bajo peso molecular, lo cual es importante debido a que muchas de estas proteínas se encuentran relacionadas con la supervivencia al ser barreras biológicas contra agentes patógenos.

- ↺ Las bandas presentes, pueden indicar la presencia de aminoácidos libres o pequeñas fracciones proteínicas, resultado de la hidrólisis de proteínas.

- ↺ El estudio de Lípidos reveló que la Semilla de *Scutellaria incarnata* presenta un mayor porcentaje de ácidos grasos que se caracterizan por ser insaturados, los cuales tiene un punto de fusión más bajo que los saturados, el rompimiento de los mismos es más fácil de realizarse debido a que están más expuestos y durante su degradación genera una gran fuente de energía, que es el potencial para germinación de la semilla.

- ↺ A nivel energético se pudo observar que la semilla cumple con los requerimientos necesarios para llevar a cabo el proceso de desarrollo, por lo tanto el bajo porcentaje de germinación que se observo puede estar relacionado con factores externos.

8. BIBLIOGRAFIA

Anderson Jhon W, Beardal,John. Molecular Activities Of The Plant Cells. Oxford:Editorial Blackwell Scientific Publications. p. 20. 1991

Alvarez Pizarro, Juan Carlos y Monteghirfo Gomero,Mario. Aislamiento de una fracción proteínica de bajo peso molecular de semillas de Maca (*Lepidium peruvianum* G. chacon) Con propiedades antifúngicas. Sociedad Química Peru. 69 (4) : 222-228. 2003.

Austin, J.E. Estudio Del Mercado Mundial Para Plantas Medicinales. Corporación Cea, Bogotá. Colombia. 2002.

Berry, T.A., And Bewley, J.D. A Role For The Surrounding Fruit Tissues In Preventing Germination Of Tomato (*Lycopersicon Esculentum*) Seeds. A Consideration Of The Osmotic Environment And Abscisic Acid. *Plant Physiol.* 100: 951-957. 1992.

Bewley, J. Derek. Seed Germination And Dormancy. *Plant Cell* 9: 1055–1066. 1997

Bonham Michael, Posakony Jeff, Coleman Ilsa, Montgomery Bruce, Simon Julian, Nelson Peter. Characterization Of Chemical Constituents In *Scutellaria Baicalensis* With Antiandrogenic And Growth-Inhibitory Activities Toward Prostate Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 11: 3905-14. 2005

Bradford, Mm. A Rapid And Sensitive For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976

Breijio Garcia, José Francisco. Introducción Al Funcionamiento De La Plantas. España:Editorial Universidad Politécnica de Valencia. p. 174-177. 2006.

Burdiles,Patricio; Olea R, Nancy; Csendes, Attila; Rencoret, Guillermo; Parada, Francisco; Cárcamo, Carlos; Recio, Mauricio. Estudio De Microscopia Electrónica De Barrido En Superficie Peritoneal En Controles Y Pacientes Con Cáncer Gástrico; Chilena De Cirugía. 59 (1): 25. 2007.

Catálogo De Especies Vegetales Amenazadas De La Comunidad Extremeña; Div. Magnoliophyta (Angiospermas); p. 217 [En línea] Disponible: <http://aym.juntaex.es/NR/rdonlyres/97F1AAA4-427F-4E4B-84E1-14F9B5999C7D/0/angiospermas3.pdf>. 2009

Chi, Yeon Sook; Lim, Hyum; Park Haeil; Kim Hyun Pyo. Effects Of Wogonin, A Plant Flavone From *Scutellaria Radix*, On Skin Inflammation: In Vivo Regulation Of Inflammation-Associated Gene Expression. *Biochem Pharmacol.* 66:1271–8. 2003.

Cronquist, Arthur. *An Integrated System Of Classification Of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York. 1981.

Cronquist, Arthur. *The Evolution And Classification Of Flowering Plants*. 2nd Ed. New York Botanical Garden, Bronx. 1988

Darnetty Leslie, Jhon F; Muthukrishnan, Subbaratman; Swengle, Mark; Vigers, Alinson And Selitrennikoff, Claude P. Variability In Antifungal Proteins From The Grains Of Maize, Sorghum An Wheat. *Physiologia Plantarum.* 88(2): 339-349. 1993.

Fuentes Yagüe, José Luis. *Iniciación A La Botánica*; Barcelona. Editorial Mundi-Prensa. p57, 65 Y 63. 2001

Glimn-Lacy, Janice; B. Kaufman, Peter. *Botany Illustrated: Introduction To Plants, Major Groups, Flowering Plant Families*, 2nd Ed. p113. 2006.

Hagemann, J.M., Earle, F.R., Wolff, I.A., And Barclay, A.S., Search For New Industrial Oils. *Xiv Seed Oils Of Labiatae. Lipids.* 2 (5): 371-380. 1967.

Hilhorst, Henk.W.M. And Downie, Bruce. Primary Dormancy In Tomato (*Lycopersicon esculentum* Cv. Moneymaker): Studies With The Sitiens Mutant. *Journal Of Experimental Botany.* 47: 89–97. 1995

Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. The Culture Method For Growing Plants Without Soil. *California Agriculture Experimental Circle.* 347:1-32. 1950.

Ikemoto, Shinichi; Sugimura, Kazunobu; Yoshida Naomasa; Yasumoto Ryouji; Wada Seiji; Yamamoto Keisuke And Kishimoto Ttaketoshi. Antitumor Effects Of *Scutellariae Radix* And Its Components Baicalein, Baicalin, And Wogonin On Bladder Cancer Cell Lines. *Urology.* 55:951-5. 2000.

Jang Si, Kim Hj, Hwang Km, Jekal Sj, Pae Ho, Choi Bm, Yun Yg, Kwon To, Chung Ht, Kim Yc. Hepatoprotective Effect Of Baicalin, A Major Flavone From *Scutellaria Radix*, On Acetaminophen-Induced Liver Injury In Mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 25: 585-94. 2003.

Joshee, Nirmal. And Yadav, Anand K. Micropropagation Of *Scutellaria Integrifolia*

L., A Medicinal Skullcap. 10th IAPTC&B Congress, 23–28 June, Orlando, FL (Abstr. p1405). 2002.

Joshee, Nirmal; Patrick, Thomas S; Mentreddy, Rao S. And Yadav, Anand K. Skullcap: Potential Medicinal Crop.: J. Janick And A. Whipkey (Eds.), Trends In New Crops And New Uses. Ashs Press, Alexandria, Va. p580–586. 2002.

Karssen, C.M. And Lac, Ka, E. A Revision Of The Hormone Balance Theory Of Seed Dormancy: Studies On Gibberellin And/Or Abscisic Acid-Deficient Mutants Of *Arabidopsis Thaliana*. p. 315–323 In Bopp, M. (Ed.) Plant Growth Substances 1985. Erlin, Springer-Verlag 1986.

Kingel, James; Galili, Gad. Seed Development And Germination. 2^a Ed. New York: Editorial Marcel Dekker, Inc. p 2. 1995.

Koornneef, Maarten; Bentsink, Leónie. And Hilhorst, Henk. Seed Dormancy And Germination. Current Opinion In Plant Biology 5: 33–36. 2002.

Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Laboratorio de Investigación de Biología celular y molecular CELMOLEC. Protocolos CELMOLEC. 1999.

Laemmli, U.K. Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685 1970.

Lane, T.M. Mericarp Micromorphology Of Great Plains *Scutellaria* (Labiatae). Southw. Naturalist 28:71-79. 1983.

Lersten, Nels R. Flowering Plant Embryology: With Emphasis On Economic Species. Iowa, Usa: Editorial Blackwell. p166. 2004

Leubner-Metzger, Gehard. Functions And Regulation Of B- 1,3-Glucanase During Seed Germination, Dormancy Release And After-Ripening. Seed Science Research 13: 17–34. 2003

Li, Bao Qun; Fu, Tao; Yan, Yaodong; Baylor, Norman W; Ruscetti, Francis.W. And Kung, Hsiang-Fu; Inhibition Of Hiv Infection By Baicalin- A Flavonoid Compound Purified From Chinese Herbal Medicine. Cell Mol. Biol. Res. 39:119–124 1993

Liu lx, Durham Dg, Richards Rm. Baicalin Synergy With Beta-Lactam Antibiotics Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* And Other Beta-Lactam-Resistant Strains Of *S. Aureus*. *J Pharm Pharmacol*. 52:361-6. 2000

Liu, Jun-Jen; Huang, Tien-Shang; Cheng, Wen-Fang; Lu, Fung-Jou. Baicalein And Baicalin Are Potent Inhibitors Of Angiogenesis: Inhibition Of Endothelial Cell

Proliferation, Migration And Differentiation. *Int J Cancer*. 106:559-65. 2003.

Mauseth, James. *Botánica. An Introduction To Plant Biology*. 4ª Edición. Sudbury, Massachusetts: Editorial Jones Abd Bartlett, Inc. p103. 2008.

Nambara, Eiji. And Marion-Poll, Annie. Aba Action And Interactions In Seeds. *Trends In Plant Science* 8:213–217. 2003

Norton, Nelson. *A Photometric Adaptation Of The Somogyi Method For The Determination Of Glucose*. *The Journal Of Biological Chemistry*, Baltimore, 153: 375-381. 1944.

Ong, Eng Shi, Len Shea Mei, Huay Lee, Audrey Chee. Differential Protein Expression Of The Inhibitory Effects Of A Standardized Extract From *Scutellariae Radix* In Liver Cancer Cell Lines Using Liquid Chromatography And Tandem Mass Spectrometry. *J Agricfood Chem*. 53: 8-16. 2005

Perez, Gerardo; Vega, Nohora; Fernandez-Alonso, Jose Luis. Lectin Prospecting In Colombian Labiatae. A Systematic-Ecological Approach – li; *Caldasia*. 28(2):179-195. 2006

Paton, Alan. A Global Taxonomic Investigation Of *Scutellaria*. (Labiatae). *Kew. Bull.* 45(3): 399-450. 1990.

Rivillas-Acevedo, Lina y Soriano-Garcia, Manuel. Antifungal Activity of a Protean Extract from *Amaranthus hypochondriacus* Seeds. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 51(3): 136-140. 2007

Santamarina Siurana, Mª Pilar. *Biología Y Botánica. Tomo I*. España: Editorial De La Universidad Politécnica De Valencia. p286. 2005.

Savage, Stefan. *A Catalogue Of The Linnean Herbarium*. Linnean Society. London. 1945

Shen, Yuh Chiang; Chiou, Wen-Fei; Chou, Yueh-Ching And Chen, Chieh-Fu. Mechanisms In Mediating The Anti-Inflammatory Effects Of Baicalin And Baicalein In Human Leukocytes. *Eur J Pharmacol.*, 465:171-81. 2003.

Shieh, D.E., L.T. Liu, And C.C. Lin. Antioxidant And Free Radical Scavenging Effects Of Baicalein, Baicalin And Wogonin. *Anticancer Res*. 20:2861–2865. 2000.

Sinha, Sujanto; Pokhrel, Subhash; Vaidya, B.N. And Joshee, Nirmal. In Vitro Micropropagation And Callus Induction In *Scutellaria discolor* Colebr. A Medicinally Important Plant Of Nepal. *Indian J. Plant Genet. Resources* 12:219–223. 1999.

Stojakowska A., J. Malarz, And S. Kohlmuenzer. Micropropagation Of *Scutellaria Baicalensis* Georgi. Acta Soc. Bot. Pol. 68:103–107 1999.

Somogyi, M. *Notes On Sugar Determination*. The Journal Of Biological Chemistry, Baltimore., 195: 19-23. 1952.

Taiz, Lincoln And Zeiger, Eduardo., Plant Physiology. 3^a Edicion. Sunderland Massachusetts: Editorial Sinauer Associates, Inc. p484. 2002.

Tropicos.Org. Missouri Botanical Garden. 18 Diciembre 2009 [En Linea] <[Http://Www.Tropicos.Org/Name/17606148](http://www.tropicos.org/name/17606148)>.

Vargas, William. Guía Ilustrada De Las Plantas De Las Montañas Del Quindío Y Los Andes Centrales., Universidad De Caldas. p328. 2002

Villareal Quintanilla, Jose Angel. Introducción A La Botánica Forestal. 2^aedicion. Mexico: Editorial Trillas. p48. 1993.

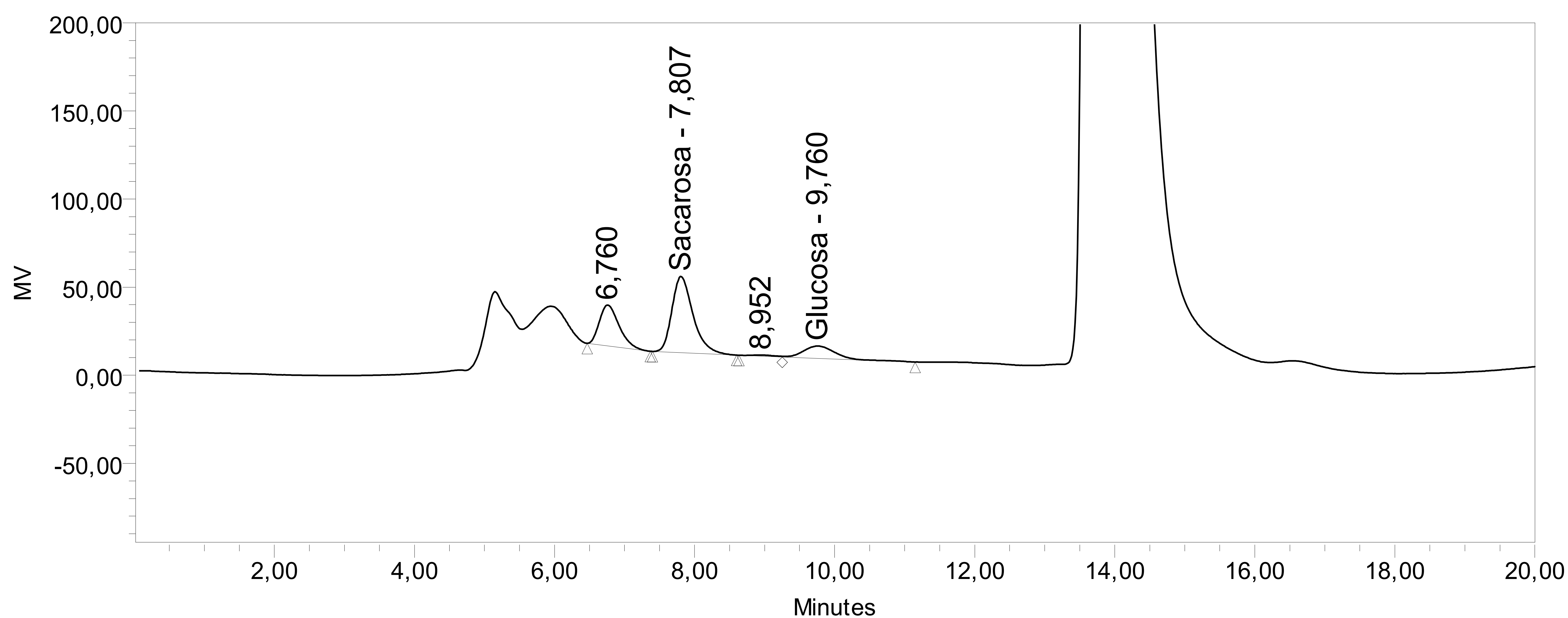
Wozniak Dorota, Lamer-Zarawska, Eliza, Matkowski Adam. Antimutagenic And Antiradical Properties Of Flavones From The Roots Of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Nahrung*. 48:9-12. 2004.

Yang, Zay-Chang; Wang, Bo-Chu; Yang, Xiao-Sheng; Wang, Qiang And Ran Liang. The Synergistic Activity Of Antibiotics Combined With Eight Traditional Chinese Medicines Against Two Different Strains Of *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 41:79.2005.

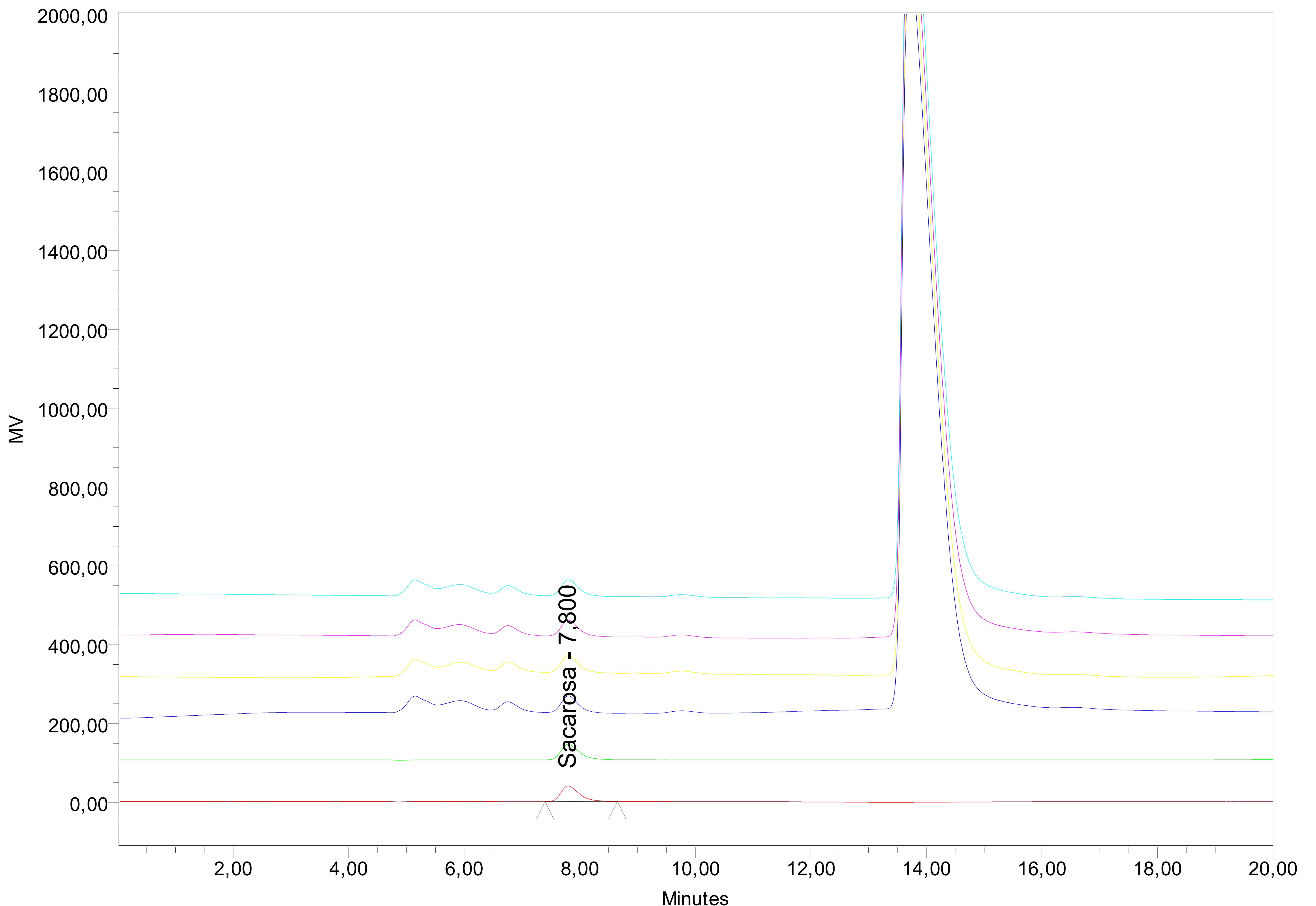
ANEXOS

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Fisiologia A1	Acquired By:	Cenicafe
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Muestras Fisiologia 161009
Vial:	21	Acq. Method Set:	Azucares_MS
Injection #:	2	Processing Method:	SAC
Injection Volume:	20,00 ul	Channel Name:	410
Run Time:	20,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Acquired:	17/10/2009 12:36:58 PM COT		
Date Processed:	24/10/2009 06:08:27 PM COT		



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1		6,760	453694	28,38	23248		
2	Sacarosa	7,807	912616	57,09	43293	0,209	>%
3		8,952	14789	0,93	627		
4	Glucosa	9,760	217381	13,60	6922	0,048	>%
5	Fructosa	11,613					



- Sample Name: Estandar Sacarosa; Date Acquired: 17/10/2009 11:34:22 AM COT; Vial: 1; Injection: 1
- Sample Name: Estandar Sacarosa; Date Acquired: 17/10/2009 11:55:12 AM COT; Vial: 1; Injection: 2
- Sample Name: Fisiologia A1; Date Acquired: 17/10/2009 12:16:08 PM COT; Vial: 21; Injection: 1
- Sample Name: Fisiologia A1; Date Acquired: 17/10/2009 12:36:58 PM COT; Vial: 21; Injection: 2
- Sample Name: Fisiologia A2; Date Acquired: 17/10/2009 12:57:51 PM COT; Vial: 22; Injection: 1
- Sample Name: Fisiologia A2; Date Acquired: 17/10/2009 01:18:41 PM COT; Vial: 22; Injection: 2

Peak Summary with Statistics Name: Sacarosa

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Estandar Sacarosa	1	1	Sacarosa	7,800	873952	100,00	39479	0,2020	%
2	Estandar Sacarosa	1	2	Sacarosa	7,799	866917	100,00	39440	0,2020	%
3	Fisiologia A1	21	1	Sacarosa	7,806	903172	1,20	42849	0,2096	%
4	Fisiologia A1	21	2	Sacarosa	7,807	912860	1,25	43295	0,2118	%

Peak Summary with Statistics
Name: Sacarosa

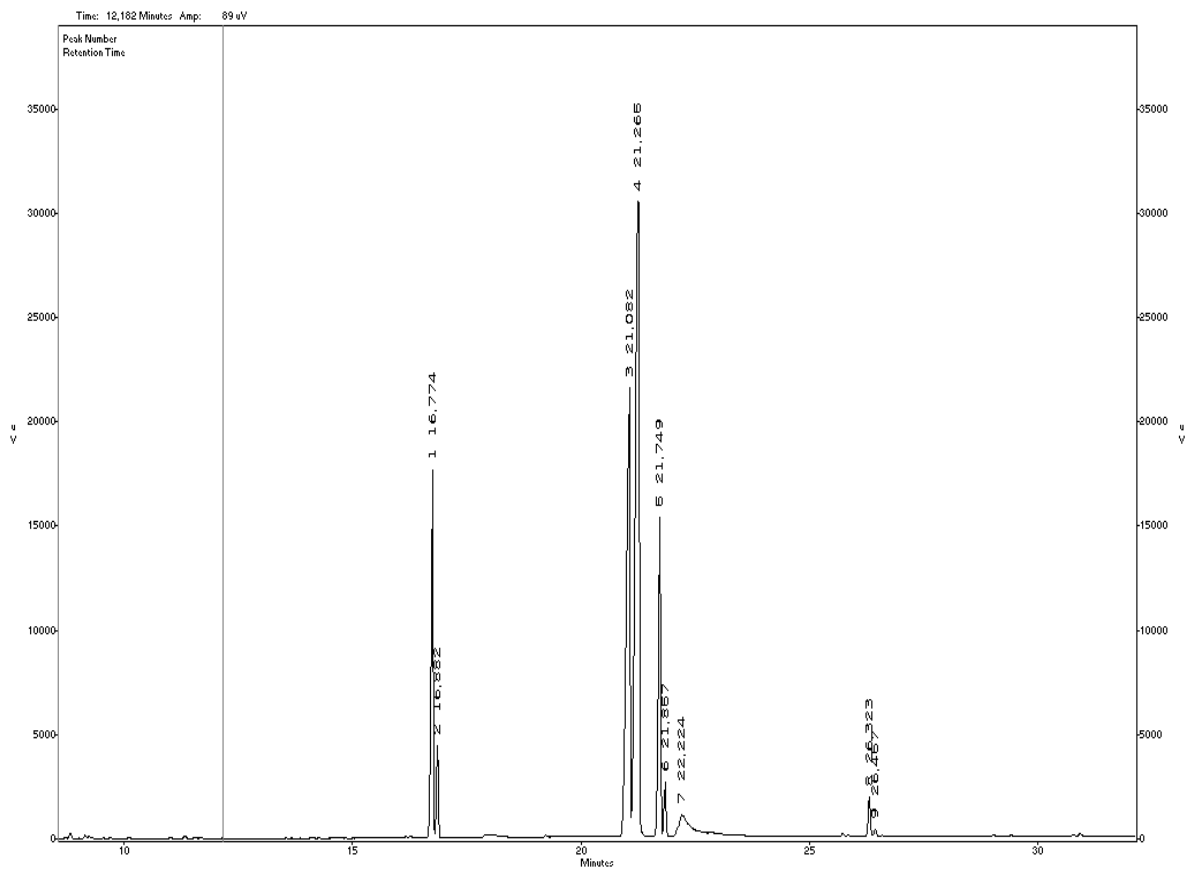
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	Units
5	Fisiologia A2	22	1	Sacarosa	7,806	853783	1,14	40719	0,1981	%
6	Fisiologia A2	22	2	Sacarosa	7,808	858513	1,16	41003	0,1992	%
Mean					7,804				0,2038	
Std. Dev.					0,004				0,0056	
% RSD					0,05				2,7562	

Peak Summary with Statistics
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Fisiologia A1	21	1	6,756	446598	0,60	22935
2	Fisiologia A1	21	1	9,763	178804	0,24	6384
3	Fisiologia A1	21	1	10,783	3346	0,00	432
4	Fisiologia A1	21	2	9,760	191007	0,26	6597
5	Fisiologia A1	21	1	12,367	267138	0,36	5395
6	Fisiologia A1	21	1	13,723	72761115	97,00	1891297
7	Fisiologia A1	21	1	16,517	450273	0,60	9102
8	Fisiologia A1	21	2	13,726	71124760	97,52	1887285
9	Fisiologia A1	21	2	16,541	249353	0,34	5586
10	Fisiologia A1	21	2	6,760	454174	0,62	23260
11	Fisiologia A2	22	1	6,757	424886	0,57	21849
12	Fisiologia A2	22	1	9,755	177861	0,24	6217
13	Fisiologia A2	22	2	16,551	264922	0,36	5972
14	Fisiologia A2	22	2	13,724	72343037	97,66	1912616
15	Fisiologia A2	22	2	13,217	4347	0,01	580
16	Fisiologia A2	22	2	9,760	183674	0,25	6347
17	Fisiologia A2	22	1	13,722	72994623	97,44	1912945
18	Fisiologia A2	22	1	16,533	459927	0,61	9421
19	Fisiologia A2	22	2	6,758	423037	0,57	21927
Mean				11,762			
Std. Dev.				3,545			
% RSD				30,14			

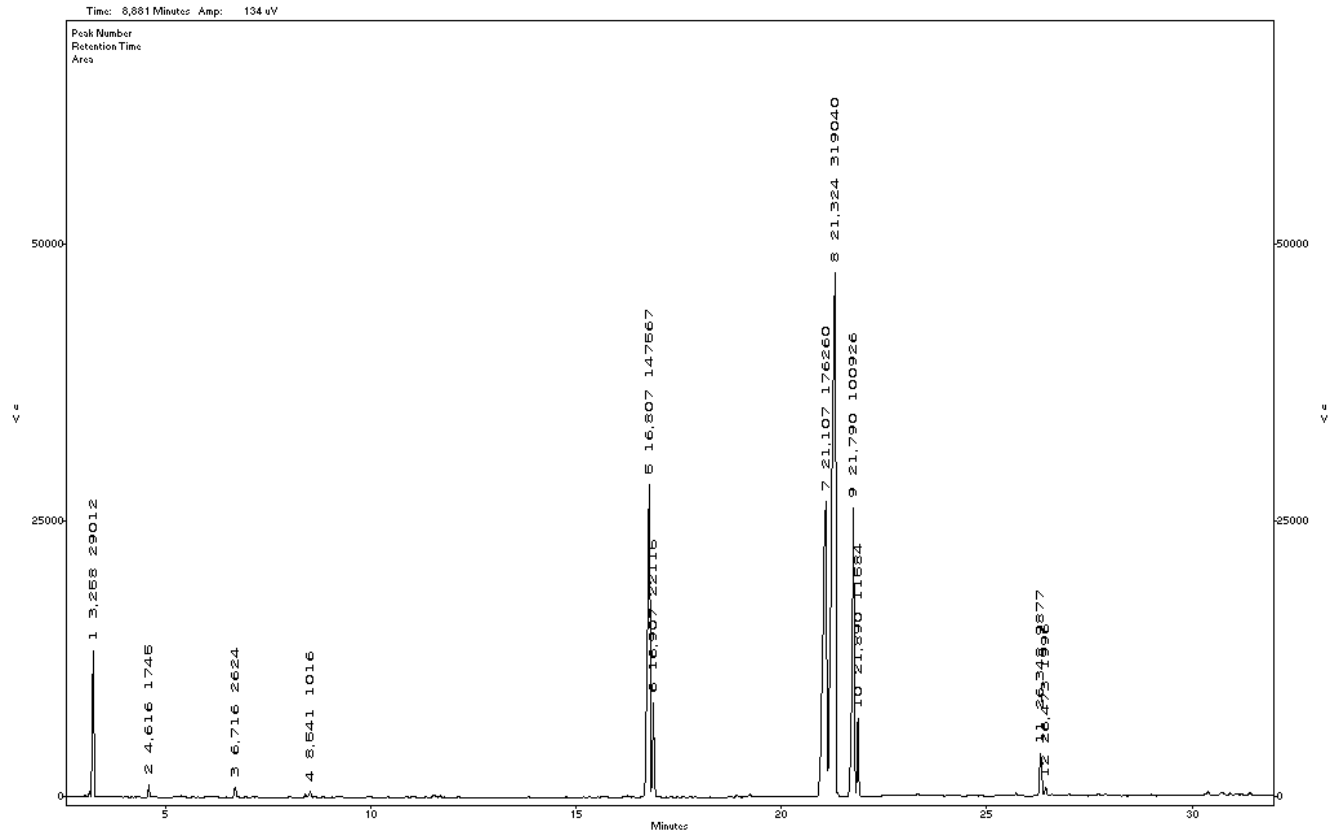
UNIVERSIDAD DE NARIÑO-LABORATORIOS ESPECIALIZADOS
ANALISIS DE ACIDOS GRASOS EN SEMILLA *S. incarnata*

Muestra No 1 Extracción En frío



UNIVERSIDAD DE NARIÑO-LABORATORIOS ESPECIALIZADOS
ANALISIS DE ACIDOS GRASOS EN SEMILLA *S. incarnata*

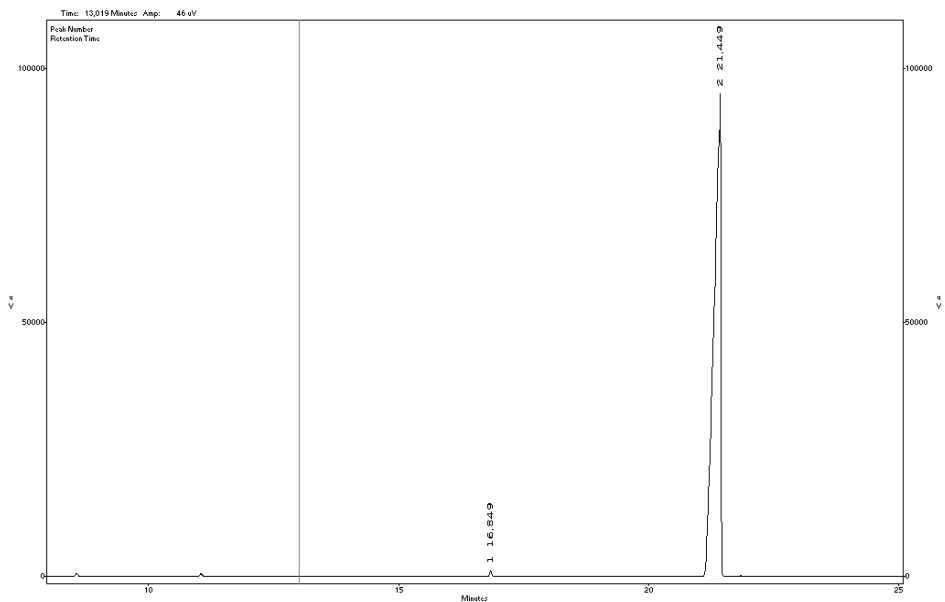
Muestra No 2 Extraccion en Temperatura Ambiente.



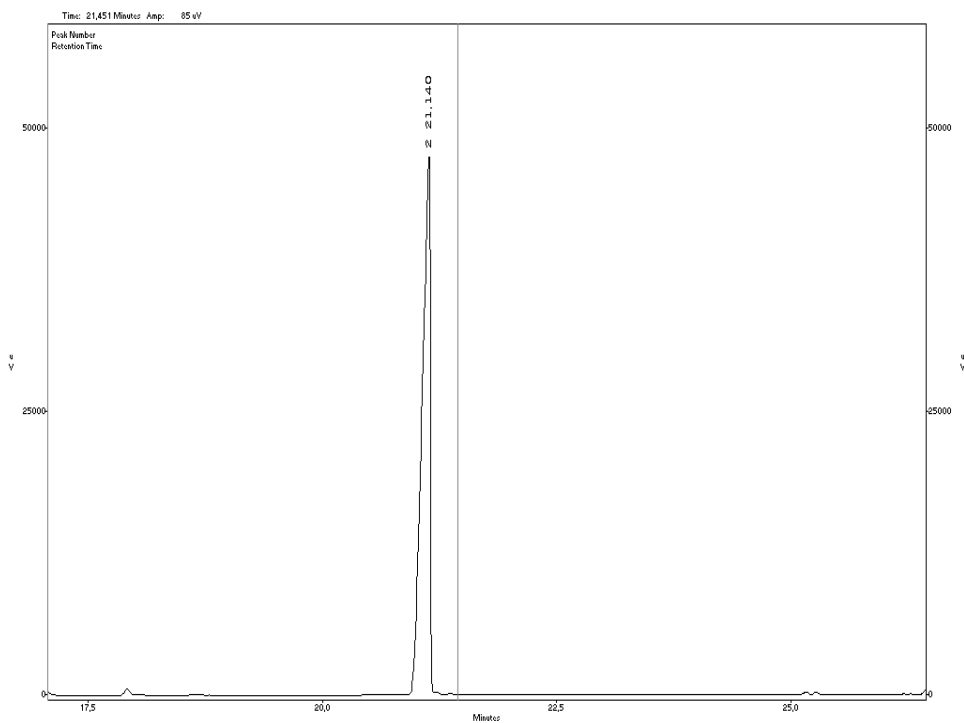
UNIVERSIDAD DE NARIÑO-LABORATORIOS ESPECIALIZADOS
ANALISIS DE ACIDOS GRASOS EN SEMILLA *S. incarnata*

Estandares.

1. Metil Oleato.



2. Metil linoleato.





UNIVERSIDAD DE NARIÑO
SECCION DE LABORATORIOS ESPECIALIZADOS
AREA DE CROMATOGRAFIA

Fecha: Junio 19 2009

Solicitante: Lorena Mendoza Tobar. Programa de Biología. Universidad del Cauca

Tipo de Muestra: Aceite de Semilla de *S. incarnata*.

Codigo de las muestras: 0298Aag1 Extracción en Frío - 0297Aag2 Extracción T° Ambiente.

Fecha de Recepción de las Muestras: 02/06/09

Análisis Solicitado: Identificación Acidos Grasos por Cromatografía de Gases

Numero de Muestras :2

ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES GC-FID

1. Preparación de la Muestra: Se procedió a realizar la esterificación del aceite de la semilla de *S. incarnata*. Se adicionó 10 mL de la mezcla HCl/Metanol 5% p/v a 50µL del aceite. La mezcla se llevo a sistema de reflujo por 2 horas. Posteriormente se dejo reposar y se realizó la extracción de los metil ésteres de los ácidos grasos con 1 mL de n-Hexano (Mallinckrodt Grado HPLC). El extracto se conservó en refrigeración hasta el momento de su análisis. 1 µL del extracto se inyectó al cromatógrafo a las siguientes condiciones.

2. Condiciones de Análisis:

Equipo: Cromatógrafo de Gases con detector de ionización en llama FID SHIMADZU GC-17 A.

Columna: Columna Capilar DB-5 (J&W Scientific . 30m x 0,25mm ID 0,25µm)

Gas Carrier: Helio UAP (99,995%) a flujo de 1.0 mL/min.

Presión de entrada de la columna: 80 kPa.

Inyector: Temperatura Inyector: 250°C Modo Inyección: Split, relación 20:1

Detector: Detector FID Temperatura: 280°C

Programación de Temperatura Columna: 150°C(4min)hasta 250°C (5 min) a razón de 4°C/ min.

3. Análisis de las Muestras: La identificación de los metil ésteres de los ácidos grasos de las muestras de semilla *S incarnata* se realizó usando el método de comparación de sus tiempos de retención con los de estandares de FAMES alta pureza (Alltech) analizados a las mismas condiciones, y mediante el calculo de sus indices de retención (Adams 2004- NIST 2008) usando una serie homologa de n-Alcanos C6-C32 (Restek, Bellefonte).

4. Resultados: Los resultados de las muestras se consignan en las tablas No 1 y 2.



UNIVERSIDAD DE NARIÑO
SECCION DE LABORATORIOS ESPECIALIZADOS
AREA DE CROMATOGRAFIA

TABLA No 1. Muestra de Semilla de *S incarnata*. Extracción en Frío.

Pico N°	Tr Min	*Cantidad Relativa %	Identificación	Indice de Retención
1	16,774	16,606	Acido Palmitico ME	1918
2	16,882	2,534	Acido Palmitoleico ME	1922
3	21,082	24,097	Acido Linoléico ME	2096
4	21,265	39,719	Acido Oleico ME	2104
5	21,749	10,900	Acido Esteárico ME	2125
6	21,857	1,574	NI	2130
7	22,224	3,200	NI	2145
8	26,323	1,182	NI	2322
9	26,457	0,190	Acido Eicosanoico ME	2328

TABLA No 2. Muestra de Semilla de *S incarnata*. Extracción Temperatura Ambiente.

Pico N°	Tr Min	*Cantidad Relativa %	Identificación	Indice de Retención
1	3,258	3,522	NI	1248
2	4,616	0,212	NI	1376
3	6,716	0,319	NI	1493
4	8,541	0,123	NI	1585
5	16,807	17,914	Acido Palmitico ME	1919
6	16,907	2,685	Acido Palmitoleico ME	1923
7	21,107	21,400	Acido Linoléico ME	2097
8	21,324	38,730	Acido Oleico ME	2107
9	21,790	12,252	Acido Esteárico ME	2127
10	21,890	1,406	NI	2131
11	26,348	1,200	NI	2323
12	26,473	0,242	Acido Eicosanoico ME	2328

ME= Metil Ester

NI = No Identificado.

* Normalizado respecto a todos los picos

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
SECCION DE LABORATORIOS ESPECIALIZADOS
AREA DE CROMATOGRAFIA

Anexo Cromatogramas de las muestras No 1 (0298Aag1 Extracción en Frío) y No 2 (0297Aag2 Extracción T° Ambiente). Cromatogramas de estandares de los Metil ésteres de los ácidos Linoléico y Oleico.

Atentamente,



FDO.DAVID ARTURO.

Químico, Laboratorios Especializados
Universidad de Nariño