

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FLAVONOIDES DE *Scutellaria incarnata* Vent. MEDIANTE EL CULTIVO DE RAÍCES PILOSAS EN MEDIO LÍQUIDO Y DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO

ANDREA CORREDOR RODRÍGUEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2013**

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FLAVONOIDES DE *Scutellaria incarnata* Vent. MEDIANTE EL CULTIVO DE RAÍCES PILOSAS EN MEDIO LÍQUIDO Y DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO

ANDREA CORREDOR RODRÍGUEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Bióloga**

Director

NELSON ROJAS MARTÍNEZ

Lic. en Biología y Química; M.Sc en Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2013

NOTA DE ACEPTACIÓN

Jurado

Jurado

Nelson Rojas Martínez
Director del trabajo de grado

Ciudad y fecha de sustentación: Popayán _____ de _____ del _____

“Me gusta la gente que vibra, que no hay que empujarla, que no hay que decirle que haga las cosas, sino que sabe lo que hay que hacer y que lo hace. La gente que cultiva sus sueños hasta que esos sueños se apoderan de su propia realidad”

Mario Benedetti

A mi Madre Amparo Rodríguez

A mi Padre Joaquín Corredor M.

A mis hermanos W. Mauricio y Mario A.

Y a mi Hermana Karen J.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi guía y darme la sabiduría necesaria para la realización de este trabajo.

A mi familia, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles, por respetar y apoyar cada una de mis decisiones; especialmente por brindarme su amor y apoyo incondicional.

A mi tío Juan Carlos Corredor por creer en mi familia.

A mi director de trabajo de grado, Ph.D Nelson Rojas por su apoyo, colaboración, paciencia, consejos y sugerencias indispensables para llevar a cabo la realización de este trabajo.

Al técnico laboratorista Albeiro Polanco del Departamento de Patología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca; por su ayuda, colaboración y consejos en la realización de la histología.

Al químico David Arturo Perdomo y al Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño, por toda su colaboración en los análisis cromatográficos.

A los laboratoristas John Carlos Meléndez, Clandia Caicedo, Magali Castrillón y Betty Piamba del Departamento de Biología, Universidad del Cauca, por sus consejos, apoyo y cooperación.

A los jurados, M.Sc Mabel Paz y M.Sc Oscar Bermúdez, por evaluar y aportarme sugerencias en mejora del documento final.

A la Universidad del Cauca, especialmente a los docentes del Departamento de Biología, por mi formación académica como bióloga.

A Carolina Bolaños B. y Alejandra Velasco R. por su amistad, palabras de aliento en los momentos difíciles y apoyo incondicional.

A mis compañeros de Biología con los cuales he compartido gratos momentos durante estos años, en especial a aquellos que me brindaron su amistad.

A Cristian Vidal, por su amistad, sugerencias y consejos en la redacción del trabajo escrito.

ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indolbutírico
AMB	Tinción con azul de metileno y azure II
ANA	Ácido naftalenacético
B5	Medio de cultivo Gamborg
CO	Colchicina
DMSO	Dimetil Sufóxido
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MS	Medio de cultivo Murashige & Skoog
MS^{1/2}	Medio de cultivo Murashige & Skoog con concentración de sales reducida a la mitad
SH	Medio de Cultivo Schenk y Hildebrandt
T-ADN	ADN transferido
T	Temperatura

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESÚMEN	
1. INTRODUCCIÓN	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1 GENERALIDADES GÉNERO <i>Scutellaria</i>	19
4.1.1 Clasificación taxonómica de <i>Scutellaria incarnata</i> Vent.	20
4.1.2 Descripción morfológica de <i>Scutellaria incarnata</i> Vent.	20
4.1.3 Distribución de <i>Scutellaria incarnata</i> Vent.	21
4.1.4 Importancia del género <i>Scutellaria</i>	21
4.2 METABOLITOS SECUNDARIOS	22
4.3 RAÍCES PELUDAS	25
4.4 INDUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	27
4.4.1 Fitorreguladores	27
4.4.2 Activación	29
4.5 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	30
4.6 HIPERHIDRICIDAD	31
5. ANTECEDENTES	32
6. OBJETIVOS	35
6.1 OBJETIVO GENERAL	35
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS	36
7.1 OBTENCIÓN DE LAS PLANTAS	36
7.2 METODOLOGÍA PARA LA SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES	36

7.3 METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL CULTIVO	40
7.4 ESTABLECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS	41
7.5 HISTOLOGÍA	42
7.6 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC-PDA)	43
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
8.1 CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE PAPEL	45
8.2 CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y CRECIMIENTO	47
8.2.1 Raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. cultivadas <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos	47
8.2.2 Evaluación del crecimiento de las raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. cultivadas <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos	48
8.3 HISTOLOGÍA	50
8.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC-PDA)	53
8.4.1 HPLC-PDA en raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales	54
8.4.2 HPLC-PDA en muestras de raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. cultivadas <i>in vitro</i> ; en los diferentes tratamientos	60
9. CONCLUSIONES	71
10. RECOMENDACIONES	73
11. BIBLIOGRAFÍA	74

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los flavonoides	25
Tabla 2. Plantilla de distribución de los flavonoides en el cromatograma	38
Tabla 3. Relación entre el color de la mancha y la estructura del flavonoide	39
Tabla 4. Rf calculados en las cromatografías bidimensionales de papel, del extracto de raíz de <i>S. incarnata</i> Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales	45
Tabla 5. Comparación del peso fresco (g) de las raíces de <i>S. incarnata</i> Vent., cultivadas <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos	49
Tabla 6. Prueba de Kruskal-Wallis para el peso fresco (g) de las raíces de <i>S. incarnata</i> Vent., cultivadas <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos	49
Tabla 7. Análisis de los flavonoides identificados por HPLC-PDA en raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales	55
Tabla 8. Espectros UV-Vis de flavonoides identificados por HPLC-PDA en raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. . obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales	57
Tabla 9. Resumen de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. . obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales y cultivadas <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos	58
Tabla 10. Cromatogramas obtenidos por HPLC-PDA a 330nm, de raíces de <i>S. incarnata</i> Vent cultivadas <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos	61
Tabla 11. Análisis de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en muestra de raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. cultivadas <i>in vitro</i> , en medio líquido MS½ y colchicina	63

Tabla 12. Análisis de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en muestra 64
de raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro*, en medio líquido MS½

Tabla 13. Análisis de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en muestra 64
de raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro*, en medio líquido MS½ y
AIA+Kinetina

Tabla 14. Análisis de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en muestra 65
de raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro*, en medio líquido MS½ y
ANA+Kinetina

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología de <i>Scutellaria incarnata</i> Vent.	21
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración	24
Figura 3. Posición del extracto flavonoico de raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. en el papel cromatográfico y dirección de desplazamiento de los solventes orgánicos, en cromatografía bidimensional de papel	37
Figura 4. Diseño del biorreactor empleado para el cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. en los diferentes tratamientos	41
Figura 5. Resultados de la cromatografía bidimensional de papel en raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales	46
Figura 6. Biorreactores utilizados para el cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. en los diferentes tratamientos	48
Figura 7. Comportamiento del peso fresco (g) de las raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. cultivadas <i>in vitro</i> en biorreactores, en los diferentes tratamientos	50
Figura 8. Histología de las raíces de <i>Scutellaria incarnata</i> Vent. cultivadas <i>in vitro</i> en biorreactores en los diferentes tratamientos. Corte transversal y fragmentos de raíz	51
Figura 9. Histología de las raíces de <i>Scutellaria incarnata</i> Vent. cultivadas <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos y en raíces obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales. Corte transversal. Células de la endodermis y secciones del sistema vascular	52
Figura 10. Cromatograma con los picos y tiempos de retención de cada uno de los compuestos detectados por HPLC-PDA en raíces de <i>S. incarnata</i> Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales	54

- Figura 11. Cromatogramas obtenidos por HPLC-PDA a 330nm de raíces de *S. incarnata* Vent., cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos 60
- Figura 12. Comparación entre los cromatogramas obtenidos por HPLC-PDA, en raíces de *S. incarnata* Vent., cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos 63
- Figura 13. Comparación entre la concentración de flavonoides identificados en raíces de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales y en raíces cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos 66
- Figura 14. Comparación de la concentración de flavonoides identificados, en raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos 67

RESÚMEN

Este trabajo se realizó con el objetivo de caracterizar y evaluar la producción de flavonoides, en raíces de *Scutellaria incarnata* Vent. cultivadas *in vitro*, mediante la adición de fitorreguladores y de colchicina (CO) al medio de cultivo. Para ello, se realizó un cultivo *in vitro* en biorreactores de 2L, con medio líquido Murashige & Skoog (1/2) en un período de 7 semanas; estableciéndose los siguientes tratamientos: MS^{1/2}, CO [1mg/L], AIA+Kinetina [1mg/L] y ANA+ Kinetina [1mg/L].

Mediante la utilización de pruebas estadísticas y de histología, se dio a conocer las diferentes respuestas a nivel de crecimiento de las raíces; el mayor crecimiento se obtuvo en presencia de AIA+Kinetina con un peso fresco igual 0,1382 g. La caracterización y elucidación estructural de los flavonoides en raíces de *Scutellaria incarnata* Vent., se hizo a través de pruebas cromatográficas como cromatografía bidimensional de papel y HPLC-PDA; obteniéndose una producción de flavonoides de tipo flavona, flavanol, flavonol, isoflavonol entre las raíces cultivadas *in vitro* y las raíces cultivadas en condiciones naturales.

En esta investigación, se confirma a *Scutellaria incarnata* Vent. como fuente de moléculas activas de origen natural con potencial farmacológico; así mismo, se reafirma el uso de los fitorreguladores ácido-3-indoloacético, ácido naftalenacético y kinetina en el cultivo *in vitro* de tejidos.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años las plantas medicinales han llamado la atención como fuente de moléculas bioactivas de uso farmacológico. *Scutellaria* es un género cosmopolita que abarca un número apreciable de especies de interés medicinal, las cuales han sido objeto de investigación tanto para el estudio de las rutas metabólicas, así como la presencia y bioactividad de moléculas de origen natural (Joshee *et al.*, 2010).

La creciente demanda de la biomasa de los recursos naturales ha generado una disminución de los recursos renovables. El uso de productos naturales de interés farmacéutico provenientes de plantas se ha incrementado, debido a la limitación de los procesos de obtención de medicamentos basados en la síntesis química (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Dado a que varios metabolitos secundarios de interés farmacéutico se acumulan en las raíces de las plantas (Guillon *et al.*, 2006), es pertinente un sistema que permita la producción de metabolitos secundarios sin necesidad de afectar la planta; puesto que la recolección de raíces en condiciones naturales resulta perjudicial para su conservación.

Se ha mencionado que la producción de metabolitos secundarios suele tener un rendimiento bajo en condiciones normales; es por eso que se hace necesario el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de raíces peludas

(Hairy roots). Ésta, es una técnica en la cual las raíces responden exudando metabolitos secundarios ante la presencia de algunos activadores ya sean bióticos, abióticos o endógenos. Este modelo permite que haya una respuesta inmediata como consecuencia de la activación; considerándose como una alternativa atractiva para la producción de numerosos y valiosos metabolitos secundarios naturales.

En este trabajo, se abarca un primer estudio de la especie *Scutellaria incarnata* Vent. conocida popularmente como “Alegría”, distribuida en la meseta de Popayán entre los 1500 y 2500 msnm; sobre la producción de flavonoides en raíces cultivadas *in vitro*, en biorreactores con medio líquido Murashige & Skoog (½) y diferentes mezclas de auxinas y citoquininas como activadores.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El género *Scutellaria* (Familia Lamiaceae), es importante no sólo por su uso ornamental sino también por su uso en medicina alternativa como antiinflamatorio, emenagogo, antiespasmódico, en tónicos, en enfermedades bacterianas, entre otras (Joshee *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2011). Por esta razón; es necesario profundizar el estudio en *Scutellaria incarnata* Vent. planta regional perteneciente al género *Scutellaria*, distribuida en los departamentos del Cauca, Cundinamarca, Huila, Meta, Tolima, Putumayo, Quindío y Valle (Fernández-Alonso, 1990), de la cual aún no se reporta mucha información en la bibliografía consultada.

Por lo anterior, se desea saber si a través de la técnica de cultivos de raíces peludas *in vitro* y diferentes tratamientos, en este caso distintos fitorreguladores y factores abióticos, se encuentra un aumento en la producción de un flavonoide de interés; según lo cual puede tener alguna utilidad a nivel medicinal y/o farmacológico.

3. JUSTIFICACIÓN

Los escasos estudios en raíces de *Scutellaria incarnata* Vent. originan la realización de esta investigación, debido al desconocimiento de sus componentes químicos y por consiguiente de sus propiedades.

Los diferentes estudios realizados en plantas del género *Scutellaria*, sugieren la importancia de la producción de metabolitos secundarios; en especial de flavonoides con potencial nutracéutico y farmacológico (Lei *et al.*, 2011); por medio de la técnica de cultivo de raíces pilosas *in vitro*, entre lo cual se destaca para este género, la presencia de más de 295 compuestos aislados, entre ellos flavonoides y diterpenos (Shang *et al.*, 2010).

La presencia de un posible flavonoide de interés medicinal en *Scutellaria incarnata* Vent., justifica su estudio a través de una técnica alternativa que permita su producción, puesto que la síntesis química de la misma suele ser compleja tanto en condiciones normales como en el laboratorio (Lei *et al.*, 2011; Roben *et al.*, 1991). Así mismo, es importante evaluar cuáles de los fitorreguladores estimulan el crecimiento de la raíz y establecer si existe un aumento en la síntesis de flavonoides, a través de la técnica cromatográfica HPLC-PDA, para su cuantificación y caracterización.

La identificación de un flavonoide con potencial farmacológico motiva a futuras investigaciones con miras a aplicaciones biomédicas, farmacológicas y biotecnológicas.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES GÉNERO *Scutellaria*

Las Lamiáceas también conocidas como labiadas, son una familia de plantas aromáticas constituidas principalmente por hierbas o arbustos, provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (Fernández-Alonso and Rivera-Díaz, 2006). La familia Lamiaceae, está integrada por aproximadamente 223 géneros y 5600 especies (Ceja-Romero *et al.*, 2005); representadas en Colombia por 23 géneros y unos 203 taxones (entre especies y subespecies), de los cuales 186 son nativos y sólo una pequeña parte (17 especies) son plantas foráneas. En la actualidad, éstas plantas se encuentran formando parte de la flora colombiana; hay además, otras 21 especies de labiadas exóticas, ampliamente cultivadas en Colombia por sus variados usos (condimento, medicinal, mágico-religioso, ornamental) (Fernández-Alonso, 2006).

Los géneros más diversos en Colombia son *Salvia* con 83 taxones e *Hyptis* con 42, ambos son, a su vez, los más diversos de la familia en territorio americano. Le siguen en importancia otros cuatro géneros: *Scutellaria* (22 especies), *Satureja* (14 especies), *Stachys* (13 especies) y *Lepechinia* (10 especies). En tiempos recientes se adelantaron algunas contribuciones o revisiones parciales en esta familia para Colombia, de donde resultaron nuevas especies y combinaciones en los géneros *Hyptis*, *Lepechinia*, *Salvia*, *Satureja* y *Scutellaria* (Fernández-Alonso, 2006).

La mayoría de las especies del género *Scutellaria* son herbáceas , anuales o perennes (Joshee *et al.*, 2010; Shang *et al.*, 2010); plantas de 5 cm a 1 m de altura, unos pocos son sub-arbustos y algunos acuáticos. Tienen tallos cuadrangulares y hojas opuestas; las flores tienen 5 pétalos, fusionados en forma de boca con un labio superior, generalmente bilobulado y más corto, y uno inferior, trilobulado (Shang *et al.*, 2010).

En cuanto a su localización; los géneros de *Salvia* y *Scutellaria* se encuentran asociados a los bordes de bosques y quebradas en las cordilleras Colombianas. (Fernández- Alonso y Rivera-Díaz, 2006).

4.1.1 Clasificación taxonómica de *Scutellaria incarnata* Vent.

Clase: Magnoliophyta

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Scutellaria*

Especie: *Scutellaria Incarnata* Vent.

Nombre Común: Alegría

4.1.2 Descripción morfológica de *Scutellaria incarnata* Vent. Hierba de más o menos 40 cm, de tallos cuadrangulares verdes con visos púrpura, el haz de las hojas simples, opuestas, de margen levemente aserrado con pelos dispersos, blanquecinos; envés verde con coloración púrpura uniforme debida a pigmentos que se encuentran dentro de las células epidermales; espigas con flores de colores, fuertemente bilabiadas rojo intenso¹ (figura1).

¹ ESTUDIOFARMACOLOGIA VEGETAL. En <http://es.scribd.com/doc/97875504/Farmacologia-Vegetal-2011>



Figura 1. Morfología de *Scutellaria incarnata* Vent. A) Flor. B) Raíz. C) Inflorescencia. D) Semilla.

4.1.3 Distribución de *Scutellaria incarnata* Vent. Según Fernandez-Alonso (1990), *Scutellaria incarnata* Vent. se distribuye en Colombia, en los departamentos del Cauca, Cundinamarca, Huila, Meta, Tolima, Putumayo, Quindío, Valle y Magdalena.

4.1.4 Importancia del Género *Scutellaria*. El interés por la relación entre los efectos farmacológicos y los usos tradicionales de *Scutellaria* ha aumentado considerablemente en los últimos años (Shang *et al.*, 2010). La *Scutellaria* es un género utilizado en medicina alternativa como antiinflamatorio, emenagogo

antiespasmódico, tónico para los nervios y sedantes. Además, su uso como un sistema modelo permite entender la biosíntesis de flavonoides (Joshee *et al.*, 2010).

Según Shang *et al.*, (2010) más de 295 compuestos han sido aislados, entre ellos los flavonoides y diterpenos. Estudios muestran que *Scutellaria* y sus principios activos poseen amplias acciones farmacológicas, como antitumoral, anti-angiogénesis, hepatoprotector, antioxidante, actividades anticonvulsivas, antibacteriales y antivirales.

4.2 METABOLITOS SECUNDARIOS

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos.

Los metabolitos primarios son aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas, desempeñando las mismas funciones (Ávalos y García, 2009); mientras que los metabolitos secundarios son compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales en ellas, ya que no intervienen en el metabolismo primario pero les confiere unas claras ventajas selectivas, interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Masa, 2011).

No obstante, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y García, 2009; Masa, 2011). Muchos pueden ser secretados dentro de las células, en vacuolas, o excretados extracelularmente como resinas o material de la pared celular (Masa, 2011).

Según Ávalos y García (2009), los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales:

- Terpenos: Entre los que se encuentran fitorreguladores, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos Fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidoscianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides

Los fenoles son compuestos químicos con al menos un anillo aromático que contienen uno o más grupos hidroxilos. Muchos de estos compuestos aparecen derivados de reacciones de condensación y adición, dando así lugar a una gran variedad de compuestos químicos en las plantas. La importancia de los fenoles radica en que producen soporte mecánico a la planta, contribuyen en la coloración de las flores y frutos, protegen contra patógenos, herbívoros y tienen una gran efectividad protegiendo los tejidos frente a la radiación UV (Masa, 2011).

Al grupo de fenoles pertenecen los flavonoides, compuestos fenólicos de 15 carbonos, que se distribuyen en el reino vegetal en más de 2.000 especies de muy diversas familias. Desempeñan un papel importante en la fisiología vegetal, dado que responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas (Russo y Speranza, 2006).

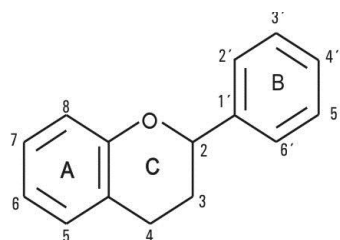


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración².

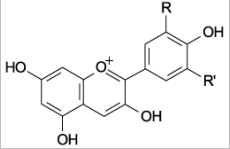
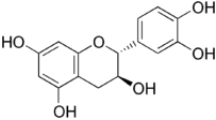
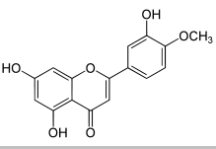
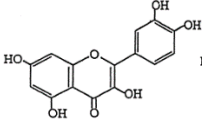
Químicamente, los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Russo and Speranza, 2006; Isaac *et al.*, 2009). Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2' al 8', y los del anillo B desde el 1' al 6' (Russo y Speranza, 2006) (figura 2).

De acuerdo a las variaciones del pirano los flavonoides se pueden clasificar en antocianidinas, flavanos, flavonas y flavonoles (ver tabla1) (Isaac *et al.*, 2009). Estos son sintetizados a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, formándose los ácidos cinámico y p-hidroxicinámico, los que al condensarse con acetato dan lugar a la estructura del cinamol de los flavonoides; luego se generan las formas glicosiladas y sulfatadas (Palomo *et al.*, 2010).

² Tomado de http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.htm

En consecuencia, a la gran demanda del uso de flavonoides, algunos órganos de la planta representan una alternativa interesante para la obtención de productos secundarios a través de cultivos de células. Dos tipos de órganos se consideran generalmente para este objetivo: las raíces peludas y cultivos de brotes (Bourgaud *et al.*, 2001).

Tabla 1. Clasificación de los flavonoides de acuerdo a Isaac *et al.*, (2009)

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
<i>Antocianidinas</i>	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.	Antocianidina	
<i>Flavanos</i>	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.	Catequina	
<i>Flavonas</i>	Posen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina	
<i>Flavonoles</i>	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	

4.3 RAÍCES PELUDAS

El cultivo *in vitro* de raíces, aplicado al estudio y producción de metabolitos secundarios se comenzó a utilizar hace 40 años. Estos sistemas generalmente obtenidos a través de un balance hormonal en el medio de cultivo, eran difíciles de establecer y además presentaban un crecimiento lento. Sin embargo, esto pudo ser solucionado por medio del cultivo de raíces transformadas, obtenidas a través de la infección con cepas patogénicas de *Agrobacterium rhizogenes* (raíces en cabelleras o "hairy roots") (Rodríguez-Talou *et al.*, 1994).

El proceso de transformación es un mecanismo de ingeniería genética natural bastante complejo. Básicamente consiste en la transferencia de una porción de ADN (T-ADN) del plásmido Ri de *A. rhizogenes* al genoma de la célula vegetal. El mecanismo se dispara con la secreción de compuestos fenólicos (acetosiringona) producidos por heridas de las plantas. Una vez producida la inserción en el genoma vegetal los genes del T-ADN transferido se expresan induciendo a la célula transformada a comportarse como una célula raíz. Paralelamente se sintetizan aminoazúcares (opinas) que son utilizados por *A. rhizogenes* como nutrientes. Se obtienen así raíces transformadas capaces de mantenerse en cultivo *in vitro* en medios libres de fitoreguladores conservando el mismo perfil de compuestos que la planta original (Rodríguez-Talou *et al.*, 1994).

Del mismo modo, el interés en las raíces peludas se debe principalmente a su capacidad para crecer rápidamente sin necesidad de un suministro externo de las auxinas. Muchas veces ellos no necesitan incubación bajo la luz; además, presentan una estabilidad genética (Rao y Ravishankar, 2002).

Según Piñeros-Castro *et al* (2009), la modificación de las raíces mediante infección con *Agrobacterium rhizogenes* ha sido planteada como una estrategia para incrementar la producción de biomasa y por lo tanto de metabolitos secundarios en plantas cultivadas *in vitro*; además de ésta, se han estudiado la adición de precursores y otras estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios, resultando - la activación - una de las más exitosas. Esta metodología es en general aplicable para la mayoría de las dicotiledóneas, ya que son más susceptibles a la infección (Rodríguez-Talou *et al.*, 1994).

En contraste a Rodríguez-Talou *et al.*, (1994); Rao y Ravishankar (2002), los cultivos de raíces pilosas necesitan una fuente exógena de fitorreguladores (Hu y Du, 2006). La adición de fitorreguladores a los cultivos *in vitro* de raíces peludas transformadas por *Agrobacterium*, afecta los cambios morfológicos y bioquímicos, lo que resulta en la alteración del crecimiento y las tasas de acumulación de metabolitos secundarios en los tejidos radiculares. Además, el uso de fitorreguladores *in vitro*, ha recibido una creciente atención como un medio potencial para aumentar los productos secundarios de plantas obtenidos en pequeñas cantidades (McCoy, 2003).

El sistema de raíces transformadas es interesante para el estudio de rutas metabólicas, interacción de las plantas con microorganismos, estudios de producción, etc. (Rodríguez -Talou *et al.*, 1994).

4.4 INDUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

4.4.1 Fitorreguladores. Los fitorreguladores son compuestos orgánicos sintetizados en diversas partes de las plantas, cuya función junto con las enzimas y vitaminas es actuar como biocatalizadores. Los fitorreguladores estimulan en las células vegetales cambios químicos y fisiológicos³, pueden actuar a bajas concentraciones, mediando procesos de señalización relacionados con el crecimiento, la diferenciación o la respuesta a factores ambientales (Zabala *et al.*, 2009).

En el cultivo *in vitro* los fitorreguladores son utilizados para la micropropagación; las auxinas y citoquininas son comunes en los medios de cultivos, cuya función consiste principalmente en estimular la elongación y multiplicación celular, formación de raíces adventicias, promoción de la organogénesis, entre otros.

Según Coletto y Coletto-Martínez (1995), los fitorreguladores pueden clasificarse en cinco grupos de acuerdo a su naturaleza química y el efecto que producen en las plantas:

- ✓ Auxinas
- ✓ Giberelinas
- ✓ Citoquininas
- ✓ Etileno
- ✓ Inhibidores y retardantes del crecimiento

³ Tomado de <http://futuroagronomo.blogspot.com/2011/03/fitohormonas-en-el-cultivo-de-tejidos.htm>

- *Auxinas*: son un grupo de fitorreguladores naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo de plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (AIA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl- AIA), ácido fenilacético (PAA), ácido indolbutírico (IBA) y el ácido indolpropiónico (IPA)⁴.

- *Giberelinas*: Son un grupo de fitorreguladores de estructura química muy compleja (esqueleto de gibane) que estimulan la multiplicación y/o la elongación celular. Fueron identificadas como productos del crecimiento del hongo *Gibberella fujikuroi* en medio líquido. Las giberelinas se consideran como derivados del ácido giberleico (GA), empleándose los subíndices para señalar pequeñas diferencias estructurales entre ellas. En la actualidad existen más de 50 compuestos con actividad giberelínica, entre los que destacan por su utilización práctica las GA₃, GA₇ y GA₉ (Coletto y Coletto-Martínez, 1995).

- *Ácido abscísico*: Es una molécula que se sintetiza en la planta, mediando la respuesta a situaciones de estrés ambiental; éste puede estimular la producción de metabolitos secundarios.

- *Etileno*: Es una molécula pequeña que difunde fácilmente a través de la membrana celular; en la planta participa en fenómenos de maduración, abscisión y respuesta a patógenos. En los cultivos celulares se utiliza para inducir la producción de metabolitos secundarios; puede suministrarse para que actúe extracelularmente cuando es alimentado con la fase gaseosa o para que actúe a nivel intracelular cuando se agrega al medio, el precursor ácido 1-

⁴ Tomado de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>

aminociclopropano-1carboxílico (ACC) que es transformado en el citoplasma a etileno por la enzima ACC oxidasa (Zabala *et al.*, 2009).

4.4.2 Activación. Los activadores son compuestos que inducen un cambio en el metabolismo de la célula vegetal, generalmente alteran la producción de metabolitos secundarios como respuesta al estrés generado por el activador (Orozco-Sánchez *et al.*, 2002; Pérez-Bran, 2010).

Los activadores pueden ser agrupados en tres categorías:

- ❖ *Activadores bióticos:* moléculas derivadas de microorganismos que estimulan el metabolismo secundario e incluyen polisacáridos, glicoproteínas, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y paredes celulares de hongos y bacterias.
- ❖ *Activadores abióticos:* radiación ultravioleta, sales de metales pesados y varios químicos.
- ❖ *Activadores endógenos:* químicos producidos dentro de la célula como mensajeros secundarios.

4.5 CULTIVO *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* de plantas se define como el cultivo de plantas o partes de los órganos, tejidos, células y protoplastos, en medio nutritivo bajo condiciones estériles y controladas. Los principales fundamentos del cultivo *in vitro* de células, órganos y tejidos, sobre todo para la micropropagación; se basan en dos

características claves de las células vegetales que son: la totipotencia y la desdiferenciación (Wabhy, 2007).

Las principales ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo convencional de plantas son: obtener sustancias de gran utilidad (metabolitos secundarios) en condiciones controladas independientemente de factores ambientales bióticos (interacción con patógenos) y abióticos (sequía, luz ultravioleta y temperaturas extremas), así como obtener un incremento considerable en el rendimiento de los metabolitos específicos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

4.6 HIPERHIDRICIDAD

La hiperhidricidad originalmente llamada vitrificación, es un desorden fisiológico (Tascan, 2007) que se produce en cultivos de tejidos de plantas caracterizado por alta retención de agua a causa de condiciones adversas de los cultivos⁵; como por ejemplo, gran potencial osmótico negativo, alta contenido de sacarosa, alta concentración de amonio y alta humedad relativa (Manzanilla, 2004; Tascan, 2007). Algunas plantas pueden adaptarse a estas condiciones *in vitro*; otras, muestran algunas características anormales, como aspecto translúcido, deficiencia de clorofila entre otros aspectos (Tascan, 2007).

⁵ En <http://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe?k=default&l=115&w=46569&n=1&s=5&t=2>

5. ANTECEDENTES

Nishikawa e Ishimaru, (1997) realizaron cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Scutellaria baicalensis*, transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* (cepa A 13) que alberga el gen β -glucuronidasa (GUS), para evaluar la relación de la expresión del gen en la producción de flavonoides tipo glucurónidos o glucósidos, obteniendo que el contenido de los flavonoides tipo glucurónido en raíces transformadas, eran bajos en comparación con lo observado en las raíces adventicias (no transformados) de esta planta. Por el contrario, los niveles de contenido de los flavonoides tipo glucósidos en las raíces transformadas, eran casi similares a los de las raíces adventicias no transformadas.

McCoy, (2003) realizó un estudio sobre el efecto de los fitorreguladores en la producción de artemisinina y crecimiento de la raíz de *Artemisia annua* L en cultivo de raíces *in vitro*. Para ello utilizó el clon YUT16, obteniendo un crecimiento significativo en las raíces cultivadas en presencia de fitorreguladores con una concentración diez veces menor, respecto a las raíces cultivadas con la solución madre. De igual manera, cuando a los 14 días de edad, se adicionó diez veces la concentración de la solución madre de los fitorreguladores a los cultivos, el crecimiento de la raíz se inhibió en comparación con las raíces enriquecidas con la solución madre. Por otra parte, obtuvo que el crecimiento de las raíces en el medio B^{1/5} fue mejor comparado con el medio B5; debido probablemente, a una mayor cantidad de carbono disponible en el medio de B^{1/5} y sacarosa al 5%. A diferencia del crecimiento de las raíces, el contenido de artemisinina aumentó al incrementar la concentración de fitorreguladores en cultivos enriquecidos con ANA, AIA, ABA y AG₃.

Según Guillon *et al.*, (2006) la investigación de la raíz peluda para la producción de metabolitos secundarios ha recibido mucha atención, debido a los nuevos conocimientos adquiridos para superar las limitaciones de la regulación de la vía metabólica de moléculas específicas y el desarrollo de la ingeniería metabólica. En la actualidad, se ofrece la posibilidad de mejorar la técnica de raíz peluda para la producción de metabolitos.

Gao *et al.*, (2010) determinaron la actividad inhibitoria de baicaleína y wogonina en células cancerosas de pulmón humano SK-MES-1 por ensayo MTT, utilizando 8 extractos de la raíz de *Scutellaria baicalensis*, cuantificadas por HPLC y evaluadas en diferentes concentraciones.

Lei *et al.*, (2011) estudiaron el efecto del elemento de tierras raras praseodimio (Pr) en la producción de flavonoides y biosíntesis de enzimas como la peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7), la polifenol oxidasa (PPO, EC 1.10.3.1) y fenilalaninaaminoliasa (PAL, EC 4.3.1.5) en las raíces peludas de *Scutellaria viscidula*, demostrando actividades de POD, PPO, PAL y producción de flavonoides ascendentes en el primer instante y luego una disminución, dependiente de la concentración de gradiente de Pr^{+3} .

Kim *et al.*, (2012) realizaron un estudio sobre cultivo de raíz peluda de *Scutellaria baicalensis* en diferentes medios MS, B5 y SH basal suplementado con 3% de sacarosa; adicionando, varias concentraciones de auxinas a los medios de cultivo, para optimizar el crecimiento y la producción de flavona; encontrando, que las raíces peludas cultivadas en SH mostraron un mayor crecimiento (0,32 g/30 ml). Igualmente, demostraron que los niveles de las flavonas baicaleína y wogonina fueron mayores en los cultivos de raíces peludas utilizando un medio B5

concentrado que las de los otros medios utilizados en este estudio; mientras que las tasas de crecimiento de las raíces peludas no varió significativamente entre los tratamientos de auxinas. Sin embargo, observaron que las auxinas aumentaron la producción de flavona; la auxina ácido indolacético (AIA) a 1 mg/L incrementó la acumulación de baicalina y baicaleína. En presencia de ácido indolbutírico a 1 mg/L, seguido por AIA a 0,1 mg/L, se dieron los niveles más altos de wogonina en los cultivos.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar y evaluar la producción de flavonoides de *Scutellaria incarnata* Vent. mediante el cultivo de raíces pilosas en medio líquido enriquecido con distintas mezclas de auxinas y citoquininas.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar y cuantificar la presencia de flavonoides a partir de cultivos de raíces peludas mediante técnicas cromatográficas.
- Observar las posibles transformaciones estructurales de las células de las raíces cultivadas *in vitro*.
- Observar e identificar la respuesta de los cultivos de raíces, ante la presencia de diferentes fitorreguladores.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 OBTENCIÓN DE LAS PLANTAS

Las plantas de *Scutellaria incarnata* Vent. se colectaron en los alrededores del antiguo Bioterio de la Universidad del Cauca, en la ciudad de Popayán entre los 1700 m.s.n.m.

➤ *Cultivo de la planta y obtención de raíces.* *S. incarnata* Vent. se cultivó en un sustrato constituido por una mezcla de humus, arena y materia orgánica (proporción 1:1:1) a campo abierto. Las raíces para el cultivo *in vitro*, se obtuvieron de plantas en el mismo estado de desarrollo.

7.2 METODOLOGÍA PARA LA SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES

➤ *Extracción.* Para la extracción de los compuestos flavonoicos se utilizó 5 g (peso fresco) de raíces de *Scutellaria incarnata* Vent. (material macerado con ayuda de un mortero). Luego, se adicionó acetona lentamente, solvente orgánico polar en el cual son solubles los flavonoides.

Posteriormente, la solución se filtró con papel filtro (Whatman N° 1), se almacenó en un eppendorf limpio cubierto en papel aluminio y se guardó en la nevera.

➤ *Cromatografía bidimensional de papel.* Para determinar la presencia de flavonoides en raíces de *Scutellaria incarnata* Vent. se realizó inicialmente una cromatografía bidimensional, utilizándose papel cromatográfico Whatman 3 MM (20x 20 cm) con una margen de 0.5cm a cada lado. Del extracto anteriormente mencionado, se tomaron 50µL los cuales se agregaron en la esquina inferior del borde izquierdo del papel a 1 cm de la margen (figura 3).

Una vez cubierta la cámara cromatográfica en papel craft para evitar la exposición directa de la muestra a la luz, se procedió a correr la primera fase en una mezcla de solventes orgánicos TBA (tertbutanol, ácido acético, H₂O) en una proporción 3:1:1 con una duración de 12 horas. Al finalizar, se secó el papel con aire frío. Luego, se dió un giro de 90° al papel y se corrió la segunda fase en HOAc en una proporción igual a 85mL de H₂O y 15mL ácido acético, teniendo un tiempo de corrida de 2h apróx.

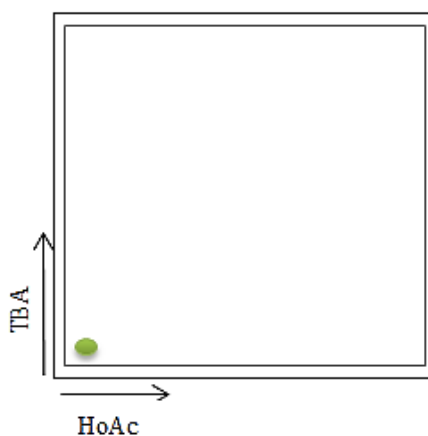
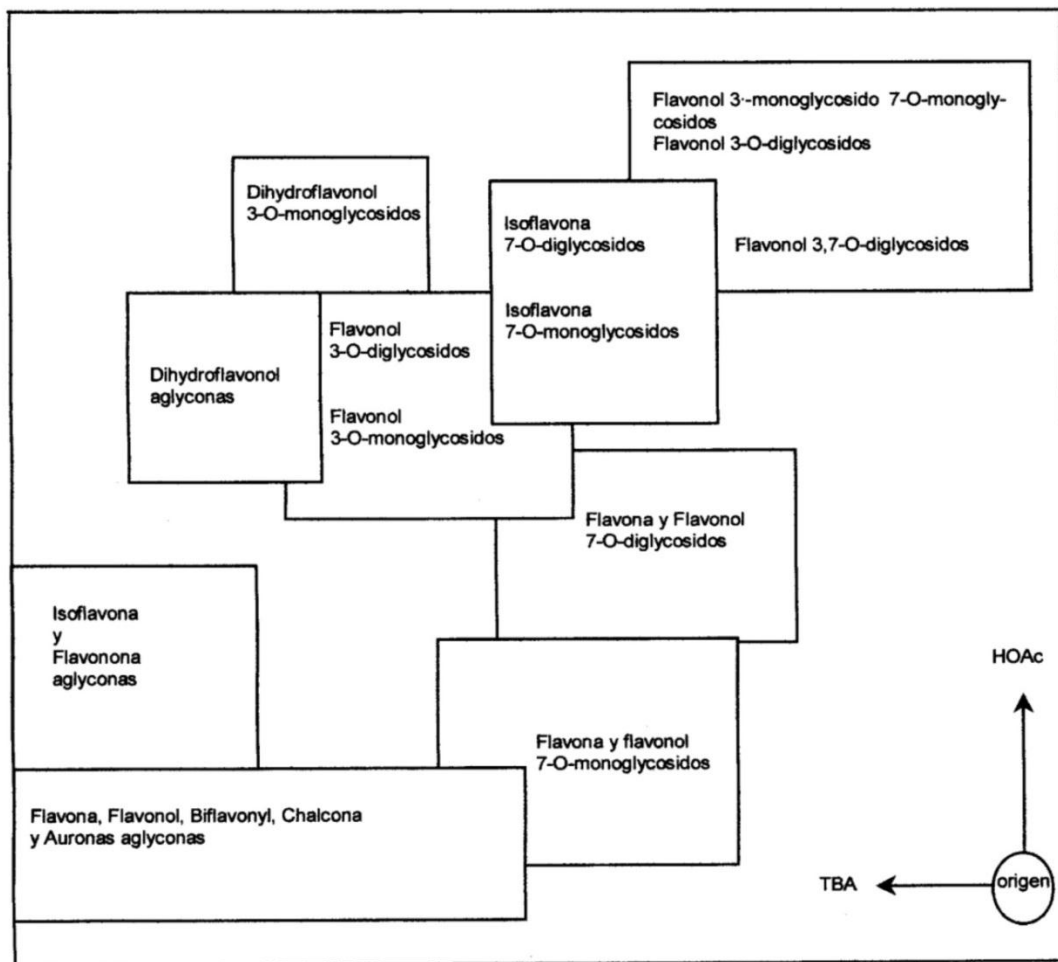


Figura 3. Posición del extracto flavonoico de raíces de *S. incarnata* Vent. en el papel cromatográfico y dirección de desplazamiento de los solventes orgánicos, en cromatografía bidimensional de papel.

La observación de la mancha en el cromatograma, se realizó bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm para estimar el tipo de flavonoide presente en el extracto. Una vez visible la mancha en el cromatograma, se demarcó y se comparó con la plantilla de distribución de flavonoides en un cromatograma bidimensional en papel propuesto por Mabry, (1970). En total se realizaron 16 cromatografías bidimensionales, en raíces de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales, con el fin de establecer la presencia de flavonoides.

Tabla 2. Plantilla de distribución de los flavonoides en el cromatograma. (Mabry, 1970)



En cuanto a la descripción de color y tipo de flavonoides se siguió la propuesta por Mabry, (1970), la cual se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Relación entre el color de la mancha y la estructura del flavonoide propuesto por Mabry, (1970)

COLOR DE LA MANCHA DEL FLAVONOIDE	TIPO DE FLAVONOIDE
BAJO LA LUZ	
1. VIOLETA INTENSO	(a) Flavonas con 5-OH y 4'-OH o 3-OH (b) Algunos 5-OH flavonas y 4'-OH. Chalconas de anillo B carentes de grupos hidroxilo. (c) Flavonas o flavonoles con 5-(OH) pero con 4'-OH ausente o sustituido. (d) Isoflavonas, dihydroflavonoles y algunas flavonas 5-OH. (e) Chalconas con 2'- o 4-OH. Algunas 5-OH flavonas. Chalconas con un 2-y/o 4-OH.
2. AZUL FLUORESCENTE SUAVE	(a) Flavonas y flavononas carentes de un 5-OH libre. (b) Flavonoles carentes de un 5-OH libre pero con el 3-OH sustituido. (c) Isoflavonas carentes de un 5-OH libre.
3. INVISIBLE	Isoflavonas carentes de un 5-OH libre.
4. AMARILLO SUAVE, AMARILLO O NARANJA FLUORESCENTE	Flavonoles con un 3-OH libre con y sin un 5-OH libre.
5. AMARILLO FLUORESCENTE, AMARILLO VERDOSO, AZUL VERDOSO O VERDE.	Auronas con un 4-OH libre y algunas 2 o 4-OH chalconas. (a) Auronas carentes de un 4'-OH libre y flavononas carentes de un 5-OH. (b) Flavonoles con un 3-OH libre y con un 5-OH libre.
4. AMARILLO PÁLIDO	Dihydroflavonoles carentes de un 5-OH.

Luego de demarcar la mancha se calculó el RF siguiendo la fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia entre el origen y el centro de la mancha}}{\text{Distancia entre el origen y el frente del solvente}}$$

Posteriormente, cada mancha fue recortada del cromatograma y cortada finamente. Una vez realizado los cortes, los papeles se colocaron en un beaker y se agregaron 180µL de metanol; dejándolos en agitación por 30min. Pasado el tiempo, la muestra se centrifugó a 1000 rpm por 10min. Luego se extrajo el sobrenadante a un eppendorf con cuidado de no tocar el pellet. Una vez terminado el procedimiento, se realizó el análisis de la muestra (sobrenadante) por espectrofotometría Uv-Vis (Spectronic Genesys 5).

7.3 METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL CULTIVO

- *Preparación de la nistatina.* Se pesaron 50mg de nistatina diluida en 10mL de DMSO. Seguidamente, la solución se filtró con un filtro millipore de 0.2µm, y se almacenó en la nevera debidamente marcada en un frasco de vidrio, cubierto con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz.

- *Limpieza de las raíces.* Las raíces fueron previamente lavadas en agua corriente hasta eliminar el suelo presente; luego se cortaron trozos de raíz hasta obtener 40 raíces con una biomasa similar a 0.11g peso fresco con el fin de evaluar el peso de las raíces. Posteriormente, se desinfectaron en hipoclorito al 0.5% (12h) y desinfectaron dentro de la campana de flujo laminar LABCONCO en etanol al 70% (40min), kanamicina 3mL/100mL H₂O (40min) y finalmente nistatina 3mL/100mL H₂O (40min).

- *Preparación del medio líquido MS $\frac{1}{2}$ (Murashige & Skoog).* Dentro de la campana de flujo laminar LABCONCO se preparó 1L de MS $\frac{1}{2}$ para el establecimiento de cada uno de los tratamientos, 2.215g de MS/1L H₂O estéril. Una vez preparado el medio se agregó 50 mg/L de kanamicina y se filtró con un filtro millipore estéril de 45mm y un frasco schott de 1L estéril. Seguidamente, se agregó la nistatina a una concentración de 50mg/L. Tan pronto como estaban listos los medios de cultivo MS $\frac{1}{2}$ se trasladaron a los respectivos biorreactores de 2 litros organizados en un sistema doble, con aireación y en condiciones de esterilidad (figura 4).

7.4 ESTABLECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS

Para el cultivo *in vitro* de raíces de *Scutellaria incarnata* Vent., se utilizaron cuatro biorreactores; dos se usaron para los controles positivo y negativo y los otros dos, para los tratamientos con adición de fitorreguladores.

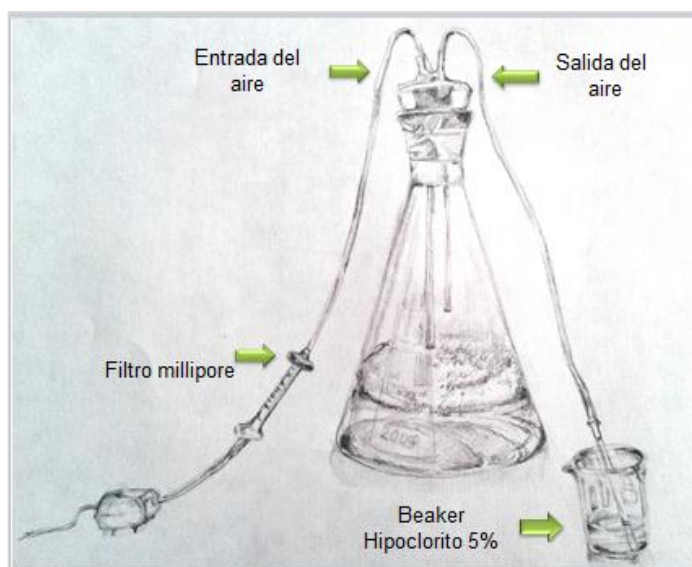


Figura 4. Diseño del biorreactor empleado para el cultivo *in vitro* de raíces de *S. incarnata* Vent. en los diferentes tratamientos.

A cada biorreactor se le agregaron 10 trozos de raíz (aprox. 0,1115 g peso fresco c/u) previamente desinfectadas y desinfectadas. Los cultivos se establecieron con un pH =5.8 y se conservaron en oscuridad con una T de 28°C.

Los tratamientos empleados fueron MS½ (control positivo), CO [1mg/L] (control negativo), AIA+Kinetina [1mg/L], y ANA+Kinetina [1mg/L]. Éstos, fueron establecidos por un período de 7 semanas. Una vez cumplido el tiempo, las raíces fueron pesadas (peso fresco) en una balanza analítica (Ohaus), considerándose el peso como la variable dependiente y los tratamientos como las variables independientes. Al peso fresco (g) de las raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* se le realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

Hipótesis:

H₀= Las medianas poblacionales del peso (g) de la raíz son iguales

H₁= Al menos una mediana poblacional del peso (g) de la raíz es diferente

Los datos obtenidos fueron analizados a través del programa estadístico SPSS versión 11.5, teniendo en cuenta una significancia estadística p <0,05.

7.5 HISTOLOGÍA

Las muestras para histología se tomaron al final del experimento y se fijaron según el siguiente protocolo.

➤ *Microscopía óptica*

- Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% en amortiguador de fosfato, durante 12h.
- Una vez transcurrido el tiempo se lavaron en agua corriente por 3h.
- Deshidratación: los tejidos se dejaron 1h en alcohol al 30%, posteriormente al 70% por 12h. Luego, se colocaron en alcohol al 80%,90% y 95% 1h en cada uno. Seguidamente, se dejaron en alcohol absoluto por 12h.
- Posteriormente los tejidos se colocaron 1 hora en cada mezcla de etanol-cloroformo en proporciones 3:1,1:1,1:3. Seguidamente, se dejaron 10 min en cloroformo.
- Infiltración: los tejidos se colocaron en cloroformo + parafina durante 12h a 40°C, luego se añadió más parafina y se subió la temperatura a 50°C por un período de 12h. Finalmente, las muestras se pasaron a parafina pura a 60°C durante 3 días, realizando 1 cambio por cada día.
- Inclusión en parafina
- Corte (7 μ m), desparafinación y tinción AMB.

7.6 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Los análisis cromatográficos por HPLC de las muestras de raíz de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales y de raíces cultivadas *in vitro*, se realizaron en el laboratorio de cromatografía de la Universidad de Nariño.

- Instrumentación HPLC

Cromatógrafo líquido HPLC Waters –Bomba Binaria 1525

Columna: C18 (X-Terra Waters 150mm x 4,6 mm)

Detector: PDA 2998 a 254 y 330nm Scan (200-450nm)

Inyector: Rheodyne Loop de 20µL

Extracción de flavonoides: La extracción de flavonoides en las muestras se realizó empleando 75mL de alcohol etílico absoluto (Merck, Alemania) por periodo de 4 horas con agitación a 100 rpm. El procedimiento se realizó en frascos de borosilicato ámbar. El extracto etanolico se filtró y se concentró a sequedad mediante presión reducida a 40°C. Posteriormente se adicionó 10 mL de acetato de etilo (Fisher, USA) y se concentró a presión reducida a 40°C a sequedad. El residuo se disuelve con 2mL de metanol grado HPLC (Fisher, USA). Las muestras se filtraron en membranas GHP Pall de 0,45µm para su posterior inyección al sistema cromatográfico HPLC. La identificación de los flavonoides en las muestras se realizó mediante comparación con los tiempos de retención de estándares de quercetina (Sigma, USA.) y naringinina (Alfa Aesar, USA) analizados a las mismas condiciones y mediante el análisis de los espectros UV-Vis de los picos integrados que se detectaron mediante el sistema de detección PDA. La cuantificación se realizó por relaciones de áreas cromatográficas empleando como estándar externo quercetina.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE PAPEL

Para el análisis cualitativo de los flavonoides en raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas en condiciones naturales; se utilizó la cromatografía bidimensional de papel. Cada cromatograma de las 16 cromatografías corridas, mostró una sola mancha, ubicada a una distancia entre 4.6-7.4cm desde el origen y el centro de la mancha; calculándose un $Rf_{promedio} = 0.335$, el cual corresponde a la media de los valores de los Rf calculados en cada una de las manchas observadas en los cromatogramas (tabla 4)

Tabla 4. Rf calculados en las cromatografías bidimensionales de papel, del extracto de raíz de *S. incarnata* Vent. obtenidas de plantas cultivadas en condiciones naturales

Resultados Rf de la mancha							
0,316	0,242	0,342	0,389	0,384	0,363	0,379	0,263
0,247	0,368	0,368	0,279	0,374	0,337	0,337	0,368

Al ser contrapuesto el cromatograma, en la plantilla de distribución de flavonoides de Mabry (1970) (Tabla 2), la mancha correspondió a un compuesto de tipo isoflavona y/o flavonona aglycona. Igualmente, una vez observada la mancha bajo luz ultravioleta, ésta presentó un color azul claro. Al ser contrastado el color de la mancha en la tabla 3; de acuerdo a la coloración y a la estructura del flavonoide

ésta pertenecía a un flavonoide tipo flavonona, flavona, flavonol o isoflavona; concordando así los dos resultados; tanto de acuerdo a la relación entre la coloración y estructura del flavonoide y la distribución de flavonoides, propuesto por Mabry (1970).

Así mismo, los máximos de absorción en el espectro Uv-Vis, del extracto metanólico aislado, en la cromatografía bidimensional de papel, fueron $\lambda_{\text{máx}}$ 289 nm y 340nm (figura 5). Según la literatura, los flavanoles y flavanonas, por faltarles el sistema enona conjugado, sólo presentan la absorción característica de los compuestos aromáticos aislados $\lambda_{\text{máx}}$ 280nm. Nótese que esos valores cambian con el solvente; son menores en agua que en metanol (o etanol) y sufren un corrimiento del máximo de absorción a mayores longitudes de onda en medio ácido; por ejemplo, los flavonoides de tipo flavanona absorben entre 275-295nm y los flavonoides de tipo flavona absorben entre 315-350nm en metanol (Marcano y Hasegawa, 2002). Siendo así, los máximos de absorción registrados en el extracto metanólico, corresponderían a flavonoides de tipo flavanona, flavanol y/o flavona.

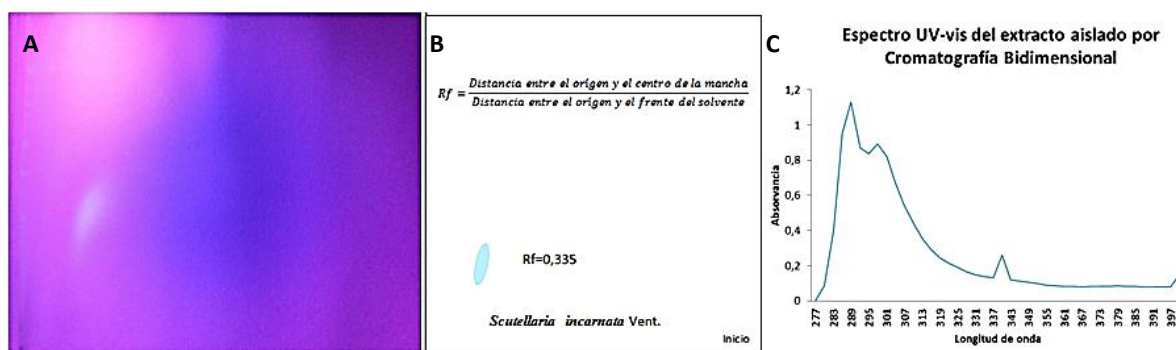


Figura 5. Resultados de la cromatografía bidimensional de papel en raíces de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales. A) y B) Color y $R_{f\text{promedio}}$ de la mancha. C) Espectro UV-vis del extracto metanólico de raíz de *S. incarnata* Vent., aislado en la cromatografía bidimensional de papel.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cromatografía bidimensional de papel y según lo reportado por Mabry (1970), Marcano y Hasegawa (2002), se puede señalar que en raíces de *S. incarnata* Vent., obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales, hay presencia de flavonoides de tipo flavonona, flavona, flavonol, flavanol e isoflavona.

8.2 CULTIVO *IN VITRO* Y CRECIMIENTO

8.2.1 Raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos

El establecimiento de los cultivos *in vitro* de raíces de *S. incarnata* Vent. en biorreactores se realizó satisfactoriamente (ver figura 6). La utilización del medio líquido MS½ fue apropiado para evitar la hiperhidricidad, riesgo que puede ocurrir al realizar un cultivo *in vitro* en medio líquido, siendo que la hiperhidricidad provoca disminución en la tasa de multiplicación celular, muerte de células y tejidos (Joshee *et al.*, 2010); observándose, que la reducción de la concentración de MS es necesaria para evitar la hiperhidricidad en los tejidos (ver figura 7), así como lo sugiere Tascan (2007); puesto que el medio MS es fuente de altas concentraciones de sales que inducen a la hiperhidricidad.

El pH en el medio de cultivo presentó una variación entre 1-1.3 unidades, es decir el pH final fue de 6.8 - 7.1 entre los diferentes cultivos. Luego, este aumento en el pH indica que hubo absorción de nitrato por parte de los tejidos vegetales (Rao and Ravishankar, 2002), lo que demuestra que el tejido vegetal se conservó en buenas condiciones. Por otra parte, la temperatura a la cual estuvieron sujetos los cultivos fue 28°C, lo cual es un factor importante ya que incide en la velocidad de

síntesis y de degradación de distintos compuestos y por ende en el nivel de producción y acumulación de metabolitos⁶.

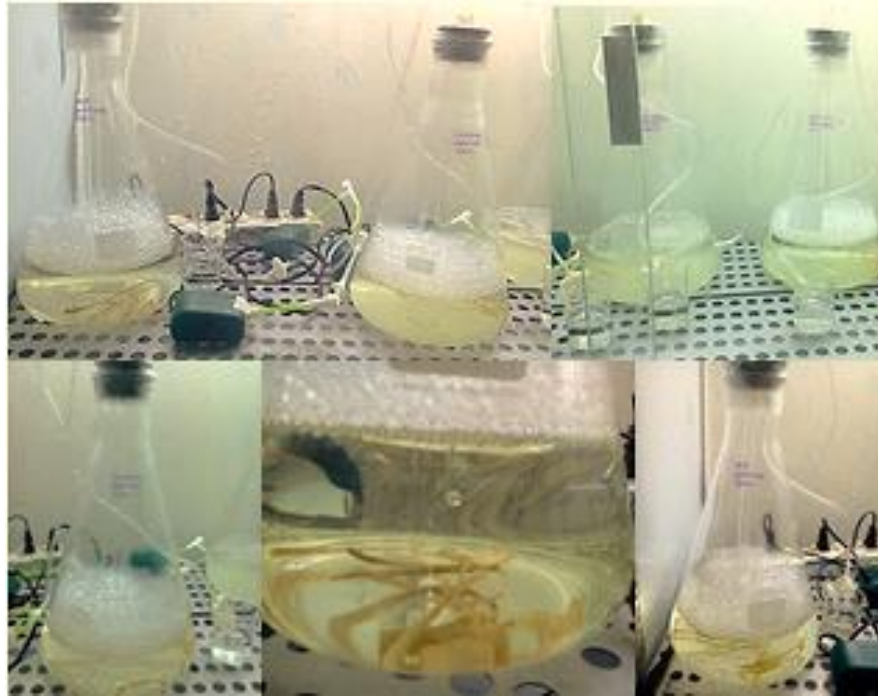


Figura 6. Biorreactores utilizados en el cultivo *in vitro* de raíces de *S. incarnata* Vent. en los diferentes tratamientos

8.2.2 Evaluación del crecimiento de las raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos

Las raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro*, presentaron un crecimiento normal. El peso fresco mínimo entre las raíces cultivadas en los sistemas fue para CO con 0,1162g y el peso fresco máximo fue para AIA+Kinetina con 0,1527g (tabla 5).

⁶ En http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6

Tabla 5. Comparación del peso fresco (g) de las raíces de *S. incarnata* Vent., cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos

Peso (g)	CO	MS ^{1/2}	AIA+Kinetina	ANA+Kinetina
Mínimo	0,1162	0,1210	0,1307	0,12696
Máximo	0,1405	0,1498	0,1527	0,1426

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de Kruskal-Wallis (tabla 6), hay diferencia significativa entre los tratamientos, $\alpha < 0,05$ se rechaza la H_0 ; es decir, si existen diferencias entre las medianas poblacionales del peso de las raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos.

Tabla 6. Prueba de Kruskal-Wallis para el peso fresco (g) de las raíces de *S. incarnata* Vent., cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos

	PESO (g)
Chi-cuadrado	12,088
gl	3
Sig. asintót.	,007

Variable de agrupación: TRATAMIENTOS

Conforme a los resultados obtenidos en la prueba de U Mann Whitney, si existen diferencias significativas entre los tratamientos: CO y MS^{1/2} $\alpha = 0,049$, CO y ANA+Kinetina $\alpha = 0,005$, CO y AIA+Kinetina $\alpha = 0,001$; por el contrario, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos de MS^{1/2} y ANA+Kinetina $\alpha = 0,762$, MS^{1/2} y AIA+Kinetina $\alpha = 0,406$, ni entre ANA+Kinetina y AIA+Kinetina $\alpha = 0,384$, demostrándose así que el mayor aumento en la biomasa de las raíces se dio en presencia de los fitorreguladores. En la figura 7, se observan los promedios de los pesos de la raíz de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en presencia de CO (0,1264 g), MS^{1/2} (0,1344 g), ANA+Kinetina (0,1353 g) y AIA+Kinetina (0,1382), coincidiendo el aumento de la biomasa de las raíces en presencia de fitorreguladores exógenos AIA y ANA con estudios realizados por Yang *et al.*, (2010).

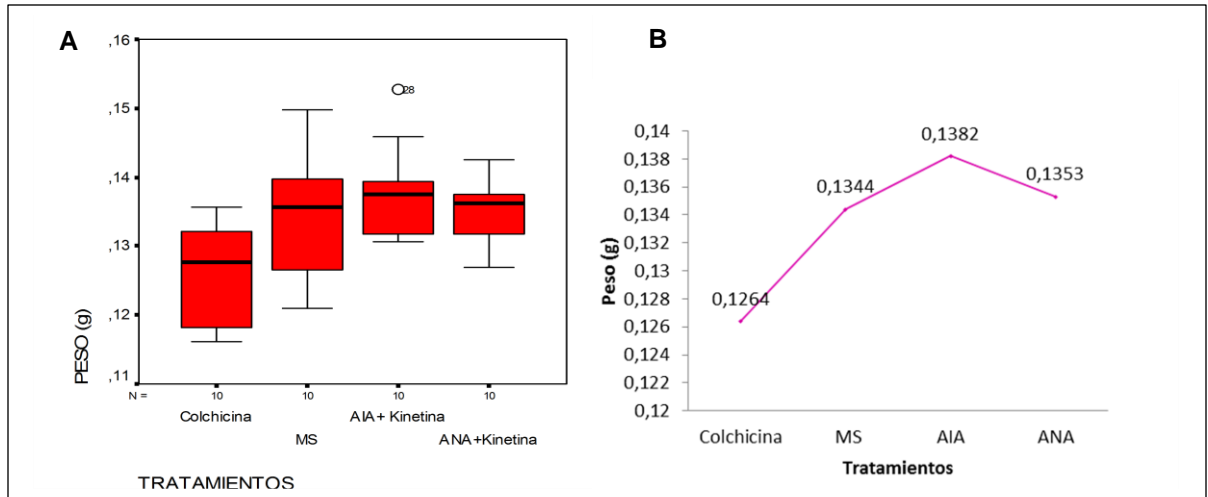


Figura 7. Comportamiento del peso fresco (g) de las raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en biorreactores, en los diferentes tratamientos. A) Peso fresco (g) mínimos y máximos de las raíces. B) Media del peso fresco (g) de las raíces en cada tratamiento.

Tal como se observa en la figura 7, las raíces (g) presentan un mayor peso en el tratamiento AIA+Kinetina, seguido del tratamientos ANA+Kinetina; corroborando la importancia del uso de éstos fitorreguladores en cultivos de tejido. Según Wabhy (2007), *in vitro* los fitorreguladores controlan la diferenciación de tejidos e intervienen en actividades principales como el crecimiento y el control del ciclo celular.

8.3 HISTOLOGÍA

En la figura 8 se observan cortes transversales de las raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro*. Los tejidos presentaron un desarrollo normal, lo cuál demuestra que las condiciones del medio fueron adecuadas para el crecimiento de las raíces. Adicionalmente, se muestran algunos fragmentos de la raíz cultivada *in vitro*, con

sus respectivas raíces secundarias en pleno crecimiento; no se observa ninguna señal de vitrificación en las raíces, lo cual corrobora que el uso del medio líquido MS con una concentración reducida a la mitad, es apropiado para realizar cultivos *in vitro* en medio líquido.

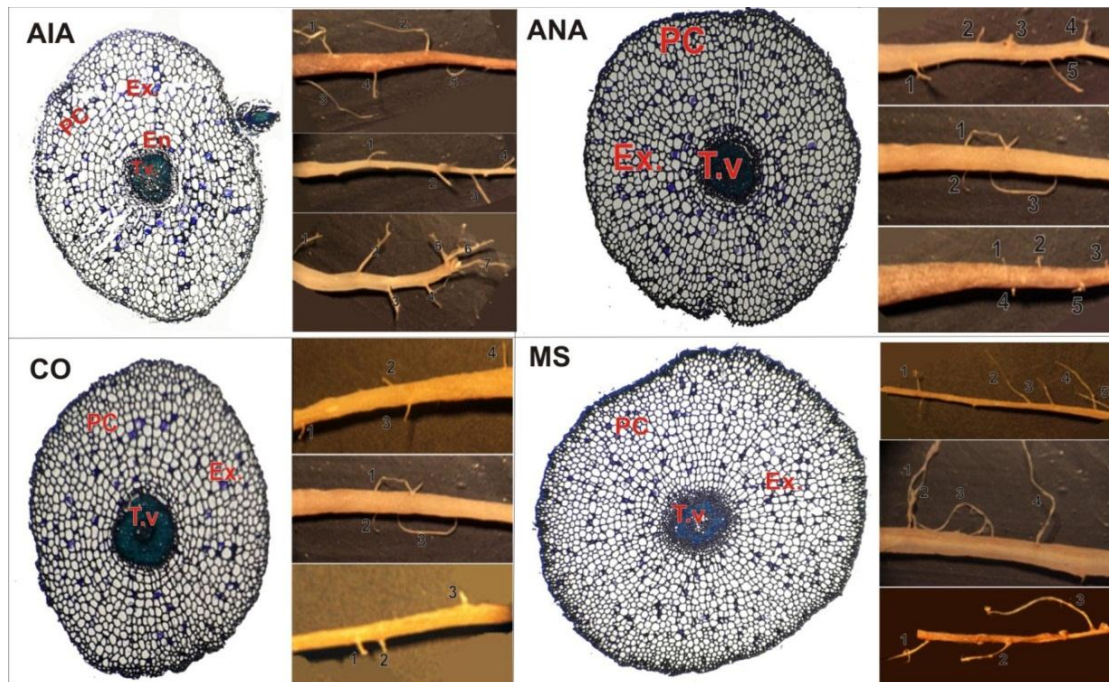


Figura 8. Histología de las raíces de *Scutellaria incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en biorreactores, en los diferentes tratamientos. Corte transversal y fragmentos de raíz. (PC. Parénquima cortical. Ex. exodermis. T.v. tejido vascular). AMB.4X.

En el córtex de las raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* y en raíces obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales, se observan espacios intercelulares (figura 9); lo cual indica, una posible interacción con microorganismos. Se ha descrito en células corticales, la presencia de compuestos fenólicos, mucilagos y algunos microorganismos. Así mismo, de acuerdo a Willadino *et al.*, (2005) en la rizosfera de las plantas, la microfauna es diversa, debido a la alta cantidad de nutrientes secretados y liberados por las

raíces. Estos nutrientes también constituyen eficientes atrayentes para organismos quimoorganotróficos oportunistas (Sala *et.al.*2000; Willadino *et. al.*, 2005).

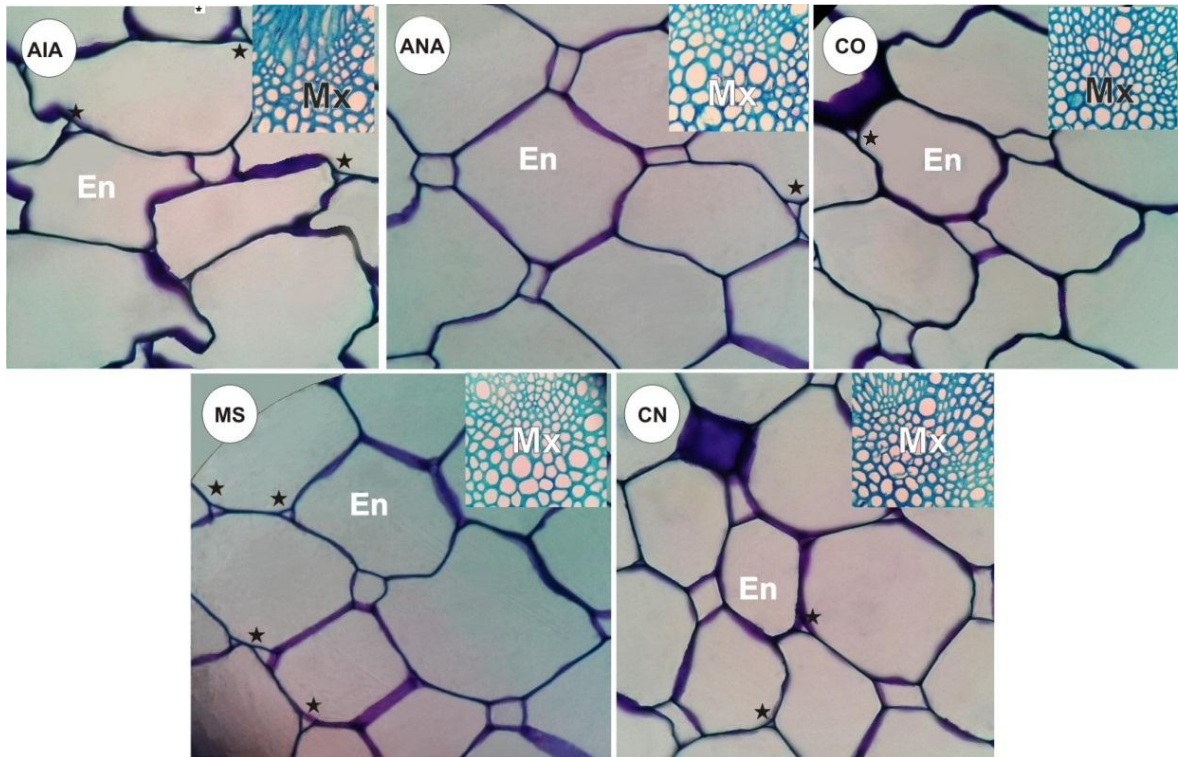


Figura 9. Histología de las raíces de *Scutellaria incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos y obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales. Corte transversal. Células de la endodermis y secciones del sistema vascular: En (endodermis), Mx (metaxilema), ★ (espacios intercelulares). AMB.100X.

Según Alonso-Peña (2011), el córtex de la raíz suele estar más desarrollado que el del tallo y es frecuente encontrar estructuras secretoras, como espacios entre sus células; clasificados, conforme con el proceso de formación intercelular; ya sea de tipo esquizógeno y menos frecuente de tipo lisígeno.

El resultado del espacio intercelular de tipo esquizógeno, se debe a la disposición diferencial de las células que forman los tejidos (Holzschuh *et al.*, 2010; Alonso-Peña, 2011) y se puede encontrar en plantas con O₂ disponible (Holzschuh *et al.*, 2010) . Por otro lado, el espacio intercelular de tipo lisígeno, se forma a partir de la lisis celular, en respuesta a las duras condiciones impuestas por el medio ambiente, especialmente la falta de O₂. Su formación se produce principalmente en las raíces, especialmente en adventicia, cuando las células de los puntos de crecimiento perciben la presencia de algún factor limitante para el metabolismo y se extienden hasta la base de la planta (Holzschuh *et al.*, 2010).

De acuerdo a Alonso-Peña, (2011) y a Holzschuh *et al.*, (2010); la formación de espacios intercelulares, observados en las raíces de *S. incarnata* Vent. corresponderían a espacios intercelulares de tipo esquizógeno.

8.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC-PDA)

La técnica cromatográfica HPLC-PDA fue utilizada para la identificación y cuantificación de los flavonoides; para ello, los análisis se realizaron en raíces de plantas cultivadas en condiciones naturales y en raíces cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos.

8.4.1 HPLC-PDA en raíces de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales

En raíces de *S. incarnata* Vent. en condiciones naturales a 330nm por HPLC se detectaron 10 picos (ver figura 10), los cuales fueron identificados como flavonoides de tipo flavona (baicalina, baicaleína y wogonina), isoflavona, flavanol (catequina) y flavonol (tabla 10), lo cual coincide con los resultados obtenidos a través de la cromatografía bidimensional, confirmando la presencia de este tipo de flavonoides en raíces de ésta especie.

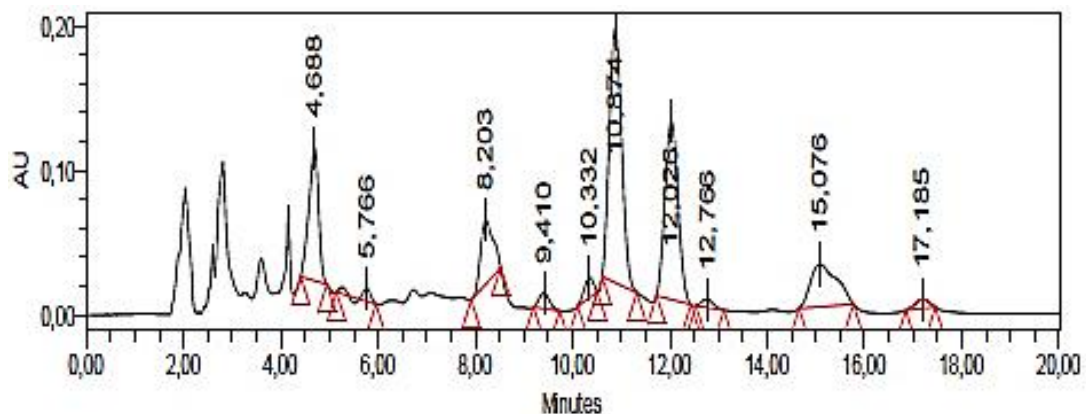


Figura 10. Cromatograma con los picos y tiempos de retención (min) de cada uno de los compuestos detectados por HPLC-PDA en la muestras de raíz de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales.

Algunos de estos flavonoides, han sido identificados en especies del género *Scutellaria*, aislados tanto de la parte aérea así como de la raíz. La flavona baicaleína ha sido reportada en *S. baicalensis* (Boyle *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012), *S. viscidula*, (Shang *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2011), *S. hypericifolia*, *S. amoena*, *S. barbata* (Shang *et al.*, 2010), *S. lateriflora* (Shang *et al.*, 2010; Upton y Dayu, 2012) y *S. indica* (Tascan, 2007); baicalina se ha encontrado en *S. baicalensis*, *S. amoena*,

S. viscidula, *S. barbata* (Shang *et al.*, 2010) y *S. lateriflora* (Tascan, 2007; Shang *et al.*, 2010; Upton y Dayu, 2012) y la wogonina se ha identificado en *S. baicalensis*, *S. amoena*, *S. barbata*, *S. rehderiana*, *S. linearis* Hussain (Shang *et al.*, 2010), *S. lateriflora* (Tascan, 2007; Shang *et al.*, 2010; Upton y Dayu, 2012) *S. viscidula* (Shang *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2011), *S. discolor*, *S. ventenatii* y *S. iyoensis* (Tascan, 2007).

Tabla 7. Análisis de los flavonoides identificados por HPLC-PDA en raíces de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales

Pico No	Tiempo de Retención (Minutos)	Posible Compuesto o Tipo de Compuesto Identificación Tentativa	Concentración mg/g
1	4,688	Baicalina ($\lambda_{\text{máx}}$ 277, 315)	0,0076
2	5,766		
3	8,203	(+) Catequina ($\lambda_{\text{máx}}$ 224, 274 nm)	0,0030
	8,444	Wogonina ($\lambda_{\text{máx}}$ 273nm)	0,0010
4	9,410		
5	10,332		
6	10,874	Isoflavona ($\lambda_{\text{máx}}$ 264, 306 nm)	NC
7	12,026	Flavonol ($\lambda_{\text{máx}}$ 264, 340)	NC
8	12,765		
9	15,076	Baicaleína ($\lambda_{\text{máx}}$ 275, 323)	0,0012
10	17,185	Flavonol ($\lambda_{\text{máx}}$ 264, 340)	NC

Pico No 3. Presenta coelución. UV-Vis $\lambda_{\text{máx}}$ a 273 nm, posiblemente corresponda al flavonoide wogonina.

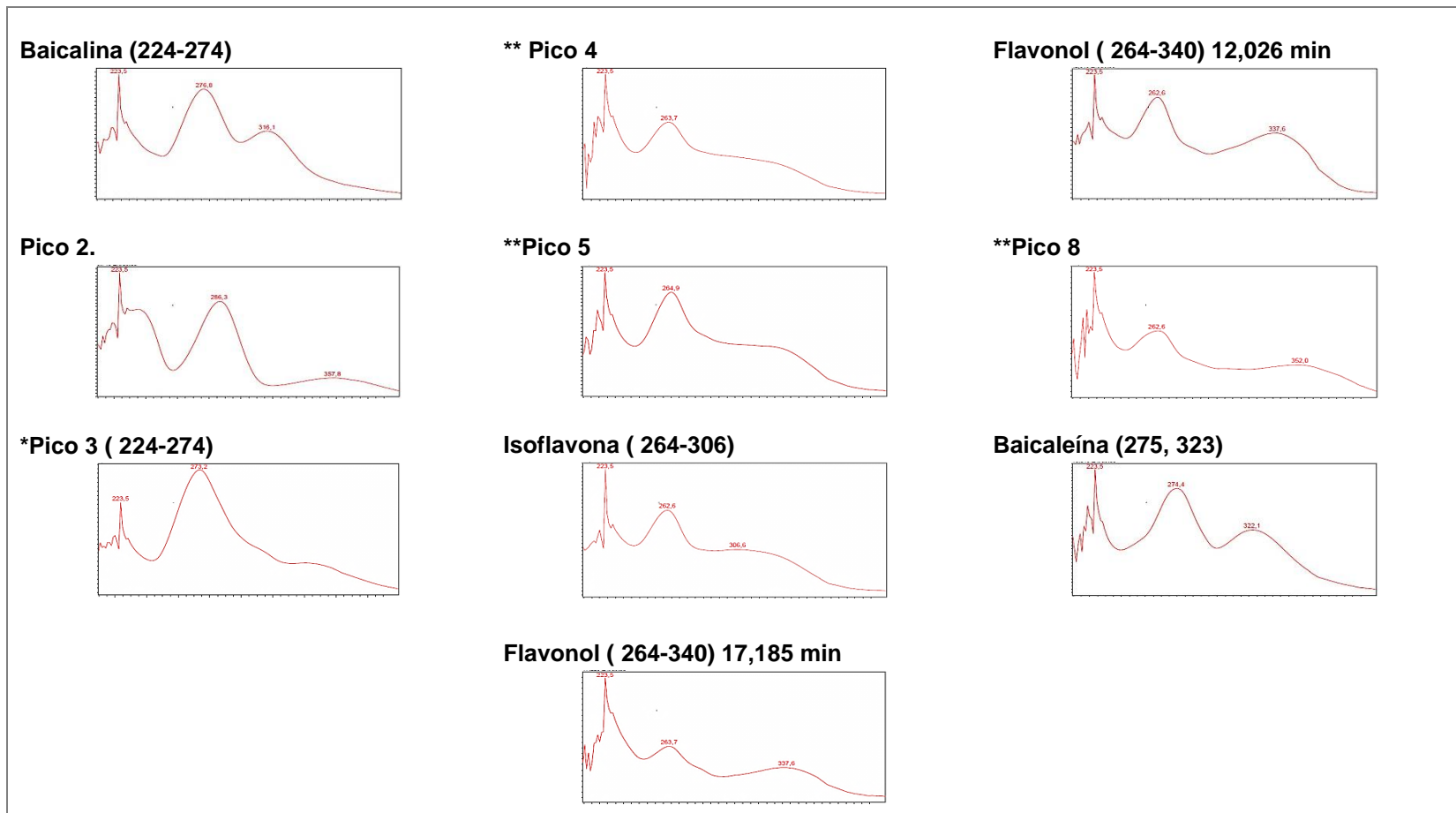
NC. No cuantificado

En la industria farmacológica los flavonoides ocupan un lugar importante debido a su actividad biológica *in vitro* (ver tabla 9). Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Flórez-Martínez *et al.*, 2002).

Entre los flavonoides comúnmente encontrados en el género *Scutellaria*, se encuentran las flavonas wogonina, baicaleína y baicalina, sobre los cuales se han realizado diferentes estudios, entre lo cual se destaca su efecto antiinflamatorio, debido a la baja regulación de un número de genes asociados a las lipoxigenasas, ciclooxigenasas y la sintasa de óxido nítrico, mediadores químicos del proceso inflamatorio (Boyle *et al.*, 2011). Igualmente, se han reportado como biomarcadores funcionales anticancerígenos, contra una amplia gama de cáncer *in vitro* (Gao *et al.*, 2010). Una posible explicación a estos efectos anticancerígenos podría derivarse del incremento que algunos flavonoides producen, en las concentraciones intracelulares de glutatión a través de la regulación de la expresión de la enzima limitante en su síntesis. Así mismo, en lo que respecta a la prevención del cáncer de mama, podría deberse a su potente capacidad de inhibir la actividad de la aromatasa, evitando de esta forma la conversión de andrógenos en estrógenos (Flórez-Martínez *et al.*, 2002).

Tal como lo sugieren estos estudios, los flavonoides identificados en las raíces de *S. incarnata* Vent. poseen una amplia acción farmacológica, aceptando esta investigación como un paso significativo para futuros estudios.

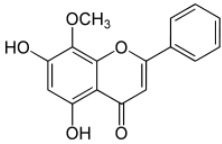
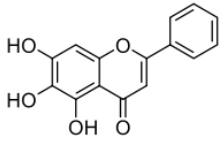
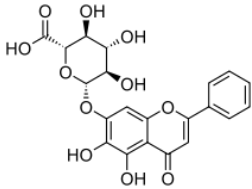
Tabla 8. Espectros UV-Vis de flavonoides identificados por HPLC-PDA en raíces de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales

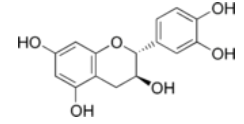
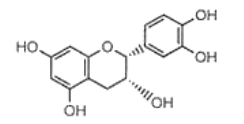
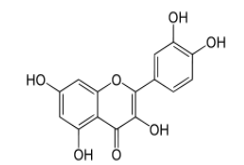
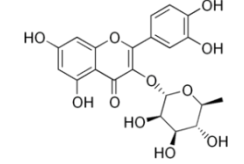


*Pico 3. Posible coelución de dos picos (catequina-wogonina)

** Compuestos no identificado

Tabla 9. Resumen de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en raíces de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales y cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos

NOMBRE	FUNCIONES Y/O PROPIEDADES	TIPO DE FLAVONOIDE	ESTRUCTURA QUÍMICA
Wogonina	Actividad antioxidante anticancerígena, antiviral, neuroprotector (Kim <i>et al.</i> , 2012). Antidepresiva, (Sierra-Pérez <i>et al.</i> , 2013).	Flavona	 <p>5,7-dihidroxi-8-metoxi-2-fenil-4H-cromen-4-uno</p>
Baicaleína	Inhibe ciertos tipos de lipoxigenasas, Antiinflamatoria (Castañeda <i>et al.</i> , 2005; Kim <i>et al.</i> , 2012). Actividad antidepresiva, (Sierra-Pérez <i>et al.</i> , 2013). Antiapoptótica, antialérgica (Castañeda <i>et al.</i> , 2005).	Flavona	 <p>5,6,7-triidrossi-2-fenil-cromen-4-one</p>
Baicalina	Hepatitis crónica (Kim <i>et al.</i> , 2012). Anti-VIH, antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antioxidante y anticonvulsivo (Kim <i>et al.</i> , 2012).	Flavona Glucurónido de Baicaleína	 <p>Baicaleína 7-O- glucurónido de ácido 5,6-dihidroxi-4-oxígeno-2-fenil-4H-1-benzopiran-7-beta-D-glucopiranososa</p>

<p>Catequina</p>	<p>Anticancerígena (Martinez, 2005). Antihepatotóxica (Castañeda <i>et al.</i>, 2005).</p>	<p>Flavanol</p>	 <p>(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyfenil)-3,4-dihidro-2H-chromene-3,5,7-triol</p>
<p>(-) Epicatequina</p>	<p>Anticancerígena (Martinez, 2005.)</p>	<p>Flavanol Diastereoisómero de Catequina Configuración <i>Cis</i></p>	 <p>2H-1-benzopiran-3,5,7-triol, 2 (3,4-dihydroxyfenil) - 3,4-dihidro-, (2R, 3R) -</p>
<p>Quercetina</p>	<p>Anticancerígena (Flórez-Martínez <i>et al.</i>, 2002; Martinez, 2005). Inhibe la infección por el virus VIH-192 (Martinez, 2005). Antihepatotóxica, antiinflamatoria, antioxidante, inhibe la agregación plaquetaria (Castañeda <i>et al.</i>, 2005).</p>	<p>Flavonol</p>	 <p>2 - (3,4-dihydroxyfenil) -3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-uno</p>
<p>Quercitrina (<i>Quercetina-3-ramnósido</i>)</p>	<p>Actividad antihipertensiva (Castañeda <i>et al.</i>, 2005). Antiinflamatoria (Chang and Yang, 2012).</p>	<p>Flavonol Glucósido de Quercetina</p>	 <p>2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[[2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-2-tetrahydropyranyl]oxy]-4-chromenone.</p>

8.4.2 HPLC-PDA en muestras de raíz de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos

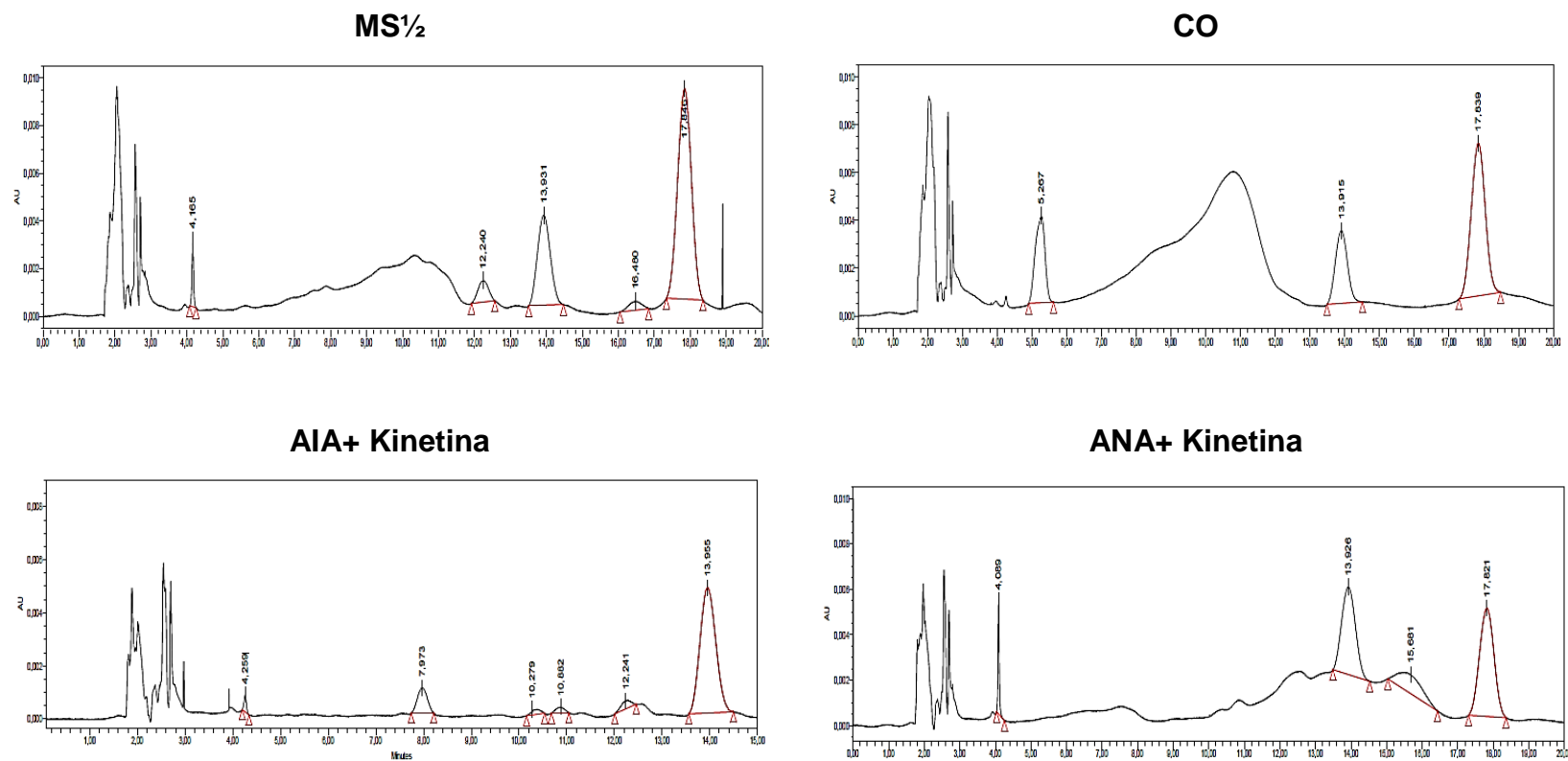
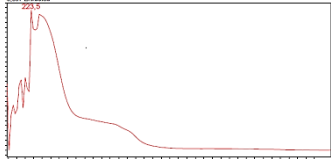
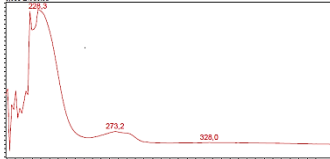
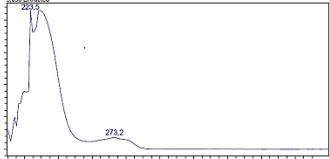
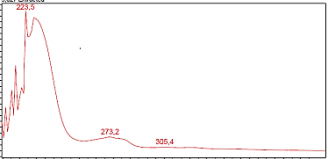
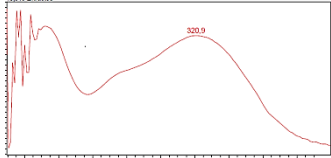
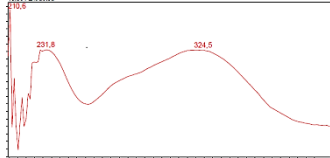
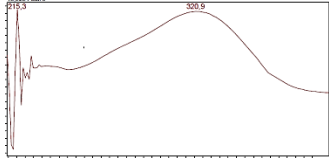

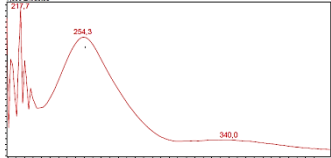
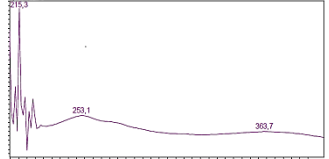
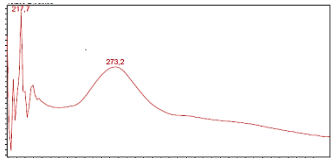
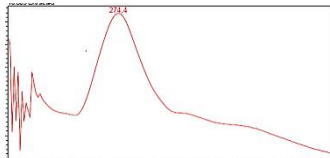
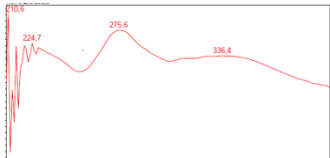


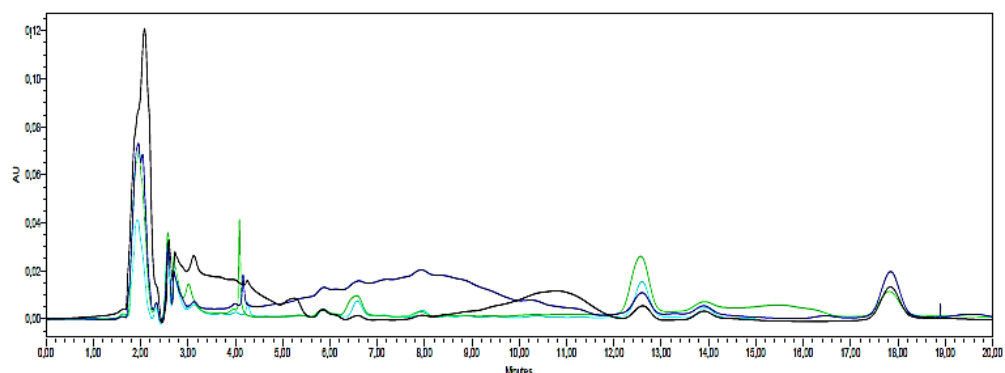
Figura 11. Cromatogramas obtenidos por HPLC-PDA a 330nm de raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos.

Tabla 10: Espectros UV-Vis de los flavonoides identificados por HPLC-PDA en raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos

	<i>MS</i> ½	<i>CO</i>	<i>AIA</i>	<i>ANA</i>
(-)Epicatequina (254nm)				
Baicaléina 275-320 nm)				
Quercitrina				
Quercetina (255, 364 nm)				

Continuación tabla 10

	<i>MS</i> ½	CO	AIA	ANA
Wogonina				
Flavona				



Convenciones

- Raíces AIA + Kinetina
- Raíces MS^{1/2}
- Raíces ANA + Kinetina
- Raíces colchicina

Figura 12. Comparación entre los cromatogramas obtenidos por HPLC-PDA, en raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos.

Tabla 11. Análisis de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en muestra de raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en medio líquido MS^{1/2} y colchicina

Pico No.	Tiempo de Retención (min)	Cantidad relativa en % de área	Identificación tentativa	Concentración mg/g
1	5,267	21,75		
	5,900		(-) Epicatequina ($\lambda_{\text{máx}}$ 224, 274nm) (1)	0,00040
	7,976		Flavona ($\lambda_{\text{máx}}$ 273,355nm) (2)	0,00025
	10,80		Wogonina ($\lambda_{\text{máx}}$ 274nm) (3)	NC
2	13,915	22,65	Baicaleína ($\lambda_{\text{máx}}$ 275,320m) (4)	0,0013
3	17,839	55,60	No identificado (5)	

(1) Se identificó tentativamente a 254nm el flavonoide (-) epicatequina ($\lambda_{\text{máx}}$ 224, 274nm), la cuantificación se realizó a esta longitud de onda.

(2) El pico presenta un tiempo de retención similar al de las muestras No 1 y 3, sin embargo, el espectro UV-VIS corresponde a un flavonoide tipo flavona con máximos de longitud de onda a 273 y 335 nm.

(3) El pico a 10,29 minutos corresponde posiblemente al flavonoide wogonina, identificado tentativamente a 274nm no se pudo cuantificar por presentar una señal muy cercana al ruido de fondo de la línea base, lo que impide su integración para el dato del área cromatográfica.

(4) El espectro UV-VIS indica una posible coelución con otro compuesto.

(5) Compuesto mayoritario no identificado.

Tabla 12. Análisis de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en muestra de raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en medio líquido MS½

Pico No.	Tiempo de Retención (min)	Cantidad relativa en % de área	Identificación tentativa	Concentración mg/g
1	4,165	2,41	(-) Epicatequina ($\lambda_{\text{máx}}$ 224, 274nm) (1)	0,00040
	5,847			
	7,888			
	10,29			
2	12,240	4,99	Quercitrina ($\lambda_{\text{máx}}$ 254,340m) (2)	0,00045
3	13,931	25,61	Wogonina ($\lambda_{\text{máx}}$ 274m) (3)	No cuantificado
4	16,480	2,59	Baicaleína ($\lambda_{\text{máx}}$ 275,320m)(4)	0,0017
5	17,846	64,41	No identificado (5)	

1) Se identificó tentativamente a 254nm el flavonoide (-) epicatequina (λ_{max} 224, 274nm), la cuantificación se realizó a esta longitud de onda.

(2) Teniendo en cuenta el tiempo de retención el pico correspondería al compuesto quercetina (λ_{max} 255, 364nm), sin embargo el espectro UV-Vis tiene longitudes de onda máximas que se asocian más al flavonoide quercitrina ($\lambda_{\text{máx}}$ 254, 340nm).

(3) El pico a 10,29 minutos corresponde posiblemente al flavonoide wogonina, identificado tentativamente a 274nm no se pudo cuantificar por presentar una señal muy cercana al ruido de fondo de la línea base, lo que impide su integración para el dato del área cromatográfica.

(4) El espectro UV-Vis indica una posible coelución con otro compuesto.

(5) Compuesto mayoritario no identificado.

Tabla 13. Análisis de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en muestra de raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en medio líquido MS½ y AIA+Kinetina

Pico No.	Tiempo de Retención (min)	Cantidad relativa en % de área	Identificación tentativa	Concentración mg/g
1	4,259	1,65	(-) Epicatequina ($\lambda_{\text{máx}}$ 224, 274nm) (1)	0,00025
	5,858			
2	7,973	10,16	Quercetina ($\lambda_{\text{máx}}$ 255,364nm)	0,00092
3	10,279	1,83		
4	10,882	2,09		
5	12,241	3,29		
6	13,955	80,98	Baicaleína ($\lambda_{\text{máx}}$ 275,320nm) (2)	0,0012

1) Se identificó tentativamente a 254nm el flavonoide (-) epicatequina ($\lambda_{\text{máx}}$ 224, 274nm), la cuantificación se realizó a esta longitud de onda.

(2) El espectro UV-Vis indica una posible coelución con otro compuesto.

Tabla 14. Análisis de flavonoides identificados por HPLC-PDA, en muestra de raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en medio líquido MS $\frac{1}{2}$ y ANA+Kinetina

<i>Pico No.</i>	<i>Tiempo de Retención (min)</i>	<i>Cantidad relativa en % de área</i>	<i>Identificación tentativa</i>	<i>Concentración mg/g</i>
1	4,089 5,847	4,46	(-) Epicatequina ($\lambda_{\text{máx}}$ 224, 274nm) (1)	0,00040
2	13,926	35,76	Baicaleína ($\lambda_{\text{máx}}$ 275,320m)	0,0011
3	15,681	13,58		
4	17,821	46,21	No identificado (2)	

(1) Se identificó tentativamente a 254nm el flavonoide (-) epicatequina ($\lambda_{\text{máx}}$ 224, 274nm), la cuantificación se realizó a esta longitud de onda.

(2) Compuesto mayoritario no identificado.

En los diferentes tratamientos, se observó una inhibición en la producción de baicalina y catequina; flavonoides que en raíces cultivadas en condiciones naturales, se encuentran en una mayor proporción respecto a los demás flavonoides, siendo que la baicalina se encontró en una concentración igual a 7.6×10^{-3} mg/g y la catequina en una concentración igual a 3×10^{-3} mg/g (figura 13). La baicaleína tuvo una producción similar entre los diferentes tratamientos ANA [1.1×10^{-3} mg/g], AIA [1.2×10^{-3} mg/g], CO [1.3×10^{-3} mg/g] y en condiciones naturales [1.2×10^{-3} mg/g]; estando presente en mayor cantidad en MS $\frac{1}{2}$ [1.7×10^{-3} mg/g]. Luego, este resultado indica que a través de los tratamientos empleados se produce baicaleína en condiciones similares a la planta natural; así mismo, aunque la wogonina no pudo ser cuantificada, si se identificó tanto en raíces en condiciones naturales, así como en presencia de CO y MS $\frac{1}{2}$ (Tabla 7, 11 y 12). Rao y Ravishankar (2002) proponen que las células vegetales obtenidas en los cultivos *in vitro* son totipotentes, lo que significa que cada célula en cultivo conserva una completa información genética de la planta madre y por lo tanto es capaz de producir la gama de productos químicos que se encuentran en la matriz planta.

De igual manera, Kim *et al.*, (2012) sugieren que el cultivo de raíces pilosas *in vitro* tiene la capacidad para sintetizar los compuestos naturales en niveles comparables a las plantas cultivadas *in vivo*. Siendo así, estos resultados coinciden con lo planteado por Rao and Ravishankar (2002) y Kim *et al.*, (2012).

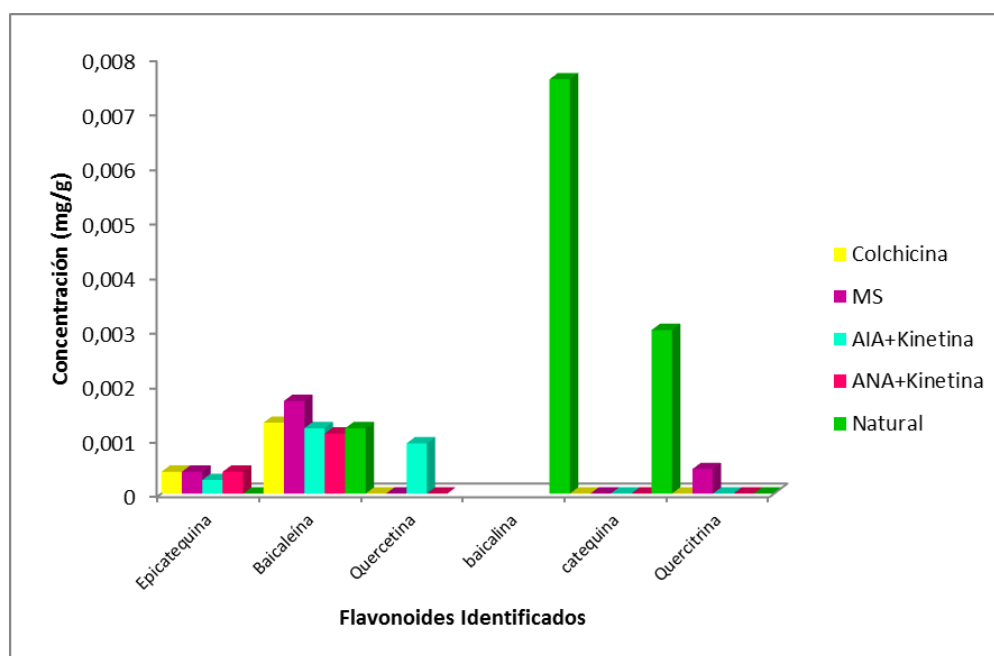


Figura 13. Comparación entre la concentración de flavonoides identificados en raíces de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales y raíces cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos.

La epicatequina, la quercitrina y la quercetina, fueron tres compuestos químicos no identificados en raíces de *S. incarnata* Vent. en condiciones naturales; la quercitrina se obtuvo a partir del tratamiento con MS½ [4.5×10^{-4} mg/g] y la quercetina a partir del tratamiento con AIA [9.2×10^{-4} mg/g]. Sin embargo, estos dos compuestos químicos la quercitrina y la quercetina han sido también identificadas en especies del género *Scutellaria* como lo es en *S. japónica* (Chang y Yang, 2012). Según Flórez-Martínez *et al.*, (2002), en experimentos *in vitro* se ha

confirmado el papel protector de la quercitrina, la cual ejerce efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos: en colon, glándula mamaria y ovario, en región gastrointestinal y en la leucemia, lo cual le confiere una propiedad con potencial biomédico.

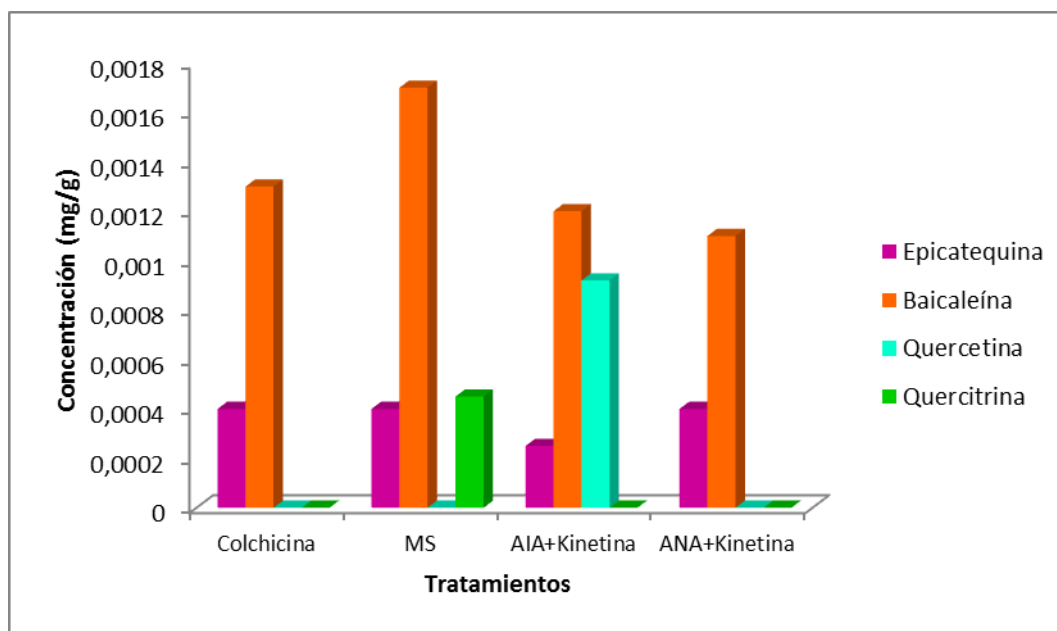


Figura 14. Comparación de la concentración de flavonoides identificados, en raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro* en los diferentes tratamientos.

En cuanto a la epicatequina, el comportamiento fue similar en MS $\frac{1}{2}$, CO y ANA [4.0×10^{-4} mg/g]; siendo menor en AIA [2.5×10^{-4} mg/g] (ver figura 14). Según Rao y Ravishankar (2002), el tipo y la concentración de auxina o citoquinina, o la relación auxina/citoquinina altera drásticamente la formación y el crecimiento de las células; así como los compuestos producidos por las plantas cultivadas. Las citoquininas tienen diferentes efectos dependiendo del tipo de metabolito y especies vegetales. Esto puede explicar por qué los resultados difieren entre los tratamientos; así mismo, los fitorreguladores generalmente inducen la síntesis de metabolitos secundarios *in vitro* e *in vivo*. La cantidad y tipo de auxina presente al principio del desarrollo del cultivo y durante él, tiene un marcado efecto sobre el

metabolismo primario y secundario (Zsabados, 1991); de igual manera, Pérez-Alonso y Jiménez (2011), expresan que una de las características que evidencia el cultivo de tejidos, es la presencia de nuevas sustancias, las cuales no son sintetizadas por las plantas en su hábitat natural. La acumulación de metabolitos secundarios en las plantas silvestres o cultivadas es baja y lenta, ya que está regulada espacial y temporalmente. Es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés (Trejo y Rodríguez, 2007).

Por otra parte, el cultivo de órganos puede producir sustancias de interés que no han sido obtenidos a partir de cultivos no diferenciados (Pérez-Alonso y Jiménez 2011), la producción y acumulación de metabolitos secundarios es una expresión de un estado particular de diferenciación celular, el cual es influenciado por un número de factores; diferentes clases de metabolitos secundarios requieren diferentes grados de diferenciación celular o tisular. La formación de gradientes físicos o bioquímicos debidos a la organización celular es también un factor importante (Trejo y Rodríguez, 2007). Acorde a lo expresado por los anteriores autores, se justifica la realización del cultivo *in vitro* de raíces de *S. incarnata* Vent, dado a que *in vitro*, se sintetizaron flavonoides como la baicaleína y wogonina presentes en las raíces de la planta en condiciones naturales; así como la epicatequina, quercetina y quercitrina, flavonoides ausentes en las raíces de la planta en su hábitat natural.

Si bien es cierto que estos resultados son positivos en la obtención de diferentes flavonoides, este estudio sugiere que el cultivo *in vitro* de raíces no transformadas, presentan un crecimiento más lento que los cultivos *in vitro* de raíces transformadas; tal como se observa en los estudios realizados por Hu and Du,

(2006), Yang *et al.*, (2010) y Kim *et al.*, (2012) en donde el crecimiento de las raíces es mayor en presencia de auxinas

Algo similar ocurre con las concentraciones de los fitorreguladores, en donde al emplearlas en concentraciones menores hay un aumento en la biomasa y producción de metabolitos. Chang y Yang, (2012) plantean que es necesario verificar el tipo y las proporciones de los fitorreguladores, no sólo por su efecto sobre el crecimiento, sino también sobre la biosíntesis; razón por la cual se recomienda realizar futuros estudios en presencia de diferentes concentraciones de fitorreguladores, puesto que no hay una estandarización; siendo que la respuesta de cada especie es independiente y diferente frente a los diversos tratamientos (Zsabados, 1991; McCoy, 2003). Por ejemplo, en estudios presentados por Alpizar *et al.*, (2008) en raíces transformadas de *Coffea arabica* en presencia de ABA y ANA las concentraciones óptimas para inducir la ramificación y el crecimiento fueron 0.50 mM y 0,25 mM respectivamente; mientras que a 5 mM se daba la inhibición de crecimiento. Por el contrario, a una concentración de 5mM de AIA se daba una mayor ramificación pero un bajo crecimiento. De modo similar, ocurre con la producción de flavonoides; por ejemplo autores como Kim *et al.*, (2012) mencionan en sus resultados que la auxina ácido-3-indolacético (AIA) a 1 mg/L induce eficazmente a la producción de baicalina y baicaleína, tanto como el ácido indolbutírico (AIB) a una concentración de 1mg/L, estimula la concentración de wogonina en raíces de *S. baicalensis*.

Por otro lado, muchos factores como la luz, la composición del medio, pH y sobre todo; la aplicación exógena de fitorreguladores, afectan el metabolismo secundario en cultivos de raíces cultivadas *in vitro* (McCoy, 2003). La composición mineral y la concentración de sacarosa pueden jugar un papel, ya sea neutro o positivo en

el crecimiento de las raíces; así como en la producción de metabolitos secundarios (McCoy, 2003). De acuerdo a lo anterior, el medio de cultivo MS½ juega un papel importante en el crecimiento de las raíces y en la producción de flavonoides en *S. incarnata* Vent., tal como se observa en los resultados descritos. Kim *et al.*, (2012) por ejemplo, presentan a través de sus estudios que el medio SH es mejor para promover el crecimiento de las raíces pilosas en *S. baicalensis* a diferencia de los medios de cultivo B5 y MS, por lo cual es necesario realizar un cultivo *in vitro* de las raíces *S. incarnata* Vent. en otros medios de cultivo, con el objetivo de evaluar la respuestas de las raíces a nivel de crecimiento y síntesis de flavonoides.

De igual manera, los cambios en el pH del medio de cultivo en el transcurso del crecimiento, influyen en la liberación de productos secundarios a partir de cultivos de raíz (Roben *et al.*, 1991; McCoy, 2003); este hecho, justificaría la producción de flavonoides como epicatequina, quercetina, quercitrina, en los cultivos *in vitro* de raíz de *S. incarnata* Vent., los cuales presentaron un incremento en el pH de 5.8 a 6.8 y 7.1 entre los diferentes tratamientos.

Finalmente, los resultados descritos en este estudio, indican que las raíces de *S. incarnata* Vent. son fuente importante de flavonoides, especialmente de baicalina, baicaleína y wogonina compuestos de alto interés farmacológico por sus propiedades antioxidantes. Igualmente, los fitorreguladores cumplen el papel activador ya que inducen a la producción de flavonoides como la epicatequina y quercetina de alto valor farmacológico. Pese a que el crecimiento de las raíces y la producción de flavonoides no fueron altos, este primer estudio vislumbra y motiva a la realización de estudios futuros en esta especie, puesto que en la presente investigación sólo se ha estudiado una parte de los metabolitos secundarios los cuales comprenden una gran variedad de compuestos químicos.

9. CONCLUSIONES

✓ Por cromatografía bidimensional de papel, en raíces de *S. incarnata* Vent. obtenidas a partir de plantas cultivadas en condiciones naturales; se identificaron flavonoides de tipo flavona, flavonona, flavanol, flavonol e isoflavona; confirmados por HPLC-PDA

✓ El mayor aumento en la biomasa de las raíces de *S. incarnata* Vent. cultivadas *in vitro*, se dio en presencia de AIA+Kinetina con un 25.6% respecto al peso inicial, mientras que el menor aumento de la biomasa se evidenció, en presencia de colchicina con un 14.1%.

✓ A nivel histológico, el córtex de la raíz de *S. incarnata* Vent. en condiciones naturales y cultivadas *in vitro*, presentan espacios intercelulares de tipo esquizógeno.

✓ Los fitorreguladores ácido-3-indolacético, ácido naftalenacético y kinetina, estimulan el crecimiento celular y favorecen la síntesis de flavonoides como la epicatequina, quercetina y baicaleína en raíces de *S. incarnata* Vent.

✓ El medio de cultivo Murashige & Skoog ½ libre de colchicina y fitorreguladores, favorece el crecimiento de la raíz y la producción de flavonoides como la quercitrina. La colchicina, actúa como un inhibidor del crecimiento de la raíz pero no inhibe la producción de flavonoides en raíces de *S. incarnata* Vent.

✓ La especie *S. incarnata* Vent. es fuente de flavonoides con propiedades farmacológicas, como la baicaleína, baicalina, catequina y wogonina.

10. RECOMENDACIONES

Con el fin, de confirmar la presencia de los flavonoides wogonina, baicaleína, catequina y baicalina, en raíces de *S. incarnata* Vent. y así mismo identificar los compuestos no identificados por HPLC-PDA; se recomienda realizar una cromatografía de gases y/o espectrometría de masas que permitan la elucidación estructural de estos compuestos.

De igual manera, con el objetivo de evaluar y establecer cual de los medios de cultivos y fitorreguladores, promueven el crecimiento de las raíces pilosas y síntesis de flavonoides en *S. incarnata* Vent., se recomienda realizar cultivos *in vitro* en diferentes medios de cultivos como SH, B5 y en presencia de diferentes fitorreguladores, a distintas concentraciones.

Debido al potencial farmacológico de *S. incarnata* Vent. es preciso realizar investigaciones sobre la viabilidad de la producción de *S. incarnata* Vent. a partir de cultivos *in vitro*, como la micropropagación a partir de explantes y la viabilidad de las semillas, con el fin de establecer una estrategia de conservación.

Por último, se recomienda identificar los compuestos presentes en *S. incarnata* Vent., con el objetivo de aumentar el conocimiento de sus propiedades.

11. BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO-PEÑA, J.R. 2011. Manual de histología vegetal. 1st ed. Mundi prensa, Madrid-España.
- ÁVALOS, A. y GARCÍA, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119–145.
- ALPIZAR, E.; DECHAMP E.; F. LAPEYRE-MONTES, F.; GUILHAUMON, C.; BERTRAND, B.; JOURDAN, C.; LASHERMES, P. y ETIENNE H. 2008. *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. Annals of botany 101(7): 929–40.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S. and GONTIER, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161(5): 839–851.
- BOYLE, S.P.; DOOLAN, P.J. ; ANDREWS, C.E. and REID, R.G. 2011. Evaluation of quality control strategies in *Scutellaria* herbal medicines. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 54(5): 951–7.
- CASTAÑEDA, B.; MEJÍA, R. y VÁSQUEZ, L. 2005. del extracto metanólico de *Alchornea castaneifolia* “ hiporuro ” en animales de laboratorio. Acta Médica Sanmartiniana 1. [Consultado el 31/08/2013] En http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2006_I/Art4_Vol6_N1.pdf
- CEJA-ROMERO, J.; C. de la P. PÉREZ-OLVERA y RIVERA-TAPIA, J. 2005. Anatomía de la madera de las especies Mexicanas de *Salvia* Sección

Erythrostachys epl. (Lamiaceae). Boletín de la Sociedad Botánica de México 76: 53–59.

CHANG, H. and L. YANG. 2012. Radical-scavenging and rat liver mitochondria lipid peroxidative inhibitory effects of natural flavonoids from traditional medicinal herbs. Journal of Medicinal Plants Research 6(6): 997–1006. [verified 31 August 2013]. Available at [http://www.academicjournals.org/jmpr/abstracts/abstracts/abstracts2012/16Feb/Chang and Yang.htm](http://www.academicjournals.org/jmpr/abstracts/abstracts/abstracts2012/16Feb/Chang%20and%20Yang.htm)

COLETO, J.M. y COLETO-MARTÍNEZ, J.M. 1995. Crecimiento y desarrollo de las especies frutales. 2nd ed. Mundi prensa, Barcelona.

FERNÁNDEZ-ALONSO, J.L. 1990. Notas sobre *Scutellaria* (Labiatae) en Colombia y Ecuador. Anales Jardín Botánico de Madrid 47(1): 105.

FERNÁNDEZ-ALONSO, J.L. and RIVERA-DÍAZ, O. 2006. Las labiadas. p. 385. In Gloria, G.N. y G. (ed.), En García, N. & G. Galeano .Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 3: Las bromelias, las labiadas y las pasifloras. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt - Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial., Bogotá, Colombia.

FLÓREZ-MARTÍNEZ, S.; GONZÁLES-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M. y TUÑÓN, M.J. 2002. Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria 6: 271

GAO, J., H. ZHAO, P.J. HYLANDS, and O. CORCORAN. 2010. Secondary metabolite mapping identifies *Scutellaria* inhibitors of human lung cancer cells. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 53(3): 723–8.

- GUILLON, S.; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J. PATI, P.K.; RIDEAU, M. and GANTET, P. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in biotechnology* 24(9): 403–9.
- HOLZSCHUH, M.J., BOHNEN, H. and ANGHINONI. I. 2010. Avaliação da porosidade e placa férrica de raízes de arroz cultivado em hipoxia 1(1): 1763–1769.
- HU, Z. B. and DU, M. 2006. Hairy Root and Its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology* 48(2): 121–127. Available at <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7909.2006.00121.x>.
- ISAAC, C.; JIMÉNEZ, E.; YANE, E.; MARTÍNEZ, C. y FONSECA J.G.. 2009. Artemisa flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 52(2): 73–75.
- JOSHEE, N.; PARAJULI, P. and MEDINA-BOLIVAR, F. 2010. *Scutellaria* Biotechnology : Achievements and Future Prospects. 67(1): 24–32.
- KIM, Y.S.; LI, X.; PARK; W.T.; UDDIN; R.; IL N.; PARK; Y.B. KIM; Y. LEE, and PARK, S.U. 2012. Influence of media and auxins on growth and flavone production in hairy root cultures of baikal skullcap , *Scutellaria baicalensis*. *Plant Omics Journal* 5(1): 24–27.
- LEI, W.E.I., SHUI, X.; ZHOU, Y.; TANG, S. and SUN. M.I.N. 2011. Effects of praseodymium on flavonoids production and its biochemical mechanism of *Scutellaria viscidula* hairy roots *in vitro*. *Pakistan Journal of Botany* 43(3): 2387–2390.
- MARCANO, D. y M. HASEGAWA. 2002. *Fitoquímica orgánica*. 2nd ed. Torino, Caracas-Venezuela.

- MARTINEZ, A. 2005. Flavonoides. Medellín, 2005. 76 p. Universidad de Antioquía Facultad de Química Farmacéutica. [Consultado el 10/08/2013] En <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>.
- MASA, C.V. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Badajoz, Mayo 2011. 216 p. Trabajo de grado (Doctora en Ciencias). Universidad de Extremadura. [Consultada 7/11/2012]. En:http://dehesa.unex.es:8080/xmlui/bitstream/handle/10662/477/TDUEX_9788469494332.pdf?sequence=1
- MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. & THOMAS, M. G. (1970). The systematic identification of flavonoids. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- MANZANILLA-RAMIREZ, M.A. 2004. Inducción en la embriogénesis somática de tejido nuclear de tres variedades de mango (*Mangifera indica* L). 117. Tesis. Maestría en Ciencias. Área Biotecnología. Universidad de Colima. [Consultado el 22/10/2013]. En http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Miguel_Angel_Manzanilla_R.PDF
- MCCOY, M.C. 2003. The effects of phytohormones on growth and artemisinin production in hairy root cultures of *Artemisa annua* L. 93. May, 2003. Thesis (Master of Science in Biotechnology). Worcester Polytechnic Institute. [Verified 8/07/2012]. Available at: http://www.wpi.edu/Pubs/ETD/Available/etd-0529103_162012/UNRESTRICTED/MCCOYMARK.PDF
- NISHIKAWA, K., and ISHIMARU, K. 1997. Flavonoids in root cultures of *Scutellaria baicalensis*. Journal of Plant Physiology 151(5): 633–636 Available at <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161797802416> (verified 16 July 2012).
- OROZCO-SÁNCHEZ, F. ; HOYOS-SÁNCHEZ, R. y ARIAS-ZABALA, M.E. 2002. Cultivo de células vegetales en biorreactores : un sistema potencial para la

producción de metabolitos secundarios. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín 55(1): 1473–1495.

PALOMO G, I.; J.A. YURI S; R. MOORE-CARRASCO; Á. QUILODRÁN P, and A. NEIRA E. 2010. Apple consumption helps to prevent cardiovascular diseases and cancer : epidemiology and mode of action. Revista Chilena de Nutrición 37(8): 377–385.

PIÑEROS-CASTRO, Y.; OTÁLVARO-ÁLVAREZ, Á. y VELÁSQUEZ-LOZANO, M. 2. 2009. Efecto de la aplicación de elicitores sobre la producción de 4b-hidroxiwithanólido E , en raíces transformadas de *Physalis peruviana* L. Universitas Scientiarum 14: 23–28.

PÉREZ-ALONSO, N. y JIMÉNEZ, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. 11(4): 195–211.

PÉREZ-BRAN, J.A. 2010. Evaluación de la producción de fitoquímicos a partir de cultivo en suspensión de *Nerium oleander*. : 75.

RAO, S.R.; and RAVISHANKAR, G. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances 20(2): 101–53. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14538059>.

ROBEN. M.L.; REYES, J.; LOYOLA V. M. 1991. Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. En cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Roca, W. M. y Mroginsk, L. A. (eds.). Cali, Colombia, p. xii, 970. [consultada el 30/09/2013]. En: http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo9_parte1.pdf

- ZSABADOS, L. 1991. Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. En cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Roca, W. M. y Mroginsk, L. A. (eds.). Cali, Colombia, p. xii, 970. [consultada el 20/08/2013]. Available at: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/PArte%20C.pdf>
- RODRÍGUEZ-TALOU, J.; ALVAREZ, M.A. y GIULIETTI A.M. 1994. Cultivos de raíces transformadas: Producción de Solasodina por *Solanum eleagnifolium* Cav. y de tiofenos por *Tagetes laxa* Cabrera. *Dominguezia* 11: 9.
- RUSSO, R.O. y SPERANZA M. 2006. Los flavonoides en la terapia cardiovascular. *Revista Costarricense de Cardiología* 8: 6.
- SALA V. R. M, FREITAS S., SILVEIRA A. P. D. 2007. Interação entre fungos micorrizicos arbusculares e bacterias diazotroficas em trigo. *Pesc Agropec Bras* 42: 1593-1600.
- SHANG, X.; HE; X.; HE; X.; LI, M; ZHANG; R.; FAN, P.; ZHANG, Q. and JIA Z. 2010. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *Journal of ethnopharmacology* 128(2): 279–313.
- SIERRA-PÉREZ, R.D.C.; GONZÁLEZ-CANAVACIOLO, V.L. y RODRÍGUEZ-LEYES, M.E.A. 2013. Lamiaceae: una revisión sobre sus efectos neurofarmacológicos y su presencia en Cuba. *Revista CENIC*. 44(1).
- TASCAN, A. 2007. *In vitro* liquid culture systems of *Scutellaria* species. 110. [verified 3 september 2013]. Available at: <http://books.google.com.co/books?id=EvNEtwAACAAJ&dq=In+vitro+liquid+culture+systems+of+Scutellaria+species&hl=es&sa=X&ei=VvssUpydMYLw8QS69YCwDQ&ved=0CC4Q6AEwAA> .

- TREJO-TAPIA, G.; RODRÍGUEZ-MONROY, M. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia* [en línea] 2007, 32 (octubre) : [Fecha de consulta: 30 de octubre de 2013] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33901004>> ISSN 0378-1844
- UPTON, R., and DAYU, R.H. 2012. Skullcap *Scutellaria lateriflora* L.: An American nerve. *Journal of Herbal Medicine* 2(3): 76–96. [verified 4 September 2013]. Available at <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210803312000607>
- WABHY, I. 2007. Aproximaciones biotecnológicas tendentes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa* L.): Obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración *in vitro*. biotecnológicas tendentes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa* L.): OBTE. : 278.
- WILLADINO L, CAMARA TJR, GALINDO RMP, GUEDES RMM, MICHEREFF SJ 2005. Sistema vascular e exudatos radiculares. In: Micxhereff SJ, Andrade GT, Nenezes M. Ecología e manejo de patógenos radiculares em solos tropicis. Recife: Imprensa Universitaria, p.19-40.
- YANG, Y.K., LEE, S.Y.; PARK, W.T.; IL N. and PARK, S.U. 2010. Exogenous auxins and polyamines enhance growth and rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Nepeta cataria* L. *Plant Omics Journal* 3(6): 190–193.
- ZABALA, M.A.; M. JULIANA; A. VELÁSQUEZ; MARIA; A.; CARDONA; A.; MANUEL, J.; FLÓREZ, R. and VALLEJO, M. 2009. Strategies for the improvement of secondary metabolites production in plant cell. *Revista Nacional de Agronomía, Medellín* 62(1): 4881–4895.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

<http://futuroagronomo.blogspot.com/2011/03/fitohormonas-en-el-cultivo-de-tejidos.html> ,

Página consultada el 20/09/2012

<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>

Página consultada el 22/09/2012

http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.htm

Página consultada el 10 /10/2012

<http://es.scribd.com/doc/97875504/Farmacologia-Vegetal-2011>

ESTUDIO FARMACOLOGIA VEGETAL. Página consultada el 27/08/2013

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6

Página consultada el 29 /08/2013

<http://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe?k=default&l=115&w=46569&n=1&s=5&t=2>

Página consultada el 22/10/2013