

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

**Establecimiento de Cultivos Celulares  
de *Lavandula angustifolia* Miller**

**TESIS**

para obtener el grado de  
**Especialización en Biotecnología**

**PRESENTA**

**Berenice Guadarrama Flores**

**Director de Tesis: Dr. Francisco Cruz Sosa  
Co-Director de Tesis: Dra. Leticia Buendía González**



MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE, 2011.



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Área de Alimentos. Departamento de Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

México D.F. a 5 de septiembre del 2011.

El lector designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la idónea  
comunicación de resultados

**Establecimiento de Cultivos Celulares  
de *Lavandula angustifolia* Miller**

que presentó

**Berenice Guadarrama Flores**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL**

---

**Director: Dr. Francisco Cruz Sosa**  
Departamento de Biotecnología. UAM-I

---

**Co-directora: Dra. Leticia Buendía González**  
Facultad de Ciencias. UAEMéxico

**LECTOR**

---

**Dra. María Elena Estrada Zuñiga**  
Departamento de Biotecnología. UAM-I



Casa abierta al mundo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00062

Mérida, 11/03/2012

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS  
CELULARES DE *Lavandula  
spicatifolia* MILLER

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 9 del mes de septiembre del año 2011 en la Ciudad Ixtapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA  
DRA. LETICIA BUENDIA GONZALEZ  
DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA

Siendo asimismo los dos primeros de la aluona y lectora la segunda, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: BERENICE GUADARRAMA FLORES

y de acuerdo con el artículo 73 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, se le notó la protesta.



BERENICE GUADARRAMA FLORES  
ALUMNA

REVISO  
*[Signature]*

LIC. JULIO CELSO DE CARA IBASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBE

*[Signature]*  
DR. RUBEN ROMAN RAMOS

ASESOR

*[Signature]*  
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

ASESORA

*[Signature]*  
DRA. LETICIA BUENDIA GONZALEZ

LECTORA

*[Signature]*  
DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA

*En memoria y profundo agradecimiento a:*



*Mauricio Gustavo*

*Gil Gutiérrez*

*A la maravillosa vida y poesía que  
compartimos juntos...*

**A TODOS Y CADA UNO DE MIS ANCESTROS**

**A MIS AMADOS PADRES**

**A MIS AMADOS HERMANOS**

**A MIS AMADOS AMIGOS**

**A PACO**



*Sí para recobrar lo recobrado  
tuve que haber perdido lo perdido,  
sí para conseguir lo conseguido  
tuve que soportar lo soportado.*

*Sí para estar ahora enamorado  
fue menester haber estado herido,  
tengo por bien sufrido lo sufrido,  
tengo por bien llorado lo llorado.*

*Porque después de todo he comprendido  
que no se goza bien de lo gozado  
sino después de haberlo padecido.*

*Porque después de todo he comprobado  
que lo que tiene el árbol de florido  
vive de lo que tiene sepultado.*

“Sólo Dios basta” de Santa Teresa de Ávila

**RESUMEN**

Los principales constituyentes del aceite esencial de *Lavandula angustifolia* son los terpenoides linalool y acetato de linalool. Estos tienen aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Para producir estos terpenoides, segmentos de hojas inmaduras de *L. angustifolia* fueron cultivadas en medio Murashige & Skoog a la mitad de su concentración, suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de 6-benciladenina (BA 0.00, 6.66, 8.88  $\mu\text{M}$ ) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0.00, 6.79, 9.05  $\mu\text{M}$ ) o BA (0.00, 6.66, 8.88  $\mu\text{M}$ ) con ácido naftalenacético (ANA; 0.00, 8.05, 10.74  $\mu\text{M}$ ). La mayor inducción de callo friable (87%) se obtuvo con el tratamiento conteniendo 6.79  $\mu\text{M}$  de 2,4-D transcurridos 30 d de cultivo. Dos líneas celulares fueron establecidas: 1) callo blanco-grisáceo (GWCL) y 2) callo café (BCL). Muestras en fresco y en seco de ambas líneas celulares, se extrajeron con n-hexano (100%) a temperatura ambiente durante 24 h y el contenido de los terpenoides se realizó por cromatografía de gases. La producción de linalool y acetato de linalool solo fueron registrados por la línea celular BCL destacando linalool como el terpenoide producido en mayor proporción (28.45 mg g<sup>-1</sup> peso fresco, PF), mientras que el contenido de acetato de linalool fue menor (11.58 mg g<sup>-1</sup> PF).

Palabras clave: *Lavandula angustifolia*, cultivo *in vitro*, linalool, acetato de linalool.



**ABSTRACT**

The terpenoids linalool and linalyl acetate, are the major volatile constituents of *Lavandula angustifolia* essential oil, with a wide application in pharmaceutical, cosmetic and food industries. In order to produce these terpenoids, immature leaf explants of *L. angustifolia* were culture into half-strength Murashige and Skoog medium supplemented with different concentrations and combinations of 6-benzyladenine (BA 0.00, 6.66, 8.88  $\mu\text{M}$ ) with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D 0.00, 6.79, 9.05  $\mu\text{M}$ ) or BA (0.00, 6.66, 8.88  $\mu\text{M}$ ) with naphthalene acetic acid (NAA 0.00, 8.05, 10.74  $\mu\text{M}$ ). Highest friable callus induction (87%) was obtained in treatment containing 6.79  $\mu\text{M}$  (2,4-D) after 30 d of culture. The callus cultures produced two cellular lines: 1) grayish-white callus (GWCL) and 2) brown callus (BCL) that shows differences in the terpenoids production. Fresh and dry samples were extracted with n-hexane (100%) during 24 h at room temperature and the content of terpenoids was determinate by gas chromatography. The linalool and linalyl acetate contents only were registered in BCL. The linalool was the major terpenoid produced in BCL (28.45 mg g<sup>-1</sup> fresh weight, FS), while linalyl acetate content was low (11.58 mg g<sup>-1</sup> FS).

**Keywords:** *Lavandula angustifolia*, *in vitro* culture, linalool, linalyl acetate.

ABREVIATURAS

<b>AIA</b>	<b>ácido 3-indolacético</b>
<b>AIB</b>	<b>ácido 3-indolbutírico</b>
<b>ANA</b>	<b>ácido naftalenacético</b>
<b>2,4-D</b>	<b>ácido 2,4-diclorofenoxiacético</b>
<b>2,4,5-T</b>	<b>ácido 2, 4, 5- triclorofenoxiacético</b>
<b>MCPA</b>	<b>ácido 2-metil-4-cloro fenoxiacético</b>
<b>KIN</b>	<b>6-furfurilaminopurina ó cinetina</b>
<b>BAP</b>	<b>6-bencilaminopurina</b>
<b>2iP</b>	<b>6-dimetilaminopurina</b>
<b>ZEATINA</b>	<b>6-hidroximetilbuterilaminopurina</b>
<b>CTV</b>	<b>Cultivo de Tejidos Vegetales</b>
<b>PS</b>	<b>Peso Seco</b>
<b>Ppb</b>	<b>Partes por billón</b>
<b>LIS</b>	<b>Linalool sintetasa</b>
<b>RCV</b>	<b>Reguladores de Crecimiento Vegetal</b>
<b>B1</b>	<b>Tiamina</b>
<b>B6</b>	<b>Piridoxina</b>
<b>PP</b>	<b>Niacina o ácido nicotínico</b>
<b>L. a.</b>	<b><i>Lavandula angustifolia</i></b>
<b>RFE</b>	<b>Referencia de la Real Farmacopea Española</b>
<b>TLC</b>	<b>Cromatografía en capa fina</b>
<b>CG</b>	<b>Cromatografía de gases</b>

---

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	I
II. ABSTRACT.....	II
III. ABREVIATURAS.....	III
IV. ÍNDICE.....	IV
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	2
Capítulo 2. ANTECEDENTES.....	5
I. <i>Lavandula angustifolia</i> Miller (lavanda).....	5
A. Aceite Esencial de <i>Lavandula angustifolia</i> Miller.....	7
II. Metabolitos Secundarios.....	9
A. Metabolitos Secundarios de <i>Lavandula angustifolia</i> Miller.....	11
a. Linalool.....	11
b. Acetato de Linalool.....	13
III. Producción de Metabolitos Secundarios en Cultivos <i>in vitro</i>	
A. Cultivo de Tejidos Vegetales .....	14
a. Material vegetal.....	16
b. Medio de cultivo.....	16
1. Sales inorgánicas.....	16
2. Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV).....	17
3. Vitaminas.....	18
4. Fuente de carbono.....	18
5. Material de soporte y pH.....	19
6. Temperatura, luz y humedad.....	19
IV. Producción de Linalool y el Acetato de Linalool por CTV.....	20

---

<b>Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>Capítulo 4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>Capítulo 5. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo 6. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>I. Material Vegetal.....</b>	<b>28</b>
<b>II. Establecimiento de Cultivos asépticos.....</b>	<b>28</b>
<b>III. Medio de cultivo.....</b>	<b>28</b>
<b>IV. Condiciones de incubación.....</b>	<b>29</b>
<b>V. Propagación de la Línea Celular de <i>L. angustifolia</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>VI. Extracción de Metabolitos Secundarios.....</b>	<b>30</b>
<b>VII. Análisis de los Extractos por Cromatografía en Capa Fina (TLC).....</b>	<b>30</b>
<b>VIII. Análisis de los Extractos por Cromatografía de Gases (CG).....</b>	<b>31</b>
<b>IX. Análisis Estadístico.....</b>	<b>31</b>
<b>Capítulo 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>I. Establecimiento de Cultivo Aséptico.....</b>	<b>33</b>
<b>II. Inducción de Callo y Raíz.....</b>	<b>33</b>
<b>III. Propagación de la Línea Celular de <i>L. angustifolia</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>IV. Extracción de Metabolitos Secundarios y Análisis de los Extractos por Cromatografía en Capa Fina (TLC) y de Gases (GC).....</b>	<b>40</b>
<b>Capítulo 8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>Capítulo 10. ARTICULO.....</b>	<b>56</b>

---

## **Capítulo 1. INTRODUCCIÓN**

### INTRODUCCIÓN

La Biotecnología, entendida en su sentido más amplio como *“el empleo de organismos vivos y sus productos para obtener un bien o servicio útil para el hombre”*, ha formado parte de la vida cotidiana del hombre desde mucho antes que recibiera dicho nombre con el que se la conoce actualmente (Herdt, 2006). No obstante, a nivel mundial, se considera que la Biotecnología es una poderosa herramienta para el desarrollo de la humanidad en donde varias disciplinas se integran, siendo la rama Vegetal de suma importancia debido a que contribuye al desarrollo de una economía sustentable, por ejemplo para proveer de fuentes renovables de alimento, fármacos, pesticidas, energía (bio-combustibles) y restauración de suelos (fitorremediación); (Inzé, 2005). El avance logrado por las ciencias biológicas en las últimas dos décadas, ha permitido el estudio de las plantas a nivel celular y molecular propiciando el incremento del conocimiento, el mejoramiento de las plantas, el progreso de la agricultura y distintas industrias químico-farmacéuticas, valiéndose del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) como herramienta principal (Robert y col., 1993). Para México, la Biotecnología Vegetal es estratégica ya que se considera que puede tener efectos benéficos sobre el impulso económico y social, ofreciendo alternativas de solución a los problemas del agro mexicano. En dicho sentido, como derivado de la biotecnología, se espera el desarrollo de nuevos productos en la agricultura y en la industria alimentaria y farmacéutica (Galindo, 1996). Un campo que ha tomado gran interés que se empezó a vislumbrar desde hace ya varias décadas, es la obtención de compuestos bio-activos a partir del CTV y su inherente producción a nivel comercial. El primer producto obtenido biotecnológicamente a nivel industrial fue la shikonina, colorante con aplicación doble, en la industria farmacéutica y en la cosmética, cuya producción se realiza en Japón. En la actualidad existen diferentes procesos ya escalados o en vías de escalamiento a nivel industrial, que permiten la producción de sustancias a partir de células y cultivos vegetales (Kolewe y col., 2008). Dichos procesos han sido posibles gracias a una extensiva investigación en CTV enfocada a la elucidación de los diversos factores implicados en el crecimiento y la

biosíntesis de metabolitos secundarios, por lo que nuevos hallazgos en dicho sentido permitirán el desarrollo e implementación de procesos a nivel industrial.

Desde tiempos inmemorables las plantas han sido manejadas y empleadas por el hombre con fines curativos. Esto dio pauta a la investigación fitoquímica y farmacológica, teniéndose actualmente conocimientos que dicha propiedad está asociada a la producción de metabolitos secundarios (alcaloides, terpenoides y fenilpropanoides), compuestos sumamente activos que le permiten a la planta en gran medida la capacidad de sobrevivir bajo condiciones de estrés abiótico provocado por exceso o insuficientes intensidades de luz, temperatura, viento, nutrientes, entre otros, ó ante el estrés biótico provocado por agentes patógenos como virus, hongos y bacterias, herbívoros o nematodos. Sin embargo, al tener estos metabolitos un rol específico en la planta, su contenido puede ser muy bajo (<1 %), lo que puede provocar una sobreexplotación de recursos naturales para su consumo con fines medicinales (Buchanan y col., 2000). Por tanto, el Cultivo de Tejidos Vegetales representa una técnica potencial para la producción de metabolitos secundarios, tales como los constituyentes del aceite esencial de *lavanda*, ya que permite una producción planificada de la planta, optimizando recursos. El CTV consiste en el cultivo aséptico de órganos de plantas, tejidos, células, protoplastos, embriones y plántulas sobre un medio nutritivo artificial, bajo condiciones ambientales controladas (Gamborg y Phillips, 1995). La particular ventaja de dicha técnica es que permite ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénicos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en el material vegetal cultivado (Zhong, 2001).

## **Capítulo 2. ANTECEDENTES**



ANTECEDENTES

**I. *Lavandula angustifolia* Miller (lavanda)**

La familia *Lamiaceae* comprende 210 géneros y alrededor de 3.500 especies, pertenecientes al orden *Lamiales*. Se trata de una familia cosmopolita en cuanto a su distribución, que comprende especies arbustivas o herbáceas. El género *Lavandulae* contiene 30 especies conocidas como *lavanda*, *alhucema*, *espliego* o *cantueso*, ampliamente distribuidas en la región Mediterránea y en el este en Asia central (Blumenthal y col., 2000).

La especie *Lavandula angustifolia* Miller en México se cultiva en la zona del Bajío en los estados de Querétaro, Guadalajara, Guanajuato y Michoacán. Se le conoce comúnmente como “lavanda” o “lavándula”. Philip Miller en 1753, reporto para esta planta su clasificación (Fig. 1), así como su sinonimia botánica: *Lavandula vera*; *Lavandula spica*, *Lavandula officinalis*).

**Reino:** Plantae  
**División:** Magnoliophyta  
**Clase:** Magnoliopsida  
**Orden:** Lamiales  
**Familia:** Lamiaceae  
**Género:** *Lavandulae*  
**Especie:** *L. angustifolia* Miller



Fig. 1. Clasificación Botánica de *Lavandula angustifolia* Miller, según Philip Miller (1753).

*Lavandula angustifolia* Miller es un arbusto aromático compuesto por tallos leñosos de hasta 50 cm de altura, de ramas erectas. Las hojas (de 20 a 50 mm de largo y de 1 a 3 mm de ancho) son lineales, simples, opuestas, enteras y lanceoladas de color verde grisáceo con margen resolutivo, provistas de densa pilosidad grisácea. El pedúnculo floral alcanza una longitud de 10 a 30 cm y normalmente no está ramificado. Las flores, de color azul-violáceo, se agrupan en una inflorescencia, con brácteas florales anchamente ovales y puntiagudas. La corola es bilabiada, con el labio superior recto, erguido, formado por dos lóbulos. El labio inferior es trilobado. Poseen cuatro estambres, didínamos y el ovario dividido en cuatro partes. La época de floración se da en verano y cuando las flores están abiertas son colectadas entre los meses de julio y agosto. Las semillas de esta especie muestran una baja capacidad germinativa de 20 a 30 %, por lo que frecuentemente se recurre a pretratamientos como la congelación, la refrigeración o el baño con ácido giberélico. Por otro lado, la multiplicación asexual de esta planta por medio de esquejes se puede realizar de madera semidura (verano) o dura (principios de invierno); sin embargo el enraizamiento de esta especie es pobre, y por lo tanto puede ser recomendable el uso de hormonas de enraizamiento (Basch y col., 2004).

Normalmente la lavanda se destina a la producción de aceite esencial. Por lo que anualmente a nivel mundial se reservan amplias extensiones de tierra para sembrar *L. angustifolia*, la cual se planta a principios de primavera o en otoño, con plantel de taca o a raíz desnuda (otoño). Las densidades de plantación usuales varían entre las 7.500 y las 12.000 plantas/ha, en función de las características del suelo y del régimen de lluvias. En zonas donde se pueda dar algún riego de apoyo, la densidad de plantación puede aumentar hasta las 18.000 plantas/ha (Biel y col., 1998). No obstante el manejo agronómico de la lavanda todavía no está bien establecido, por lo que los agricultores se enfrentan ante una serie de problemas, tales como rendimientos muy bajos y diferentes en condiciones agronómicas similares, aparición de síntomas sin orígenes patológicos y aparición de enfermedades o plagas (Lange, 2006).

### **A. Aceite Esencial de *Lavandula angustifolia* Miller**

Los aceites esenciales son mezclas compuestas por alrededor de 100 sustancias químicas diferentes biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias y semillas. Están constituidos principalmente por terpenoides volátiles, formados por unidades de isopreno unidas en estructuras de 10 carbonos (monoterpenoides) y 15 carbonos (sesquiterpenoides). Las sustancias responsables del olor suelen poseer en su estructura química grupos funcionales característicos: aldehídos, alcoholes, cetonas, ésteres, entre otros (Shimizu y col., 2008).

Históricamente el aceite esencial de lavanda ha sido el más ampliamente utilizado. En la antigua Grecia, Pedanius Dioscorides, un médico, farmacólogo y botánico lo recetaba como antiséptico y antiespasmódico. Los romanos lo usaban para lavarse y como insecticida. Los egipcios lo utilizaban como ingrediente en el incienso y el perfume. La reina Elizabeth I aplicaba 2 gotas de aceite esencial de lavanda en la infusión de flores de la misma planta para tratar su migraña. No obstante fue hasta 1937 cuando Rene Gattefosse, científico francés, publicó en su obra *Aromatherapy* que las propiedades terapéuticas de lavanda derivaban de sus aceites esenciales. Actualmente el comercio mundial del aceite esencial de lavanda asciende a 1000 millones de dólares, ya sea de fuentes silvestres o cultivadas, convirtiéndose así en el aceite más popular y versátil del mundo (Basch y col., 2004).

*Lavandula angustifolia* Miller contiene hasta un 3% de aceite esencial muy perfumado (*oleum lavandulae*), el cual se produce y se almacena en las hojas, donde se encuentran situadas una gran cantidad de glándulas de aceite (tricomas), que están incrustadas entre la densa pilosidad de las hojas; por ello la materia prima para extraer *oleum lavandulae* es el follaje de la planta y en menor proporción las flores secas o frescas (Fig. 2). No obstante el contenido de aceite esencial en la planta es variable durante los 6 años de vida de la misma (Fig. 3).



Fig. 2: Sección transversal de la glándula peltada (tricoma) de *L. angustifolia*. Acumulación de aceites esenciales en el espacio subcuticular de la flor (color violeta). A: 20  $\mu\text{m}$  y B: 100  $\mu\text{m}$  (Guitton y col., 2010).

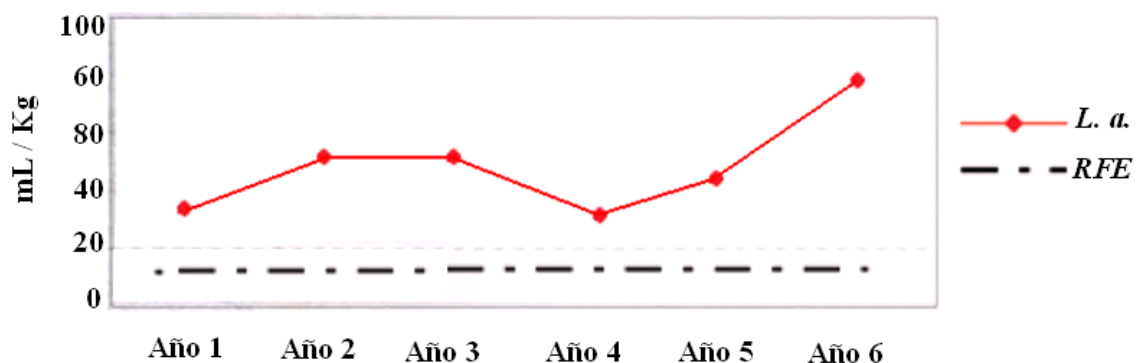


Fig. 3. Contenido medio anual de aceite esencial (mL aceite / Kg flor seca) durante los 6 años de vida de *Lavandula angustifolia* (L. a.). RFE: Contenido de Referencia de la Real Farmacopea Española para L. a. (Basch y col., 2004).

El *oleum lavandulae* está formado por diferentes alcoholes terpénicos y sus esteres, entre los que se encuentran linalool, acetato de linalool, geraniol y borneol, así como un 12% de taninos; los cuales si sufren evaporación, pierden las propiedades terapéuticas que poseen (Petriská y col., 2006). El extracto de lavanda que puede ser el pigmento o el aceite esencial, es utilizado en productos de perfumería, por sus características relajantes y decorativas, además la industria cosmética recurre frecuentemente al uso del aceite esencial de *L. angustifolia* para fabricar perfumes, jabones, aceites, etc.

Actualmente el aceite puede ser de origen natural o artificial, siendo el primero el más buscado entre los fabricantes de productos cosméticos para evitar posibles reacciones secundarias que afecten la salud de los consumidores. Sin embargo se necesita 1 tonelada de plantas de *L. angustifolia* para extraer 9 litros de aceite esencial de lavanda, lo cual implica una sobre explotación de la especie. Por tanto, para cubrir la demanda de aceite esencial se han desarrollado diferentes métodos de extracción como la destilación por corriente de vapor o bien utilizando diversas combinaciones de solventes que incrementen su rendimiento, no obstante hasta el momento no se ha podido aumentar significativamente la producción de *oleum lavandulae* (Basch y col., 2004).

Las propiedades que se le atribuyen al aceite esencial de lavanda son las siguientes: calma los nervios, la irritabilidad, el insomnio, las migrañas, el reumatismo y las taquicardias (Cong y col., 2008). Usado también como tónico digestivo ayuda a expulsar los gases. Es un antiséptico excelente, calma y cicatriza las infecciones cutáneas y las heridas. En general es un sedante, diurético, hipotensor, antiséptico, cicatrizante, antireumático, antiinflamatorio, entre otros (Cavanagh y Wilkinson, 2002). Se han registrado varios usos domésticos para esta planta: para aromatizar el vinagre, como insecticida natural, para tratar picaduras de insectos, como emplaste para aliviar los esguinces. Se tienen registros etnobotánicos donde se reporta que la ingesta de la infusión de *L. angustifolia* combate la fiebre y el insomnio. Así mismo se ha generalizado su uso para perfumar habitaciones evitándose de esta manera la presencia de las polillas.

## **II. Metabolitos Secundarios**

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como los azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros), esenciales para la vida celular y, en general, de la planta (Piñol y col., 2000). Estos procesos constituyen, en su conjunto, el metabolismo primario, y a los compuestos indicados se denominan metabolitos primarios, los cuales están

involucrados directamente en el crecimiento y en el metabolismo (Ramawat, 2007). Además de estos procesos metabólicos, en las plantas se pueden desarrollar otras rutas que conducen a la formación de compuestos usualmente peculiares de ciertos grupos taxonómicos vegetales (género, especie o familia); (Ramawat, 2007). Estas rutas constituyen el metabolismo secundario y sus productos secundarios se denominan metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales (Piñol y col., 2000). Estos compuestos están considerados como productos finales del metabolismo primario y por lo general no están involucrados en procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación, formación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Taiz y Zeiger, 2006).

La distribución de los metabolitos secundarios en las plantas es mucho más restringida que el de los metabolitos primarios; un compuesto a menudo sólo se encuentra en unas pocas especies, o incluso dentro de unas pocas variedades de una especie (Smetanska, 2008).

Además, la biosíntesis de estos metabolitos se restringe también a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo como de las células especializadas, y a períodos de estrés causados, por ejemplo, por la deficiencia de nutrientes, factores ambientales, o el ataque de microorganismos (Piñol y col., 2001). También, desempeñan un papel importante en la adaptación de las plantas con su entorno, y en su mayoría tienen un papel ecológico puesto que protegen a las plantas de ser comidas por herbívoros y en contra de ser infectados por patógenos; sirven como atrayentes (olor, color y sabor) de polinizadores, y al ser ingeridas por animales ayudan a la dispersión de las semillas; funcionan también como agentes de competencia entre las plantas y a la simbiosis de microorganismo planta (Bourgand y col., 2001; Taiz y Zeiger, 2006). Por ejemplo, se ha probado que las plantas producen fitoalexinas como respuesta al ataque de bacterias y hongos (Gurib-Fakim, 2006). La producción de metabolitos secundarios suele ser bajo (menos del 1% PS), dependiendo en gran medida de estos tipos de factores (Neumann y col., 2009). Por otra parte, muchas plantas han sido utilizadas desde cientos de años

para el tratamiento y cura de las enfermedades infecciosas y no infecciosas, lo que propició una de las bases más importantes para el nacimiento de la medicina (Samuelsson, 2004 y Floriani y col., 2006). En la actualidad, la investigación y desarrollo se centran en las plantas que producen metabolitos secundarios de interés farmacéutico, tales como, sustancias antisépticas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, antidepressivas, cicatrizantes, entre otras (Yamada, 1991).

### **A. Metabolitos Secundarios de *Lavandula angustifolia* Miller**

Uno de los metabolitos secundarios asociados a la propiedad curativa de lavanda es el ácido rosmarínico, compuesto que posee varias actividades biológicas (antiviral, antibacterial, antiinflamatoria y antioxidante). Dicho metabolito es un éster de los ácidos caféico y 3,4-dihidroxifeniláctico, perteneciente al tipo fenilpropanoide, cuya producción se refiere a especies pertenecientes a la familia Lamiaceae, aunque su producción también se ha descrito para otras familias de plantas. La presencia de dicho compuesto en plantas puede estar asociada a su función como compuesto de defensa acumulado constitutivamente (Petersen y Simmonds, 2003). Otro tipo de metabolitos secundarios asociados al uso de lavanda a nivel farmacéutico, en perfumería y cosmética, son los aceites esenciales, metabolitos del tipo terpenoide (mezcla de mono y sesquiterpenos). Los principales constituyentes del aceite esencial de la lavanda son: linalool, acetato de linalool, 1,8-cineole,  $\beta$ -ocimene (*cis* y *trans*), terpinen-4-ol y camfor (Cavanagh y Wilkinson, 2002).

#### **a. Linalool**

El linalool es un terpeno cuya formula molecular es  $C_{10}H_{18}O$ . Su nomenclatura IUPAC es 2,6-dimetil-2,7-octadien-6-ol. Sin embargo posee otros nombres tales como  $\beta$ -linalool, linalyl alcohol, óxido de linaloyl, p-linalool, allo-ocimenol y 2,6-dimethyl-2,7-octadien-6-ol. El linalool tiene un centro quiral en  $C_3$  y por lo tanto puede existir en forma de dos isómeros ópticos (Fig. 4): una forma es licareol o (*S*)-(+)-linalool (CAS

No. 126-90-9, PubChem 67179) y la otra es coriandrol o (*R*)-(-)-linalool (CAS No. 126-91-0, PubChem 13562); (Casabianca y col., 1997).

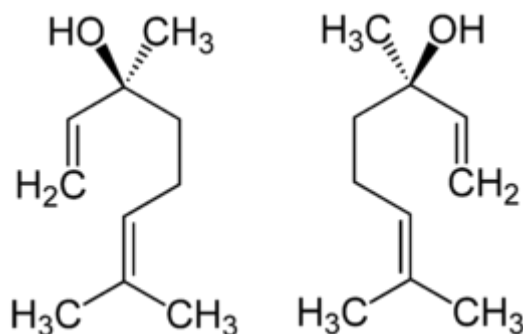


Fig. 4: Estructura del (*S*)-(+)-linalool y del (*R*)-(-)-linalool.

Ambas formas enantiomeras están presentes en la naturaleza: el *S*-linalool es uno de los mayores constituyentes del aceite esencial del cilantro (*Coriandrum sativum* L. familia Apiaceae), la palmarosa (*Cymbopogon martinii* var *martinii* (Roxb.) Wats., familia Poaceae), y el naranja dulce (*Citrus sinensis* Osbeck, familia Rutaceae). Por otro lado el *R*-linalool está presente en la lavanda (*Lavandula officinalis* Chaix, familia Lamiaceae), el laurel (*Laurus nobilis*, familia Lauraceae) y la albahaca (*Ocimum basilicum*, familia Lamiaceae), entre otras plantas (Lewinshon y col., 2001).

Cada enantiómero evoca diferentes sensaciones en los seres humanos lo cual sugiere la estimulación de este compuesto en distintos canales neuronales. La molécula *S*-(+)-linalool contiene un olor a limón dulce y floral (umbral 7.4 ppb). La forma *R* tiene un aroma entre madera y lavanda (umbral 0.8 ppb); (Lewinshon y col., 2001).

El linalool es producido a través de la vía del isopentil pirofosfato a partir del intermediario (isoprenoide) universal geranil pirofosfato. Esto a través de un tipo de enzimas ligadas a la membrana celular llamadas monoterpeno sintetasas. Una de estas, la linalool sintetasa (LIS), es la responsable de la producción de (*S*)-linalool en diversos tejidos florales. Por su olor floral con un toque mentolado se le ha conferido cierto valor para su uso en productos aromáticos, utilizándose como esencia aromática para la



fabricación de jabones, detergentes, champús y lociones. También sirve como reactivo químico intermediario necesario para producir otras sustancias como la vitamina E (Raguso y Pichersky, 1999).

### b. Acetato de Linalool

El acetato de linalool (Fig. 5) es el acetato de éster de linalool. Su fórmula molecular es  $C_{12}H_{20}O_2$ . Su nomenclatura IUPAC es 3,7-acetato de Dimethylocta-1,6-dien-3-iles. Se le conoce también como Bergamiol y Bergamol. Es uno de los principales componentes del aceite esencial de lavanda y bergamota. Linalool y acetato de linalool son los principales componentes de los aceites esenciales comerciales ya que se les atribuyen varias actividades biológicas como la antiinflamatoria (Peana y col., 2002).

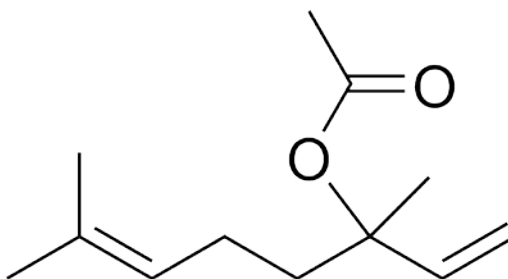


Figura 5: Estructura del acetato de Linalool

Dado que tanto linalool y el acetato de linalool pueden sufrir fácilmente cambios a en su estructura química y derivar está en su descomposición, la síntesis artificial del éster no es fácilmente realizable. Por tanto el rendimiento en la producción de este compuesto mediante el método de Tiemann, de Hesse y de Zeitschel es muy bajo, ya que el linalool se descompone en terpineol, geraniol y nerol (Raguso y Pichersky, 1999).

### III. Producción de Metabolitos Secundarios en Cultivos *in vitro*

La producción de metabolitos secundarios de plantas se ha logrado por mucho tiempo a través del cultivo en campo. Sin embargo, las plantas procedentes de biotopos

específicos pueden ser difíciles de cultivar fuera de sus ecosistemas. Así mismo, las plantas cultivadas en campo están expuestas a diferentes factores de estrés tanto biótico como abiótico, lo que ha llevado a los científicos y biotecnólogos a considerar el cultivo de tejidos y células vegetales como una forma alternativa de producir los metabolitos secundarios (Bourgaud y col., 2001).

### A. Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) o cultivo *in vitro* vegetal (Fig. 6) es una herramienta de la biotecnología moderna, la cual consiste en el uso de partes aisladas de las plantas, llamados explantes, y mantenidos en un medio nutritivo artificial aséptico bajo condiciones ambientales controladas (Barba y col., 2001). Este medio nutritivo funciona como reemplazo de las células, tejidos o elementos conductores originalmente vecinos del explante (Neumann y col., 2009).

Pierik (1990), menciona seis tipos de cultivos *in vitro* o cultivo de tejidos vegetales:

**1. Cultivo de plantas intactas:** se siembra la semilla *in vitro*, de la cual se obtiene una plántula y finalmente una planta.

**2. Cultivo de embriones:** se cultiva el embrión aislado después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.

**3. Se cultiva *in vitro* un órgano aislado** (una porción de tejido o un órgano). Se pueden distinguir distintos tipos, por ejemplo, cultivos de meristemas, cultivos de ápices del vástago, cultivo de raíces, cultivo de anteras, etc.

**4. Cultivo de callo:** Es un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular presentado una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido.

**5. Cultivo de células aisladas.** Es el crecimiento de células individuales obtenidas de un tejido, callo o cultivo en suspensión.

**6. Cultivo de protoplastos:** Se obtiene a partir de células, por digestión enzimática de la pared celular.

El cultivo de tejidos vegetales explora también condiciones que promueven la división celular y la reprogramación genética en condiciones *in vitro*. Además, se ha convertido en un procedimiento estándar para la biotecnología vegetal y hoy en día se puede reconocer cinco grandes áreas donde el cultivo *in vitro* de células es generalmente aplicado (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota 2006): a) propagación a gran escala de material elite, b) generación de individuos fértiles genéticamente modificados; c) como un modelo para estudios de fisiología celular vegetal; d) preservación de especies en peligro de extinción y recursos fitogenéticos; y e) para la producción de productos naturales o metabolitos secundarios como aceites esenciales.

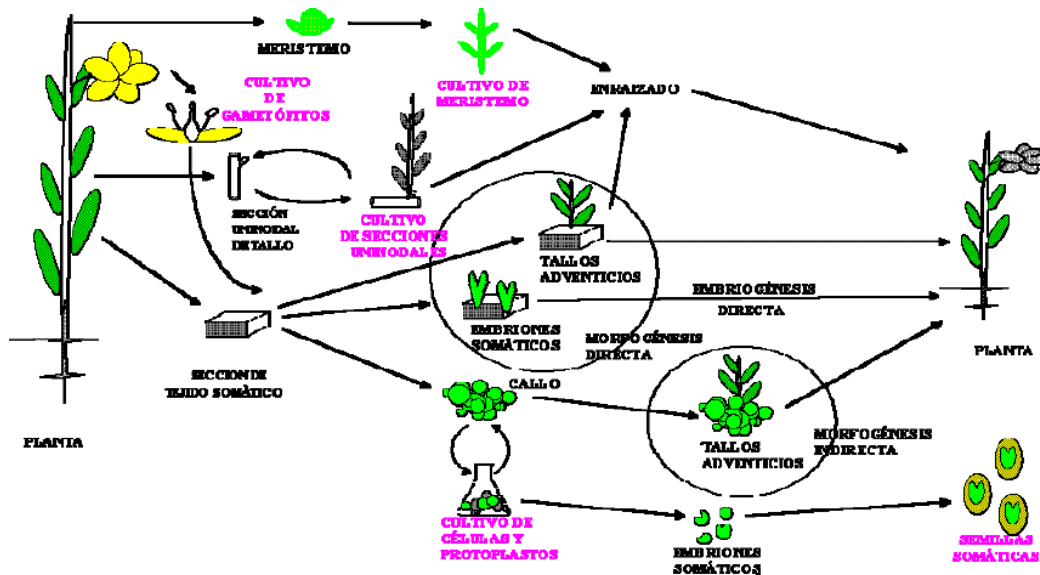


Fig. 6: Esquema general del cultivo de tejidos vegetales (Lindsey y Jones 1989).

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende de varios factores, entre los que se encuentran el material vegetal, la composición del medio de crecimiento (sales inorgánicas), reguladores del crecimiento vegetal y condiciones del cultivo tales como la temperatura, pH, luz, y humedad (Pierik, 1990; Cardoza, 2008).

#### **a. Material vegetal**

Se considera como material vegetal óptimo para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, aquel proveniente de tejidos jóvenes y sanos, no lignificados. Se ha observado que los explantes provenientes de dicotiledóneas se regeneran mejor que las monocotiledóneas. Así mismo, se ha reportado que es más difícil inducir el crecimiento en estructuras muy pequeñas como células, agregados de células, y meristemos, que en estructuras más grandes, como explantes de hojas, tallo o tubérculos (Pierik, 1990).

#### **b. Medio de cultivo**

##### **1. Sales inorgánicas**

El medio de crecimiento es una composición de minerales esenciales y vitaminas que son necesarias para el crecimiento y desarrollo de la planta ya que ésta no es completamente un organismo autótrofo cuando se desarrolla en estas condiciones. Los minerales constan de macronutrientes como el nitrógeno (N), potasio (K), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), y azufre (S), que son requeridos por las plantas en grandes cantidades (g/l); mientras a aquellos que se requieren en cantidades mínimas (mg/l) se denominan micronutrientes como el hierro (Fe), zinc (Zn), cloro (Cl), boro (B), cobre (Cu), níquel (Ni), molibdeno (Mo), manganeso (Mn) (Pierik 1990; Cardoza 2008). Estos elementos junto con el carbono (C), oxígeno (O) y el hidrógeno (H), conforman los 17 elementos esenciales. Algunos otros, como el cobalto (Co), aluminio (Al), sodio (Na) y el yodo (I) han sido esenciales o benéficos para algunas especies (George et al. 2008).

Uno de los medios nutritivos más usados en el CTV es el de Murashige y Skoog (1962),

que fue desarrollado para el crecimiento óptimo de cultivos de callos de tabaco, y el desarrollo resultó útil para un gran número de especies. Este medio, consiste en preparar por separado soluciones base (stock) de macroelementos, microelementos, vitaminas, etc., almacenarlas en frío y mezclarlos en la proporción adecuada en el momento de su utilización (Pina 2008).

## **2. Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV)**

Se entiende por hormonas vegetales aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo ó metabolismo del vegetal. El término "sustancias reguladoras del crecimiento" es más general y abarca a las sustancias tanto de origen naturales como sintetizadas en laboratorio que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo ó desarrollo en la planta. Los RCV más usadas en el cultivo de tejidos son las auxinas, tales como, el ácido 3-indolacético (AIA), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2, 4, 5- triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 2-metil-4-cloro fenoxiacético (MCPA). Las auxinas como el AIA (auxina natural) se utilizan en concentraciones de 0.01 a 10 mg / L, y las auxinas sintéticas como AIB, ANA y 2,4-D, se usan desde concentraciones menores que van desde 0.001-10 mg / L, por ser relativamente más activas. Las auxinas estimulan principalmente la elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias, inhibición de formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos de células en suspensión. Es decir, con una concentración baja de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones da lugar a la formación de callo (Pierik, 1990). Se menciona también que, el 2,4-D y 2,4,5-T son muy efectivas para el crecimiento de callos (Bhojwani y Razdan, 1983).

Las citocininas por su parte, se usan para estimular el crecimiento y el desarrollo, siendo

las más comunes, el 6-furfurilaminopurina ó cinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP), 6-dimetilaminopurina (2iP), y 6-hidroxi metilbuterilaminopurina (zeatina). Estos reguladores, además de promover la división celular, inducen la formación de vástagos axilares por la disminución de la dominancia apical y retarda el envejecimiento y se usa generalmente altas concentraciones de 1-10 mg / L (Cardoza, 2008; Pina 2008; Pierik, 1990).

### **3. Vitaminas**

Las vitaminas más utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales son la tiamina (B1), piridoxina (B6) y el ácido nicotínico (PP ó niacina). La única vitamina que ha demostrado tener importancia en el cultivo de células y órganos es la tiamina, y se usan concentraciones de 0.1-5 mg / L al igual que el ácido nicotínico (PP ó niacina), mientras que la piridoxina es de 0.1-1 mg / L. Estas dos últimas se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos (Hurtado y Merino, 1987). El mio-inositol tiene un efecto estimulante muy significativo y se utilizan concentraciones generalmente de 100-200 mg / L. El ácido cítrico junto con el ácido ascórbico (vitamina C), a veces se utilizan en concentraciones muy elevadas (1-100 mg / L), principalmente para evitar la oxidación de ciertos inóculos (Pierik, 1990).

### **4. Fuente de carbono**

En adición, las plantas requieren de una fuente de carbono externa (azúcares), ya que los cultivos *in vitro* no realizan el proceso de fotosíntesis de manera suficiente para soportar las necesidades de carbono del tejido, además de que el crecimiento de ciertos cultivos tiene lugar en condiciones de oscuridad (Cardoza, 2008). La fuente de carbono más usada es la sacarosa y se emplean concentraciones de 2 a 3 %, pudiendo variar de acuerdo a la especie entre 5 a 12 %. Generalmente el crecimiento y desarrollo aumentan con la concentración de azúcar, hasta que alcanza un óptimo, mientras que disminuye a elevadas concentraciones (Pierik, 1990).

### **5. Material de soporte y pH**

Como material de soporte, el agar (8 g / L) es el más usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inoculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento, por lo que, se pueden sustituir por Gelrite o Phytigel (2 g / L), los cuales son más puros y de apariencia clara que el agar (Cardoza, 2008; Hurtado y Merino, 1987). El pH en el medio es de gran importancia ya que influye en la absorción de varios componentes del medio, la mayoría de éstos se ajustan a un pH de 5.2-5.8 (Cardoza 2008). Pierik (1990) menciona que el pH en el rango de 5-6.5 es apto para el crecimiento, con un máximo de 6.0, mientras que un pH bajo (menor de 4.5) o alto mayor de 7), generalmente frena el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo, puede ocasionar que la auxina AIA y el ácido giberélico sean menos estables, el agar pierde su rigidez, y algunas sales como el fierro y fosfato pueden precipitar.

### **6. Temperatura, luz y humedad**

Otros tipos de factores que influyen en el cultivo son la luz, temperatura y la humedad relativa. A pesar de que los cultivos de tejidos no son fotosintéticamente eficientes, la iluminación influye en los procesos morfogénéticos y en general en el metabolismo. El fotoperiodo generalmente utilizado es de 16 horas luz y 8 de oscuridad, intensidad de luz de 25-50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Algunos cultivos son también incubados en la oscuridad, debido a que la luz incrementa la producción de compuestos fenólicos, los cuales interfieren con el crecimiento del cultivo de callos (Pina, 2008; Cardoza, 2008; George y Davis, 2008). A veces, dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja (18°C para especies bulbosas), o una temperatura más alta (28-29°C para especies tropicales), pero debe tomarse en cuenta que la temperatura interior de los recipientes que contienen los cultivos *in vitro* es 3-4 grados más alta que en la cámara de crecimiento. Por otra parte, debe tenerse también en cuenta que la humedad en los recipientes del cultivo es relativamente alta, por lo que la humedad de la cámara de crecimiento debe ser 30-50%. Sin embargo, si la humedad es elevada en la cámara,

dará como resultado una mayor cantidad de infecciones al igual que una elevada temperatura (Pierik, 1990).

#### **IV. Producción de Linalool y el Acetato de Linalool por CTV**

Existen pocos reportes en los que la producción de linalool y el acetato de linalool, haya sido llevada a cabo por CTV en el género *lavandulae*: Monoterpenos fueron detectados en cultivos de brote de *L. latifolia* (Calvo y Sánchez-Gras, 1993) y *L. angustifolia* (Webb y col., 1984), el aceite esencial fue detectado en plantas micropropagadas de *L. viridis* (Nogueira y Romano, 2002), un pigmento azul fue producido en cultivos de células inmovilizadas de *L. vera* al emplear L-cisteína como inductor y variando la fuente de Nitrógeno, y al adicionar glucosa la productividad de dicho pigmento incrementó (Nakajima y col., 1989a,b), y en cultivos de células en suspensión de *L. angustifolia* se detectó la acumulación de terpenoides al adicionar el precursor mevalonato (Banthorpe y col., 1995). No obstante actualmente no existen reportes de la producción de linalool y acetato de linalool por CTV.



## **Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN**

## **JUSTIFICACIÓN**

*Lavandula angustifolia* Miller, es una especie que produce metabolitos secundarios (ácido rosmarínico y aceites esenciales) de gran importancia por su amplia aplicación en la industria farmacéutica y cosmética. Debido a la alta demanda del linalool y el acetato de linalool como constituyentes principales del *oleum lavandulae* (siendo los de origen natural más cotizados), al año se reservan amplias extensiones de tierra para sembrar *L. angustifolia*. No obstante el manejo agronómico de la lavanda todavía no está bien establecido, por lo que los agricultores se enfrentan ante rendimientos muy bajos, lo cual implica una pérdida importante de los recursos de producción. Además existe una sobre explotación de la especie, ya que para extraer 9 litros de aceite esencial de lavanda se necesita 1 tonelada de plantas de esta especie (Basch y col., 2004). Por ello el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) representa una herramienta potencial para la producción sustentable de metabolitos secundarios. Sin embargo, los reportes existentes sobre CTV se refieren principalmente a la producción de ácido rosmarínico y muy pocos a la producción de aceites esenciales. En estudios llevados a cabo al respecto, se hace énfasis a las condiciones de estrés como promotores de la producción de metabolitos secundarios (Calvo y Sánchez-Gras, 1993). Por tanto, el establecimiento de cultivos celulares de *L. angustifolia* permitirá obtener sistemas modelo para evaluar distintas condiciones de estrés como la elicitación para obtener más conocimiento sobre la producción de aceites esenciales mediante CTV.

## **Capítulo 4. HIPÓTESIS**

## **HIPÓTESIS**

El establecimiento de cultivos celulares de *L. angustifolia* será posible al emplear los reguladores de crecimiento (RCV): auxina 2,4-D y ANA y citocinina BAP, cuya obtención permitirá la adquisición de sistemas modelo capaces de producir metabolitos secundarios del tipo terpenoide.

## **Capítulo 5. OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

### **I. Objetivo General**

Establecer cultivos celulares a partir de explantes foliares inmaduros de *Lavandula angustifolia*.

### **II. Objetivos Particulares**

**A.** Establecer cultivos asépticos de *L. angustifolia*.

**B.** Evaluar en explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia* el efecto de distintas combinaciones de RCV para la inducción de callo o respuestas morfogénicas.

**C.** Seleccionar los tratamientos que promuevan los mayores porcentajes de inducción y el mejor crecimiento.

**D.** Establecer líneas celulares de *L. angustifolia*.

**E.** Determinar la presencia de linalool y acetato de linalool en extractos de líneas celulares por cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de gases (CG).

## **Capítulo 6. MATERIAL Y METODOS**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **I. Material Vegetal**

Ejemplares de *L. angustifolia* fueron adquiridos del invernadero de la Farmacia París a principios del mes de junio del 2010. Las plantas fueron aclimatadas, fertilizadas y mantenidas en el invernadero UAM-I por dos meses, para posteriormente emplear las hojas jóvenes como fuente de explantes.

### **II. Establecimiento de Cultivos asépticos**

Se removieron hojas jóvenes de *L. angustifolia*, las cuales fueron sometidas a 6 tratamientos de desinfestación: 1) lavado con detergente y agua durante 5 y 10 min, 2) inmersión en etanol al 70% durante 15 y 30s, 3) inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 0.6 %, 1.2 % y 1.8% y 0.2% de Tween-20 durante 5 y 10 min, 4) Enjuague (3 veces) con agua estéril bajo condiciones asépticas. Luego las hojas fueron sembradas en medio de cultivo, colocándose un explante por tubo.

### **III. Medio de cultivo**

Los tubos (25 x 150 mm) contenían 15 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50 %, suplementado con 30 g/L de sacarosa, antioxidantes (ácidos ascórbico y cítrico, 150 y 100 mg/L, respectivamente) y diferentes reguladores del crecimiento vegetal: ANA ó 2,4-D (1.5 y 2.0 mg/L) y BAP (0, 1.5 y 2.0 mg/L); estableciéndose de esta forma dos series de tratamientos: BA y BD (Tabla 1A-B). Todos los medios fueron ajustados a pH 5.7-5.8 con NaOH y HCl 1N seguidos de la adición de gelificante (phytagel, 2 g/L) y su esterilización en autoclave a 121°C durante 18 min. Cada tratamiento consto de lotes de 5 tubos por triplicado. Se seleccionaron los tratamientos que presentaron el mayor porcentaje de inducción de callo friable o cultivo morfogenético, para establecer la línea celular (Georgiev y col. 2006). Subsecuentes subcultivos se llevaron a cabo cada 30 días



**Tabla 1. Combinaciones de RCV para la inducción de callo o respuestas morfológicas en explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia*.**

A. Reguladores del Crecimiento Vegetal (RCV) Serie BA			B. Reguladores del Crecimiento Vegetal (RCV) Serie BD		
BAP mg / L	ANA mg / L		BAP mg / L	2,4-D mg / L	
	1.5	2.0		1.5	2.0
0	B <sub>0</sub> A <sub>15</sub>	B <sub>0</sub> A <sub>20</sub>	0	B <sub>0</sub> D <sub>15</sub>	B <sub>0</sub> D <sub>20</sub>
1.5	B <sub>15</sub> A <sub>15</sub>	B <sub>15</sub> A <sub>20</sub>	1.5	B <sub>15</sub> D <sub>15</sub>	B <sub>15</sub> D <sub>20</sub>
2.0	B <sub>20</sub> A <sub>15</sub>	B <sub>20</sub> A <sub>20</sub>	2.0	B <sub>20</sub> D <sub>15</sub>	B <sub>20</sub> D <sub>20</sub>

\* En A y B se muestran las combinaciones en mg/L de RCV para la serie de tratamientos BA y BD respectivamente. Cada tratamiento consta de lotes de 5 tubos por triplicado.

B<sub>0</sub>A<sub>15</sub> = 0 mg/L de BAP + 1.5 mg/L de ANA  
 B<sub>0</sub>D<sub>15</sub> = 0 mg/L de BAP + 1.5 mg/L de 2,4-D, etc.

#### IV. Condiciones de incubación

Los cultivos (inducción y subcultivos) fueron incubados, bajo un fotoperíodo de 16 h luz fluorescente a una irradiancia de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y bajo una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los explantes de cada tratamiento fueron observados semanalmente. Una vez ocurrida la inducción de callo o respuestas morfológicas se determinó el porcentaje de inducción como una relación de explantes produciendo callo con respecto al total de explantes.

#### V. Propagación de la Línea Celular de *L. angustifolia*

El establecimiento de la línea celular de *L. angustifolia* se obtuvo al tratar los explantes foliares con la auxina 2,4-D a la concentración de 1.5 mg/L. Para la generación de biomasa de la línea celular, ésta fue subcultivada en frascos tipo “gerber” cada 30 días en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50 %, suplementado con 30 g/L de sacarosa, antioxidantes (ácidos ascórbico y cítrico, 150 y 100 mg/L, respectivamente). Dicho tratamiento dio origen a dos líneas celulares de callo de color blanco-grisáceo y café. Posteriormente parte del material vegetal propagado de la línea celular (3g de biomasa fresca) se transfirió a matraces Erlenmeyer

de 125 ml conteniendo 25 mL de medio de cultivo líquido adicionado con 500 mg/L de polivinilpirrolidona (Georgiev y col. 2006).

## **VI. Extracción de Metabolitos Secundarios**

Muestras en fresco y seco de callos de color blanco-grisáceo y café derivados de las dos líneas celulares de *L. angustifolia* y de hojas jóvenes de dicha planta provenientes del invernadero UAM-I (3 g y 0.5 g de biomasa fresca y 0.25 g y 0.047 g de biomasa seca respectivamente), fueron sometidas a dos procesos de extracción: 1) extracción con n-hexano y 2) extracción directa a reflujo con metanol (50 ml/100 mg biomasa en peso seco). En el primero el material vegetal de cada muestra fue inmerso en n-hexano durante 24 horas a 25 °C, transcurrido este tiempo el disolvente fue removido y remplazado por nuevo solvente. En el segundo cada muestra se calentó (45 °C) a reflujo con metanol durante 30 minutos. Por otro lado, muestras en fresco de hojas jóvenes, flores y ambos fenotipos de callo de las líneas celulares de *L. angustifolia* fueron extraídas a reflujo con diclorometano bajo las mismas condiciones experimentales mencionadas para esta técnica. En cada caso el procedimiento se realizó 3 veces. Los extractos obtenidos se filtraron y concentraron (5 mL) a presión reducida (Nunes y col., 2009). Cada experimento fue llevado a cabo por triplicado.

## **VII. Análisis de los Extractos por Cromatografía en Capa Fina (TLC).**

Se analizó de manera cualitativa, la presencia de linalool y acetato de linalool en los extractos hexánicos y metanólicos, mediante el uso de cromatoplasmas (Merck 5554) y sus respectivos estándares (solución clorofórmica 0.2 mg ml<sup>-1</sup>; sigma). Se utilizó como fase móvil una mezcla de hexano:cloroformo (1:1 y 3:2). El extracto metanólico fue analizado cualitativamente para la producción de ácido rosmarínico mediante el uso de cromatoplasmas (Merck 5554) y el respectivo estándar (solución metanólica 0.2 mg ml<sup>-1</sup>; sigma) y una fase móvil consistiendo de diclorometano:metanol (85:15). Los compuestos se detectaron mediante revelado físico y químico por medio de luz UV ( $\lambda = 256$  y 320 nm) y reacciones de coloración con: vainillina/ácido sulfúrico para linalool y acetato de linalool y cloruro férrico para el ácido rosmarínico. Se determinaron los valores del factor de retención (Rf) para cada estándar y se

compararon con los observados en los extractos obtenidos. El Rf fue calculado de acuerdo a: Distancia de migración de estándar ó muestra / Distancia de migración de la fase móvil. Cada experimento se llevo a cabo por triplicado.

### **VIII. Análisis de los Extractos por Cromatografía de Gases (CG).**

Se empleo un Cromatógrafo de Gases PerkinElemer Instrument Autosystem XL acoplado a un detector de ionización de flama, una columna capilar HP-5 (30m x 0.25mm, 0.32 $\mu$ m) y gas helio como acarreador a un flujo de 1 mL/min. Se inyectó 1  $\mu$ l de extracto en modo Split 1:10. El programa consistió de 100-210 °C (15° C/min). La temperatura del inyector y del detector se estableció a 240 y 250 °C, respectivamente (Modificado de Javidnia y col., 2004). Se emplearon estándares de linalool y acetato de linalool para comparar los tiempos de retención y el área de los picos con los datos obtenidos en los extractos. El software cromatográfico Totalchrom (PerkinElmer, versión 2004) fue empleado para la adquisición de datos del detector.

### **IX. Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos experimentalmente fueron expresados en  $\bar{X} \pm SD$  y analizados mediante una prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tuckey con una  $P < 0.05$  utilizando el paquete estadístico SPSS version 17.

## **Capítulo 7. RESULTADOS Y DISCUSION**

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **I. Establecimiento de cultivo aséptico**

La propagación masiva *in vitro* de especies como *L. angustifolia*, presenta ventajas importantes sobre el cultivo tradicional, ya que permite reproducir plantas en condiciones ambientales controladas, en tiempos y espacios mínimos (Loyola y col., 1985). Además estas técnicas sirven para el estudio y producción de metabolitos secundarios como el linalool y acetato de linalool. Sin embargo un reto importante de este tipo de metodologías es el establecimiento de cultivos asépticos. Es decir el punto de partida para el cultivo de tejidos vegetales es la iniciación, en donde los explantes son sometidos a condiciones de desinfestación con el propósito de ser transferidos a un medio de cultivo aséptico, donde resulta esencial mantener la esterilidad del medio ambiente confinado en el recipiente, debido a que la presencia de microorganismos, resulta letal para el explante, puesto que éstos crecen de manera oportunista a una velocidad mucho más rápida que los tejidos vegetales y eventualmente colonizan y matan a los tejidos (Loyola y col., 1985). Por tal motivo, inicialmente el presente estudio se centro de manera prioritaria en el establecimiento de cultivos asépticos de explantes foliares de *L. angustifolia*, en donde se evaluaron seis distintos tratamientos de desinfestación, demostrándose que los explantes de lavanda tratados con detergente y H<sub>2</sub>O durante 10 min, seguidos de una limpieza con alcohol al 70 % durante 30 segundos, e hipoclorito de sodio al 1.8 % y 0.2% de Tween-20 por 10 min, no presentaron contaminación (Tabla 2), por lo tanto dicho tratamiento se estableció para la desinfestación posterior de los explantes utilizados para cada ensayo experimental.

### **II. Inducción de callo y raíz**

A diferencia de la mayoría de las células animales, las células vegetales pueden cambiar de un estado diferenciado, a uno completamente indiferenciado en donde las células conforman una masa aparentemente desorganizada, típico de tejido de callo y en otros casos presentan estructuras reconocibles como tallos, órganos, raíces, etc. (Osborne y

Mcmanus, 1986). Este proceso se logra mediante la variación de las concentraciones y proporciones relativas de dos principales reguladores del crecimiento vegetal (auxinas y citocininas) en el medio de cultivo (Skoog y Millar, 1957). Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente estudio se determinó evaluar en explantes foliares inmaduros el efecto de distintas combinaciones de auxinas 2,4-D y ANA y citocinina BAP (Tabla 1A-B), para la inducción de callo o respuestas morfológicas.

**Tabla 2. Dosis evaluadas en la desinfección de explantes foliares de *L. angustifolia***

TRATAMIENTO	CARACTERISTICAS		% CONTAMINACION
	EtOH 70% /Tiempo (s)	NaOCl (%) /Tiempo (min)	
1	15	0.6 % /5 min.	70
2	30	0.6 % /10 min.	60
3	15	1.2 % /5 min.	40
4	30	1.2 % /10 min.	20
5	15	1.8 % /5 min.	15
6	30	1.8 % /10 min.	0

\* Cada tratamiento con lotes de 5 unidades por triplicado

En términos generales, se observó la inducción de raíz vía organogénesis indirecta y callo en los explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia* tratados con los distintos tratamientos de de RCV ( $B_xA_y$ ;  $B_xD_y$ ), y predominantemente dichos tratamientos indujeron la respuesta de callo ( $B_xA_y$ ;  $B_xD_y$ ) (Fig. 7 y 8). En el caso de los tratamientos  $B_xA_y$ , aquel suplementado únicamente con ANA (2.0 mg/L;  $B_0A_{20}$ ) no presentó ningún tipo de inducción (Fig. 7) y en ambos casos todos los explantes se oxidaron en su totalidad, mientras que el resto de los tratamientos correspondientes a la combinación  $B_xA_y$  mostraron un 100 % de inducción de callo a los treinta días de cultivo, los cuales no mostraron diferencias en los porcentajes de inducción observados (Fig. 7). Las características de los callos inducidos bajo dichos tratamientos fueron: de color amarillo verdoso, el cual se inició en los bordes del explante que estaba en contacto con el medio de cultivo; no obstante dichos callos exhibieron una textura muy compacta al momento de ser subcultivados (Fig. 8). Sin embargo, al repetir el tratamiento  $B_0A_{20}$  con explantes colectados a finales del mes de octubre, alrededor de la 6:00 p.m. se registró un 65.21 % de inducción de raíz a los 45 días de cultivo (Fig. 8).

Con respecto a la serie de tratamientos  $B_xD_y$ , los cuales fueron suplementados con diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D, pudo apreciarse que a los 45 días de cultivo, todos los tratamientos de esta serie presentaban porcentajes por arriba del 85 % e incluso del 100 % de inducción de callo de color café grisáceo, en casi la totalidad del explante (Fig. 7). Sin embargo todos los tratamientos de  $B_xD_y$  no mostraron diferencias significativas sobre los porcentajes de inducción observados (85-100%); (Fig. 7). No obstante  $B_{15}D_{15}$  -  $B_{20}D_{20}$  presentaron una textura de callo muy compacta al momento subcultivarse. Por otro lado los tratamientos  $B_0D_{15}$  y  $B_0D_{20}$ , los cuales contenían únicamente 1.5 y 2.0 mg/L de 2,4-D consecutivamente, indujeron un callo café grisáceo, siendo el tratamiento  $B_0D_{15}$  el que presentó la apariencia más hidratada y con mayor disgregación o friabilidad al subcultivarse (Fig. 8), por tal motivo dicho tratamiento se eligió para establecer la línea celular.

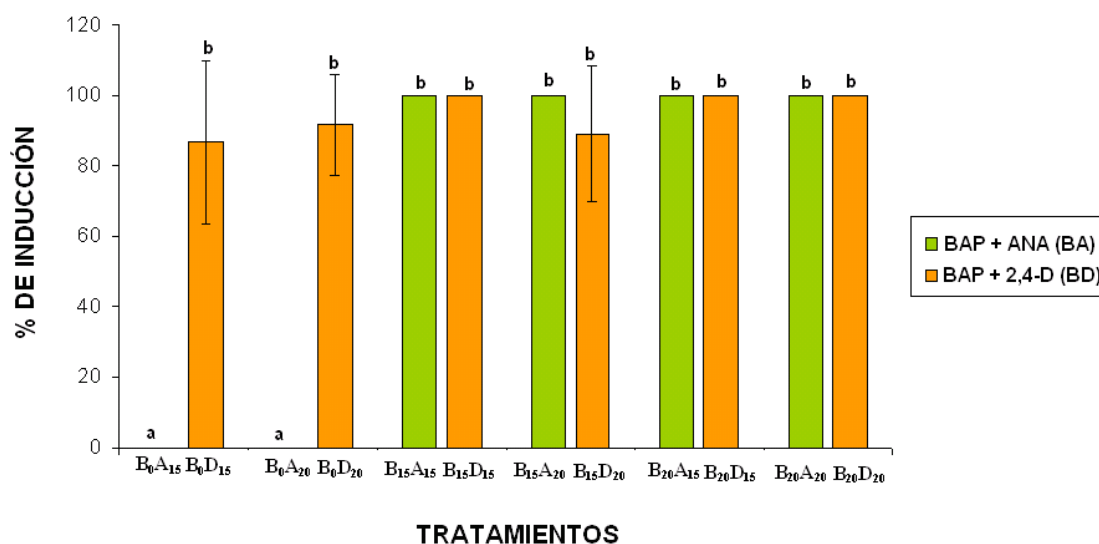


Fig. 7: Porcentaje de inducción de callo en explantes foliares de *L. angustifolia*, obtenido para la serie de tratamientos BA y BD, a los 45 días de cultivo. Los resultados expresan la  $\bar{X} \pm SD$  de lotes de 5 explantes por triplicado. Se señala la significancia  $P < 0.05$  de a-b. Letras sobre la barra muestran los cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales.

$B_0A_{15}$  = 0 mg/L de BAP + 1.5 mg/L de ANA, etc.  
 $B_0D_{15}$  = 0 mg/L de BAP + 1.5 mg/L de 2,4-D, etc.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las auxinas sintéticas ANA y 2,4-D promovieron diferentes respuestas en los explantes foliares inmaduros de *L.*

*angustifolia*; ANA favoreció la formación de raíz, mientras que 2,4-D promovió la formación de callo. Lo anterior concuerda con el creciente número de evidencias que sugieren que las auxinas pueden activar diferentes vías de transducción de señales (Celenza y col., 1995; Hobbie y col., 2000; Yamagami y col., 2004; Campanoni y Nick, 2005). Además se ha demostrado que las auxinas controlan la división y la elongación celular a través de diferentes receptores. La división celular depende de receptores acoplados a proteínas G, mientras que la elongación celular no depende de este tipo de receptores (Ullah y col., 2001, 2003; Campanoni y Nick, 2005). Por tanto, cuando diferentes receptores están involucrados en la respuesta, se espera que exista una afinidad diferencial por distintos ligandos (auxinas), por ende la división celular y alargamiento de células se verá afectado con diferentes relaciones dosis-respuesta de auxinas distintas, siendo éstos procesos antagónicos (Zhao y col., 2002; Savaldi-Goldstein y col., 2008). Otra posible causa de los resultados observados en este estudio pudiera deberse a la existencia de dos receptores de auxinas distintos y consecuentemente con afinidad diferente por la auxina, explicando la sensibilidad diferencial de ANA y 2,4-D en los tratamientos B<sub>0</sub>A<sub>20</sub> y B<sub>0</sub>D<sub>20</sub>. Resultados similares fueron obtenidos por Medina y col., (2007) quienes demostraron que en *Manihot esculenta*, ANA es uno de RCV más eficaces para estimular la formación de las raíces en concentraciones superiores a 1 mg/L; mientras que los explantes tratados con 2,4-D reportaron inducción hacia callo. De manera similar, Campanoni y col. (2005), demostraron que ANA y 2,4-D promueven respuestas diferenciales con respecto a la sensibilidad relativa de la división y elongación celular en plantas de Tabaco: el 2,4-D estimuló la división celular e inhibió el alargamiento celular, ya que presenta un receptor de baja afinidad, ANA conduce a un aumento de la elongación celular puesto que se une a un receptor de alta afinidad a auxinas (Campanoni y col., 2005; Chen, 2001). Bednarek y col. (2007) obtuvieron callo con 2 mg/ L de 2,4-D en *Hordeum vulgare*. Finalmente, dicho efecto diferencial también pudiera asociarse a las propiedades de transporte de estas dos diferentes auxinas sintéticas a través de las células, donde 2,4-D se acumula más rápidamente a diferencia de ANA (Delbarre y col., 1996).



Por otro lado, recientemente se ha reportado la preponderancia de genes circadianos implicados en la síntesis de auxinas (Abas y col., 2006; Li y col., 2004), ya que alrededor del 50% de los genes de estas hormonas son altamente sensibles al ciclo circadiano, por ende existe alta probabilidad de que las vías de señalización en donde están implicadas las auxinas se encuentren bajo control circadiano. Así mismo, también se ha registrado que cuando las plantas se cultivan con auxinas sintéticas como ANA el ritmo circadiano se conserva (Woodward y Bartel, 2005; Teale y col., 2006), promoviendo el crecimiento de las plantas en tiempos específicos del día (Michael y col., 2007), observándose máxima sensibilidad por la tarde y por la madrugada (Went y Timan, 1937). Todo lo anterior, pudiera explicar la respuesta de inducción a raíz, registrada en los explantes de lavanda colectados en otoño y por la tarde-noche, donde debido al periodo estacional la planta presentó una apariencia senescente, reforzando lo citado por Salisbury y col. (1994) quienes explican que puede existir un nuevo aumento de auxinas en tejido senescente, probablemente a causa del aumento de triptofano como consecuencia de la proteólisis enzimática. Así mismo, lo antepuesto también pudiera explicar los resultados obtenidos en los porcentajes de inducción de callo o raíz en los explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia* bajo los tratamientos B<sub>x</sub>A<sub>y</sub> y B<sub>x</sub>D<sub>y</sub>.

### **III. Propagación de la Línea Celular de *L. angustifolia***

El crecimiento de las células vegetales *in vitro* está regulado por el balance hormonal de reguladores del crecimiento vegetal (RCV) que imitan la acción de las hormonas vegetales. El RCV más utilizado para generar desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, es 2,4-D (Amhed y col., 2001). En el presente estudio, dicha auxina a la concentración de 1.5 mg/L no sólo dio origen a dos líneas celulares de callo de color blanco-grisáceo y café, en explantes foliares de *L. angustifolia* con alto porcentaje de callo friable (86.66%); (Fig. 9A-B), sino también permitió alta proliferación celular del tejido. La generación de dos líneas celulares obtenidas con la misma concentración de

2,4-D y provenientes de explantes jóvenes de la misma planta, probablemente se deba a que el cultivo *in vitro per se* pudo causar algún tipo de estrés en las células vegetales durante la inducción de callo, ya que se sabe que durante la iniciación de organogénesis o embriogénesis indirecta se activan elementos transponibles que estimulan la inducción de enzimas y productos específicos que se estimulan en situaciones adversas en la planta. Cuando comienza la división celular a partir de tejidos diferenciados que darán origen a un callo, se incrementa el riesgo de inestabilidad cromosómica, pudiéndose generar considerables cambios en el fenotipo del tejido a consecuencia de una variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981; Freire-Seijo, 2006).

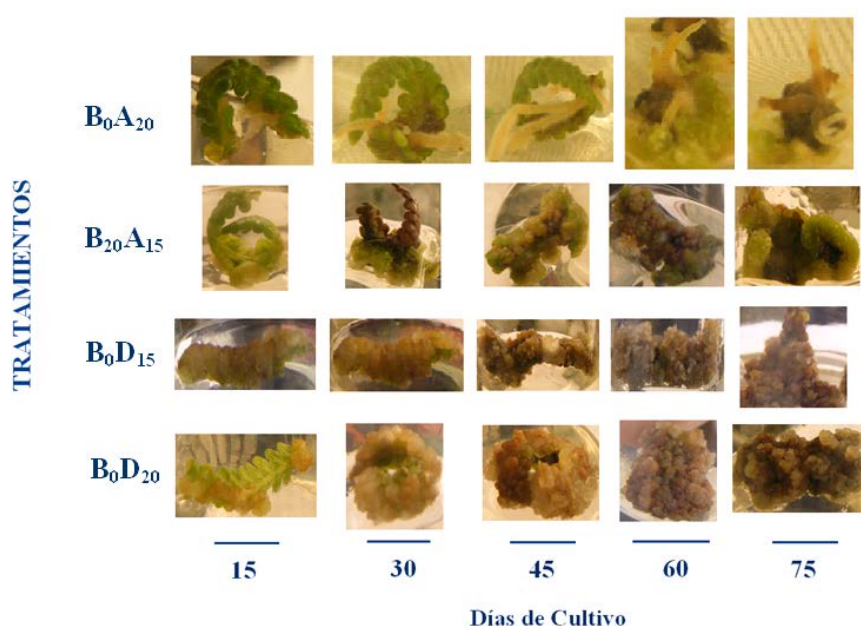


Fig. 8: Características fenotípicas de raíz y callo inducidos en explantes foliares de *L. angustifolia* a los 15, 30, 45, 60 y 75 días de cultivo. B<sub>0</sub>A<sub>20</sub> (2mg/L de ANA) promovió la diferenciación hacia raíz, B<sub>20</sub>A<sub>15</sub> (2 mg/L BAP + 1.5 mg/L de ANA) representa el tipo de callo inducido en los tratamientos de la serie B<sub>X</sub>A<sub>Y</sub>, B<sub>0</sub>D<sub>15</sub> (1.5 mg/L de 2,4-D) promovió la inducción de callo friable, B<sub>0</sub>D<sub>20</sub> representa el tipo de inducción de callo de los tratamientos de la serie B<sub>X</sub>D<sub>Y</sub>.

Una vez establecidas las dos líneas celulares de lavanda, se inicio su etapa de propagación para generar suficiente biomasa vegetal y evaluar su producción de linalool y acetato de linalool; por tanto el medio de cultivo fue renovado periódicamente con el

objetivo de cambiar los nutrientes y evitar estrés asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular, la acumulación de células muertas o productos metabólicos potencialmente tóxicos. Los callos obtenidos crecieron normalmente en medio sólido, sin embargo al presentar alta friabilidad y proliferación celular, parte de la biomasa generada fue transferida a un medio en suspensión, ya que diversas investigaciones han demostrado que en el medio líquido la disponibilidad del agua, los minerales y los reguladores de crecimiento, es mayor al compararlo con el medio semisólido, promoviendo un crecimiento celular más acelerado (Debergh, 1981). En las pruebas preliminares realizadas en medio líquido se observó oxidación de los callos color blanco-grisáceo (Fig. 9C), posiblemente en respuesta a las nuevas condiciones hidrodinámicas a la que fue sometido el tejido; además que la mayor disponibilidad de los nutrientes y reguladores en el medio líquido podría ser causa de toxicidad celular. Sin embargo la oxidación de tejido vegetal *in vitro* pudo disminuirse parcialmente cuando se adicionó al medio de cultivo polivinilpirrolidona (PVP), ya que como demuestran Sánchez-Cuevas (2001) dicho compuesto en concentraciones de 0,5 y 1,0 g/L, causó un efecto positivo en cultivos en suspensión de pimentero incubado en presencia de luz, puesto que se obtuvo un 80 % de callos libres de oxidación.

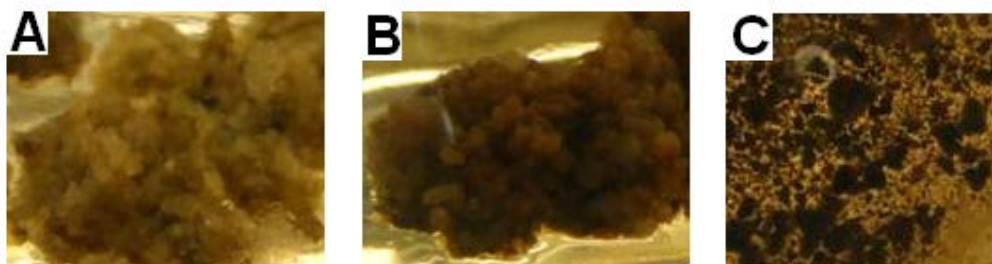


Fig. 9. Características fenotípicas de las líneas celulares de *L. angustifolia* obtenidas mediante el tratamiento de explantes foliares de la planta con la auxina 2,4-D (1.5 mg/L). En A y en B se muestran las líneas celulares de callo de color blanco-grisáceo y café respectivamente, cultivadas en medio semisólido. En C se muestra la oxidación del tejido de la línea celular de callo color blanco grisáceo a los 25 días de cultivo en medio líquido.

**IV. Extracción de Metabolitos Secundarios y Análisis de los Extractos por Cromatografía en Capa Fina (TLC) y Cromatografía de Gases (CG).**

Mediante TLC fue posible distinguir la presencia de linalool en los extractos metanólicos de hojas (muestra fresca) y callo blanco-grisáceo (muestra fresca y seca); en cuanto a los extractos hexánicos pudo observarse en hoja (muestra fresca y seca), callo blanco grisáceo (muestra seca) y callo café (muestra fresca), dichas muestras presentaron una banda mayoritaria de color verde-azul intenso con un Rf promedio de 0.13, el cual es semejante al Rf del estándar de linalool (0.18); (Fig. 10A). La presencia de linalool en los extractos hexánicos resulta evidente, ya que el disolvente al presentar apolaridad, tiene la propiedad de arrastrar compuestos de característica lipídica como el linalool y el acetato de linalool. Así mismo la detección del acetato de linalool por TLC resulto poco clara, cuando se utilizo el sistema de elusión hexano:cloroformo 3:2, puesto que pudieron apreciarse dos Rfs para el estándar: 0.069 y 0.38, siendo el primero coincidente con el Rf promedio obtenido tanto por los extractos hexánicos como por los extractos metanólicos (0.067); (datos no mostrados). La presencia de dos bandas pertenecientes a la muestra estándar de acetato de linalool, pudiera deberse a que las proporciones de los disolventes de la fase móvil no eran las apropiadas para permitir una adecuada resolución de la banda. Sin embargo, cuando el sistema de elusión estuvo constituido por una mezcla de hexano:cloroformo 1:1, fue posible detectar en dicho estándar una banda más prominente con Rf de 0.36, la cual no pudo apreciarse en las muestras experimentales (Fig. 10A). Finalmente, en el análisis por TLC pudo observarse de manera cualitativa que las bandas más prominentes y definidas provenían del material fresco, posiblemente debido a que éstas muestras conservaron los componentes químicos del aceite esencial de lavanda, ya que no fueron sometidas al proceso de evaporación; por tanto se determino realizar el análisis por CG únicamente a las muestras en fresco.

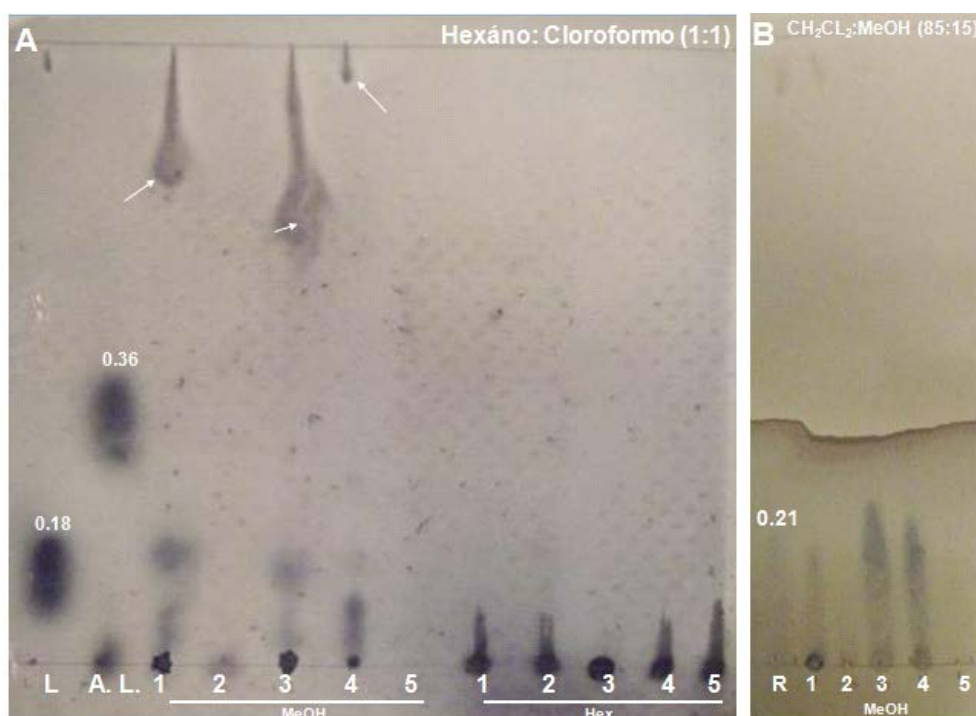


Fig. 10: Perfil Cromatográfico en Capa Fina (TLC) de las muestras en fresco y seco de hoja, callo blanco grisáceo y callo café-oscuro de *L. angustifolia* extraídas con n-hexano y metanol. En A se muestra el cromatograma obtenido utilizando como fase móvil mezcla hexano:cloroformo (1:1) y en B mezcla diclorometano:metanol (85:15). Los números en blanco muestran los Rf obtenidos para cada muestra. Las flechas blancas señalan la presencia de compuestos menos polares en los extractos metanólicos.

L = Linalool, L. A. = Acetato de Linalool, R = Acido Rosmarínico (estándares-Sigma), 1 = hoja fresca, 2 = hoja seca, 3 = callo blanco grisáceo (fresco), 4 = callo blanco grisáceo (seco), 5 = callo café (fresco), Hex = extractos hexánicos, MeOH = extractos metanólicos.

Por otro lado, mediante TLC, utilizando como sistema de elusión diclorometano:metanol 85:15, pudo observarse un Rf de 0.21 para el estándar de ácido rosmarínico, el cual coincidió con el obtenido por las muestras en fresco y en seco de hojas y callo color blanco grisáceo (Rf: 0.23), a excepción de las muestras de callo color café (Fig. 10B). La presencia de ácido rosmarínico en este tipo de extractos es evidente, ya que el MeOH al ser un disolvente polar tiene la propiedad de arrastrar compuestos de características semejantes a éste, como el ácido rosmarínico. La ausencia de metabolitos secundarios del tipo fenólico en las muestras de callo café puede deberse a que el tejido celular posiblemente se encuentra bajo estrés oxidativo y contiene la acumulación de células muertas incapaces de producir cualquier tipo de compuesto del tipo fenólico. Se ha demostrado que las plantas emplean una variedad de mecanismos de

protección contra el estrés oxidativo, en donde la síntesis de terpenos volátiles juega un papel importante en la resistencia a dicho estrés (Huang y col., 2010), lo cual podría explicar la presencia de componentes de aceite esencial en los extractos hexánicos de callo color café (Fig. 10A-B). No obstante, la presencia de ácido rosmarínico en dichos extractos, debe corroborarse con una técnica analítica como CG.

El análisis por cromatografía de gases, mostro que entre los dos métodos empleados para extraer linalool y acetato de linalool con solventes, el más adecuado y eficiente fue aquel realizado a temperatura y presión ambiental utilizando hexano, ya que se obtuvieron mayores rendimientos en comparación con los obtenidos de las muestras sometidas a reflujo con diclorometano (Tabla 3A-B). En la literatura, se encuentra citado que los rendimientos para aceites esenciales derivados de muestras extraídas por arrastre de vapor, varían del 0.5 al 2 %. Para el caso específico de lavanda se ha reportado 0.9 % en hoja y 0.6 % en flor (Basch y col., 2004). En este estudio, para el caso de linalool (constituyente principal del aceite esencial de lavanda), los rendimientos obtenidos por las muestras extraídas a reflujo presentaron rendimientos por debajo de lo anteriormente citado: 0.3 % (hoja), 0.09 % (flor) y 0.3 % (callo café); sin embargo mediante el procedimiento de extracción a temperatura y presión ambiental con hexano, se obtuvieron rendimientos notablemente mayores: 6.76 % (hoja), flor (4.28 %) y 5.69 % (callo café). Lo cual, pone de manifiesto que la cantidad obtenida de aceite esencial dependerá de la técnica que se utilice para el aislamiento. Se ha reportado que la extracción por arrastre de vapor de agua es el principal proceso utilizado para aislar aceites esenciales, ya que los compuestos de los que están constituidos generalmente son terpenos, los cuales al ser volátiles son arrastrables por vapor de agua; sin embargo para realizar dicha técnica se requieren grandes cantidades de material vegetal que oscilan entre los 50 y 100 gramos (Pavia y Lampman, 1988). Por tanto, para este estudio se determino realizar la extracción con disolventes, ya que se requieren volúmenes pequeños de material vegetal. Los resultados obtenidos reflejan la importante influencia de diversos factores como la polaridad y tiempo de exposición de la muestra al solvente, así como la temperatura en los proceso de extracción. En cuanto al tipo de solvente empleado, el hexano presenta una ventaja sobre el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ya

que los terpenos presentes en los aceites esenciales de lavanda al poseer naturaleza química lipofílica, son altamente miscibles en éste solvente apolar; en comparación con el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, solvente polar aprótico en donde dichos compuestos son menos solubles (Snowden y col., 1992).

**Tabla 3:** Contenido de Terpenoides en hojas, flores y cultivos *in vitro* de callo de extractos de *L. angustifolia*.

Terpenoides	Tr (min)	Contenido de Terpenoides en <i>L. angustifolia</i> (mg/g de TF)							
		A. Extractos Hexánicos				B. Extractos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>			
		Cultivo <i>in vitro</i>							
		Hoja	Flor	Callo		Hoja	Flor	Callo	
		Blanco-Grisáceo	Callo Café			Blanco-Grisáceo	Callo Café		
Linalool	5.03	33.38 ± 1.25 <sup>c</sup>	21.41 ± 0.52 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	28.45 ± 1.61 <sup>e</sup>	1.56 ± 0.38 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.41 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.18 <sup>b</sup>
Acetato de Linalool	6.25	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	11.58 ± 0.72 <sup>f</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.27 <sup>g</sup>

Los resultados expresan la  $\bar{X} \pm SD$  de las muestras inyectadas por triplicado. Se señala la significancia  $P < 0.05$  de a-g. Letras iguales no son significativamente diferentes al nivel del 5 %.

Así mismo, se ha documentado que existe una aparente relación lineal entre el tiempo de exposición de la muestra al solvente y la obtención del aceite esencial de la misma; no obstante en este caso el aumento de temperatura optimiza dicho proceso, puesto que actúa como un catalizador debido a que facilita la ruptura del tejido vegetal liberando el aceite esencial en el solvente caliente, lo cual favorece la solubilidad de los analitos en la reacción. A pesar de esto, la temperatura también genera presión de vapor dentro del matraz donde se realiza la extracción (sobre todo si el diámetro es muy pequeño), la cual si es muy alta (mayor a los 6 *psi*) puede generar la hidrólisis del aceite esencial disminuyendo su calidad y su rendimiento, o bien puede provocar su oxidación (Martínez y Csáky, 1998), lo cual pudiera explicar los bajos rendimientos reportados y la ausencia de otros compuestos en las muestras obtenidas por reflujo a 45 °C con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Tabla 3B, Fig. 12). Actualmente para lograr mejor eficiencia en la operación, se realiza la extracción de aceites esenciales preferentemente a temperatura y presión ambiental ((Mercè Raventós Santamaría; 2005), ya que se obtiene mayor rendimiento y contenido de constituyentes, lo cual en este estudio pudo corroborarse con las muestras extraídas bajo dichas condiciones con hexano (Tabla 3A, Fig. 11). A pesar del

sobresaliente rendimiento conseguido en la extracción con hexano, debe tomarse en cuenta que la obtención de metabolitos secundarios con solventes, presenta varios inconvenientes: elevados costos, riesgo de manipulación, ya que son inflamables y tóxicos; pudiendo quedar trazas en el producto obtenido, alterando el aroma y la pureza del aceite esencial (Mercé Raventós Santamaría; 2005). Lo cual justifica, porque el arrastre de vapor se sigue utilizando actualmente como técnica mayoritaria para aislar aceites esenciales.

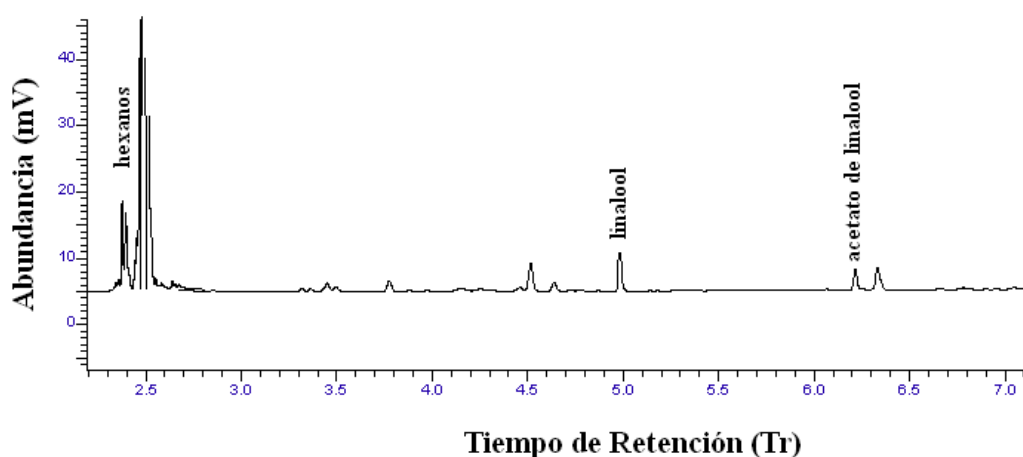


Fig. 11: Cromatograma (CG) del extracto obtenido a temperatura y presión ambiental con hexano, de la línea celular de Callo Café

La CG también puso de manifiesto que por ambos métodos de extracción se obtuvo de las hojas y las flores de lavanda únicamente linalool, presentándose mayoritariamente en la primera estructura mencionada (Tabla 3A-B). Lo cual concuerda con la literatura, ya que el *oleum lavandulae*, se produce y se almacena en mayor proporción entre la densa pilosidad de las hojas, donde se encuentran situadas una gran cantidad tricomas; por ello la materia prima para extraer el aceite de lavanda es el follaje de la planta y en menor proporción se ocupan las flores secas o frescas (Guitton y col., 2010).

La presencia de linalool, también se reportó en las muestras de callo café (Fig. 11), extraídas a temperatura y presión ambiental con hexano, no obstante fue menor al



obtenido en la hoja y superior al extraído de la flor (Tabla 3A), es decir en este caso se encontró en la hoja de lavanda 1.17 veces mayor cantidad de linalool, en comparación con el callo café, y éste último presentó 1.32 veces mayor cantidad que la flor. De manera similar sucedió con las muestras extraídas a reflujo (45 °C) con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Tabla 3B). Estos resultados pudiesen explicarse con la creciente evidencia de que la pared celular del tejido vegetal indiferenciado denominado callo, es generalmente más gruesa, en comparación con la pared celular del explante del que proviene, debido al estrés *per se* del cultivo *in vitro* (Vidal y col., 2000), por lo que podemos inferir que parte del contenido de aceite esencial no fue removido en su totalidad del tejido de callo, por tanto posiblemente se requiera de otros métodos de extracción como los denominados emergentes: Extracción con fluidos supercríticos (FSC), con agua subcrítica (SWE), con líquidos presurizados (PLE), asistida con microondas (MAE), asistida con ultrasonido (UAE), asistida con enzimas (EAE) y asistida por fermentación (FAE); (Mercé Raventós Santamaría; 2005).

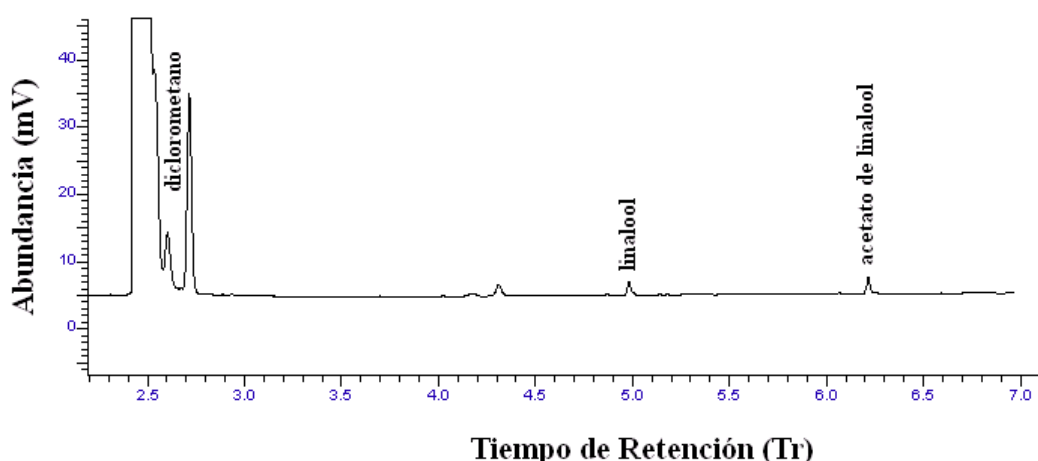


Fig. 12: Cromatograma (CG) del extracto obtenido a reflujo (45 °C) con diclorometano, de la línea celular de Callo Café.

La presencia de acetato de linalool, de igual forma se presentó en la línea celular de callo café (Tabla 3A-B y Fig. 11). En el caso de las muestras extraídas con hexano se observó que la línea produce 2.45 veces linalool, en comparación con su éster. En los

extractos obtenidos a reflujo, se registro mayor proporción de acetato de linalool, lo cual pudo deberse a que el aumento en la temperatura y presión de extracción provoco la oxidación de linalool. La presencia de acetato de linalool en las muestras de callo café, tiene un efecto positivo en cuanto al grado de diferenciación comercial del aceite esencial, ya que el contenido de compuestos oxigenados como el anteriormente mencionado, determina el grado de calidad comercial del aceite (Galletty y Bonaga, 1988).

Además, en los extractos hexánicos de la línea celular de callo café, fue posible detectar otros compuestos con tiempos de retención de 3.46, 3.78, 4.52, 4.64 y 6.46 (Fig. 11); posiblemente pertenecen a la mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles de los que está constituido el aceite esencial de lavanda, como cariofileno, terpineol,  $\beta$ -ocimeno, mircenos, alcanfor, etc (Harborne y Williams, 2002). Sin embargo la naturaleza química de dichos compuestos debe corroborarse mediante una técnica analítica como CG.

Por otro lado, en los extractos de la línea celular de callo blanco-grisáceo obtenidos tanto por reflujo, como a temperatura y presión ambiental, no se detecto la presencia de linalool o acetato de linalool (Tabla 3A-B); no obstante en las muestras hexánicas pudieron apreciarse compuestos con tiempo de retención de 3.48, 3.76, 4.26, 4.52 y 4.64 (Fig. 13), los cuales son semejantes a los reportados en el extracto hexánico de las muestras de callo café, lo cual sugiere que aunque el callo blanco-grisáceo y callo café proceden del mismo tratamiento con 2,4-D (1.5 mg/L), dichos cultivos se encuentran bajo diferentes condiciones de estrés *in vitro*, como variaciones en la intensidad lumínica, la calidad de la luz, la temperatura, disponibilidad de nutrientes, cantidad de oxígeno, etc.; reflejándose tanto fenotípicamente como de manera bioquímica, manifestando que el callo de color café se encuentra bajo condiciones más estresantes en comparación con el callo blanco-grisáceo, por lo que para aminorar el estrés, el tejido recurre a la síntesis de linalool y acetato de linalool, como mecanismo de defensa, ya que éstos metabolitos secundarios dentro de la planta funcionan en una variedad de contextos ecológicos: interacción planta-insecto, planta-patógeno y planta-planta

(Pichersky y Gershenzon, 2002). Lo cual resulta congruente, con la creciente evidencia de recurrir a la elicitación para optimizar la producción y acumulación de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* (Zhao y col., 2005) Se ha demostrado que la producción *in vitro* de terpenos puede ser potenciada utilizando inductores y factores de estrés, dada la conocida actividad antimicrobiana y antifúngica de estos compuestos (Burt, 2004; Kordali y col., 2005); tal es el caso de *Lavandula vera*, en donde se obtuvieron sesquiterpenos asociados a un pigmento azul, cuando se empleo al L-cisteína como elicitador y se vario la fuente de nitrógeno, no obstante al adicionar glucosa la productividad de dicho pigmento se incrementó (Nakajima y col., 1989a,b).

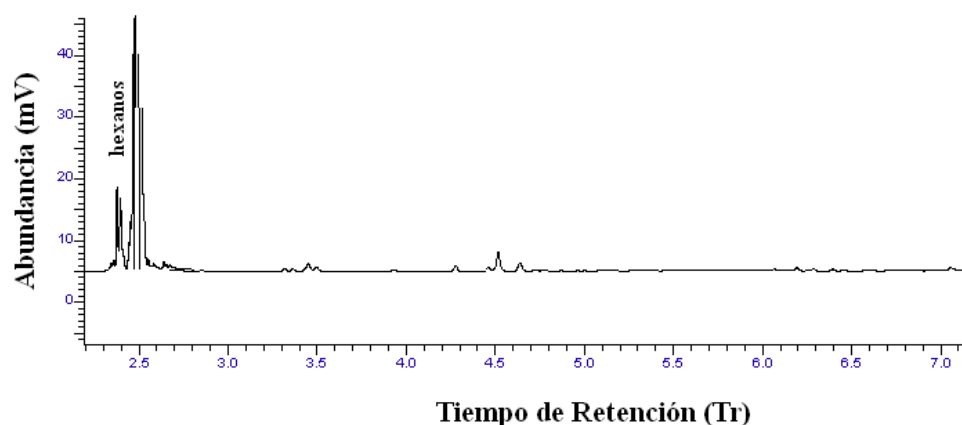


Fig. 13: Cromatograma (CG) del extracto obtenido a temperatura y presión ambiental con hexano, de la línea celular de callo blanco-grisáceo.

## **Capítulo 8. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- Se estableció el cultivo aséptico de explantes foliares de *L. angustifolia* con las siguientes condiciones: detergente + H<sub>2</sub>O durante 10 min, 70% de alcohol durante 30 s, hipoclorito de sodio al 1.8 % por 10 min.
- Los tratamientos con ANA en combinación con BAP indujeron la formación de callo compacto color verde en explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia*.
- La acción de ANA a la concentración de 2 mg / L de forma individual mostró efecto en la inducción de raíz.
- La acción de 2,4-D a las concentraciones de 1.5 y 2 mg / L de forma individual mostró efecto significativo sobre la inducción de callo y su crecimiento en explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia*, y al ser éste regulador combinado con BAP promovió una mayor inducción, crecimiento y desarrollo del callo.
- El tratamiento consistiendo de 2,4-D a la concentración de 1.5 mg/L fue seleccionado para establecer una línea celular de *L. angustifolia* por inducir un alto porcentaje de callo friable (86.66%) y una proliferación celular mayor.
- Las dos líneas celulares de *L. angustifolia*: callo blanco-grisáceo y callo café, generadas mediante el tratamiento con 2,4-D [1.5 mg/L], se propagaron favorablemente obteniéndose la cantidad de biomasa necesaria para el análisis de metabolitos secundarios.
- Entre los dos métodos empleados para extraer linalool y acetato de linalool con solventes, el más adecuado y eficiente fue el realizado a temperatura y presión ambiental utilizando hexano, ya que se obtuvieron mayores rendimientos en comparación con los obtenidos de las muestras sometidas a reflujos con diclorometano.
- La presencia de linalool, se reportó en la línea celular de callo café, siendo el rendimiento menor al obtenido de la hoja y superior al extraído de la flor.
- La línea celular de callo café presentó acetato de linalool en menor proporción que linalool, sin embargo las muestras de hoja y flor no presentaron este compuesto.

- En los extractos hexánicos de la línea celular de callo café, además de linalool y acetato de linalool, se detectaron otros compuestos que posiblemente pertenecen a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles de los que está constituido el aceite esencial de lavanda.
- En los extractos de la línea celular de callo blanco-grisáceo obtenidos tanto por reflujo, como a temperatura y presión ambiental, no se detectó la presencia de linalool o acetato de linalool, no obstante se registró la presencia de otros compuestos que posiblemente pertenecen a la mezcla del aceite esencial de lavanda.
- La extracción a reflujo con metanol a temperatura superior a la ambiental, parece ser eficaz en cuanto a la extracción de ácido rosmarínico.
- La oxidación de tejido vegetal *in vitro* en medio líquido, pudo disminuirse parcialmente cuando se adicionó al medio de cultivo polivinilpirrolidona (PVP).
- La Fisiología de la planta representa un factor importante en la inducción de callo o respuestas morfogénicas, por lo que la realización de un barrido hormonal de auxinas y citocininas debe ser efectuado para el desarrollo de una línea celular.

## **Capítulo 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Amhed, Z., Akhter, F., Haque, S., Banu, H., Rahman M., Faruquzzaman, M. (2001). *Novel Micropropagation System. OnLine Journal of Biological Sciences* 1 (11): 1106-1111.
- Banthorpe DV, Bates MJ, Ireland MJ (1995). Stimulation of accumulation of terpenoids by cell suspensions of *Lavandula angustifolia* following pre-treatment of parent callus. *Phytochemistry* 40:83-87
- Basch E, Foppa I, Liebowitz R. (2004). Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller). *J Herb Pharmacother* 4(2):63-78.
- Burt SA (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Inter J Food Microbiol.* 94:223-253.
- Biel, C., De Herralde, F., Savé, R. (1998). Efecto de la densidad de plantación en el crecimiento y relaciones hídricas de, dos especies de labiadas. Proc. IV Symp. Hispano-Portugues de Relaciones Hídricas en las Plantas. Murcia, España.
- Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plants Physiologists, Maryland USA
- Calvo MC, Sánchez-Gras MC (1993). Accumulation of monoterpenes in shoot-proliferation cultures of *Lavandula latifolia* Med. *Plant Science* 91:207-212
- Casabianca H, Graff JB, Faugier V, Fleig F, Grenier C. (1997) Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate. A powerful tool for authenticity control of essential oils. *HRC J High Res Chrom* 21:107-112
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, et al. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci* 8: 165–171.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM (2002). Biological activities of Lavender Essential oil. *Phytotherapy Research* 16:301-308
- Celenza JL, Grisafi PL, Fink GR (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 9: 2131–2142



- Cong Y., Abuliziz P, Zhi L, Wang X, Mirensha (2008). Chemical composition of the essential oil of *Lavandula angustifolia* from Xinjiang, China. *Chemistry of Natural Compounds* 44:810
- Chen JG, Ullah H, Young JC, Sussman MR, Jones AM (2001b) ABP1 is required for organised cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev* 15: 902–911
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198:532–541.
- Georgiev M, Pavlov A, Ilieva M (2006). Selection of high rosmarinic acid producing *Lavandula vera* MM cell lines. *Process Biochemistry* 41: 2068-2071
- Hadacek F. (2002) Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21:273–322.
- Huang, M., Abel, C., Sohrabi, R., Petri, J. Haupt, I., Cosimano, J., Gershenzon, J., y Tholl, D. (2010) Variation of herbivore-induced volatile terpenes among Arabidopsis ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03 *Plant Physiol.*, 10.1104/pp.110.154864
- Inzé D (2005). Plant biotechnology helps to build a sustainable economy. *Current Opinion in Biotechnology* 16:109-111
- Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J Agric Food Chem.*53:9452-9458.
- Lange, D. (2006). International trade in medicinal and aromatic plants. En *Medicinal and aromatic plants. Agricultural, commercial, ecological, legal, pharmacological and social aspects.* Bogers, R., Craker, L, Lange, D (Ed). Springer. 309 pp.
- Larkin P, Scowcroft W. (1981). Somaclonal variation a novel source of variability from cells cultures from plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, 197-214.

- Marisol Freire-Seijo\*, Rafael G. Kosky, Idalia Herrera Ofarril, Maritza Reyes. (2006). Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de caña de azúcar a partir de segmentos de hojas de plantas *in Vitro*. *Biotecnología Vegetal Vol. 6, No. 1: 51 - 57*
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- NakajimaH, Sonomoto K, Sato F, Ichimura K, Yamada Y, Tanaka A (1989a). Enhancement of pigment productivity of immobilized cultured *Lavandula vera* cells by limitation of Nitrogen sources. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 67: 306-308
- NakajimaH, Sonomoto K, Sato F, Ichimura K, Yamada Y, Tanaka A (1989b). Influence of carbon source on pigment production by immobilized cultured cells of *Lavandula vera*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 68: 330-333
- Nogueira JMF, Romano A (2002). Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Phytochemical Analysis* 13:4-7
- Nunes IS, Faria JMS, Figueiredo AC, Pedro LG, Trindade H, Barroso JG (2009). Menthol and geraniol biotransformation and glycosilation capacity of *Levisticum officinale* hairy roots. *Planta Medica* 75:387-391
- Pichersky E, Gershenzon J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol* 5: 237–243
- Peana de AT , PS D'Aquila , Panin F , G Serra , P Pippia , Moretti MD .(2002). La actividad anti-inflamatoria de linalol y acetato de linalilo componentes de los aceites esenciales. Fitomedicina. Dic. 9 (8):721-6.
- Petersen M, Simmonds MSJ (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62: 121-125
- Petriska I, Polásek M, Sladkovský R. (2006). Assay of terpene alcohols in pharmacopoeial essential oils by micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC). Pharmazie. Dec 61(12):989-93

- Raguso RA, Pichersky E. (1999). A day in the life of a linalool molecule: chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biol* 14:95-120
- Robert, M.L., Arce, M.M. y Eastmond, A., 1993. Biotecnología vegetal. En: *Biotecnología Alimentaria*. García, G.M, Quintero, R.R. y López-Munguía, C.A., Compiladores. LIMUSA. México. pp. 69-10
- Romero-Ramírez L., Buendía-González L., Cruz-Sosa F., Orozco-Villafuerte J. (2008). Morphogenesis *in vitro* Cultures of Foliar Explants of *Lavandula Angustifolia*. *Memorias “First International Congress on Biotechnology And Bioengineering”*. Ciudad de México.
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 54: 118–130.
- Ullah H, Chen JG, Young JC, Im KH, Sussman RM, Jones AM (2001). Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. *Science* 292: 2066–2069
- Verlet N. (1993). Commercial aspects of essential oil production. In RKM Hay, PG Waterman, eds, *Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry and Production*. Longman Scientific and Technical, Essex, UK, pp 137–174
- Webb JK, Banthorpe V, Watson DG (1984). Monoterpene synthesis in shoots regenerated from callus cultures. *Phytochemistry* 23: 903-904
- Yamagami M, Haga K, Napier RM, Iino M (2004) Two distinct signaling pathways participate in auxin-induced swelling of pea epidermal protoplasts. *Plant Physiol* 134: 735–747
- Zhong JJ (2001). Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 72: 1-26

## **Capítulo 10. ARTÍCULO**

# PRODUCCIÓN EN CULTIVOS *IN VITRO* DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES DEL ACEITE ESENCIAL DE *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA*

BERENICE GUADARRAMA-FLORES<sup>a</sup>, LETICIA BUENDÍA-GONZÁLEZ<sup>b</sup>, JUAN OROZCO-VILLAFUERTE<sup>c</sup>, MARÍA ELENA ESTRADA-ZÚÑIGA<sup>a</sup>, FRANCISCO CRUZ-SOSA<sup>a\*</sup>

(Recibido Junio 2012; Aceptado Septiembre 2012)

## ABSTRACT

The terpenoids linalool and linalyl acetate, are the major volatile constituents of *Lavandula angustifolia* essential oil, with a wide application in pharmaceutical, cosmetic and food industries. In order to produce these terpenoids, immature leaf explants of *L. angustifolia* were culture into half-strength Murashige and Skoog medium supplemented with different concentrations and combinations of 6-benzyladenine (BA 0.00, 6.66, 8.88  $\mu\text{M}$ ) with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D 0.00, 6.79, 9.05  $\mu\text{M}$ ) or BA (0.00, 6.66, 8.88  $\mu\text{M}$ ) with naphthalene acetic acid (NAA 0.00, 8.05, 10.74  $\mu\text{M}$ ). Highest friable callus induction (87%) was obtained in treatment containing 6.79  $\mu\text{M}$  (2,4-D) after 30 d of culture. The callus cultures produced two cellular lines: 1) grayish-white callus (GWCL) and 2) brown callus (BCL) that shows differences in the terpenoids production. Fresh and dry samples were extracted with n-hexane (100%) during 24 h at room temperature and then, the terpenoids content was determinate by gas chromatography. Linalool and linalyl acetate were only detected in BCL. The linalool was the major terpenoid produced in BCL (28.45 mg g<sup>-1</sup> fresh weight, FS), while linalyl acetate content was lower (11.58 mg g<sup>-1</sup> FS). [www.relaquim.com](http://www.relaquim.com)

**Keywords:** *Lavandula angustifolia*, *in vitro* culture, linalool, linalyl acetate.

## RESUMEN

Los principales constituyentes del aceite esencial de *Lavandula angustifolia* son los terpenoides linalol y acetato de linalilo. Estos compuestos tienen aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. En este trabajo, para producir estos terpenoides, segmentos de hojas inmaduras de *L. angustifolia* fueron culti-

<sup>a</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 México, D.F., México

<sup>b</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Piedras Blancas Carretera Toluca- Ixtlahauca km 15.5 C.P. 50200 Toluca Estado de México, México.

<sup>c</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120 Toluca Estado de México, México.

\*Autor para la correspondencia: E-mail: [cuhp@xanum.uam.mx](mailto:cuhp@xanum.uam.mx). Tel. (52 55) 5804 4714 y (52 55) 5804 6400 extensión 2847

vadas en medio Murashige & Skoog a la mitad de su concentración, suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de 6-benciladenina (BA 0.00, 6.66, 8.88  $\mu\text{M}$ ) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0.00, 6.79, 9.05  $\mu\text{M}$ ) o BA (0.00, 6.66, 8.88  $\mu\text{M}$ ) con ácido naftalenacético (ANA; 0.00, 8.05, 10.74  $\mu\text{M}$ ). La mayor inducción de callo friable (87%) se obtuvo con el tratamiento conteniendo 6.79  $\mu\text{M}$  de 2,4-D transcurridos 30 d de cultivo. Dos líneas celulares fueron establecidas: 1) callo blanco-grisáceo (GWCL) y 2) callo café (BCL). Se extrajeron muestras en fresco y en seco de ambas líneas celulares con n-hexano (100%) a temperatura ambiente durante 24 h y el contenido de los terpenoides se analizó por cromatografía de gases. Solo fue detectada producción de linalol y acetato de linalilo en la línea celular BCL. El linalol fue el terpenoide producido en mayor proporción (28.45  $\text{mg g}^{-1}$  peso fresco, PF), mientras que el contenido de acetato de linalilo fue menor (11.58  $\text{mg g}^{-1}$  PF). [www.relaquim.com](http://www.relaquim.com)

**Palabras clave:** *Lavandula angustifolia*, cultivo *in vitro*, linalol, acetato de linalilo.

## INTRODUCCIÓN

*Lavandula angustifolia* Miller pertenece a la familia de las Lamiáceas, se le conoce comúnmente como lavanda. Contiene hasta un 3% de aceite esencial el cual se produce y almacena en los tricomas foliares y en menor proporción en las flores (Guitton *et al.*, 2010a). La producción comercial del aceite de lavanda se inició en Francia y en 1937 Rene Gattefosse reportó en su obra *Aromatherapy* que las propiedades terapéuticas de la lavanda derivaban de sus aceites esenciales. Actualmente, *L. angustifolia* se usa en la medicina tradicional por sus propiedades sedantes, diuréticas, hipotensoras, antisépticas, cicatrizantes, antirreumáticas y antiinflamatorias (Cavanagh y Wilkinson, 2002; Cong *et al.*, 2008).

El aceite esencial está constituido principalmente por linalol (20 – 40%) y por acetato de linalilo (30 – 50%) (Petriska *et al.*, 2006). El linalol es un alcohol mono-terpénico que tiene un átomo estereogénico en C<sub>3</sub>, por lo cual existe un par de enantiómeros ((S)-(+)-linalol y (R)-(-)-linalol). El isómero (S)-(+) llamado licareol tiene un olor a limón dulce y floral (umbral 7.4 ppb). El isómero (R)-(-) coriandrol tiene un aroma a madera y lavanda (umbral 0.8 ppb) (Casabianca *et al.*, 1997; Lewinshon *et al.*, 2001).

Por su olor floral con un toque mentolado y ser intermediario para producir sustancias como la vitamina E, al linalol se le ha conferido alto valor para su uso en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Raguso y Pichersky, 1999). Mientras que al acetato de linalilo se le atribuyen varias actividades biológicas, entre ellas la anti-inflamatoria (Peana *et al.*, 2002).

El comercio mundial del aceite esencial de lavanda ascendía para el 2006 a 1000 millones de dólares al año, ya sea de fuentes silvestres o cultivadas, convirtiéndose así en el aceite esencial más popular y versátil del mundo. Cada año se siembran entre 7500 y 12000 plantas/ha, y por cada tonelada de biomasa vegetal procesada se obtienen tan solo nueve litros del aceite esencial, lo cual limita su obtención. Aunado a ello, el contenido de aceite esencial en la planta es variable durante sus seis años de vida productiva, su manejo agronómico aún no está bien establecido, por lo que los productores se enfrentan frecuentemente con la aparición de enfermedades, plagas y cambios climáticos que resultan en bajos rendimientos del aceite esencial (Lange, 2006).

Una alternativa biotecnológica al cultivo tradicional de lavanda para la obtención del

aceite esencial, es el cultivo de tejidos vegetales (CTV). Esta herramienta consiste en el cultivo de fragmentos de tejidos u órganos vegetales en un medio nutritivo artificial aséptico y bajo condiciones ambientales controladas con lo que se eliminan problemas de estacionalidad, variaciones geográficas y fluctuaciones en los rendimientos (Andrade *et al.*, 1999; Muñoz de Malajovich, 2006;). Se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre propagación de lavanda a través del CTV con la finalidad de obtener material vegetal homogéneo (Xiu-juan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2005). No obstante, no existen reportes sobre la producción de linalol y acetato de linalilo en cultivos celulares de lavanda; la producción de metabolitos secundarios es otra aplicación del CTV que ha mostrado en algunas especies mejores rendimientos de producción de compuestos bioactivos al compararse con las plantas completas (Georgiev *et al.*, 2009). El objetivo del presente trabajo fue producir los terpenoides principales del aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (linalol y acetato de linalilo) en cultivos *in vitro* de callo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Las plantas fueron colectadas en el estado de Querétaro, México en el mes de abril de 2010. Las plantas fueron fertilizadas y acondicionadas en el invernadero de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Hojas de 1 cm de longitud fueron removidas de plantas adultas, desinfectadas superficialmente con detergente en polvo al 1% durante 15 min seguido de una inmersión en etanol al 70% durante 30 s, posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 1.8% con Tween-20 (tres gotas por cada 100 mL de solución) durante 10 min y finalmente bajo condiciones asépticas, lavadas tres veces con agua

esterilizada. Segmentos de 0.5 cm fueron sembrados bajo condiciones asépticas en tubos de cultivo (25 X 150 mm) conteniendo 15 mL de medio Murashige & Skoog (MS, 1962) a la mitad de su concentración y suplementado con reguladores del crecimiento vegetal (RCV). Un explante fue sembrado asépticamente en cada tubo de cultivo y un lote de cinco tubos fue evaluado por cada tratamiento y se realizó por triplicado.

### Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo empleado fue MS a la mitad de su concentración suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 150 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico y 2 g L<sup>-1</sup> de phytigel (Sigma-Aldrich Co., EUA) como solidificante. Para evaluar la respuesta a callo en los explantes foliares inmaduros, los medios de inducción fueron enriquecidos con diferentes concentraciones y combinaciones de RCV: 6-benciladenina (BA; 0.00, 6.66 y 8.88 μM) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0.00, 6.79 y 9.065 μM) denominados con los códigos B<sub>x</sub>D<sub>y</sub> ó la combinación de BA (0.00, 6.66 y 8.88 μM) con ácido naftalenacético (ANA 0.00, 8.05 y 10.74 μM) representados por los códigos B<sub>x</sub>A<sub>y</sub>. Todos los medios de cultivo fueron ajustados a pH de 5.8 con NaOH y HCl 1N, posteriormente fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 18 min. Los cultivos fueron incubados bajo un fotoperíodo de 16 h luz fluorescente a una irradiancia de 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y una temperatura de 25 ± 2°C. La respuesta a callo, de los explantes foliares para cada uno de los tratamientos de inducción, fue expresada como el porcentaje del número de explantes formando callo respecto al total de explantes evaluados (5), el cual fue registrado a los 30 d de cultivo.

### Propagación de las líneas celulares

El tratamiento que registro los más altos porcentajes de inducción de callo y que exhibió mayor grado de disgregación (callo

friable) fue seleccionado para su proliferación mediante subcultivos en medio fresco con la misma formulación del medio de inducción: 6.79  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, los cuales se llevaron a cabo cada 30 d durante seis ciclos de subcultivo. Con posterioridad al primer ciclo de subcultivo el callo generado en el medio de inducción  $\text{B}_0\text{D}_{1.5}$  dio origen a dos líneas celulares: callo blanco-grisáceo (GWCL) y callo café (BCL), ambas líneas fueron propagadas.

#### **Extracción de linalol y acetato de linalilo**

Muestras frescas de biomasa de las dos líneas celulares (3 g), hojas y flores de la planta utilizadas como fuente de explantes, fueron sometidas por separado a dos procesos de extracción: 1) extracción con 50 mL de n-hexano (100%) a temperatura ambiente durante 24 h dos veces y 2) extracción con 50 mL de diclorometano (100%) a 45 °C durante 30 min tres veces. En ambos casos, los extractos obtenidos se filtraron y concentraron a presión reducida a un volumen final de 5 mL. Cada proceso de extracción se llevo a cabo por triplicado.

#### **Determinación de linalol y acetato de linalilo en extractos por cromatografía de gases**

Para determinar el contenido de los terpenoides se empleó un Cromatógrafo de Gases Autosystem XL (Perkin-Elmer, EUA) acoplado a un detector de ionización de llama, equipado con una columna capilar HP-5 (5% de siloxano, 30m x 0.32mm I.D., y 0.25 $\mu\text{m}$  de espesor, Agilent Technologies, EUA); el gas acarreador fue helio (1 mL min<sup>-1</sup>). Las condiciones experimentales fueron: 100 - 210 °C (15° C min<sup>-1</sup>); temperatura del inyector y del detector 240 y 250 °C, respectivamente (Modificado de Javidnia *et al.*, 2002). Inyección, split-splitless; split ratio, 1:10. El volumen de inyección de 1  $\mu\text{L}$  de extracto. Soluciones stock de estándares de linalol y acetato de linalilo (50 mg mL<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich Co., EUA) fueron diluidas de manera independiente para obtener

su correspondiente curva de calibración (100, 150, 200 y 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; coeficiente de determinación  $[r^2] = 0.9785$  y 0.9654 para linalol y acetato de linalilo, respectivamente). Los estándares fueron corridos bajo las mismas condiciones que las muestras. El software cromatográfico Total Chrom (Perkin-Elmer, versión 2004) fue empleado para la adquisición de datos del detector. El tiempo de retención ( $T_r$ ) y el área obtenidos de la curva patrón de los estándares fueron empleados para identificar y cuantificar el contenido de linalol y acetato de linalilo ( $T_r$  de 5.03 $\pm$ 0.07 y 6.25 $\pm$ 0.06, respectivamente) en las muestras de extractos. Cada muestra fue inyectada al menos tres veces ( $n \geq 3$ ).

#### **Análisis estadístico**

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Todos los datos obtenidos experimentalmente fueron analizados estadísticamente utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17 y la comparación de medias mediante una prueba de Tuckey estableciendo el nivel de significancia al 5% ( $P < 0.05$ ).

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **Inducción de callo en explantes foliares**

En el presente estudio se observó que los tratamientos suplementados únicamente con ANA ( $\text{B}_0\text{A}_1$  y  $\text{B}_0\text{A}_2$ ) no indujeron la formación de callo (Tabla 1) en los explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia*. Sin embargo, el tratamiento  $\text{B}_0\text{A}_2$  indujo la formación de raíz (62.5 %) (Tabla 1) desarrollando un promedio de tres raíces adventicias por explante. Mientras que los tratamientos suplementados con ANA y BAP ( $\text{B}_1\text{A}_1$ ;  $\text{B}_2\text{A}_1$ ;  $\text{B}_1\text{A}_2$ ;  $\text{B}_2\text{A}_2$ ) registraron los más altos porcentajes de inducción de callo (100%) a los 30 d de cultivo (Tabla 1). La formación de callo en estos arreglos de los RCV se inició en los bordes del explante que estaban en contacto con el medio de cultivo, el callo caracterizado por una



coloración amarillo-verdosa y exhibiendo una textura compacta.

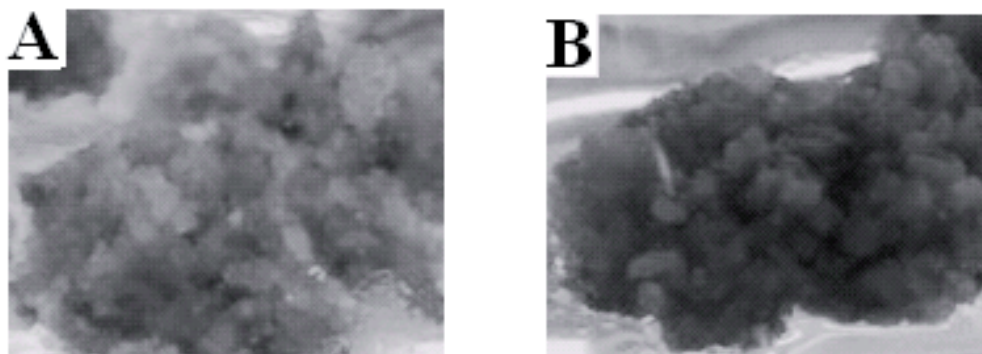
Por otro lado, los tratamientos  $B_xD_y$ , suplementados con diferentes concentraciones 2,4-D en combinación con BA registraron altos porcentajes de inducción de callo (86-100%) que no mostraron diferencias significativas con los tratamientos  $B_xA_y$  que indujeron el mismo tipo de respuesta morfogénica. Adicionalmente, los callos inducidos por estas combinaciones de RCV, registraron visualmente, mayor producción de biomasa caracterizada por

una coloración café a los 30 d de cultivo. En particular, los tratamientos  $B_1D_1$  (6.66  $\mu$ M de BA y 6.79  $\mu$ M de 2,4-D) y  $B_2D_2$  (8.88  $\mu$ M de BAP y 9.06  $\mu$ M de 2,4-D) presentaron un callo con una textura compacta. Por el contrario, el tratamiento  $B_0D_1$  (6.79  $\mu$ M de 2,4-D) indujo la formación de callo (86.66 %) con una coloración café, apariencia hidratada y friable, por lo que, los cultivos generados por este tratamiento fueron seleccionados para su proliferación y posterior análisis de la producción de los terpenoides (Tabla 1).

**Tabla 1:** Porcentaje de inducción de respuestas morfogénicas en explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia* bajo diferentes niveles de 6-benciladenina con ácido 2,4-diclorofenoxiacético o ácido naftalenacético después de 30 d de cultivo.

Código del tratamiento	RCV ( $\mu$ M)		Respuesta morfogénica (%)	
	BA	2,4-D	Callo	Raíz
$B_0D_0$	0.00	0.00	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_0D_1$	0.00	6.79	86.66 $\pm$ 23.09 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_0D_2$	0.00	9.05	91.66 $\pm$ 14.43 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_1D_0$	6.66	0.00	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_1D_1$	6.66	6.79	100 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_1D_2$	6.66	9.05	88.88 $\pm$ 19.24 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_2D_0$	8.88	0.00	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_2D_1$	8.88	6.79	100 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_2D_2$	8.88	9.05	100 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
ANA				
$B_0A_0$	0.00	0.00	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_0A_1$	0.00	8.05	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_0A_2$	0.00	10.74	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	62.50 $\pm$ 19.04 <sup>b</sup>
$B_1A_0$	6.66	0.00	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_1A_1$	6.66	8.05	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_1A_2$	6.66	10.74	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_2A_0$	8.88	0.00	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_2A_1$	8.88	8.05	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$B_2A_2$	8.88	10.74	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>

El código de los tratamientos ( $B_xA_y$  y  $B_xD_y$ ) corresponde a los niveles de BA: 0.00 ( $B_0$ ), 6.66 ( $B_1$ ) y 8.88 ( $B_2$ ) con ANA 0.00 ( $A_0$ ), 8.05 ( $A_1$ ) y 10.74 ( $A_2$ ) ó 2,4-D: 0.00 ( $D_0$ ), 6.79 ( $D_1$ ) y 9.05 ( $D_2$ ). Los resultados expresan la  $\bar{X} \pm SD$  de lotes de 5 tubos conteniendo un explante por triplicado. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 5%



**Fig. 1.** Características fenotípicas de las líneas celulares de *L. angustifolia* de cultivos de explantes foliares inmaduros cultivados en medio MS al 50% de su concentración suplementado con  $6.79 \mu\text{M}$  de la auxina 2,4-D después de 3 subcultivos (120 d). (A) Línea celular GWCL y (B) línea celular BCL.

Los resultados muestran que las auxinas sintéticas ANA y 2,4-D indujeron diferentes respuestas en los explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia*. ANA favoreció la formación de raíz, mientras que 2,4-D promovió la formación de callo. Resultados similares fueron obtenidos por Medina *et al.*, (2007) quienes demostraron que en *Manihot esculenta*, ANA es uno de los RCV que estimulan la formación de raíces adventicias en segmentos nodales en concentraciones superiores a  $5.37 \mu\text{M}$ ; mientras que los explantes tratados con 2,4-D ( $4.52 \mu\text{M}$ ) indujeron la formación de callo. De manera similar, Campanoni y Nick, (2005) demostraron que ANA y 2,4-D promueven respuestas diferenciales con respecto a la división y elongación celular en cultivos en suspensión de *Nicotiana tabacum*, proveniente de callos inducidos en el segmento de tallo: 2,4-D ( $10 \mu\text{M}$ ) estimuló la división celular e inhibió el alargamiento celular, ya que presenta un receptor de baja afinidad, mientras que ANA ( $10 \mu\text{M}$ ) conduce a un aumento de la elongación celular puesto que se une a un receptor de alta afinidad a auxinas. Este efecto diferencial también pudiera asociarse a las propiedades de transporte de estas dos diferentes auxinas sintéticas a través de las células, donde 2,4-D se acumula con mayor velocidad con respecto a ANA (Delbarre *et al.*, 1996).

### Propagación de las líneas celulares

En el presente estudio, 2,4-D ( $6.79 \mu\text{M}$ ) dio origen a dos líneas celulares (callo color blanco-grisáceo y callo color café) en explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia* friable (Fig. 1A-B). La generación de las dos líneas celulares, bajo la influencia de la auxina 2,4-D a la misma concentración, en el mismo tipo de explantes y provenientes del mismo ejemplar adulto, probablemente se deba a que en el cultivo *in vitro*, durante la inducción de callo en las células vegetales se activan elementos transponibles que estimulan la inducción de enzimas y otros productos específicos en situaciones de estrés. Cuando se inicia la división celular a partir de tejidos diferenciados que darán origen a un callo, se incrementa el riesgo de inestabilidad cromosómica, pudiéndose generar considerables cambios en el fenotipo del tejido a consecuencia de una variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981; Freire-Seijo, 2006).

### Contenido de linalol y acetato de linalilo en órganos y cultivos celulares

Los aceites esenciales son mezclas complejas de terpenoides volátiles, los cuales son extraídos de manera tradicional por el método de arrastre de vapor permitiendo su separación al ser éstos compuestos inmiscibles en agua. Sin embargo, dife-

**Tabla 2.** Contenido de terpenoides en extractos de hojas, flores y líneas celulares de *L. angustifolia*.

Tr (min)	Contenido de terpenoides (mg g <sup>-1</sup> PF)								
	Extractos hexánicos				Extractos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>				
	Hoja	Flor	Líneas celulares		Hoja	Flor	Líneas celulares		
			GWCL	BCL			GWCL	BCL	
Linalol	5.03±0.07	33.38± 1.25 <sup>c</sup>	21.41±0.52 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	28.45±1.61 <sup>d</sup>	1.56±0.38 <sup>b</sup>	0.45±0.41 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	1.53±0.18 <sup>b</sup>
Acetato de linalilo	6.25±0.06	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	11.58±0.72 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	2.95±0.27 <sup>b</sup>

Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y de muestras inyectadas por triplicado ±SD. Valores con letras iguales, en renglones, no son significativamente diferentes al nivel del 5 %.

rentes métodos de extracción para compuestos volátiles han demostrado mejores rendimientos que el arrastre de vapor. Tal es el caso de la extracción líquido-líquido con solventes orgánicos no polares ya que los terpenoides son compuestos químicamente liposolubles (Sánchez-Palomo y col. 2009; Harbore, 1984). La extracción de los terpenoides, linalol y acetato de linalilo, fue eficiente empelando n-hexano como disolvente, tanto en las muestras de hoja y flor de la planta adulta como en la biomasa de la línea celular BCL, las cuales registraron significativamente mayores contenidos de linalol y del acetato de linalilo respecto a los contenidos detectados en los extractos con diclorometano (Tabla 2). En estos mismos extractos, la producción de linalilo en la línea celular BCL (28.45 mg g<sup>-1</sup> PF) fue significativamente menor a lo registrado en la hoja (33.38 mg g<sup>-1</sup> PF), pero significativamente mayor al contenido del terpenoide en la flor (21.41 mg g<sup>-1</sup> PF). Destacando la producción de acetato de linalilo en la línea celular BCL (11.58 mg g<sup>-1</sup> PF) y su nulo contenido en las muestras de hoja y flor. Por otro lado, en los extractos con diclorometano, el contenido de linalol en la línea celular y en la hoja no mostró diferencias significativas, pero fueron significativamente mayores los contenidos determinados en éstas muestras con respecto a los registrados en flor (Tabla 2). La producción de acetato de linalilo en

los extractos hexánicos de la línea celular BCL (11.58 mg g<sup>-1</sup> PF) fue significativamente mayor que lo detectado en los extractos con diclorometano de la misma línea celular BCL (2.95 mg g<sup>-1</sup> PF), siendo casi cuatro veces mayor su contenido con respecto a lo detectado en el extracto hexánico (Tabla 2). Sin embargo, en la línea celular GWCL no se detectó la presencia de ninguno de los dos terpenoides.

De la misma forma, el rendimiento de linalol, en los extractos hexánicos fue significativamente mayor a los determinados para los extractos con diclorometano. En hoja registró un rendimiento de 6.76 %, 4.28 % en flor y 5.69 % en la línea celular BCL. Mientras que los rendimientos determinados para las muestras de los extractos con diclorometano fueron para hoja de 0.3 %, 0.09 % en flor y 0.3 % en la línea celular BCL. Los rendimientos reportados, por extracción por arrastre de vapor, para aceites esenciales, varían del 0.5 al 2 %. Para lavanda se ha reportado un rendimiento del 0.9 % en hoja y 0.6 % en flor (Basch *et al.*, 2004). Los resultados del presente estudio concuerdan con lo reportado en la literatura. El aceite esencial de *L. angustifolia* se sintetiza y se almacena en mayor proporción entre la densa pilosidad de las hojas, donde se encuentran situadas una gran cantidad de tricomas; por ello la materia prima para extraer el aceite de *L. angustifolia* es el follaje de la planta y en

menor proporción se ocupan las flores, secas o frescas (Guitton *et al.*, 2010b).

Ante situaciones de estrés, el tejido vegetal recurre a la síntesis de linalol y acetato de linalilo, como mecanismo de defensa, ya que éstos metabolitos secundarios dentro de la planta funcionan en una variedad de contextos ecológicos: interacción planta-insecto, planta-patógeno y planta-planta (Pichersky y Gershenzon, 2002). Esto ha sido empleado en el cultivo de tejidos, existe una creciente evidencia de recurrir a la elicitación para optimizar la producción y acumulación de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* (Zhao *et al.*, 2005). La producción de terpenos *in vitro* ha sido mejorada utilizando inductores y factores de estrés, dada la conocida actividad antimicrobiana y antifúngica de estos compuestos (Burt, 2004); tal es el caso de *Lavandula vera*, en donde se obtuvieron sesquiterpenos, al emplear L-cisteína variando la fuente de nitrógeno (Nakajima *et al.*, 1989).

## CONCLUSIONES

Se establecieron dos líneas celulares de callo friable (GWCL y BCL) derivadas de cultivos de explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia*, en medio MS al 50% de su concentración suplementado con 6.79  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. La línea celular BCL retuvo la capacidad de sintetizar linalol y acetato de linalilo, registrando los extractos hexánicos significativamente mayores contenidos de los terpenoides que los extractos con diclorometano (23.45 y 11.58  $\text{mg g}^{-1}$  PF; 1.53 y 2.95  $\text{mg g}^{-1}$  PF, respectivamente). Siendo significativamente mayor el contenido de linalol en la línea celular que en la flor y menor a lo registrado en la hoja. Destacando la síntesis del acetato de linalilo en la línea celular BCL, registrando hasta 11.58  $\text{mg g}^{-1}$  PF, mientras que en las muestras de flor y hoja no fue detectado. Demostrando que el CTV es una alternativa para la producción de los componentes principales del aceite esencial de *L. angustifolia*

---

## REFERENCIAS

- Andrade, L.B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G.F., Rota, L. (1999) The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **56**: 79-83
- Basch, E., Foppa, I., Liebowitz, R., Nelson, J., Smith, M., Sollars, D., Ulbricht C. (2004) Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller). *Journal of Herbal Pharmacotherapy* **4**: 63-78
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**: 223-253
- Campanoni, P., Nick. P. (2005) Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology* **137**: 939-948
- Casabianca, H., Graff, J.B., Faugier, V., Fleig, F., Grenier C. (1997) Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate. A powerful tool for authenticity control of essential oils. *Journal of High Resolution Chromatography* **21**: 107-112
- Cavanagh, H.M.A., Wilkinson J.M. (2002) Biological activities of Lavender essential oil. *Phytotherapy Research* **16**: 301-308
- Cong, Y., Abuliziz, P., Zhi, L., Wang, X., Mirenska (2008) Chemical composition of the essential oil of *Lavandula angustifolia* from Xinjiang, China. *Chemistry of Natural Compounds* **44**: 810
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., Guern J. (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* **198**: 532-541

- Freire-Seijo, M., Kosky, R.G., Herrera Ofarril, I., Reyes M. (2006) Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de caña de azúcar a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* **6**: 51–57
- Gattefossé, R.M. (1993) Aromatherapy: Translated from Original 1937 French Text. R.B. Tisserand (Ed.). Saffron Walden: C.W. Daniel Co.
- Georgiev, M.I., Weber, J., Maciuk, A. (2009) Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**: 809–823
- Guitton, Y., Nicolè, F., Moja, S., Benabdelkader, T., Valot, N., Legrand, S., Jullien, F., Legendre, L. (2010a) Lavender inflorescence: A model to study regulation of terpenes synthesis. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 749–751.
- Guitton, Y., Nicolè, F., Moja, S., Valot, N., Legrand, S., Jullien, F., Legendre L. (2010b) Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development. *Physiologia Plantarum* **138**: 150–163
- Harborne, J.B., Williams C.A. (2002) Phytochemistry of the genus *Lavandula*. In: M Lis-Balchim (Ed.) Lavender. Taylor & Francis, USA pp. 86–99
- Harborne, J.B. (1984) Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. 2<sup>a</sup> ed., Chapman & Hall, London, Great Britain.
- Javidnia, K., Miri, R., Kamalinejad, M., Nasiri A. (2002) Composition of the essential oil of *Salvia mirzayanii* Rech. F. & Esfan from Iran. *Flavor and Fragrance Journal* **17**: 465–467
- Lange, D. (2006). International trade in medicinal and aromatic plants. Medicinal and aromatic plants. Agricultural, commercial, ecological, legal, pharmacological and social aspects. Bogers, R., Craker, L, Lange, D. (Eds.). Springer, USA pp. 309
- Larkin, P.J., Scowcroft W.R. (1981) Somaclonal variation a novel source of variability from cells cultures from plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* **60**: 197–214
- Lewinshon, E., Schalechet, F., Wilkinson, J., Matsui, K., Tadmor, Y., Nam, K.H., Amar, O., Lastochkin, E., Larkov, O., Ravid, U., Hiatt, W., Gepstein, S., Pichersky E. (2001) Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiology* **127**: 1256–1265
- Medina, R., Faloci, M., Gonzalez, A., Mroginski L.A. (2007) *In vitro* cultured primary roots derived from stem segments of cassava (*Manihot esculenta*) can behave like storage organs. *Annals of Botany* **99**: 409–423
- Muñoz de Malajovich, M. A. (2006) Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmes. Argentina. pp. 47–52
- Murashige, T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**:473–497
- Nakajima, H., Sonomoto, K., Sato, F., Ichimura, K., Yamada, Y., Tanaka A. (1989) Enhancement of pigment productivity of immobilized cultured *Lavandula vera* cells by limitation of nitrogen sources. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **67**: 306–308
- Peana, A.T., D'Aquila, P.S. Panin, F., Serra, G., Moretti M.D. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* **9**: 721–726
- Petriska, I., Polásek, M., Sladkovský R. (2006) Assay of terpene alcohols in pharmacopoeial essential oils by micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC). *Pharmazie* **61**: 989–993
- Pichersky, E., Gershenzon J. (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 237–243
- Raguso, R.A., Pichersky E. (1995) Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Systematics and Evolution* **194**: 55–67

- Sánchez-Palomo, E., Alañón, M.E., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A., Pérez-Coello, M.S. (2009) Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice. *Talanta* **79**: 871-876
- Wang, X., Jin, L., Li, M., Zhao, M., Zhao, H., Xu, Y. (2007) Bioreactor culture and plant regeneration from cell clusters of the aromatic plant *Lavandula angustifolia* "Munstead". *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **82**: 781-785
- Went, F.W., Thimann K.V. (1937) Phytohormones. The Macmillan Company New York: USA pp. 294
- Xiu-juan, S., Chen, Q., Ma, L., Yao, L., Ning, Y., Tao, H., Gulidasidan, Qu Y. (2006) Plant regeneration from leaf in *Lavandula angustifolia*. *Journal of Xinjiang Agricultural University* **29**: 22-25
- Xu, Y.Z., Wang, X.J., Zhao, M.A., Zhao, H.Q. (2005) Effects of several biological factors on the growth of embryogenic callus suspension culture of *Lavandula angustifolia*, cv. Munstead. *Letters in Biotechnology* **16**: 34-36
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* **23**: 283-333