

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología



Casa abierta al tiempo

Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Lavandula angustifolia* Miller

TESIS

Para obtener el grado de
Especialista en Biotecnología

PRESENTA

Edson Missael Flores García

Director:

Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesor:

Dr. Eristeo García Márquez

Lector:

Dr. Antonio Bemabé Antonio

México D.F Junio 2013

6 de Junio de 2013

El Jurado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación idónea de los resultados

“Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Lavandula angustifolia* Miller”

Que presentó:

Edson Missael Flores García

Co-dirección:

Dr. Francisco Cruz Sosa



Dr. Eristeo García Márquez



Lector:

Dr. Antonio Bernabé Antonio



DEDICATORIA

Gracias, es una palabra tan pequeña pero con un gran significado...y que, en estos tiempos, no se pronuncia tan a menudo como se debería. Gracias a Dios por darme esa fuerza y paciencia para seguir cumpliendo cada uno de los objetivos de mi vida.

A mis papás Olivia García Torres y Timoteo Flores Morales, que no solo estuvieron de espectadores en esta tesis, si no que estuvieron realizándola conmigo. A ti mamá que dejaste sembrado en mí, la semilla de la superación, mediante tu amor y cariño, porque no hay forma de agradecerte todo lo que me diste... tus consejos, tu confianza, pero sobre todo tu ejemplo. Gracias mamá. Papá Gracias por tu ejemplo, por enseñarme que en la vida lo único que cuenta es seguir adelante y seguir con valentía. Por todo tu cariño, comprensión y sobre todo tu alegría. Por ser un gran ejemplo a seguir y apoyarme siempre, sin importar cuan absurdo fuera y sobre todo por ser mi papá. Te quiero mucho.

A mi Hermano Mario Jesús Flores García que con tu entusiasmo y esa alegría que te caracteriza, seguro que vamos a salir adelante. Quizá pertenecemos a una generación en dónde las circunstancias son difíciles, pero lo importante no es desmoralizarnos, salir con perseverancia, constancia, firmeza y tenacidad, primeramente Dios.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones, es un gran privilegio pertenecer a esta institución.

Al **Dr. Francisco Cruz Sosa** por su apoyo en todo momento, su dedicación y su gran paciencia al guiarme en todo el desarrollo de la tesis. Doctor, es un honor y un gran privilegio trabajar con usted.

Al **Dr. Antonio Bernabé Antonio** por todo el apoyo incondicional que me ha brindado durante cada etapa de la investigación. Gracias por otorgarme tu valiosa paciencia.

A la **Dra. Keiko Shirai Matsumoto** y al **M en B. José Jiro Matsumoto Soule** por brindarme la oportunidad de conocer éste bonito posgrado en Biotecnología. De todo corazón, ¡muchas gracias!

Al **Dr. Gerardo Figueroa Lucero** por su tiempo, apoyo y dedicación. Gracias por las palabras de ánimos antes y durante los estudios de posgrado, fueron de mucha ayuda para aprender y madurar personalmente.

A la **M en B. Laura Georgina Núñez García** por su bonita amistad y sus excelentes e insuperables palabras de aliento y superación, sin duda esenciales para la culminación de ésta Tesis.

A la **Dra. Irene Barriga Sosa** que es una maravillosa investigadora, sin lugar a dudas es un ejemplo de entrega, lucha y perseverancia, un ejemplo a seguir.

Al laboratorio R-003 "Biotecnología Vegetal" por brindarme el espacio y los instrumentos para obtener resultados en mi tesis. Gracias a mis compañeros y amigos que coincidimos en el laboratorio, Bere, Hipatya, Alexa, Mireya, Amalia, Aurelio, Gustavo.

A mis amigos de la PexPA realmente siento un gran aprecio por ustedes Vic, Ale, Amalia, Gaby, Belén, Dany, Laris, Karina, Isabel, Yessica, Erick, Omarcito..., échenle muchas ganas para que en un futuro no muy lejano seamos profesionistas e investigadores que contribuyamos a satisfacer las necesidades y mejorar las expectativas de nuestro país.

A todas las personas que intervinieron de algún modo en esta realización de investigación....

¡Muchas gracias!

Resumen

Lavandula angustifolia es una planta originaria de Europa, pertenece a la familia de las Lamiaceas, produce una gran variedad de Metabolitos secundarios que tienen usos en la industria cosmética, farmacéutica e incluso últimamente en la apícola precisamente por sus aceites esenciales. Sin embargo se encuentra a merced de eventos climáticos, así como de algunas plagas y enfermedades que afectan severamente los cultivos a cielo abierto. Por otro lado, el cultivo de células en suspensión se ha convertido en una herramienta biotecnológica y sustentable para la preservación de especies, producción a gran escala de plantas de interés comercial y de Metabolitos.

En este trabajo se estudió el establecimiento de cultivo de células en suspensión de *L. angustifolia*, primeramente se recolectó la planta en la zona chinampera de Xochimilco, se aclimató a las condiciones de la UAM-I, de ella se extrajeron explantes foliares jóvenes y se cultivaron asépticamente en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), suplementado con una auxina sintética (2,4-D) a una concentración de 6.79 μM para inducir la formación de callo. Los callos friables se colocaron en matraces con medio MS y con la misma concentración de 2,4-D, hasta que se obtuvo la homogenización y línea celular de cultivos en suspensión; muestras de hoja, de callo y de suspensión fueron analizadas por cromatografía de capa fina (TLC).

Se obtuvieron dos fenotipos de callo con un rendimiento de inducción del 95.22% (callo café claro y callo amarillento claro) a partir de los explantes foliares de *L. angustifolia* tratados con 2,4-D 6.79 μM ; el callo formado por el explante en un inicio es de color blanco grisáceo y posteriormente fracciones de este callo se tornan color café claro, de ahí que de la misma línea celular se deriven dos fenotipos diferentes. La línea de callo amarillento claro no presentó oxidación y es friable motivo por el cual se seleccionó para establecer el cultivo en suspensión. El análisis por TLC de los extractos del callo café claro, callo amarillento claro y cultivo en suspensión muestran la presencia de compuestos que tienen un $R_f = 0.26$ similar entre sí mismos pero diferente al del linalol $R_f = 0.53$, sin embargo en los cultivos en suspensión se observa también mayor presencia de otros compuestos comparados con extractos de hoja y de callo.

Abstract

Lavandula angustifolia is a plant native to Europe, belongs to the family of Lamiaceae, produces a variety of secondary metabolites that have uses in the cosmetics, pharmaceutical and even recently in the beekeeping precisely because its essential oils. However, it is at the mercy of weather events, as well as some pests and diseases affecting crops severely open. Moreover, the suspension cell culture has become a tool for biotechnology and sustainable species preservation, large scale production of commercially important plants and metabolites.

In this study, the establishment of cell suspension culture of *L. angustifolia*, first plant was collected in the chinampas of Xochimilco, acclimated to the conditions of the UAM-I, from her young leaf explants were removed and cultured aseptically on Murashige and Skoog (MS) supplemented with a synthetic auxin (2,4-D) at a concentration of 6.79 mM to induce callus formation. Friable callus were placed on MS medium flasks with the same concentration of 2,4-D, until the homogenization was obtained cell line and suspension cultures, leaf samples of callus and suspension were analyzed by thin layer chromatography (TLC).

Two phenotypes were obtained with a yield of callus induction of 95.22% (callus callus yellowish light brown and clear) from leaf explants of *L. angustifolia* treated with 6.79 mM 2,4-D, the callus formed by the explant is initially grayish white and fractions of this callus subsequently become light brown, hence the same cell line

derived two different phenotypes . The clear yellow callus line and is not displayed oxidation friable why was selected to set the suspension culture. TLC analysis of extracts of callus light brown, light yellow callus and suspension culture showed the presence of compounds having an $R_f = 0.26$ similar among themselves but different from linalool $R_f = 0.53$, though in suspension cultures also observed increased presence of other compounds compared with extracts of leaf and callus.

Índice General

Índice de figuras	i
Índice de cuadros	ii
Resumen	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. Generalidades de <i>Lavandula angustifolia</i> Miller	2
2.2. Aceites esenciales	4
2.2.1. Importancia	8
2.2.2. Composición química	9
2.3. Composición química del aceite de <i>L. angustifolia</i>	10
2.4. Calidad del aceite esencial de <i>L. angustifolia</i>	12
2.5. Metabolitos secundarios	13
2.5.1. Terpenoides	15
2.5.2. Compuestos fenólicos	16
2.5.3. Compuestos nitrogenados y alcaloides	17
2.6. Cultivo de tejidos vegetales	18
2.7. Reguladores de crecimiento vegetal	20
2.7.1. Citoquininas	21
2.7.2. Auxinas	21
2.8. Calogénesis y medio de cultivo en suspensión	22
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVOS	28
5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos particulares	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1. Material Vegetal	29
6.2. Condiciones asépticas	29
6.3. Medio de cultivo y condiciones de incubación	31
6.4. Inducción de callo	32
6.5. Cultivo en medio líquido	32
6.6. Cultivo de células en suspensión	33
6.7. Preparación de extractos y análisis por TLC	33
VII. RESULTADOS	35
7.1. Inducción de callo y cultivos de células en suspensión	35

7.2. Análisis de los extractos por cromatografía de capa fina (TLC)	37
VIII. CONCLUSIONES	40
IX. PERSPECTIVAS	41
X. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Lavandula angustifolia</i> Miller	3
Figura 2. Tricomas glandulares que sirven de almacenamiento a los compuestos volátiles de las plantas	5
Figura 3. Estructura del isopreno	15
Figura 4. Estructura química del Linalol y Acetato de Linalol	15
Figura 5. Estructura química del ácido cinámico	17
Figura 6. Características fenotípicas de callo (<i>Nicotiana tabacum</i>)	23
Figura 7. Origen de los cultivos de células en suspensión	24
Figura 8. Clasificación de los Metabolitos Secundarios y Cultivo de Tejidos Vegetales	26
Figura 9. Proceso experimental para el establecimiento de cultivos de células en suspensión de <i>L. angustifolia</i>	28
Figura 10. Ejemplar de una planta de <i>L. angustifolia</i>	29
Figura 11. Condiciones asépticas de siembra en una campana de flujo laminar	30
Figura 12. Incubación de explantes foliares de <i>L. angustifolia</i> en medio MS	31
Figura 13. Concentración de muestras a través de Rotavapor (Buchi RE-111; BuchiLaboratoriums-Tecnick AG, Flawil, Switzerland)	34
Fig. 14. Características fenotípicas de las líneas celulares de <i>L. angustifolia</i> , A) Callo café claro, B) amarillento claro y C) Células en suspensión de callo amarillento claro	36
Fig. 15. Cromatoplasmas de los extractos de callo y de las células en suspensión. (A) Extracción a T.A. de <i>L. angustifolia</i> (B) Extracción a 65°C de <i>L. angustifolia</i> . R= Estándar de Linalol, H=Hoja, C=Callo, Cc=Callo café claro, Cb=Callo amarillento claro y S=Células en suspensión. Muestras de 1.0 g de peso seco	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Lavandula angustifolia</i> Miller	2
Cuadro 2. Composición de los principales aceites esenciales	7
Cuadro 3. Principales compuestos de los aceites esenciales	10
Cuadro 4. Compuestos identificados en aceite esencial de lavanda, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa	10
Cuadro 5. Compuestos identificados en aroma de aceite esencial de lavanda mediante GC/MS	12
Cuadro 6. Porcentaje de algunos componentes de un aceite esencial de lavanda de calidad	

I. Introducción

Las plantas son fuente de una amplia variedad de metabolitos secundarios que son utilizados como fármacos, pesticidas, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros. Comúnmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o cultivadas. Su acumulación en las plantas es baja (menos del 1%), y ocurre en células, órganos y tejidos específicos, y bajo condiciones de estrés (Verpoorte *et al.*, 2002). En el caso de plantas silvestres, su explotación comercial está basada en la recolección de material en su hábitat natural, frecuentemente incluyendo la raíz, lo que ha provocado que muchas estén amenazadas o en peligro de extinción.

El cultivo masivo de células vegetales se ha propuesto como una alternativa biotecnológica para el desarrollo de sistemas de producción de Metabolitos secundarios (Sharp y Doran, 2001). Sin embargo, después de más de 40 años de investigación y desarrollo tecnológico, los casos exitosos que justifican técnica y económicamente su operación a nivel comercial son limitados, pudiéndose citar entre ellos la producción de shikonina por células de *Lithospermum erythrorhizon* y de Taxol por células de *Taxus spp.* (Zhao *et al.*, 2005).

El cultivo de células y tejidos vegetales se basa en el principio de totipotencia celular, que establece que a partir de cualquier célula de una planta es posible regenerar un individuo completo. Mediante esta herramienta, es posible obtener cultivos de células no diferenciadas, como callos y suspensiones celulares, además de cultivos de órganos como brotes y raíces. Los sistemas que operan a nivel comercial usan principalmente cultivos de células en suspensión (Zhao *et al.*, 2005). Por lo cual, El objetivo del presente trabajo fue el establecimiento de células en suspensión de *Lavandula angustifolia* y determinar la presencia de Linalol en dichos cultivos.

II. Revisión de literatura

2.1. Generalidades de *Lavandula angustifolia* Miller

La lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.) pertenece a la familia de las Lamiaceae (*Labiatae*). Son plantas herbáceas anuales o perennes, matas o arbustos, de hojas opuestas, flores hermafroditas y fruto compuesto de cuatro núculas o aquenios (tetraquenio). Además esta familia agrupa plantas aromáticas y medicinales muy conocidas como el orégano (*Origanum vulgare* L.), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), albahaca (*Ocimum basilicum* L.), melisa (*Melisa officinalis* L.), menta (*Menta piperita* L.) y la salvia (*Salvia officinalis* L.) (Chu y Kemper, 2001).

El nombre *Lavandula* proviene del latín: *lavare*, aludiendo al uso de sus flores en el agua de baño de la Roma antigua, tiene sus orígenes en Europa meridional y norte de África. (Cavanagh y Wilkinson, 2002).

En el cuadro 1 se aprecia la clasificación taxonómica de *Lavandula angustifolia* Miller

. Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Lavandula angustifolia* Miller

Clasificación Taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Nepetoideae
Tribu	Lavanduleae
Género	<i>Lavandula</i>
Especie	<i>angustifolia</i>



Figura 1. Morfología de *L. angustifolia*. Miller

Lavandula angustifolia Miller (LaM) tiene usos de tipo sedante, diurético, hipotensor, antiséptico, cicatrizante, antireumático y antiinflamatorio (Chemat *et al.*, 2006; Cong *et al.*, 2008).

Davis y Camper (2001), mencionan que la parte útil de la planta la constituyen sus flores, de tamaño pequeño, intenso color azul, agrupadas en racimos fuertemente aromáticos, estas contienen un aceite volátil que puede ser extraído mediante destilación por arrastre de vapor.

Para iniciar la floración las plantas de lavanda requieren unos 70 a 80 días con temperaturas diarias entre 14 y 15° C, con temperaturas altas, sobre todo en la fase de floración ya que esto aumenta el contenido de aceite esencial en las flores (Fuentealba, 1999). Además, son fundamentales los vientos suaves en floración

dado que favorecen la calidad de éste, debido a que ayudan a la evaporación de compuestos volátiles como hidrocarburos terpénicos que bajan la calidad (López *et al.*,1997).

La lavanda presenta dos floraciones, siendo la segunda equivalente al 15-25% de la producción total; es importante cosechar esas inflorescencias para que la planta no pierda energía en la producción de semillas (Portilla,2002).En cuanto al rendimiento Cabau (2003), señala que en un cultivo el promedio por ha es de 15 a 25 L de aceite esencial de lavanda, con un rendimiento de 2000 a 3000 kg de flores por ha, lo que no concuerda por lo expresado por otros autores como López *et al.*, (1997), quienes señalan un rendimiento de 2000 a 4000 kg de flores por ha, con una cantidad de aceite fluctuante entre 2.3% y 2.6% y Fuentealba (1999), menciona que es posible obtener alrededor de 8000 kg de flores por ha con un rendimiento de 1.5% de aceite esencial.

El estudio de Lavanda es un tema de interés, por los componentes de sus aceites esenciales, sólo por mencionar los principales se encuentran el linalol, acetato de linalol, geraniol, borneol, nerol, pineno (Cavanagh y Wilkinson, 2002).

2.2.Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos volátiles, cristalinos, raramente coloreados, solubles en lípidos y en solventes orgánicos, y presentan densidades menores a la del agua. Pueden ser sintetizados (dependiendo de la planta) en varios órganos de

las plantas tales como: brotes, flores, hojas, tallos, semillas, frutos, raíces y cortezas. Su almacenamiento se produce dentro de glándulas secretoras, cavidades, células epidérmicas o tricomas glandulares. (Angioni et al. 2006). Figura 2.

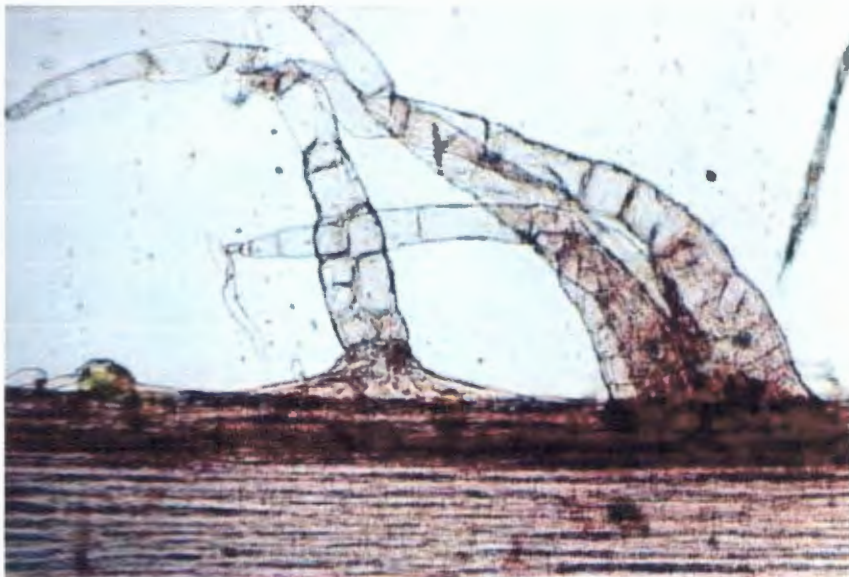


Figura 2. Tricomas glandulares que sirven de almacenamiento a los compuestos volátiles de las plantas.

Los aceites esenciales son obtenidos de plantas aromáticas mediante la fracción arrastrada por vapor de agua en la destilación y que a temperatura ambiente se encuentran en estado líquido. Existen cerca de 17500 especies aromáticas pertenecientes a las plantas superiores (Bruneton 1999).

Los géneros de donde proceden la mayoría de los componentes que forman parte de los aceites esenciales pertenecen a las familias de las Myrtaceae, Lauraceae, Compositae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae,

Zingiberaceae, Piperaceae, Verbenaceae, Anacardiaceae y Chenopodiaceae. Se caracterizan por tener olores intensos y su producción dentro de la planta como metabolitos secundarios ha sido seleccionada como defensa producto de la presión ejercida por los insectos fitófagos y herbívoros. Así de esta coevolución planta-hospedador, la liberación de compuestos que alteran el comportamiento de los insectos (alimentación, cópula, atracción hacia polinizadores, repelencia) ha tenido un rol principal en la síntesis y modificación de los mencionados compuestos (Ryan & Byrne 1988).

El proceso de coevolución ha sido propuesto como el principal factor responsable de promover la diversidad de compuestos químicos en las plantas, ya que los efectos selectivos continuos del ataque de los herbívoros y por otra parte de la defensa de las plantas han sido responsables del aumento en la elaboración y proliferación de los compuestos secundarios de las plantas y de los mecanismos detoxificantes de los insectos (Becerra 2007).

Existen varios métodos de extracción de los aceites esenciales, los cuales pueden incluir el uso de dióxido de carbono líquido, pero principalmente se produce por la destilación a baja o alta presión de agua en estado de ebullición o por aire caliente. Es por eso que el perfil químico de los productos de aceites esenciales difiere no solo en el número de moléculas sino también en el tipo de estereoquímica de las mismas. La presencia o no de determinadas moléculas va a estar afectado por el tipo de extracción, la cual a vez dependerá del propósito de uso del producto en cuestión. El

producto de extracción puede variar en cantidad, calidad de acuerdo al clima, composición del suelo, órgano de la planta, fenología y ciclo vegetativo (Angioni et al. 2006). Por lo tanto, de manera de obtener una composición constante del aceite esencial, se tiene que tener presente que la extracción se debe realizar de manera tal que las condiciones originales se mantengan lo más constantes a lo largo de todo el estudio. Es decir, la extracción debe hacerse del mismo órgano de la planta que ha sido crecido sobre el mismo tipo de suelo, bajo el mismo clima y la colecta realizarse durante la misma estación.

Cuadro 2. Composición de los principales aceites esenciales (Trease and Evans, 1984)

Nombre común	Descripción botánica	Compuesto
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalol (65-80% alcoholes); terpenos
Rosa	<i>Rosa spp.</i>	Geraniol, citronelol (70-75% alcoholes; ésteres
Geranio	<i>Pelargonium spp.</i>	Geraniol, citronelol; ésteres
Lavanda	<i>Lavandula intermedia</i>	Linalol; acetato de linalol; cineol
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Borneol y linalol (10-18%) terpenos
Menta	<i>Mentha piperita</i>	Mentol (45%), acetato de mentilo (4-9%)
Canela	<i>Cinnamomum cassia</i>	Aldehído cinámico (80%)
Eucalipto	<i>Eucalyptus citroodora</i>	Citronelal (70%)
Limón	<i>Citrus limon</i>	Citral (3.5%), limoneno (90%)

El efecto de la madurez de la planta en el tiempo de producción del aceite y de la existencia de diferencias quimiotípicas pueden afectar considerablemente la composición, indicando que las condiciones ecológicas y/o los estados fisiológicos pueden interferir con la presencia de componentes biológicamente activos en la planta. La mayoría de los aceites esenciales comercializados son caracterizados químicamente mediante el análisis de cromatografía gaseosa y espectrometría de masa. Hasta el presente, existen aproximadamente 3000 aceites esenciales conocidos, 300 de los cuales poseen importancia económica para las industrias cosméticas, de perfumes, farmacéutica, agronómica, alimenticia y sanitaria (Bakkali et al. 2008). Los aceites esenciales o sus productos son usados en perfumes, productos cosméticos, sanitarios, en la agricultura en productos odontológicos, saborizantes de alimentos, aditivos alimentarios y como remedios naturales (Tisserand & Balacs 1995).

2.2.1.Importancia

Montes *et al.*, (1992) y Cairo (2003), coinciden en que se desconoce la función exacta de un aceite esencial en un vegetal; entre ellas puede ser para atraer los insectos para la polinización, para repeler insectos nocivos, o puede ser simplemente un producto metabólico intermedio.

A nivel mundial el uso de los aceites esenciales es amplio y diversificado. Además, de su uso conocido en perfumería y cosmética, tiene un amplio campo de aplicación en otras industrias como materia prima básica en saborizantes y aromatizantes de

alimentos, detergentes, bebidas, cigarrillos, entre muchos otras (Fuentealba 1999, Ortega *et. al.* 2001 y Cairo 2003).

La producción mundial de aceites esenciales es de aproximadamente 50.000 Tm anuales, de las cuales el 90 % se concentra en 14 productos, con no menos de 500 Tm cada uno, encontrándose entre estas la esencia de lavanda (Fundación para la innovación agraria, 2003).

También tienen importancia en Medicina y en la apicultura, tanto por su sabor como por su efecto calmante del dolor y su valor fisiológico; lo que es también señalado por (Fuentealba 1999 y Cairo 2003) como aromaterapia.

Se conocen alrededor de 3000 tipos de aceites esenciales, pero sólo 300 tienen importancia comercial y que la demanda de composiciones aromáticas ha crecido en el sector agroindustrial a razón de un 10% anual desde 1960, sus principales destinos son las industrias de bebidas, las lácteas, las de golosinas, de cosméticos y sabores. (Ricciardi, 2003).

2.2.2. Composición química

La composición química de los aceites esenciales consiste de una mezcla compleja de varios componentes (en general de entre 10-60) en diferentes concentraciones. En general se puede mencionar que están caracterizados por dos o tres componentes en alta concentración (20-70%) y por los demás componentes presentes en cantidades denominadas de traza (<1%). En muchos de los casos son

estos componentes principales quienes determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales. Los componentes incluyen a dos grupos de origen biosintético diferente (Pichersky et al. 2006). El grupo principal está compuesto de terpenos y terpenoides, y el otro por constituyentes aromáticos y alifáticos; todos caracterizados por un bajo peso molecular.

Cuadro 3. Principales compuestos de los aceites esenciales.

Grupo químico	Ejemplo
Esteres	Principalmente de ácido benzoico, acético, salicílico.
Alcoholes	Linalol, geraniol, citronelol, terpinol, mentol, borneol.
Aldehídos	Citral, citronelal, benzaldehído, aldehído cumínico.
Fenoles	Eugenol, timol, carvacrol.
Cetonas	Carvona, mentona, pulegona, fenchona, alcanfor, cetona.
Lactonas	Cumarina.
Terpenos	Canfeno, pineno, limoneno, felandreno, cedreno.
Hidrocarburos	Cimeno, estireno (feniletileno).

Fuente. Adaptado de Cairo (2003)

2.3.Composición química del aceite de *L. angustifolia*

Entre los componentes más importantes del aceite esencial de lavanda se encuentran: α -pineno, β -pineno, limoneno, 3-octanol, linalol, acetato de linalilo, 1-borneol, lavandulol, y acetato de lavandulilo. Esto concuerda con lo señalado por Banthorpe *et al.*, (1995), Guillen *et al.*, (1996), Chu y Kemper, (2001) y Barocelli *et al.*, (2004). Sin embargo, el contenido de sus componentes es muy variable, dependiendo éste de muchos factores tales como la especie, manejo del cultivo y condiciones atmosféricas (Shellie *et al.*, 2002).

CUADRO 4. Compuestos identificados en aceite esencial de lavanda, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa.

Compuesto	Porcentaje	Compuesto	Porcentaje
Triciclono	0.05	Terpinen-4-ol	0.19
α - Thujeno	0.02	Epoxi - linalol	0.07
α -Pineno	1.11	α -Terpineol	0.79
Campheno	0.56	Verbenona	0.12
Sabineno	0.47	Hexil 2-metil - propanoato	0.15
β -Pineno	1.48	Hexil butyrato	0.37
β -Mirceno	0.15	Hexenil butyrato	0.05
α -Terpineno	0.33	Hexil pentanoato	0.19
α -Terpinoleno	0.69	Acetato de linalilo	0.1
1,8 Cineol	31.31	Neril acetato	0.02
cis- Hidrato de Sabineno	0.61	Hexil hexanoato	0.03
cis - Linalol óxido	0.77	Linalil butirato	0.03
trans- Linalol óxido	0.05	Bergamoteno	0.13
Linalol	36.94	α -Humuleno	0.03
Canfor	13.6	β -Bisaboleno	0.24
Pino- Canfeno	0.04	α -Bisalolol	0.23
endo - Borneol	1.13	Farnesol	0.03

Fuente: Guillen *et al.*, (1996).

Un estudio realizado en Londres utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC/MS) inyectando estándares para su comparación, destinados a medir la acumulación de terpenoides en células de lavanda logró identificar 10 compuestos: linalol, acetato de linalilo, acetato de lavandulilo, borneol, α - terpineol, ocimeno, nerol, limoneno, cariofileno y 1,8 cineol (Banthorpe *et al.*, 1995).

Guillen *et al.*, (1996), caracterizaron en el norte de España el aceite esencial de lavanda, identificando 57 compuestos mediante GC/MS (Cuadro 4), utilizando para ello sólo la librería que poseía el equipo. Utilizando la misma técnica Barocelli *et al.*,(2004), caracterizaron un total de 24 compuestos en aceite esencial de lavanda

proveniente de Italia. Mediante esta técnica cada compuesto es posible identificarlo en la librería del equipo debido a que posee líneas de fragmentación del ion molecular característicos (Virginia Polytechnic Institute and State University, 2004).

En otro estudio se realizó una comparación de diferentes métodos de extracción de fragancias en lavanda para ser analizadas mediante GC/MS, utilizando estándares y las librerías NIST y Wiley, lograron identificar un total de 43 componentes (Cuadro 5) presentes en el aroma de lavanda (Kim y Lee, 2002).

CUADRO 5. Compuestos identificados en el aceite esencial de lavanda mediante GC/MS.

Compuestos identificados	
Etil benceno	Lavandulol
m-Xileno	Borneol
o-Xileno	α -Terpinen -4-ol
Thujeno	p-Cimeno-8-ol
α -Pineno	α -Terpineol
β -Pineno	Linalil acetato
β -Mirceno	Bornil acetato
α -Terpineno	Terpineol acetato
m-Cimeno	Geranil acetato
p-Cimeno	Cariofileno
Limoneno	Cumarina
Cineol	Farneseno
γ -Terpineno	γ -Cadineno
Linalil óxido	Calameneno
Fenchona	Cariofileno óxido
Linalol	7-Metoxi cumarina
Canfor	Carvona

Fuente: Kim y Lee (2002).

2.4. Calidad del aceite esencial de *L. angustifolia*

La Norma Internacional que regula la cantidad de cada uno de los mayores componentes del aceite esencial de lavanda, para que sea de buena calidad es la norma ISO N° 3515:2002, (International Organization for Standardization, 2002). Entre algunos de los componentes que regula la norma se encuentran los porcentajes de: alcanfor, acetato de linalilo, acetato de lavandulilo, Cis- β -ocimeno, Trans- β -ocimeno, 1,8 cineol; terpineno - 4-ol; linalol y limoneno como se observan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Porcentaje de algunos componentes del aceite esencial de lavanda de calidad.

Componente	Rango % (Norma ISO 3515)
Limoneno	Máximo 0.50
1,8 Cineol	Máximo 1.50
Cis- β - Ocimeno	de 4 - 10
Trans- β -Ocimeno	de 2 - 6
Alcanfor	Máximo 0.50
Borneol	No indica rango
Terpinen-4-ol	de 2 - 6
Lavandulol	Mínimo 0.30
Linalol	25-38
Acetato de Linalilo	25-45
Acetato de Lavandulilo	Mínimo 2.0

Fuente: International Organization for Standardization, 2002

La calidad de un aceite esencial se define por su composición química, sus propiedades físico-químicas, sus características aromáticas olfativas y su pureza. Además agrega que entre los factores externos que pueden afectar la calidad de los aceites se incluyen el clima, suelo, plagas, enfermedades, malezas, condiciones técnicas del cultivo, su cosecha o manejo de postcosecha; como factores internos,

pueden influir en su composición y calidad del aceite esencial: las variedades del cultivo, la etapa de desarrollo de la planta y la parte del vegetal que se utilice (Tsuru *et al.*,2001).

2.5.Metabolitos secundarios

Las plantas presentan diferentes vías metabólicas, no existentes en los animales, por las cuales se producen grandes cantidades de compuestos químicos que en principio no representan un rol específico o esencial en la planta (Bakkali *et al.*, 2008) Al conjunto de estas vías metabólicas se les conoce como metabolismo secundario.

Los metabolitos secundarios de las plantas son aquellos compuestos químicos sintetizados por éstas que cumplen funciones no esenciales en ellas y donde su ausencia no entraña un riesgo para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario. Estos metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. (Lahlou, 2004)

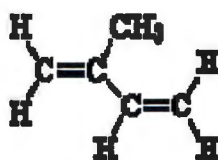
Además, a diferencia de los metabolitos primarios, estos metabolitos tienen una distribución restringida a veces a solo una especie o un grupo de ellas. La principal función de algunos de estos metabolitos se cree que es la protección contra el ataque de predadores y patógenos, asimismo actuando como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), aunque otros también actúan como atrayentes de insectos para la polinización y dispersión del fruto y de la

semilla. Sin embargo muchas de las funciones de los metabolitos secundarios aún son desconocidas (Namdeo, 2007).

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, terpenoides, compuestos fenólicos y alcaloides, en base a sus orígenes biosintéticos (Riedel *et al.*, 2010).

2.5.1. Terpenoides

Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario (Lehninger, 1995) como los más de 25.000 metabolitos secundarios, están contruidos por unidades múltiples del hidrocarburo de cinco átomos de carbono *isopreno* (2-metil-1,3-butadieno).



isopreno

Figura 3. Estructura del isopreno

El linalol es un terpeno cuya fórmula molecular es $C_{10}H_{18}O$, posee sinonimias tales como β -linalol, alcohol linalílico, óxido de linaloil, p-linalol, allo-ocimenol y 2,6-dimetil-2,7-octadien-6-ol.

El acetato de linalol es el éster de linalol. Su fórmula molecular es $C_{12}H_{20}O_2$, sus sinonimias son 3,7-acetato de dimetilocta-1,6-dien-3-il, o simplemente como bergamiol y bergamol. Al acetato de linalol se le atribuyen varias actividades

biológicas como la antiinflamatoria (Peana *et al.*, 2002). En Figura 4 se observan las diferencias de estructura química entre el Linalool y Acetato de Linalool

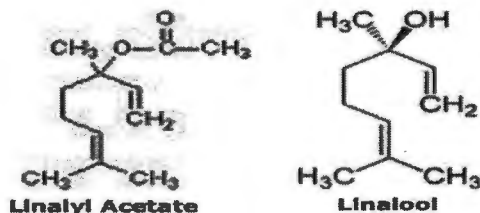


Figura 4. Estructura química del Linalool y Acetato de Linalool

El linalol es un valioso intermediario generalmente usado como ingrediente de fragancias y saborizantes. Su campo de aplicación puede variar según el grado de pureza. Así, acetato de linalilo de alta calidad (pureza >99% en peso) es ampliamente usado en perfumería y cosmética por su agradable aroma a bergamota fresca y lavanda. Un producto de menor calidad (pureza <99.0% en peso) puede ser utilizado como modificador en perfumería, donde le confiere un fresco aroma floral a las composiciones con un ligero olor a frutasc (Davis y Camper 2001), El acetato de linalilo con menos del 97% en peso de pureza es un poco más terroso, concentrado y duradero; tiene gran aplicación como modificador de fragancias para jabones, detergentes, ambientadores y productos de limpieza.

2.5.2. Compuestos fenólicos

Los más de 8000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido shikímico o bien por la vía del malonato/acetato. Son aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser

productos secundarios de su metabolismo y la característica química de contener al menos un grupo fenol (un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidroxilo) en su estructura molecular. (Riedel *et al.*, 2010).

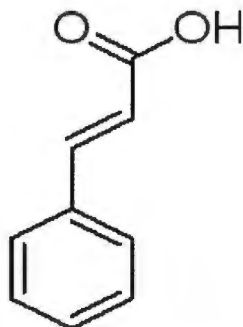


Figura 5. Estructura del ácido cinámico

2.5.3. Compuestos nitrogenados y alcaloides

Un alcaloide, es por definición, un compuesto químico que posee un nitrógeno heterocíclico. Se conocen alrededor de 12.000 alcaloides que contienen uno o más átomos de nitrógeno. Son sintetizados a partir de aminoácidos por medio de la vía del ácido shikímico o de la vía del acetato (Riedel *et al.*, 2010).

Son compuestos alcalinos (excepto la colchicina) y poseen acción fisiológica intensa en los animales aún a bajas dosis con efectos psicoactivos. Ejemplos conocidos son la cafeína, la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina y la estricnina. Generalmente actúan sobre el sistema nervioso central, si bien algunos afectan al

sistema nervioso parasimpático y otras al sistema nervioso simpático (Rao y Ravishankar, 2002).

2.6.Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta de la biotecnología; en general, esta tecnología consiste en el uso de partes aisladas de las plantas, llamados explantes, mantenidos en un medio nutritivo artificial aséptico bajo condiciones ambientales controladas. (Tomas, 2008)

En este sentido, el CTV es una serie de técnicas que se utilizan en investigación y en la producción productos vegetales. Se emplea en estudios de fisiología, bioquímica, morfogénesis, anatomía, embriología, fitomejoramiento y preservación de germoplasma; se ha utilizado en la biosíntesis de productos naturales (saborizantes, colorantes, aromatizantes, fármacos) y en la micropropagación de plantas ornamentales, forestales, frutales y hortícolas. (Tomas, 2008)

El cultivo de tejidos vegetales también estudia la división celular y la reprogramación genética en condiciones *in vitro*. Se ha convertido en un procedimiento estándar para la biotecnología vegetal. Su aplicación ha sido enfocada a tres principales aspectos: para realizar estudios genéticos, patológicos y fisiológicos de células vegetales, micropropagación y la producción de metabolitos secundarios (Taiz y Zeiger 2006)

Para la eficiente ejecución del CTV, se requiere utilizar una herramienta base, un soporte integrado por varios componentes que se denomina medio de cultivo. (Staba,

1982) El medio de crecimiento es una composición de minerales esenciales y vitaminas que son necesarias para el crecimiento y desarrollo de la planta, es decir, sin agua y nutrientes minerales, las plantas o los explantes no pueden vivir *in vitro*, ya que no son completamente autótrofos cuando se desarrollan en estas condiciones. (Rout, 2000)

Las ventajas que presenta el cultivo de células vegetales con respecto al cultivo tradicional de la planta completa son (Topete et al., 1991):

- Independencia de las condiciones climáticas adversas y de los problemas de plagas.
- Control del suministro del producto independiente de la disponibilidad de la planta.
- Sistemas de producción bajo condiciones controladas y optimizadas.
- Producción más consistente en cuanto a calidad y rendimiento del producto.
- Es posible lograr mejores rendimientos con respecto a los obtenidos por el cultivo de la planta completa.
- Mínimas necesidades de espacio para el desarrollo de la producción.
- Población celular uniforme y facilidad de extracción del producto.

Debido a lo anterior, el cultivo de estas células representa una alternativa biotecnológica para la producción *in vitro* de metabolitos primarios y secundarios.

En el cultivo de células vegetales son fundamentales los reguladores del crecimiento vegetal (RCV), los cuales son compuestos orgánicos, distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico en las plantas.

2.7.Reguladores de Crecimiento Vegetal

Los RCV son sustancias químicas presentes en los tejidos vegetales que tienen una función regulatoria en el crecimiento y desarrollo de la planta, dicha actividad se lleva a cabo generalmente a bajas concentraciones. (Piñol *et al.*, 2000). En el cultivo de tejidos celulares se emplean algunos reguladores del crecimiento vegetal, que son elaborados sintéticamente, o a través de procesos fermentativos, éstos, son agregados al medio de cultivo, y por tanto se consideran sustancias endógenas, cuyo tipo y concentración a utilizar deben de ser evaluados en los experimentos para la obtención de callo (Pina, 2008).

Los RCV han sido clasificados en 5 grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido absísico. (Piñol *et al.*, 2000). A nivel celular las auxinas regulan procesos como la elongación y división celular. La auxina natural más empleada en el CTV es ácido-Indol-3-Ácético (AIA), sin embargo, también se utilizan auxinas sintéticas, la más utilizada es el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), su uso varía de 0.5 – 50 μm de acuerdo a la especie de la planta. (Pawar y Thengane 2009).

2.7.1.Citoquininas

Las citoquininas, estimulan la formación de brotes, promueven la división celular, ayudan a la germinación, inhiben el alargamiento del tallo, estimulan el crecimiento de los brotes laterales y retardan el envejecimiento de las hojas. Se encuentra en altas concentraciones en los meristemos y los tejidos en crecimiento hasta donde es traslocado por el xilema desde las raíces, desde donde probablemente es sintetizado por la ruta bioquímica de la adenina (Purves et al., 2002; Salisbury, 1994).

2.7.2.Auxinas

Charles Darwin, en su libro el Poder de Movimiento en las Plantas, pone de manifiesto la actividad de una sustancia con capacidad para inducir el movimiento frente a una fuente de luz en coleoptilos de *Phalaris canariensis*(alpiste), la cual posteriormente fue identificada como auxina (Arteca, 1996). Desde ese entonces han sido ampliamente estudiadas y juegan un papel central en la regulación del crecimiento de las raíces, promueven la elongación del tallo e inhiben el crecimiento de brotes laterales manteniendo la dominancia apical (Salisbury, 1994).

Existen tres grupos auxínicos (Rojas & Ramirez, 1987):

- Derivados del indol como ácido indol propiónico (IPA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido 3-indol acético (AIA)
- Derivados del naftaleno, como ácido naftalen acético (NAA), ácido naftoxiacético (Noxa o BNOA), ácido naftilpropiónico (NPA).
- Derivados fenoxi, usados como herbicidas selectivos y algunas veces como reguladores del crecimiento vegetal.

Se encuentran en las células en concentraciones de 10^{-6} - 10^{-8} M, y su distribución dentro de los tejidos está sujeto a los principios del transporte activo y polar. Si la concentración del compuesto en el tejido aumenta, el efecto que tienen sobre la planta será la inhibición de la elongación de la raíz, la raíz es un estímulo en la producción de etileno, mientras que a bajas concentraciones estimula la elongación de los brotes y las raíces (Salisbury, 1994).

2.8.Callogénesis y Medio de Cultivo en Suspensión

En 1939, dos investigadores europeos, Nobecourt y Gautheret, y un norteamericano, White, hicieron las primeras observaciones sobre la proliferación de grandes masas de tejido desdiferenciado (callos), derivadas de raíces de zanahoria. El cultivo de callos se utiliza en la investigación en fisiología vegetal, organogénesis, embriogénesis, genética, fitotoxicología y propagación de plantas, aunque se le da

énfasis al área de síntesis y extracción de productos naturales, como fármacos y enzimas (Hurtado y Merino, 1987).

El cultivo de callos se puede dividir en las siguientes etapas:

- a) Inducción. Las células del inóculo inicial comienzan su crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- b) Proliferación celular. El tejido caloso aumenta su masa celular al máximo.
- c) Inducción de la diferenciación. Se obtienen meristemas, embrioides, tejido vascular, etc., a partir de la masa celular del callo.
- d) Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

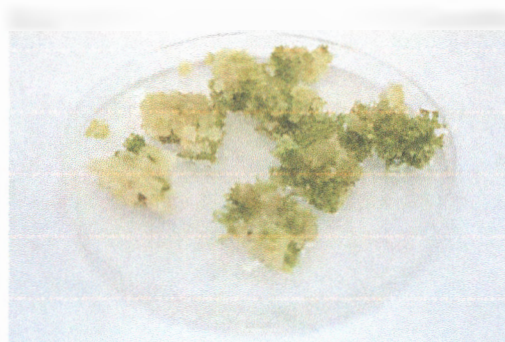


Figura 6. Características fenotípicas de callo (*Nicotiana tabacum*)

Para la inducción de callo se requiere el uso de los RCV, generalmente se emplea la auxina, ya que controla la dediferenciación celular. Por ello se requiere una

concentración adecuada, que resulta específico de acuerdo al tipo de planta que se esté utilizando. (Pawar y Thengane 2009).

La inducción de tejido calloso se produce cuando la proporción de auxinas es superior a la de las citocininas. Las auxinas son las responsables de la aparición de este tipo de tejido, mientras que las citocininas sólo favorecen su proliferación. En ciertas especies la inducción de tejido calloso puede lograrse agregando únicamente auxinas al medio de cultivo (Pérez et al., 1999).

Cuando se logra producir el callo es fundamental mantener esa condición en el medio para poder promover su proliferación. Una vez que se han cubierto las condiciones mencionadas se considera como "establecido" al cultivo, en esta etapa del proceso es posible promover la formación suficiente de biomasa y realizar estudios bioquímicos, fisiológicos, celulares, según lo requiera la investigación. (Díaz, 2005)

Una vez obtenido el cultivo de callo, se desarrolla el cultivo en suspensión, éste, es un sistema que se utiliza para la proliferación masiva de células, porque permite un control adecuado y homogéneo de mezclado, así como de las condiciones aeróbicas, en comparación con cultivos de raíces como lo son los cultivos sólidos o semisólidos. (Croteau, 2000).

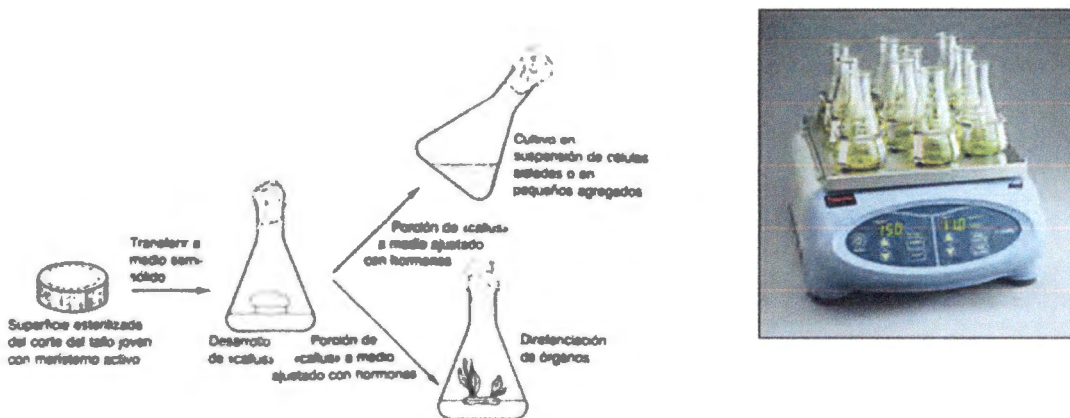


Figura 7. Origen de los cultivos de células en suspensión

Este sistema es útil para llevar a cabo estudios sobre embriogénesis, crecimiento y diferenciación, organogénesis, bioquímica y metabolismo; también para la obtención de productos secundarios.

En este sentido, el cultivo en suspensión representa el sistema más adecuado para lograr un cultivo a gran escala. Se aprovechan los callos que no presentan oxidación, y sobre todo, deben de presentar una característica denominada “friabilidad” es decir, (una alta capacidad para disgregarse), posteriormente se inoculan en un medio de cultivo líquido y se colocan en agitación. (Cardoza, 2008)

Es fundamental iniciar el cultivo con una cantidad de inóculo elevada y seleccionar periódicamente los agregados más diminutos hasta lograr una suspensión homogénea. De la misma manera que en los callos, se considera a una línea de células en suspensión “estable”, cuando los parámetros de crecimiento y producción

de biomasa son reproducibles, es decir, presentan el mismo comportamiento a través del tiempo. (Cardoza, 2008)

Después de la inoculación del tejido calloso en el medio líquido agitado, se inicia un período de fragmentación en pequeños agregados que producen células libres y nuevos grupos de células. El crecimiento del cultivo suele presentar un comportamiento sigmoideo, mostrando las fases características del crecimiento de microorganismos.

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión a partir de un fragmento de callo es más rápido, aunque depende de la friabilidad del tejido calloso, es decir de la capacidad de las células para disgregarse fácilmente después de una división celular (Hurtado y Merino, 1987).

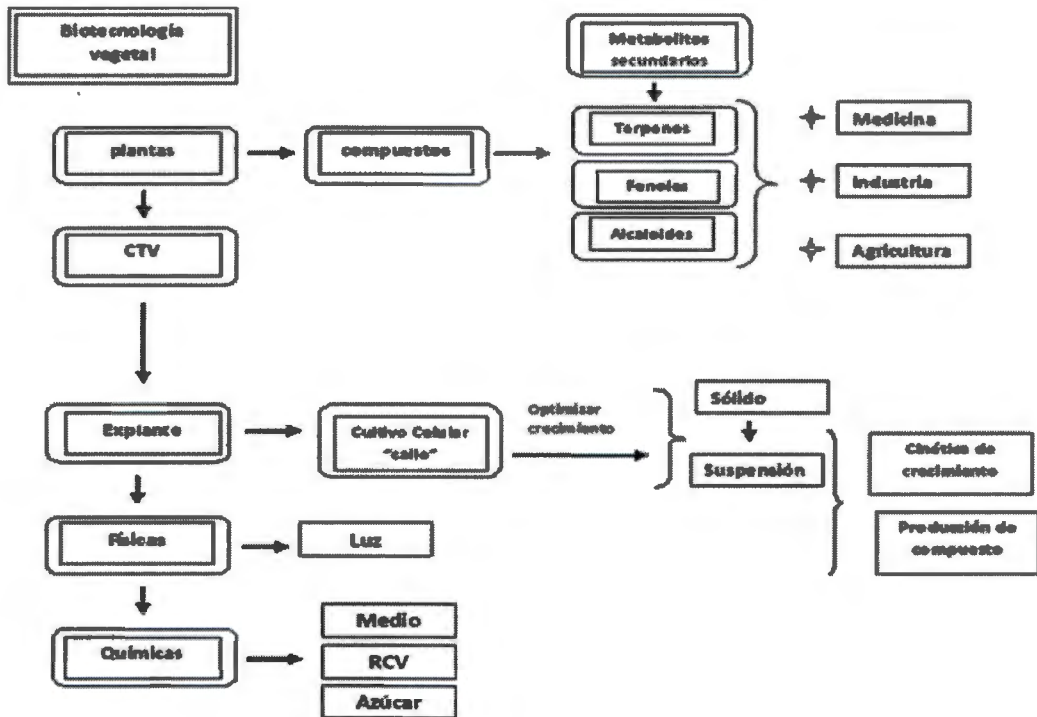


Figura 8. Clasificación de los Metabolitos Secundarios y Cultivo de Tejidos Vegetales

III. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de tejidos en plantas ha sido utilizado como una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios. En *L. angustifolia* se realizó un estudio para la obtención de una línea celular de callo en medio semisólido, observándose que es factible establecer la producción de terpenos (linalol y acetato de linalol) y llevar a cabo su caracterización.

El cultivo de *L. angustifolia* se ve limitado por tener semillas poco viables (germinación menor al 66%), plagas y enfermedades Baskin y Baskin 2004, por lo que el CTV representa una alternativa para el establecimiento de los cultivos *in vitro*.

En el presente estudio se plantea el establecimiento de cultivo de células en suspensión de *L. angustifolia* para la producción de los componentes principales del aceite esencial de lavanda como linalol y acetato de linalol.

IV. HIPÓTESIS

L. angustifolia es una planta que produce aceites esenciales, por lo que se espera que los cultivos celulares en suspensión de ésta especie retengan la capacidad de producir dichos metabolitos secundarios.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

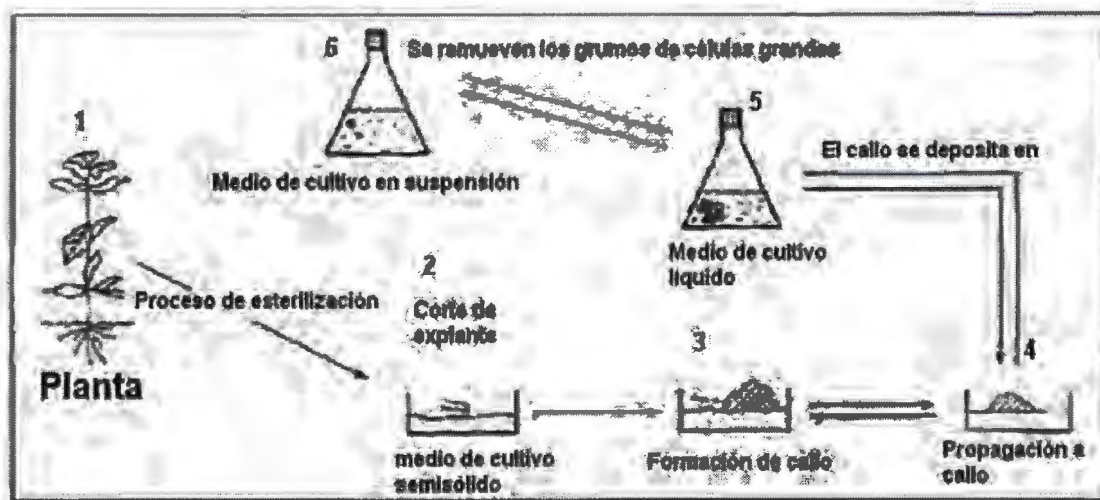
Establecer cultivos en suspensión de *L. angustifolia* a partir de líneas celulares de callo productores de linalol.

5.2. Objetivos Particulares

1. Establecer el cultivo de callo de *L. angustifolia* en medio semisólido.
2. Establecer el cultivo de células en suspensión de *L. angustifolia* y determinar la presencia de linalol y/o acetato de linalol.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 9 se muestra un esquema del proceso experimental que se siguió para el establecimiento de cultivos celulares en *L. angustifolia*.



Fi

Figura 9. Proceso experimental para el establecimiento de cultivos de células en suspensión de *L. angustifolia*.

6.1. Material Vegetal

Ejemplares jóvenes con etapa fenológica entre 5 – 6 meses de *Lavandula angustifolia* fueron adquiridos en los viveros de la zona chinampera en la delegación Xochimilco de la Ciudad de México. Las plantas (Figura 10) fueron mantenidas y acondicionadas en el invernadero de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Las hojas fueron empleadas como fuente de explantes para la inducción de callo. Una muestra de planta fue identificada y registrada en el herbario de la UAM-I, con el número de registro 24356.

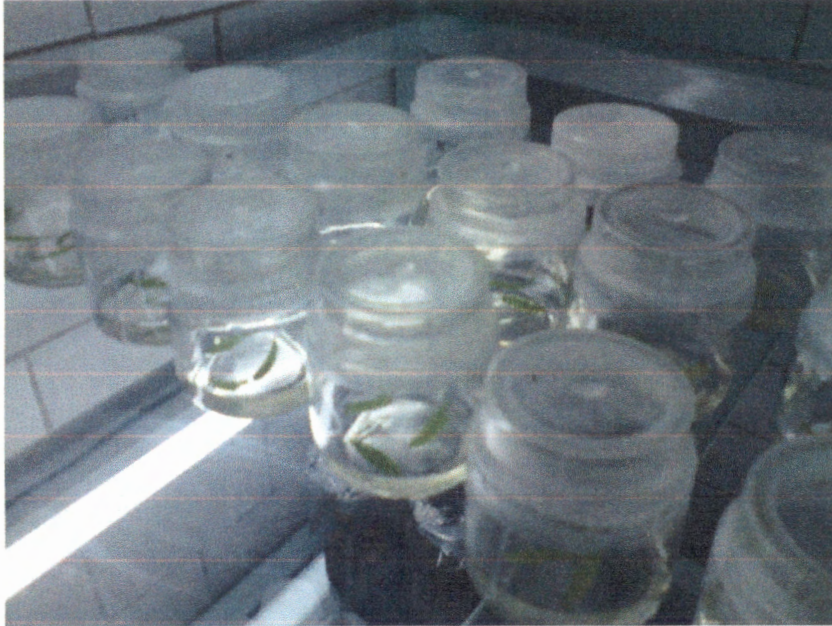


Figura 12. Incubación de explantes foliares de *L. angustifolia* en medio MS .

Los cultivos fueron incubados, bajo un fotoperíodo de 16 h luz blanca fluorescente a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y bajo una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Realizando subcultivos cada 14 días después de la evaluación de respuesta de explante.

6.4. Inducción de callo

Para inducir la respuesta de callo en los explantes, se incorporó al medio del cultivo la auxina sintética (RCV) 2,4-D a una concentración de $6.79 \mu\text{M}$. El valor del pH se ajustó a 5.8, y el medio se esterilizó a una temperatura de 121°C durante 18 min. La respuesta de inducción de callos desarrollados de los explantes, se expresaron como un porcentaje del total de los explantes evaluados después de 6 semanas. Los callos de explantes fueron seleccionados como líneas celulares, los cuales se siguieron

ascórbico ($100 \text{ mg l}^{-1} + 150 \text{ mg l}^{-1}$, respectivamente). Las hojas se cortaron en segmentos de $5 \times 5 \text{ mm}$. Después, los segmentos se sumergieron en soluciones nuevas de antioxidante en vasos de precipitado, realizando 3 cambios periódicos de dicha solución durante 3 o 4 min. Finalmente, 3 ó 4 explantes se depositaron en frascos tipo Gerber contenido 25 ml de medio de cultivo, previamente esterilizado.



Figura 11. Condiciones asépticas de siembra en una campana de flujo laminar.

6.3. Medio de cultivo y condiciones de incubación

Los explantes fueron sembrados en medio de cultivo sólido (Figura 12) Murashige y Skoog (MS; 1962) al 50% de su concentración y suplementado con 30 g l^{-1} de sacarosa, 2 g l^{-1} de phytigel como gelificante, adicionado con 100 mg l^{-1} de ácido cítrico y 150 mg l^{-1} de ácido ascórbico.



Figura 10. Ejemplar de una planta de *Lavanda angustifolia* .

6.2. Condiciones asépticas

Hojas inmaduras se lavaron de manera superficial con una solución jabonosa por 5 min, seguido de una desinfección con etanol al 70% (v/v) por 30 s. y una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% (v/v) por 30 min, agregando tres gotas de Tween-20 por cada 100 ml de solución preparada.

Posteriormente, en el interior de una campana de flujo laminar (Figura 11), previamente desinfectada, los explantes fueron lavados tres veces con agua destilada esterilizada. Una vez desinfectados, los explantes se cortaron dentro de cajas petri conteniendo solución antioxidante compuesta por ácido cítrico y ácido

subcultivando en su respectivo medio de inducción y RCV. Las transferencias a medio de cultivo fueron realizadas en periodos de 14 días, durante 7 ciclos. Después de los ciclos de subcultivo, se realizó el análisis por TLC para determinar la producción de metabolitos de los callos, también para realizar la inducción en medio de cultivo líquido.

6.5. Cultivo en medio líquido

El medio de cultivo líquido se preparó siguiendo la misma metodología para preparar el medio en semisólido, pero en este caso no se le agregó el Phytigel para solidificar. Una vez que se obtuvieron las líneas celulares de callo friable, éstas fueron agregadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL en 50 mL medio de cultivo líquido y se colocaron en un equipo orbital a 100 rpm. Los cultivos fueron incubados bajo un fotoperiodo de 16 h luz fluorescente a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

6.6. Cultivo de células en suspensión

El cultivo de células en suspensión se inició con subcultivos de callos friables desarrollados a partir de hojas jóvenes con $6.79 \mu\text{M}$ de 2,4-D. Se transfirieron 2 g de células frescas a matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml medio de cultivo (MS) sin fitagel e incubados en una agitadora orbital a 100 rpm bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación que las usadas para los callos.

Cuando se incrementó la biomasa, las células fueron seleccionadas por tamaño con disociador de 200 μm , con la finalidad de obtener una suspensión fina y homogénea, se subcultivaron cada 22 días, durante 5 ciclos.

6.7.Preparación de extractos y análisis por TLC

Para la extracción de linalool se utilizaron 15 frascos de callos café, 15 de callo blanco-gris, 3 matraces de cultivos en suspensión y hojas frescas de *L. angustifolia*, muestras de callos, suspensiones y hojas se sometieron a secado de T° ambiente (T.A.), mientras que otras muestras de los mismos callos, suspensiones y hojas a secado en estufa Felisa 45cv a una T° de 65°C. Para cada muestra se peso 1.0 g en peso seco de biomasa y se hicieron 2 extracciones hexánicas cada 24 h T.A.; las otras muestras de igual manera se tomaron 1.0 g en peso seco y se hicieron mediante reflujo a 65 °C durante 30 min con 3 ciclos cada una. Posteriormente las muestras se filtraron, se mezclaron y se concentraron bajo presión reducida en un Rotavapor (Buchi RE-111; BuchiLaboratoriums-Tecnick AG, Flawil, Switzerland). Las muestras concentradas se secaron por evaporación del disolvente restante a temperatura ambiente y se guardaron en frascos ámbar para su posterior análisis en TLC.

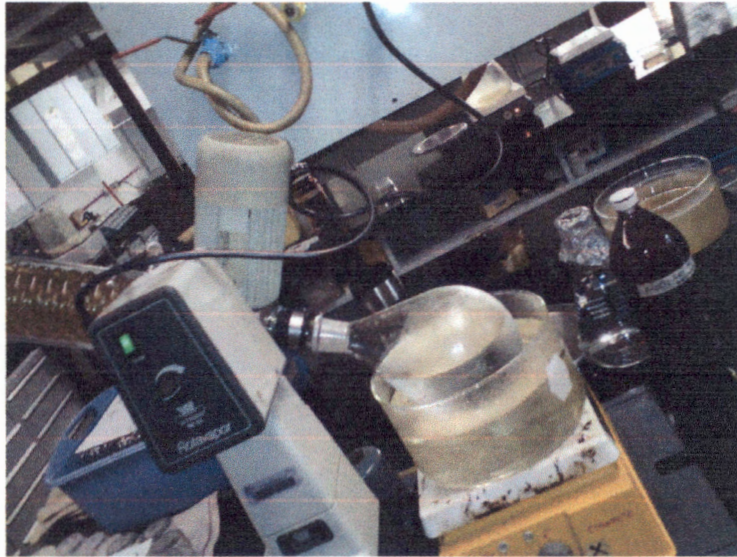


Figura 13. Concentración de muestras a través de Rotavapor (Buchi RE-111; BuchiLaboratoriums-Tecnick AG, Flawil, Switzerland)

La detección de metabolitos secundarios (Linalol) se efectuó cromatografía en capa fina usando cromatoplasacas (Merck 5554) y corroborándolos con estándares auténticos (solución Linalol, 0.2 mg ml⁻¹; Sigma, Extrasynthese). Se usó como fase móvil una mezcla de elución tolueno – acetato de etilo 93:7.

VII. RESULTADOS

7.1. Inducción de callo y cultivo de células en suspensión

Se obtuvieron dos fenotipos de callo con un rendimiento de inducción del 94% (callo café y callo blanco-gris, figuras 14A y 14B) a partir de los explantes foliares de *L. angustifolia* tratados con 2,4-D 6.79 μM ; el callo formado por el explante en un inicio es de color blanco grisáceo y posteriormente fracciones de este callo se tornan color café, de ahí que de la misma línea celular se deriven dos fenotipos diferentes. La línea de callo blanco-gris no presentó oxidación y es friable motivo por el cual se seleccionó para establecer el cultivo en suspensión (Figura 14C).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la auxinas sintética 2,4-D promueve diferentes respuestas en los explantes foliares inmaduros de *L. angustifolia*; 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 (Campanoni y Nick, 2003). 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 (Delbarre et al., 1996; Campanoni y Nick, 2003). 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 (Dharmasiri et al., 2003

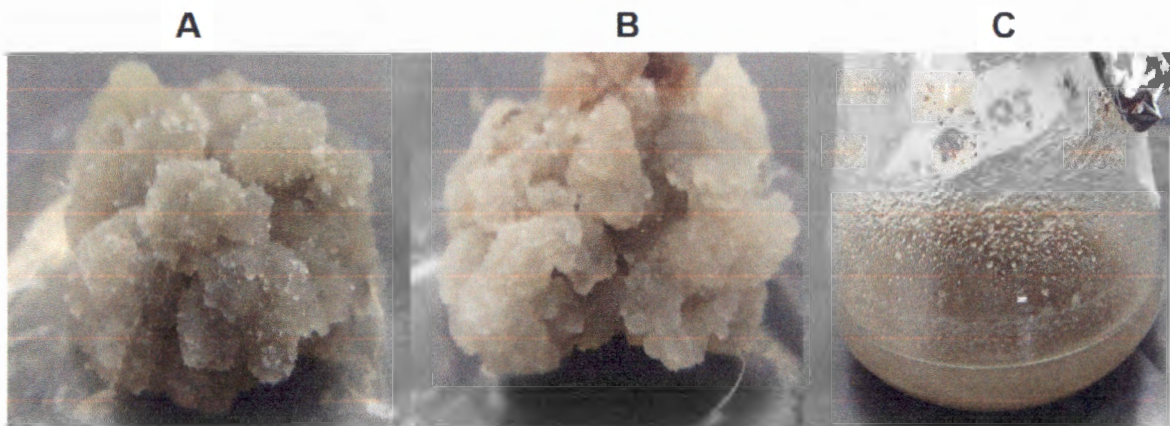


Fig. 14. Características fenotípicas de las líneas celulares de *L. angustifolia*, A) Callo café claro, B) callo amarillento claro y C) Células en suspensión de callo amarillento claro.

En el presente estudio 2,4-D a la concentración de 6.79 μM no sólo dio origen a dos líneas celulares de callo de color café claro y amarillento claro, en explantes foliares de *L. angustifolia* con alto porcentaje de callo friable (95.22%), sino también permitió alta proliferación celular en cultivos de células en suspensión. 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* 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 (Yamagami et al., 2004).

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 linalol; 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 (Steffens et al., 2001), lo cual dio origen al cultivo de células en suspensión.

7.2. Análisis de los extractos por cromatografía de capa fina (TLC)

El análisis por TLC de los extractos del callo café claro, callo amarillento claro y cultivo en suspensión muestran la presencia de compuestos que tienen un $R_f = 0.26$ similar entre sí mismos pero diferente al del linalol $R_f = 0.53$ (Figura 15A y 15B), sin embargo en los cultivos en suspensión se observa también mayor presencia de otros compuestos comparados con extractos de hoja y de callo (Figura 5A).

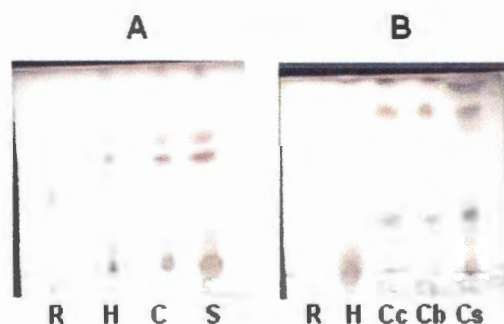


Fig. 15. Cromatoplasmas de los extractos de callo y de las células en suspensión. (A) Extracción a T.A. de *L. angustifolia* (B) Extracción a 65°C de *L. angustifolia*. R= Estándar de Linalol, H=Hoja, C=Callo, Cc=Callo café claro, Cb=Callo amarillento claro y S=Células en suspensión. Muestras de 1.0 g de peso seco.

La ausencia de metabolitos secundarios del tipo fenólico en las muestras de hoja con extracción a 65°C 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 Wu., 1999), lo cual podría explicar la presencia

de componentes de aceite esencial en los extractos hexánicos de callo y suspensión, no obstante debe corroborarse con una técnica analítica como CG.

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 CH_2Cl_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_2Cl_2 , solvente polar aprótico en donde dichos compuestos son menos solubles (Zhao et al., 2002).

VIII. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron dos líneas celulares de callo a partir de hojas inmaduras de dos lotes de plantas silvestres de *L. angustifolia* con el tratamiento con 2,4-D 6.79 μ M.
- Se estableció un cultivo de células en suspensión a partir de la línea celular de callo gris-blanco. Se detectó la presencia de compuestos con un Rf similar en las dos líneas celulares de callo y en el cultivo en suspensión pero con Rf diferente al del linalol, por lo que se presume que los tres cultivos celulares son productores de compuestos análogos al linalol (Guadarrama Flores y col., 2012).

IX. PERSPECTIVAS

- Realizar cinética de crecimiento en cultivos de células en suspensión de *L. angustifolia*
- Cuantificar la producción de Metabolitos secundarios por cromatografía de gases

X. REFERENCIAS

Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. Essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4364-4370.

Arteca R. N. 1996. *Plant Growth Substances Principles and Applications*. Editorial Chapman & Hall. New York pp 332.

Bakkali F, Averbeck S, Averbek D, Idaomar M 2008. Biological effect of essential oils- a review. *Food and chem. Toxicol.* 46: 446-475.

Banthorpe, D., Bates, M. e Ireland, M. 1995. Stimulation of accumulation of terpenoids by cell suspensions of *Lavandula angustifolia* following pre-treatment of parent callus. 1995. *Phytochemistry* 40 (1): 83-87.

Barocelli, E., Calcina, F., Chiavarini, M., Impicciatore, M., Bruni, R., Bianchi, A. y Ballabeni, V. 2004. Antinociceptive and gastroprotective effect of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. *Life Sciences* 76: 213-223.

Baskin, J. M, and C. C. Baskin. (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1 – 16.

Becerra J 2007. The impact of herbivore-plant coevolution on plant community structure. *PNAS* 104: 7483-7488.

Bruneton J 1999. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants: essential oils*, 2nd. Edition, Lavoisier Publishing, NY, pp. 461-780.

Cabau, R. 2003. Productos secundarios del bosque. On line: <<http://www.ctfc.es/apsb/es/pam.htm>>(15.may.2012).

Cairo, M. 2003. Aceite esencial a partir de la corteza del limón (*Citrus limonium*). On line: < <http://www.monografias.com/trabajos12/aceitesc/a ceitesc.shtml>> (05.may.2012).

Campanoni P, Blasius B, Nick P (2003) Auxin transport synchronizes the pattern of cell division in a tobacco cell line. *Plant Physiol* 133: 1251-1260

Cardoza V (2008) Tissue culture: The manipulation of plant development. En: *Plant biotechnology and genetic: principles, techniques, and applications*. CN Stewart Jr

(Ed). John Wiley and Sons, Inc. Knoxville, Tennessee. pp. 113-134.

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., Mirenscha. (2008). Chemical composition of the essential oil of *Lavandula angustifolia* from Xinjiang, China. *Chemistry of Natural Compounds*. 44:810.

Chemat F, Lucchesi ME, Smadja J, Favretto L, Colnaghi G & Visinoni F (2006) Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: a rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*, 555:157-160.

Chu, C., y Kemper, K. 2001. Lavender (*Lavandula spp.*). On line: <<http://www.mcp.edu/herbal/lavender.pdf>> (10.may.2012).

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products: secondary metabolites. En: *Biochemistry and molecular biology of plants*. BB Buchanan, W Grissem, RL Jones (Eds). American Society of Plants Physiologists, Maryland USA. pp 1250-1318.

Davis, J. y Camper, D. 2001. Lavender, History, Taxonomy, & Production. On line: <<http://www.ces.ncsu.edu/fletcher/staff/jmdavis/lav.html>> (04.may.2012).

Delbarre A, Meller 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

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Jones AM, Estelle M (2003) Auxin action in a cell-free system. *Curr Opin Cell Biol* 13: 1418–1422

Díaz CC (2005). Biotecnología agrícola moderna: Aportaciones del cultivo de tejidos y la ingeniería genética. pp. 27-32. En: *Claridades Agropecuarias No. 137. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA)*. México.

Fuentealba, J. 1999. Cultivo de la lavanda para la obtención de aceite esencial. Universidad Austral de Chile, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Dirección de Extensión. 8p.

Fundación para la innovación agraria. (FIA). 2001. Producción de plantas medicinales y aromáticas. Ministerio de Agricultura. 67 p.

Guadarrama-Flores, B., Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J Estrada-Zúñiga, M.L., y Cruz-Sosa, F. (2012). Producción en cultivos in vitro de los componentes principales del aceite esencial de *Lavandula angustifolia*. *Revista Latinoamericana de Química* 40 (2): 65 – 74.

Guillen, M., Cabo, N. y Burillo, J. 1996. Characterisation of the essential oils of some cultivated plants of industrial interest. *Journal of the science of food and agriculture*, 70 (3): 359-363.

Huang J. y Wu X. Y. (1999). Effects of pH, salt, surfactant and composition on phase transition of poly(NIPAm/MAA) nanoparticles. *Journal Polymer Science* 37, 2667–2676

Hurtado V., D. y Merino M., M. E. (1987). Cultivo de tejidos vegetales. México. Primera edición. Ed. Trillas, pp. 122-130.

International Organization for Standardization (ISO). 2002. Oils of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.). Suiza, Génova. 16 p.

Kim, N. y Lee, D. 2002. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 982: 31-47.

Lahlou M 2004. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Frag. J.* 19: 159-165.

Lehninger, A.L. 1995. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª Edición, ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1117 p.

López, X., Bagisnky, C. y Portilla, G. 1997. Caracterización del crecimiento y rendimiento de plantas de Lavanda establecidas en la región central de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 57 (2):113-121.

Montes, M., Wilkomirsky, T. y Valenzuela, L. 1992. Plantas medicinales. Concepción, Chile. Ediciones Universidad de Concepción. 207 p.

Murashige, T., Skoog, F., (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.

Namdeo AG (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Pharmacognosy*, 1: 69-79.

Ortega, X., Salazar, E. y Portilla, G. 2001. Producción de esencias aromáticas. Mercado de aceites esenciales. *Tierra Adentro (Chile)* 39: 10-13.

Pawar KD & Thengane SR (2009) Influence of hormones and medium components on expression of dipyrano-coumarins in cell suspension cultures of *Calophyllum inophyllum* L. *Process Biochemistry* 44: 916-922.

Peana A., T., Aquila., Panin, F., Serra, G., Moretti M., D. (2002) La actividad anti-inflamatoria de linalol y acetato de linalilo componentes de los aceites esenciales. *Fitomedicina*. 9(8):721-726.

Pérez, E. M., Ramírez, R. M. y Núñez, H. G. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Primera edición. Ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Pichersky E, Noel J, Dudareva N 2006. Biosynthesis of plant volátiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811.

Pina LJA (2008) Propagación de plantas. Universidad Politécnica de Valencia, España.

Piñol MT, Palazon J, Cusidó RM (2000) Introducción al metabolismo secundario. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. J Azcón-Bieto, M Talón (Eds). McGraw-Hill Interamericana, Barcelona, España. pp. 261-283.

Portilla, G. 2002. Esencia con aroma a negocio. *Diario electrónico Mercosurco*. On line: <<http://www.mercosurco.com.ar/Notas.asp?Codigo=2309>> (20.oct.2012).

Purves W., Sadova D., Orians G., Heller C.. 2002. *Vida La Ciencia De La Vida*. Sexta Edición. Editorial Medica Panamericana. New York . pp 1133.

Rao SR, Ravishankar GA (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20(2): 101-153.

Ricciardi, G. 2003. Aceites esenciales. On line: <<http://www.members.tripod.com/aromaticas/Aceites.htm>>. (03.may.2012).

- Riedel H, Cai Z, Kütük O, Smetanska I (2010). Obtaining phenolic acids from cell cultures of various *Artemisia* species. *Afr. J. Biotechnol.* 9(51): 8805-8809.
- Rojas G. M., Ramirez H. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas: fisiología, tecnología, experimentación. Limusa 2 ed., pp263.
- Rout GR, Samantaray S, Das P (2000) In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18: 91-120.
- Ryan M, Byrne O 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.* 14: 1965-1975.
- Salisbury F. 1994. *Fisiología Vegetal*. Editorial Iberoamericana. Mexico. pp 759.
- Sharp JM, Doran PM (2001) Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol. Progr.* 17: 979-992.
- Shellie, R., Mondello, L. Marriott, P y Dugo, G. 2002. Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography* 970: 225 - 234.
- Staba EJ (1982) *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press. Florida
- Steffens B, Feckler C, Palme K, Christian M, Böttger M, Lüthen H (2001) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant J* 27: 591-599
- Taiz L & Zeiger E (2006) *Plant physiology*. Sinauer. USA.
- Tisserand R, Balacs T 1995. *Essential oils safety: a guide for health care professionals*. Churchill Livingstone. London, UK.
- Tomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618-631.
- Topete, M., Torres, L. G., Ramírez, M. E., Herrera, M. y Galindo, E. (1991). Avances en los sistemas de cultivo masivos de células vegetales. *Ciencia y Desarrollo*, Vol. XVIII. 99:73-96.
- Tsuro, M., Inoue, M. y Kameoka, H. 2001. Variation in essential oil components in regenerated lavender (*Lavandula vera* DC) plants. *Scientia horticultrae* 88 (4) : 309-317.

Trease, G.E. and W.C. Evans, 1984. Pharmacognosy. 13th Edn., Bailliere Tindall, London, UK., Pages: 332.

Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 1: 13-25.

Virginia Politechnic Intitute and State Universyte. 2004. Introducción a la espectrometría de masa. On line: www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/ms-intro.html. (25.sep.2012).

Yamagami M, Haga K, Napier RM, lino M (2004) Two distinct signaling pathways participate in auxin-induced swelling of pea epidermal protoplasts. *Plant Physiol* 134: 735–747

Zhao H, Hertel R, Ishikawa H, Evans ML (2002) Species differences in ligand specificity of auxin-controlled elongation and auxin transport: comparing *Zea* and *Vigna*. *Planta* 216: 293–301

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23:283-333.



ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN DE *Lavandula angustifolia* MILLER

Edson Missael Flores García, Berenice Guadarrama Flores, Antonio Bernabé Antonio, Eristeo García Márquez, Francisco Cruz Sosa

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
cuhp@xanum.uam.mx

Palabras clave: Cultivo de tejidos vegetales, *Lavandula angustifolia*, Linalol

Introducción. *Lavandula angustifolia* Miller (Lamiaceae) produce aceites esenciales con propiedades terapéuticas, cuyo componente principal es el linalol (1). El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta potencial para la producción de compuestos medicinales, fragancias y colorantes, que actualmente no son producidos por microorganismos o por síntesis química (2). El objetivo del presente trabajo fue establecer cultivos de callo y de células en suspensión a partir de explantes foliares de *L. angustifolia* y determinar la presencia del linalol en ambas líneas celulares.

Metodología. Las hojas se desinfectaron y se sembraron en medio MS, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de ácido ascórbico, 150 mg/L de ácido cítrico y 2,4-D 6.79 μ M. Los cultivos se incubaron a 25°C \pm 2°C bajo un fotoperíodo de 16 h. Los cultivos de callo se subcultivaron cada 3 semanas durante 3 meses y se transfirieron a medio líquido MS bajo las mismas condiciones utilizadas para el cultivo de callo, con agitación a 110 rpm y con subcultivos cada 21 d. Se tomaron 15 frascos de callo café, 15 frascos de callo blanco-grís y 3 matraces de cultivos en suspensión. Las muestras fueron filtradas y secadas en una estufa a 55°C por 24 h, otras muestras se secaron a temperatura ambiente (T.A.). Para cada muestra se pesó 1.0 g en peso seco de biomasa y se hicieron 2 extracciones hexánicas cada 24 h a T.A.; otras muestras se hicieron mediante reflujo a 65°C durante 30 min con 3 extracciones cada una. Posteriormente se realizó un análisis por cromatografía en capa fina (TLC) con un sistema de elución tolueno – acetato de etilo 93:7.

Resultados y Discusión. Se obtuvieron dos fenotipos de callo con un rendimiento de inducción del 94% (callo café y callo blanco-grís, figuras 1A y 1B) a partir de los explantes foliares de *L. angustifolia* tratados con 2,4-D 6.79 μ M, el callo formado por el explante en un inicio es de color blanco grisáceo y posteriormente fracciones de este callo se toman color café, de ahí que de la misma línea celular se deriven dos fenotipos diferentes. La línea de callo blanco-grís no presentó oxidación y es fríasle motivo por el cual se seleccionó para establecer el cultivo en suspensión (Figura 1C). El análisis por TLC de los extractos del callo café, callo blanco-grís y cultivo en suspensión muestran la presencia de compuestos que tienen un $R_f = 0.26$ similar entre sí mismos pero diferente al del linalol $R_f = 0.53$ (Figura 2A y 2B), sin embargo en los cultivos en suspensión se observa también mayor presencia de otros compuestos comparados con extractos de hoja y de callo (Figura 2A).



Fig. 1. Características fenotípicas de las líneas celulares de *L. angustifolia*. A) Callo café, B) callo blanco-grís y C) Células en suspensión de callo blanco-grís.

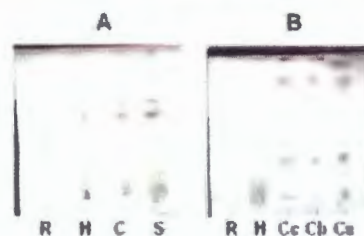


Fig. 2. Cromatogramas de los extractos de callo y de las células en suspensión. (A) Extracción a T.A. de *L. angustifolia* (B) Extracción a 65°C de *L. angustifolia*. R= Estándar de Linalol, H=Hoja, C=Callo, Co=Callo café, Cb=Callo blanco-grís y S=Células en suspensión. Muestras de 1.0 g de peso seco.

Conclusiones. Se obtuvieron dos líneas celulares de callo a partir de hojas inmaduras de dos lotes de plantas silvestres de *L. angustifolia* con el tratamiento con 2,4-D 6.79 μ M. Se estableció un cultivo de células en suspensión a partir de la línea celular de callo gris-blanco. Se detectó la presencia de compuestos con un R_f similar en las dos líneas celulares de callo y en el cultivo en suspensión pero con R_f diferente al del linalol, por lo que se presume que los tres cultivos celulares son productores de compuestos análogos al linalol (Guadarrama Flores y col., 2012). Actualmente, estos cultivos se continúan propagando para cuantificar posteriormente producción de linalol por Cromatografía de Gases.

Bibliografía.

1. Gattefossé, R.M. 1993 Aromatherapy. R.B. Tisserand (Ed.) Saffron Walden: C.W. Daniel Co.
2. Mulabagal V, Teey H. 2004. *Int. J Appl Sci Eng*, 2: 29-48.
3. B. Guadarrama Flores, L. Buendía González, J. Orozco Villafuerte, M.E. Estrada Zúñiga, F. Cruz Sosa. 2012 *Rev Latinoam Quim*. 40: 65-74.



Unidad Iztapalapa

La División de Ciencias Biológicas y de la Salud y la Comisión Académica del Posgrado en Biotecnología otorgan la presente Constancia de Participación en el **2º Simposio: Perspectivas en Biotecnología a**

Edson Missael Flores García, Berenice Guadarrama Flores, Antonio Bernabé Antonio, Eristeo García Márquez y Francisco Cruz Sosa

por el cartel

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN DE *Lavandula angustifolia* MILLER

México D.F., a 05 de abril de 2013

Dr. Francisco José Fernández Perrino Coordinador del Posgrado en Biotecnología



Caso abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00123

Métrica: 2121800111

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS
DE CELULAS EN SUSPENSION DE
Lavandula angustifolia MILLER

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 14 del mes de junio del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA
DR. ERISTEO GARCIA MARQUEZ
DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO

siendo los dos primeros asesores del alumno y lector el tercero, 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: EDSON MISSAEL FLORES GARCIA

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:



EDSON MISSAEL FLORES GARCIA
ALUMNO

Aprobar

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

ASESOR

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

ASESOR

DR. ERISTEO GARCIA MARQUEZ

LECTOR

DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO