



Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la capacidad antioxidante en células de pimiento elicidadas con un extracto de hojas de *Moringa oleifera*.

Estudo da capacidade antioxidante en células de pemento elicidadas cun extracto de follas de *Moringa oleifera*.

Study of antioxidant capacity in elicited pepper cells with an extract of leaves of *Moringa oleifera*.



Elena Mercedes Moldes Allegue

18 de Septiembre, 2018

Director Académico: Dra Ángeles Bernal Pita da Veiga

Facultad de Ciencias

TRABALLO FIN DE GRAO

Dña. María de los Angeles Bernal Pita da Veiga, autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao “Estudo da capacidade antioxidante en células de pemento elicidadas cun extracto de follas de *Moringa oleifera*”, presentado por Mercedes Moldes Allegue para a súa defensa ante o tribunal cualificador

En A Coruña a 6 de Setembro do 2018.

Fdo.: Angeles Bernal Pita da Veiga

Las técnicas aprendidas durante el desarrollo de este trabajo fin de grado, fueron presentadas en diferentes ferias de divulgación científica organizadas por la Facultad de Ciencias de la UDC a lo largo del curso 2017.2018.

- *Feria Científica Divulgativa en Betanzos*
- *Feria Científica Divulgativa en Arteixo*

ÍNDICE

1-Introducción	8
1.1. <i>Moringa oleifera</i> Lam	8
1.2. Metabolismo secundario	9
1.2.1. ¿Qué son los metabolitos secundarios?	9
1.2.2. Compuestos fenólicos	10
1.3. Cultivo <i>in vitro</i>	11
1.3.1. Callos	11
1.3.2. Suspensiones celulares	12
1.3.3. Elicitación	12
2. Objetivos	13
3. Material y Métodos	13
3.1. Reactivos	13
3.2. Material vegetal	13
3.3. Extracción de los compuestos de <i>Moringa</i> para el extracto	13
3.4. Cultivo <i>in vitro</i>	14
3.4.1. Obtención de <i>vitro plant</i>	14
3.4.2. Inducción de la formación de callo	14
3.4.3. Inicio de suspensión celular	15
3.4.4. Elicitación	15
3.4.5. Obtención del medio celular	15
3.4.6. Extracción de fenoles	16
3.4.7. Determinación de la actividad antioxidante	16
3.5. Análisis estadístico	17
4.Resultados y discusión	17
4.1. Obtención de <i>vitro plant</i>	17
4.2. Obtención de callos y repicado	18
4.3. Obtención de suspensiones celulares	19
4.4. Determinación de los compuestos fenólicos	20
4.4.1. Análisis estadístico a las 24 horas y 96 horas	23
4.5. Determinación de la actividad antioxidante	24
4.5.1. Análisis estadístico a las 24 horas y 96 horas	26
5. Conclusiones	27
6. Bibliografía	28

RESUMEN

Moringa oleifera Lam es un árbol apreciado por su elevado valor en la alimentación, la medicina o el tratamiento de aguas, entre otros. Además posee múltiples características metabólicas, entre las cuales destaca su elevada cantidad de metabolitos secundarios, implicados en mecanismos de defensa o adaptación al ambiente. Forman parte de estos metabolitos secundarios los compuestos fenólicos caracterizados por su alto poder antioxidante. Debido a estas características, se elicitaron las suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L var. *annuum* con hojas de extracto de *Moringa* a 24 y 96 horas, con el objetivo de ver la respuesta a nivel celular. Los resultados obtenidos señalan un aumento en la concentración de fenoles y de la actividad antioxidante a las 24 horas de la elicitación.

RESUMO

Moringa oleifera Lam é una árbore apreciada polo seu elevado valor na alimentación, na medicina, no tratamento de augas, entre outros. Ademais, posúe múltiples características metabólicas, entre as cales destaca a súa elevada cantidade de metabolitos secundarios, implicados en mecanismos de defensa ou adaptación ao ambiente. Forman parte destes metabolitos secundarios os compostos fenólicos caracterizado polo seu alto poder antioxidante. Debido a estas características, levouse a cabo a elicitación de suspensión celulares de *Capsicum annuum* L var. *annuum* con follas de extracto de *Moringa* de a 24 e 96 horas co obxectivo de ver a resposta a nivel celular. Os resultados obtidos sinalan un aumento na concentración de fenoles e da actividade antioxidante ás 24 horas da elicitación.

ABSTRACT

Moringa oleifera Lam is a highly regarded tree for its high value in nutrition, medicine and water treatment among others. It also has multiple metabolic features, among which stands out its high quantity of secondary metabolites, involved in defense mechanisms or adaptation to the environment. Phenolic compounds which are considered by their high-antioxidant power, take part in these secondary metabolites. Owing to these features, cell suspensions of *Capsicum annuum* L. var *annuum* were elicited with *Moringa* extract leaves for a period above 24 and 96 hours with the aim to watch the effects on the cellular response. According to the results obtained, there is an increasing in concentration of phenols and also an antioxidant activity after 24 hours of the elicitation.

PALABRAS CLAVE

Cultivo *in vitro*, *Moringa oleifera* L, fenoles, elicitación, capacidad antioxidante, *Capsicum annuum* L var. *annuum*.

PALABRAS CRAVE

Cultivo *in vitro*, *Moringa oleifera* L, fenoles, elicitación, capacidade antioxidante, *Capsicum annuum* L var. *annuum*.

KEY WORDS

In vitro culture, *Moringa oleifera* L, phenols, elicitation, antioxidant capacity, *Capsicum annuum* L var. *annuum*.

1-Introducción:

1.1. *Moringa oleifera* Lam.

Moringa oleifera Lam también conocida como árbol de la vida o árbol de los milagros (Martín et al., 2013) es un árbol perteneciente a la familia de las Moringaceae, dentro del orden de las Brassicales donde nos encontramos géneros conocidos como *Raphanus sativus* (rábano) o *Brassica oleracea* (col silvestre). Se encontró *Moringa* silvestre en bosques caducifolios del nortoste de la India y este de Pakistán (Olson & Fahey, 2011a) pero actualmente se encuentra en todo el trópico, subtropical y las regiones semiáridas (Martín et al., 2013). Está caracterizada por poseer hojas pinnadas, semillas con 3 alas y frutos trivalvados (Olson & Fahey, 2011) . Su rango de crecimiento es entre 5-10 m (Anwar et al., 2007).

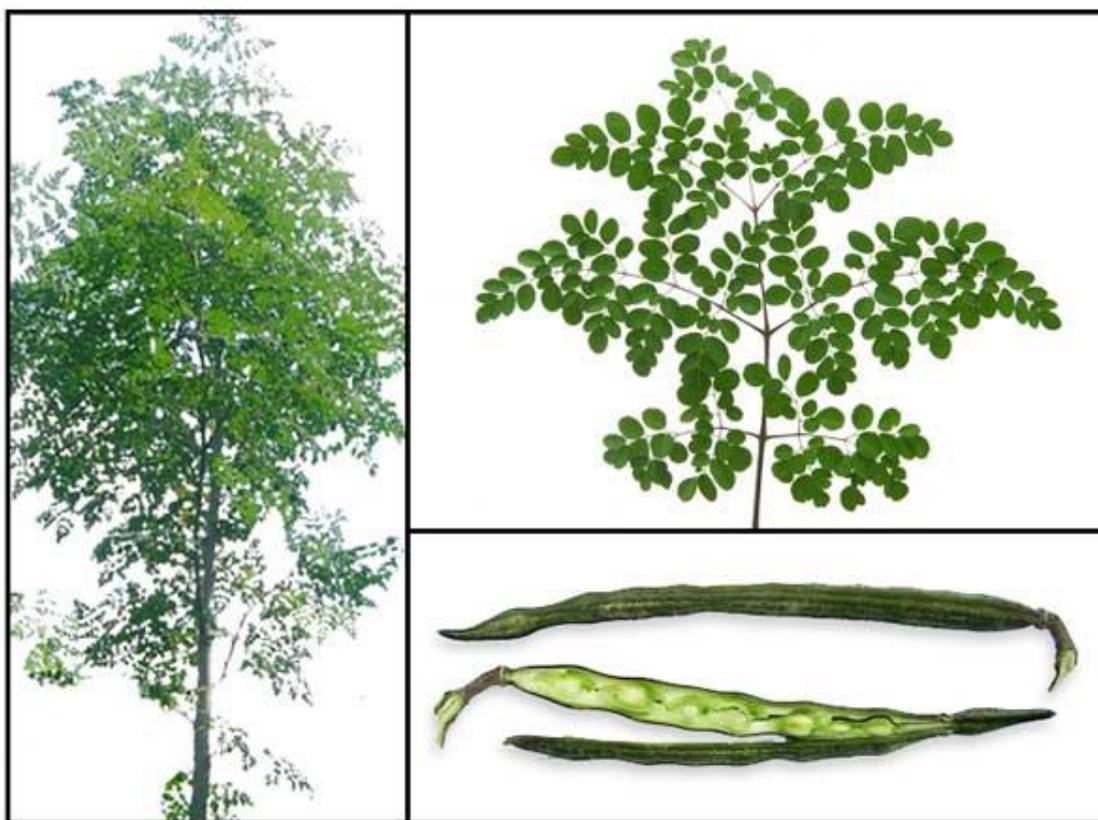


Figura 1: *Moringa oleifera* Lam: Vainas, hojas y árbol. Fuente: <https://www.ecoagricultor.com/la-moringa-el-arbol-de-la-vida-y-sus-multiples-propiedades-medicinales-y-nutricionales/>



Figura 2: Semillas de *M. oleifera* Lam.

Es altamente apreciada en la alimentación tanto humana como animal, ya que las hojas poseen un alto contenido en vitaminas, aminoácidos y proteínas. Las semillas se utilizan tanto en la alimentación como en medicina, el tratamiento de aguas y como fertilizante. Así mismo, la corteza de *Moringa* tiene un papel importante en la adsorción de metales pesados. Otro uso característico de *Moringa* es su actividad antimicrobiana en el control de infecciones provocadas por microorganismos, por ejemplo inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, además de actividad antifúngica contra el género *Trichophyton* (Martín et al., 2013).

Se ha demostrado que las hojas de *Moringa oleifera* Lam son ricas en β -carotenos, proteínas, vitamina C, calcio, potasio y actúa como un antioxidante natural (Anwar et al., 2007). Recientes estudios demostraron que el poder antioxidante de los extractos de hojas, frutos y semillas de *Moringa* protege a las células vivas del daño oxidativo del ADN causado por el envejecimiento, cáncer y enfermedades degenerativas. Además estos extractos inhiben el *quorum sensing* bacteriano y la peroxidación lipídica (Martín et al., 2013). Así mismo, *Moringa* tiene capacidad regeneradora de tejidos ya que posee reguladores fisiológicos de tipo citocininas, en especial zeatina (Mendoza, 2015)

1.2. Metabolismo secundario.

1.2.1. ¿Qué son los metabolitos secundarios?

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que poseen gran importancia ecológica ya que participan en procesos de adaptación al ambiente, así como en la respuesta a condiciones adversas de tipo biótico (por ejemplo el consumo por herbívoros o el ataque de microorganismos) o de tipo abiótico (la exposición a luz solar, estrés salino u oscilaciones de temperatura, entre otros).

Nos podemos encontrar dos tipos de metabolitos secundarios: los nitrogenados, dentro de los cuales están los compuestos alcaloides, aminoácidos no proteicos y aminos. Y los no nitrogenados que incluyen terpenoides, fenilpropanoides y poliacetilenos (Sepúlveda et al., 2003).

1.2.2. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son metabolitos implicados en la reproducción y el crecimiento, así como en la protección frente a patógenos, liberados para la defensa a condiciones de estrés (Muñoz, 2004). Estos compuestos poseen un anillo aromático que contiene grupos hidroxilo y su estructura va desde una molécula fenólica simple a un polímero complejo (Balasundram et al., 2006). Algunos de los componentes fenólicos son los flavonoles, los taninos o los ácidos fenólicos (Muñoz, 2004).

Existen diversos métodos para la cuantificación de compuestos fenólicos, pero el que hemos escogido en este TFG es el ensayo de Folin-Ciocalteu, el cual se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando lugar a un cambio de color a azul y una posterior medición al espectrofotómetro a 750nm en base a la recta patrón de ácido gálico.

a) Actividad antioxidante.

Los antioxidantes son sustancias que a bajas concentraciones retardan la oxidación de un sustrato (Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2005). Normalmente hay un equilibrio entre los sistemas antioxidantes y los radicales libres, pero cuando dicho equilibrio se rompe en el denominado estrés oxidativo, la producción de radicales libres se dispara (Coronado et al., 2015). Los radicales libres se definen como cualquier especie química que contiene electrones desapareados, ya sea por la ganancia o pérdida de un electrón (Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2005). Esto se produce debido a contaminantes ambientales, como las radiaciones de tipo ultravioleta o gamma, o por el propio metabolismo humano (Coronado et al., 2015). Un ejemplo de radicales libres son las especies reactivas de oxígeno (ROS) entre las que se encuentran el peróxido de hidrógeno y el superóxido (Winterbourn, 2008).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se basa en la capacidad de atrapar radicales libres, de donar átomos de hidrógeno o de quelar cationes metálicos (Balasundram et al., 2006).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante. En este TFG hemos escogido el método DPPH, debido a su sencillez. El DPPH es un compuesto de coloración violeta que tiene una banda de absorción alrededor de 520nm. En presencia de un sustrato que puede donar un átomo de hidrógeno o cualquier otro radical se produce una reducción de la absorción así como una pérdida de la coloración (Muñoz, 2004). Para determinar la capacidad antioxidante los valores tienen que ser comparados con un

compuesto patrón, en este caso el compuesto Trolox, el cual es un antioxidante análogo a la Vitamina E (Verde Yáñez, 2017).

1.3. Cultivo *in vitro*.

Se conoce como cultivo *in vitro* al crecimiento en condiciones estériles y en un medio nutritivo de protoplastos, células, tejidos, órganos y plantas con las condiciones ambientales controladas (Estopà, 2005).

La producción del cultivo *in vitro* se debe a la capacidad de las células diferenciadas de dar lugar a nuevos tejidos y eventualmente a un organismo completo. Esta característica, denominada totipotencia, la poseen las células meristemáticas presentes en distintos órganos de las plantas.

Las células vegetales cultivadas con hormonas vegetales, pueden dar lugar a dos tipos de respuesta:

- La formación de callos, que son células desdiferenciadas con un crecimiento tumoral, que bajo condiciones adecuadas pueden generar órganos o embriones somáticos.
- La formación directa de órganos o embriones, debido a una respuesta morfogénica.

La totipotencia es una habilidad imprescindible en las plantas modificadas genéticamente o las plantas transgénicas, ya que, una vez realizada la transformación, bien sea por *Agrobacterium* o por otro método, el siguiente paso es el cultivo *in vitro*, dando finalmente a una plántula que lleva el transgén en todas sus células.

La técnica del cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de la planta y depositarla en un medio nutritivo estéril donde se regenerarán una o muchas plantas.

Son múltiples las aplicaciones del cultivo *in vitro*, entre las cuales nos encontramos: propagación, obtención de metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos, mejora genética, producción de haploides, germinación de semillas, obtención de plantas libres de virus, clonación de individuos de características agronómicas deseables durante todo el año o estudios fisiológicos entre otros.

1.3.1. Callos

Como ya hemos dicho anteriormente, los callos son masas de células desdiferenciadas con aspecto tumoral, las cuales pueden regenerar una planta entera.

Para que la inducción del callo sea efectiva hay que tener en cuenta tres factores: el recurso vegetal del cual se parte, las características genéticas del individuo y la composición del medio de cultivo utilizado para la inducción.

Además, para que la inducción sea efectiva, al medio de cultivo se le deben de añadir fitohormonas, como las auxinas y las citoquininas.

1.3.2. Suspensiones celulares.

En este TFG se han utilizado las suspensiones celulares como método de cultivo *in vitro*. Se denominan suspensiones celulares a aquellas en las cuales se encuentran las células vegetales libres distribuidas en un medio líquido en movimiento con un suministro de nutrientes, en condiciones de asepsia, tras la incubación de callos friables.

Frecuentemente se utilizan Erlenmeyers, en los cuales se introduce el medio nutritivo líquido con trozos del callo dispersos en él, hasta llenar 1/5 de la capacidad del mismo. Tras esto, se incuban en un agitador a 80-150 rpm, en oscuridad y a temperatura de 25°C. Se realizan subcultivos semanalmente y tras varios días quedarán establecidas las suspensiones celulares.

Algunas de las características de estos cultivos son la elevada actividad metabólica, la acumulación de metabolitos secundarios y los cambios en el ADN celular durante el ciclo de cultivo, entre otros.

Esta técnica se puede aplicar a varios campos, entre los que destacan: los estudios sobre el ciclo celular, los estudios fisiológicos y bioquímicos, la producción de metabolitos secundarios y la embriogénesis somática (Szabados et al., 1993).

1.3.3. Elicitación

Un elicitador se define como un compuesto químico o una mezcla compleja, el cual es capaz de desencadenar una respuesta en los organismos de origen vegetal. Estos son una herramienta útil a la hora de mejorar la producción de compuestos vegetales de interés. Por tanto, la elicitación es un proceso de potenciación de la síntesis de metabolitos secundarios en las plantas para garantizar su supervivencia, persistencia y competitividad.

Los elicitores pueden clasificarse según su naturaleza como elicitores abióticos o bióticos. Los elicitores abióticos son factores físicos, como el estrés osmótico o térmico, y compuestos químicos, entre los cuales encontramos el etilacetato y las sales de metales pesados. Dentro de los elicitores bióticos están los polisacáridos de la pared celular vegetal (pectina o celulosa) y de la pared de microorganismos (quitina o glucanos), también hormonas vegetales como son el ácido salicílico o el metiljasmonato (Gutiérrez, 2016).

2. Objetivos

En este trabajo se pretende estudiar, la capacidad elicitora de *Moringa oleifera* sobre las células vegetales de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var *annuum* en diferentes estados de crecimiento. Esto se desglosa en los siguientes objetivos:

- Inicio de una línea celular de *Capsicum annuum* L. var *annuum* para obtener suspensiones y posterior elicitación.
- Determinar la concentración de fenoles totales en las células vegetales.
- Medir la capacidad antioxidante en las células vegetales de las suspensiones celulares.

3. Material y Métodos

3.1. Reactivos.

Los reactivos que se utilizaron fueron los siguientes:

- 1) Extracción de fenoles
 - a) Reactivo de Folin-Ciocalteu
 - b) Na₂CO₃ al 7%
- 2) Actividad antioxidante
 - a) DPPH 1mM
- 3) Extracción de los compuestos bioactivos de *Moringa*
 - a) Metanol al 80%
 - b) Etanol al 70%

3.2. Material vegetal.

Las semillas *Moringa oleifera* Lam con las que se ha realizado este trabajo provienen de la empresa Vitalmor (Bilbao). Éstas se plantan en tierra con vermiculita, regándolas con una solución nutritiva. Cuando pasan 7-9 días emergen las plántulas, tomando dicho día como tiempo 0. Una vez han emergido las plántulas de *Moringa oleifera* Lam, se llevan al invernadero donde alcanzan el estado floral.

Además, se utilizarán semillas de *Capsicum annuum* L var *annuum* para el cultivo *in vitro*.

3.3. Extracción de los compuestos de *Moringa* para el extracto.

Primero se secan las hojas de *Moringa* en una estufa a 70°C durante 48 horas. A continuación se recogen y se machacan hasta obtener 200 mg de polvo o

sedimento fino. Dicho polvo se mezcla con 50 ml de metanol al 80%, y durante 3 horas se mantiene en agitación a temperatura ambiente en oscuridad. Tras esto se filtra con una tela de nylon (0.22µm) y se evapora el disolvente utilizando el rotavapor. El extracto se resuspende con 1'5 ml de etanol al 70%, dando así a una concentración final de 133 mg en 1 ml de etanol al 70%.

3.4. Cultivo *in vitro*.

3.4.1. Obtención de *in vitro* plant.

En un primer momento se envuelven las semillas de *Capsicum annuum* L en una gasa cerrada con un clip y se esterilizan en etanol al 70% durante 2 minutos e hipoclorito sódico al 20% durante 20 minutos, ambos procedimientos en continua agitación.

Tras esto se lleva a la cabina de flujo laminar (previamente esterilizada), donde se realizan 3 lavados consecutivos con agua destilada. Una vez terminada la desinfección se abren los paquetes y se secan las semillas. Cuando estén totalmente secas, se introducen en el medio de cultivo con la ayuda de unas pinzas.

Este medio contiene lo siguiente:

Productos	Concentración
Sales Murashige y Skoog	4.3 g/L
Sacarosa	30 g/L
Caseína	0.25 g/l
Vitaminas de Morel	1 mL/L
Agar	8g/L

Tabla 1: Componentes del medio nutritivo para el inicio de la línea celular.

3.4.2. Inducción de la formación de callo.

Se extrae una de las plantas, y se cortan preferiblemente las hojas más jóvenes, con cortes longitudinales, situando el envés de la hoja hacia el medio nutritivo. Si en cambio se recogen las hojas más maduras, se corta primero el peciolo y luego se realizan los cortes longitudinales. El medio nutritivo es el que se ilustra en la tabla 2. Esto se deja un mes en completa oscuridad. Y tras este tiempo se realiza una serie de repicado de los callos.

Productos	Concentración
Sales Murashige y Skoog	4.3 g/L
Sacarosa	30 g/L
Ácido 2,4 diclorofenoxiacético	3mg/L
Kinetina	0.05 mg/L
Vitaminas de Morel	1 mL/L
Caseína	0.25 g/l
Agar	8g/L

Tabla 2: Componentes del medio nutritivo para la inducción de callos.

3.4.3. Inicio de suspensión celular.

En la cabina de flujo laminar, y se recogen 8 g de callos en 40 mL del medio de cultivo ilustrado en la tabla 3 y se introducen en un Erlenmeyer. Se incuba en una cámara con una temperatura controlada, en oscuridad y con una agitación continua. El repicado se realiza cada 10 días mediante una dilución 1:2.

Productos	Concentración
Sales Murashige y Skoog	4.3 g/L
Sacarosa	30 g/L
Ácido 2,4 diclorofenoxiacético	3mg/L
Kinetina	0.05 mg/L
Vitaminas de Morel	1 mL/L
Caseína	0.25 g/l

Tabla 3: Componentes del medio nutritivo para la suspensión celular

3.4.4. Elicitación

En la cámara de flujo laminar se realiza un filtrado de las suspensiones celulares, y una separación de las células en grupos de 4g, los cuales se añaden a 40 mL de medio nutritivo.

Pasadas 24 horas, se separan 3 grupos de Erlenmeyer:

- 3 control: 150 µl de medio de cultivo.
- 3 etanol: 150 µl de etanol al 100%
- 3 *Moringa*: 150 µl de extracto de *Moringa* 133 mg/ml.

Se recogerán muestras a las 24 horas y a las 96 horas.

3.4.5. Obtención del medio celular.

Una vez recogidas las muestras se filtra separando así las células del apoplasto. En este TFG trabajaremos con las células.

Resuspendemos las células con 1mL metanol al 80% y las incubamos a 70°C durante 30 minutos. Tras esto, se centrifugan a 10000 rpm durante 10 minutos, recogiendo posteriormente el sobrenadante.

3.4.6. Extracción de fenoles.

Se realizará la extracción de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo la técnica de Díaz et al. (2001)

Se realizan 3 réplicas de cada una de las muestras, obteniendo así un total de 27 muestras. Se toman 100 µl de cada muestra, 1mL del reactivo de Folin diluido (1:10). Se incuba 4 minutos a oscuridad, y tras esto se añade 1000 µl de CO₃Na al 7% y 400 µl de H₂O. Tras esto se agita y se incuba durante 90 minutos a oscuridad.

Por último, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 760 nm. Una vez obtenidas las absorbancias, se calcula la concentración por medio de la recta de calibrado del ácido gálico:

$Y=5.599x + 0.013$; siendo x la concentración (mg fenólicos / ml) (Fernández Vázquez, 2018)



Figura 3: Muestras una vez realizado el test de Folin, observando el cambio en la coloración.

3.4.7. Determinación de la actividad antioxidante.

Se determina la actividad antioxidante por medio de la técnica DPPH, siguiendo la técnica de Thaipong et al. (2006). Mezclamos 950µl de DPPH oxidado con 50 µl de muestra. Se agita y se mide la absorbancia a 550 nm. Se repite el proceso 3 veces para cada muestra.

Una vez obtenidas las absorbancias, se calcula el DPPH reducido por medio de la siguiente fórmula

$$\text{DPPH reducido} = ((A_0 - A_m) - A_0) * 100$$

siendo A₀ el valor de la absorbancia de la referencia y A_m el valor de la absorbancia de cada muestra.

Los datos obtenidos se extrapolan de una recta de calibrado realizada con Trolox, el cual es un análogo hidrosoluble de la vitamina E con actividad antioxidante. La recta utilizada fue: $y = 0,8938x + 3,7336$ (Verde Yáñez, 2017). A partir de esta ecuación se obtiene el % de DPPH reducido.

3.5. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se representan en gráficas obtenidas en el programa Microsoft Office Excel 2010 y se analizan los datos con el programa R i386 3.4.3.

- a) *Test paramétricos*. Dentro de los test paramétricos, el primero que aplicamos es el test de Shapiro, como test de medida de la normalidad. Se realizó también el test de Bartlett para comprobar la homocedasticidad (varianzas iguales). Tras corroborar la normalidad de nuestros datos y que tienen varianzas iguales, aplicamos el test de análisis de varianzas ANOVA, el cual comprueba si hay diferencias de las medias entre los grupos, y su correspondiente post-hoc, el test de Tuckey, el cual indica entre qué grupos hay diferencias.
- b) *Test no paramétricos*. Dentro de los test no paramétricos, utilizamos el test de Kruskal Wallis como homólogo al test ANOVA.

La significación utilizada para todos los estadísticos realizados fue del 95%, por lo que se utilizó un $\alpha=0,05$.

4.Resultados y discusión:

4.1. Obtención de *vitro plant*.

La primera fase del proceso de cultivo *in vitro* es la desinfección del material vegetal y el secado del mismo en la cámara de flujo laminar, para evitar la contaminación, ya que el medio de cultivo es idóneo para el crecimiento de bacterias y hongos.

Primero se envuelven las semillas de *C. annuum* en una gasa y se realiza un lavado con etanol al 70% seguido de un lavado con hipoclorito sódico al 20%. A continuación se llevan a la cámara de flujo laminar donde se realizan 3 lavados consecutivos con agua destilada para eliminar los residuos de los lavados anteriores. Y tras esto, se dejan secar el tiempo necesario para eliminar la humedad. Se introducen las semillas en un bote de cristal donde anteriormente se ha introducido el medio de cultivo necesario para esta primera fase de *vitro plant*. Finalmente se introducen en la cámara de cultivo, donde se dejarán 8 días hasta obtener las plántulas de pimiento.

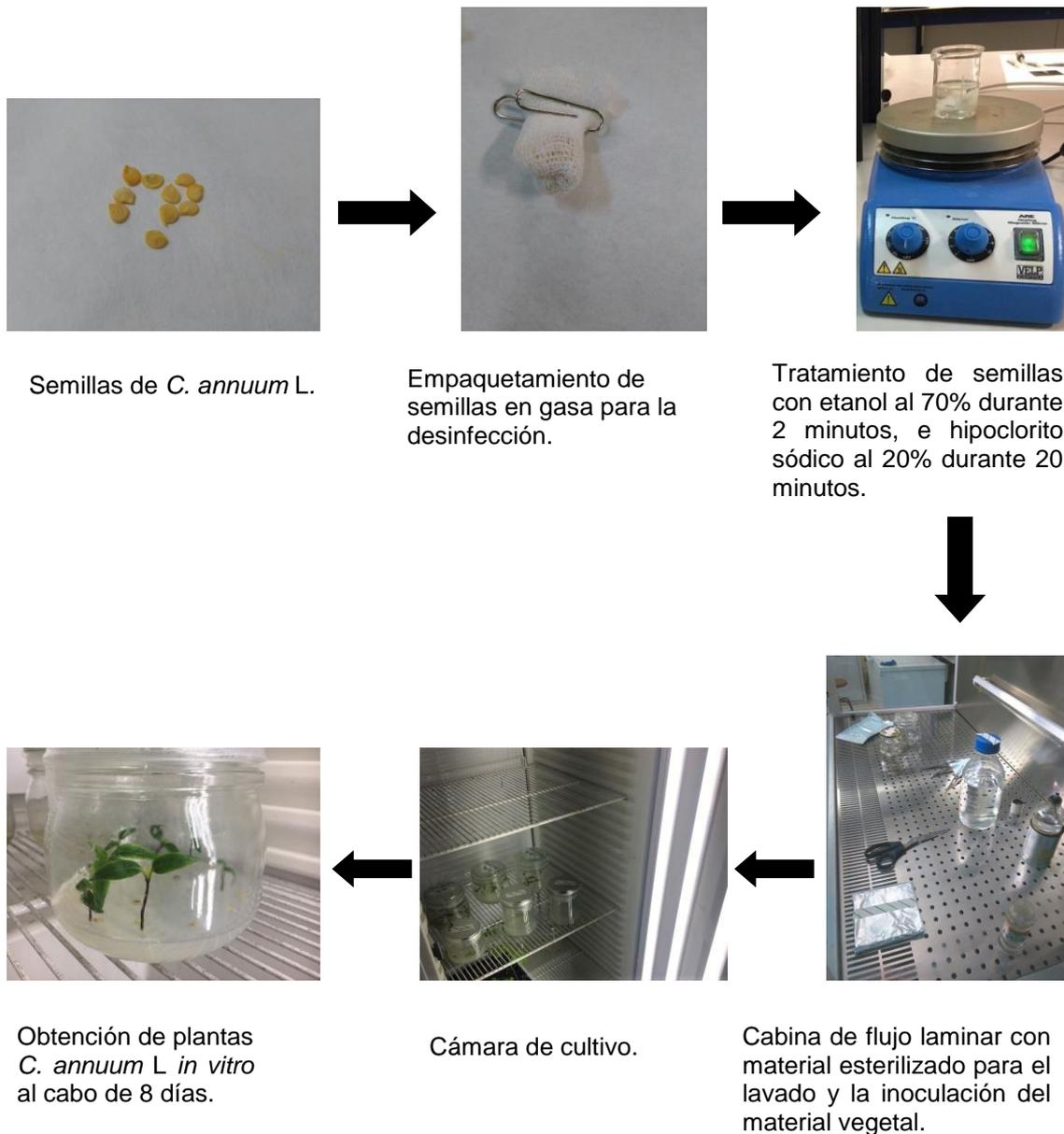


Figura 4: Esquema de la obtención de vitro plant.

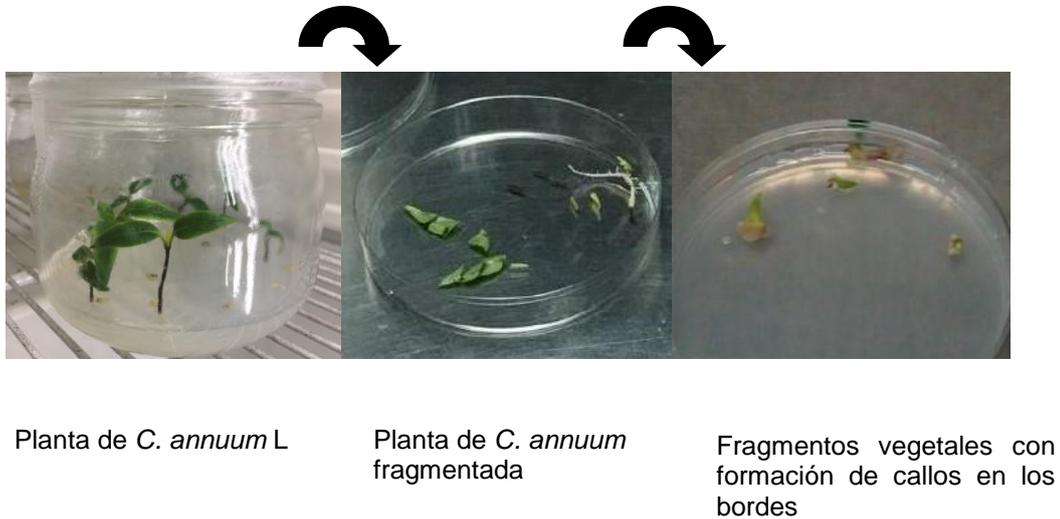
4.2. Obtención de callos y repicado.

Tras la obtención de la plántula de pimiento, se realiza la inducción del callo y su posterior repicado.

Para ello se recogen las hojas jóvenes y el tallo con el ápice de las plántulas con mejor aspecto, ausentes de clorosis y de envejecimiento. Tras esto se realizan una serie de cortes longitudinales de dichas partes en la cámara de flujo laminar, y se introducen en una placa Petri con un medio nutritivo con hormonas. Se dejan en la cámara de cultivo durante un mes, a temperatura ambiente y en oscuridad.

Después de dicho tiempo, los explantes incubados presentan una masa de células en el borde, el callo, el cual se recoge y se deposita en otra placa Petri

con medio nutritivo enriquecido con hormonas. Se introduce en la cámara de cultivo a temperatura ambiente y en oscuridad para que se desarrollen.



Callo completamente desarrollado.

Figura 5: Esquema de la obtención de callos.

4.3. Obtención de suspensiones celulares.

Para iniciar las suspensiones celulares, en la cámara de flujo laminar se cogen 8 gr de callos y se llevan a un Erlenmeyer con 40 ml de medio líquido enriquecido con hormonas. Tras este proceso se obtiene una suspensión celular de color blanca, donde están los callos diluidos. A continuación se llevan a la cámara de cultivo, donde se incuban con agitación continua y oscuridad.

La suspensión está lista para ser repicada a los 10 días, donde se observa un anillo de crecimiento en el borde del Erlenmeyer y un cambio en la coloración a un color más oscuro, al mismo tiempo que se observa un aumento claro de la densidad. Cuando esto ocurre se lleva a cabo el repicado de las suspensiones, las cuales se vuelven a introducir en la cámara de cultivo, en oscuridad y agitación. Una vez que se produce el crecimiento en las suspensiones celulares repicadas, se puede proceder a realizar las técnicas necesarias para la determinación de la concentración de fenoles y la actividad antioxidante.

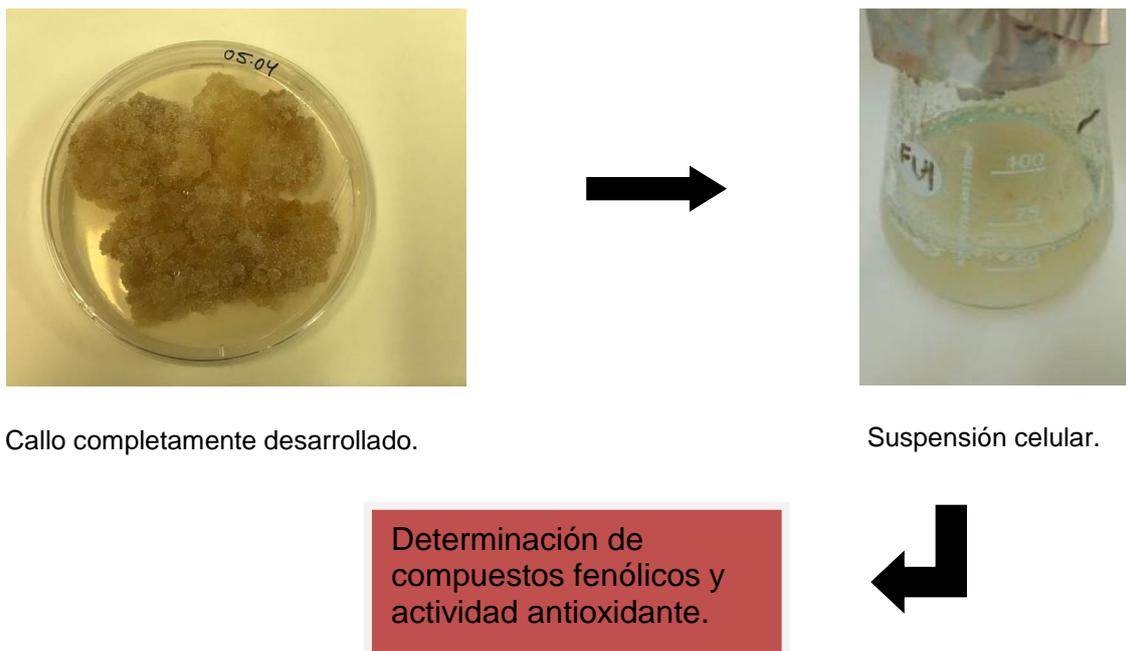


Figura 6: Esquema de la obtención de suspensiones celulares.

4.4. Determinación de los compuestos fenólicos.

Para poder determinar el contenido de compuestos fenólicos es necesaria una recta patrón, en este caso la recta de calibrado del ácido gálico, que nos permite obtener la concentración de nuestra muestra a partir de las absorbancias. En este TFG cogemos como referencia la siguiente recta de calibrado: $y = 0,8938x + 3,7336$, siendo “y” los datos de la absorbancia y “x” la concentración de la muestra (Fernández, 2018).

En este ensayo se han determinado la cantidad de compuestos fenólicos en las células vegetales, tras la elicitación con *Moringa*, su correspondiente control con medio nutritivo y etanol, recogiendo muestras a 24 horas y 96 horas. Estos datos fueron los siguientes:

Gráfico de los compuestos fenólicos.

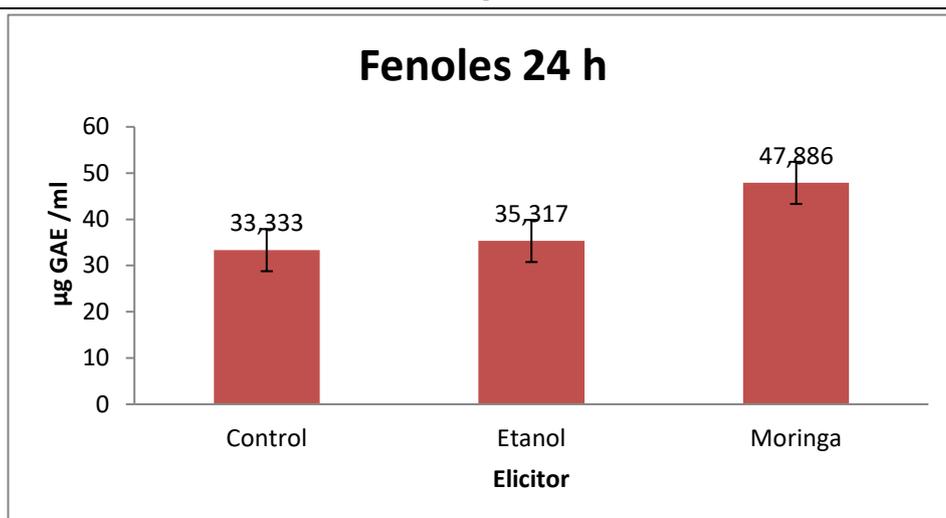


Figura 7: Gráfico representativo del efecto de los distintos elicitores frente a la concentración de $\mu\text{g GAE/ml}$ medido a las 24 horas después del tratamiento.

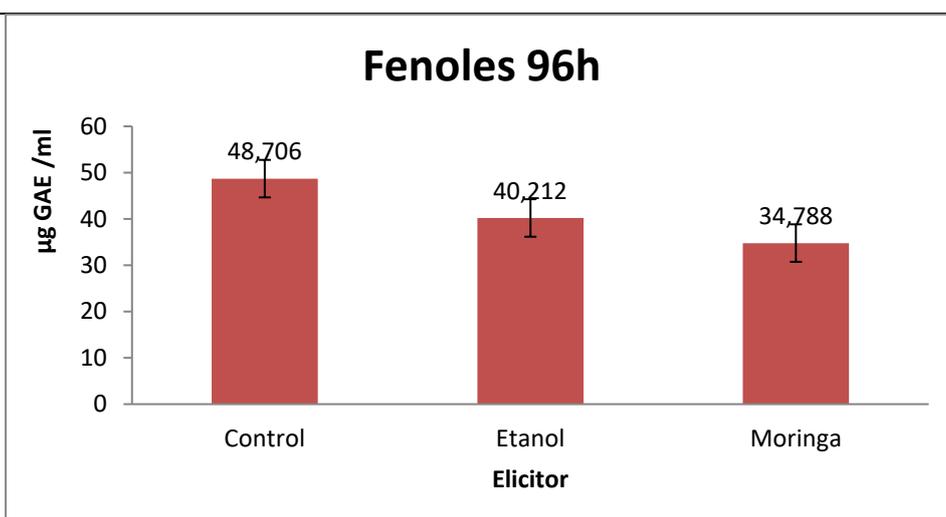


Figura 8: Gráfico representativo del efecto de los distintos elicitores frente a la concentración de $\mu\text{g GAE/ml}$ medido a las 96 horas después del tratamiento.

Pruebas estadísticas de los compuestos fenólicos

Fenoles 24h	
Test Shapiro	p-valor=3.964e-11
Test Kruskal-Wallis	p-valor= 0.0003891

Tabla 4: Resultados de las distintas pruebas estadísticas realizadas para la concentración de fenoles a 24 horas en las células vegetales.

Fenoles 96h	
Test Shapiro	p-valor=0.3924
Test Barlett	p-valor=0.6848
ANOVA	p-valor= 0.00069
Tuckey E-C	p-valor=0.0316
Tuckey M-C	p-valor=<0.001
Tuckey M-E	p-valor=0.2150

Tabla 5: Resultados de las distintas pruebas estadísticas realizadas para la concentración de fenoles a 96 horas en las células vegetales.

En la figura (7) se representan la concentración de fenoles en *C. annuum* frente a los distintos tratamientos (Control, Etanol y *Moringa*) a las 24 horas. Las células de las muestras de *C. annuum* tratadas con *Moringa* presentan una concentración de 47.67 µg/ml, siendo la concentración más elevada, con respecto a las muestras tratadas con etanol, con una concentración media de 35.32 µg/ml y a las muestras del control, con una concentración de 33.33 µg/ml, siendo esta última la menor concentración.

La figura (8) representa la concentración de fenoles a 96 horas con respecto a los distintos tratamientos (Control, Etanol y *Moringa*). Se observa que hay una mayor concentración de fenoles en el control, al tener una media de 48,70 µg/ml, con respecto al etanol (40.21 µg/ml), y a la *Moringa*, que representa la menor concentración con 34.78 µg/ml.

El análisis estadístico para la concentración de fenoles a 24 horas se representa en la tabla (4). En primer lugar, se realizó el test de Shapiro, para determinar la normalidad de los datos. Con un p-valor menor de 0.05, se determina que nuestros datos no son normales, por lo que realizamos el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, determinando así que hay diferencias significativas entre los tratamientos.

El análisis estadístico para la concentración de fenoles a 96 horas se representa en la tabla (5). Éste se basó en un primer análisis de la normalidad de los datos (test de Shapiro), dando como resultado unos datos normales. Para poder realizar el test de varianza ANOVA, se tiene que corroborar que las varianzas sean iguales, por medio del test de Barlett. Una vez confirmado que ambas varianzas son iguales se realiza el test ANOVA, el cual es significativo, esto quiere decir que, para 96 horas, hay diferencias significativas entre nuestros datos. Por último, se realiza el test post-hoc de Tuckey, y se observa que hay diferencias significativas entre las muestras del control y el etanol, además de las muestras del control y la *Moringa*.

4.4.1. Análisis estadístico a las 24 horas y 96 horas.

Comparando los resultados de la concentración de fenoles a 24 horas y a 96 horas reflejadas en las figuras (7) y (8), se ha observado que la elicitación con *Moringa* aumenta considerablemente los niveles de fenoles a las 24 horas y disminuye a las 96 horas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Aslam et al. (2013) el cual observa un aumento en la concentración de fenoles de la planta de espinaca al elicitarla con extracto de *Moringa*.

Una posible explicación es que los extractos de *Moringa* activan las defensas de las plantas (Martín et al., 2013), aumentando la concentración de fenoles a las 24 horas, bien por su riqueza en vitaminas o por la inducción de un estrés.

Los resultados de Mendoza et al (2018) muestran un aumento de los fenoles intracelulares a las 96 horas, independientemente del elicitor, por lo que podemos suponer que en nuestro experimento se llegó a una fase de agotamiento a las 96 horas, y debido a esto se produjo la reducción en la concentración de los mismos, como se observa en los resultados de Perucka & Materska (2001) donde se analizó la fracción lipofílica de *C. annuum*, y se observó a que 72 horas se reducía la concentración de fenoles debido al agotamiento del elicitor.

Los resultados de Fernández Vázquez (2018) y Verde Yáñez (2017) en el medio extracelular demuestran un aumento en la concentración de fenoles a medida que pasa el tiempo, como también lo demuestran los resultados de Miras-Moreno et al. (2016) en los cuales la adición de elicitores a las suspensiones celulares aumenta la producción de fenoles extracelulares. Una posible explicación es que la síntesis de los compuestos fenólicos tiene lugar en el interior celular y por lo tanto hay un aumento a las 24 horas. Mientras que a las 96 horas hay una reducción de fenoles en el contenido celular, debido a que se expulsa al medio extracelular, por lo que hay un descenso en la concentración de fenoles intracelulares, y un aumento en la concentración extracelular.

Además, se observa un aumento significativo en la concentración de fenoles en las células en relación a la concentración de fenoles en el medio extracelular al comparar nuestros resultados con los obtenidos en el experimento de Fernández Vázquez (2018), ya que la concentración de fenoles más elevada que obtuvo fue 6.81 µg/m, mientras que en nuestro experimento la concentración más elevada de fenoles fue 48,70 µg/ml.

Análisis estadístico a las 24 horas y a las 96 horas	
Test Shapiro	p-valor=3.964e-11
Test Kruskal-Wallis	p-valor = 0.0003891

Tabla 6: Resultados de las distintas pruebas estadísticas realizadas para la comparación de la concentración de fenoles a 24 y 96 horas en las células vegetales.

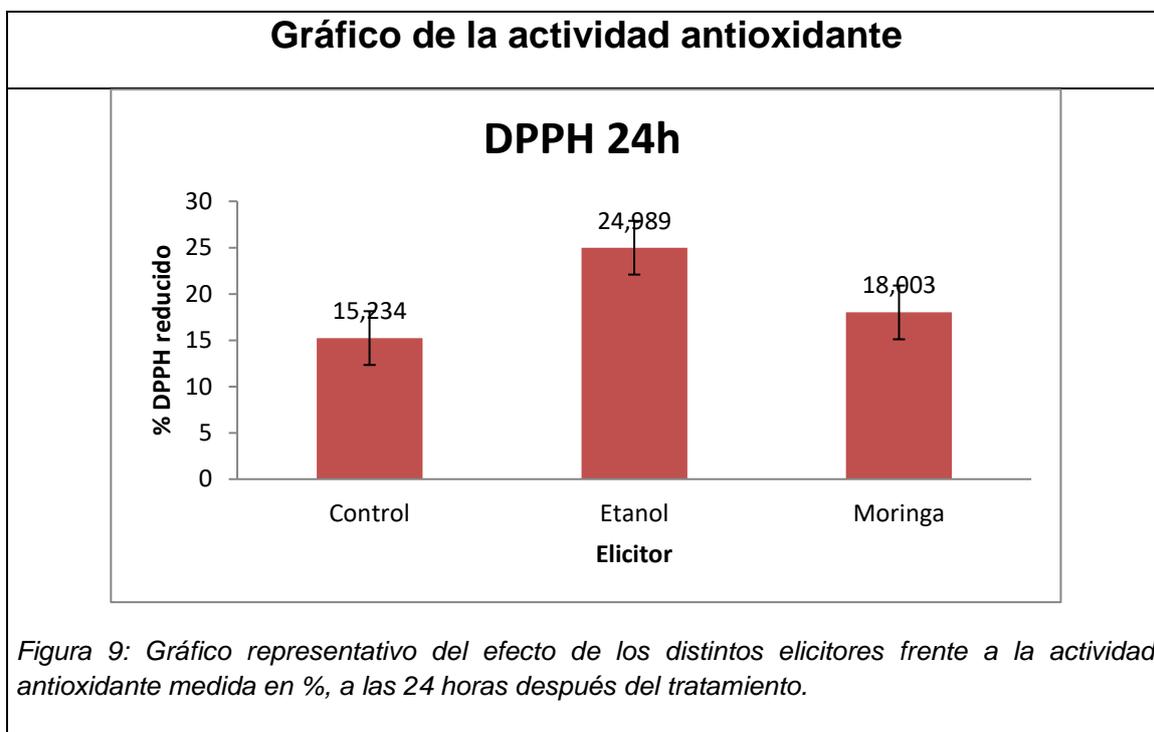
En la tabla (6) se representa la comparación entre la concentración de fenoles a 24 horas y a 96 horas. Se realizó en primer lugar un test de normalidad, test Shapiro, el cual nos indica que nuestros datos no son normales. Por consiguiente, se realiza el test Kruskal-Wallis, siendo este significativo, y por consecuencia que haya diferencias significativas entre la concentración de fenoles a 24 horas ya 96 horas.

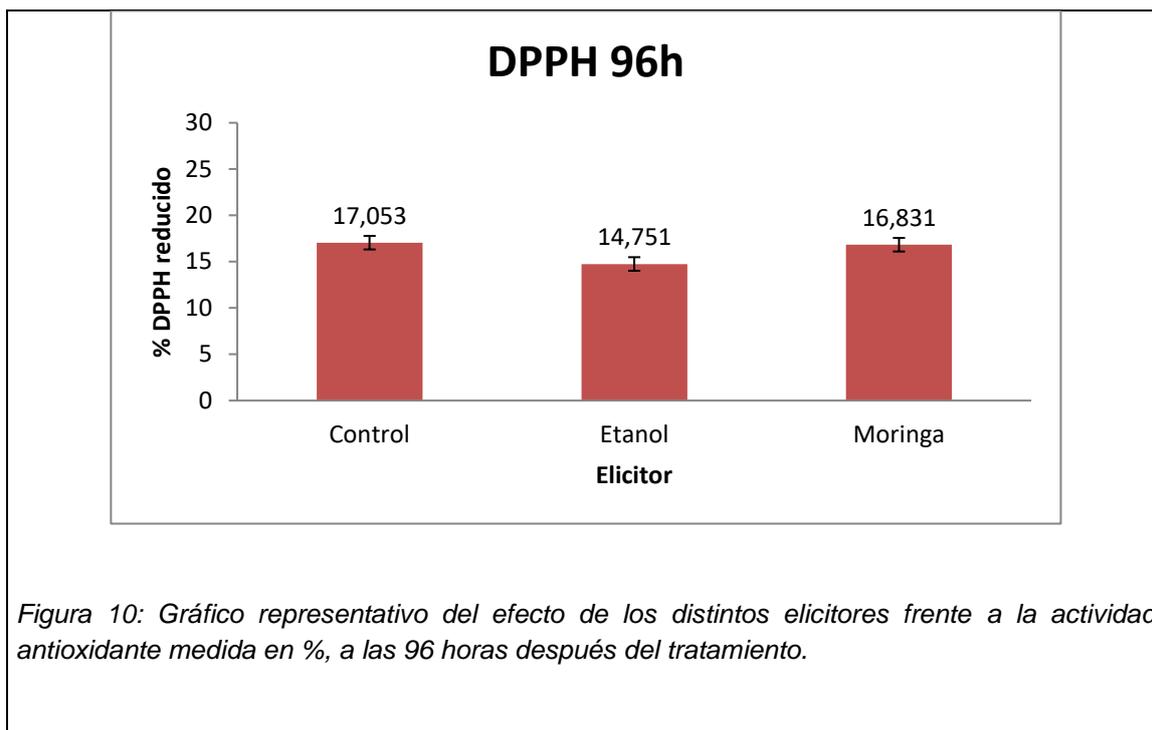
4.5. Determinación de la actividad antioxidante.

En este ensayo se ha determinado la actividad antioxidante del contenido celular de *C. annuum* en distintos tratamientos (Control, Etanol y *Moringa*), por medio de la recta de calibrado Trolox. Esto nos permite obtener la concentración en equivalentes de las muestras. La recta utilizada fue:

$$y = 0,8938x + 3,7336 \text{ (Verde Yáñez, 2017)}$$

Se recogieron los datos a 24 horas y a 96 horas. Estos fueron los siguientes:





Pruebas estadísticas de la actividad antioxidante	
DPPH 24h	
Test Shapiro	p-valor=0.02989
Test Kruskal-Wallis	p-valor=0.00005583
Tabla 7: Resultados de las distintas pruebas estadísticas realizadas para la actividad antioxidante a 24 horas en las células vegetales.	
DPPH 96h	
Test Shapiro	p-valor=0.1569
Test Barlett	p-valor= 0.4422
ANOVA	p-valor=0.0504
Tabla 8: Resultados de las distintas pruebas estadísticas realizadas para la actividad antioxidante a 96 horas en las células vegetales	

La figura (9) muestra la actividad antioxidante de las muestras de *C. annuum* a 24 horas, tras la elicitación con los distintos tratamientos (Control, Etanol y *Moringa*). Se observa una elevada actividad antioxidante en las muestras tratadas con etanol, con una actividad del 25 %. Mientras que, en menor medida, se encuentra la actividad antioxidante del tratamiento de *Moringa* con un porcentaje del 18 % y el tratamiento control, con el valor más bajo de actividad antioxidante, un 15 %.

En la figura (10) se muestra la actividad antioxidante de las células de *C. anuumm* a 96 horas. Se observa que el tratamiento con etanol presenta el menor porcentaje de actividad antioxidante con un 15%, mientras que la *Moringa* tiene un 16.8%. Nos encontramos que el tratamiento que más actividad antioxidante posee es el control, con un 17%.

Los datos del análisis estadístico se representan en la tabla (7) a las 24 horas. En primer lugar, se realizó el test de normalidad Shapiro, donde nos indica que nuestras muestras tienen una distribución no paramétrica. Tras esto se realiza el test de Kruskal-Wallis, donde se muestra que nuestros datos son significativos, por lo que hay diferencias significativas entre las muestras.

Los datos del análisis estadístico se muestran en la tabla (8) a las 96 horas. Se realizó el test de normalidad Shapiro, el cual indica que nuestras muestras tienen una distribución paramétrica. Tras eso se realizó el test de varianzas Barlett, que nos indica que nuestras muestras tienen varianzas iguales. Por lo que se aplica el test ANOVA, donde se muestra que nuestros datos no son significativos.

4.5.1. Análisis estadístico a las 24 horas y 96 horas.

Comparando las figuras (9) y (10) se observa que hay un aumento en la actividad antioxidante de las muestras elicitadas con *Moringa* y etanol a 24 horas, y, sin embargo, a las 96 horas hay una reducción de dicha actividad antioxidante.

Esto ocurre de la misma manera en los compuestos fenólicos, habiendo una relación entre ambos, ya que la *Moringa* contiene compuestos antioxidantes, entre los cuales se encuentran los fenoles, lo cual le permite una protección frente al daño oxidativo (Martín et al., 2013). Por tanto, ambos procesos están correlacionados, como se observa en este experimento. También se observa en el experimento realizado por González Casas (2017) donde los resultados muestran un aumento en la actividad antioxidante y en la concentración de fenoles en las primeras 48 horas.

Los resultados de Fernández Vázquez (2018) y Verde Yáñez (2017) no muestran una correlación entre la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos ya que la actividad antioxidante es una combinación de diversos factores, por lo que no siempre están relacionados.

Análisis estadístico a las 24 horas y a las 96 horas	
Test Shapiro	p-valor= 0.02989
Test Kruskal-Wallis	p-valor = 0.00005583

Tabla 9: Resultados de las distintas pruebas estadísticas realizadas para la comparación de la actividad antioxidante a 24 y 96 horas en las células vegetales.

Estadísticamente se comprobó que nuestras muestras eran significativamente diferentes, al realizar el test de Shapiro, y por consiguiente el test Kruskal-Wallis, dando resultados significativos. Por tanto, se puede afirmar que hay diferencias significativas entre las muestras a 24 horas y a 96 horas.

5. Conclusiones

-Las suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var *annuum* se muestran como un sistema adecuado para estudiar la respuesta de las células de pimiento al proceso de elicitación con extracto de *Moringa* ya que hemos obtenido resultados fiables.

-La elicitación con extracto de *Moringa* eleva significativamente la concentración de fenoles de las células vegetales de las suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var *annuum* a las 24 horas.

- La elicitación con extracto de *Moringa* eleva significativamente la actividad antioxidante de las células vegetales de *Capsicum annuum* L. var *annuum* a las 24 horas.

5.Conclusión

-As suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var *annuum* mostrarse como un sistema adecuado para estudiar a resposta das células de pimento ao proceso de elicitación con extracto de *Moringa* xa que obtivemos resultados fiables.

-A elicitación con extracto de *Moringa* eleva significativamente a concentración de fenoles das células vexetais das suspensións celulares de *Capsicum annuum* L. var *annuum* ás 24 horas.

-A elicitación con extracto de *Moringa* eleva significativametne a actividade antioxidante das células vexetais de *Capsicum annuum* L. var *annuum* ás 24 horas.

5.Conclusions

-The cellular suspensions of *Capsicum annuum* L. var *annuum* are shown as proper system to study the response of the pepper cells to the elicitation

process with *Moringa* extract since accurate and reliable results have been obtained.

-The elicitation with *Moringa* extract leaves increases significantly the concentration of the phenols in the cells from the cell suspensions of *Capsicum annuum* L. var *annuum* after 24 hours

-The elicitation with *Moringa* extract leaves increases significantly the antioxidant activity of the plant cells of *Capsicum annuum* L. var *annuum* after 24 hours.

6. Bibliografía

Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21(1), 17–25.

Aslam, M., Sultana, B., Anwar, F., Munir, H. (2016). Foliar spray of selected plant growth regulators affected the biochemical and antioxidant attributes of spinach in a field experiment. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(2), 136-145.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.

Cárdenas-Rodríguez, N., & Pedraza-Chaverri, J. (2005). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Profesores Al Día (Biomedicina)*, 164–173.

Codesal García, V. (2016). Diseño experimental para la obtención de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. Grao en Biología Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología Área de Fisiología Vegetal. A Coruña. Universidade da Coruña. Facultade de Ciencias

Coronado H, M., Vega y León, S., Gutiérrez T, R., Vázquez F, M., & Radilla V, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206–212.

Díaz, J., Bernal, A., Pomar, F., & Merino, F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, 161(1), 179–188.

Estopà Bagot, M. (2005). El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *Viveros*, 50–56.

Fernández Vázquez, Á. (2018). Estudio de la capacidad antioxidante del medio extracelular de suspensiones elicidadas con un extracto de hojas de *Moringa oleifera*. Grao en Biología Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología Área de Fisiología Vegetal. A Coruña. Universidade da Coruña. Facultade de Ciencias.

García Martínez, E., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (n.d.). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Departamento de

- Gutiérrez, F. J. (2016). Aplicación biotecnológica de bacterias rizosféricas: elicitation de sistemas defensivos sistémicos en relación con la producción de compuestos con interés farmacológico y alimentario. Universidad Complutense, Madrid.
- Martín, C., Martín, G., García, A., Fernández, T., Hernández, E., & Puls, J. (2013). Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*, 36(2), 137–149.
- Mendoza, D., Cuaspu, O., Arias, J. P., Ruíz, O. & Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology reports*, 19.
- Mendoza García, L. O. (2015). Uso de *Moringa* como biofertilizante foliar en pimiento variedad sweet/cubanelle (*Capsicum annuum* L.) en la granja santa inés. Universidad Técnica, Machala.
- Miras-Moreno, B., Sabater-Jara, A. B., Pedreño, M. A., & Almagro, L. (2016). Bioactivity of phytosterols and their production in plant in vitro cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7049-7058.
- Muñoz Juárez, M. A., Gutierrez. D. M. (2004). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol. *Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
- Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* (Vol. 82). Instituto de Biología, UNAM.
- Perucka, I., & Materska, M. (2001). Phenylalanine ammonia-lyase and antioxidant activities of lipophilic fraction of fresh pepper fruits *Capsicum annuum* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(3), 189–192.
- Segretín, E. (n.d.). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales) Las bases biológicas del cultivo de tejidos: la totipotencialidad celular. *ArgenBio, Consejo Argentino para la Información y Desarrollo de la Biotecnología*.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355–363.
- Szabados, L., Mroginski, L. , & Roca, W. . (1993). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. En Szabados, L., Mroginski, L. ., & Roca, W (1993) . *Cultivo de tejidos en la agricultura* (173-211). Colombia, CIAT.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675.
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 278–286.
- Verde Yáñez, L. (2017). Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitor un extracto de hojas de *Moringa oleifera*. Grao en Biología Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología Área de Fisiología

Vexetal. A Coruña. Universidade da Coruña. Facultade de Ciencias.

