

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR Y CONSUMO DE SUSTRATO
A PARTIR DEL ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES DE
Borojoa patinoi cuatrec.**

**CAROLINA CABALLERO MUNERA
NATALIA CARDONA DÍAZ**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS
ESCUELA DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD EAFIT
MEDELLIN
2006**

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR Y CONSUMO DE SUSTRATO
A PARTIR DEL ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES DE
Borojoa patinoi cuatrec.**

**CAROLINA CABALLERO MUNERA
NATALIA CARDONA DÍAZ**

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos**

**Asesor
CESAR HERNANDEZ
Biólogo MSc Biotecnología**

**Co-Asesora
CATALINA GIRALDO ESTRADA
Ingeniera de Procesos**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS
ESCUELA DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD EAFIT
MEDELLIN
2006**

Nota de Aceptación

Jurado

Jurado

Medellín, 23 de Noviembre de 2006

A nuestras familias por darnos su apoyo incondicional, por ayudarnos a superar todos los momentos difíciles y por todo el sacrificio que han hecho para que logremos los objetivos que nos hemos propuesto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan el agradecimiento a todas las personas que colaboraron en la realización de este proyecto:

A Catalina Giraldo Estrada, Co-asesora del Proyecto, por su ayuda constante y desinteresada.

A César Augusto Hernández, Asesor del Proyecto Biólogo MSc Biotecnología, por su asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al personal de los laboratorios de Ingeniería de Procesos por su colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE GRÁFICAS.....	9
LISTA DE FOTOS.....	10
LISTA DE ANEXOS.....	11
RESUMEN.....	12
1.INTRODUCCIÓN.....	13
2.OBJETIVO GENERAL.....	15
3. MARCO TEÓRICO.....	16
3.1 Generalidades del borojó.....	16
3.1.1 Descripción botánica.....	17
3.1.2 Condiciones climáticas.....	18
3.1.3 Fruto.....	18
3.1.4 Plagas e insectos.....	19
3.1.5 Composición química.....	20
3.1.6 Producción nacional e internacional.....	24
3.1.7 Usos y Aplicaciones.....	24
3.2 Metabolitos secundarios.....	26
3.2.1 Taninos.....	27
3.2.2 Antraquinonas.....	28
3.2.3 Flavonoides.....	29
3.2.4 Sesquiterpenos.....	29
3.3 Suspensiones celulares.....	30
3.3.1 Cultivo de tejidos.....	30
3.3.2 Inicio y establecimiento.....	31
3.3.3 Requerimientos de las suspensiones celulares.....	32
3.3.4 Morfología de las células.....	33
3.3.5 Curva de crecimiento.....	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1 Localización.....	36
4.2 Origen y selección del material vegetal.....	36
4.3 Obtención del material vegetal.....	36
4.4 Establecimiento in Vitro de los explantes.....	36
4.4.1 Desinfección de la semilla.....	36
4.4.2 Obtención de plántulas a partir de semillas.....	37
4.4.3 Obtención y Mantenimiento de callos friables.....	37
4.5 Establecimiento de suspensiones celulares.....	38
4.5.1 Desagregación Celular.....	38
4.5.2 Establecimiento de las suspensiones celulares.....	41
4.5.3 Diseño de experimentos.....	41
4.5.4 Cinética de crecimiento de las suspensiones celulares.....	42
4.6 Análisis químicos.....	45
4.6.1 Identificación de componentes.....	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47

5.1 Establecimiento in Vitro de los explantes	47
5.1.1 Desinfección de la semilla	47
5.1.2 Obtención de plántulas a partir de semillas	47
5.1.3 Obtención y Mantenimiento de callos friables.....	48
5.2 Establecimiento de suspensiones celulares.....	49
5.2.1 Desagregación Celular	49
5.2.2 Establecimiento de las suspensiones celulares.....	54
5.2.3 Determinación de proteína extracelular	68
5.2.4 Determinación de azúcares no reductores.....	70
5.2.5 Determinación de azúcares reductores.....	72
5.3 Análisis químicos	72
5.3.1 Identificación de componentes	73
CONCLUSIONES.....	75
RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición Química de los frutos de <i>Borojoa patinoi</i> C (Gómez, 1988)	21
Tabla 2. Valor Nutricional de 100 gramos de pulpa de <i>Borojoa patinoi</i> C (Mosquera et al., 1995)	22
Tabla 3. Análisis semicuantitativo de los elementos presentes en las cenizas del <i>Borojoa patinoi</i> C (Arango et al., 1985)	23
Tabla 4. Velocidades específicas de crecimiento de biomasa para los tratamientos A, B y C en las suspensiones celulares de <i>B. patinoi</i>	57
Tabla 5. Resultados Cromatografía de capa fina para identificación de metabolitos secundarios extracelulares en suspensiones celulares de <i>B. patinoi</i>	73

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Estructura Química de las Antraquinonas	28
Gráfica 2. Curva de crecimiento de las células en suspensiones celulares	35
Gráfica 4. Efecto de la Ampicilina sobre la cinética celular	52
Gráfica 5. Cinética de crecimiento celular de <i>B. patinoi</i> para los tratamientos A, B, C y D	56
Gráfica 6. Cinética de crecimiento celular de <i>B. patinoi</i> para los tratamientos A y C	59
Gráfica 7. Cinética de crecimiento celular de <i>B. patinoi</i> para los tratamientos B y D	60
Gráfica 8. Presencia o ausencia de la luz en presencia de 2,4-D sobre el crecimiento celular.	61
Gráfica 9. Cinética de crecimiento celular de <i>B. patinoi</i> para los tratamientos A y D	62
Gráfica 10. Cinética de crecimiento celular de <i>B. patinoi</i> para los tratamientos A y B	63
Gráfica 11. Cinética de crecimiento celular de <i>B. patinoi</i> para los tratamientos C y D	63
Gráfica 12. Relación biomasa húmeda y biomasa seca de suspensiones celulares en la cinética de crecimiento de <i>B. patinoi</i>	65
Gráfica 13. Relación BH/BS para el tratamiento A en suspensiones celulares de <i>B. patinoi</i>	66
Gráfica 14. Relación BH/BS para el tratamiento C en suspensiones celulares de <i>B. patinoi</i>	66
Gráfica 15. Gráfico comparativo de pH para los tratamientos A, B, C y D en las suspensiones celulares	68
Gráfica 16. Proteína total extracelular para los tratamientos A, B, C y D en suspensiones de <i>B. patinoi</i>	69
Gráfica 17. Azúcares no reductores para los tratamientos A, B, C y D en suspensiones celulares de <i>B. patinoi</i> con un nivel de confianza del 95%.71	
Gráfica 18. Azúcares reductores para los tratamientos A, B, C y D en suspensiones celulares de <i>B. patinoi</i> .	72

LISTA DE FOTOS

Foto 1. Semillas para obtención de plántulas en medio MS 1962	37
Foto 2. Callos obtenidos para el establecimiento de las suspensiones celulares	38
Foto 3. Montaje Jeringa	39
Foto 4. Montaje muestreo Pipeta y Vaciado	40
Foto 5. Desarrollo de plántulas in Vitro. a: explantes, b: raíz delgada, c: plántula (30 días), d: plántula (45 días)	47
Foto 6. Callos friables obtenidos para las suspensiones celulares	48
Foto 7. Primer montaje para la determinación del muestreo en la desagregación celular. Arriba: Montaje en el día cero, Abajo: Suspensión fenolizada día seis.	50
Foto 8. Contaminación microbiana en la suspensión de Borojó en el segundo montaje (Observada en microscopio con lente 100 X)	50
Foto 9. Tubos de centrifuga estériles	51
Foto 10. Secuencia de la desagregación celular (Izquierda: día cero, Medio: día dos, Derecha: día ocho)	53
Foto 11. Tinción con azul de Evans para células en periodo de desagregación (día 6 de cultivo)	54
Foto 12. Células de borojó durante el periodo de desagregación (día 6)	
Foto 13. Suspensiones celulares de <i>B. patinoi</i> . Izquierda: día cero de cultivo, Derecha: día 13 de cultivo	55
Foto 14. Cromatografía de capa fina para identificación de sesquiterpenlactonas	74

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	84
ANEXO B	85
ANEXO C	87
ANEXO D	88
ANEXO E	89
ANEXO F	90
ANEXO G	91
ANEXO H	92
ANEXO I	94
ANEXO J	96
ANEXO K	98

RESUMEN

El *Borojoa patinoi cuatrec* es una planta originaria del departamento del Chocó. Es ampliamente reconocida por sus propiedades medicinales y nutricionales debido a su contenido de aminoácidos esenciales y fósforo, así como sus metabolitos secundarios: triterpenos (sesquiterpenos), taninos, fenoles y antraquinonas.

En este estudio se evaluó el efecto de la luz (presencia y ausencia) y la hormona 2,4-D (0 y 1 mg/L) para el establecimiento de suspensiones celulares de *B. patinoi*, observando su crecimiento celular, la producción de proteínas extracelulares y producción de azúcares. Para lo cual se obtuvieron callos friables de *B. patinoi*, éstos se emplearon en el establecimiento de las suspensiones celulares. Se encontró que el tiempo de desagregación fue de seis días para un inóculo inicial de 20 g BH/L, el crecimiento de biomasa necesita por lo menos de la presencia de uno de los dos factores para que se presente un óptimo crecimiento; el contenido de proteína total extracelular aumentó con la edad del cultivo, siendo la máxima 6.88 g/L en el día 9 de cultivo en el tratamiento con 1 mg/L de 2,4-D y en ausencia de luz. Las suspensiones celulares de *B. patinoi* presentan una producción de azúcares no reductores y reductores, por lo tanto no fue posible obtener un consumo neto de estos. En pruebas cualitativas se encontró la presencia de sesquiterpenlactonas como uno de los principales metabolitos secundarios.

Palabras Clave: *Borojoa patinoi cuatrec*, suspensiones celulares, desagregación celular, proteína extracelular, azúcares no reductores, 2,4-D.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son una de las principales fuentes de compuestos bioquímicos, los cuales se emplean en medicamentos, pesticidas, colorantes, saborizantes y fragancias. (Kieran et al., 1997). El Borojó (*Borojoa patinoi* Cuatrec.) es ampliamente reconocido por sus propiedades medicinales y nutricionales debido a su contenido de aminoácidos esenciales, fósforo, y metabolitos secundarios: triterpenos (sesquiterpenos), taninos, fenoles y antraquinonas.

Algunos compuestos bioquímicos producidos por las plantas son los metabolitos secundarios, los cuales parecen no tener una función directa con el crecimiento y desarrollo de las plantas (no participan en los procesos de respiración, fotosíntesis y en la asimilación de nutrientes), pero la formación de estos depende de las condiciones de crecimiento, en particular, de la composición del medio de cultivo. También se diferencian en que solamente se encuentran en algunas especies de plantas mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2002).

Las suspensiones celulares son una alternativa comparada con los métodos de cultivos tradicionales o la síntesis química de los compuestos bioquímicos; con esta técnica se puede alcanzar un rápido crecimiento celular, se pueden obtener altos rendimientos en la producción de biomasa lo que lleva a una alta obtención de metabolitos secundarios (más de la encontrada en la planta madre), y la producción no se ve afectada por las condiciones climáticas o geográficas, ya que en el laboratorio se pueden controlar todas estas variables que afectan directamente la producción de estos compuestos. Estas suspensiones celulares buscan controlar y simular las condiciones de estrés en las células e inducir las rutas metabólicas secundarias aumentando la producción de los compuestos de interés. En Colombia, estas técnicas no son ampliamente estudiadas en la producción de metabolitos secundarios, siendo principalmente empleadas para mejoramiento genético, propagación de especies y producción de plantas transgénicas.

Muchos metabolitos secundarios se acumulan en mayores cantidades en las suspensiones celulares que en su estado nativo, esto se logra por medio de la optimización de las condiciones del cultivo, y la manipulación de los factores físicos siendo lo más cercano a la optimización de la productividad.

Con base en lo expuesto se realizó este trabajo en el cual se evaluaron diferentes condiciones para el establecimiento de suspensiones celulares de *B. patinoi* con miras a la producción de metabolitos de alto valor agregado de esta especie.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes condiciones de cultivo para el crecimiento celular y consumo de sustrato a partir del cultivo de células en suspensión de *Borjoia patinoi* *cuatrec.*

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el tiempo necesario para la desagregación celular (tiempo de adaptación) para una cantidad determinada de inóculo.
- Determinar la cinética de crecimiento celular mediante la cuantificación de biomasa por el método de peso seco, con el fin de establecer el tiempo de crecimiento celular.
- Evaluar el consumo de azúcares no reductores mediante el método de DNS, con el fin de establecer su relación con el crecimiento celular.
- Establecer la relación entre proteína total extracelular presente en las suspensiones celulares con el crecimiento celular mediante métodos colorimétricos.
- Evaluar el efecto de la presencia o ausencia de luz en el crecimiento celular para establecer condiciones de cultivo adecuadas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades del borojón

El borojón (*Borojoa patinoi*) es una especie propia del sotobosque selvático del interior del Departamento del Chocó (cuenca media alta del Atrato San Juan) y de la Amazonía Colombiana en donde las condiciones ambientales de humedad, sombrero natural y demás factores ecológicos, actúan e influyen para dar origen a esta nueva especie de plantas tropicales. Es una especie que ha evolucionado con el ritmo de la interacción selva-hombre dándole características especiales al sentido de la evolución cultural del pueblo chocoano. (Córdoba, 1988; Rengifo *et al.*, 2004).

Adicionalmente, bajo las condiciones ecológicas anteriormente mencionadas, se reportan en la actualidad las siguientes especies de borojón: En Colombia: *B. patinoi Cuatr*, *B. duckey stey*, en Venezuela: *B.universitatis stey*, *B. venezuelensis stey* y en el Brasil Amazónico: *B. sorbilis*, *B. stipularis Ducke (Cuatr)*, *B. verticillata Ducke (Cuatr)*, pero la especie típica del género *Borojoa* es la *patinoi Cuatr* (Arenas, 1985)

En Colombia las especies más estudiadas son la *Borojoa sorbilis*, y la *Borojoa patinoi Cuatr*. Sin embargo, la especie *B. patinoi* es mucho más conocida y se encuentra actualmente cultivada en los departamentos de Antioquia, Valle, Cauca, Tolima y los Llanos Orientales, entre otros (Reyes, 2000). Aunque es una especie originaria del departamento del Chocó, actualmente se está diseminando por todo el territorio colombiano, incluyendo la Amazonia, la zona cafetera y el Magdalena Medio ya que su rango de adaptación es bastante amplio. (Giraldo, 2004)

El borojón (*Borojoa patinoi*) es una planta dioica (con árboles machos y árboles hembras), perteneciente a la familia *Rubiaceae* al igual que el café (*Coffea arabica*) y no presenta problemas serios de plagas o enfermedades.

Clasificación taxonómica (Arenas 1985; Arenas en Velasco, 1987; Jiménez, 1987; Erazo, 1999; Reyes, 2000).

Reino: Vegetal
División: Fanerógamas
Subdivisión: Angiosperma
Clase: Angiosperma, Magnoliopsida, Dicotiledónea
Subclase: Asteridae
Orden: Rubiales
Familia: *Rubiaceae*
Tribu: *Gardenias*
Sub tribu: *Cordieriae*
Género: *Borojoa*
Especies: *B. Sorbilis*,
B.patinoi Cuatr.
B.universitatis stey.
B. venezuelensis.stey
B.duckey stey.
B.stipularis Ducke (Cuatr)
B. verticillata Ducke (Cuatr)
B. lanceolata (cham)
B. claviiflora

Su aspecto general es un arbusto de tres a cinco metros de altura en condiciones normales o comunes, tallo erecto y hojas de mayor tamaño que la del café. Especie que también pertenece a la familia de las *Rubiaceae* (Córdoba, 1988)

3.1.1 Descripción botánica

B. patinoi es un árbol pequeño, tipo arbusto, con 3 a 5 m de altura (Córdoba, 1988), aunque puede llegar a alcanzar alturas hasta de 6 m.

Su tallo es liso de color marrón oscuro, las hojas son opuestas, coriáceas, con 30 a 40 cm. de longitud por 15 cm. de ancho (Erazo, 1999).

3.1.2 Condiciones climáticas

El Borojó crece bien en regiones por debajo de los 800 msnm, con una temperatura promedio de 28°C, humedad relativa entre 80 y 86% y precipitaciones desde 1600 y superiores a 4000 mm/año (Córdoba, 1988), mostrando un mejor comportamiento en precipitaciones entre 5000 y 6000 mm/año (Jiménez, 1987); brillo solar de 1.320 horas/año, con requerimientos de suelos bien drenados, ricos en materia orgánica, aunque se ha desarrollado en suelos de amplia plasticidad con dominancia de arcillas y con características ácidas debido a su relación con microorganismos micorrizales (Mosquera *et al.*, 1995), pH entre 4.5- 5.5, aunque la especie tiene gran facilidad para adaptarse a diferentes tipos de suelo (Erazo, 1999). Para su cultivo es importante tener en cuenta que el borojó es exigente en agua (lluvia o riego) pero no en cuanto a la cantidad total sino a la buena distribución semanal de ésta (40-50 mm semanales) (Reyes, 2000).

El Borojó al ser una rubiácea, es un cultivo que requiere estar asociado con otro cultivo o con árboles que le den sombrío (Velasco, 1987). La exposición directa a los rayos solares causa quemazón en los frutos y los afecta en su crecimiento (Erazo, 1999).

Desde el punto de vista químico, algunos de los elementos requeridos por el Borojó son el fósforo y el calcio, brindándole características al fruto de ser rico en carbohidratos, calcio y fósforo (Córdoba, 1988).

3.1.3 Fruto

El fruto de *B. patinoi* es una baya de forma redonda, piriforme. La envoltura es de color verde y se torna a un color café rojizo cuando está madura. El mesocarpio es de color castaño, carnoso, con un aroma agradable cuando

está maduro. El fruto tiene un peso promedio entre 450 a 600 g con 8 a 10 cm de diámetro aproximadamente, es altamente ácido, con un pH de 2,8 – 3,0; que tiene características de interés alimenticio, medicinal e industrial, que lo posicionan como un recurso genético promisorio. El número de semillas que produce aproximadamente es de 300 y tienen forma triangular. El fruto ha tenido aceptación comercial por sus efectos afrodisíacos y por su alto contenido de fósforo, que llega hasta 160 mg por cada 100 g de fruto. Una vez el fruto ha alcanzado una coloración parda, se empieza a recubrir de un tejido fungoso grisáceo, que no penetra hasta la parte comestible o pulpa, por lo cual el borjón se puede conservar por periodos muy largos sin refrigerarse, aún en las regiones cálidas y húmedas de las selvas tropicales (Pereira, 1998)

El borjón se propaga generalmente por semillas; sin embargo, los árboles macho, no productores de frutos, no son fenotípicamente diferenciables de las hembras. Es imposible separar los árboles de acuerdo con su sexo en el momento de establecer un cultivo, ya que las características sexuales solo se reconocen en la edad de floración (Rengifo *et al.*, 2004).

El fruto fisiológicamente maduro, presenta condiciones excepcionales para la farmacopea, la industria y la alimentación. Actualmente, se utiliza en la alimentación bajo formas diferentes, tales como: chicha (por los indígenas), jugos (solo o mezclado con otras frutas), jaleas, mermeladas, bocadillos (solo o mezclados), helados, paletas, salsas agrídulces (para carne y/o pescado) mezclador de bebidas alcohólicas, compotas (para niños), pastas liofilizadas, pastas deshidratadas y extractos en esencias y ampollitas (Rengifo *et al.*, 2004).

3.1.4 Plagas e insectos

En cuanto a plagas, la especie no presenta problemas de gran incidencia que puedan limitar su desarrollo y fructificación ni que afecten en forma económica y menos aún cuando se encuentra bajo sistemas agroforestales. Sin embargo,

se han registrado las siguientes especies causando algunos daños en las plantas: (Reyes, 2000).

Con respecto a insectos se pueden presentar:

- *Saisetia coffeae* (Homóptera, Coccidae).
- *Chrisomphalus dictyospermi* (Homóptera, Diaspididae).
- *Anticarsia sp* (Lepidóptero, Noctuidae) (Jiménez *et al.*, 1987).
- *Atta cephalotes* (Córdoba, 1988)

En el fruto se desarrolla con mucha frecuencia el hongo *Penicillum sp (notatum)*, este se retira antes de consumir la fruta o de emplearla en la industria. Pero también este hongo se puede emplear en la obtención de la penicilina.

En cuanto a enfermedades, el Borojó es muy resistente pero se pueden observar algunos síntomas por deficiencias causadas por falta de algunos elementos menores, especialmente de boro o de hierro generando la aparición de manchas negras en la cáscara de la fruta y su posterior cuarteadura y engrosamiento, producido por la acción de los rayos solares directos (Córdoba, 1988).

3.1.5 Composición química

El Borojó está constituido por pulpa en un 88 % y el 12 % restante son semilla y cáscara (Dupont, 1992). Su composición química se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición Química de los frutos de Borojoa patinoi C (Gómez, 1988)

DETERMINACIÓN	PULPA MADURA
Humedad (%)	57.11
Proteína (%)	1.1
Grasa (%)	0.2
Carbohidratos (%)	3.9
Fibra (%)	10.2
Cenizas-(%)	2.4
Azúcares reductores (%)	6.4
Sólidos solubles (T =20 °C)	30
pH (T =20 °C)	3.1

Este fruto tiene un contenido de agua libre menor que la mayoría de las frutas, característica que le protege contra el ataque de microorganismos, aumentando además el contenido de sólidos solubles necesarios para el proceso de industrialización. Su contenido en fibra es bastante alto, comparado con otras frutas, y el pH bajo es importante como efecto inhibidor en el desarrollo de microorganismos y enzimas (Gómez, 1988). El valor nutricional del Borojó se muestra en la Tabla 2.

Los análisis bromatológicos han mostrado que el Borojó es rico en elementos básicos de la alimentación humana como: Hierro, magnesio, calcio, fósforo, aluminio, sodio, titanio, silicio, boro, cobre, níquel y plomo entre otros, como se muestra en la Tabla 3. Las semillas tienen una humedad del 36 %, 0.9 % de grasa, 11 % de proteína, 0.9 % de cenizas, 13 % de carbohidratos y 39 % de fibra cruda y algunos aminoácidos (Mosquera *et al.*, 1995).

**Tabla 2. Valor Nutricional de 100 gramos de pulpa de *Borojoa patinoi* C
(Mosquera et al., 1995)**

COMPONENTE	UNIDAD	VALOR
Agua	g	64.7
Proteína	g	1.1
Grasa	g	0.0
Carbohidratos	g	24.7
Ceniza	g	1.2
Fósforo	mg	160.0
Calcio	mg	25
Hierro	mg	1.5
Tiamina	mg	0.30
Niacina	mg	2.3
Riboflavina	mg	0.12
Acido ascórbico	mg	3.0
Vitamina C	mg	3.1

Tabla 3. Análisis semicuantitativo de los elementos presentes en las cenizas del *Borojoa patinoi* C (Arango et al., 1985)

ELEMENTO		CANTIDAD
Fe	Hierro	0.5 %
Mg	Magnesio	2.0%
Ca	Calcio	5.0%
Ti	Titanio	0.005%
Al	Aluminio	0.2%
Na	Sodio	1.5%
Si	Silicio	Trazas
Mn	Manganeso	20 ppm
B	Boro	150 ppm
Cr	Cromo	10 ppm
Cu	Cobre	150 ppm
Mo	Molibdeno	5 ppm
Ni	Niquel	5 ppm
Pb	Plomo	16 ppm
P	Fósforo	10000 ppm
Fe	Hierro	0.5 %
Mg	Magnesio	2.0%
Ca	Calcio	5.0%
Ti	Titanio	0.005%
Al	Aluminio	0.2%
Na	Sodio	1.5%
Si	Silicio	Trazas
Mn	Manganeso	20 ppm
B	Boro	150 ppm
Cr	Cromo	10 ppm
Cu	Cobre	150 ppm
Mo	Molibdeno	5 ppm
Ni	Niquel	5 ppm
Pb	Plomo	16 ppm
P	Fósforo	10000 ppm

3.1.6 Producción nacional e internacional

En Colombia, el cultivo del Borojó no sólo es originario del litoral pacífico, sino que también se haya concentrado y se distribuye desde allí; es por esto que los Departamentos del Chocó y el Valle del Cauca son los productores más representativos a nivel nacional, siendo Chocó el más importante, donde se conoce mejor la fruta y donde se encuentra la posibilidad de negocio a gran escala, ya que en este solo Departamento se hallan 174 productores de la fruta, concentrados en Quibdó, Lloró, Istmina, Condoto y Bojayá.

En Lloró se distinguen dos épocas de producción: la de abundancia (60 a 80% de la producción) entre noviembre y marzo, cuando las lluvias tienden a disminuir y la de baja producción; entre abril y octubre, cuando aumenta la precipitación pluvial (Anónimo¹, 2006)

Su producción está entre 12 y 25 frutos por árbol al año para los primeros años de cultivo y hasta 30 frutos en los años siguientes, con una vida productiva de hasta 60 años por árbol.

En cuanto a la producción internacional de la fruta como grandes productores se identifican las poblaciones amazónicas nativas de Perú, Ecuador, Colombia y en Belem do Pará, Brasil, donde el período de cosecha está concentrado en los meses de febrero y marzo; y en menor proporción países como México y las Antillas. En estos mercados se encuentran las cuatro variedades de Borojó conocidas en el mundo (Anónimo¹, 2006).

3.1.7 Usos y Aplicaciones

A este fruto se le atribuyen propiedades anticancerígenas debido a que tiene sustancias que actúan como inhibidores de la reproducción celular. También contiene elementos básicos de la alimentación humana como: Hierro, magnesio, calcio, aluminio, sodio, titanio, silicio, boro, cobre, níquel

y plomo y un alto contenido de fósforo (60 mg/ 100 g de la pulpa) (Dupont, 1992; Mosquera *et al.*, 1995).

El Borojé ha sido utilizado durante muchos años como especie medicinal y nutricional, por lo que se le atribuyen muchas propiedades en el tratamiento de enfermedades estomacales, estreñimiento, desgarraduras de los músculos, afecciones en los pulmones, el bazo, el hígado, la difteria y la lepra (Erazo, 1999).

Dentro de sus efectos conocidos se encuentra que ha sido fundamental en la evolución cultural del departamento del Chocó, ya que los indígenas Chocoes lo seleccionaron y lo adaptaron para embalsamar cadáveres y para cicatrizar heridas, prácticas que continúan en las comunidades negras en el Atrato y en el San Juan (Rengifo *et al.*, 2004).

Uno de los principales potenciales del borojé según Echeverry *et al.*, (1981) es la producción de fitoalexinas, que en la mayoría de los casos, han demostrado poseer acción antifúngica y bactericida, además de ser biodegradables.

También tiene ciertos beneficios especulativos:

- Tratamiento de infecciones bronquiales
- Equilibra el azúcar en la sangre
- Controla la hipertensión arterial
- Controla las funciones genésicas de la mujer
- Aumenta la potencia sexual

Hasta ahora no se le ha encontrado ningún componente que sirva como estimulante sexual. Lo que sí se sabe, es que el Borojé es el fruto más rico en fósforo en el mundo. Es por esto quizás, que se le atribuyen “poderes”, ya que aunque éstos no existen, sí se sabe que el fósforo es un posible generador de energía, la cual es vital para realizar cualquier tipo de actividad.

3.2 Metabolitos secundarios

Las sustancias producidas por las células vegetales y que son compuestos nativos de las plantas no asociados al metabolismo energético primario, son denominados metabolitos secundarios. Los compuestos secundarios aparentemente no tienen una función en el metabolismo primario vegetal, pero algunas veces cumplen un papel ecológico, representando adaptaciones químicas a ambientes de estrés o sirviendo como defensores químicos contra microorganismos, insectos y en algunos casos de otras plantas (Capataz, 2005). Estos compuestos son particulares a grupos taxonómicos determinados (especie, género, familia).

Los metabolitos secundarios son acumulados en las plantas en pequeñas cantidades y son sintetizados por células específicas y en diferentes etapas del desarrollo vegetal. Los compuestos obtenidos a partir de células vegetales son más fáciles de purificar debido a la ausencia de cantidades significativas de pigmentos (Capataz, 2005).

La formación del metabolito secundario no es vital para el vegetal, aunque cumplen misiones de naturaleza muy diversa. Por ejemplo, muchos metabolitos están implicados ecológicamente en la relación planta-organismo, como los pigmentos de las flores, que atraen a los insectos polinizadores, o los compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos (sustancias alelopáticas), o que protegen a la planta productora de infecciones (fitoalexinas) o de los depredadores (disuasorios nutritivos). Otros metabolitos secundarios tienen misiones fisiológicas (Anónimo ², 2005).

El metabolismo secundario vegetal es una fuente importante de principios activos de medicamentos y de otros productos químicos valiosos (esencias, colorantes, insecticidas o aditivos nutritivos) (Anónimo ², 2005).

Los metabolitos secundarios en los cultivos de células vegetales se pueden generar en todo el año, no hay limitaciones con respecto a las estaciones, la producción es segura, previsible, e independiente del tiempo. Algunas veces, el

rendimiento puede exceder la cantidad que se encuentra en la naturaleza (Lila, 2005). La inducción de metabolitos depende de múltiples factores y la concentración de las sustancias de interés en el medio de cultivo va a determinar en gran medida el costo del producto.

Actualmente, se registran un gran número de metabolitos secundarios producidos por las plantas. Dentro de los metabolitos presentes en la especie del borjón se encuentran triterpenos, antraquinonas, sesquiterpenos, flavonoides y taninos.

3.2.1 Taninos

El término tanino se emplea para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales, capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando la putrefacción. Se suelen establecer dos grandes grupos: Los taninos hidrolizables y los taninos condensados (estos últimos se encuentran ampliamente en el reino vegetal) (Anónimo², 2005).

Los taninos son compuestos polifenólicos, hidrosolubles, de sabor astringente; conocidos y empleados desde hace muchos siglos por su propiedad de ser capaces de curtir las pieles; esto se debe a su capacidad para unirse a macromoléculas como carbohidratos y proteínas. Precipitan con sales de metales pesados, proteínas y alcaloides. Dentro de los vegetales suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides y proteínas (Anónimo³, 2005).

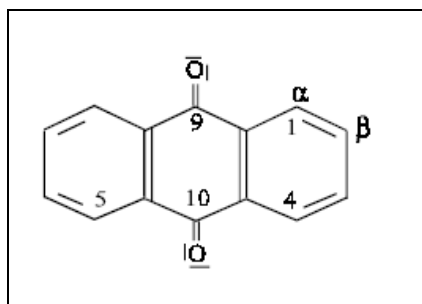
El uso más antiguo conocido de estas sustancias, como ya se ha comentado, es en la industria de los curtidos, debido a que se establecen enlaces entre las fibras de colágeno de la piel; los taninos y las macromoléculas se combinan gracias a los grupos fenólicos de los primeros formando puentes de hidrógeno, a la vez se establecen enlaces covalentes que son los que aseguran que la unión perdure a lo largo del tiempo. De las actividades farmacológicas de los taninos se destacan sus propiedades astringentes, tanto por vía interna como

tópica, poseen también propiedades vasoconstrictoras por lo que se utilizan en el tratamiento de afecciones vasculares como varices o hemorroides y en pequeñas heridas (cicatrizantes) (Anónimo³, 2005).

3.2.2 Antraquinonas

Las antraquinonas son sustancias fenólicas de tipo heterósido (unidas a azúcares, generalmente glucosa), presentes en algunas drogas purgantes. Las antraquinonas constituyen el grupo más numeroso de las quinonas naturales y son la base y fuente de una importante cantidad de colorantes. Suelen ser compuestos de color rojo anaranjado, soluble en agua a altas temperaturas o en alcohol diluido. El ensayo de Bornträger suele emplearse para su detección (Domínguez, 1988). Su estructura química se puede observar en la Gráfica 1.

Gráfica 1. Estructura Química de las Antraquinonas (Anónimo⁴, 2006)



La acción más específica de este grupo de sustancias es su capacidad de estimular la musculatura lisa intestinal. Paralelamente, también inhiben la reabsorción de agua a través del intestino grueso, lo cual llega a ocasionar una mayor dilución del contenido intestinal. En conjunto produce un claro efecto laxante que no se manifiesta al instante, sino después de unas 6 ó 7 horas. Las plantas que contienen antraquinonas se comportan como laxantes o purgantes según la dosis y, por tanto, tienen una acción específica contra el estreñimiento (Anónimo⁵, 2005).

Las antraquinonas naturales pueden hallarse en la corteza y en la raíz de diversos géneros y especies de las familias: *Rubiaceae*, *Rhamnaceas*, *Poligonaceas*, entre otras (Anónimo⁶, 2006).

3.2.3 Flavonoides

Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal: responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización, tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre, protegen la planta de los efectos nocivos de la radiación UV y ejercen una eficaz actividad antioxidante. Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo (Anónimo³, 2006; Anónimo⁷, 2006).

3.2.4 Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son un amplio grupo de terpenoides que presentan más de 200 estructuras cíclicas diferentes; muchos de estos sesquiterpenos tienen funciones de defensa en plantas y algunas sesquiterpeno sintetasas son capaces de dar lugar a más de 25 productos diferentes (Anónimo⁵, 2005).

Se conocen más de 500 compuestos de este grupo. No son únicamente importantes desde el punto de vista químico y quimiotaxonómico, sino también por poseer muchos de ellos actividad antitumoral y antimicrobiana (Anónimo⁸, 2006).

3.3 Suspensiones celulares

3.3.1 Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos fue introducido para facilitar la propagación clonal de especies hortícolas. En la propagación clonal las plantas son reproducidas asexualmente y los nuevos individuos son idénticos a la planta original. Pequeños trozos de tejido vivo (explantes) son aislados de un organismo y cultivados asépticamente por periodos de tiempo indefinido en un medio nutritivo (Lee, 1996).

La técnica de cultivos vegetales va unida a la totipotencia celular, es decir, la capacidad de las células para regenerar el fenotipo de la planta de la que provienen. Esto puede ocurrir de dos maneras: organogénesis (conduce a la diferenciación de meristemos caulinares que originan tallos o raíces adventicias) y embriogénesis somática (conduce a la formación de embriones somáticos, es decir, asexuados o sin fecundación) (Villalobos y Torpe, 1991; Segura, 1993). En ambos tipos de morfogénesis, el desarrollo y crecimiento de los órganos y embriones de interés pueden hacerse directa o indirectamente (Villalobos y Torpe, 1991; Lee, 1996).

El cultivo de células en suspensión consiste en un conjunto de células aisladas, así como de agregados celulares (que van de 2 a 100 células) distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento, siendo esta una de las formas para mantener y propagar las células vegetales. Este método de cultivo es un proceso implementado para llevar a cabo estudios sobre inducción de la embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación, organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición, bioquímica y metabolismo, así como de la obtención de diversos productos secundarios tales como algunos fenoles, antraquinonas, antocianina, nicotina etc. Esta técnica es empleada en el mejoramiento genético, dando esta técnica la mayor posibilidad de células mutadas para expresarse y formar, por consiguiente, plantas mejoradas que pueden ser seleccionadas posteriormente por procesos biotecnológicos como son la selección *In Vitro* y la transformación genética (Gómez, 1998).

Las suspensiones celulares se han obtenido en infinidad de especies vegetales, así como la regeneración de plantas vía organogénesis y embriogénesis somática (Gómez, 1998).

Una suspensión celular ideal estará caracterizada por una homogeneidad tanto morfológica como bioquímica. Sin embargo, muchas suspensiones establecidas por largo tiempo presentan una diversidad genética en su población de células, usualmente como resultado de diferencias en el número de cromosomas y en la morfología de los cromosomas. Tal heterogeneidad no puede ser eliminada desde una población con diferentes tipos de células (Gómez, 1998).

3.3.2 Inicio y establecimiento

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión puede lograrse directamente transfiriendo porciones de callo o de embriones somáticos en estado globular al medio líquido. El establecimiento de las suspensiones a partir de fragmentos de callo es más rápido, aunque depende generalmente de la friabilidad del tejido calloso. Esta es la propiedad que tienen las células de separarse unas de otras después de una división celular con relativa facilidad, lo cual está muy relacionado con las propiedades de la pared celular, que puede modificarse al variar algunos componentes del medio de cultivo como son fitohormonas (altas concentraciones de auxinas y bajas de citoquininas mejoran esta propiedad), algunas sales, minerales y vitaminas (Gómez, 1998).

La auxina (hormona) 2,4-D en el medio de cultivo incrementa el crecimiento desordenado de las células formándose el callo. Aun cuando el callo presente alta friabilidad, el cultivo en suspensión se establece después de un período de adaptación celular al medio líquido. Esta etapa se denomina etapa de desagregación celular, donde se liberan las células del callo por el movimiento del medio líquido, el cual queda compuesto por agregados celulares de

diversos tamaños, células nuevas producto de la división celular, fragmentos residuales del inóculo y restos de células muertas (Gómez, 1998).

El tiempo de desagregación celular depende de la especie a cultivar y de la cantidad de callo a inocular pero, en general, se extiende desde 15 a 35 días. Después de este periodo es necesario eliminar los restos celulares y agregados grandes de células (Gómez, 1998). Para el establecimiento de suspensiones celulares de café se ha reportado que el tiempo de desagregación celular es de 12 días (Gallardo *et al.*, 2000).

La cantidad de inóculo a utilizar (callo) varía desde 1 a 20 gr en 50 ml de medio de cultivo, dependiendo del objetivo que se persigue con la suspensión celular. Mientras mayor cantidad del inóculo inicial se emplee, mas rápido se establecerá el cultivo en suspensión (Gómez, 1998).

Generalmente se trabaja con un volumen ocupado correspondiente a un cuarto del volumen total del erlenmeyer. Con relación a las condiciones del cultivo, luz y temperatura necesarias para el desarrollo óptimo de la suspensión existen rangos muy amplios dependiendo de la especie a cultivar, se prefiere el cultivo en condiciones de oscuridad, aunque en algunos casos se recomienda la luz indirecta (Gómez, 1998). La biosíntesis de los metabolitos secundarios es elevada por factores como la luz, como en el caso de algunos alcaloides presentes en el café (*Coffea arabica*) los cuales aumentan al exponer las células a irradiación lumínica, debido a que la luz estimula algunas enzimas que están involucradas en el metabolismo secundario de la planta (Kurata *et al.*, 1997).

3.3.3 Requerimientos de las suspensiones celulares

Las células en su crecimiento requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos, clasificables como macro y micro nutrientes, que deben suministrarse en el medio de cultivo.

En general, los componentes que conforman un medio de cultivo son:

- Fuente de Carbono (carbohidratos): sus funciones son ser fuente de energía y mantener en el medio un potencial osmótico determinado, la fuente de carbono más utilizada es la sacarosa y su cantidad comúnmente adicionada es de 20 a 30 g/l.
- Nutrientes y minerales: La selección y niveles de sales se basa fundamentalmente en los requerimientos de la planta. Un componente esencial del medio es el hierro ya que éste ayuda al crecimiento y a la morfogénesis en cultivos *in vitro*.
- Vitaminas: La adición de vitaminas tiene importancia en su acción como coenzimas.
- Sustancias reguladoras de crecimiento: La relación auxinas/ citoquininas generalmente es la responsable de la inducción de callos, planta completa o embriones.
- Fuentes de nitrógeno reducido: Se ha encontrado que el ion NH_4^+ (suministrado como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3) proporciona mayor crecimiento, pero la adición de aminoácidos no dan como resultado un particular aumento de crecimiento.
- Microelementos: su ausencia genera problemas fisiológicos en las plantas (Roca *et al.*, 1993).

3.3.4 Morfología de las células

Los cultivos de células en suspensión generalmente son heterogéneos con células aisladas y pequeños agregados celulares. La proporción entre ambos así como su tamaño, depende de la especie vegetal, de la edad del tejido, de la composición del medio y del ambiente.

Generalmente, la información perteneciente a la citología de las células *In Vitro* sugiere que la medida promedio de las células varía entre 25 y 475 μm dependiendo de su forma; esta puede ser alargada, ovalada o redonda.

En las suspensiones celulares se encuentran tres tipos de células :

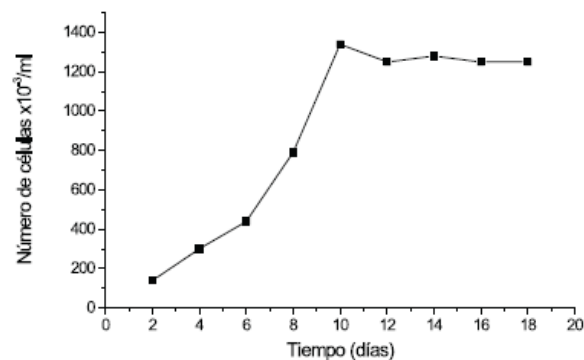
- **Células meristemáticas:** son células pequeñas con envoltura nuclear definida y núcleo central o laterizado con nucleolo, pared de mediano grosor y en ocasiones gruesa. La membrana celular está cercana a la pared, el citoplasma es compacto con escasas y pequeñas vacuolas.
- **Células parenquimáticas:** son células de mayor talla, con el núcleo y el citoplasma rechazado hacia la periferia por la expansión de la vacuola. El núcleo contiene uno o dos nucleolos. La pared celular es delgada, y la membrana está cerca de la pared.
- **Células gigantes:** son células en las que la vacuola ocupa el espacio intracelular y ha comprimido hacia la pared al núcleo y al citoplasma con todos sus organelos. A tales efectos se aprecian paredes celulares delgadas.

Cuando se analizan los tipos de células en el desarrollo de una suspensión, predominan las células meristemáticas en los primeros días, luego aparecen las parenquimáticas y al final predominan las gigantes, lo cual es sinónimo de envejecimiento de la suspensión (Gómez, 1998).

3.3.5 Curva de crecimiento

En una suspensión celular es indispensable determinar cual es el momento en donde las células han agotado los componentes del medio, necesitando de medio de cultivo fresco para continuar sus procesos fisiológicos normales. Para conocer dicho momento es necesario realizar una curva de crecimiento. Esta curva depende del tipo y cantidad de inóculo utilizado para iniciar las suspensiones. La curva se puede apreciar en la Gráfica 2.

**Gráfica 2. Curva de crecimiento de las células en suspensiones celulares
(Gallardo *et al.*,2000)**



La fase de retraso se observa cuando en un medio fresco se subcultivan suspensiones celulares que están en la fase estacionaria; los cultivos crecen lentamente durante 1 a 3 días. La fase de retraso no se presenta o es muy corta, si se subcultivan suspensiones que están en el periodo de crecimiento.

En la fase exponencial, la velocidad específica de crecimiento es constante. El uso de bajas densidades en la iniciación del cultivo o el de elevadas concentraciones de nutrientes en el medio, pueden prolongar la fase exponencial.

Durante la fase de desaceleración, la tasa específica de crecimiento disminuye uniformemente con el tiempo para alcanzar finalmente la fase estacionaria en la cual, no hay crecimiento neto en la síntesis de biomasa o en el número de células (Roca *et al.*, 1993).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT ubicado en la ciudad de Medellín a 1420 msnm con una temperatura ambiente promedio de 25°C.

4.2 Origen y selección del material vegetal.

El material vegetal se obtuvo de la Central Mayorista de Antioquia, la cual actúa como centro de acopio y distribución de una amplia variedad de frutales y hortalizas para los habitantes del municipio de Medellín.

4.3 Obtención del material vegetal

- Para la regeneración de las plantas *in Vitro*, se obtuvieron semillas de frutos maduros de borjón previamente seleccionados.
- Para la inducción de callos friables se obtuvieron hojas procedentes de plántulas *in Vitro*.

4.4 Establecimiento *in Vitro* de los explantes

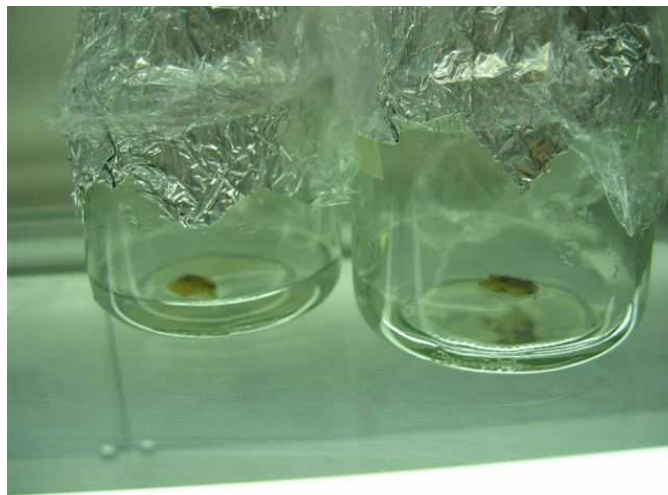
4.4.1 Desinfección de la semilla

A los frutos maduros se le extrajeron las semillas, las cuales fueron lavadas cuidadosamente con abundante agua y jabón Tego al 2% (v/v) para limpiarles el mucílago. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, las semillas fueron sumergidas en etanol al 70% durante 15 minutos, en hipoclorito de sodio al 3% por 25 minutos con la adición de Tween 20 y finalmente se lavaron con abundante agua destilada y estéril (Martínez, 2005).

4.4.2 Obtención de plántulas a partir de semillas.

Las semillas se sembraron en el medio Murashige Skoog (MS) (1962) suplementado con sacarosa (20 g /L), phytigel (2 g/L) y BAP (1mg/L), con un pH de 5.8 de acuerdo con el protocolo reportado por Martínez *et al.* (2005) como se puede observar en la Foto 1. Los explantes fueron mantenidos a una temperatura promedio de 28°C y bajo condiciones de luz permanente.

Foto 1. Semillas para obtención de plántulas en medio MS 1962



4.4.3 Obtención y Mantenimiento de callos friables

Una vez obtenidas las plántulas *in Vitro*, se tomaron las hojas como explante para la inducción de callos friables. Se realizaron cortes de la hoja en forma de disco de un tamaño de 0.9 cm de diámetro, los cuales se sembraron bajo condiciones estériles en el medio Murashige Skoog (1962) suplementado con sacarosa (30 g/L), phytigel (2 g/L), 2,4-D (1 mg/L), Tiamina-HCl (0.2 mg/L), ácido nicotínico(1 mg/L), Glicina (4 mg/L), Piridoxina-HCl (1 mg/L) y Mioinositol (200 mg/L) con un pH ajustado a 5.8 antes de autoclavar el medio de cultivo. El subcultivo de los callos a medio fresco fue llevado a cabo cada cuatro semanas. Los callos fueron mantenidos a una temperatura promedio de 28°C y

bajo condiciones de luz permanente. En la Foto 2 se pueden observar los callos obtenidos.

Foto 2. Callos obtenidos para el establecimiento de las suspensiones celulares



4.5 Establecimiento de suspensiones celulares

4.5.1 Desagregación Celular

Para determinar el tiempo de desagregación celular fue empleado el medio Murashige Skoog (MS) (1962) suplementado con sacarosa (30 g/L), 2,4-D (1 mg/L), Tiamina-HCl (0.2 mg/L), Ácido nicotínico (1 mg/L), Glicina (4 mg/L), Piridoxina-HCl (1 mg/L) y Mioinositol (200 mg/L), el volumen de medio ocupado en el erlenmeyer fue la quinta parte de este, el pH inicial fue de 5.8, la concentración inicial del inóculo fue (20 gr BH/L), con agitación orbital de 160 rpm y condiciones de luz total. Los callos utilizados en este ensayo tenían 8 semanas de edad.

Los parámetros tenidos en cuenta para evaluar el tiempo de desagregación celular fueron los siguientes:

4.5.1.1 Método de muestreo:

Para la evaluación de este parámetro se definieron tres montajes:

El primero constó de un erlenmeyer, un tapón de gasa estéril, tubo de vidrio, manguera plástica y una jeringa estéril (Foto 3).

Foto 3. Montaje Jeringa



El segundo montaje fue un erlenmeyer y un tapón de gasa estéril y la muestra se tomó con una pipeta estéril (Foto 4).

El tercer montaje se realizó con un erlenmeyer y un tapón de gasa estéril y la muestra se hizo por vaciado en tubos de centrifuga estériles (Foto 4).

Estos métodos de muestreo se realizaron con el propósito de determinar el método que no presentara contaminación y de obtener la muestra más uniforme. Los montajes se realizaron por duplicado en cada frasco y el muestreo se hizo por triplicado durante 15 días.

Foto 4. Montaje muestreo Pipeta y Vaciado



4.5.1.2 Presencia de antibiótico:

Una vez seleccionado el método de muestreo, se procedió a evaluar el efecto de la presencia de antibiótico en el medio de cultivo como inhibidor de la división celular y la contaminación microbiana. Se empleó Ampicilina de grado reactivo a una concentración de 100 mg/L (Anónimo⁹, 2006).

Se realizó una cinética de crecimiento para la etapa de desagregación celular utilizando el medio MS (1962) suplementado con sacarosa (30 g/L), 2,4-D (1mg/L), Tiamina-HCl (0.2 mg/L), ácido nicotínico (1 mg/L), Glicina (4 mg/L), Piridoxina-HCl (1 mg/L), Mioinositol (200 mg/L) y con un pH ajustado a 5.8 antes de autoclavar el medio de cultivo. Este montaje se hizo en erlenmeyers de 500 ml con el 20% de volumen ocupado con el medio (100 ml), agitación orbital (160 rpm), condiciones de luz total y 1 gramo (peso fresco) de callo friable por cada 50 ml de medio, realizando 4 ensayos, 2 de los cuales tenían 100mg/L de Ampicilina grado reactivo (A1 y A2) y 2 sin esta (B1 y B2), para obtener dos tratamientos con dos replicas.

El muestreo se realizó por vaciado, tomando 3ml de muestra en tubos de centrifuga estériles. La toma de las muestras se realizó cada 48 horas hasta determinar que la disgregación se encontrara en estado estacionario mediante el método de peso fresco y peso seco de las células (Habeych, 2003).

Adicionalmente, se determinó este tiempo de forma cualitativa una vez se observó que el medio de cultivo lucía homogéneo y saturado, y que los agregados celulares se habían separado. Una vez determinado el tiempo de desagregación, se repitió el montaje sin toma de muestra para ser empleado como inóculo de las suspensiones celulares.

4.5.2 Establecimiento de las suspensiones celulares

Una vez determinado el tipo de muestreo y la acción del antibiótico en el medio de cultivo, el desagregado celular se pasó a través de un tamiz en condiciones estériles para evitar la presencia de agregados grandes de células y garantizar así la homogeneidad del inóculo. Se tomó una parte de éste por cada tres partes de medio fresco según lo reporta Roca *et al.* (1993), en erlenmeyers de 100 ml pre-esterilizados con un volumen total ocupado de 20 ml.

4.5.3 Diseño de experimentos

Se realizó un diseño de experimentos factorial, balanceado y de efectos fijos.

- Factores bajo estudio: Hormona 2,4-D y Luz
- Niveles de los factores bajo estudio
 - Hormona: 0 y 1 mg/l 2,4-D
 - Luz: ausencia o presencia de luz
- Tratamientos: 4
- Número de réplicas: 2 por tratamiento
- Restricciones de aleatoriedad: Tiempo (10)
- Número total de observaciones: 80
- Variables de respuesta: crecimiento de biomasa, producción de proteína extracelular total, Consumo de azúcares no reductores y reductores.

El efecto de los diferentes tratamientos se analizó estadísticamente mediante análisis de Varianza (ANOVA) con un 95% de confianza, utilizando el programa STATGRAPHICS Plus para Windows Versión 5.0.

4.5.4 Cinética de crecimiento de las suspensiones celulares

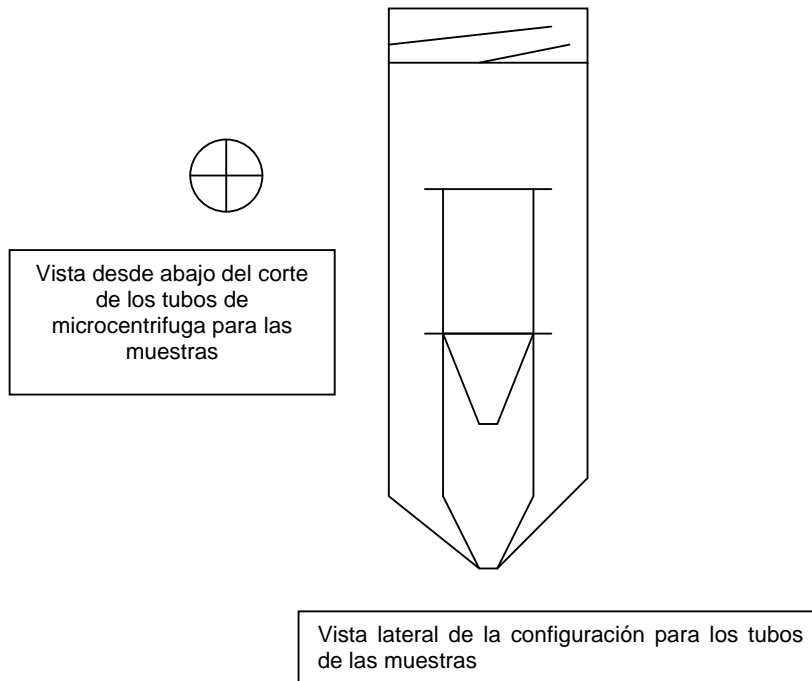
La cinética de crecimiento se evaluó en el medio de cultivo MS suplementado con sacarosa (30 g/L), Ampicilina (100 mg/L) y 2,4-D de acuerdo con el diseño de experimentos planteado anteriormente. El crecimiento celular fue monitoreado mediante el método de peso fresco y peso seco de las células, descrito por Habeych (2003). Se retiraron 2 erlenmeyers al azar de cada ensayo (8 erlenmeyers cada 48 horas hasta llegar a la fase exponencial durante la cual el muestreo se hizo cada 24 horas y al llegar a la fase estacionaria el muestreo se realizó cada 48 horas, para un total de 15 días de cultivo). Esta metodología se empleó con el propósito de eliminar contaminaciones ya que cada erlenmeyer usado en el muestreo fue descartado (Capataz, 2005).

De cada uno de los erlenmeyers se tomaron alícuotas de 3 ml de suspensión celular para realizar las mediciones de peso seco, este procedimiento se realizó por triplicado, el sobrenadante obtenido se almacenó a -4°C y posteriormente fue empleado para realizar las pruebas de azúcares no reductores y reductores y para determinar proteína total extracelular. El resto de la muestra de la suspensión celular de cada erlenmeyer fue utilizada para realizar los análisis de metabolitos secundarios, medición del pH y para monitorear la morfología celular a través del tiempo en las suspensiones celulares (viabilidad celular mediante la tinción de Evans).

4.5.4.1 Determinación de peso seco

Las muestras fueron transferidas a tubos de microcentrifuga previamente pesados y cortados en la parte inferior. Los tubos de microcentrifuga cortados se introdujeron en los tubos no cortados y ambos son puestos en tubos de centrifuga. Las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 20 minutos, lo cual permite la salida de los líquidos de la muestra por la parte inferior reteniendo solamente el material sólido que luego es puesto al horno a 50°C hasta lograr la sequedad completa para ser posteriormente pesados (Mills y Lee, 1996; Habeych, 2003). El montaje realizado se puede observar en la Gráfica 3.

Gráfica 3. Representación del montaje para la determinación de peso seco (Mills y Lee, 1996).



4.5.4.2 Determinación de la proteína extracelular

Para la determinación de la proteína celular se utilizó el método de Lowry, el cual es uno de los más exactos para la cuantificación de proteínas. Este método consiste en la hidrólisis de la proteína seguida de la determinación espectrofotométrica de sus aminoácidos. Es el método más usado, pues su sensibilidad es moderadamente constante de proteína a proteína, por lo cual, se hace aceptable cuando se trata de determinaciones absolutas de proteínas en mezclas o extractos crudos. En este método se combina la reacción de cobre y la reacción del reactivo fosfotungstomolibdico (Reactivo de Folin-Ciocalteu) con fenoles tales como la tirosina, el triptófano y en menor grado a la cisteína e histidina. El resultado final de esta reacción es la obtención de un color azul oscuro (Lowry, 1951) La preparación de la soluciones utilizadas para la determinación de la proteína extracelular mediante el método de Lowry se encuentra en la sección de los anexos (Anexo I).

4.5.4.3 Cuantificación de azúcares no reductores por el método del Ácido ÁC 3,5-dinitro salicílico (DNS)

Este método se basa en la hidrólisis de la sacarosa para producir una molécula de glucosa y una de fructosa, y la posterior medición de los azúcares reductores libres por medio de la reducción del ácido dinitrosalicílico. Se forma un compuesto nitrogenado amarillo, cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores. (Miller, 1959).

Las soluciones utilizadas para la realización de este método, se encuentran en la sección de los anexos (Anexo J)

4.5.4.4 Cuantificación de azúcares reductores por el método del Ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS)

La medición de los azúcares reductores se realizó por medio de la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico, en la cual se forma un compuesto nitrogenado

amarillo, cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

Las soluciones utilizadas para la realización de este método, se encuentran en la sección de los anexos (Anexo J)

4.5.4.5 Tinción de Evans

La tinción de Evans se realizó con el propósito de evaluar la viabilidad celular de las suspensiones siguiendo el protocolo reportado por Giménez *et al.* (2004).

Para esto se utilizaron 20 μ L de suspensión celular, 2 μ L de solución de azul de Evans (1% p/v) y se esperó 5 min antes de observar las células bajo el microscopio.

4.6 Análisis químicos

Al sobrenadante recolectado de las muestras tomadas para la cinética de crecimiento celular se les realizó algunas pruebas que se describen a continuación con el propósito de realizar un análisis cualitativo de la presencia de algunos metabolitos secundarios extracelulares en la suspensión celular.

4.6.1 Identificación de componentes

Se realizaron ensayos de cromatografía de capa fina (TLC) para los siguientes metabolitos: Flavonoides, Antraquinonas y Sesquiterpenlactonas, los cuales se presume y de acuerdo con la literatura revisada se encuentran en las muestras.

Las muestras se ubicaron a un centímetro de la placa de sílica gel, luego se secaron y se introdujeron en una cámara con el eluyente, ésta se tapó y se

dejaron correr hasta que el eluyente recorrió la placa. El solvente sube por capilaridad y arrastra las moléculas, las cuales se mueven según la afinidad que muestren por la fase estacionaria y la móvil. Como las muestras son incoloras hubo que someterlas a tratamientos con sustancias reveladoras para poder determinar la presencia de componentes sobre el silicato. El tipo de revelador depende del tipo de moléculas a analizar, éstos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Eluyentes y Reveladores TLC

Metabolito	Eluyente	Revelador	Observaciones
Flavonoides	Acetato de etilo – Isopropanol (65:25)	Reactivo Citrobórico	Calentar a 100°C por 5 minutos y luz ultravioleta 5 minutos. Coloración Amarilla
Antraquinonas	Acetato de etilo – Metanol - Agua (100:17:13)	Reactivo de Borntraeger	Coloración rojiza
Sesquiterpenlactonas	Cloroformo – Acetona (4:1)	H ₂ SO ₄ + Calor	Coloración Rojiza

Estos ensayos se realizaron para las muestras en los días 0, 9 y 15 del cultivo para cada tratamiento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Establecimiento *in Vitro* de los explantes

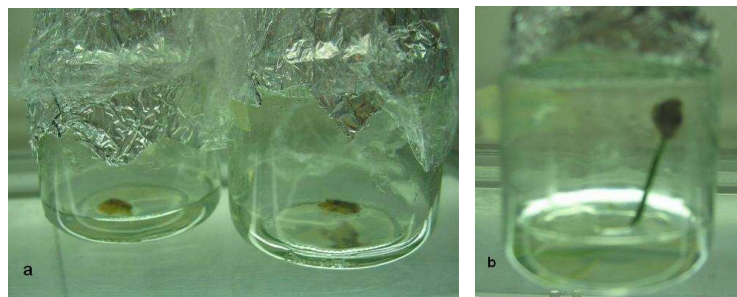
5.1.1 Desinfección de la semilla

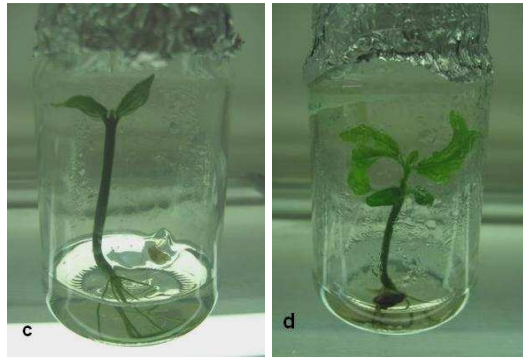
Para el proceso de desinfección de las semilla se utilizó el protocolo reportado por Martínez *et al.* (2006) el cual permitió obtener el 100 % de las semillas sin ningún tipo de contaminación bacteriana o fúngica.

5.1.2 Obtención de plántulas a partir de semillas

Para la germinación de semillas de borjón *in Vitro* (Foto 5 a) se observó un comportamiento parecido al reportado para la germinación en campo, iniciándose el proceso germinativo a los 15 días y obteniendo al día 45 el 85% de las vitroplantas. A los 15 días después de iniciado el cultivo se presentó la aparición inicial de una raíz delgada (Foto 5 b), a los 30 días se observó la manifestación de la plántula completa pero de un tamaño pequeño (Foto 5 c) y a los 45 se observó la presencia de plantas completas con un promedio de 5 hojas (Foto 5 d), las cuales posteriormente fueron utilizadas como explantes.

Foto 5. Desarrollo de la plántula de Borjón *in Vitro*. a: explantes, b: raíz delgada, c: plántula a los 30 días, d: plántula a los 45 días





5.1.3 Obtención y Mantenimiento de callos friables

Se logró establecer el cultivo de callos friables *in Vitro* utilizando hojas juveniles provenientes de las plántulas descritas anteriormente mediante el protocolo reportado por Martínez *et al.* (2006), con modificaciones en la cantidad de sacarosa cambiando el contenido de 20 g/L a 30 g/L y en las vitaminas adicionando el doble del contenido de estas en el medio MS (1962). En los ensayos a partir del día 8 y hasta los 20 días de cultivo, se comenzó a observar la presencia y formación de callos friables bajo condiciones de luz permanente. Posteriormente, estos callos se subcultivaron en medio fresco en la cuarta semana de edad. Esta modificación en el contenido de vitaminas y de sacarosa en el medio MS (1962) duplicó la velocidad de formación de los callos con respecto a la velocidad reportada por Martínez *et al.* (2006) el cual obtuvo callos a los 45 días de cultivo; así mismo se observó una alta friabilidad en estos con una coloración entre amarilla y verde y de apariencia cremosa. La Foto 6 muestra callos friables obtenidos a partir de hojas procedentes de material *in Vitro*.

Foto 6. Callos friables obtenidos para las suspensiones celulares a los 20 días después de iniciado el cultivo



5.2 Establecimiento de suspensiones celulares

5.2.1 Desagregación Celular

El periodo de desagregación celular consiste en disminuir el tamaño de los grandes agregados celulares y lograr una suspensión homogénea, esto se puede evidenciar de manera cualitativa debido a que a medida que las células se dividen y crecen, aumenta la turbidez del medio de cultivo, lo cual es visualmente perceptible. Una medida cuantitativa para determinar el tiempo de desagregación celular puede ser una cinética de crecimiento celular basado en el método de peso seco.

5.2.1.1 Determinación cuantitativa del tiempo de desagregación celular

5.2.1.1.1 Tipo de muestreo

Se realizaron ensayos con el propósito de determinar el método de muestreo mas adecuado para la obtención de una mayor homogeneidad y menor índice de contaminación.

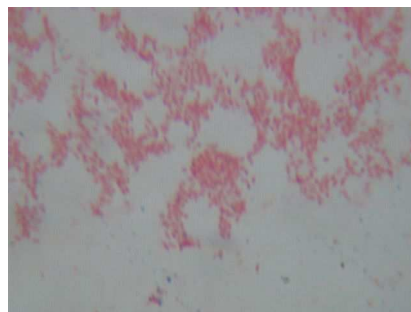
En el primer montaje, se empleó una jeringa estéril con la cual se tomaron las muestras. La suspensión celular no presentó contaminación, lo cual, se corroboró realizando tinción de Gram y montaje en fresco cada 48 horas, sin embargo, la suspensión celular presentó fenolización, la cual posiblemente se deba al choque de las células contra el tubo de vidrio insertado en el erlenmeyer para la toma de muestras, tal como se puede observar en la Foto 7. Por lo anterior este tipo de muestreo no presentó las mejores condiciones para obtener el desagregado celular.

Foto 7. Primer montaje para la determinación del muestreo en la desagregación celular. a: Montaje en el día cero, b: Suspensión fenolizada día seis.



En el segundo montaje evaluado se usó una pipeta estéril para la toma de muestras. Este método presentó contaminación de tipo bacteriano (Gram -). No se observó presencia de hifas que indicaran contaminación por hongos, tal como se observa en la Foto 8, y en consecuencia, este montaje tampoco fue tenido en cuenta.

Foto 8. Contaminación bacteriana en la suspensión de Borojó en el segundo montaje (Observación bajo en microscopio con lente 100 X)



El muestreo llevado a cabo en el tercer montaje se realizó por vaciado en tubos de centrifuga estériles (Ver Foto 9), éste ensayo no presentó ningún tipo de contaminación, ni fenolización y el muestreo fue uniforme, por lo cual fue el método seleccionado para la toma de muestras.

Foto 9. Tubos de centrifuga estériles



Con respecto a la uniformidad en el muestreo, no se presentaron diferencias significativas entre los tres métodos evaluados, lo cual fue posible determinar calculando la desviación estándar y el error para las replicas de los tratamientos.

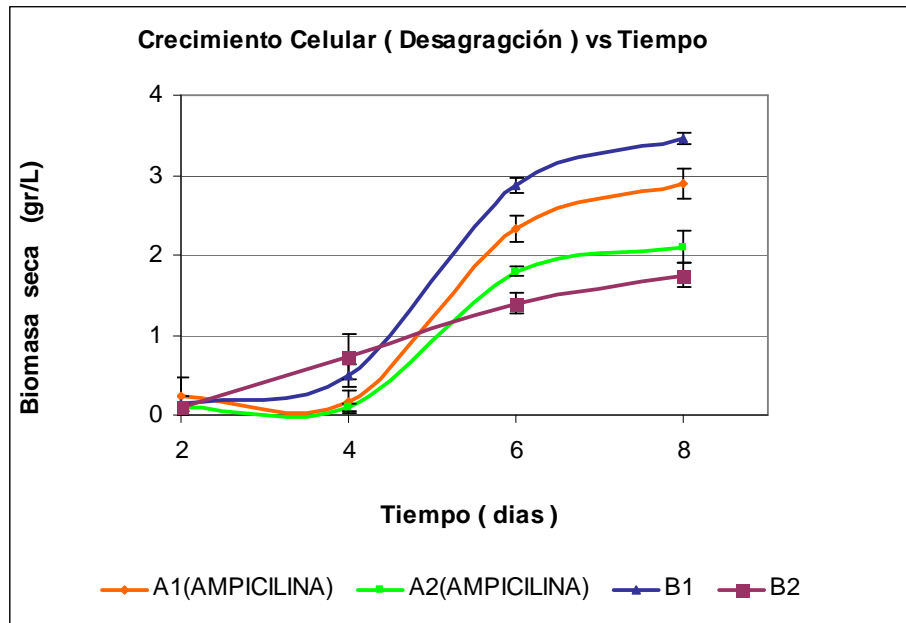
5.2.1.1.2 Presencia de antibiótico

Con base en los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento celular, con y sin antibiótico, se determinó que la Ampicilina no inhibió el crecimiento celular, debido a que no se observó una diferencia significativa con respecto al crecimiento celular en el medio sin Ampicilina, tal como se observa en la Gráfica 4. De acuerdo con el análisis estadístico donde se encontró que el P-Valor para el efecto tratamiento fue de 0,9873 con un nivel de significancia del 5%, por lo tanto, la presencia del antibiótico en el medio de cultivo no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento celular (Ver Anexo A).

De acuerdo con la Gráfica 4 se observó que B1 (tratamiento sin antibiótico) tiene un crecimiento superior en un 19.8% sobre A1 (tratamiento con antibiótico) en el día 6 del cultivo de desagregación, por lo cual, no se encuentra una diferencia significativa que indique una inhibición en el

crecimiento celular en presencia de Ampicilina. De igual manera, se observó que A2 tiene un crecimiento del 22.22% por encima del tratamiento B2, lo que indica, que se presentó mayor crecimiento en presencia de antibiótico.

Gráfica 4. Efecto de la Ampicilina sobre la cinética celular



Con base en los resultados obtenidos se determinó que la Ampicilina a una concentración de 100 mg/L no tiene un efecto inhibitor en el crecimiento celular, por lo que, el medio empleado para las suspensiones celulares fue suplementado con este antibiótico, siendo esto un factor importante en la prevención de la contaminación microbiana en el medio de cultivo.

Una vez definido el método de muestreo y el uso de Ampicilina en el medio de cultivo y con la ayuda de la cinética realizada previamente, se estableció que el tiempo de desagregación para las células de *B. patinoi* fue de 6 días para un inóculo inicial de 20 gr BH/l.

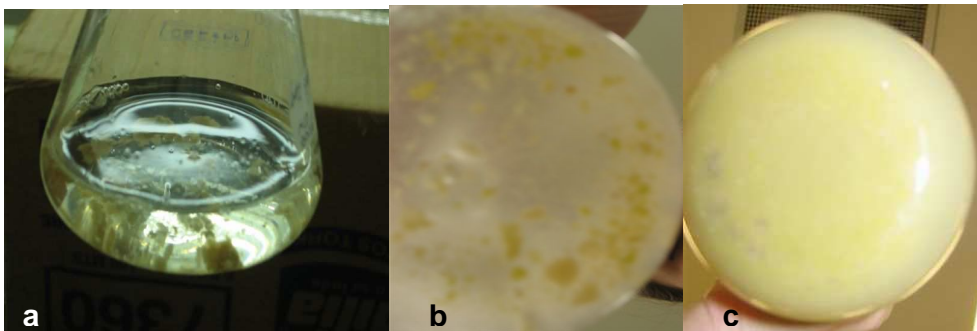
De la misma manera en la Gráfica 4, se observó que al sexto día de cultivo todos los ensayos se encontraron en fase de crecimiento exponencial, periodo en el cual es recomendable subcultivar las células, ya que en este periodo se incrementa la velocidad de división celular, las células son jóvenes y

biológicamente activas como lo reportan Vasil y Vasil (1982, 1984) en Gómez (1998) de manera que se evite o disminuya el tiempo de la fase lag en la cinética de las suspensiones celulares.

5.2.1.2 Determinación cualitativa del tiempo de desagregación celular

En La Foto 10 se muestra una secuencia del periodo de desagregación. En el día cero se observaron grandes agregados celulares y el medio de cultivo presentó un aspecto translúcido (Foto 10a), en el día dos se presenta un leve aumento en la turbidez, un cambio de color y una disminución en el tamaño de los agregados celulares (Foto 10b), al octavo día se aprecia una suspensión homogénea sin grandes agregados, incluso, se observó en las paredes del erlenmeyer una biopelícula, producto de la agitación constante y de la acumulación de células libres en el medio (Foto 10c).

Foto 10. Secuencia de la desagregación celular (a: día cero, b: día dos, c: día ocho)



Durante el periodo de desagregación se evaluó la viabilidad celular siguiendo el protocolo de tinción de Evans reportado por Giménez *et al.* (2004), tal y como se observa en la Foto 11, donde las células blancas son células viables mientras que las teñidas de azul son células muertas. En la Foto 12 se muestran células individuales ligeramente redondeadas, completas, con organelas, lo cual indica el buen estado de la pared celular, característica de células en activo crecimiento.

Foto 11. Células en periodo de desagregación (día 6 de cultivo); a: Tinción con azul de Evans para células viables. b: Tinción de la pared celular

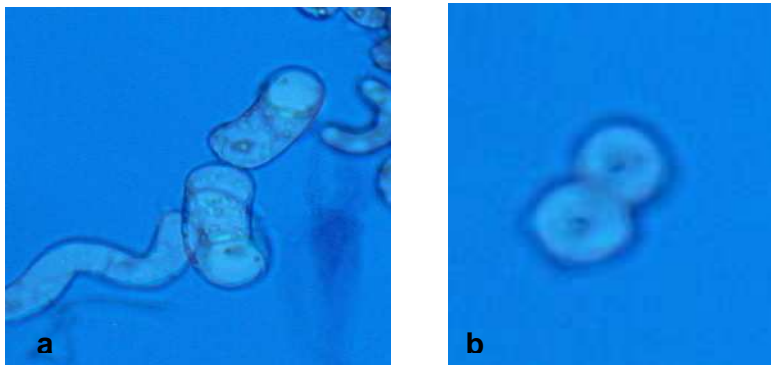
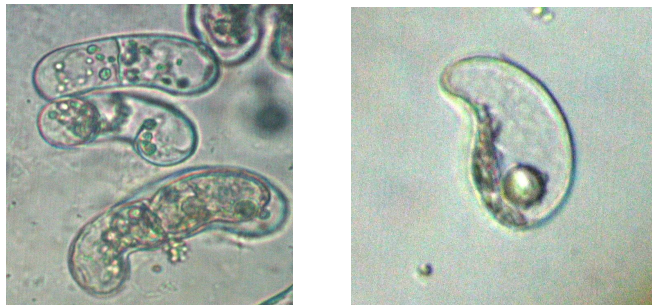


Foto 12. Células típicas de Borjón durante el periodo de desagregación (día 6)



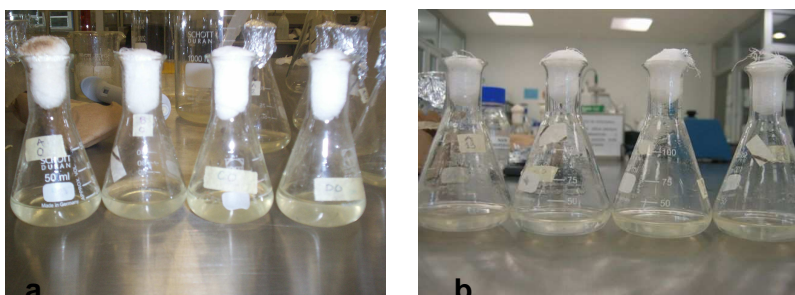
5.2.2 Establecimiento de las suspensiones celulares

Para el establecimiento de las suspensiones celulares se empleó el medio de cultivo Murashige Skoog (1962) suplementado con sacarosa (30 g/L), Ampicilina (100 mg/L) y 2,4-D de acuerdo con el diseño de experimentos planteado.

La adaptación de las células en el medio líquido se logró mediante el subcultivo en medio fresco de células provenientes de la desagregación. Se adicionaron 5 ml de inóculo (relación 3:1) a 15 ml de medio fresco, equivalente a una densidad celular de 12.95 g/L (biomasa húmeda); a estas suspensiones celulares se les realizó el seguimiento de producción de biomasa de acuerdo con el diseño de experimentos factorial que se describió en la sección de

materiales y métodos; adicionalmente, se midió el pH a lo largo de la fermentación. En la Foto 13 se muestra el aspecto de las suspensiones celulares al inicio (Foto 13 a) y al final del cultivo (Foto 13 b).

Foto 13. Suspensiones celulares de *B. patinoi*. a: día cero de cultivo, b: día 13 de cultivo



5.2.2.1 Análisis de la cinética de crecimiento celular

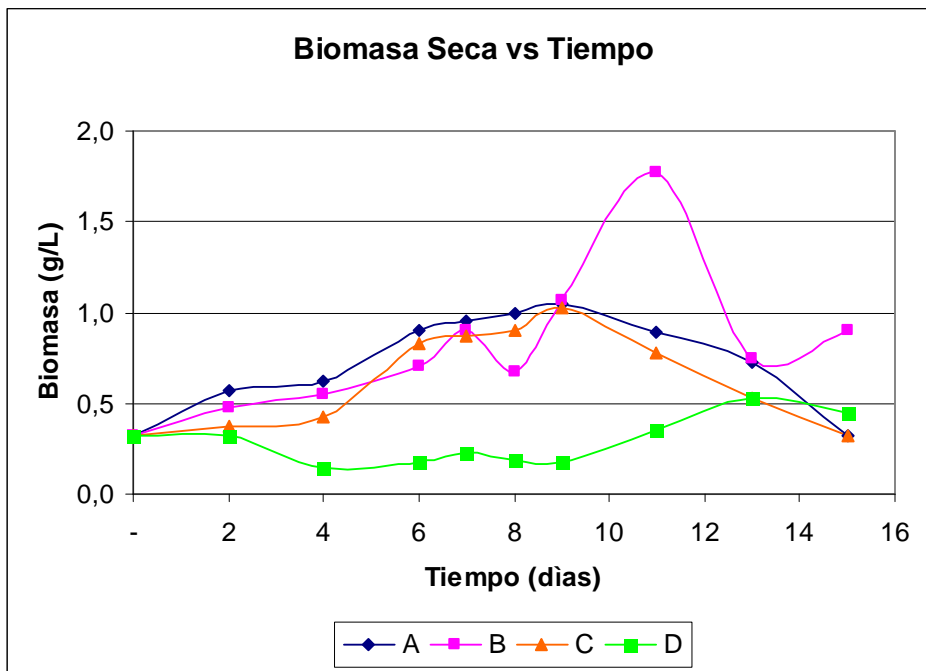
La cinética de crecimiento celular de *B. patinoi* se llevó a cabo por un periodo de 15 días. Las suspensiones se realizaron por duplicado tomando mediciones de biomasa por triplicado (en cada frasco) cada 48 horas, como lo reporta Habeych (2003). Los valores tomados de biomasa y pH fueron promediados aritméticamente y se calculó la desviación estándar de los datos.

Los pH fueron medidos en el instante en que la muestra fue tomada y en presencia de células vegetales (Ver Anexo H).

Las suspensiones celulares en el día cero presentaron un color entre amarillo y verde, siendo este último característico de células vegetales provistas de cloroplastos mientras el color amarillo se le puede atribuir a la presencia de antibiótico en el medio.

A medida que el periodo de cultivo fue avanzando, la coloración fue invariable para los tratamientos en presencia de luz (A y C) mientras que los tratamientos B y D (en ausencia de luz) presentaron una coloración oscura desde el día dos hasta el final del cultivo.

Gráfica 5. Cinética de crecimiento celular de *B. patinoi* para los tratamientos A, B, C y D



Los resultados del crecimiento celular para los cuatro tratamientos se muestran en la Gráfica 5 donde puede apreciarse que la duración de la fase lag es de aproximadamente cuatro días, momento en el cual inicia la fase exponencial con una duración de 5 días la cual finaliza aproximadamente el día 9 del cultivo; este comportamiento fue reportado por Gallardo *et al* (2000) en suspensiones celulares de *Coffea arabica* especie que se toma como referencia para comparar por pertenecer a la misma familia (*Rubiaceae*) del *B. patinoi*.

Al final de la fase exponencial se presenta una caída en el crecimiento celular, lo cual se debe, según Vasil y Vasil (1982,1984) en Gómez (1998), a que al alcanzar el máximo número de células se produce una rápida lisis y muerte de las células a causa de una disminución de los nutrientes en el medio y sustancias reguladoras de crecimiento, especialmente 2,4-D.

La cinética de crecimiento en las suspensiones celulares de *B. patinoi* se ajusta a un modelo exponencial donde la velocidad de crecimiento celular es

constante. La velocidad de crecimiento celular μ se determinó de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{x_f - x_i}{t_f - t_i} = \mu$$

Donde x_f es la biomasa seca en g/L al final de la fase exponencial, x_i es la biomasa seca en g/L al inicio de la fase exponencial, t_f es el tiempo final de la fase exponencial y t_i es el tiempo inicial de la fase exponencial (Duarte, 1998). Se calculó la velocidad de crecimiento celular para los tratamientos A, B y C, el tratamiento D no se evaluó debido a que éste no presentó un crecimiento celular, es decir, hubo una leve disminución en la concentración celular en el tiempo y no hubo cambio neto en la producción de biomasa (aproximadamente cero)

Tabla 4. Velocidades de crecimiento de biomasa para los tratamientos A, B y C en las suspensiones celulares de *B. patinoi*

TRATAMIENTO	μ (g BS *día ⁻¹ /L)
A	0,085
B	0.103
C	0,12

La mayor velocidad de crecimiento celular se presentó para el tratamiento C (presencia de luz y 2,4-D) como se aprecia en la tabla 4, (0.12g*día⁻¹/L), este comportamiento puede explicarse porque ambos factores promueven el crecimiento celular y a su vez pueden acelerar la velocidad de crecimiento. El tratamiento B (presencia de 2,4-D) presentó una menor velocidad de crecimiento (0.103 g*día⁻¹/L), pero esta velocidad fue superior a la del tratamiento A (presencia de Luz) (0.085 g*día⁻¹/L) lo que sugiere que en presencia solo de la hormona 2,4-D hay una mayor velocidad que cuando solo hay presencia de luz. Sin embargo, la concentración celular máxima para los tratamientos en el día 9 de cultivo es aproximadamente igual, por lo tanto la presencia de ambos factores no incrementa la cantidad de células pero si acelera su crecimiento, acelerando la velocidad de división celular. La

velocidad de crecimiento celular para C es superior en un 14.17% sobre B y en un 29.17% sobre A, pero la producción de biomasa fue aproximadamente igual.

5.2.2.2 Efecto de los factores luz y hormona en el crecimiento celular

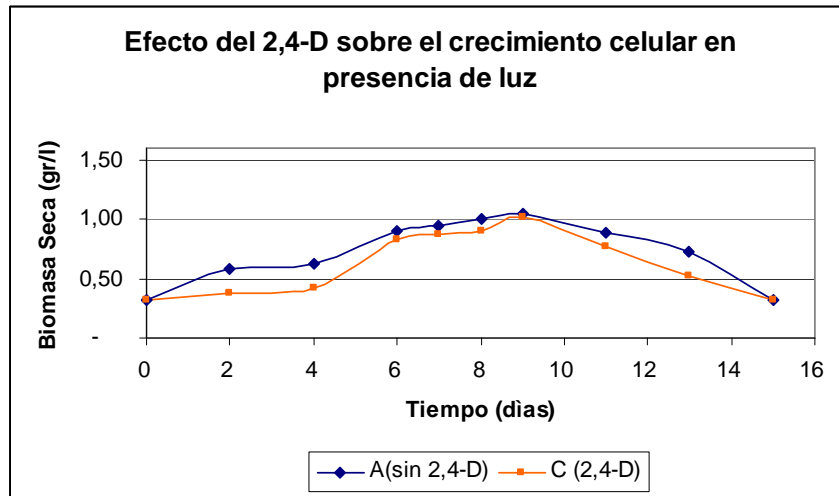
- **Factor hormona**

Para los tratamientos A y C la presencia de luz es un factor común, teniendo en cuenta esto, la ausencia de 2,4-D (1mg/L) (tratamiento A) ocasiona un incremento en la producción de biomasa del 1.90% sobre la presencia de 2,4-D (tratamiento C). Sin embargo, puede observarse en la Gráfica 6 que la presencia de 2,4-D no afecta el crecimiento celular, el análisis estadístico corrobora este resultado el cual se puede observar en el Anexo B. Para ver el efecto de los factores en el crecimiento celular se realizó un análisis de Varianza ANOVA con un nivel de significancia de 0.05. El P-Valor para el efecto hormona fue de 0,0115 y aunque este indica que este valor es significativo en la variable de respuesta crecimiento celular, un análisis de contraste múltiple de rangos para la variable respuesta crecimiento de biomasa con tratamientos como factor el cual arroja que estos tratamientos (A y C) son homogéneos y no hay una diferencia estadística significativa entre los grupos de medias en presencia de luz (A y C) y la presencia o no del 2,4-D.

Con respecto a los tratamientos B y D los cuales presentan ausencia de luz, se puede observar que la mayor concentración de biomasa se presenta para el tratamiento B el cual tiene 2,4-D (1 mg/L) en el medio de cultivo, este incremento es superior en un 80.34% en el día 11 de cultivo sobre la producción de biomasa en el tratamiento D (Ver Gráfica 7). Es posible apreciar que esta diferencia se presenta durante toda la cinética, siendo siempre mayor el crecimiento en el tratamiento B (con 2,4-D), en ausencia de luz es posible apreciar el efecto positivo que ejerce la hormona sobre el crecimiento celular. Estadísticamente, el efecto de la hormona es significativo en estos tratamientos que están en ausencia de luz, ya que se

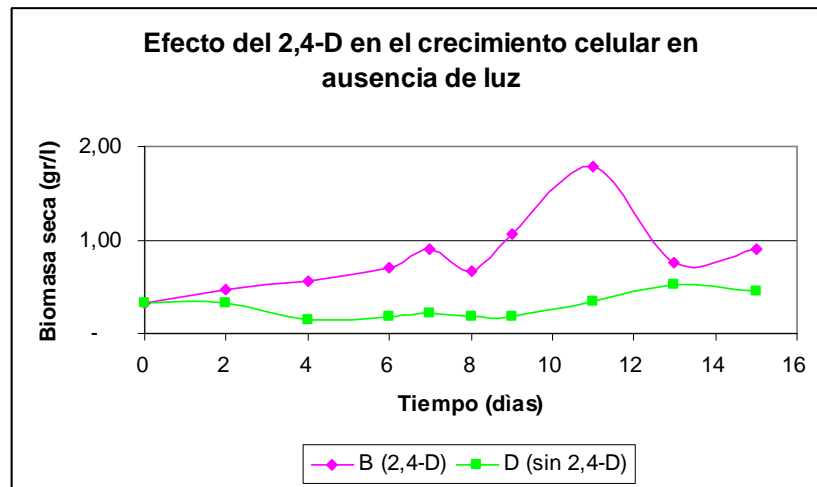
agrupan en categorías diferentes en el test de rangos múltiples de Duncan (Anexo B).

Gráfica 6. Cinética de crecimiento celular de *B. patinoi* para los tratamientos A y C



Con base en los análisis realizados entre los tratamientos A y C y B y D se determinó que la hormona no tiene ningún efecto diferencial en el crecimiento celular cuando existe la presencia de luz, por el contrario, bajo ausencia de la luz, el 2,4-D produce mayor crecimiento celular. De acuerdo con lo reportado por Martínez *et al.* (2006), el 2,4-D bajo condiciones de oscuridad y en una concentración entre 1 y 2 mg/L tiene una acción estimulante del crecimiento celular en Borojó.

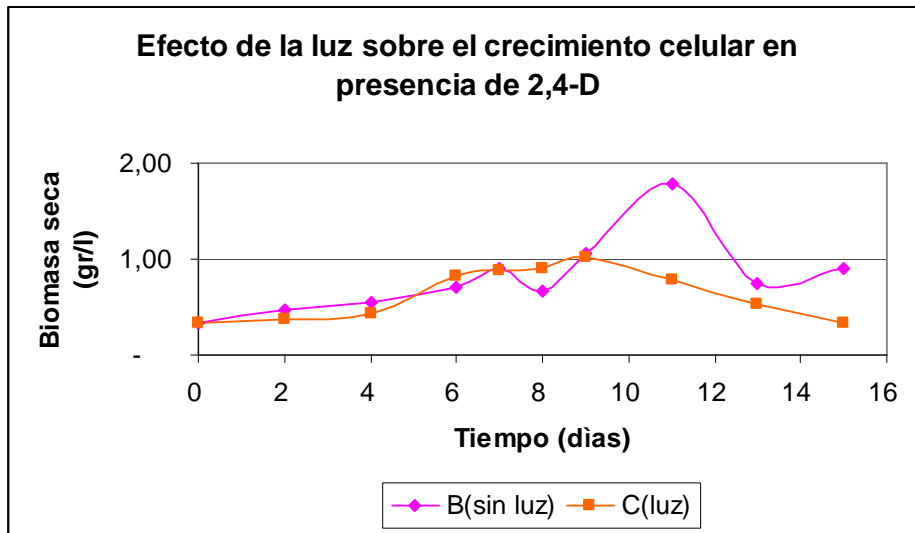
Gráfica 7. Cinética de crecimiento celular de *B. patinoi* para los tratamientos B y D



- **Factor Luz**

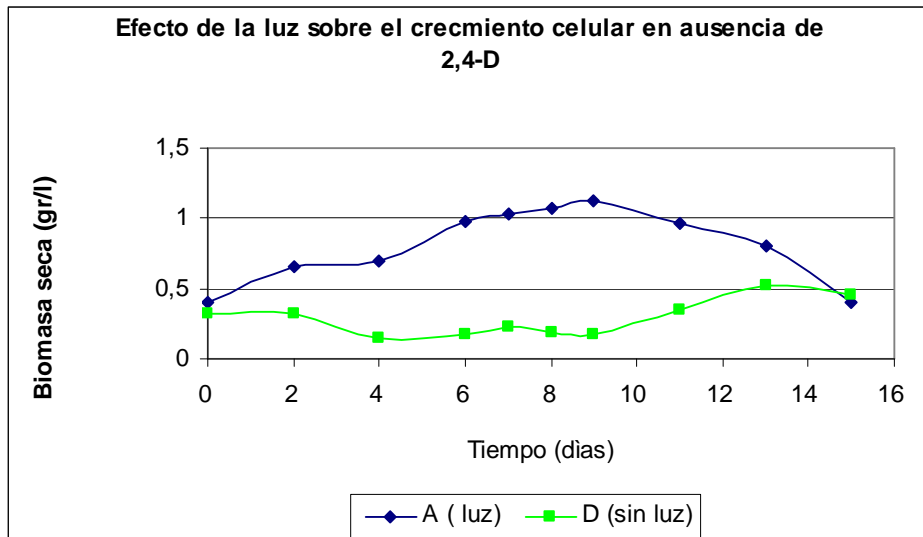
Comparando los tratamientos B y C en presencia de 2,4-D (1 mg/l); durante la fase lag se presenta una mayor producción de biomasa en ausencia de luz (tratamiento B), así mismo, en la fase de crecimiento exponencial la producción de biomasa fue superior en ausencia de luz (tratamiento B) (Ver Gráfico 8). De acuerdo con el análisis de varianza, el P-Valor para el factor luz fue de 0,0117 con un 95% de confianza, esto indica que este factor tiene incidencia en el crecimiento celular (Ver Anexo B). Sin embargo, en el test de rangos múltiples de Duncan se aprecia que estadísticamente no se presenta una diferencia significativa para ambos tratamientos en la variable respuesta en presencia del 2,4-D, es decir, cuando se adiciona la auxina el crecimiento celular es igual con y sin luz.

Gráfica 8. Presencia o ausencia de la luz en presencia de 2,4-D sobre el crecimiento celular.



Para los tratamientos A y D en los cuales el factor común es la ausencia de 2,4-D, encontramos que en presencia de luz (A) se presenta un crecimiento de biomasa superior durante todo el tiempo de cultivo. En ausencia de luz (D), no se presenta crecimiento de biomasa, por el contrario se observa, una caída del 53.13 % en los primeros cuatro días de cultivo y después tiene una tendencia lineal para la mayor parte del periodo, en el día 9 de cultivo se presenta un incremento del 67.3% hasta el día 13, el cual se mantiene hasta el día 15 (Ver Gráfica 9). En el test de contraste múltiple de rangos de Duncan con un 95% de confianza para biomasa (Anexo B) se evidencia que los tratamientos A y D no son Homogéneos, así mismo se presenta una diferencia significativa entre estos grupos. El comportamiento del tratamiento D puede atribuírsele a una hipersensibilidad en el cultivo debido a la ausencia de ambos factores (luz y auxina), lo cual podría causar muerte de algún porcentaje de células suspendidas y al tener poca densidad celular en el cultivo, el crecimiento de las células restantes puede ser lento o no ocurrir ya que las células necesitan un determinado número de ellas mismas para poder retroalimentarse y dividirse según lo reporta Gómez (1998).

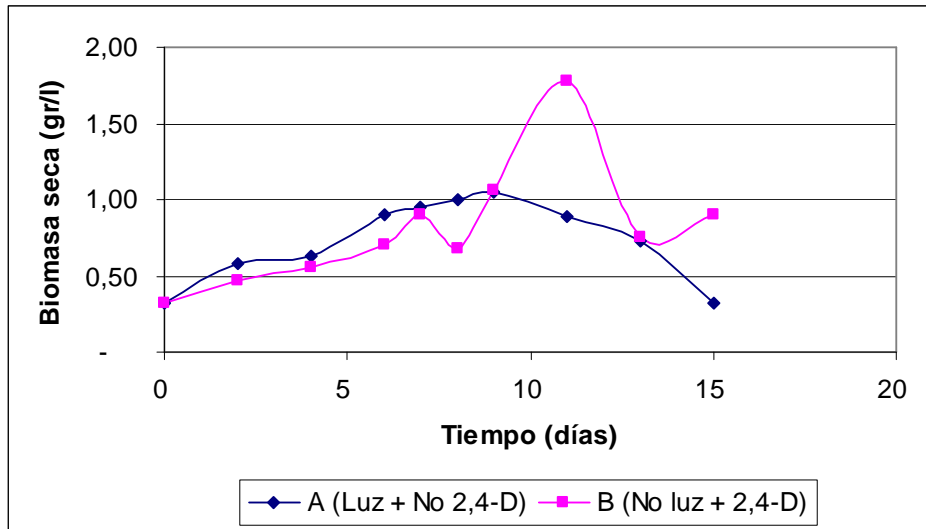
Gráfica 9. Cinética de crecimiento celular de *B patinoi* para los tratamientos A y D



- **Acción conjunta de los factores**

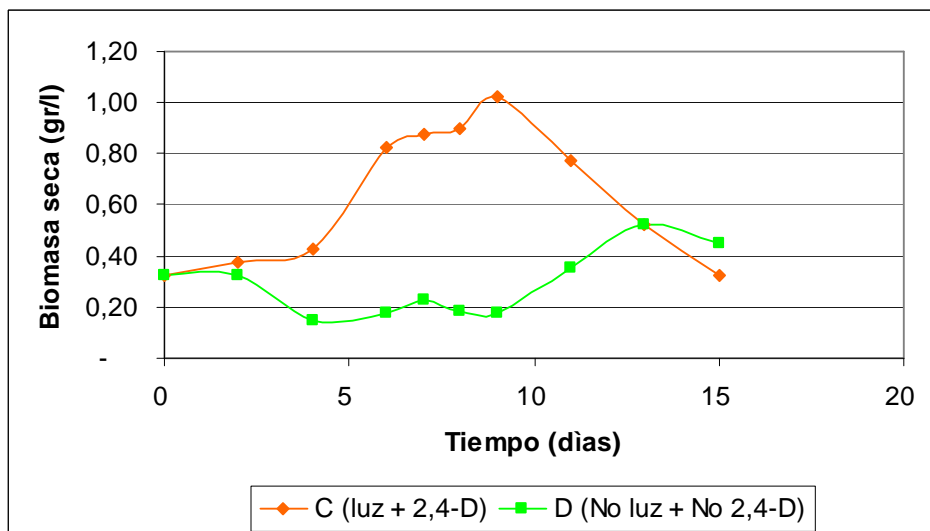
En la Gráfica 10 es posible observar que al presentarse al menos un factor, la biomasa presenta un comportamiento exponencial. En el tratamiento A en el cual hay presencia de luz y sin 2,4-D se evidencia un mayor crecimiento de biomasa, éste no es significativo en comparación con el crecimiento presentado en el tratamiento B, el cual tiene presencia de 2,4-D y ausencia de luz, por lo tanto, es indiferente cual de los factores se encuentre presente, siempre y cuando haya presencia de al menos uno de ellos. Esto concuerda con el análisis estadístico en el cual el P-valor para ambos factores es de 0.0000 lo cual indica que el crecimiento celular se vio afectado principalmente por la interacción luz-hormona. En el test de rangos múltiples de Duncan con A y B son homogéneos, de la misma manera es posible observarlo en el gráfico de interacciones en el cual se muestra el efecto que tiene la acción conjunta de estos factores (Ver Anexo B) Sin embargo, al observar la prueba de comparación múltiple se puede determinar que el tratamiento B presenta mayor crecimiento celular comparado con el tratamiento A. Estadísticamente estos dos tratamientos A y B no presentan diferencia significativa sobre la variable respuesta.

Gráfica 10. Cinética de crecimiento celular de *B. patinoi* para los tratamientos A y B



La presencia de ambos factores (Tratamiento C: luz y 2,4-D) ocasiona un crecimiento celular superior al producido en ausencia de ambos (tratamiento D), lo cual indica que en ausencia de ambos factores la energía que tiene la célula disponible la emplea en mantenimiento y no en crecimiento como se ve en la Gráfica 11.

Gráfica 11. Cinética de crecimiento celular de *B. patinoi* para los tratamientos C y D



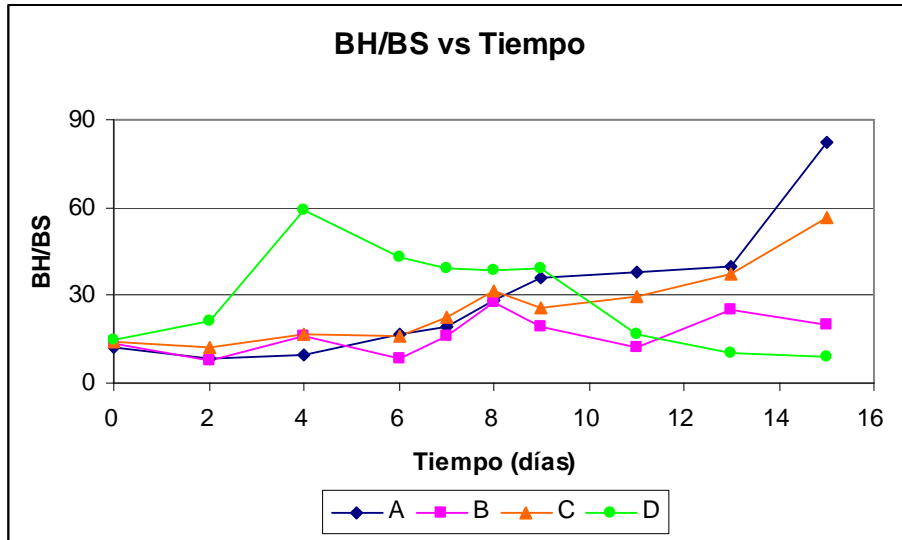
Finalmente, el análisis estadístico realizado demostró que los factores evaluados luz y hormona y su interacción tienen una incidencia significativa sobre el crecimiento celular con P-Valores de 0.0117, 0.0115 y 0.0000 indicando que el crecimiento celular fue afectado por la interacción de las dos variables estudiadas, mostrando que se requiere la presencia de al menos uno de los factores para que se estimule la división celular. Sin embargo, la adición de la hormona con luz (C) no tiene diferencia significativa con los tratamientos que tienen un solo factor (A y B).

5.2.2.3 Relación Biomasa Húmeda a Biomasa Seca (BH/BS)

En este trabajo se midió la masa húmeda y la masa seca a lo largo de todo el tiempo de cultivo con el propósito de determinar la influencia de la luz como un posible promotor del crecimiento celular.

La relación entre la biomasa seca (BS) y la biomasa húmeda (BH) fue calculada como el promedio entre la relación dada por cada uno de los triplicados (de la misma muestra), para ambas replicas, estos resultados se pueden observar en el Gráfico 12. En el Anexo H se encuentran los datos experimentales.

Gráfica 12. Relación biomasa húmeda y biomasa seca de suspensiones celulares en la cinética de crecimiento de *B. patinoi*



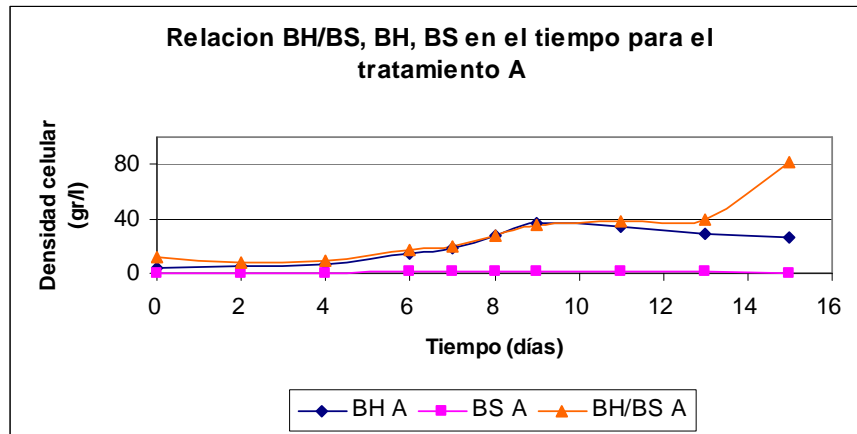
En la Gráfica 12 se observa que el tratamiento D presenta un incremento en los cuatro primeros días de cultivo, esto es común en suspensiones celulares vegetales en condiciones de estrés (Bhadra y Shanks, 1997 en Habeych, 2003) ocasionando ósmosis de nutrientes que se puede reflejar en un aumento de tamaño celular incrementado la relación BH/BS, para el resto del cultivo se observa un decremento súbito que luego se hace progresivo el cual puede ser explicado como un daño en la membrana permitiendo la salida de solutos favoreciendo la salida de agua, reduciendo así la masa húmeda y como tal la relación BH/BS.

El tratamiento B tiende a permanecer constante lo que indica un incremento similar en la masa húmeda y en la masa seca.

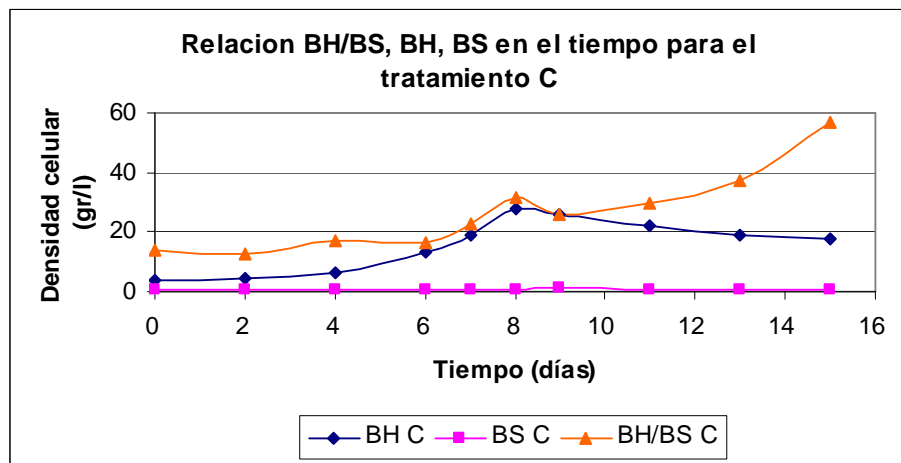
Los tratamientos A y C (presencia de luz) que se observan en los Gráficos 13 y 14, muestran una tendencia a tener ligeros incrementos seguidos de un comportamiento constante en la relación BH/BS, sugiriendo así que la presencia de luz no presenta un efecto elicitor. Si este fuera el efecto se presentaría un marcado decrecimiento de esta relación, debido a que la tasa de crecimiento de biomasa seca es mayor a la tasa de crecimiento de biomasa húmeda, por la deposición de moléculas en la pared de la célula que se

presenta con el fin de reforzar esta para prevenir el ingreso o el ataque de supuestos patógenos (Habeych, 2003).

Gráfica 13. Relación BH/BS para el tratamiento A en suspensiones celulares de *B. patinoi*



Gráfica 14. Relación BH/BS para el tratamiento C en suspensiones celulares de *B. patinoi*



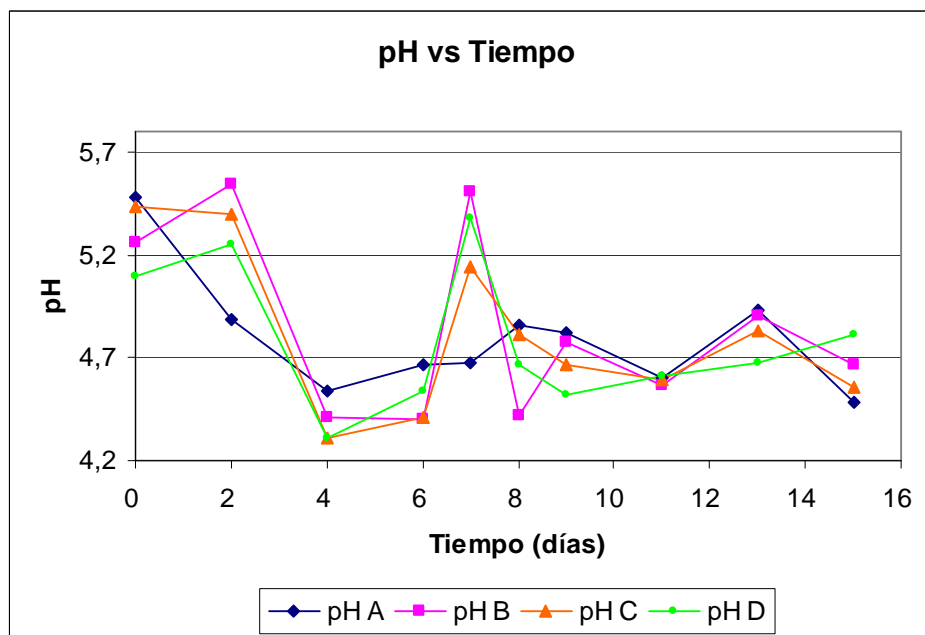
5.2.2.4 Análisis del pH en las suspensiones celulares

En el anexo H se encuentran los datos obtenidos de la medición del pH para los diferentes tratamientos y se pueden observar en la Gráfica 15. El comportamiento del pH para todos los tratamientos fue un comportamiento típico en las suspensiones de células vegetales, en las cuales se obtiene una

disminución del pH por más de una unidad en los primeros dos días de cultivo, se ha postulado que este puede ser un mecanismo de la célula para controlar el pH intra y extracelular produciendo ácidos orgánicos débiles que salen fácilmente de la célula, los cuales llevan a cabo un efecto tampón como lo reportan Bhadra y Shanks (1997) en Habeych (2003). Este comportamiento se presentó también en las suspensiones celulares de *B. patinoi* como se aprecia en la Gráfica 15. Los tratamientos A, B, C y D mostraron una disminución hacia el día 4 de cultivo, momento en el cual finaliza la fase lag y comienza la fase exponencial, justo después de esta reducción en el pH se presenta un retorno gradual al pH original, Dixon (1997) atribuye este aumento de pH a la toma de nutrientes del medio de cultivo. Finalmente, ocurre otra caída que coincide con el tiempo donde se obtiene el número máximo de células producidas según lo reporta Gómez (1998).

Como se observa en la Gráfica 15, en los tratamientos B y D los cuales tienen en común la ausencia de luz se presenta un pequeño incremento en el pH en los primeros dos días de cultivo, esto puede ser ocasionado por estrés oxidativo debido a la ausencia de luz lo cual se evidenció con el oscurecimiento de las suspensiones.

Gráfica 15. Gráfico comparativo de pH para los tratamientos A, B, C y D en las suspensiones celulares



5.2.3 Determinación de proteína extracelular

Se cuantificó el contenido de proteína total extracelular en el medio, en el cual se evidencia que el contenido de proteínas aumentó con la edad del cultivo, presentándose mayor producción de proteína en el día nueve, coincidiendo con el tiempo de mayor producción de biomasa. Aunque la función de las proteínas en el medio de cultivo es desconocida, Quiroz *et al.* (2002) proponen que una de las funciones que se le pueden atribuir es la modificación de los polímeros de la pared celular relacionando esta producción con el incremento de biomasa.

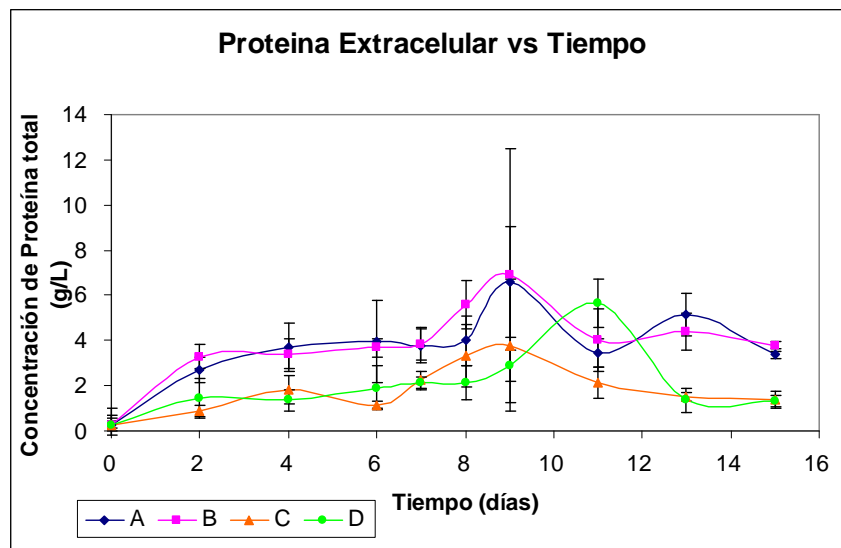
La mayor parte de las proteínas que son excretadas al medio de cultivo son efecto del mecanismo de defensa de las plantas, aunque la composición de proteínas cambia con la edad del cultivo (Quiroz *et al.*, 2002).

En suspensiones celulares de café se reportan cantidades significativas de proteínas extracelulares en el medio justo después de alcanzar la fase

exponencial, de la misma manera se ha observado que para muchas especies vegetales tales como *Daucus carota*, *Hordeum vulgare* y *Solanum tuberosum* se ha reportado la presencia de proteínas extracelulares y su aumento con la edad del cultivo (Quiroz *et al.*, 2002).

Como se evidencia en la Gráfica 16, la presencia de al menos un factor (hormona 2,4-D o luz) (tratamiento A o B) favorece la producción de proteína extracelular en un 44.91% sobre la presencia de ambos factores (tratamiento C) y de un 58.14% sobre el control (tratamiento D), estos porcentajes corresponden al final de la fase exponencial (día nueve de cultivo). La mayor concentración de proteína obtenida fue de 6.88 g/l en el tratamiento B (2,4-D, no luz); de 6.58 g/l en el tratamiento A (luz, no 2,4-D), 3.79 g/l en el tratamiento C (luz, 2,4-D), en el día nueve de cultivo y de 5.93 g/l en el tratamiento D (control) en el día once de cultivo.

Gráfica 16. Proteína total extracelular para los tratamientos A, B, C y D en suspensiones de *B. patinoi*



Como se puede observar en la gráfica de interacciones (Anexo E) se presenta una diferencia estadísticamente significativa cuando solo una de las variables (luz u hormona) está presente en el medio de cultivo. Además, se pudo observar que cuando hay presencia o ausencia de ambos factores, se presentó una menor producción de proteína extracelular.

La concentración inicial de proteína extracelular en el medio para el tratamiento B es de 0.28 g/l y la concentración en el día de mayor producción fue de 6.88 g/l, lo anterior representa un incremento de 25 veces (95.93%) con respecto al día cero, misma proporción reportada por Quiroz *et al.* (2002) para suspensiones celulares de *C. arabica*, cabe anotar que para *B. patinoi* el contenido de proteínas estuvo en el orden de g/l mientras que para *C. arabica* es de µg/l.

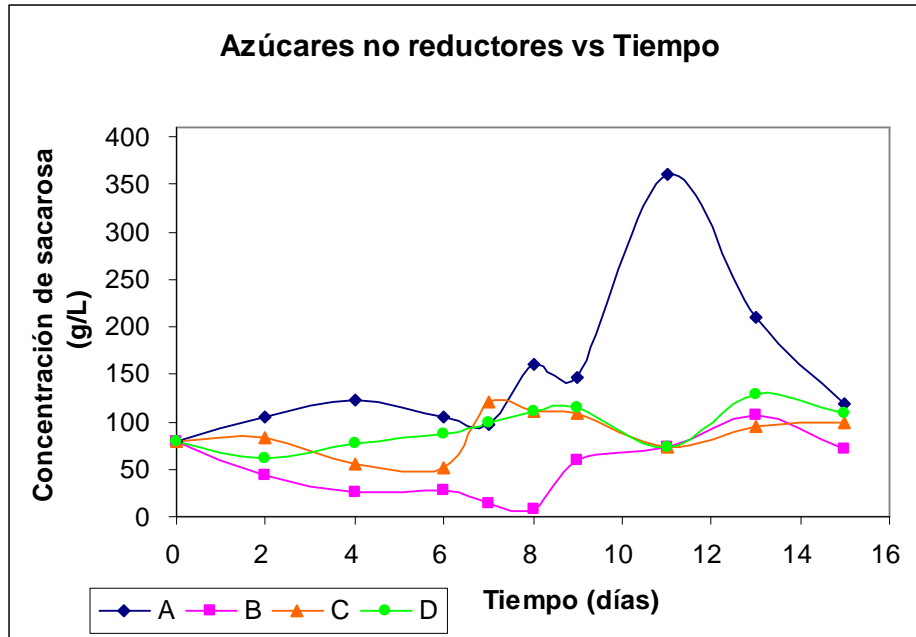
En el análisis de múltiples variables (Anexo C) se pudo observar que la producción de proteína extracelular está relacionada con el crecimiento celular, ya que ambas presentan un P-Valor de 0 con un nivel de significancia del 95%.

5.2.4 Determinación de azúcares no reductores

De acuerdo con la Gráfica 17, se pudo observar que los tratamientos B, C y D presentan un consumo de azúcares no reductores al inicio del cultivo, que coincide con el inicio de la fase exponencial en el crecimiento celular para B y C y, en el caso del tratamiento D, esto puede deberse al mantenimiento celular, ya que en este no hay producción de biomasa. Esto puede ocurrir ya que al comienzo del crecimiento celular las células se están adaptando al medio nuevo y se incrementa el gasto energético en ellas.

El tratamiento A presenta una producción máxima de 360.4 g/L y esta producción fue superior al resto de los tratamientos en un 65%. Este tratamiento (sin hormona) presentó un aumento en la concentración de azúcares no reductores a lo largo de todo el periodo de cultivo, mientras que el tratamiento D presentó una tendencia a permanecer constante.

Gráfica 17. Azúcares no reductores para los tratamientos A, B, C y D en suspensiones celulares de *B. patinoi* con un nivel de confianza del 95%.



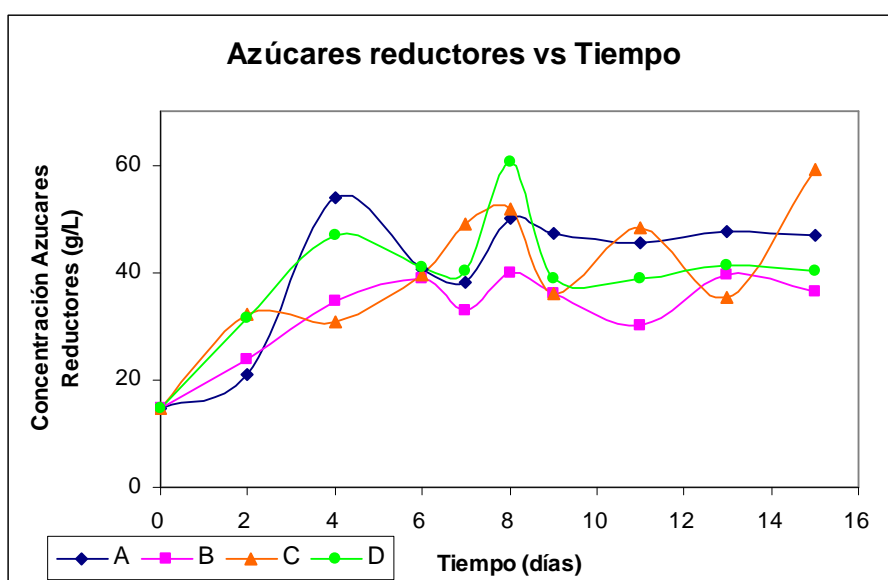
Estadísticamente no se observó una relación entre el consumo de azúcares no reductores y el crecimiento celular, esto se puede observar en el anexo D, en el análisis de correlaciones donde se presenta un P-valor de 0,4489, con nivel de significancia de 0,05, por lo tanto no es significativa esta correlación.

En general, las suspensiones celulares de *B. patinoi* presentaron una producción de azúcares no reductores, por eso no es posible determinar su consumo neto. Esto es consistente con la información reportada por Villalobos (1987) y Gómez (1988) quienes afirman que el fruto de borjón, bajo condiciones *in Vivo*, presenta una producción de 7.8% de azúcares totales, por lo tanto es de esperarse que las suspensiones celulares presenten este comportamiento. Adicionalmente, es posible que se haya presentado producción de exopolisacáridos, los cuales pueden haberse hidrolizado durante el procedimiento de cuantificación de azúcares no reductores dando unidades de glucosa, fructosa, glucosamina o derivados que pueden reaccionar positivos a DNS y que son comunes en suspensiones celulares.

5.2.5 Determinación de azúcares reductores

De acuerdo con lo reportado por la literatura, el fruto de borjój contiene 6.4 % de azúcares reductores, lo cual indica que no es posible calcular un consumo neto de estos, ya que se asume que hay una producción superior al consumo a lo largo del cultivo, esto se puede observar en la Gráfica 18 en la cual es posible observar que la máxima producción promedio fue de 48.79 gr/l.

Gráfica 18. Azúcares reductores para los tratamientos A, B, C y D en suspensiones celulares de *B. patinoi*.



Estadísticamente, se observó que todos los factores bajo estudio (luz y hormona 2,4-D) fueron significativos en la variable respuesta azúcares reductores, como se observa en el anexo G.

5.3 Análisis químicos

Se realizaron análisis químicos con la finalidad de buscar cualitativamente la presencia de algunos metabolitos secundarios extracelulares que podrían estar presentes en las suspensiones celulares de *B. patinoi*.

5.3.1 Identificación de componentes

La identificación de metabolitos secundarios extracelulares se realizó por cromatografía de capa fina (TLC). Los resultados se pueden observar en la Tabla 5. Las pruebas realizadas para antraquinonas y flavonoides dieron negativas, mientras que para sesquiterpenlactonas dieron positivas a lo largo de todo el periodo de cultivo al utilizar el revelador de Lieberman que induce a una coloración rojiza como se puede observar en la Foto 14.

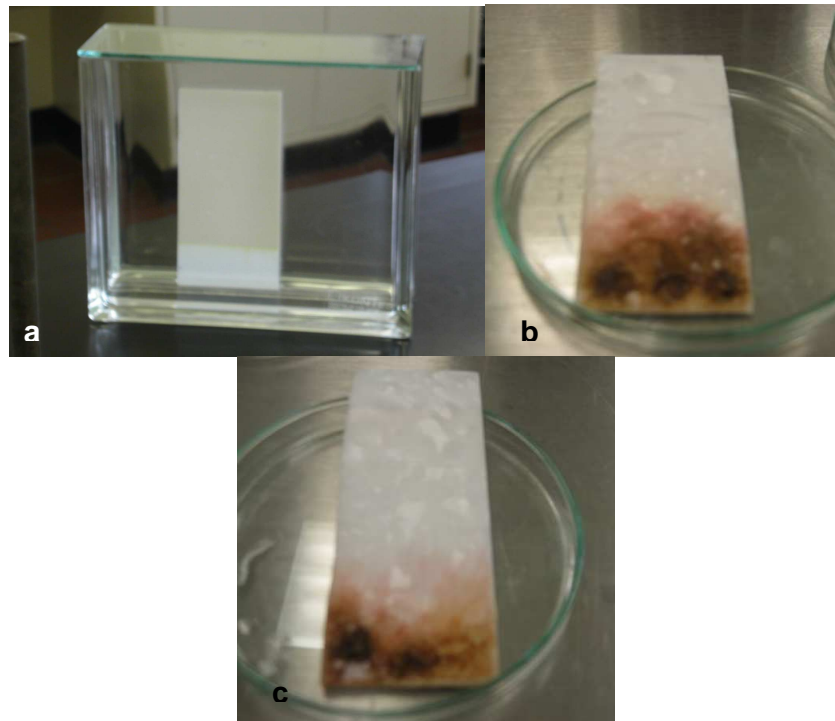
Tabla 5. Resultados Cromatografía de capa fina para identificación de metabolitos secundarios extracelulares en suspensiones celulares de *B. patinoi*

MUESTRA		ANTRAQUINONAS	FLAVONOIDES	SESQUITERPENLACTONAS
A	0	-	-	+
	9	-	-	+
	15	-	-	+
B	0	-	-	+
	9	-	-	+
	15	-	-	+
C	0	-	-	+
	9	-	-	+
	15	-	-	+
D	0	-	-	+
	9	-	-	+
	15	-	-	+

El resultado negativo para estos metabolitos no implica que no estén presentes, es posible que esta respuesta se haya presentado debido a una poca afinidad de los metabolitos evaluados y el eluyente empleado; otro factor que pudo ocasionar esta respuesta, es que los metabolitos pueden presentarse intracelularmente o en otras fases del cultivo, y que pueden aparecer como respuestas a estímulos, lo cual generalmente ocurre al final del cultivo en ausencia de nutrientes, cuando comienza el metabolismo endógeno donde la energía de mantenimiento es suministrada por la degradación de una parte de la biomasa (Doran, 1999). Algunas veces los metabolitos secundarios no se

expresan al establecerse un cultivo *in Vitro* de la especie, incluso es posible que el metabolito se exprese en el callo y al este ser transferido a un medio líquido puede no expresarse. En ocasiones es posible que se expresen metabolitos que en la planta *ex Vitro* no se encuentran (Orozco, 2002).

Foto 14. Cromatografía de capa fina (TLC) para identificación de sesquiterpenlactonas; a: Placa de cromatografía. b: Placa coloreada con respuesta positiva tratamiento B, c: Placa coloreada con respuesta positiva tratamiento C



CONCLUSIONES

Se establecieron suspensiones celulares de *B. patinoi* con un activo crecimiento celular cuando se inocularon callos friables en medio líquido MS, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de Ampicilina (grado reactivo), 1 mg/L de 2,4-D, con un inóculo de 20 g BH/L de callo friable con un temperatura promedio de 27 °C, agitación orbital de 160 rpm y régimen total de luz; determinando así que el tiempo necesario para la desagregación celular es de 6 días, momento en el cual se encuentran completamente separados los agregados celulares y la suspensión luce homogénea, siendo este el momento ideal para finalizar la etapa de desagregación e iniciar el cultivo en suspensión de *B. patinoi* alcanzando una densidad celular de 3,5 g/L de células secas.

De acuerdo con la cinética de crecimiento celular a las condiciones evaluadas, se determinó que el tiempo de la fase lag fue de 4 días, seguida por la fase exponencial la cual tuvo una duración de 5 días (finalizó en el día 9 de cultivo) y finalmente se presentó una etapa de decline hasta el final del cultivo el cual se mantuvo durante 15 días.

Los parámetros estudiados mostraron tener un efecto sobre el crecimiento celular, en presencia de al menos uno de ellos se observa un crecimiento celular positivo, en presencia de ambos factores el crecimiento celular es menor que el que se observa en presencia de solo uno, pero en ausencia de ambos no presenta una respuesta positiva al crecimiento. Para obtener un incremento en la biomasa es indiferente cual de los factores se encuentre presente, siempre y cuando haya al menos uno de ellos.

Estadísticamente no se encontró que alguno de los factores bajo estudio (luz y hormona), fuera más significativo que el otro con respecto al crecimiento de biomasa, por lo tanto, las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de una mayor producción de biomasa son las del tratamiento A (presencia de luz y ausencia de hormona), aunque el costo de la luz es significativo en términos

económicos es posible minimizarlo, mientras que, para el tratamiento B (presencia de hormona y ausencia de luz) el cual es la siguiente alternativa en cuanto a mayor producción de biomasa, tiene como desventaja el costo de la hormona el cual no es posible minimizar.

La mayor velocidad de crecimiento se observó en el tratamiento C (presencia de ambos factores) la cual fue de $0.12\text{g}\cdot\text{día}^{-1}/\text{L}$. No se encontró una relación entre la velocidad de crecimiento y la cantidad de células producidas, así mismo como no fue posible relacionarla con la producción de proteína total extracelular ni de azúcares no reductores.

En este trabajo se midió la masa húmeda y la masa seca a lo largo de todo el tiempo de cultivo con el propósito de determinar la influencia de la luz en el crecimiento celular, sugiriendo que la luz no presentó un comportamiento típico de un elicitador, el cual aumenta la tasa de crecimiento de peso seco mas que la tasa de de peso húmedo y, así mismo, el pH no sufrió un aumento como es de esperarse en procesos de elicitación.

No fue posible relacionar la concentración de los azúcares no reductores con el crecimiento celular, estos en lugar de evidenciar un consumo presentaron una producción neta. De la misma manera se presentó producción de azúcares reductores. Por lo tanto, no se encontró que dichos azúcares estuvieran asociados al crecimiento celular en vista de que éstos tuvieron un comportamiento irregular.

De acuerdo con el análisis estadístico, la producción de proteína se encuentra evidentemente asociada al crecimiento celular. El incremento de la proteína aumentó conforme aumentó la edad del cultivo y alcanzó una producción 25 veces más que al inicio del cultivo, permitiendo asociarla con el metabolismo primario.

Con base en lo reportado en la literatura, es bien sabido que la luz participa en la fotosíntesis regulando la actividad de muchas enzimas (en algunos casos es posible la inactivación de algunas de ellas en ausencia de luz), pero el

mecanismo por el que esto ocurre es aún desconocido, además, la respuesta que la luz puede ocasionar está relacionada directamente con la especie vegetal y varía de una especie a otra. Es por esto que, en el caso de *B. patinoi*, no se puede establecer el mecanismo por el cual la luz afecta el crecimiento celular, sin embargo, sí se observó que la presencia de luz lo mejoró.

Mediante análisis químicos se encontró de manera cualitativa la presencia de Sesquiterpenlactonas (sesquiterpenos), a las cuales se atribuyen propiedades antitumorales y antimicrobianas; este hallazgo ratifica la importancia de continuar con los estudios de esta especie vegetal (*Borojoa patinoi*) como una fuente alternativa de sustancias que actualmente tienen un alto valor agregado en la industria.

RECOMENDACIONES

Algunas recomendaciones para trabajos futuros sobre el tema son:

- Se recomienda estudiar la respuesta de la variación en la densidad inicial de inóculo en el crecimiento celular y así mismo determinar una densidad crítica o mínima inicial para lograr el crecimiento celular en suspensión.
- Mantener las suspensiones por un periodo mas largo de cultivo para determinar la expresión y cuantificación de algunos metabolitos secundarios en suspensión.
- Llevar a cabo estudios que permitan evaluar elicitores bióticos y/o abióticos con respuestas conocidas en otras especies.
- La luz presentó algún tipo de estímulo, tal vez como promotor del crecimiento celular, lo que deja abierta la posibilidad de estudiar diferentes intensidades lumínicas, periodos de exposición y determinar su efecto desde el punto de vista fisiológico.

BIBLIOGRAFÍA

Anónimo¹, El Borojó.

<http://www.gobant.gov.co/organismos/sagricultura/documentos/BOROJO.doc>

(fecha de consulta: marzo de 2006)

Anónimo², Prácticas de Fisiología Vegetal

<http://www.ujaen.es/dep/bioani/practica%20metabolismo%20secundario.pdf>

(fecha de consulta: diciembre 10 de 2005).

Anónimo³. Compuestos fenólicos

[http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/\\$File/web_fenolicos.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/$File/web_fenolicos.htm)

(fecha de consulta diciembre 11 de 2005).

Anónimo⁴, 2006. Antraquinonas

<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtualData/Libros/Quimica/pigmentos/archivos%20PDF/antraquinonas.pdfv>

(fecha de consulta: diciembre 9 de 2005).

Anónimo⁵, Plantas Medicinales <http://inistor.galeon.com/pagina2.htm>

(fecha de consulta: diciembre 20 de 2005).

Anónimo⁶, 2006. Antraquinonas

<http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtualData/Libros/Quimica/pigmentos/archivos%20PDF/antraquinonas.pdf#search=%22antraquinonas%22>

(fecha de consulta: agosto 17 de 2006).

Anónimo⁷, 2006. Flavonoides

http://www.grupoaulamedica.com/aula/nutricion/n62002/03_Los_flavonoides.pdf#search=%22flavonoides%22

(fecha de consulta: agosto 16 de 2006).

Anónimo⁸, 2006.

http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apbot-farm2c/evanswc01/29.html

Anónimo⁹, Medina, M.; Lampreave, F. Anel, A. y Lantero J.M. Guion de prácticas, fundamentos de metodología bioquímica.

http://72.14.209.104/search?q=cache:qckWVG1KdbcwJ:www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/PraFMB200607.doc+antibi%C3%B3tico+%2B+suspensiones+celulares+%2B+mg+%2B+70&hl=es&gl=co&ct=clnk&cd5 (Consulta: marzo de 2006)

Arenas, L.E. 1985., El borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr.) y sus posibilidades de explotación en el choco, CODECHOCO. Memorias seminario recursos genéticos promisorios (1981- 2001) 168-181pp

Capataz J. 2005. Efecto de los elicitores abióticos sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *Azadirachta indica* y su efecto sobre *Spodoptera* sp. (Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín).

Córdoba, J.Á. 1988. Cultivo del Borojó. *Revista ESSO Agrícola* No.1. Bogotá, Colombia. 3-12 pp

Córdoba, J.Á. 1988 El Cultivo del Borojó. *Revista EL CACAOTERO* colombiano No 36, V 11 p 35-49. Medellín Colombia.

Domínguez, X.A. 1988. Métodos de investigación fotoquímica. Limusa, México pp 45.

Duarte, A. 1998. Introducción a la ingeniería bioquímica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Dupont N. 1992. Contribución al estudio de la pulpa de borojó (*Borojoa patinoi*) cultivado en la región de río claro (Antioquia) Universidad Nacional sede Medellín, pp 63 (Tesis de grado).

Erazo Y. 1999 Especies promisorias de la Amazonia, conservación, manejo y utilización del germoplasma, Corpoica. pp 60-71.

Gallardo, L.H y Yuffá, A. 2000. Multiplicación masiva del café (*coffea arabica* L. cv. catimor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriónicas. Instituto de biología experimental, Centro de Botánica Tropical. Universidad Central de Venezuela.

Giménez C. y Colmenares M. 2004. Evaluación in Vitro de la resistencia a las toxinas de *Mycosphaerella fijiensis* en *Musa* spp. Departamento de biología, Facultad experimental de ciencias. Universidad del Zulia, Venezuela.

Giraldo, C.I *et al.* (2004) determinación del sexo en Borojó (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas) mediante marcadores moleculares. Revista Colombiana de Biotecnología Vol. 6 No 2, 9-14 pp.

Gómez, R.K. 1998. Propagación y mejora genética de las plantas por Biotecnología, pp 24-44.

Gómez M.I. 1988. Caracterización del Borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr) para su posible industrialización como néctar, (Trabajo de grado, Corporación Universitaria Lasallista), Medellín.

Habeych, David. 2003. Evaluación de Elictores Químicos sobre la Producción de Indolalcaloides en Células en Suspensión de *Catharanthus roseus*. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

Jiménez B.; Restrepo D.I. 1987. Aspectos agronómicos y botánicos del cultivo de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr.) (Tesis de Grado Universidad Nacional sede Medellín. p 70

Kieran, P.M.; Macloughlin, P.F.; Malone, D.M. 1997. Plant cell suspensions cultures: some engineering considerations. Journal of Biotechnology, 59:39-52.

Kurata, H.; Matsumura, S y Furusaki, S. 1997. Light irradiation causes physiological and metabolic changes for purine alkaloid production by a *Coffea*

Arabica cell suspension culture. Department of chemistry and biotechnology, The University of Tokyo, Japan.

Lee, H.B. 1996. Fundamentals of food biotechnology. United Kingdom: VCH Publishers.

Lila M.A. 2005. Valuable secondary products from in Vitro culture. Plant Development and Biotechnology.

Lowry, O.H. 1951. Protein measurement with the Folin phenol, reagent. J. Biol. Chem. 193,. p. 265-275

Martínez D. M. 2005. Estandarización de un para la obtención de callos embriogénicos de borojó (*Borojoa patinoi*). (Tesis de Grado Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid).

Mosquera J.L. y Arenas L.E. 1995 EL BOROJÓ Cultivo agroforestal del choco fundamental para desarrollo sostenible, CODECHOCO, pp 30

Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem 31 (3): 426-428

Orozco, F. 2002. Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea* y evaluación de la producción de 1,8 cineol y otros terpenoides. Tesis Universidad Nacional, Medellín.

Pereira A.E. 1998. Elaboración de los descriptores de cuatro especies vegetales promisorias de la amazonía colombiana, (Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias agropecuarias sede Medellín). pp. 52- 56, 83-89

Quiroz, F.R.; Rodríguez, S.C. y Loyola V.M. 2002. Patrón proteico extracelular durante la embriogénesis somática en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. Centro de investigación científica de Yucatán, México.

Rengifo L; Giraldo CI; Aguilar E; Gaviria D y Alegría AH. 2004, Determinación del sexo en borojó (*Borojoa Patinoi Cuatrecasas*) mediante marcadores moleculares. Revista Colombiana de Biotecnología Vol. 6 No 2, 9-14 pp

Reyes C. 2000 Borojó Amazónico, Borojó Chocoano, (Monografía).

Roca, W; Mroginski, L. Cultivos de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT. 1993.

Segura, J. 1993. Morfogénesis In Vitro, En: Azcon-Bieto, J; Talón, M. Fisiología y Bioquímica vegetal. Mc Graw Hill. España.

Taiz, L.; Zeiger, E.; Plant physiology. 3ª edición. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 2002.

Velasco A. 1987. El BOROJÓ. Resumen bibliográfico de aspectos botánicos agronómicos y industriales, Secretaria de agricultura y fomento del valle, Cali col, pp 41.

Villalobos, V.M; Thorpe, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca W. y Mroginski L. Los cultivos de tejidos en la agricultura. Centro Internacional de Agricultura tropical (CIAT). Cali, Valle.

ANEXOS

ANEXO A

Análisis de la Varianza para la variable respuesta **Peso seco**

FACTOR	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la Media	Relación F	P-Valor
Ampicilina	0.0915062	1	0.0915062	0.06	0.8078
RESIDUOS	20.8369	14	1.48835		
TOTAL (CORREGIDO)	20.9284	15			

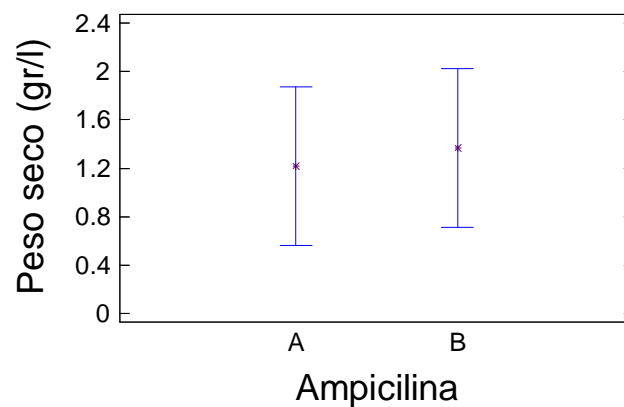
Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rangos para **PESO SECO DESAGREGACION**

Ampicilina	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A	8	1.21625	0.431328	X
B	8	1.3675	0.431328	X

Contraste	Diferencias
A - B	-0.15125

Medias para desagregación con un 95 % de confianza



ANEXO B

Análisis de la Varianza para la variable respuesta el crecimiento celular. (Biomasa)

FACTOR	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la Media	Relación F	P-Valor
A:hormona	0,475347	1	0,475347	6,89	0,0115
B:luz	0,472781	1	0,472781	6,86	0,0117
C:tiempo	2,24535	9	0,249483	3,62	0,0016
AB	1,54475	1	1,54475	22,41	0,0000
AC	1,09384	9	0,121537	1,76	0,0999
BC	1,72724	9	0,191915	2,78	0,0102
RESIDUAL	3,37825	49	0,0689439		
TOTAL	10,9376	79			

Contraste Múltiple de Rangos para Biomasa según Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

TRATAMIENTOS	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
D	20	0.000384583	00.0000745022	X
C	20	0.00069	0.0000745022	X
A	20	0.00081125	0.0000745022	X
B	20	0.000811667	0.0000745022	X

Comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras

Contraste	Diferencias
A- B	-4.1665E-7
A- C	0.00012125
A- D	*0.000426667
B - C	0.000121667
B - D	*0.000427083
C - D	*0.000305417

* indica una diferencia significativa.



ANEXO C

Análisis estadístico para relacionar proteína total extracelular con el crecimiento celular

Correlaciones

	BIOMASA	PROTEINA
BIOMASA		0,4425
Tamaño de muestra		(80)
P-Valor		0,0000
PROTEINA	0,4425	
Tamaño de muestra	(80)	
P-Valor	0,0000	

ANEXO D

Análisis estadístico para relacionar azúcares no reductores con el crecimiento celular

FACTOR	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la Media	Relación F	P-Valor
Between groups	194242,	1	194242,	262,44	0,0000
Within groups	45888,6	62	740,138		
Total (Corr.)	240130,	63			

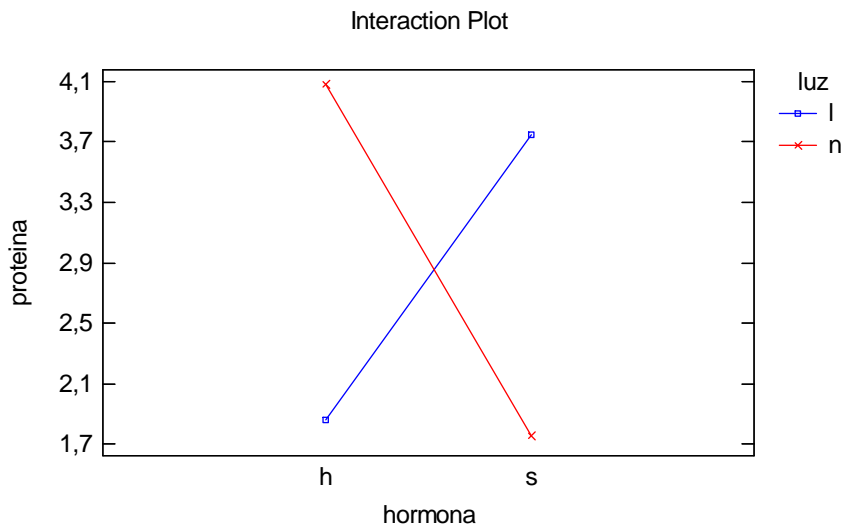
Correlaciones

	Biomasa	Azúcares No Reductores
Biomasa		0,1387
Tamaño de muestra		(32)
P-Valor		0,4489
Azúcares No Reductores	0,1387	
Tamaño de muestra	(32)	
P- Valor	0,4489	

ANEXO E

Análisis de la Varianza para la variable respuesta producción total extracelular de proteína

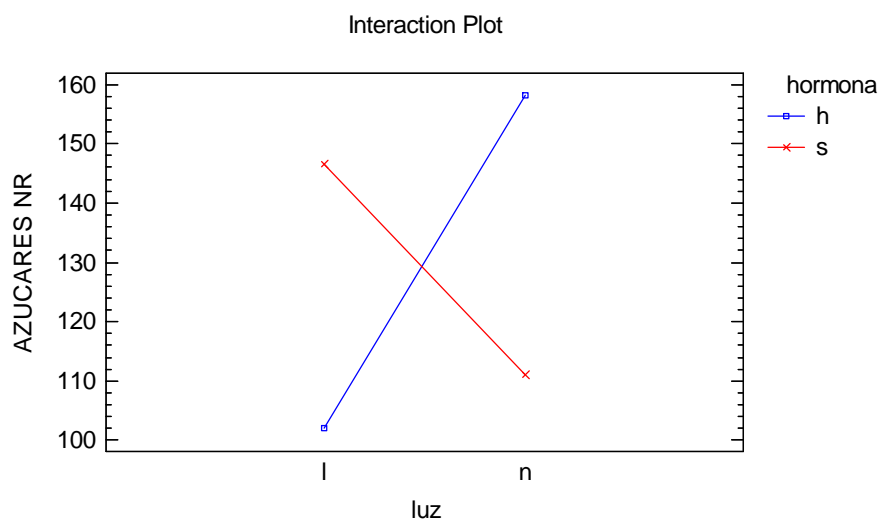
FACTOR	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la Media	Relación F	P-Valor
A:hormona	0,939611	1	0,939611	1,33	0,2538
B:luz	0,249761	1	0,249761	0,35	0,5543
C:tiempo	85,3756	9	9,48618	13,46	0,0000
AB	88,179	1	88,179	125,16	0,0000
AC	5,14743	9	0,571936	0,81	0,6077
BC	2,71888	9	0,302097	0,43	0,9131
RESIDUAL	34,5219	49	0,704529		
TOTAL	217,132	79			



ANEXO F

Análisis de la Varianza para la variable producción total de azúcares no reductores

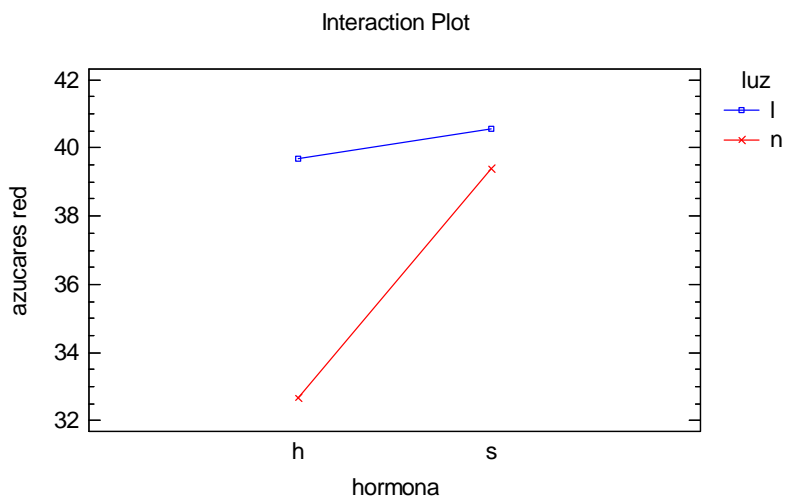
FACTOR	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la Media	Relación F	P-Valor
A:hormona	30,1965	1	30,1965	0,04	0,8404
B:luz	2135,31	1	2135,31	2,90	0,0951
C:tiempo	26650,8	9	2961,19	4,02	0,0007
AB	41850,7	1	41850,7	56,78	0,0000
AC	29409,3	9	3267,7	4,43	0,0003
BC	29359,5	9	3262,17	4,43	0,0003
RESIDUAL	36115,2	49	737,045		
TOTAL	165551,	79			



ANEXO G

Análisis de la Varianza para la variable producción total de azúcares reductores

FACTOR	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la Media	Relación F	P-Valor
MAIN EFFECTS					
A:hormona	285,088	1	285,088	17,97	0,0001
B:luz	334,153	1	334,153	21,06	0,0000
C:tiempo	7331,16	9	814,574	51,34	0,0000
INTERACTIONS					
AB	170,003	1	170,003	10,72	0,0020
AC	797,068	9	88,5631	5,58	0,0000
BC	553,847	9	61,5386	3,88	0,0009
RESIDUAL	777,395	49	15,8652		
TOTAL (CORRECTED)	10248,7	79			



ANEXO H

Datos experimentales fermentación de suspensiones celulares de *B patinoi*. Tratamiento A (en presencia de Luz y sin 2,4-D)

Tiempo (días)	Concentración promedio Células BH (g/l)	Concentración promedio Células BS (g/l)	Relación promedio BH/BS (adim.)	pH (adim.) promedio
0	3,98	0,32	12,25	5.48
2	4,83	0,57	8,39	5.29
4	6,13	0,62	9,80	4.54
6	14,83	0,90	16,47	4.54
7	18,55	0,95	19,53	4.95
8	28,10	1,00	28,10	4.8
9	37,47	1,05	35,68	4.82
11	33,80	0,89	38,09	4.6
13	28,99	0,72	39,98	4.93
15	26,69	0,32	82,11	4.48

Datos experimentales fermentación de suspensiones celulares de *B patinoi*. Tratamiento B (en ausencia de Luz y con 2,4-D)

Tiempo (días)	Concentración promedio Células BH (g/l)	Concentración promedio Células BS (g/l)	Relación promedio BH/BS (adim.)	pH (adim.) promedio
0	3,98	0,32	13,38	5.26
2	3,21	0,48	7,53	5.54
4	8,33	0,55	15,82	4.41
6	5,56	0,70	8,46	4.4
7	14,11	0,90	16,08	5.51
8	18,18	0,67	27,48	4.42
9	20,27	1,07	19,35	4.78
11	21,69	1,78	12,43	4.57
13	18,28	0,75	24,87	4.9
15	17,38	0,90	19,72	4.67

Datos experimentales fermentación de suspensiones celulares de *B patinoi*. Tratamiento C (en presencia de Luz y con 2,4-D)

Tiempo (días)	Concentración promedio Células BH (g/l)	Concentración promedio Células BS (g/l)	Relación promedio BH/BS (adim.)	pH (adim.) promedio
0	3,98	0,32	13,85	5.43
2	4,16	0,37	12,47	5.4
4	6,63	0,42	16,82	4.31
6	12,98	0,82	16,36	4.41
7	19,21	0,87	22,54	5.14
8	27,78	0,90	31,44	4.81
9	25,84	1,03	25,71	4.67
11	22,24	0,77	29,37	4.59
13	19,03	0,52	37,24	4.83
15	17,96	0,32	56,86	4.56

Datos experimentales fermentación de suspensiones celulares de *B patinoi*. Tratamiento D (en ausencia de Luz y sin 2,4-D)

Tiempo (días)	Concentración promedio Células BH (g/l)	Concentración promedio Células BS (g/l)	Relación promedio BH/BS (adim.)	pH (adim.) promedio
0	3,98	0,325	14,62	5.1
2	6,11	0,325	21,15	5.25
4	8,08	0,150	59,00	4.31
6	6,80	0,175	43,29	4.54
7	8,05	0,225	39,22	5.38
8	6,36	0,183	38,86	4.67
9	6,09	0,175	39,22	4.52
11	5,08	0,350	16,71	4.61
13	4,66	0,525	10,34	4.68
15	3,28	0,450	9,00	4.81

ANEXO I

Determinación de la proteína extracelular

Solución complejante: esta solución se preparó inmediatamente antes de usar, se mezclaron las soluciones **A** (Na_2CO_3 en agua destilada al 2% peso/volumen), **B** ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada al 1% peso/volumen), **C** (Tartrato de sodio y potasio en agua destilada al 2% peso/volumen), en proporciones de 100:1:1 respectivamente.

Solución patrón de albúmina: para obtener la curva estándar de albúmina, se prepararon 5 soluciones de NaCl al 0,9 % (peso/volumen) y albúmina con las siguientes concentraciones en ppm (mg/l): 16, 80, 200, 300, 400 como se observan en la Tabla 4.

Preparación de la solución patrón de albúmina (Lowry, 1951)

Nº de dilución	Blanco	1	2	3	4	5
μl de stock de albúmina	0	20	100	250	375	500
μl de NaCl 0.9%	500	480	400	250	125	0
Concentración (ppm)	0	16	80	200	300	400

La metodología utilizada para el análisis cinético de la determinación de la proteína extracelular se realizó de la siguiente manera:

En tubos de ensayo se sirvieron 0.5 ml de las soluciones patrón de albúmina, las muestras problema diluidas (factor de dilución 1:10) y NaCl al 0.9% como blanco. A cada tubo se le adicionó 0.5 ml de NaOH 2N y se llevaron al baño maría precalentado a 100 °C por un tiempo de 10 minutos. Posteriormente se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente, y se agregó a cada tubo 5 ml de la solución complejante, luego se agitaron en vortex y se dejaron reposar por 10 minutos. Finalmente se adicionaron 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitaron en vortex durante 20 segundos. Las muestras se dejaron en reposo en un cuarto oscuro durante 30 minutos.

Posteriormente se leyó la absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro UV visible, y con las soluciones patrón se construyó la gráfica Absorbancia vs. Concentración de albúmina sérica de bovina (BSA); la cual permite determinar la concentración de las muestras problema interpolando el valor de la absorbancia. La curva estándar debe tener un coeficiente de correlación (r) de 0.991 a 0.999 (Lowry, 1951).

ANEXO J

Cuantificación de azúcares no reductores por el método del Ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS)

Preparación de la solución Standard stock de sacarosa (30 g/l): se tomaron 3.0 gr de sacarosa anhidra grado reactivo con exactitud hasta la décima de mg la cual fue disuelta en un poco de agua desionizada y después se aforó a 100 ml con agua desionizada, esta solución debe permanecer congelada cuando no se esté usando.

Preparación del DNS: se pesaron 1.6 gr. de hidróxido de sodio grado reactivo, 30 gr de tartrato de sodio y potasio y se disolvieron juntos en 50 ml de agua desionizada, aparte se pesó 1.0 gr del DNS, se disolvió con 30 ml de agua desionizada, y se agregó lentamente con agitación la solución del DNS a la solución de tartrato y NaOH anteriormente preparadas, se ajustó a 100 ml, se filtró, y se envasó en un frasco oscuro. Esta solución se debe mantener a la temperatura del laboratorio.

Preparación del reactivo NaOH 1.0 N (500 ml): se pesaron con exactitud hasta la décima de mg; 20 gr de NaOH grado reactivo por cada 500 ml de solución, se disolvió en 300 ml de agua desionizada y luego se aforó a 500 ml. Esta solución se debe mantener a la temperatura del laboratorio.

Preparación de HCl 10% (100 ml): se tomaron 27 ml de ácido clorhídrico al 37% grado reactivo, se diluyó y se aforó hasta 100 ml con agua desionizada, y se almacenó a la temperatura del laboratorio.

Se prepararon en cada tubo 100 µl de solución con : las soluciones de la curva patrón de sacarosa, las muestras problema diluidas (factor de dilución 1:10) y como blanco agua desionizada de solución, se adicionaron 200 µl de HCl 10% a cada tubo y se agitaron en un vortex, llevándolos posteriormente a ebullición durante 10 minutos en baño María precalentado a 95 °C, luego se enfriaron y a

cada tubo se le adicionó 1 ml de NaOH 1.0 N agitando nuevamente en vortex.

Preparación de la curva de calibración para la determinación de azúcares no reductores (Miller, 1959)

Nº Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6
µl stock sacarosa 30 g/l	0.0	10	20	40	60	80	100
µl H₂O destilada	100	90	80	60	40	20	0.0
gr/l de sacarosa	0.0	3	6	12	18	24	30

Aparte se tomaron 0.5 ml de las muestras anteriores colocando esta cantidad en otros tubos rotulados a los cuales se les agregó 0.5 ml del DNS, se agitaron en vortex y se llevaron a ebullición por 5 minutos; estas muestras posteriormente se enfriaron y se les adicionó 5 ml de H₂O desionizada, se agitaron en vortex y se dejaron reposar por 15 minutos realizando lecturas a 540 nm para obtener la curva absorbancia vs. concentración.

ANEXO K

Cuantificación de azúcares reductores por el método del Ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS)

Preparación del stock de glucosa de 4 g/L: se tomaron 0.400 gr de glucosa anhidra grado reactivo y se disolvieron con un poco de agua destilada y luego se aforó a 100 ml en un erlenmeyer volumétrico.

Preparación de la curva de calibración para la determinación de azúcares reductores (Miller, 1959)

Nº Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6
Glucosa ml stock	0.0	0.025	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150
H₂O destilada ml	0.500	0.475	0.450	0.425	0.400	0.375	0.350
Volumen total ml	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
Gr./l de glucosa	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

Para la cuantificación de azúcares reductores se prepararon en cada tubo 0.5 ml de solución total con : soluciones de curva patrón, las muestras problema diluidas (1:50) y agua como blanco , se adicionó 0.5 ml del reactivo del DNS a cada tubo y luego se agitaron en vortex; llevándolos posteriormente a ebullición por 5 minutos en baño maría. Se enfriaron rápidamente y a cada tubo se le adicionó 5 ml de agua destilada, se agitaron en vortex y nuevamente se dejaron reposar 15 minutos; la lectura de la absorbancia se realizó a 540 nm, en un espectrofotómetro UV visible.