

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE  
PRODUCTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA

**Producción de saponinas triterpénicas en cultivos  
*in vitro* de *Centella asiatica***

Susana Mangas Alonso  
2009





## Materiales y métodos

### 2.1-. Material vegetal

Para realizar este trabajo, el material vegetal de partida fueron semillas y plantas de *Centella asiatica* (L) Urban, cedidas por la Universidad de Shanghai. Se trabajó, preferentemente, con la parte aérea de la planta debido a la elevada presencia de los cuatro principios activos de interés (asiaticósido, madecacosido, ácido asiático y ácido madecásico – Fig. 15).

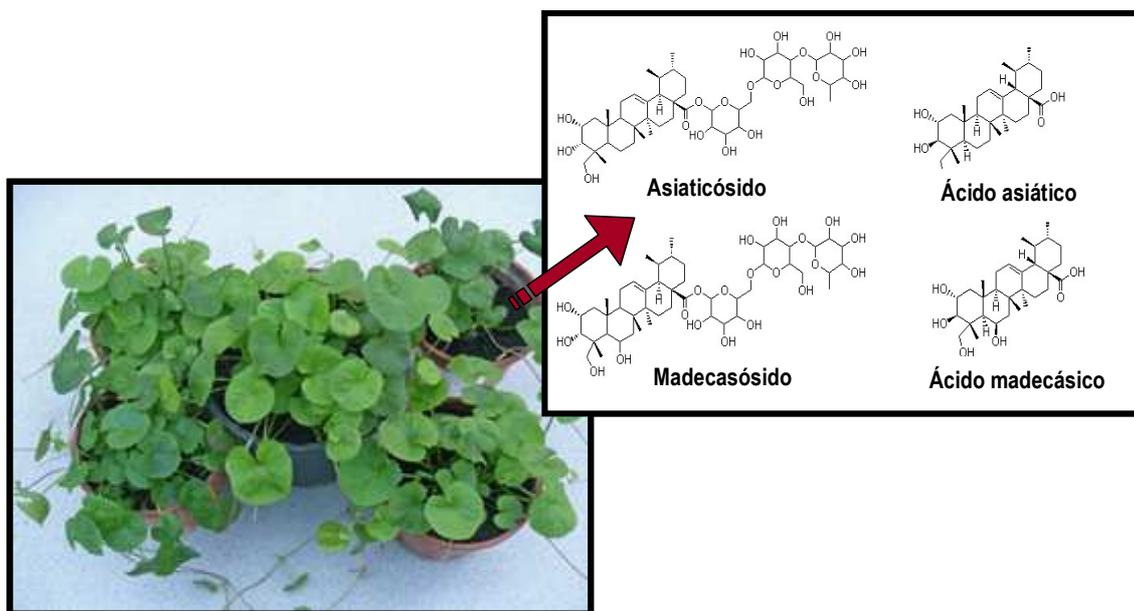


Figura 15-. *Centella asiatica* y los principios activos.

De acuerdo con diferentes estudios, se ha observado que es en la parte aérea de *C. asiatica* es donde se acumulan mayores cantidades de asiaticósido, con un 82,6%, mientras que la parte subterránea contiene aproximadamente un 1,5%. (Kim y col., 2004a). Generalmente, la síntesis de productos del metabolismo secundario va relacionada a la especificidad de los tejidos, por ejemplo la biosíntesis de alcaloides tropánicos se produce principalmente en las raíces de las especies productoras (Hakinen y col., 2005) o la síntesis de aceites esenciales de lavándula se realiza en las glándulas de la parte aérea (Sudria y col., 1999).

#### 2.1.1-. Proceso de esterilización

Debido a las características de los cultivos *in vitro*, todo el material tuvo que someterse a esterilización, se utilizaron diferentes metodologías en función de su origen, desarrollándose protocolos específicos para hojas, tallos y semillas:

# Materiales y métodos

---

## a) Esterilización de hojas y tallos

- 1.- Lavado suave con agua.
- 2.- Inmersión en HgCl<sub>2</sub> 0,1% durante 3 minutos.
- 3.- 4 - 5 lavados con agua destilada estéril.

## b) Esterilización de semillas

- 1.- Inmersión durante 30 segundos en EtOH al 70%.
- 2.- Lavado con agua destilada estéril.
- 3.- Inmersión en HgCl<sub>2</sub> 0,1% durante 10 minutos.
- 4.- Lavado con agua destilada estéril.
- 5.- Inmersión en hipoclorito sódico al 3% durante 15-20 minutos.
- 6.- 4 - 5 lavados con agua destilada estéril

### **2.1.2-. Obtención de plántulas estériles de *C. asiatica***

Para obtener plántulas de *C. asiatica* estériles, y poder trabajar con el material vegetal, sin tener que someterlo a los procesos de esterilización que en determinadas ocasiones pueden ser muy agresivos y provocar una disminución en la supervivencia del material vegetal y su correcto desarrollo, se hicieron germinar semillas naturales *in vitro*, previamente esterilizadas, y semillas artificiales *in vitro* obtenidas a partir de nódulos meristemáticos de plantas estériles.

#### **2.1.2.1-. Germinación de semillas naturales *in vitro***

Se partió de semillas procedentes de China, cedidas por el Dr. Ding de la Universidad de Shangai, y se esterilizaron como se ha descrito anteriormente (ver apartado 2.1.1). Una vez realizado el proceso de esterilización, se sometieron a diferentes tratamientos para favorecer su germinación y así la obtención de plantas estériles (Fig. 16).



Figura 16-. Semillas de *Centella asiatica* donadas por la Universidad de Shangai.

## Materiales y métodos

---

La germinación de las semillas es un proceso clave para la obtención de material vegetal y poder desarrollar una planta entera, pero muchas veces estas semillas están en un estado de latencia y no germinarán hasta que las condiciones, de luz o temperatura, sean las adecuadas. En estas semillas, la dormición se puede vencer aplicando giberelinas, una hormona que estimula la producción de hidrolasas, principalmente la  $\alpha$ -amilasa induciendo la germinación (Thomas y Hedden, 2006). Otras veces, para favorecer la germinación se realizan escarificaciones de la semilla (Paek y col., 1996).

Por estos motivos se sometieron las semillas a diferentes tratamientos para desarrollar un sistema eficaz para obtener material vegetal:

- Las semillas se mantuvieron entre 6-8 horas, en agitación, en una solución de  $GA_3$   $10^{-4}$  M.
- Las semillas agitadas en una solución con y sin  $GA_3$   $10^{-4}$  M, se sometieron a un proceso de escarificación (Paek y col., 1996). Esta técnica consiste en practicar un corte longitudinal con el bisturí en la semilla.
- Las semillas agitadas en solución de  $GA_3$   $10^{-4}$ M o no, se aplastaron con unas pinzas con la finalidad de romper la cubierta, sin llegar a lesionar el embrión.
- El resto de semillas se dejaron intactas sin someterlas a ningún tratamiento, para usarlas como control.

Después de los diferentes tratamiento se sembraron en placas con medio Murashige-Skoog (MS –tabla 4) y MS/2 (el medio MS/2 es similar al medio MS, las concentraciones de los componentes inorgánicos se reducen a la mitad y los componentes orgánicos se mantienen a la misma concentración).

Se sembraron 4 semillas por placa. Estos cultivos se mantuvieron en condiciones controladas de luz (16h de luz) y temperatura a  $25 \pm 2$  °C, durante dos meses.

# Materiales y métodos

Tabla 4-. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog.

MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE-SKOOG (MS)		
Componentes inorgánicos		Componentes orgánicos
<u>1-. Macronutrientes</u>	<u>2.- Micronutrientes</u>	<u>4-. Vitaminas</u>
KNO <sub>3</sub> .....1900 mg/l	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O.....16900 mg/l	Glicina.....2,0 mg/l
NH <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> .....1650 mg/l	ZnSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O.....8630 mg/l	Ácido nicotínico.....0,5 mg/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O.....440 mg/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....6200 mg/l	Pirodoxina · HCL.....0,5 mg/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....370 mg/l	IK.....0,830 mg/l	Tiamina · HCL.....0,5 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....170 mg/l	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O.....0,250 mg/l	5-. Sacarosa 3% (30 g/l)
	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O.....0,025 mg/l	6-. Mio-inositol (100 mg/l)
	CoCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O.....0,025 mg/l	7-. Gelrite 0,2 % (2,7 g/l)
<u>3-. EDTA - Fe</u>		pH= 5.8 ± 0.2
Na <sub>2</sub> EDTA.....37,3 mg/l		
FeSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O.....27,8 mg/l		

## 2.1.2.2 - Obtención de semillas artificiales de *Centella asiatica*

Una semilla artificial (Fig. 17) es un explanto vegetal formado por tejido meristemático, que para preservar su viabilidad se encapsula en hidrogeles, en nuestro caso se utilizó un polímero de alginato.



Figura 17-. Semilla artificial de *Centella asiatica*

Estas semillas artificiales son capaces de regenerar la planta entera y como se ha descrito en diferentes estudios constituye un posible sistema alternativo de micropropagación para diferentes especies vegetales (Basker y col., 2004; Rady, 2004; Pereira y col., 2008).

El hidrogel que se utiliza es el alginato, un polisacárido que se obtiene de las algas pardas o marrones, principalmente de la *Macrocystis pyrifera* y *Laminaria spp* (Belitz y Grosch, 2008). Este polímero está formado por dos tipos de monosacáridos, el ácido gulurónico y el ácido manurónico (Fig. 18). Las algas sintetizan el alginato inicialmente como un polímero de ácido manurónico, que posteriormente modifican transformando estas unidades de manurónico en gulurónico mediante una epimerización enzimática (Guelcher y Hollinger, 2006).

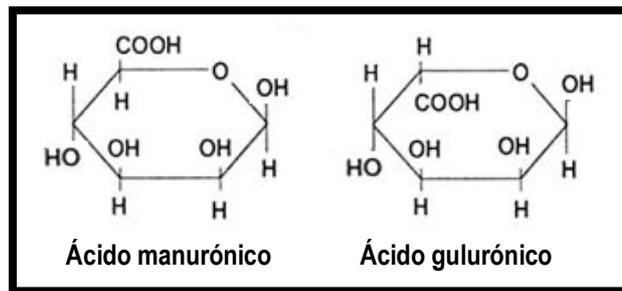


Figura 18-. Estructura del ácido manurónico y el ácido gulurónico, componentes del alginato.

Los alginatos tienen una amplia gama de utilidades, en odontología se usan para hacer impresiones dentales, en medicina para emulsionar fármacos o para formar cápsulas de los medicamentos. Por otro lado, en la industria alimenticia se utiliza por sus propiedades coloidales y no tóxicas. El alginato de sodio es considerado el mejor coloide, se usa como estabilizador y agente cremoso para los helados (por eso el helado casero nunca queda igual al helado comercial), también está presente en sopas, cremas, salsas como agente que las hace más espesas. En el mundo de la cosmética se utiliza en diversas formas, como en los lápices labiales, pinturas de uñas, cremas de afeitar, champús y cremas para el cuerpo (Belitz y Grosch, 2008).

El alginato en presencia del calcio puede formar una estructura conocida como "caja de huevos" (Fig. 19), en la cual, los iones de calcio se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gulurónico.

La estructura que forman dos cadenas de alginato con los iones calcio tiene forma helicoidal, y favorece la utilización del alginato para encapsular los explantos o fragmentos meristemáticos, dando lugar a las semillas artificiales.

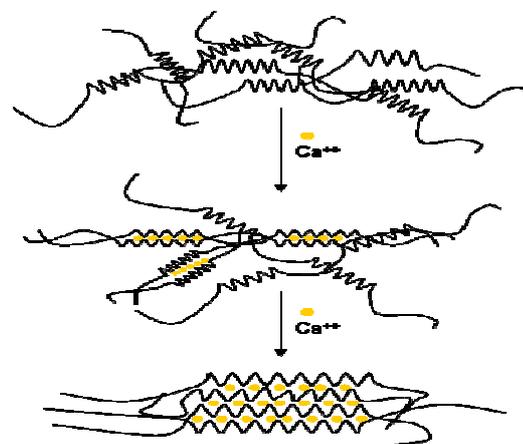


Figura 19-. Estructura en "caja de huevos", del alginato (filamentos negros) en contacto con iones de calcio (punto amarillo).

## Materiales y métodos

En nuestro caso, para la obtención de las semillas se partió de plantas de *C. asiatica* crecidas *in vitro*, que se traspasaron a placas Petri, sobre papel de filtro humedecido, para mantener la planta hidratada. A continuación se seleccionaron las estructuras meristemáticas (Fig. 20):

- meristemos apicales de raíces
- nódulo meristemático

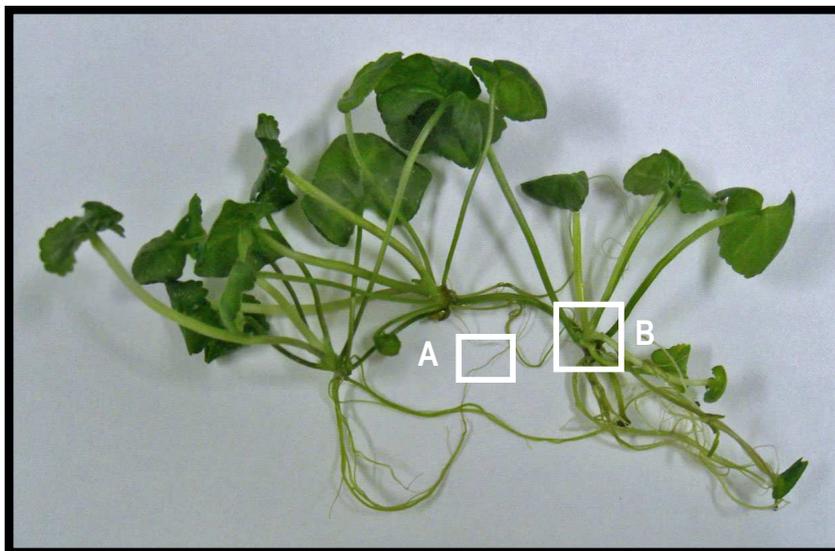


Figura 20-. Fragmentos meristemáticos, A – meristemos apicales de raíz y B- nódulos meristemáticos.

Seguidamente se cortaron fragmentos de aproximadamente 0,5 cm y se sumergieron en medio MS adicionado con alginato al 5%. Se ha comprobado que la utilización de medio MS con un 3% de sacarosa, para la obtención de semillas artificiales aumenta el porcentaje de supervivencia, siendo de un 55,9% cuando se utiliza una solución de alginato y un 72,1% cuando el alginato es disuelto en un medio MS con un aporte de sacarosa (Ballester y col., 1997).

Con una pipeta de 10 ml de boca ancha, se pasaron estos fragmentos meristemáticos del alginato a una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 0,55%, dejándolos caer gota a gota. El contacto del alginato con la solución de cloruro cálcico, en agitación suave, provocó la formación de perlas de alginato.

Posteriormente se dejaron agitar las perlas en la solución de  $\text{CaCl}_2$  durante 30 minutos.

Una vez pasado este tiempo, las perlas se lavaron varias veces con abundante agua destilada estéril y se colocaron sobre papel de filtro para eliminar el exceso de ésta (Fig. 21).

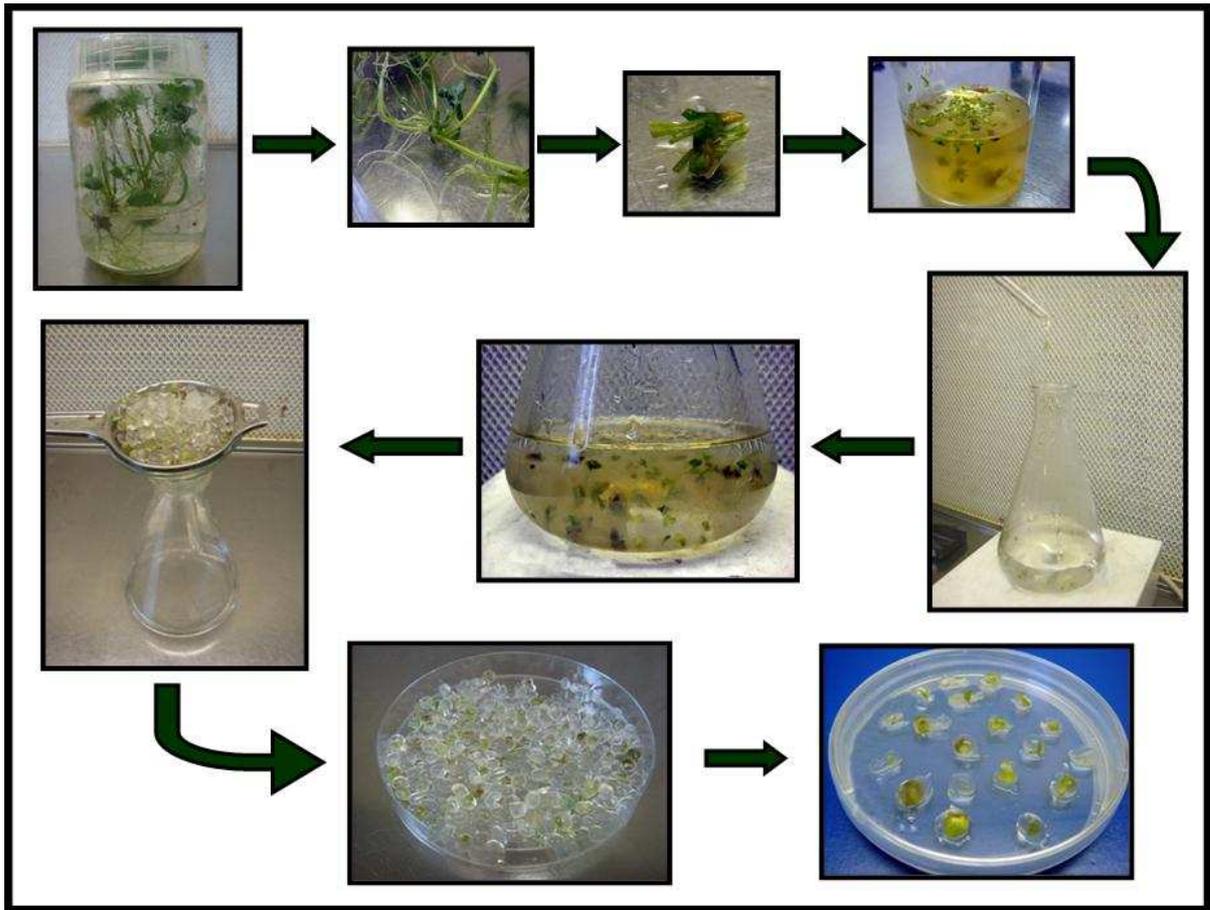


Figura 21-. Protocolo de obtención de semillas artificiales con explantos de *C. asiatica*.

Para finalizar, se escogieron las perlas que contenían explantos (Fig. 22), desechando aquellas perlas que estuvieran vacías. Una vez seleccionadas las perlas se guardaron a 4°C, en placas de Petri con medio MS, hasta su utilización (protocolo establecido por la Dra. Furmanowa y la Dra. Guzewska, Universidad de Varsovia, comunicación personal).

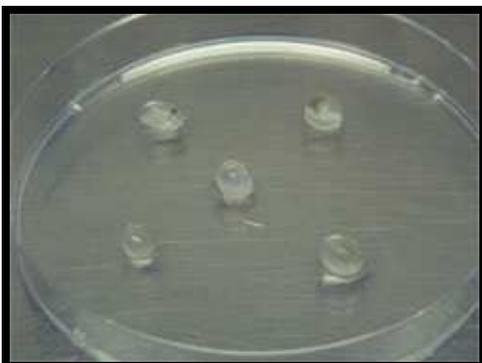


Figura 22-. Semillas artificiales con explantos de *C. asiatica*.

## Materiales y métodos

Una propiedad destacable de las semillas artificiales es su capacidad de mantener la viabilidad, después de ser almacenadas durante un determinado periodo de tiempo. Este sistema permite que el material sea transportado con facilidad, pues su pequeño tamaño y su esterilidad reducen los problemas fitosanitarios y de cuarentena, que se pueden dar cuando existen intercambios de material vegetal entre laboratorios de diferentes países. Las bajas temperaturas y una alta humedad son condiciones esenciales para mantener la viabilidad durante el almacenamiento de los segmentos nodales encapsulados. Por este motivo, se ha realizado un estudio de viabilidad de las semillas artificiales, guardadas a 4°C, durante un período de 6 meses. Para comprobar la capacidad germinativa de las semillas, cada mes se transfirieron a temperatura ambiente, manteniéndolas en un fotoperíodo de 16 h de luz, y 25 ± 2°C de temperatura, hasta su germinación.

Por otro lado, se probaron dos medios diferentes de germinación: el medio SH (Tabla 5) y una variante del medio SH (SH-ML). La diferencia entre estos dos medios es la variación de pH de 7 (SH) a 5.8 (SH-ML), la cantidad de mio-inositol de 1000 mg/l a 100 mg/l y de sacarosa, 30 g/l a 20 g/l, de SH a SH-ML.

Los cultivos se mantuvieron en condiciones de luz y 25±2°C durante dos meses.

Tabla 5-. Composición del medio de cultivo de Schenck-Hildebrandt (SH).

MEDIO DE CULTIVO SCHENCK-HILDEBRANDT (SH)		
Componentes inorgánicos		Componentes orgánicos
1-. Macronutrientes	2.- Micronutrientes	4-. Vitaminas
KNO <sub>3</sub> .....2500 mg/l	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O..... 10 mg/l	Ácido nicotínico.....5 mg/l
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....300 mg/l	ZnSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....1 mg/l	Pirodoxina · HCL.....0,5 mg/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....200 mg/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....5 mg/l	Tiamina · HCL.....5 mg/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....400 mg/l	IK.....1 mg/l	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....0.10 mg/l	5-. Sacarosa 3% (30 g/l)
	CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O.....20 mg/l	
3-. EDTA -Fe	CoCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O.....10 mg/l	6-. Mio-inositol (1000 mg/l)
Na <sub>2</sub> EDTA.....15 mg/l		
FeSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O.....20 mg/l		7-. Gelrite 0,2 % (2,7 g/l)
		pH= 7 ± 0,2

En posteriores subcultivos se traspasaron a medio sólido MS, manteniendo las mismas tasas de supervivencia.

## 2.2-. Inducción y cultivo de callo

La principal dificultad para la utilización de las plantas medicinales como fuente de productos naturales es lograr una producción constante de los principios de interés, ya que ésta se ve afectada por las condiciones del cultivo, variaciones geográficas o cambios en la climatología de la zona. Por ello, la utilización de técnicas de cultivo *in vitro* como la obtención de cultivos celulares, permiten un mayor control en la producción y una independencia de las condiciones climáticas.

El primer paso para la obtención de cultivos celulares es la inducción de callo. Esta etapa consiste en la desdiferenciación del material vegetal, y puede lograrse a partir tanto de hoja como de tallo. Las células diferenciadas que forman parte de los tejidos vegetales darán lugar a un conjunto de células no organizadas que recibe el nombre de callo. Estas células pueden regenerar una nueva planta, dicha capacidad recibe el nombre de totipotencia (describe la capacidad de regular la división celular y dar lugar a todos los tipos de células diferentes del organismo vegetal). Pero, para que se de este cambio en el tejido, es indispensable una combinación determinada de reguladores del crecimiento o fitohormonas. En nuestro caso, los reguladores del crecimiento siempre se han adicionado al medio de cultivo de Murashige-Skoog (MS), medio de cultivo utilizado por otros autores previamente, para el cultivo *in vitro* de esta especie vegetal (Banerjee y col., 1999).

Según el origen del explanto vegetal se siguió diferente metodología para la inducción de callo. Las hojas se seccionaron en forma de disco y la cara del haz se mantuvo en contacto con el medio MS (Fig. 23).

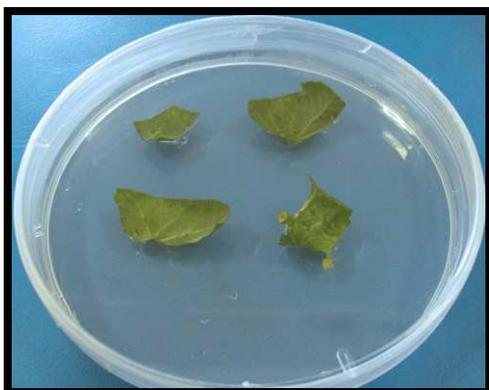


Figura 23-. Disposición de los explantos de hoja en las placas con medio de inducción.

## Materiales y métodos

Mientras que los tallos fueron seccionados en fragmentos y colocados de dos formas diferentes en el medio de cultivo (Fig. 24):

-clavados por un extremo al medio con un ángulo de 45°.

-seccionados longitudinalmente y depositados horizontalmente sobre el medio, por la zona del corte.



Figura 24-. Disposición de los explantos de tallo en las placas con medio de inducción.

El siguiente paso fue encontrar un medio óptimo de inducción de callo. Al medio MS se le adicionaron diferentes combinaciones de auxinas (ácido indolbutírico – IBA, ácido naftalenacético – NAA, ácido indolacético – IAA, ácido 2,4-diclorofenoxiacético – 2,4D) y citoquininas (quinetina – KIN, bencil adenina – BA). Los medios probados para la inducción del callo fueron: MS + BA (2 mg/l) + IBA (0,1 mg/l); MS + BA (2 mg/l) + NAA (2 mg/l); MS + KIN (0,2 mg/l) + IAA (2 mg/l) y MS + KIN (0,1 mg/l) + 2,4-D (1 mg/l).

Los cultivos se mantuvieron durante 28 días a 25°C en oscuridad. En la tabla 6 figuran todas las combinaciones hormonales utilizadas para la inducción de callo de *C. asiatica*.

Tabla 6-. Reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo para obtener la inducción de callo.

MEDIOS PARA LA INDUCCIÓN DE CALLO		
MS	+ IBA (0,1 mg/l)	+ BA (2 m/l)
	+ NAA (2 mg/l)	+ BA (2 mg/l)
	+ IAA (2 mg/l)	+ KIN (0,2 mg/l)
	+ 2,4-D (1 mg/l)	+ KIN (0,1 mg/l)

Una vez obtenido el material de callo, este se aisló de los explantes y se cultivó en una serie de medios para la obtención de biomasa de callo friable. Los medios utilizados fueron: [MS + BA (2 mg/l) + IBA (0.1 mg/l); MS + BA (2 mg/l) + NAA (2 mg/l); MS + KIN (0.2 mg/l) + IAA (2 mg/l) ] ya

## Materiales y métodos

utilizados previamente para la inducción de callo, y como medios nuevos se utilizaron: [ MS/2 + BA (2 mg/l) + IBA (0.1 mg/l); MS/2 + BA (2 mg/l) + NAA (2 mg/l) ]. El medio MS/2 es similar al medio MS pero con la diferencia de que las concentraciones de los componentes inorgánicos se reducen a la mitad, manteniendo los componentes orgánicos a la misma concentración (tabla 7). Los callos crecidos en estos medios se subcultivaron cada 28 días.

Tabla 7-. Medios de cultivo utilizados para la obtención de biomasa de callo.

MEDIOS DE SUBCULTIVO		
MS	+ BA (2 mg/l)	+ IBA (0,1 mg/l)
	+ BA (2 mg/l)	+ NAA (2 mg/l)
	+ KIN (0,2 mg/l)	+ IAA (2 mg/l)
MS/2	+ BA (2 mg/l)	+ IBA (0,1 mg/l)
	+ BA (2 mg/l)	+ NAA (2 mg/l)

Posteriormente, para lograr callos friables y optimizar el crecimiento de los callos se subcultivaron en medio MS suplementado con 0,1 mg/l IBA y 1, 2 y 3 mg/l 4PU-30 (tabla 8).

El compuesto 4PU-30 (2-cloro-4piridil-N-fenilurea) es una citoquinina de síntesis. En cultivos *in vitro* de tabaco, se observó previamente que favorecía la obtención de callos friables (Piñol y col., 1987).

Tabla 8-. Medios de cultivo utilizados para el estudio del crecimiento del callo.

MEDIOS DE CULTIVO		
MS	+ IBA (0,1 mg/l)	+ 4PU-30 (1 mg/l)
		+ 4PU-30 (2 mg/l)
		+ 4PU-30 (3 mg/l)

Con el objetivo de estudiar la cinética de crecimiento de los cultivos de callos de *C. asiatica* se realizó un estudio con diferentes medios (Tabla 8), en los que el cultivo se mantuvo durante 6 semanas y la toma de muestras se realizó a la 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup> semana (Fig. 25).



Figura 25-. Callos obtenidos en medio MS+IBA 1mg/l +4PU-30 3mg/l

## **Materiales y métodos**

Este estudio demostró un aumento en la biomasa pero no la formación de callos friables, por eso se optó en cambiar la auxina IBA por el 2,4D, manteniendo la citoquinina 4PU-30 (Fig. 26). En este medio se mantuvieron las tasas de crecimiento del callo, pero con la ventaja que se desarrollaron callos friables (característica imprescindible para la obtención de cultivos celulares ya que permite la disgregación del callo en medio líquido).

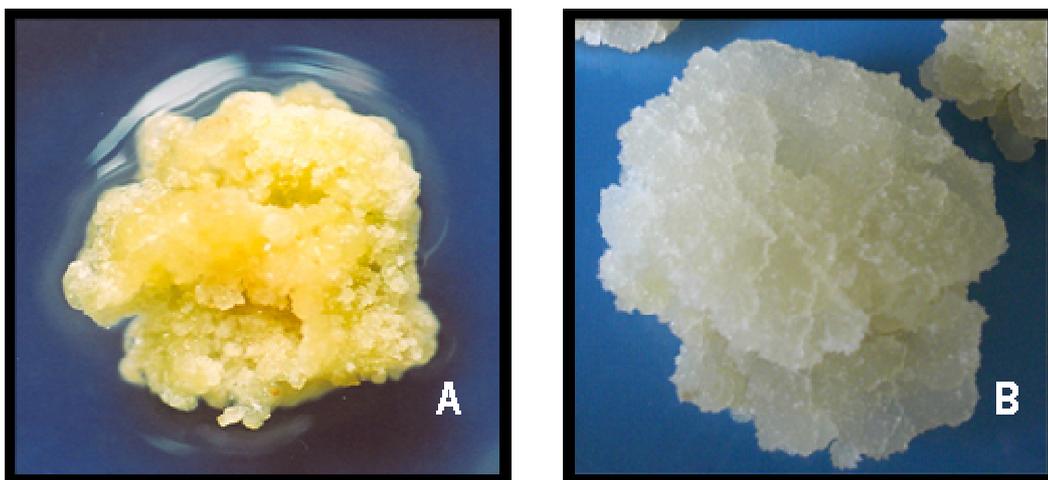


Figura 26-. A la izquierda (A): aspecto del tejido de callo en medio MS adicionado de IBA (0,1 mg/l) y 4PU-30 (3 mg/l) que permitía un aumento de biomasa. A la derecha (B): aspecto del tejido de callo en medio MS adicionado de 2,4-D (2 mg/l) y 4PU-30 (3 mg/l) favorecía el aumento de biomasa y la friabilidad del callo.

### **2.2.1-. Estudio del curso de crecimiento del callo: determinación del peso fresco y peso seco**

Con el objetivo de estudiar la cinética del crecimiento de los cultivos de callo de *Centella asiatica* y más tarde su producción, se seleccionaron los callos crecidos en el medio MS + BA (2 mg/l) + IBA (0,1 mg/l) y se subcultivaron en tres medios de crecimiento:

MS + IBA (0,1 mg/l) + 4PU-30 (1 mg/l)

MS + IBA (0,1 mg/l) + 4PU-30 (2 mg/l)

MS + IBA (0,1 mg/l) + 4PU-30 (3 mg/l)

El peso del inóculo inicial fue de  $0,5 \pm 0,05$  g. Los cultivos se mantuvieron durante 6 semanas y las tomas de muestras se realizaron a la 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup> semana. Los callos se depositaron sobre papel de filtro para eliminar los restos de agua y de medio, que pudieran haberse quedado adheridos, y posteriormente, se registró el peso fresco. Finalmente, los callos se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a  $-80$  °C.

Para la determinación del peso seco, los callos se liofilizaron durante 48 h (tiempo suficiente para eliminar toda el agua presente en las células). A continuación se registró el peso seco del callo. El material liofilizado fue triturado en un mortero de vidrio y se guardó en un desecador hasta el momento en que se utilizó para la extracción y determinación de las saponinas triterpénicas presentes en *C. asiatica*.

### **2.3-. Establecimiento de los cultivos de células en suspensión**

Una vez obtenido un callo suficientemente friable se establecieron las suspensiones celulares (Fig. 27). Se probaron dos medios líquidos, el mismo medio que se usó como medio de crecimiento y otro medio en el cual se cambió la citoquinina 4PU-30 por la BA a 0,1mg/l, medio que se había utilizado anteriormente en el grupo en estudios sobre *Digitalis purpurea* L., dando buenos resultados (Bonfill M., 1993). Se optó por utilizar el medio adicionado con la BA, ya que de ambos, era el que daba mayores tasas de viabilidad celular.

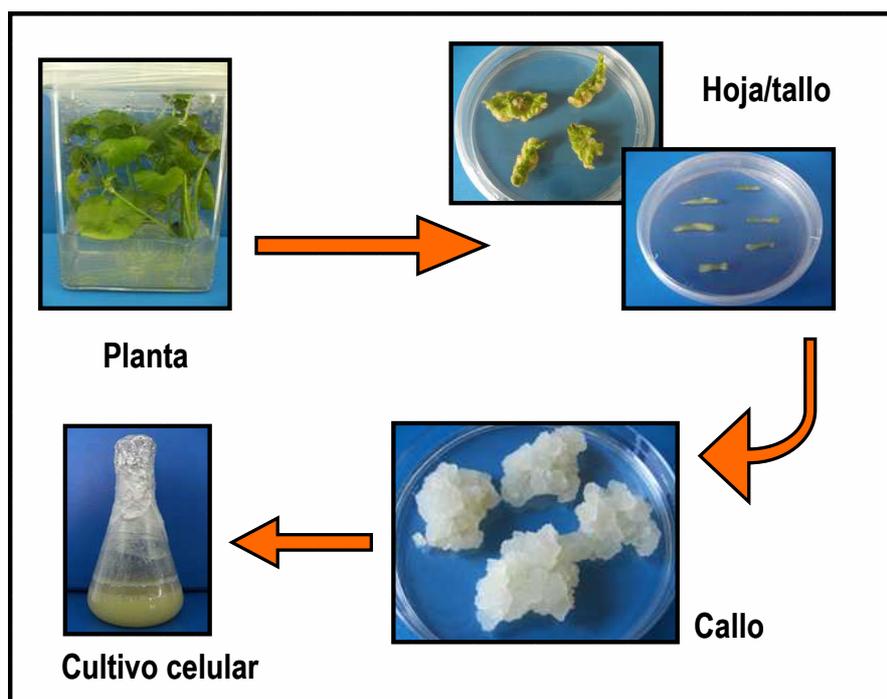


Figura 27-. Proceso seguido para la obtención de las suspensiones celulares. Planta desarrollada *in vitro*, desdiferenciación de explantes, callo friable y suspensión celular.

Para iniciar las suspensiones celulares se partió de 20 g de callo friable en 200 ml de medio (MS + 2,4D 2 mg/l + BA 0,1 mg/l) lo que representa una proporción de inóculo 1/10 (PF/V). Se dejaron durante 15 días para que se disgregasen las células y pasado este tiempo, se filtraron

## **Materiales y métodos**

---

por un filtro de nylon de 60 µm de diámetro de poro. Este paso permite separar las células individuales de los agregados celulares. De las células filtradas se volvieron a tomar 20 g/200 ml. Las suspensiones celulares así obtenidas se utilizaron en los estudios de crecimiento, de elicitación o de biotransformación.

El material de partida fue de 20 g peso fresco por muestra, debido al elevado grado de hidratación de las células de *C. asiatica*. Valores inferiores de material fresco, una vez liofilizados no permiten obtener el peso seco que se necesita como material de partida para la extracción de los principios activos.

Las condiciones en las que se mantuvieron los cultivos celulares fueron a 105 rpm, en un agitador orbital, a 25 °C, durante el tiempo de duración de los diferentes estudios (30 días en el caso de los cursos de crecimiento y/o elicitación y 5-7 días en los estudios de biotransformación).

### **2.3.1-. Determinación del crecimiento**

La medida del crecimiento de la suspensión celular se determinó mediante la cuantificación del peso fresco y seco. Cada muestra del cultivo celular se filtró con nylon (60 µm de tamaño de poro), recogiendo las células aisladas, estas se pesaron para registrar el peso fresco. Posteriormente las células se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C.

Para la determinación del peso seco, las células en suspensión fueron liofilizadas entre 48h–72h, en un liofilizador Flexi-Dry™ µP de FTS Systems (USA), bajo las condiciones de -56°C y 50mT (tiempo suficiente para extraer toda el agua presente en las células).

A continuación, se registró el peso seco de las células en suspensión. El material liofilizado se trituró en un mortero de vidrio y se guardó en un desecador hasta el momento en que se utilizase para la extracción y determinación de los compuestos de interés en *C. asiatica*.

### **2.3.2-. Determinación de viabilidad**

La viabilidad se define como la capacidad de la célula o el organismo para vivir. Muchas veces, la viabilidad va acompañada por un aumento en la biomasa del cultivo celular (Malinin y Perry, 1967), sin embargo en muchos casos un descenso de temperatura o la utilización de reactivos que actúen como inhibidores del metabolismo pueden provocar una disminución de la biomasa, pero no por ello la muerte celular. En este trabajo se ha utilizado una técnica que cuantificaba directamente las células mediante fluorocromos.

Los fluorocromos tienen la capacidad de excitarse delante de la radiación ultravioleta-visible, esta energía es absorbida y posteriormente emitida en forma de luz fluorescente a una

longitud de onda superior. De este modo, los fluorocromos permiten ser utilizados para marcar estructuras o procesos del interior de la muestra. La utilización de fluorocromos de diferentes longitudes de onda nos permite la obtención de imágenes de marcajes múltiples.

Para determinar la viabilidad celular se utilizaron dos fluorocromos, el diacetato de fluoresceína (DAF) y el ioduro de propidio (IP). El DAF actúa sobre las células vivas, no es fluorescente y penetra fácilmente en el interior de la célula donde es hidrolizado por las esterasas presentes en la membrana celular y en el citoplasma, dejando libre la fluoresceína que es el compuesto que da la fluorescencia ( $\lambda_{\text{excitación}}$  490 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$  514 nm fluorescencia verde) (Vitecek y col., 2007). Por el contrario, el IP marca las células muertas, ya que penetra y se intercala en los ácidos nucleicos. El IP ( $\lambda_{\text{excitación}}$  536 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$  620 nm fluorescencia roja), en una célula viva es impermeable a la membrana celular (Suzuki y col., 1997) (Fig. 28).

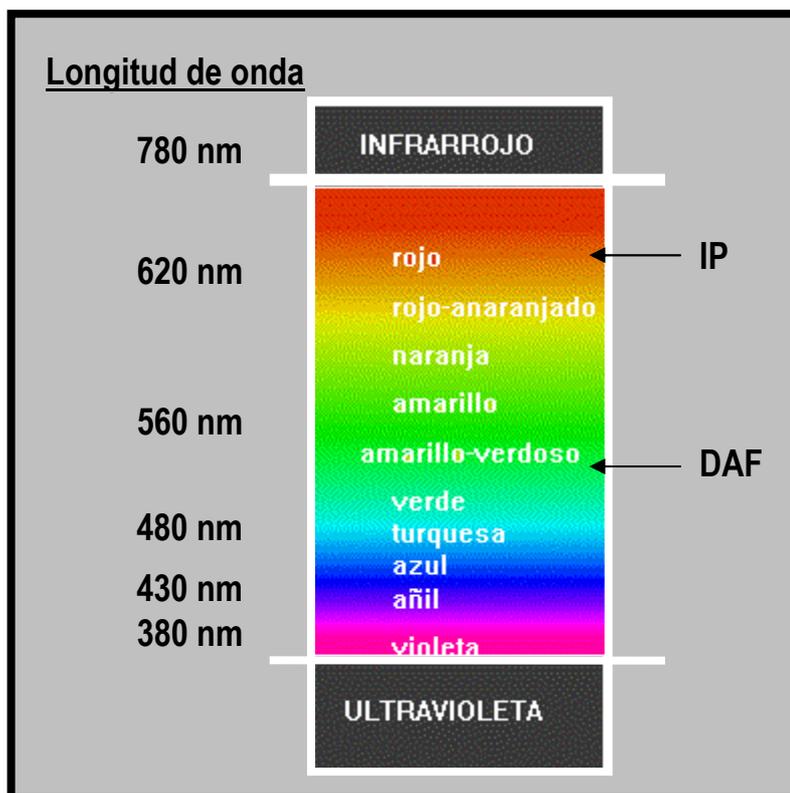


Figura 28-. Espectro electromagnético de la luz visible.

Se realizaron soluciones madres de ambos fluorocromos, DAF (5 mg/ml de acetona) y de IP (1 mg/ml de agua). A partir de estas se preparó una solución marcadora, la cual estaba formada por 1 ml de medio de cultivo y 0,01% (P/V) tanto de DAF como IP, manteniendo las muestras protegidas de la luz. Esta mezcla sólo se puede mantener unas pocas horas.

## **Materiales y métodos**

---

A continuación, en un portaobjetos se añadió una alícuota de la suspensión celular y unas gotas de la solución marcadora y se observó en un microscopio estereoscópico de fluorescencia Leica MZFLIII con las siguientes características:

Filtros de fluorescencia GFP Plant – DAF, compuesto por:

Filtros de excitación: 470/40 nm.

Filtros de emisión: 525/50 nm BP.

Filtros de fluorescencia verde-IP, compuesto:

Filtros de excitación: 546/10 nm.

Filtros de emisión: 590 nm LP.

La viabilidad se expresó como el número de células vivas respecto el número total de células. En todos los estudios realizados con suspensiones celulares, se cuantificó la viabilidad celular (Fig. 29).

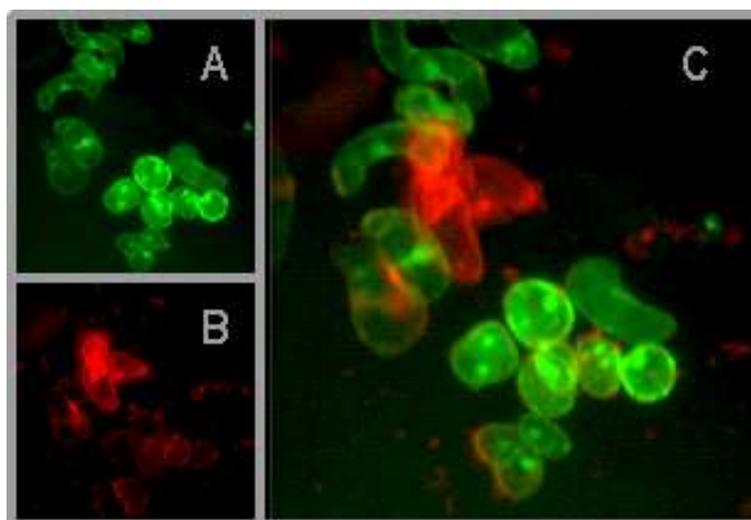


Figura 29-. (A) células vivas – verde con DAF, (B) células muertas – rojas con IP; (C) superposición de ambas imágenes.

### **2.4-. Extracción y determinación de saponinas y esteroides**

#### **2.4.1-. Protocolo de extracción de saponinas triterpénicas y esteroides**

Para determinar la presencia y contenido de saponinas triterpénicas en callos y plantas de *Centella asiatica* se realizó la extracción de los principios activos del material vegetal según el protocolo descrito por (Inamdar y col., 1996). A continuación, se efectuó un análisis cualitativo del extracto mediante cromatografía en capa fina (TLC) y un análisis cuantitativo utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## 2.4.1.1-. Extracción a partir de material seco

La extracción se realizó a partir de 1 g de material vegetal seco y triturado, que se disolvió en 10 ml de una solución metanol:agua (9:1) y se dejó durante 2h en sonicación. Pasado este tiempo se filtró a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y el sobrenadante se dejó evaporar en cápsulas de porcelana. El residuo se volvió a redissolver con una solución metanol: agua (9:1) y se dejó durante otras 2 h en sonicación. A continuación, se filtró de nuevo con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Se reunieron ambos sobrenadantes y el residuo se desechó.

El sobrenadante obtenido se llevó a sequedad a temperatura ambiente y el residuo seco resultante, se disolvió con 1 ml de metanol, se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se guardó en nevera hasta el momento de analizarlo (Fig. 30).

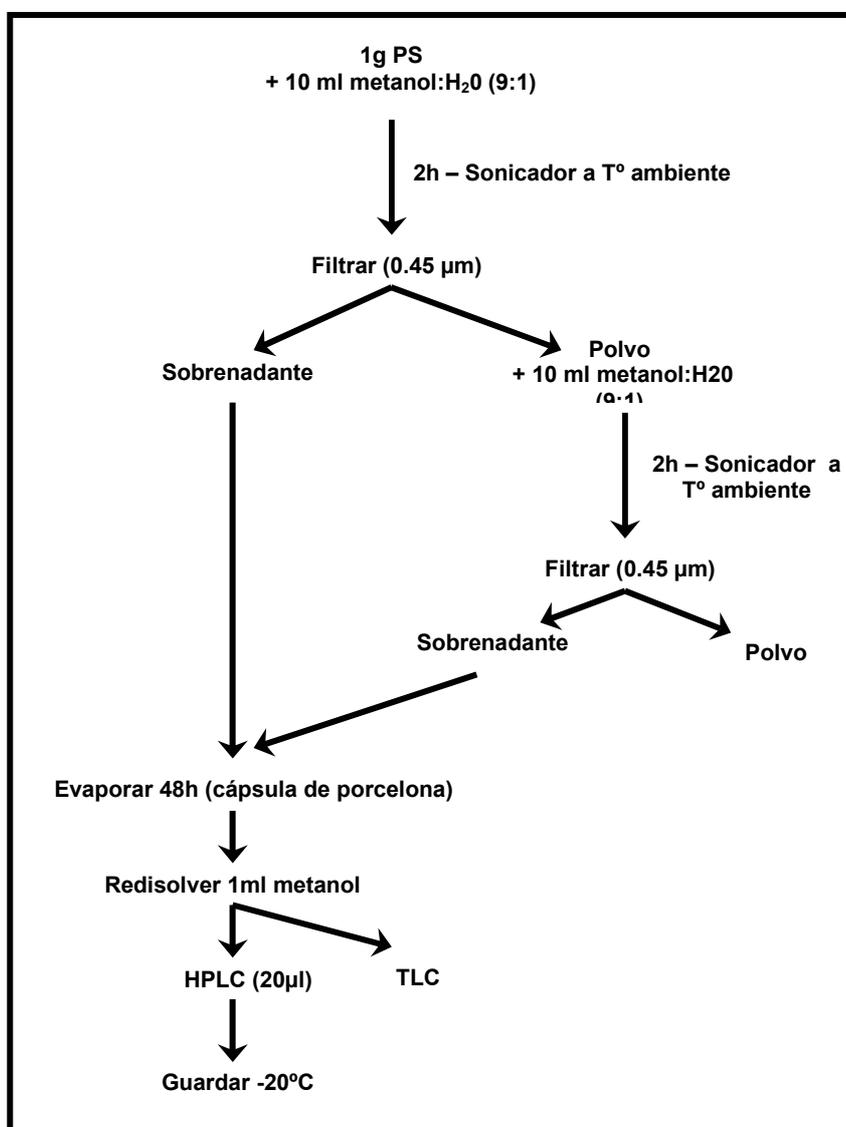


Figura 30-. Protocolo seguido para la extracción de saponinas a partir de material seco de *Centella asiatica*.

# **Materiales y métodos**

---

## **2.4.1.2-Extracción a partir de medio líquido**

La extracción de los principios activos de interés del medio se inició con la liofilización del medio líquido durante 5 días. El residuo que se obtuvo fue el material de partida para realizar la extracción, que consistió en el mismo protocolo de extracción para las saponinas y esteroides. El residuo se redisolvió con una solución metanol:agua (9:1) y se dejó durante otras 2h en agitación. A continuación, se filtró de nuevo con un filtro de 0,45 µm y se dejó evaporar; el residuo se diluyó en 1 ml de metanol y fue analizado.

## **2.4.2- Análisis cualitativo: TLC**

### **2.4.2.1- Desarrollo cromatográfico**

Para comprobar la presencia de las saponinas triterpénicas en las plantas y callos obtenidos, se analizaron sus extractos por cromatografía en capa fina (TLC), utilizando un método puesto a punto por nuestro grupo de investigación, a partir del método de identificación de centelósidos mediante TLC, descrito en la Farmacopea Europea.

Con este método se puede comprobar si las saponinas triterpénicas de *C. asiatica* están presentes en el material vegetal y obtener el patrón de las posiciones donde quedan retenidas las saponinas en la placa de sílice. Los compuestos se identificaron con un revelador que consiste en una mezcla de anisalaldeído más alcohol ácido (90% metanol – 5% ácido sulfúrico – 5% ácido acético). Si los compuestos se recuperan de la placa sin ser revelados pueden ser identificados por espectrometría de masas y cuantificados por HPLC.

Las soluciones patrón de los 4 principios activos analizados: madecásido, asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático (obtenidos de ChromaDex Inc.) se prepararon a una concentración de 10 mg/ml y fueron diluidos para obtener soluciones de 2 mg/ml, de las cuales se aplicaron 4 µl mediante pipeta Pasteur. Las muestras a analizar se aplicaron con el volumen justo, de manera que nunca se saturara la placa, puesto que podría provocar una incorrecta separación de los compuestos.

Los análisis cromatográficos fueron realizados en placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (HPTLC 10 x 10 cm) sin indicador de fluorescencia. Como fase móvil del sistema, se usó una combinación de acetato de etilo y metanol (60:40), para una óptima separación de los principios activos, respecto a las restantes sustancias contenidas en los extractos metanólicos. El sistema se desarrolló en cubetas de vidrio para TLC previamente saturadas por la fase móvil.

Las placas desarrolladas fueron secadas a temperatura ambiente y a continuación se rociaron con la solución de anisalaldeído, se calentaron a 100-105°C y el revelado permitió

visualizar, con luz natural, las bandas correspondientes a cada compuesto (Fig. 31). En la tabla 9 se pueden observar los Rfs de cada compuesto:

Tabla 9-. Rfs de los principios activos.

Principio activo	Rf
madecasósido	0.817
asiaticósido	0.899
ácido madecásico	0.354
ácido asiático	0.371

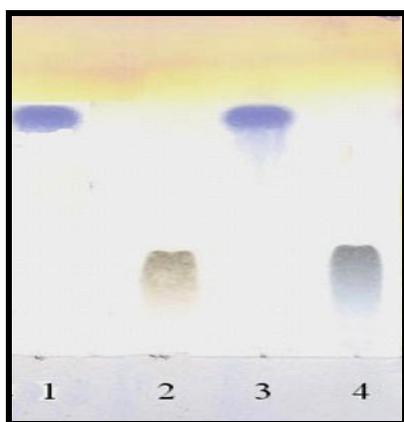


Figura 31-. Placa de TLC con los patrones (1: ácido madecásico, 2: madecasósido, 3: ácido asiático y 4: asiaticósido)

Algunas placas de TLC fueron reveladas solamente en la zona que correspondía a los patrones, pero no en la zona que correspondía a las muestras. Las bandas correspondientes a las muestras fueron rascadas y el polvo obtenido se diluyó en 2 ml de metanol, se filtró a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y el filtrado se dejó evaporar. El residuo seco con los principios activos se utilizó para la identificación mediante la técnica de MALDI-TOF. La pureza de los patrones se determinó utilizando esta misma técnica.

### **2.4.2.2. Identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF)**

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica que determina los pesos moleculares de los componentes de una muestra, medidos por la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones que los forman y permite así su identificación. En la EM hay tres partes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador y el detector.

Como técnicas de ionización para moléculas orgánicas, las más comunes son ionización por impacto electrónico (IE), ionización química (CI), electro-spray (ESI) o *matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI).

# Materiales y métodos

---

El **impacto electrónico** es usado en muestras relativamente volátiles que no son termolábiles y tienen bajo peso molecular. Esto puede producir iones moleculares como fragmentos de las muestras.

La **ionización química** se usa principalmente para componentes volátiles. El método se basa en la transferencia de protones de un ión gas reactivo (como isobutanol o metanol) presente en exceso a las muestras de interés. Permite determinar moléculas de peso entre 50 a 800 Da.

El **electro spray** puede ser usado para biopolímeros de pesos moleculares pequeños o grandes como son péptidos, proteínas, carbohidratos o fragmentos de DNA y lípidos. La muestra pasa a través de una aguja con un alto potencial de 3 a 10 KV, lo que provoca la formación de moléculas protonadas con o sin fragmentación.

**MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) es usado para determinar el peso molecular de péptidos, proteínas, polisacáridos y otros componentes de origen biológico. Se basa en bombardear las moléculas de una muestra con láser de N<sub>2</sub> (que emite a 330 nm) para conseguir la ionización de las mismas. La muestra se mezcla previamente con un compuesto altamente absorbente a modo de matriz para que los resultados sean más consistentes y fidedignos (si la muestra absorbe a 330nm no es necesario el uso de la matriz). La matriz transforma la energía láser en energía de excitación para la muestra, lo cual, conduce a una emisión de iones. Así, la transferencia de energía es eficaz y las moléculas a analizar están protegidas de un exceso de energía que podría causar su descomposición.

Referente a los detectores los más comunes son "magnetic sector analyzer", "time of flight" (TOF), "quadrupole" e "ion cyclotron resonante" (Hounsom y col., 2008). En un analizador de "tiempo de vuelo" (TOF), los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico y terminar en el detector, éste registra los "tiempos de vuelo" de los distintos iones. Se pueden detectar tanto iones de carga positiva como negativa.

En la metodología empleada para determinar los compuestos de interés se utilizó la ionización positiva de las muestras y un aparato Voyager-DE RP de Applied Biosystems. El compuesto utilizado como matriz fue el ácido de  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico.

## **2.4.3- Análisis cuantitativo: HPLC**

La cromatografía líquida es una de las técnicas que más se utilizan para el análisis de componentes orgánicos de las plantas.

Se basa en las interacciones químicas entre las sustancias analizadas y una columna cromatográfica. Existen varios métodos de HPLC, como la cromatografía de fase inversa, por

exclusión de tamaño o por intercambio iónico. En nuestro trabajo se utilizó la HPLC de fase reversa, técnica que se basa en una fase estacionaria no-polar y una fase móvil polar, permitiendo que el tiempo de retención de moléculas no-polares sea más elevado que el de aquellas moléculas más polares que se eluyen más rápidamente. Esta técnica permite analizar azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, saponinas y polisacáridos (Nollet, 2000).

### **2.4.3.1- Determinación de saponinas triterpénicas**

Los compuestos madecásido, asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático fueron obtenidos de ChromaDex Inc. Los restantes productos químicos que se utilizaron tenían el grado de pureza necesario para HPLC.

Las soluciones estándares de los cuatro compuestos, para usarlas como patrones y determinar los tiempos de retención, se prepararon pesando las cantidades exactas y diluyendo en metanol para conseguir una concentración final de 10 mg/ml. Dicha solución se usó para la obtención de la recta de regresión que presentaba los patrones a cinco concentraciones (0,025-0,05 – 0,1 – 0,5 – 1 mg/ml) cada uno con tres réplicas.

El material vegetal fue liofilizado y posteriormente triturado hasta transformarlo en polvo. A continuación fueron extraídos los compuestos mediante el protocolo descrito en la figura 30. El extracto seco se disolvió en 1 ml de metanol y se filtró a través de un filtro de los 0,22  $\mu\text{m}$  para el análisis por HPLC. El sistema de HPLC consistente en una bomba Waters 600 Controller, un inyector automático Waters 717 Autosampler, un detector de longitud variable Jasco (UV) 1570 y el programa de análisis de datos Borwin versión 1.5.

El análisis cromatográfico se realizó mediante gradiente, a temperatura ambiente, utilizando una columna Spherisorb 5  $\mu$  (4 x 250 mm) ODS2 (Waters). La fase móvil estaba formada por acetonitrilo y fosfato amónico (10mM) acidificada a pH 2,5 con ácido ortofosfórico. La acidificación permitió una mejor definición de los picos de los compuestos.

Las condiciones del gradiente se describen en la tabla 10. El flujo fue de 1 ml/min y el volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$ . El detector fue fijado a 214 nm, 1,00 au/V.

# Materiales y métodos

Tabla 10-. Gradiente utilizado para la separación por HPLC de los principios activos.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Solvente acuoso (%)	Solvente orgánico (%)
0	1	80	20
15	1	62	38
30	1	30	70
35	1	30	70
37	1	80	20
45	1	80	20

Para la identificación de los compuestos en los cromatogramas (Fig. 32) se usaron los tiempos de retención de los patrones indicados en la siguiente tabla:

Tabla 11-. Tiempos de retención de los cuatro centelósidos por HPLC.

PRINCIPIOS ACTIVOS	TIEMPO de RETENCIÓN (min)
Madecacosido	13,1
Asiaticosido	15,2
Ácido madecásico	24,1
Ácido asiático	27,1

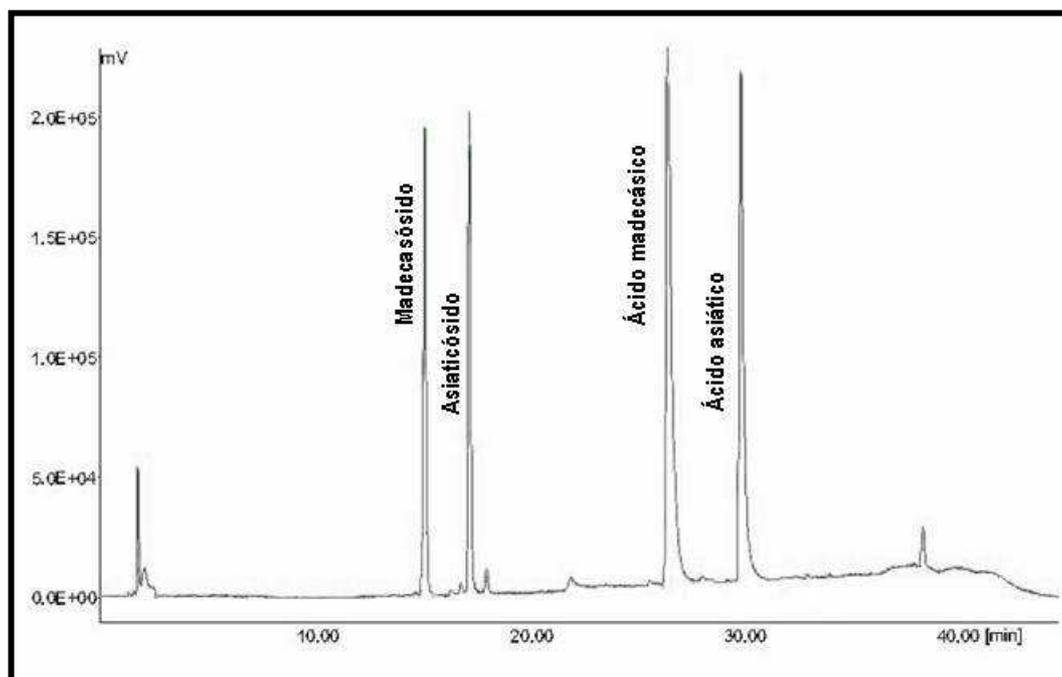


Figura 32-. Cromatograma correspondiente a los cuatro principios activos analizados.

## 2.4.3.2. Determinación de esteroides

Se determinaron cuatro esteroides libres: colesterol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol, de cada uno de los extractos. Los patrones se obtuvieron de Sigma, de pureza 99%.

La extracción de los compuestos fue la misma que se usó para la obtención de las saponinas triterpénicas.

Las soluciones estándares se prepararon pesando las cantidades exactas y diluyendo en metanol y se realizó la recta de regresión con cinco concentraciones que iban de 5 a 75  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , cada una con tres réplicas.

Para la separación de los esteroides se usó un sistema isocrático de metanol, con una columna Hypersil 5 $\mu$  ODS (250 x 4,6 mm), con un flujo de 0,9 ml/min y el detector se fijó a 210 nm (Manzi y col., 1996).

La identificación de los compuestos se realizó mediante los tiempos de retención indicados en la siguiente tabla e identificados en la figura 33:

Tabla 12-. Tiempos de retención de los esteroides libres cuantificados en *C. asiatica*.

PRINCIPIOS ACTIVOS	TIEMPO de RETENCION (min)
Colesterol	15,88
Estigmasterol + campesterol	17,45
Sitosterol	19,41

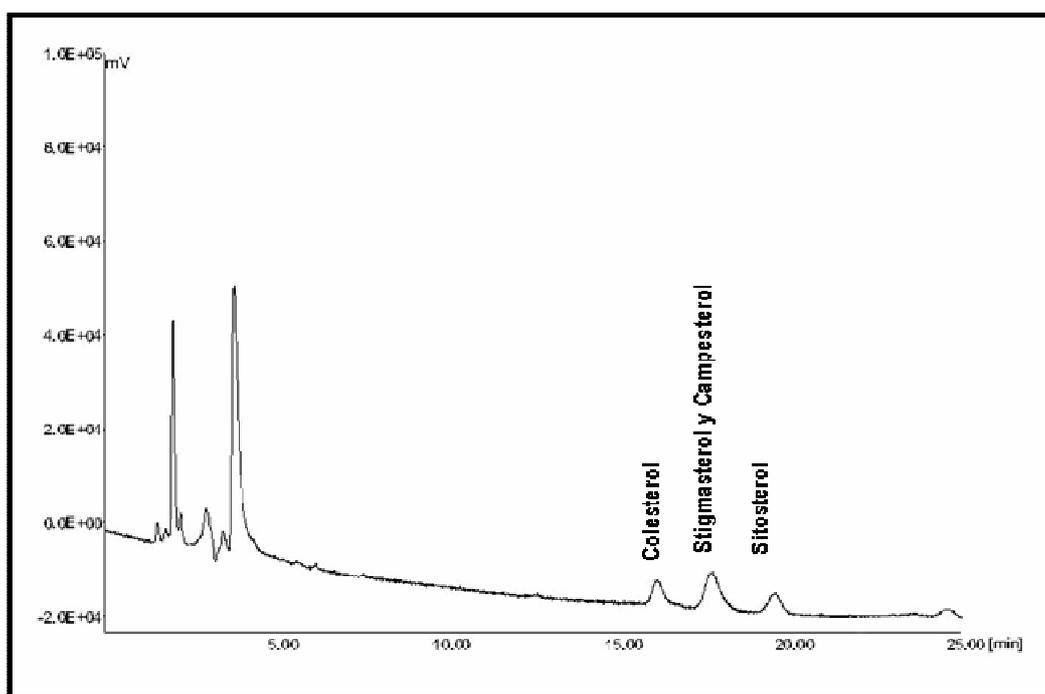


Figura 33-. Cromatograma correspondiente los esteroides libres analizados.

# Materiales y métodos

## 2.4.3.3-. Determinación de amirinas

Los patrones utilizados fueron  $\beta$ -amirina obtenida de Sigma y  $\alpha$ -amirina extraída de una fuente natural (ver apartado 3.10.3). A partir de los cuales se realizó una curva patrón con concentraciones entre 0,05 a 1,5 mg/ml.

Para la determinación de amirinas se usó un sistema isocrático de metanol, con una columna Hypersil 5 $\mu$  ODS (250 x 4,6 mm), un flujo de 0,9 ml/min y el detector se fijó a una  $\lambda$  de 210 nm.

La identificación de los compuestos se realizó mediante sus tiempos de retención, indicados en la siguiente tabla e identificados en la figura 34:

Tabla 13-. Tiempos de retención de amirinas cuantificadas en *C. asiatica*.

PRINCIPIOS ACTIVOS	TIEMPO de RETENCION (min)
$\beta$ amirina	16
$\alpha$ amirina	18

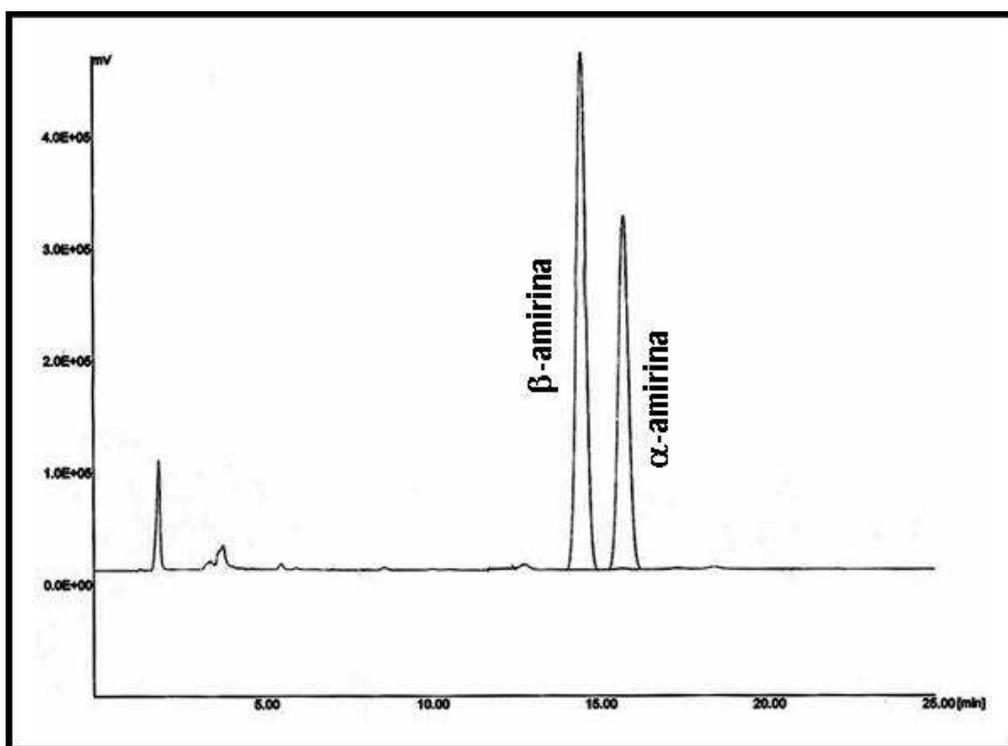


Figura 34-. Cromatograma correspondiente a las amirinas analizadas.

## 2.5-. Experimentos de elicitación de los cultivos

Las plantas frente a una amenaza como el ataque de patógenos, insectos o un estrés abiótico, responden activando diferentes mecanismos de defensa incluyendo la inducción de la biosíntesis de metabolitos secundarios, como fitoalexinas o con barreras defensivas, como es la deposición en la pared celular de toxinas (He y col., 2002). Los factores que inducen la formación de fitoalexinas reciben el nombre de elicitores, estos pueden ser fragmentos de la pared celular de diferentes microorganismos, o enzimas tipo pectinasas y celulasas, que dan lugar a fragmentos de la pared celular que actuarán como elicitores. Del mismo modo que pueden ser algunos fragmentos pépticos, oligosacáridos, glicopéptidos o lípidos (Ebel y Cosio, 1994) y elicitores abióticos como algunos iones de metales pesados (Fig. 14).

Tabla 14-. Clasificación de elicitores.

Elicitores bióticos		Elicitores abióticos	
Compuestos específicos	Mezcla compleja	Químicos	Físicos
Quitosan			Estrés térmico
Alginato	Extracto de levadura	Sulfato de vanadilo	Estrés osmótico
Pectina	Esporas de hongos	Sales de metales pesados	Irrradiación por UV
Elicitina	Mezcla de hongos	Ortovanadato de sodio	Heridas
Jasmonato de metilo			

La principal función de los elicitores, en biotecnología es su capacidad para ser inductores del metabolismo secundario, de esta manera pueden provocar la acumulación de un compuesto tanto en planta entera como en cultivos de tejidos vegetales (Yu y col., 2002). Numerosos estudios han indicado que en determinados cultivos *in vitro* al ser estimulados por elicitores, los metabolitos secundarios son rápidamente producidos en respuesta al tratamiento del elicitor (Dicosmo y Misawa, 1985).

En nuestro caso se utilizó el jasmonato de metilo como elicitor.

### 2.5.1-. Elicitación

El jasmonato de metilo (MeJa) es un compuesto que regula la inducción de genes de defensa en plantas y se produce como respuesta a un ataque de hongos o por una lesión.

El jasmonato de metilo forma parte de la cadena de señalización ocasionada por la presencia de cualquier elicitor, y aunque se acumula rápidamente después de la elicitación, su

## **Materiales y métodos**

---

presencia es transitoria. Por ello, la aplicación exógena de estos compuestos y su presencia continuada en el medio de cultivo puede ser más efectiva. En la actualidad, se ha demostrado que la aplicación de MeJa incrementa la producción de compuestos del metabolismo secundario, como es el caso de flavonoides, antroquinonas o alcaloides (Gundlach y col., 1992)

### **2.5.1.1- Elicitación de plantas**

Con el experimento de elicitación se ha intentado conseguir un aumento en la producción de centellósidos añadiendo jasmonato de metilo a un cultivo de plántulas *in vitro* de *Centella asiatica*. El jasmonato de metilo, además de estimular la síntesis de metabolitos secundarios (Kim y col., 2004a), también produce efectos negativos sobre las plantas como inducción de la senescencia de las hojas o producción de etileno (Weidhase y col., 1987), lo que constituye un problema para la producción de metabolitos secundarios en cultivos, a largo plazo.

La concentración utilizada en estudio fue de 0,1 Mm de MeJA disuelto en etanol, esta concentración ya había sido utilizada previamente para incrementar la biosíntesis de centellósidos (Kim y col., 2004b). En nuestro experimento, se trabajó con un total de 20 plantas crecidas *in vitro* provenientes de semillas artificiales. La mitad se cultivaron en 150 ml de medio MS suplementado con etanol (plantas control, para descartar el etanol como posible elicitor del metabolismo secundario) y la otra mitad se trataron con jasmonato de metilo (plantas tratadas).

Las muestras fueron recogidas a la segunda y cuarta semana, más tarde las saponinas triterpénicas fueron extraídas y determinadas siguiendo el método de (Inamdar y col, 1996) con algunas modificaciones descritas en el apartado 2.4.3.1.

### **2.5.1.2- Elicitación de suspensiones celulares**

La elicitación, como estrategia para mejorar la producción de los principios activos en cultivos celulares se ha probado en diferentes estudios, mostrando un aumento de los compuestos de interés (Zhao y col., 2001; Bonfill y col., 2003). En el caso de *C. asiatica* se han realizado estudios de elicitación con MeJa que provocaron un aumento de la producción de centellósidos (Kim y col., 2004a). Sin embargo, la efectividad del MeJa en cultivos celulares no se había investigado hasta el momento, por ello se ensayaron dos concentraciones diferentes del elicitor, a una concentración de 100  $\mu$ M (probada en planta) y de 200  $\mu$ M (para observar si un aumento de MeJa también iba acompañado con un aumento en la producción).

Para ello, se mantuvo un cultivo celular durante 30 días y en el duodécimo día se añadió el MeJa.

Para seleccionar el día de adición del compuesto, se realizó un estudio de crecimiento previamente, permitiendo de esta manera diferenciar las fases del cultivo y adicionar el elicitor al inicio de la fase de crecimiento estacionario. La fase de crecimiento exponencial del cultivo se asocia al metabolismo primario pues los productos que se sintetizan son esencialmente utilizados para el crecimiento y la obtención de energía (Prescott y col., 1999). Mientras que la producción de metabolitos secundarios se realiza, preferentemente, durante la fase estacionaria o de producción. En el caso de *C. asiatica* es a partir del día 10 en que el cultivo entra en la fase de producción de metabolitos secundarios (Fig. 35).

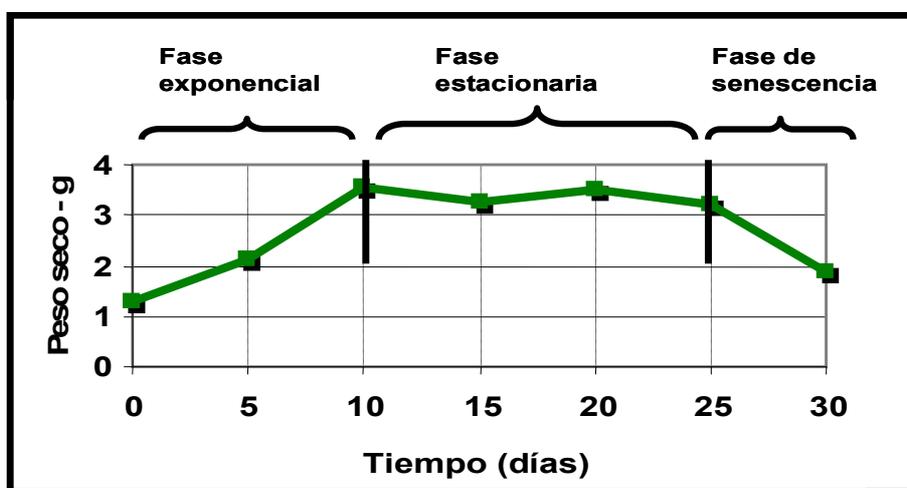


Figura 35-. Fases de crecimiento de una suspensión celular de *C. asiatica*.

### **2.6-. Experimentos de biotransformación utilizando células de *Centella asiatica***

Los cultivos celulares de plantas han sido utilizados para efectuar diferentes biotransformaciones, principalmente la glucosidación de compuestos exógenos como fenoles, cumarinas, flavonoides y cardenólidos. La glucosidación juega un papel importante en el proceso de almacenamiento de metabolitos secundarios en las plantas. Puede ser utilizada como un mecanismo de desintoxicación y es un método de síntesis de moléculas con actividad biológica. La glucosidación de compuestos utilizando cultivos celulares, es una alternativa a los procesos de síntesis química que requieren de diversas reacciones de protección y desprotección de grupos funcionales.

Particularmente, los cultivos de células en suspensión de *C. asiatica* han sido utilizados para la glucosidación regio-especifica de tiolcolchicina (1). Después de siete días de incubación

## Materiales y métodos

del compuesto 1 (Fig. 36) con células en suspensión de *C. asiatica*, en medio MS adicionado con 2,4D ( $10^{-6}$  M), BAP ( $10^{-6}$  M) e hidrolizado de caseína (500 mg/l) se obtuvieron los glucósidos 2 (85%) y 3-O-glucosilticolchicina (3) (15%), como productos de la reacción. Los estudios permitieron deducir que una glucosil transferasa esta involucrada en la reacción y este proceso incluye dos etapas, la desmetilación y la posterior glucosilación regioselectiva del producto (Solet y col., 1993).

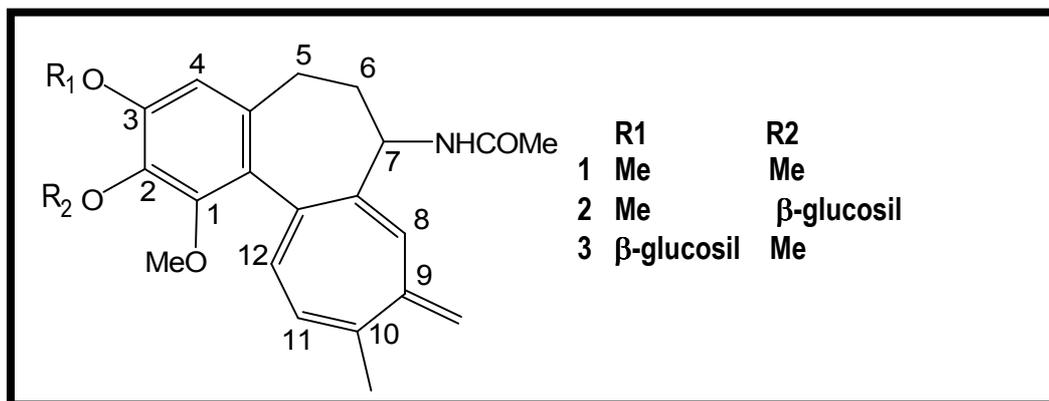


Figura 36-. Biotransformación de tiocolchicina en cultivos celulares de *Centella asiatica*.

En el presente trabajo se planteó la biotransformación de los sustratos  $\beta$  y  $\alpha$ -amirina, para obtener los triterpenos característicos de *C. asiatica*, teniendo particular interés los centelósidos, compuestos bioactivos de la planta y adicionalmente obtener nuevos triterpenos, probables intermediarios en la biosíntesis de centelósidos.

Para lograr los objetivos planteados, se requiere inicialmente una fuente fácil de los sustratos, para adicionarlos a los cultivos celulares de *C. asiatica*. Los pasos posteriores serán la determinación de centelósidos de estos cultivos y la identificación de nuevos triterpenos.

### 2.6.1-. Reactivos y equipos

Todos los reactivos químicos utilizados, son de la firma Merck. Los disolventes, hexano, acetato de etilo, acetona, metanol y diclorometano fueron de grado HPLC de Teknokroma. Para los análisis de cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía en placa preparativa (CCP), se usaron cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany) en placas de vidrio de 20x20 cm con espesor de 2 mm y 0,2 mm respectivamente.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  se realizaron en un equipo Mercury 400MHz, usando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente y TMS como Standard interno. Los desplazamientos químicos son presentados en ppm. Los espectros de masas se realizaron en un equipo Hewlett-Packard 6890+MSD5475 operando en el modo de impacto electrónico (IE) a 70 eV.

## Materiales y métodos

Como precursor en las biotransformaciones con suspensiones celulares de *C. asiatica* se seleccionaron inicialmente las moléculas de  $\alpha$ - y  $\beta$ - amirina. Son compuestos de naturaleza triterpénica y potenciales precursores de la formación del esqueleto base del ursano. Con la adición de estos compuestos se quería comprobar si la maquinaria enzimática de *C. asiatica* es capaz de biotransformar estos compuestos en los productos de interés de la planta, mediante reacciones de hidroxilación y glucosidación de los esqueletos base de estos triterpenos. Reacciones que potencialmente forman parte de la ruta biosintética de los centelósidos.

### 2.6.2. Obtención de $\alpha$ - o $\beta$ - amirina de fuentes naturales

Como fuente de estos precursores partimos de diferentes resinas y plantas que se han elegido por detectar previamente la presencia de estos compuestos (Tabla 15).

Tabla 15-. Tabla de las diferentes fuentes naturales utilizadas para obtener las amirinas.

Nombre Común	Nombre Científico	Origen	
<i>Manila Elemi</i>	<i>Canarium luzonicum</i>	España	Resina
Copal Blanco Sonora	<i>Bursera sp.</i>	México	
Copal Blanco Tepoztlan	<i>Bursera sp.</i>	México	
Copal Negro	<i>Bursera sp.</i>	México	
Copal Piedra	<i>Bursera sp.</i>	México	
Gayuba	<i>Arctotaphylos uva-ursi</i>	España	Planta medicinal
Caléndula	<i>Calendula officinalis</i>	España	
Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i>	España	
Olivo	<i>Olea europea</i>	España	
Cancerina	<i>Hippocratea excelsa</i>	España	
Nanche	<i>Byrsonima crassifolia</i>	México	

### 2.6.3. Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina de resinas y plantas

Con la finalidad de seleccionar una buena fuente de  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, para su posterior utilización como precursores en la biotransformación con células de *C. asiatica*, se procedió a la obtención de los extractos de las plantas comerciales y a su posterior análisis cualitativo por TLC.

El material vegetal seco y pulverizado de cada una de las **plantas medicinales** (10 g) fue extraído con 100 ml de n-hexano, en un equipo Soxhlet por 12h.

## Materiales y métodos

Después de la extracción, se filtró el disolvente y se dejó evaporar a temperatura ambiente hasta sequedad, obteniéndose los extractos hexánicos, que posteriormente fueron redisueltos en diclorometano (10 mg/ml) y aplicados, en la placa cromatográfica (Fig. 37).

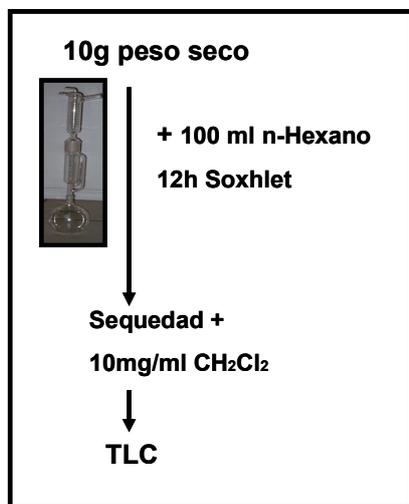


Figura 37-. Protocolo de extracción de amirinas en planta, para analizarlas por TLC.

Por otra parte las **resinas** se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mg/ml) y fueron aplicadas directamente a la placa.

La placa cromatográfica fue eluída con una mezcla de hexano-diclorometano-metanol (10:10:1), en la que se aplicaron las muestras y los patrones de  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina (2 mg/ml). A continuación, la placa se dejó secar y se aplicó el revelador que consistió en una mezcla de anisaldehído-ácido sulfúrico. La placa se calentó a 80-100°C durante 5 min. Los triterpenos fueron identificados por comparación de su R<sub>f</sub> y el color de las bandas con los estándares aplicados.

Mientras que la  $\beta$ -amirina usada como patrón, fue adquirida en Sigma-Aldrich, la  $\alpha$ -amirina usada como sustrato, fue aislada y purificada del copal blanco de Tepoztlan, por cromatografía en capa preparativa (CCP). La estructura de la  $\alpha$ -amirina fue corroborada por resonancia magnética nuclear (RMN), incluyendo las técnicas en dos dimensiones y por espectrometría de masas (EM). La pureza > 98% se confirmó por HPLC y EM.

### 2.6.4-. Análisis cuantitativo de triterpenos por HLPC de resinas y planas comerciales

Las **plantas comerciales** secadas y pulverizadas (10 g) fueron extraídas con 100 ml de n-hexano en un equipo Soxhlet por 12 h. El disolvente fue evaporado a sequedad a 40°C y el extracto obtenido se llevó a peso constante a 60°C.

Los extractos se redisolvieron en metanol (10ml) y se analizaron por HPLC (Fig. 38)

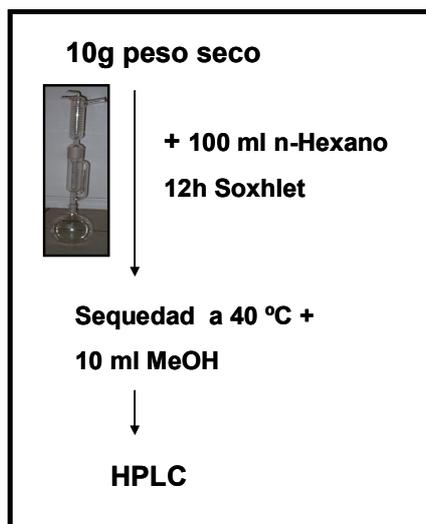


Figura 38-. Protocolo de extracción de amirinas en planta, para cuantificarlas por HPLC.

Los extractos de las **resinas** fueron obtenidos por disolución de la resina (50 mg) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml), el disolvente se evaporó al vacío en un rotavaporador, el residuo se redisolvió en metanol y se analizó por HPLC (Fig. 39).

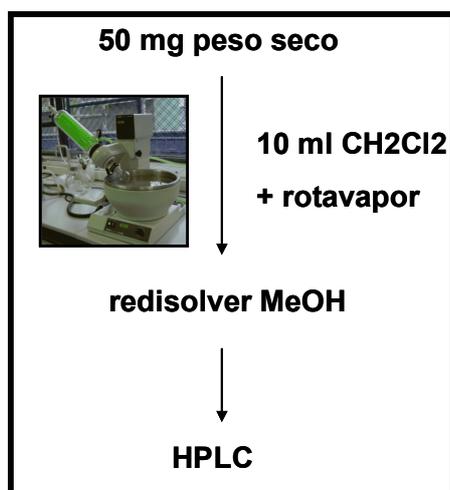


Figura 39-. Protocolo de extracción de amirinas a partir de resinas, para cuantificarlas por HPLC.

Los extractos obtenidos tanto de plantas como de las resinas fueron analizados siguiendo el método de HPLC descritos, en el apartado 2.4.3.3.

# **Materiales y métodos**

---

## **2.6.5-. Aislamiento de $\alpha$ y $\beta$ amirina**

### **2.6.5.1-. Separación de $\alpha$ -amirina del copal blanco de Tepoztlan por cromatografía en capa preparativa**

La fracción hexánica cristalizada (200 mg) de copal blanco Tepoztlan fue disuelta en diclorometano y se aplicó en una placa de cromatografía preparativa. La placa se eluyó dos veces con una mezcla de hexano:diclorometano:metanol (10:3:0.5) y se reveló con anisaldehído-ácido sulfúrico, determinándose dos zonas principalmente bien definidas.

Ambas zonas, fueron raspadas de la placa por separado y se extrajeron tres veces con 20 ml acetato de etilo, posteriormente, el polvo se filtró y el disolvente se evaporó de cada una de las bandas. La zona de menor polaridad (120 mg, 60 % de rendimiento) se identificó como  $\alpha$ -amirina y la de mayor polaridad correspondió a una mezcla compuesta principalmente por 3-epilupeol (30 mg) y otro compuesto no identificado. La estructura de la  $\alpha$ -amirina aislada, fue confirmada por los datos RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y EM. La pureza de la muestra (98%) se determinó por HPLC y RMN de  $^1\text{H}$ .

### **2.6.5.2-. Separación preparativa $\beta$ -amirina**

La corteza de Nanche (*Byrsonima crassifolia*) seca y pulverizada (1 Kg) fue extraída por maceración con hexano (2 l x 2) a temperatura ambiente durante 48h, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida en un rotavapor hasta sequedad, obteniéndose un sólido blanco (2,06% de peso seco).

De este sólido, se recogieron 5 g que fueron disueltos en 20 ml de diclorometano a temperatura ambiente. Después de la disolución, se adicionaron 15-20 ml de metanol caliente en porciones pequeñas, la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido ese tiempo se observó la formación de un sólido blanco cristalino, el cual se filtró al vacío, obteniéndose 4,5 g de cristales en forma de agujas transparentes.

En el análisis por cromatografía en capa fina, estos cristales se presentaron como una mancha homogénea de color violeta, de igual polaridad y color que el estándar de  $\beta$ - y  $\alpha$ -amirina (72 % y 18 %). Con el fin de separar esta mezcla para la obtención de sus integrantes, se realizaron pruebas para su separación con placas impregnadas con  $\text{AgNO}_3$ , sin éxito, lo que provocó que no se utilizaran para los estudios posteriores.

### **2.6.6-. Administración del sustrato a los cultivos de células en suspensión, usando como codisolvente DMSO**

Para favorecer la captación del precursor hacia las células del cultivo *in vitro*, se adicionó DMSO, un compuesto con acción permeabilizante. Para ello, se tomaron 200 ml de la suspensión celular después de 7 días de su subcultivo en medio (MS+2.4D(2mg/l)+BA(0.1mg/l)) se les adicionaron 10ml de DMSO (1%-5%) y 20 mg de  $\alpha$  amirina, disuelta en 2ml de acetona.

Los cultivos se dejaron durante 5-7 días más a 25°C y agitación de 100 rpm, para efectuar las biotransformaciones. Transcurrido este tiempo, las células se filtraron con ayuda de una malla de nylon (60  $\mu$ m tamaño de poro), se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se liofilizaron. El medio sobrante se congeló y se liofilizó también.

### **2.6.7-. Administración del sustrato a los cultivos de células en suspensión usando $\beta$ -ciclodextrina, como transportador**

Las ciclodextrinas fueron aisladas por vez primera por Villiers en 1891, como producto de degradación bacteriana del almidón, y fueron caracterizadas como oligosacáridos por Schardinger en 1904.

En el 1938 se descubrió que las ciclodextrinas estaban formadas por unidades de glucosa conectadas entre si por enlaces  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  (Freudenberg y Meyer-Delius, 1938). En los mismos estudios, se observó la capacidad de inclusión de la molécula. Actualmente la síntesis industrial de la  $\beta$ -ciclodextrina se realiza mediante la bacteria *Bacillus* No. 38-2; la cual posee una glicosil-transferasa selectiva para esta ciclodextrina y se obtiene un alto rendimiento (el 80% del almidón se convierte en  $\beta$ -ciclodextrina).

Las ciclodextrinas son unos oligosacáridos cíclicos (Saenger, 1980), compuestos de 5 o más  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ -(1-4), pueden estar formadas por diferente número de monosacáridos, las más conocidas y usadas (Fig. 40), son:

- $\alpha$ -ciclodextrina: seis unidades.
- $\beta$ -ciclodextrina: siete unidades.
- $\gamma$ -ciclodextrina: ocho unidades

# Materiales y métodos

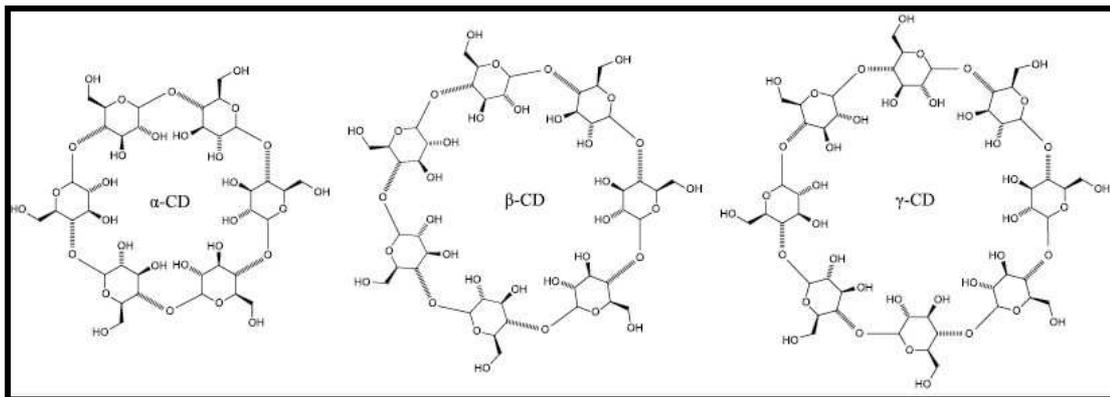


Figura 40-. Estructura de las ciclodextrinas más utilizadas.

Debido a la baja solubilidad de la amirina en medio acuoso y la utilización de disolventes orgánicos como el DMSO para la permeabilización, se optó por probar otros vehículos para mejorar la captación de las amirinas por parte de la célula. En este caso se utilizó la  $\beta$ -ciclodextrina.

Las ciclodextrinas tienen una forma de cono truncado, dando lugar a un extremo ancho y otro estrecho (Fig. 41). Esta estructura se debe a la conformación en forma de “silla rígida” que presentan las unidades de glucosa.

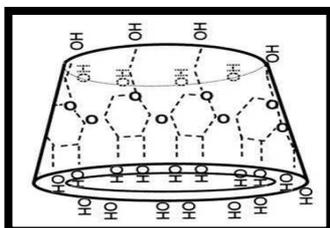


Figura 41-. Estructura tridimensional de la ciclodextrina.

Debido a la disposición de los grupos hidroxilos en las ciclodextrinas, se generan dos zonas de diferente polaridad, la zona interior del cono hidrofóbico y la zona exterior hidrofílica (Schlenk y Sand, 1961). Esta diferencia de afinidad por el agua, permite la inclusión en las ciclodextrinas de moléculas poco polares, permitiendo su solubilidad en agua. Por otra parte, también se ha descrito el efecto elicitor de estos compuestos para favorecer la producción de metabolitos secundarios (Cho y col., 2003; Qu y col., 2006; Zamboni y col., 2006).

En un matraz con 200 ml de la suspensión celular en medio (MS+ 2,4D (2 mg/l) + BA (0,1 mg/l), se adicionaron 10 ml de una disolución de  $\beta$ -ciclodextrina en agua (7,8 mg/ml) que contenía  $\alpha$ -amirina a saturación.

Los matraces se dejaron siete días bajo las condiciones, previamente descritas, para el experimento con DMSO. Transcurrido este tiempo, las células se filtraron con ayuda de una

mallita de nylon, se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se liofilizaron. El medio sobrante se congeló y se liofilizó también.

### **2.6.8-. Extracción de triterpenos y análisis por TLC y HPLC**

#### **2.6.8.1-. Células en suspensión**

Las células deshidratadas, recuperadas de la biotransformación, se pesaron y se les adicionó 25ml de acetato de etilo, por cada gramo de peso seco. La mezcla se colocó en baño de ultrasonidos durante 30 min y se dejaron en maceración durante 8 horas.

A continuación, se filtraron sobre papel de filtro y el disolvente se evaporó al vacío hasta sequedad. Se volvió a realizar la extracción con el disolvente y el extracto de acetato de etilo obtenido se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1ml).

Para comprobar la correcta extracción, 5µl de este extracto se aplicaron en una TLC para su análisis la cual se eluyó con una mezcla de hexano-diclorometano-metanol y se reveló con anisaldehído-ácido sulfúrico.

Las células se extrajeron posteriormente con metanol 25 ml/g PS, siguiendo el proceso descrito en el apartado 2.4.1.1, para obtener el extracto metanólico.

Posteriormente, se evaporó el disolvente de cada extracto y se redisolvió en 1 ml de metanol, se filtro a través de un filtro 0,45 µm para su análisis por HPLC, siguiendo el método descrito en el apartado 2.4.3.

### **2.7-. Análisis de expresión génica**

El estudio de la expresión génica es importante para descubrir y conocer los mecanismos de regulación de las vías metabólicas de interés e identificar los genes clave. De este modo, se podrán mejorar la eficiencia de estas vías y en nuestro caso, incrementar la producción de los principios activos de interés farmacológico.

Varias técnicas son usadas para el análisis de la expresión genética como: el análisis por transferencia, la hibridación *in situ*, la técnica de RT-PCR o ensayos de protección RNAsa (Bustin, 2000). En nuestro caso se utilizó la RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), es un método para la detección de la expresión del mRNA. En la que se definen dos pasos:

- la reacción de retrotranscripción
- la amplificación por PCR.

## Materiales y métodos

---

El primer paso para el análisis de expresión del mRNA, consiste en la obtención de un mRNA de calidad, en este trabajo se siguió el protocolo del reactivo Trizol<sup>®</sup> (TRizol<sup>®</sup> LS Reagent, Invitrogen). Debido a la inestabilidad del RNA y su facilidad para degradarse se necesitó trabajar a 4°C, utilizando DPEC (dietil pirocarbonato, inactivador de las RNAsas) y utilizando material libre de RNAsas (doblemente autoclavado).

El siguiente paso fue cuantificar el RNA, mediante un espectrofotómetro (Nanodrop<sup>®</sup>). Una vez conocida la cantidad de RNA, se realizó un gel de agarosa 0,5%, para visualizar el RNA, en el cual se cargo la misma cantidad de material en todos los pocillos, de manera que nos permitió comprobar que no se hubiera degradado el RNA y que la cuantificación era correcta (Fig. 42).



**Figura 42-** Gel de agarosa de RNA, se distinguen dos bandas de rRNA que representan las subunidades 18S y 28S del rRNA.

En el siguiente paso, se realizó una “no-RT”, la cual consiste en hacer una PCR simple con algunos de los genes que queremos expresar, usando como molde las muestras de RNA. De esta manera, se descarta que se haya realizado una incorrecta extracción de RNA y que haya DNA en la muestra, lo que originaría en las posteriores PCRs falsos resultados. En teoría, el RNA al no ser estable a altas temperatura, como los 94°C al que se somete durante el primer paso de la PCR, se degradará y el resultado de la PCR será negativo, al contrario, si hubiera DNA se observaría una banda que tendría el peso molecular del gen analizado, lo que indicaría contaminación de DNA.

Una vez realizados estos dos pasos, se procedió a transcribir el RNA a cDNA, usando una transcriptasa reversa, este cDNA será utilizado como molde para las sucesivas amplificaciones por PCR de los genes de interés (Fig. 43).

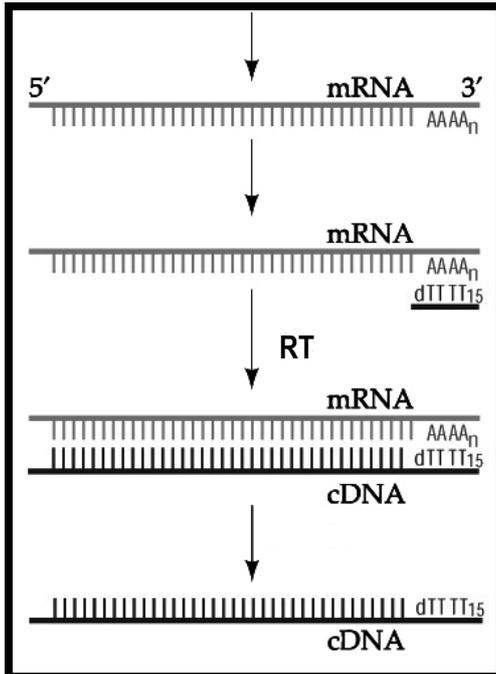


Figura 43-. Esquema del proceso de Retrotranscripción, de mRNA a cDNA. La transcriptasa inversa (RT), es una enzima de tipo DNA-polimerasa, que tiene como función sintetizar DNA de doble cadena utilizando como molde mRNA, mediante la unión por el extremo poliA del mRNA.

La metodología de la RT (retrotranscripción) es un proceso mediante el cual el RNA se transcribe a una cadena de DNA complementaria, cDNA. Mediante la utilización de una enzima transcriptasa y un cebador de oligo de T, que permite la unión a la cola poliA del mRNA y la posterior transcripción a cDNA. Una vez obtenido el cDNA se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta que se utiliza para analizar la expresión de los diferentes genes de interés. Pasos a seguir para la obtención del cDNA:

- 1  $\mu\text{g}$  de RNA de cada muestra
- 1  $\mu\text{l}$  mix oligo NTP (10 Mm.)
- 1  $\mu\text{l}$  d(T)15 (50  $\mu\text{M}$ ) - d(T)15 GCT AGG CCA CTG TGG CCT TTT TTT TTT TTT TT
- x H<sub>2</sub>O mili Q (volumen máximo total de 12 $\mu\text{l}$ )
- 5' a  $65^{\circ}\text{C}$  (rápidamente en hielo – spin)
- 4  $\mu\text{l}$  Buffer 5x
- 2  $\mu\text{l}$  DTT 0.1 M
- 1  $\mu\text{l}$  Inhibidor de RNAsa OUT
- 2' a  $37^{\circ}\text{C}$
- 1  $\mu\text{l}$  de RT (M-MLV Reverse Transcriptase)
- 50' a  $37^{\circ}\text{C}$
- 5' a  $70^{\circ}\text{C}$

## Materiales y métodos

Para realizar las PCRs, se necesitan “primers” o cebadores que permitan la amplificación de un fragmento del gen y para ello se necesita conocer la secuencia total o de una parte del gen, estos datos se obtuvieron a través de *The National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) donde se incluyen todos los genes secuenciados hasta el momento de *Centella asiatica*. En nuestro caso, seleccionamos el gen de la escualeno sintasa (CaSQS – enzima de la vía de los triterpenos), el gen de la  $\beta$ -amirina sintasa (CabAS – enzima específico de la vía de las saponinas triterpénicas), gen de la cicloartenol sintasa (CaCYS – enzima específico de la vía de los esteroides) y el gen del 5,8 S rRNA (control interno, que forma parte de la unidad grande 60S del ribosoma de eucariotas).

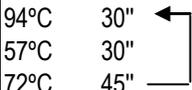
Una vez seleccionados los genes de interés, se procedió a diseñar la secuencia de los primers a través del programa Gene Tool Lite ® o Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (tabla 16):

Tabla 16-. Secuencias de los primers utilizados para el análisis de la expresión génica.

		Primers	Tamaño	Temperatura de hibridación
CaSQS – Escualeno sintasa	Forward	5'- TGG GTT AGG GTT GTC AAA GC – 3'	324 pb	58°C
	Reverse	5'- CGG AAG ATA GCA GGA TCT CG – 3'		
CabAs – Amirina sintasa	Forward	5'- TGG TTG GGG AGA AAG TCT TG – 3'	302 pb	58°C
	Reverse	5'- ACA AGC GTT TGC GGT ACT CT – 3'		
CaCYS – Cicloartenol sintasa	Forward	5'- GAA TCC ACG CCA TGA AGT CT – 3'	421 pb	58°C
	Reverse	5'- ACC ACC ATG ATC CAG AAT CC – 3'		
5,8S rRNA	Forward	5'- CGG CAA CGG ATA TCT CGG CTC T- 3'	201 pb	58°C
	Reverse	5'- TCC GCC CCG ACC CCT TTC – 3'		

Una vez obtenidos los primers se procedió a realizar las diferentes PCRs, con sus ciclos correspondientes (Tabla 17).

Tabla 17-. Secuencias de los primers utilizados para el análisis de la expresión génica.

Programa	Primers	nº Ciclos
94°C 5'		5,8S 28
94°C 30"		bAS 32
57°C 30"		SQS 25
72°C 45"		CYS 28
72°C 7'		

El producto de estas PCRs se sembró en un gel de agarosa al 1,5% con un 3% de bromuro de etidio. Los geles se analizaron con el software Kodac molecular del equipo Gel Logic 100 Imaging System, para determinar la intensidad de banda de cada muestra y establecer las diferencias cualitativas de las expresiones de los genes analizados.

### **2.7.1- Obtención del control interno**

Cuando se estudia la expresión génica mediante la RT-PCR se necesita un control interno, para descartar errores metodológicos. Como control interno, se suelen utilizar genes necesarios para la supervivencia de las células (Thellin y col., 1999), que presentan una expresión constante independiente del tejido, del estado de desarrollo o del experimento (Goncalves y col., 2005).

En la mayoría de los casos, se utiliza algún control interno standard como el gen de la actina, el G3PDH o el 18S rRNA, pero en nuestro caso ninguno de estos genes estaba secuenciado para *Centella asiatica*. Por consiguiente, se tuvo que realizar una búsqueda bibliográfica de los genes secuenciados por el momento y encontrar algún candidato para ser utilizado como control interno.

Como candidato elegimos el 5,8s rRNA, pero previamente tuvo que validarse para demostrar que se comportaba como un control interno. Para ello, se compararon diferentes tejidos vegetales y distintos tratamientos, en función de los estudios que queríamos realizar. Con estas muestras se realizaron una serie de PCRs con diferentes cantidades de cDNA, para corroborar que las diferencias que se observan en las expresiones de los genes de interés, eran debidas a una diferencia en la expresión génica y no a un error en la metodología.

### **2.8- Análisis estadístico**

Posterior a cada experimento se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos, para determinar si existían diferencias entre las variables consideradas, como los diferentes medios de cultivo utilizados o tipo de tratamientos. Para ello, se utilizó el programa Statgraphics Centurión XV.II, con el que se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ . El análisis de la varianza se define como una técnica en la que la varianza total de un conjunto de datos se divide en dos o más componentes, y cada uno de ellos presentan una varianza específica, de manera que durante el análisis, es posible encontrar la magnitud con la que contribuye cada una a la variación total. Lo cual, nos permite estimar y probar hipótesis respecto a las variaciones de las poblaciones (Daniel, 2005).

## **Materiales y métodos**

---

En todos los análisis que se realizaron y cuyo resultado determinó que existían diferencias significativas entre los grupos, se procedió a realizar unas pruebas “post-hoc” para determinar entre cuales de ellos existía la diferencia. Por eso, se compararon dos a dos, los grupos analizados, mediante el test de Tukey. Este test permite comparar grupos del mismo número de individuos, cuando el objetivo es comparar promedios entre dos grupos.