

## **Grao en Bioloxía**

**Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía  
Vexetal e Ecoloxía**

**Área de Fisioloxía Vexetal**

### **Memoria do Traballo de Fin de Grao**

**Ensaio de elicitación de suspensións celulares, empregando como  
elicitador, extracto de raíz de *Moringa oleifera***

**Ensayo de elicitación de suspensiones celulares, empleando como  
elicitador, extracto de raíz de *Moringa oleifera***

**Elicitation test of cell suspensions using as elicitor an extract of  
*Moringa oleifera* root**

**Balduino González Casas**

Xullo, 2017

*Dirixido por: Dra. María de los Ángeles Bernal Pita da Veiga  
Dra. Lorena Almagro Romero*



Facultade de Ciencias

## TRABALLO FIN DE GRAO

Dña. María de los Angeles Bernal Pita da Veiga, autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao "Ensaio de elicitación de suspensions celulares empregando como elicitor extracto de raíz de *Moringa oleifera*", presentado por Balduino González Casas para a súa defensa ante o tribunal cualificados

En A Coruña a 12 de Xullo del 2017.

Fdo.: Angeles Bernal Pita da Veiga

Os resultados obtidos neste traballo de fin de Grao foron presentados no Congreso da SEBIOT 2017 que tivo lugar en Murcia no mes de Xuño.

**Autores:** Iglesias,M., Gago,D., Castro,A., Verde, L., González, B., Vidal, N., Bernal, MA

**Título:** Estudio sobre el potencial biotecnológico *in vitro* e *in vivo* de diferentes órganos de *Moringa oleífera* Lam

**Tipo de participación:** póster

**Congreso:** Sebiot 2017

**Lugar de celebración:** Murcia

Data: 2017

## Índice

<u>Resumo/ Resumen/ Abstract</u> .....	7-8
<u>Palabras chave/ Palabras clave/ Keywords</u> .....	8
1. <u>Introdución</u> .....	8-10
1.1. Características e propiedades de <i>Moringa oleifera</i> .....	8
1.2. Cultivo <i>in vitro</i> .....	9
1.2.1. Suspensións celulares.....	9
1.2.2. Elicitación.....	9
1.3. Compostos fenólicos.....	9-10
1.4. Capacidade antioxidante.....	10
2. <u>Obxetivos</u> .....	10-11
3. <u>Material e métodos</u> .....	11-16
3.3. Reactivos.....	11
3.2. Material vexetal.....	11
3.3. Obtención do extracto de raíz de moringa.....	11
3.4. Cultivo <i>in vitro</i> .....	11-13
3.4.1. Medio de cultivo.....	11-12
3.4.2. Inducción y mantemento de callos.....	12
3.4.3. Iniciación y mantemento de suspensiones celulares.....	12
3.4.4. Medición da viabilidade celular.....	13
3.4.5. Preparación das suspensións destinadas á elicitación.....	13
3.5. Elicitación co extracto de Moringa.....	13-14
3.6. Toma e método de extracción de mostras.....	14
3.7. Medición de fenois.....	14-15
3.7.1. Recta de calibrado de ácido gálico.....	14-15
3.7.2. Preparación da mostra para a medición de fenois totais.....	15

3.8. Actividade antioxidante.....	15-16
3.8.1. Ensaio con DPPH e elaboración da recta de calibrado de Trolox.....	15-16
3.8.2. Preparación das mostras para a medición da actividade antioxidante.....	16
3.9. Análise estatístico.....	16
<u>4. Resultados e discusión</u> .....	16-22
4.1. Determinación do contido de fenois totais .....	16-19
4.1.1. Recta de calibrado de ácido gálico.....	16-17
4.1.2. Fenois totais.....	18-19
4.2. Determinación da capacidade antioxidante.....	19-21
4.2.1. Recta de calibrado de Trolox.....	19-20
4.2.2. Porcentaxe de actividade antioxidante.....	20-21
4.3. Resultados estatísticos.....	21-23
5. <u>Conclusiones</u> .....	24
6. <u>Bibliografía</u> .....	25-26

**Resumo:** *Moringa oleifera* é unha árbore con características metabólicas singulares, cunha elevada cantidade e variedade de metabolitos secundarios con múltiples funcións, dentro das cales podemos resaltar as relacionadas cás funcións defensivas como é a capacidade antioxidante, parcialmente ligada cos compostos fenólicos. Dadas estas características da árbore propúxose un experimento de elicitación cun extracto da raíz en suspensións celulares de *Capsicum annuum* var. *annuum* co fin de ver como afectaba este extracto sobre a resposta antioxidante e os compostos fenólicos das suspensións. Os resultados obtidos indican diferenzas significativas na capacidade antioxidante entre as suspensións controis e as tratadas co extracto de *M. oleifera*, observándose importantes incrementos de ata o triplo de actividade nas mostras cunha elevada concentración do extracto, nos niveis de compostos fenólicos tamén se reportan diferenzas significativas nas primeiras 48 horas, obtívose unha maior concentración nas suspensións tratadas. Os resultados lévannos a preguntarnos se o emprego de extractos desta especie podería ter unha posible aplicación como pretratamento fronte ós axentes bióticos e abióticos, activando os sistemas defensivos das plantas antes de que se produza unha infección ou estrés e posibilitando unha resposta defensiva máis efectiva como pode ser un aumento da capacidade antioxidante.

**Resumen:** *Moringa oleifera* es un árbol con características metabólicas singulares, con una elevada cantidad y variedad de metabolitos secundarios con múltiples funciones, dentro de las cuales podemos resaltar las relacionadas con las funciones defensivas como es la capacidad antioxidante, parcialmente ligada con los compuestos fenólicos. Dadas estas características del árbol se propuso un experimento de elicitación con extracto de la raíz en suspensiones celulares de *Capsicum annuum* var. *annuum* con el fin de ver como afectaba este extracto sobre la respuesta antioxidante y los compuestos fenólicos de las suspensiones. Los resultados obtenidos indican diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre las suspensiones controles y las tratadas con el extracto de *M. oleifera*, observándose importantes incrementos de hasta el triple de actividad en las muestras con una elevada concentración del extracto, en los niveles de compuestos fenólicos también se reportan diferencias significativas en las primeras 48 horas, se obtuvo una mayor concentración en las suspensiones tratadas. Los resultados nos llevan a preguntarnos si el empleo de extractos o sueros de esta especie podría tener una posible aplicación como pretratamiento frente a los agentes bióticos y abióticos, activando los sistemas defensivos de las plantas antes de que se produzca una infección o estrés y posibilitando una respuesta defensiva más efectiva como puede ser un aumento de la capacidad antioxidante.

**Abstract:** *Moringa oleifera* is a tree with unique metabolic characteristics, with a high quantity and variety of secondary metabolites with multiple functions, inside of which we can highlight those related to defensive functions as it is partially linked with phenolic compounds, antioxidant capacity. Given these characteristics of the tree was proposed an experiment of elicitation with root extract in cell suspensions to *Capsicum annuum* var. *annuum* in order to see how it affected this extract on antioxidant response and phenolic compounds in suspensions. The results indicate significant differences in antioxidant capacity between suspensions controls and those treated with the extract of *M. oleifera*, Noting significant increases of up to three times the activity in samples with a high concentration of extract in the levels of phenolic compounds are also reported significant differences in the first 48 hours, obtained a

higher concentration in the treated suspensions. The results lead us to wonder if the use of extracts from this species may have a possible application as a pretreatment against biotic and abiotic agents activating the defensive systems of the plants until there is an infection or stress and allowing a defensive response more effective as it may be an increase in antioxidant capacity.

**Palabras chave:** *Moringa oleifera*, elicitor, elicitación, actividade antioxidante, compostos fenolicos, suspensións celulares, cultivo *in vitro*.

**Palabras clave:** *Moringa oleifera*, elicitor, elicitación, actividad antioxidante, compuestos fenolicos, suspensiones celulares, cultivo *in vitro*.

**Keywords:** *Moringa oleifera*, elicitor, elicitation, antioxidant activity, phenol compounds, cell suspensions, *in vitro* culture.

## **1. Introducción**

### **1.1. Características e propiedades de *Moringa oleifera***

A *Moringa (Moringa oleifera)* é unha árbore de crecemento acelerado pertencente á familia Moringaceae, do orde Brassicales, que acada de 10 - 12 metros de altura. É orixinario do sur do Himalaya, e introduciuse artificialmente na maioría das rexións con climas tropicais e subtropicais; o Suroeste asiático, Asia occidental, na Península Arábiga, no Oeste de África, gran parte de América do Sur etc. Dita distribución é factible debido a súa resistencia fronte secas ou escaseza de auga (Sánchez-Peña et al., 2013)

As súas características metabólicas son notables e singulares, de feito, é empregada coma complemento dietético, antiinflamatorio ou expectorante entre outros usos (Olson, 2011).

É un dos vexetais que contén mais variedade e cantidade de metabolitos, destacando os seus elevados niveis de vitaminas con propiedades antioxidantes: vitamina A (betacarotenos), vitamina C, vitamina K, vitamina E, etc. Tamén presenta abundantes vitaminas do grupo B: b1, b2, b3, b5, b6 y b12 (Pérez et al., 2010). Ademais ten unha gran cantidade de minerais, proteínas e múltiples aminoácidos fundamentais entre eles os 9 non producibles polas células humanas.

A *Moringa* presenta unha elevada capacidade antioxidante, isto débese a súa elevada proporción de enzimas antioxidantes e doutros metabolitos secundarios con esta capacidade como os fenóis, vitaminas etc. (Pérez et al., 2010).



## **1.2. Cultivo *in vitro***

### **1.2.1. Suspensións celulares**

Dentro do cultivo *in vitro*, a preparación de suspensións celulares permítenos desenvolver un medio en condicións axeitadas para a viabilidade celular e crecemento regulado para células vexetais. A presenza dun medio líquido, con función equiparable á do apoplasto, permite unha multiplicación e produción rápida de metabolitos (Vanisree *et al.*, 2004)

As suspensións consisten nun cultivo cun medio líquido iniciado en condicións asépticas e esterilizado, para ter unhas condicións estables e coñecidas, preparado a partir de fragmentos de callos friables. Os callos, iníciase a partir de fragmentos esterilizados da planta, inducidos nun medio sólido suplementado con hormonas (Mustafa *et al.*, 2011).

### **1.2.2. Elicitación**

Un elicitor é un factor físico ou químico que induce cambios fisiolóxicos nos organismos, que se aplica (laboratorio) ou afecta (natureza). Trátase de compostos que estimulan a síntese de metabolitos secundarios como consecuencia dos mecanismos defensivos das plantas. Poden ser de procedencia biótica ou abiótica (Hassan & Soleimani, 2016). Entre os elicitores bióticos atópanse múltiples compostos presentes en patóxenos coma a quitina ou a flaxelina, pero tamén existen outros tipos que son sintetizados por animais ou vexetais, por exemplo un planta pode secretar este tipo de sustancias en resposta a herbívoros ou fronte a condicións de estrés externas.

Os elicitores son percibidos por receptores celulares, polo xeral de membrana mediante unha unión reversible que activa unha cadea de sinais, que acaban activando a síntese de sustancias de defensa, entre elas hormonas, axentes antioxidantes, fitoalexinas etc. (Hassan & Soleimani, 2016).

Dadas as súas características, a aplicación de elicitores de xeito artificial pode ser moi beneficiosa para a planta se esta corre risco de sufrir algún tipo de estrés ou patoxénese.

## **1.3. Compostos fenólicos**

Os fenóis son uns compostos orgánicos conformados polo menos por un grupo fenol: un anel aromático unido a un ou mais grupos funcionais. Tódolos fenóis son metabolitos secundarios, produtos biosintetizados despois da fase de crecemento inicial que non interveñen no crecemento ou desenvolvemento da planta, senón que actúan noutras funcións secundarias; como compostos de defensa, funcións de sostén, atraer polinizadores e/ou dispersores dos froitos, absorber radiacións ultravioleta prexudiciais, ou reducir o crecemento das plantas do entorno, entre outras funcións (Díaz & Bernal, 2011).

Existe unha ampla variedade de fenóis con diferentes propiedades e distintas estruturas, dende simples (un único anel aromático) ata máis complexos (varios aneis). Poden ser dende polímeros de gran tamaño e insolubles a solubles en solventes orgánicos (apolares) ou polares como certos glucósidos ou ácidos carboxílicos solubles en sustancias polares coma a auga e o metanol.

Gran parte dos fenóis actúan como axentes antioxidantes debido a súa capacidade para captar electróns, oxidándose e imposibilitando que se oxidasen outros compoñentes celulares ou extracelulares. O propio metabolismo das plantas xera radicais libres, que posúen esta capacidade de ceder electróns oxidando compoñentes celulares. Os máis notables son as especies reactivas de osíxeno (ROS): radicais superóxido, peróxido de hidróxeno ou radicais hidroxilo entre outros (Taiz et al., 2015).

#### **1.4. Capacidade antioxidante**

Os radicais libre son unha especie química caracterizada por ter un ou máis electróns desapareados. Polo xeral, son moi inestables e cun gran poder reactivo que provoca oxidacións en cadea que poden causar graves danos para a célula. Os antioxidantes actúan como moléculas captadoras de electróns, oxidándose eles e neutralizando esa oxidación en cadea, impedindo que sexan outras moléculas da célula as que sufran procesos oxidativos.

As plantas para protexerse dos radicais libres resultantes do seu metabolismo, fundamentalmente da formación de ROS, sintetiza nos diferentes compartimentos celulares sustancias antioxidantes, para evitar danos oxidativos na célula e restauralo equilibrio fisiolóxico.

Hai diferentes clases de antioxidantes:

- Enzimas: coma a peroxidasa, catalasa etc.
- Metabolitos secundarios: coma os compostos fenólicos.
- Compostos nitroxenados: coma a cafeína.
- Quelatos: ácidos policarboxílicos, ácido cítrico, aminoácidos, etc.

A suma de todos estes compostos será a que determine a capacidade antioxidante total da célula. A interacción entre os radicais libres e os antioxidantes determinará os niveis de estrés oxidativo da planta, o cal pode e adoita estar asociado a patoxénese.

## **2. Obxetivos**

Con este traballo de investigación preténdese estudar o efecto dun elicitor, un extracto de raíz de *Moringa oleifera*, sobre vexetais, empregando neste caso unha suspensión celular de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. Preténdese analizar a reacción da suspensión ante o elicitor, mediante o emprego de dous parámetros indicativos dunha resposta defensiva da planta:

- Posta a punto dun sistema de elicitación de suspensións celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* con diferentes concentracións de extracto de raíz de Moringa.
- Concentración de fenóis polares totais das diferentes suspensións e a súa comparación para determinar o efecto do extracto de moringa como elicitor.
- Actividade antioxidante das suspensións.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Reactivos**

Os reactivos empregados para a elaboración dos medios de cultivo e para os estudos de fenóis e actividade antioxidante foron da marca Sigma-Aldrich.

#### **3.2. Material vexetal**

Empregáronse suspensións de *C. annuum* L. var. *annuum* obtidas por cultivo *in vitro*, partindo de hipocotilos de plantas. O elicitor obtívose do extracto de raíz da planta *M. oleifera*, obtidas a partir de sementes procedentes da empresa Vitalmor e cultivadas no invernadoiro da Facultade de Ciencias da UDC.

#### **3.3. Obtención do extracto de raíz de moringa**

Partindo da raíz da *M. oleifera* triturámola e machucámola ata dar unha textura de po ou sedimento fino para facilitar o proceso de dilución. Collemos 200 mg deste po e mesturámolo con 50 ml de metanol (80%). Poñemos esta solución en axitación durante 3 horas, a temperatura ambiente e en escuridade, empregando un vaso de precipitados, cuberto con papel de aluminio, e un axitador magnético. Posteriormente filtrámola solución cunha tea de nylon e empregamos o rotavapor para evaporalo disolvente. Para recuperalo extracto resuspendemolo en 1 mL de etanol (70%). Por último levamos a cabo unha filtración na cabina de fluxo laminar cuns filtros de 22 µm de diámetro de poro. Despois deste proceso obtemos un extracto de 200 mg de po en 1 mL de etanol (70%).

#### **3.4. Cultivo *in vitro***

##### **3.4.1. Medio de cultivo**

Preparouse un medio para todos os tipos de cultivo *in vitro*, procurando que fose axeitado para o crecemento de *C. annuum*. O medio elixido foi do tipo Murashige e Skoog cos seguintes compoñentes e características (**Taboa 1**):

Tipo de cultivo	Produtos	Concentración
Suspensións Celulares	Sales Murashige e Skoog	4,3 g/L
	Sacarosa	30 g/L
	Caseína	0,25 g/L
	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético	3 mg/L
	Kinetina	0,05 mg/L
	Vitaminas de Morel	1 mL/L
Cultivo de callos	Sales Murashige e Skoog	4,3 g/L
	Sacarosa	30 g/L
	Casaminoácidos	0,25 g/L
	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	3 mg/L
	Kinetina	0,05 mg/L
	Vitaminas de Morel	1 mL/L
	Agar	8 g/L

**Taboa 1.** Composición dos medios empregados.

Para elaborar 1 litro de medio depositamos 500 mL nun matraz de 1 litro de capacidade e poñemolo no axitador magnético para ir introducindo os compostos do medio e que se vaian disolvendo. Despois aproximámolo pH a 5,8 mediante a adición de HCl ou NaOH. Unha vez que están mesturados e o pH axustado enrrasamos o matraz con auga destilada ata 1 litro. Por ultimo tapamos con papel de aluminio e autoclavamos.

### 3.4.2. Inducción e mantemento de callos

Os callos de *C. annum L. var. annum* obtivéronse no ano 2015 a partir de hipocotíleos desta variedade do pemento. Os callos obtidos, subcultiváronse cada tres semanas, ata a actualidade co fin de manter a liña celular. Para este mantemento seccionáronse porcións de callos friables e transferíronse ao medio de cultivo indicado anteriormente. Os callos mantivéronse en escuridade a 25°C e foron destinados á obtención de suspensións celulares.

### 3.4.3. Iniciación e mantemento de suspensiones celulares

As suspensións celulares iniciáronse mediante a transferencia de porcións de callo friable en matraces de 250 mL de capacidade, cun contido de 100 mL de medio de cultivo anteriormente descrito. As suspensións mantivéronse en axitación a 115 rpm

en escuridade e subcultivaronse cada 15-18 días.

#### **3.4.4. Medición da viabilidade**

Efectuar unha medición da viabilidade das células dos cultivos celulares é fundamental para poder levar a cabo o proceso de elicitación en cultivos coas condicións axeitadas e así poder coñecer e axustar a densidade celular inicial dun subcultivo. O procedemento consiste en detectar o bo funcionamento da cadea de transporte electrónico. Para isto vamos a empregar un composto soluble e incoloro; o cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio. Este composto capta electróns da cadea de transporte electrónico reducíndose a formazano que é insoluble e de cor rosa. Aquelas mostras que viren a cor rosa serán aquelas que presenten unha elevada densidade de células vivas e funcionais.

#### Procedemento realizado:

Primeiro preparase unha disolución de cloruro de tetrazolio mesturándoo con auga nunha proporción entre 0,5 e 3%, por exemplo 0,75 g en 25 ml de auga destilada (o que procuramos e que haxa suficiente reactivo como para captar os electróns da cadea de transporte electrónico). A continuación tómanse 1 mL coma mostra das solucións celulares e aplicáselle a disolución de cloruro de tetrazolio en cantidade suficiente (1 mL) e deixase actuar o redor de 30 min para comprobar a viabilidade celular.

#### **3.4.5. Preparación das suspensións celulares destinadas á elicitación.**

Para o experimento de elicitación realizáronse subcultivos celulares a partir dunha suspensión nai de *C. annuum* preparada no laboratorio de Fisioloxía Vexetal polas metodoloxías xa mencionadas. Producíronse un total de 12 suspensións en matraces, cun volume de 40 ml de medio de cultivo e 4 g de peso húmido da suspensión nai. Para a extracción do peso húmido realizouse unha filtración da suspensión, empregando o seguinte material estéril: matraz, coador, papel de filtro, culler e báscula na cámara de fluxo laminar, para asegurar as súas condicións de asepsia, evitando infeccións ou contaminacións prexudiciais para o experimento. Unha vez realizados estes subcultivos illáronse con papel de aluminio e dispuxéronse en axitación 24 horas.

### **3.5. Elicitación co extracto de moringa**

Ás 24 horas da obtención dos subcultivos estes xa superaron a fase de establecemento e podemos proceder coa elicitación.

Preparouse un control e tres tipos de concentracións, realizando un total de tres replicas por concentración incluíndo ao control (**Taboa 2**)

	Controis			Concentración menor			Concentración media			Concentración maior		
Elicitor (mg/ml)	0			0,025			0,25			0,75		
Réplicas	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3

**Taboa 2.** As distintas concentracións están expresadas en (mg/mL).

Para a elaboración das diferentes concentracións, empregouse o extracto de *M. oleifera* previamente obtido. Tendo en conta a concentración do extracto, 200 mg/mL, dispensáronse 5  $\mu$ L do extracto nas 3 réplicas de concentración menor, 50  $\mu$ L nas de concentración media e 150  $\mu$ L nas de concentración maior, realizando todo este proceso na cámara de fluxo laminar e con material estéril (puntas de micropipeta). Aos controis non se lles engade elicitor. Unha vez realizada a elicitación vólvense a dispoñer as suspensións tapadas e en axitación.

### 3.6. Toma e método de extracción de mostras

Despois da elicitación, realízanse 3 tomas de mostras, ás 6, 24 e 72 horas para realizar a posterior análise de fenóis e actividade antioxidante.

O procedemento de toma é o seguinte: coa micropipeta de 1000  $\mu$ L tómanse dúas mostras de 1 mL de cada réplica que se dispensan en tubos eppendorf de 1mL, obtendo un total de 24 mostras. Posteriormente centrifúganse durante 15 minutos a 10 °C e a 1300 rpm. E por último recóllese o sobrenadante noutro eppendorf tendo moito coidado de non coller o pellet e obter un mínimo de 0,5 mL. Unha vez obtidas as mostras conxelámolas a -80 °C conservándoa para a súa posterior análise. A primeira toma que se efectúa directamente das suspensións (1mL) realízase na cámara de fluxo para non contaminalo resto do cultivo.

### 3.7. Medición de fenóis

#### 3.7.1. Recta de calibrado de ácido gálico

Para a medición do contido de fenóis totais empregámolo reactivo Folin-Ciocalteu, segundo o método de Slinkard & Singleton (1977) modificado por Kraujalyte et al. (2015).

Para a obtención da recta de calibrado empregamos 5 concentracións ácido gálico (**Taboa 3**).

Concentracións (mg/mL)	0,01	0,02	0,05	0,10	0,20
---------------------------	------	------	------	------	------

**Taboa 3.** Concentracións empregadas de ácido gálico en (mg/mL).

O procedemento realizado foi o seguinte: mesturamos en tubos de ensaio 100 µl de cada concentración de ácido gálico con 1ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluído 10 veces. Como branco empregamos auga destilada e tratámola coma o resto das mostras. Axitámoslos tubos no axitador e incúbanse as mostras catro minutos en escuridade, a continuación engadímoslle a cada tubo 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ao 7% e 400 µl de auga destilada, axitámoslos tubos e incúbanse durante 90 minutos en escuridade. Por último medimos a absorbancia no espectrofotómetro a unha lonxitude de onda de 725 nm e realizamos a recta de calibrado con estes datos.

### **3.7.2. Preparación da mostra para a medición de fenóis totais**

Unha vez desconxeladas as mostras extraemos 500 µL e pasámoslos a outros eppendorfs engadíndolle 500 µL de metanol ao 80% (dilución 1/2). Despois de engadilo metanol, axitamos e poñémolos en incubación a 70 °C durante 30 minutos. Ao finalzala incubación, sacámoslos e poñémolos eppendorfs en xeo brevemente. Despois deste tratamento podemos proceder co mesmo método empregado na recta de calibrado de ácido gálico; reactivo Folin-Ciocalteu, segundo o método de Slinkard & Singleton (1977) modificado por Kraujalyte et al. (2015) ( a única diferenza será a de empregar 100 µL de cada mostra en lugar de 100 µL de concentración de ácido gálico, polo demais séguese o mesmo método descrito previamente). Ao final do ensaio tomámoslos datos de absorbancia e extrapolámoslos aos de concentración segundo a recta de calibrado realizada.

## **3.8. Actividade antioxidante**

### **3.8.1. Ensaio con DPPH e elaboración da recta de calibrado de Trolox**

Para a determinación da actividade antioxidante empregouse o composto 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) o cal funciona expoñendo radicais libres no medio, os cales poden ser hidroxilados ou revertidos con outros grupos funcionais, polos compostos antioxidantes (fenóis entre outros). O DPPH presenta distinta cor en función do seu estado redox, polo que se pode determinar a actividade antioxidante en función do cambio de cor, medindo a absorbancia a 515 nm nunha solución fenólica. Para poder extrapolala actividade realizouse unha recta de calibrado con Trolox (ácido 6 - hidroxilado - 2,5,7,8 - tetrametilchroman - 2 - carboxílico), un reactivo que funciona como antioxidante.

Prepárase unha recta de calibrado de Trolox cunha primeira disolución nai de DPPH 1 mM e dilúese con metanol 80% ata que indique valores de absorbancia próximos a

0,800 no espectrofotómetro a 515 nm, esta será a dilución coa que se traballe en todas as mostradas. A recta patrón farémola con 950 µl desta solución e 50 µl de solución de Trolox a diferentes concentracións, partido dunha solución nai de 1 mM para elaboralas, realízanse estas 5 dilucións: 10, 20, 30, 40 e 50 µM. É preciso axitalas 5 dilucións finais (950 + 50 µL) e metelas en escuridade durante 3 minutos antes de medilas no espectrofotómetro. Unha vez obtidos os datos de absorbancia obtense o porcentaxe de redución de DPPH a partir da seguinte fórmula:  $((A_0 - A_X)/A_0) * 100$ , onde **A<sub>0</sub>** é a absorbancia da solución nai sen Trolox (100% do DPPH sen reducirse) e **A<sub>X</sub>** a absorbancia da mostra da concentración elixida. Unha vez se acharon tódolos porcentaxes das diferentes concentración realízase a recta patrón do % de redución do DPPH fronte á concentración de Trolox.

### **3.8.2. Preparación das mostradas para a medición da actividade antioxidante**

Unha vez desconxeladas as mostradas procédese do mesmo xeito que para a realización da recta patrón tomando 50 µL de cada mostra en lugar das dilucións de Trolox. Unha vez obtidas as absorbancias extrápolanse as concentracións da recta patrón.

### **3.9. Análise estatístico**

Para o estudo da actividade antioxidante e dos compostos fenólicos, fixéronse por triplicado cada concentración de extracto e tomáronse dúas mostradas de cada replica. Os datos de fenóis expresáronse cunha análise da desviación estándar, realizando a regresión lineal mediante o programa Microsoft Excel 2013. Levouse a cabo tamén un estudo de varianzas ANOVA por medio do programa de estatística R.

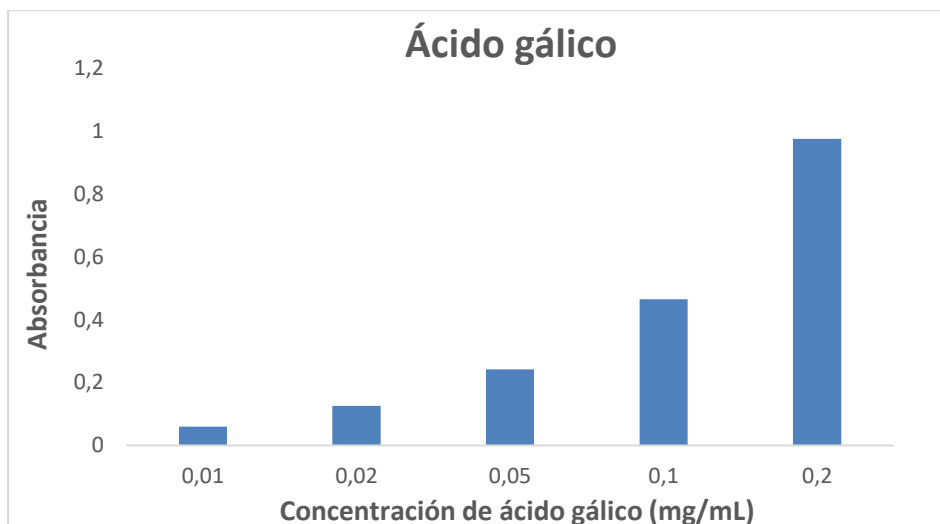
## **4. Resultados e discusión**

### **4.1. Determinación do contido de fenóis totais**

#### **4.1.1. Recta de calibrado de ácido gálico para a medición dos fenóis**

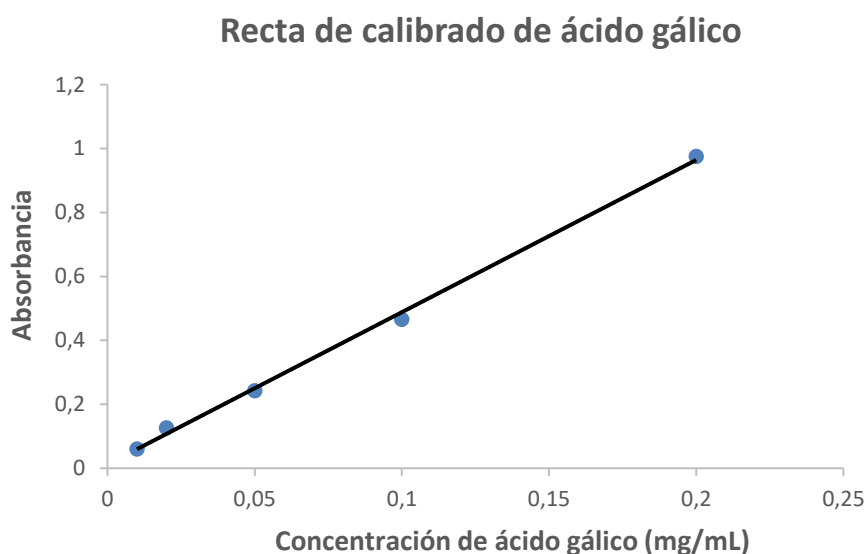
Os datos obtidos das medidas de ácido gálico foron os seguintes: (**Figura 1**)





**Figura 1.** Absorbancia das mostras de diferente concentración de ácido gálico (mg/mL)

Cos datos obtidos realizouse a recta de calibrado (**Figura 2**) empregada para avaliar as nosas mostras:

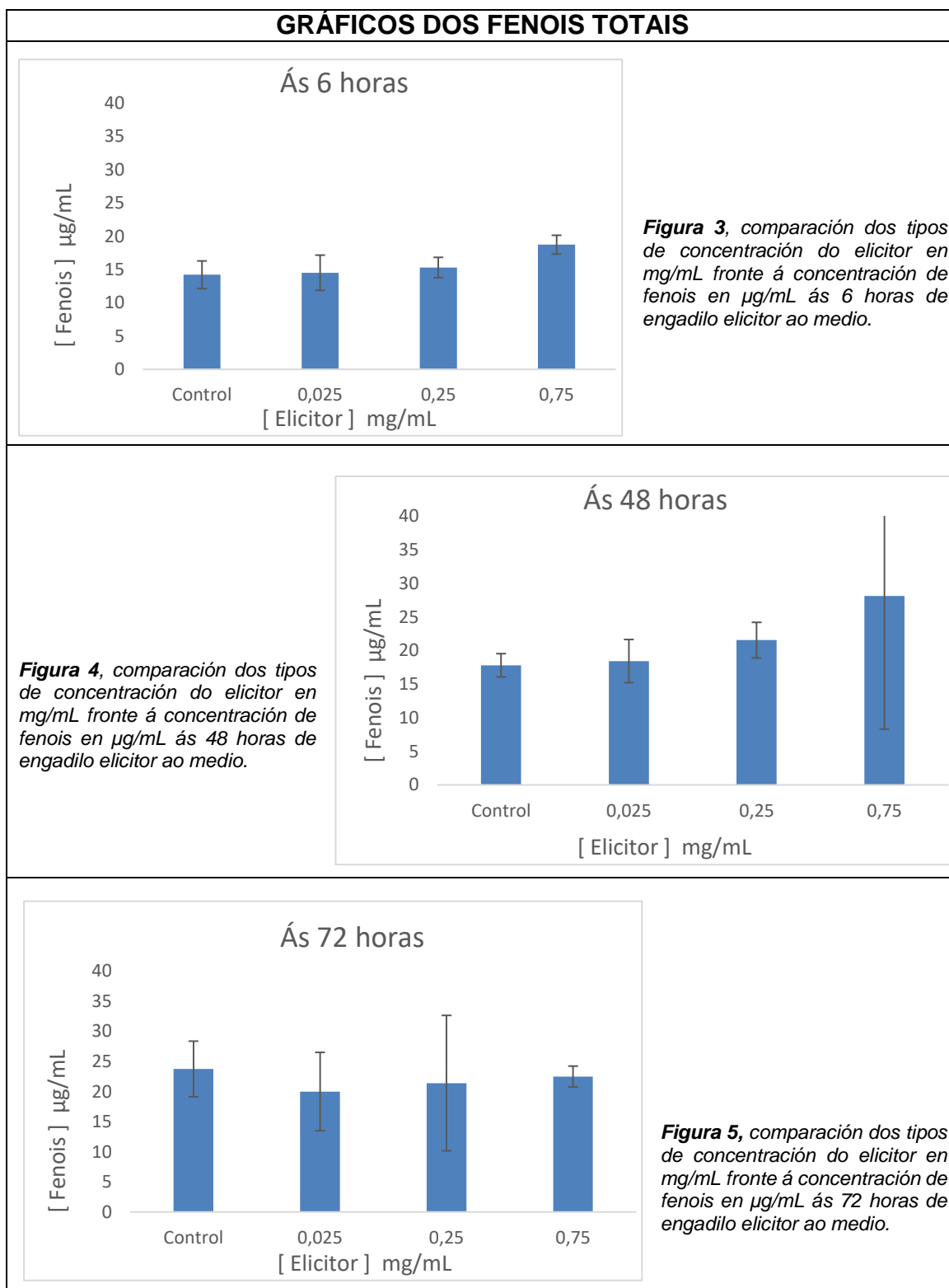


**Figura 2,** Recta de calibrado realizada comparando a absorbancia das diferentes concentración de ácido gálico en mg/mL.

A ecuación desta recta (**Figura 2**) e a seguinte: ( $Y = 4,7621x + 0,012$ ), a cal empregamos para obter as concentracións das mostras medidas a partir dos datos de absorbancia.

#### 4.1.2. Fenois totais.

Cos datos obtidos das medidas de fenois elaboráronse as gráficas ás diferentes horas: 6 h (**Figura 3**), 48 h (**Figura 4**), 72 h (**Figura 5**).



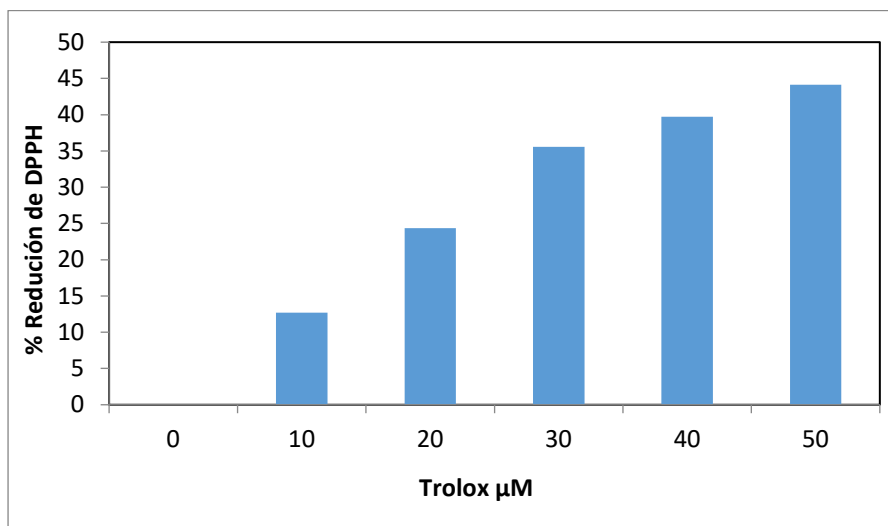
Ás **Figuras 3** e **4** indican unha correlación da concentración de fenois e a concentración de elicitor, observándose as maiores concentracións de fenois nas mostras coa maior concentración de elicitor tal e como poderíamos agardar en función

de estudos de elicitación previos como (Materska & Perucka, 2005). Na **Figura 5** non se define un patrón claro poida que debido ao esgotamento do elicitor o que explicaría esta redución da taxa de produción de fenóis ás 72 horas, do mesmo xeito que sucede no estudo de (Perucka & Materska, 2001) no cal tamén se observa unha redución de compostos fenólicos cara o final do cultivo das suspensións celulares.

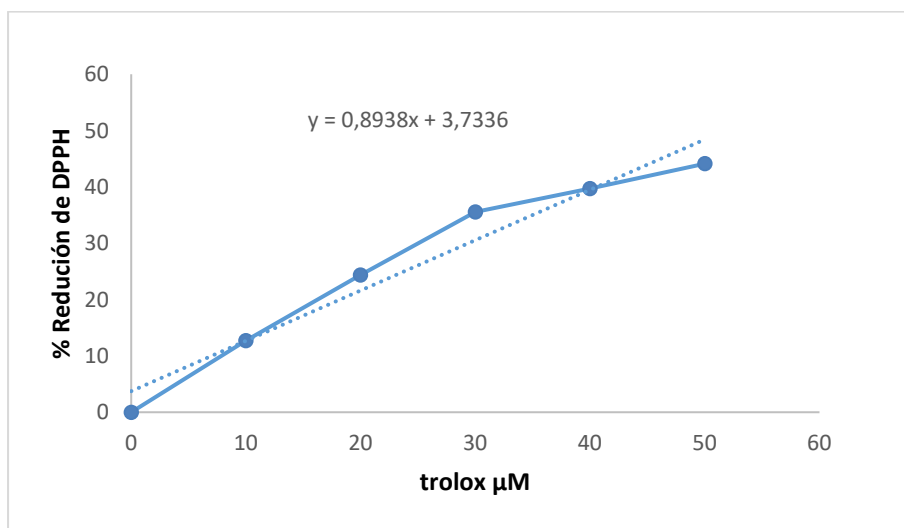
## 4.2. Determinación da capacidade antioxidante

### 4.2.1. Recta de calibrado de Trolox

Os datos obtidos representáronse na **Figura 6** coa que se realizou a recta patrón do porcentaxe de redución vs equivalentes de Trolox (**Figura 7**)



**Figura 6.** Comparación dos datos obtidos de % de redución, fronte ás cantidades de Trolox en  $\mu\text{M}$

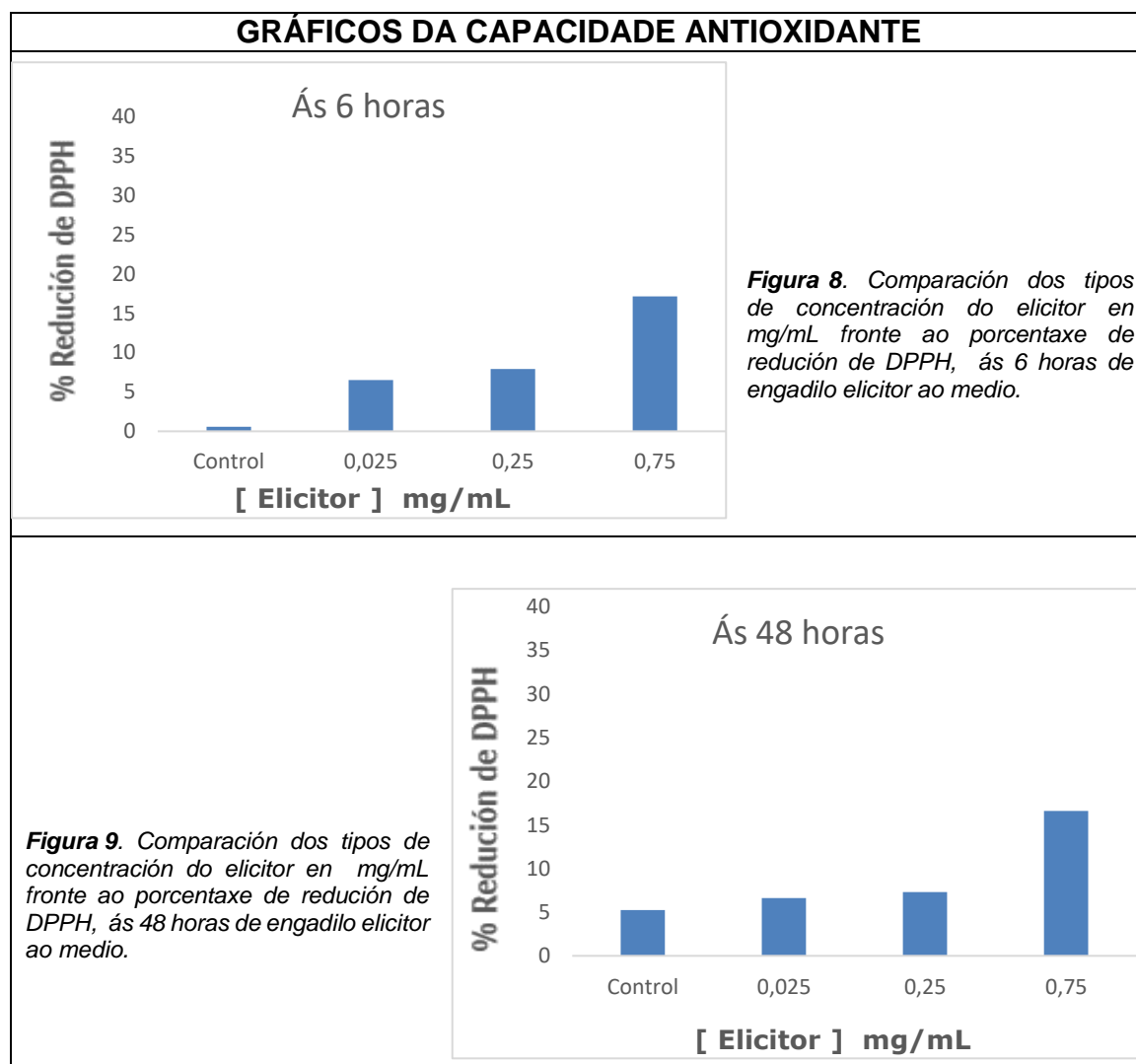


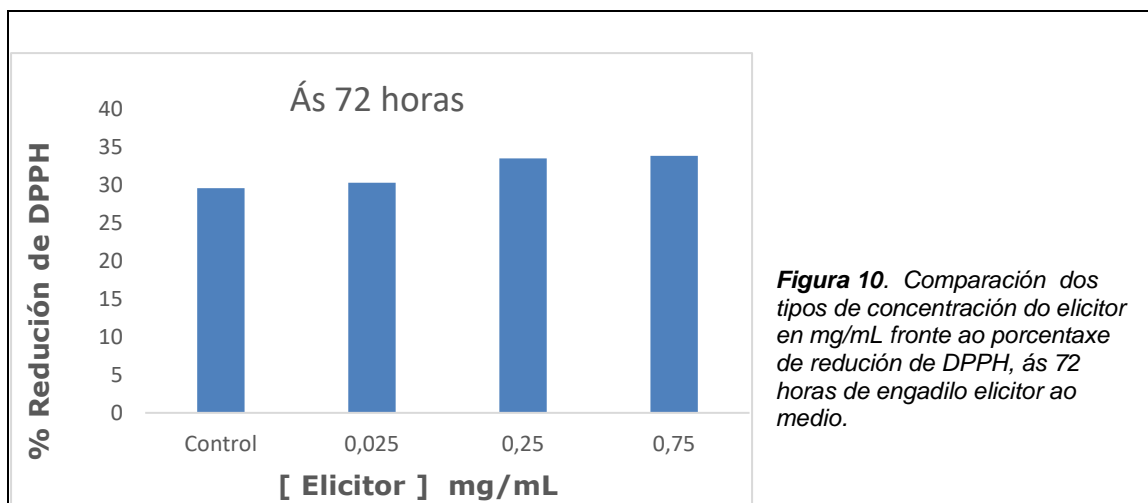
**Figura 7.** Recta patrón elaborada cos dos datos de % de redución, fronte ás cantidades de Trolox en  $\mu\text{M}$

Da recta patrón obtémola ecuación: ( $Y = 0,8938x + 3,7336$ ) que empregamos para a obtención dos equivalentes de Trolox das nosas mostras.

#### 4.2.2. Porcentaxe de actividade antioxidante.

Cos datos obtidos das medidas de actividade antioxidante elaboráronse as gráficas ás diferentes horas: 6 h (**Figura 8**), 48 h (**Figura 9**), 72 h (**Figura 10**).





**Figura 10.** Comparación dos tipos de concentración do elicitor en mg/mL fronte ao porcentaxe de redución de DPPH, ás 72 horas de engadido elicitor ao medio.

Ás táboas indican unha correlación da actividade antioxidante e a concentración de elicitor. Existe un aumento claro na redución de DPPH nas mostras tratadas co elicitor especialmente nas de maior concentración e nas primeiras 48 horas.

Os resultados indican un claro aumento da actividade antioxidante nas suspensións celulares tratadas co extracto de Moringa, especialmente nas primeiras 48 horas despois da aplicación e nos tratamentos de maior concentración do extracto, dándose un 10% mais de redución de DPPH e 3 veces máis concentración en equivalentes de Trolox que os tratamentos da concentración media o que nos podería levar a considerar que se tivéssemos empregado unhas concentracións maiores de elicitor os resultados tenderían a incrementarse máis.

En relación cos niveis de fenóis podemos observar como están correlacionados cos niveis de actividade antioxidante como xa determinarán (Materska & Perucka, 2005), estudo no cal tamén se observou unha proporcionalidade da capacidade antioxidante e os compostos fenólicos durante as primeiras horas de cultivo, no caso do noso estudo isto prodúcese ata as primeiras 48 horas.

Hai que ter en conta que nas nosas suspensións celulares, están actuando factores implicados na actividade antioxidante non avaliados neste estudo, como poden ser as enzimas antioxidantes, outros axentes antioxidantes e inclusive compostos fenólicos apolares (dado que empregamos metanol como solvente, os fenóis apolares non se disolven nel). Todos estes compostos non avaliados, teñen un efecto importante sobre a actividade antioxidante total, isto ponse en claro manifesto nas nosas mostras ás 72 horas, dado que a actividade antioxidante, continua incrementándose nas mostras tratadas, mentres que os fenóis presentan unha flutuación, sendo inclusive nos controis, onde hai unha maior concentración de compostos fenólicos, polo que por si sos, non explican a capacidade antioxidante total.

### **4.3. Resultados estatísticos**

Para analizar estatisticamente os datos empregamos o programa R para comprobar a homoxeneidade das varianzas mediante o test de Bartlett e de Fligner-Killeen, para a normalidade o test de Shapiro-Wilk e para a varianza e determinación de diferenzas significativas unha ANOVA (Análise da varianza). (**Taboas4-9**).

## RESULTADOS DE FENOIS TOTAIS

Ensaio: 6 hora	
<u>TEST</u>	<u>p-valor</u>
<b>Test de Bartlett</b> (Proba da homoxeneidade das varianzas)	0.8672
<b>Test de Fligner-Killeen</b> ( Proba da homoxeneidade das varianzas )	0.9491
<b>Shapiro-Wilk</b> (Test de normalidade )	0.3771
<b>ANOVA</b> (Análise da varianza)	0.0012

**Táboa 4.** Resultados das probas estatísticas realizadas os resultados de fenois ás 6 horas despois do proceso de elicitación.

Ensaio: 48 horas	
<u>TEST</u>	<u>p-valor</u>
<b>Test de Bartlett</b> (Proba da homoxeneidade das varianzas)	0.0009
<b>Test de Fligner-Killeen</b> ( Proba da homoxeneidade das varianzas )	0.4131
<b>Shapiro-Wilk</b> (Test de normalidade )	0.0002
<b>ANOVA</b> (Análise da varianza)	0.0169

**Táboa 5 .** Resultados das probas estatísticas realizadas os resultados de fenois ás 48 horas despois do proceso de elicitación.

Ensaio: 72 horas	
<u>TEST</u>	<u>p-valor</u>
<b>Test de Bartlett</b> (Proba da homoxeneidade das varianzas)	0.206
<b>Test de Fligner-Killeen</b> ( Proba da homoxeneidade das varianzas )	0.5346
<b>Shapiro-Wilk</b> (Test de normalidade )	0.4391
<b>ANOVA</b> (Análise da varianza)	0.7869

**Táboa 6.** Resultados das probas estatísticas realizadas os resultados de fenois ás 72 horas despois do proceso de elicitación.

## RESULTADOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Ensaio: 6 hora	
<u>TEST</u>	<u>p-valor</u>
<b>Test de Bartlett</b> (Proba da homoxeneidade das varianzas)	0.2259
<b>Test de Fligner-Killeen</b> ( Proba da homoxeneidade das varianzas )	0.417
<b>Shapiro-Wilk</b> (Test de normalidade )	0.1871
<b>ANOVA</b> (Análise da varianza)	0.001594

**Táboa 7.** Resultados das probas estatísticas realizadas os resultados de concentración en equivalentes de Trolox e o porcentaxe de redución de DPPH ás 6 horas.

Ensaio: 48 horas	
<u>TEST</u>	<u>p-valor</u>
<b>Test de Bartlett</b> (Proba da homoxeneidade das varianzas)	0.03715
<b>Test de Fligner-Killeen</b> ( Proba da homoxeneidade das varianzas )	0.6698
<b>Shapiro-Wilk</b> (Test de normalidade )	0.001287
<b>ANOVA</b> (Análise da varianza)	0.01939

**Táboa 8.** Resultados das probas estatísticas realizadas os resultados de concentración en equivalentes de Trolox e o porcentaxe de redución de DPPH ás 48 horas.

Ensaio: 72 horas	
<u>TEST</u>	<u>p-valor</u>
<b>Test de Bartlett</b> (Proba da homoxeneidade das varianzas)	0.3745
<b>Test de Fligner-Killeen</b> ( Proba da homoxeneidade das varianzas )	0.6747
<b>Shapiro-Wilk</b> (Test de normalidade )	0.1482
<b>ANOVA</b> (Análise da varianza)	0.006355

**Táboa 9.** Resultados das probas estatísticas realizadas os resultados de concentración en equivalentes de Trolox e o porcentaxe de redución de DPPH ás 72 horas.

Obsérvase que existe unha homoxeneidade das variancias en todas as mostras, dáse normalidade nos valores das mostras agás ás 48 horas. O análise da varianza indica que existen diferenzas significativas entre os controis e os tratamentos exceptuando os niveis de fenóis ás 72 horas.

## **5. Conclusións**

- O sistema posto a punto funciona correctamente, aínda que sería necesario optimizar a concentración do extracto e a valoración noutros tempos.
- Obsérvase unha correlación entre a presenza de fenóis totais no apoplasto das suspensións celulares e a concentración de elicitor, sendo ás 48 horas o momento máis significativo.
- Obsérvase un claro aumento na capacidade antioxidante, determinada polo método DPPH, coincidindo no tempo co máximo nivel de fenóis ata as 48 horas.

## **Conclusiones**

- El sistema puesto a punto funciona correctamente, si bien sería necesario optimizar la concentración de extracto y la valoración en otros tiempos.
- Se observa una correlación entre la presencia de fenoles totales en el apoplasto de las suspensións celulares y la concentración de elicitor, siendo a las 48 horas el momento más significativo.
- Se observa un claro aumento en la capacidad antioxidante, determinada por el método DPPH, coincidiendo en el tiempo con el máximo nivel de fenoles hasta las 48 horas.

## **Conclusions**

- The system perfected working properly, although it would be necessary to optimize the concentration of extract and the valuation in the past.
- There is a correlation between the presence of total phenols in the Apoplast of the cell suspensions and elicitor concentration, being 48 hours when more significant.
- There is a clear increase in antioxidant capacity, determined by the method of DPPH, coinciding in time with the highest level of phenols up to 48 hours.



## **Bibliografía**

Berg, R. Van Den, Haenen, G. R. M. M., & Berg, H. Van Den. (2000). The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related avonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Elsevier*, 70, 391–395.

Berg, R. Van Den, Haenen, G. R. M. M., Berg, H. Van Den, & Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Elsevier*, 66, 511–517.

Chac, C., & Gonz, A. R. (2009). Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios. *Lacandonia*, 3(2), 59–65.

Chinprahast, N., Tungsomboon, T., & Nagao, P. (2016). Antioxidant activities of Thai pigmented rice cultivars and application in sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 46–53

Díaz, J. & Bernal, Á. 2011. Capsicinoides y análogos no pungentes en el pimiento. II Xornadas Técnicas do Pemento do Couto. Editorial Diputación da Coruña.

Doberski, J., & Doberski, J. (2016) Simple phenolic compounds and the growth of plants: a short review. *Journal of Biological Education*, 9266 (October). Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00219266.1986.9654793>

Fernández, C. (2016). “Mejora de la propagación in vitro de *Vaccinium corymbosum* y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales” TFM. UDC.

Hassan, S. A., & Soleimani, T. (2016). Improvement of artemisinin production by different biotic elicitors in *Artemisia annua* by elicitation–infiltration method. *Banat’s Journal of Biotechnology*.

Kim, J.-H., Baek, M.-H., Chung, B. Y., Wi, S. G., & Kim, J.-S. (2004). Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *Journal of Plant Biology*, 47(4), 314–321.

Liñan, F. (2010). Moringa oleífera EL ÁRBOL DE LA NUTRICIÓN. *Ciencia y Salud*.

Materska, M., & Perucka, I. (2005). Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1750–1756.

Martínez, A. C. (2016). Avaliación da actividade antioxidante en framboesas comercias. 2–13

Mustafa, NR, Winter, W, van Iren, F and Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*. 6(6).5–12

Olson, M. E. (2011). Moringa oleifera: un árbol multiusos para las zonas tropicales. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 1071–1082.

Pérez, A., Sánchez, T., Armengol, N., & Reyes, F. (2010). Características y potencialidades de Moringa oleifera, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos Y Forrajes*, 33(4), 1–16.

Perucka, I., & Materska, M. (2001). Phenylalanine ammonia-lyase and antioxidant activities of lipophilic fraction of fresh pepper fruits *Capsicum annum* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(3), 189–192.

Sánchez-Peña, Y.A., Martínez-Avila, G.C.G, Sinagawa-García, S.R, Vázquez-Rodríguez, J. (2013). Moringa oleifera ; Importancia, Funcionalidad y Estudios Involucrados. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, (9), 25–30.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. & Murphy, A. 2015. Plant Physiology and development. Décimoquinta ed. Sinauer Associates, Inc.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Cevallos, L., & Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.

Vanisree, M.; Lee, C.Y.; Lo, S.F.; Nalawade, S.M.; Lin, C.Y. & Tsay, H.S. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45: 1-22.

