



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitador un extracto de hojas de *Moringa oleifera*

Ensaio de elicitación de suspensions celulares utilizando como elicitador un extracto de follas de *Moringa oleífera*

Elicitation test of cell suspensions using as elicitador an extract of *Moringa oleifera* leaves



Lucía Verde Yáñez

Julio, 2017

*Tutores Académico: Dra. Ángeles Bernal Pita da Veiga
Dra. Lorena Almagro Romero*

Facultad de Ciencias

TRABALLO FIN DE GRAO

Dña. María de los Angeles Bernal Pita da Veiga, autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao “Ensaio de elicitación de suspensions celulares empregando como elicitor un extracto de follas de *Moringa oleifera*”, presentado por Lucía Verde Yáñez para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña a 12 de Xullo del 2017.

Fdo.: Ángeles Bernal Pita da Veiga

Los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Grado han sido presentados en el Congreso de la SEBIOT 2017 que ha tenido lugar en el mes de Junio en Murcia.

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

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

Tipo de participación: póster

Congreso: Sebiot 2017

Lugar de celebración: Murcia

Fecha: 2017

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 <i>Moringa oleifera</i> L.	1
1.2 Cultivo <i>in vitro</i>	3
1.2.1. Suspensiones celulares.....	4
1.2.2. Elicitación.	5
1.3. Metabolismo secundario.	6
1.3.1. Compuestos fenólicos.	6
1.3.2. Capacidad antioxidante.	7
1.3.3. Métodos de medida de la capacidad antioxidante.....	7
2. OBJETIVOS.	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
3.1 Reactivos.	8
3.2 Material vegetal.....	8
3.3 Extracción de compuestos activos de <i>Moringa</i>	9
3.4 Cultivo <i>in vitro</i>	9
3.4.1. Medio de cultivo <i>in vitro</i>	9
3.4.2. Inducción y mantenimiento de callos.....	10
3.4.3. Inicio y mantenimiento de suspensiones celulares.....	10
3.4.4. Viabilidad.....	10
3.4.5. Filtración de las suspensiones celulares.	10
3.4.6. Preparación de suspensiones	11
3.5 Proceso de elicitación de suspensiones celulares.	11
3.6 Extracción y determinación del contenido en compuestos fenólicos de suspensiones celulares.....	12
3.6.1. Métodos de extracción:	12
❖ Extracción con metanol 80%.....	12
3.6.2. Determinación de contenido de fenoles totales:.....	12
❖ Recta de calibrado y método de Folin-Ciocalteu.....	12
3.7 Determinación de actividad antioxidante.....	12
3.7.1. Ensayo de DPPH.....	13
3.8. Análisis estadístico.....	13

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1 Determinación de la extracción de compuestos fenólicos.....	13
4.2 Determinación de la capacidad antioxidante con DPPH.....	16
5. CONCLUSIONES.....	20
5. CONCLUSIONS.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA.....	21

Resumen

En este trabajo de investigación se estudió el efecto de extractos de hojas de *Moringa* sobre la producción de compuestos fenólicos solubles en el medio extracelular de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* var. *annuum*. Asimismo, se analizó el efecto de estos extractos sobre la capacidad antioxidante de las suspensiones celulares. Los resultados indicaron que altas concentraciones del extracto metanólico de hojas de *Moringa* provocó un incremento significativo sobre la producción de fenoles solubles en el medio extracelular de las suspensiones celulares de *C. annuum*. Sin embargo, este incremento no se vió acompañado con un aumento en la actividad antioxidante. En este trabajo de investigación es la primera vez que se comprueba el efecto elicitor de extracto de *Moringa* sobre suspensiones celulares vegetales, y abre una prometedora puerta sobre el uso de extractos para incrementar la bioproducción de compuestos fenólicos.

Abstract

This research work focuses on the study of the effect of *Moringa* leaf extracts on the production of phenolic compounds that are soluble in the extracellular medium of cell suspensions of the plant *Capsicum annuum* var. *annuum*. Likewise, the effect of these extracts on the antioxidant capacity of the cell suspensions was analysed. The results show that high concentrations of the methanolic extract of *Moringa* leaves increased significantly the production of soluble phenols in the extracellular medium of *C. annuum* cell suspensions. However, this increase was not followed by an increase in the antioxidant activity. This research work was the first time that the effect that the *Moringa* extracts elicitor has over plant cell suspensions has been tested, and it opens a promising door on the use of extracts to increase the bioproduction of phenolic compounds.

Palabras clave

Actividad antioxidante, compuestos fenólicos, DPPH, elicitor, metabolitos secundarios, *Moringa oleifera* L.

Key words

Antioxidant activity, DPPH, elicitor, *Moringa oleifera* L., phenolic compounds, secondary metabolites.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Moringa oleifera* L.

El árbol de Moringa (*Moringa oleifera* L.) también llamado árbol de la vida, proviene de la familia Moringáceas, de origen Capparidales, el cuál comprende 13 especies. Son árboles de climas tropicales y subtropicales siendo la especie más popular *M. oleifera* L.

La *Moringa* es un árbol originario del Himalaya y se ha extendido a otras partes (Fig.1) como India, Bangladesh, Afganistán, Pakistán, Sri Lanka, sudeste asiático, Asia Occidental, Península Arábiga, Caribe, Centroamérica y gran parte de América del Sur. Se cree que fue llevada de la India a África por los ingleses e introducida al Caribe por los franceses y de allí a Centroamérica (1).



Fig. 1. - Distribución mundial de *Moringa oleifera* L. El color verde representa la zona de distribución de la especie. Fuente:

http://www.treesforlife.org/sites/default/files/images/Moringa_worldmap.jpg

Taxonomía:

Reino: Plantae

Orden: Brassicales

Familia: Moringaceae

Género: *Moringa*

Especie: *oleifera*

Partes útiles: Semillas, raíz, tallo, hoja, flor, y fruto (Fig. 3).

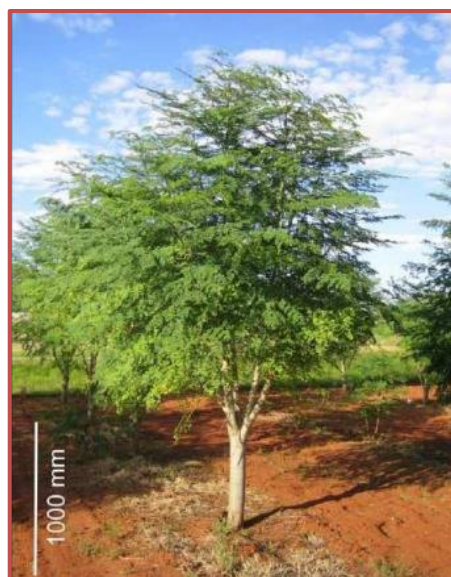


Fig. 2. - Árbol de Moringa (*Moringa oleifera* L.)
Fuente: http://oa.upm.es/23094/1/PFCARIAS_SABIN.pdf

M. oleifera L. es un árbol perenne de tamaño pequeño y crecimiento acelerado que usualmente alcanza entre 10 a 12 m de alto (2). Su duración es aproximadamente 20 años de vida, aunque se han obtenido variedades en la India que son anuales. Aporta una elevada cantidad de nutrientes al suelo, además de protegerlo de factores externos como la erosión, la desecación y las altas temperaturas (3).

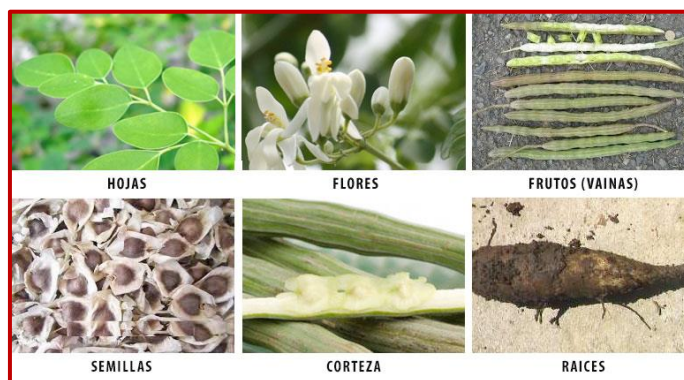


Fig. 3. - Partes de la planta *M. oleifera* L. Fuente: <http://xn--tierra-islea-khb.com/la-moringa-fuente-desconocida-de-salud/>

Todas las partes de la *Moringa* tienen atribuidas propiedades medicinales. De hecho, estudios *in vitro* o *ex vivo* con animales, demostraron que el uso de *Moringa* o sus extractos aumenta los niveles de determinados biomarcadores, antioxidantes y enzimas de detoxificación. Además, *M. oleifera* también es una fuente de hormonas promotoras del crecimiento vegetal, obtenidas a partir de extracto de hojas y tallos jóvenes. El principio activo es la zeatina, una hormona vegetal del grupo de las citoquininas. Además cabe destacar que las hojas de *Moringa*, incorporadas directamente al suelo, previenen del ataque de ciertas plagas como *Pythium debaryanum* (4).

Por otra parte, las hojas de esta especie presentan un elevado contenido de vitaminas, provitaminas y minerales. Además, se ha demostrado que contienen todos los aminoácidos esenciales para la vida, incluyendo algunos como la arginina y la histidina, que se encuentran generalmente en proteínas de origen animal y que son muy importantes para el desarrollo de los niños (1). También, es importante destacar la elevada capacidad antioxidante que muestran las hojas (5). Esta característica hace que *M. oleifera* sea especialmente interesante como complemento en la dieta, dado su poder protector frente a los radicales libres neutralizándolos antes de que provoquen daño celular y enfermedades (6).

M. oleifera también puede ser utilizada para el control de diversas infecciones provocadas por microorganismos y en los últimos años se han obtenido resultados que confirman su actividad antimicrobiana. De hecho, se ha podido observar que diferentes partes de la planta inhibe el crecimiento de

microorganismos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (7).

Debido a las múltiples aplicaciones de *M. oleifera* cuyo interés es el resultado de una rápida y efectiva distribución geográfica, este árbol recibe el nombre de “el árbol milagroso”.

En la Figura 4 se pueden observar las diversas aplicaciones de esta planta, en la cual, cualquier órgano o tejido puede ser utilizado para diferentes fines: medicinal, industrial, agrícola, alimentación, fungicida, fertilizante, etc.

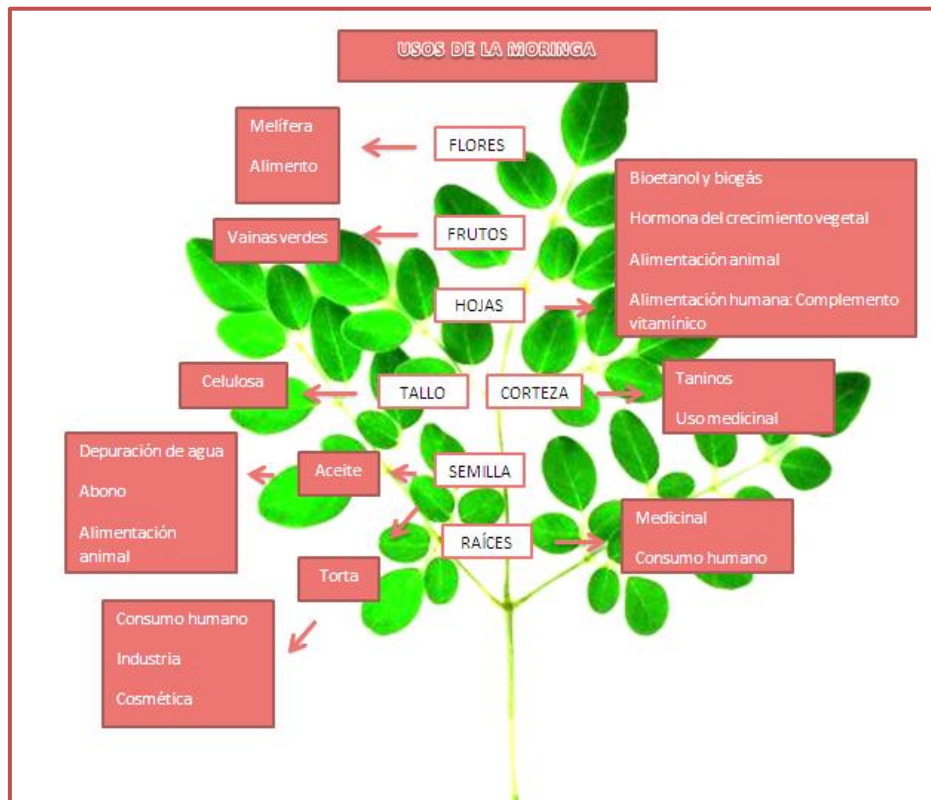


Fig. 4. -Usos de las diferentes partes de Moringa.

1.2 Cultivo *in vitro*

La técnica de cultivo *in vitro* se define como el cultivo en condiciones estériles, de plantas, semillas, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores (8). El cultivo *in vitro* vegetal aprovecha la capacidad totipotente de las células puesto que a partir de una única célula es posible de reproducir un individuo completo.

Esta técnica consiste básicamente en el cultivo de pequeños fragmentos de tejidos y órganos en condiciones asépticas empleando un medio de cultivo determinado y bajo unas condiciones ambientales controladas las cuales permiten el crecimiento y multiplicación celular de los vegetales. Estas

condiciones incluyen un suplemento de nutrientes y de hormonas, un pH determinado, temperatura adecuada y atmósfera apropiada (9).

Los objetivos de la técnica de cultivo *in vitro* son numerosos y diferentes, algunos de ellos son: estudios básicos de fisiología, genética y bioquímica, bioconservación y producción de compuestos útiles, incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógeno, propagación de plantas y conservación e intercambio de germoplasma (9).

1.2.1. Suspensiones celulares

El método de cultivo *in vitro* que vamos a emplear como herramienta son las suspensiones celulares, que consiste en un cultivo estéril en medio líquido iniciado bajo condiciones asépticas a partir de fragmentos de callos friables. Los callos, como ya se ha mencionado anteriormente, se inician a partir de fragmentos esterilizados de la planta, que se inducen en placas con medio sólido suplementado con hormonas (9).

La aplicación de las técnicas del cultivo de tejidos como el establecimiento de suspensiones celulares, tiene la ventaja de producir compuestos bajo condiciones controladas puesto que las células pueden multiplicarse fácilmente y producir metabolitos secundarios específicos (10).

En general, la preparación de las suspensiones celulares se basa en el empleo de frascos Erlenmeyer, en los cuales se deposita el medio líquido con los trozos de callo dispersos en él, hasta llenar aproximadamente 1/5 de la capacidad de los frascos; estos matraces son incubados en un agitador bajo condiciones controladas.

Durante los primeros subcultivos es recomendable usar una tasa de dilución baja utilizando cuatro partes de medio fresco por cada parte de suspensión celular. Posteriormente se puede utilizar una tasa de dilución más alta, según el objetivo para el cual se haya establecido la suspensión.

El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es sin duda un callo friable, con un alto ritmo de división celular. Sin embargo, a veces es necesario utilizar otros tipos de callos, y en esos casos hay que realizar tratamientos enzimáticos para romper los agregados que se forman durante el proceso. En su inicio, las suspensiones celulares constan de grandes agregaciones y de células libres, alargadas y enormes, que no se dividen. Sin embargo, después de repetir los subcultivos es factible obtener una suspensión celular finalmente dispersa con alto ritmo de crecimiento. Estas suspensiones poseen pequeños agregados de células pequeñas, isodiamétricas, con paredes finas y citoplasma denso (11).

Las principales ventajas de las suspensiones celulares están relacionadas con el rápido crecimiento celular, transformación genética, alta expresión de

proteínas y bajo contenido en fenoles (9). Adicionalmente las suspensiones celulares, permiten un manejo similar al que se realiza con microorganismos, una rápida multiplicación celular y es posible realizar el escalado utilizando biorreactores (12).

Las suspensiones celulares vegetales han sido utilizadas para estudios sobre el ciclo celular, estudios fisiológicos y bioquímicos, producción de metabolitos secundarios y embriogénesis somática (11).

Hay que tener en cuenta, que previamente a establecer una suspensión celular hay que conseguir la estabilidad genética de la línea celular, para ello es necesario analizar diferentes líneas de callos, eligiendo el más adecuado en función del medio de cultivo y la productividad (9).

1.2.2. Elicitación

La elicitación es uno de los métodos más efectivos establecidos en procesos a gran escala para inducir la expresión de genes asociados con enzimas responsables de la síntesis de metabolitos secundarios como mecanismo de defensa contra el ataque de patógenos o daños en plantas (12).

El término «elicitador» se utiliza comúnmente para denominar los factores físicos y químicos que son responsables de las respuestas fisiológicas o morfológicas de las plantas. Según su origen y estructura molecular han sido clasificados como físicos o químicos, abióticos o bióticos y dentro de este grupo como elicitors de composición química compleja o definida (12). Por lo tanto, los elicitors son moléculas de bajo peso molecular capaces de inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios en un sistema celular vivo.

Entre los elicitors físicos están el déficit hídrico, la salinidad, temperaturas extremas, excesiva o insuficiente radiación luminosa, anaerobiosis por encharcamiento o inundación, factores mecánicos como el viento o la compactación del suelo y las lesiones. Los químicos incluyen el estrés iónico (por salinidad), el estrés nutricional, la presencia de contaminantes inorgánicos (dióxido de silicio, ozono o metales pesados) u orgánicos (clorofluorocarbonados, bifenilospoliclorados o hidrocarburos aromáticos policíclicos). El estrés abiótico es el más común y generalmente, se produce una combinación de varios de ellos (12).

Entre los elicitors utilizados con mayor frecuencia sobre suspensiones celulares vegetales destaca el jasmonato de metilo, oligosacáridos y extractos de hongos u otros microorganismos (12).

1.3. Metabolismo secundario

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios. Muchos de estos compuestos contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides (13).

1.3.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles incluyen un amplio rango de sustancias vegetales que poseen un anillo aromático que contiene uno o más sustituyentes hidroxilo. Los compuestos fenólicos vegetales son considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 10.000 compuestos individuales. Algunos son solubles en agua ya que se encuentran combinados con azúcares en forma de glucósidos, y normalmente están localizados en la vacuola. Otros solamente son solubles en solventes orgánicos, y otros son polímeros grandes e insolubles (14).

Su principal función en las células vegetales es la de actuar como metabolitos protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa (15). Otra de las funciones, es su capacidad antioxidante frente a los radicales libres generados por el metabolismo. En el metabolismo de todas las plantas se forman radicales libres como son las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las cuales, los átomos de oxígeno presentan diferentes grados de excitación electrónica. Entre las ROS se encuentran los radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroxiperoxil (HO_2^-) o el hidroxilo (OH^-). Todas estas moléculas se producen en diferentes compartimentos celulares, como cloroplastos, mitocondrias, pared celular, fracción microsomal o peroxisomas. Ante un incremento de los radicales libres en la célula, para evitar daños en la misma, los vegetales sintetizan otro tipo de compuestos que actúan como antioxidantes para restaurar el equilibrio fisiológico (16).

Por lo tanto, los antioxidantes son sustancias capaces de retardar o prevenir la formación de radicales libres. Las plantas contienen compuestos antioxidantes como los carotenoides, tocoferoles, ascorbatos y fenoles que pueden atenuar el daño oxidativo; ya sea de manera indirecta, al activar las defensas celulares, o directa, al eliminar los radicales libres (1).

1.3.2. Capacidad antioxidante

Un antioxidante se define como una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química (Fig. 5) de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres provocando daños en a las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones eliminando partes intermedias del radical libre e inhibiendo otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos.

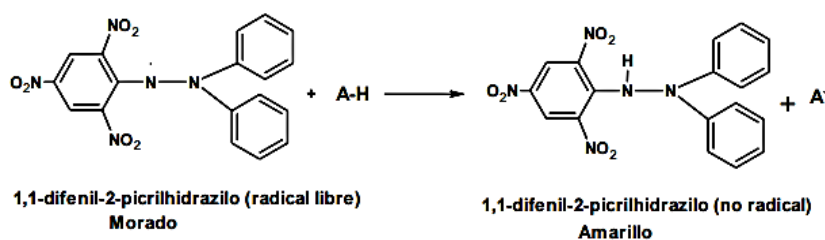


Fig. 5. - Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al., 2012)

1.3.3. Métodos de medida de la capacidad antioxidante

Existen diversos métodos que se usan para evaluar la capacidad antioxidante de muestras biológicas. La medida de la actividad antioxidante se basa en el efecto de una muestra sobre un radical libre determinado generándose cambios que pueden ser detectados instrumentalmente. En general los métodos de determinación deben tener un mecanismo de acción claramente establecido, deben ser sencillos, reproducibles y reaccionar con sustancias de naturaleza lipofílica e hidrofílica. Esta determinación puede ser directa o indirecta, en función de la estrategia utilizada (17). El cambio de color es monitorizado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.

En este TFG, se ha decidido utilizar el método DPPH dada su sencillez, reproducibilidad y estabilidad. En el ensayo del DPPH, la actividad antioxidante se determina por el descenso de la absorbancia a 515nm de una solución metanólica de radical 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia del extracto a estudiar, usando la solución de radical DPPH como blanco. La pérdida de color es proporcional al grado de captura del radical DPPH, y nos da una medida de la eficiencia antioxidante de los extractos (14).

Para determinar la capacidad antioxidante, los valores se tienen que expresar siempre en comparación a un compuesto patrón. El Trolox (Fig. 6) es un antioxidante análogo hidrosoluble a la vitamina E. En virtud de su alta solubilidad en agua y su amplia disponibilidad comercial, el Trolox es universalmente empleado como estándar en las curvas de comparación de diversos ensayos de actividad antioxidante.

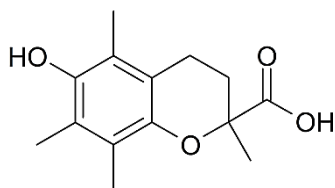


Fig. 6. - Molécula de Trolox.

2. OBJETIVOS

En este trabajo de investigación se estudia la capacidad elicitora de un extracto metanólico de hojas de *M. oleifera* sobre suspensiones celulares de *Capsicum annuum* var. *annuum*. El objetivo global de este trabajo se desglosa en tres objetivos concretos:

1. Puesta a punto de un método de elicitación de suspensiones celulares de *C. annuum* var *annuum* con diferentes concentraciones de extractos metanólicos obtenidos a partir de hojas de *Moringa*.
2. Cuantificación de fenoles solubles presentes en los medios extracelulares de suspensiones celulares elicidadas de *C. annuum* con extractos metanólicos obtenidos de hojas de *Moringa*.
3. Análisis de la capacidad antioxidante de los medios extracelulares de suspensiones celulares elicidadas de *C. annuum* con extractos metanólicos obtenidos de hojas de *Moringa*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Los reactivos empleados tanto para la preparación de medios de cultivo *in vitro* como para las determinación de estudios de fenoles y actividad antioxidante fueron de la marca Sigma-Aldrich.

3.2 Material vegetal

Las hojas de *M. oleifera* L. con las que se ha realizado el presente trabajo, se han obtenido partir de una plantación de *Moringa* existente en el invernadero de la Facultad de Ciencias en el año 2016.

Las semillas procedentes de la empresa Vitalmor (Bilbao) se sembraron en una bandeja de perlita:vermiculita en proporción 1:1 en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias. Pasados 7-9 días, las plántulas emergen y se toma ese día como momento 0.

Aproximadamente 2 meses después, se trasladaron al invernadero de la Facultad, en dónde se mantuvieron durante el verano de 2016. Las plantas se regaron con una solución nutritiva 2 veces a la semana, llegando al alcanzar el estado floral.

Para realizar este TFG, las hojas se recogieron en el mes de septiembre del 2016, procediéndose inmediatamente a su secado en una estufa a 70° durante 3 días. Una vez secas, se guardaron en bolsas hasta su posterior uso.

3.3 Extracción de compuestos bioactivos de *Moringa*

La extracción de los compuestos bioactivos presentes en las hojas secas de *Moringa* se realizó triturando estas hojas con un molinillo hasta obtener un polvo fino de hoja de *Moringa*.

Una vez obtenida la muestra de las hojas de *Moringa*, se mezclaron 200 mg de polvo con 50 ml de metanol (80%) y se pusieron en agitación durante 3 horas. Posteriormente se filtró la solución con una tela de nylon y se evaporó el disolvente utilizando un rotavapor. El extracto se resuspendió en 1 ml de etanol (70%). Por último, llevamos a cabo una filtración en la cabina de flujo laminar con unos filtros de 22 µm de diámetro de poro, obteniéndose un extracto final de 200 mg de polvo en 1 ml de etanol (70%).

3.4 Cultivo *in vitro*

3.4.1. Medio de cultivo *in vitro*

Las suspensiones celulares de *C. annuum* fueron mantenidas en un medio de cultivo líquido basado en las sales de Murashige e Skoog suplementado con hormonas vegetales. La composición y concentraciones del medio de cultivo se indican en la siguiente tabla (Tabla 1).

TIPO DE CULTIVO	PRODUCTOS	CONCENTRACIONES
Suspensiones celulares	Sales Murashige e Skoog	4,3 g/l
	Sacarosa	30 g/l
	Caseína	0,25 g/l
	2,4 D	3 mg/l
	Kinetina	0,05 mg/l
	Vitaminas de Morel	1 ml
Cultivo de callos	Sales Murashige e Skoog	4,3 g/l
	Sacarosa	30 g/l
	Caseína	0,25 g/l
	2,4 D	3 mg/l
	Kinetina	0,05 mg/l
	Vitaminas de Morel	1 ml
	Agar	8 g

Tabla 1. - Composición y concentraciones empleadas en los medios de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se deposita 500ml de agua destilada sobre un matraz de 1l. A continuación se colocó el matraz en un agitador magnético para disolver todos los compuestos del medio y se ajustó el pH a 5,8

mediante la adición de HCl o NaOH. El medio de cultivo se enrasó a 1l y se autoclavó durante 20 min a 121°C.

3.4.2. Inducción y mantenimiento de callos

Los callos de *C. annum* var. *annuum* se obtuvieron en el año 2015 a partir de hipocotilos de esta variedad de pimiento. Los callos, se subcultivan cada tres semanas con el fin de mantener esta línea celular. Para ello, porciones de callos friables se transfirieron a un medio de cultivo de tipo Murashige y Skoog suplementados con ácido 2,4 diclorofenoxiacético y quinetina (3mg/l y 0,05mg/l respectivamente) manteniéndose en oscuridad a 25°C.

3.4.3. Inicio y mantenimiento de suspensiones celulares

Las suspensiones celulares se iniciaron mediante la transferencia de porciones de callo friable de 10 g en matraces de 250 ml de capacidad, que contenían 100 ml de medio de cultivo anteriormente descrito. Las suspensiones se mantuvieron en agitación a 115 rpm en oscuridad y se subcultivaron cada 15-18 días.

3.4.4. Viabilidad

Para determinar la viabilidad de una suspensión celular se utiliza el método del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio. Para la realización del proceso, en primer lugar, se preparó una disolución de cloruro de tetrazolio en agua en una proporción entre 0,5 y 3%. A continuación, se incubaron 1ml de las suspensiones celulares y 1ml de la disolución de cloruro de tetrazolio durante 30 min para comprobar la viabilidad celular. Este compuesto capta electrones de la cadena de transporte electrónico y se reduce a formazano que es insoluble y de color rojo. Por lo tanto, aquellas muestras que adquieran el color rojo serán aquellas que presenten una elevada densidad de células vivas y funcionales.

3.4.5. Filtración de las suspensiones celulares

Las suspensiones celulares se filtraron en la cabina de flujo laminar utilizando una tela de nylon. Para realizar la filtración de las suspensiones es necesario que el material que se vaya a utilizar en el proceso se encuentre previamente en el interior de la cabina de flujo laminar. Este material consta de un colador, filtro, matraces con los medios de cultivo estéril, mechero, pinzas, puntas p1000, tijeras, placas Petri y cucharillas estériles. Una vez filtradas las suspensiones celulares, las células se mantuvieron en el interior de la cabina de flujo laminar para iniciar las suspensiones.

3.4.6. Preparación de suspensiones celulares destinadas a la elicitación

Las suspensiones celulares se iniciaron introduciendo 4 g de peso fresco de células en matraces de 100 ml de capacidad que contenían 40 ml del medio de cultivo líquido descrito anteriormente. Estas suspensiones celulares fueron incubadas en un agitador durante 24h con el fin de eliminar el estrés ocasionado por la manipulación.

3.5 Proceso de elicitación de suspensiones celulares

El proceso de elicitación, consiste en añadir el extracto metanólico de hoja de *Moringa* (elicitor) a las suspensiones celulares (Fig. 7), con el objetivo de incrementar la producción de metabolitos secundarios. Para ello, se preparó un control y diferentes concentraciones de extracto, realizando un total de tres réplicas por concentración, incluyendo al control, tal y como se puede observar en la Tabla 2.

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

Tabla 2- Representación de las distintas concentraciones de extracto metanólico de *Moringa* expresado en mg/ml.

Para la elaboración de las diferentes concentraciones, se empleó el extracto puro de *M. oleífera* previamente obtenido. Teniendo en consideración que la concentración inicial del extracto metanólico fue de 200 mg/ml, se añadieron 5 µl del extracto en las 3 réplicas de concentración menor, 50 µl en las de concentración media y 150 µl en las de concentración mayor, realizando todo este proceso en la cámara de flujo laminar y con material estéril. A los controles no se les añadió elicitor. Una vez las suspensiones celulares de *C. annuum* fueron elicidadas, estas se incubaron durante 72 horas en un agitador orbital en oscuridad a 25°C.

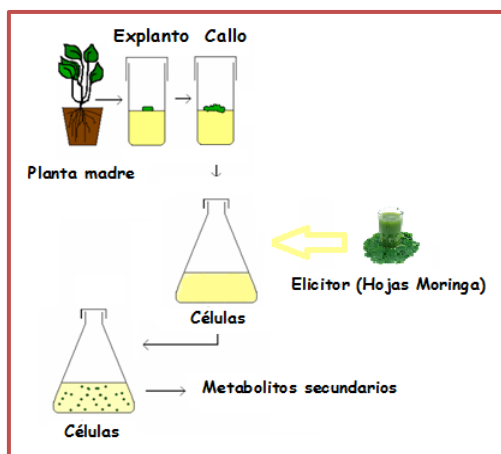


Fig. 7. -Proceso de elicitación

Durante el tiempo de elicitación se tomaron muestras periódicamente (1, 6 y 72 horas) para realizar los análisis de componentes fenólicos y actividad antioxidante.

El procedimiento de recogida de muestras se realizó con una micropipeta de 1000 μl , cogiendo 1 ml de muestra de cada matraz en los tiempos indicados. Las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 10 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 1300 rpm. A continuación, se recogieron los sobrenadante y se congelaron en eppendorf a -80°C hasta su posterior análisis.

3.6. Extracción y determinación del contenido en compuestos fenólicos de suspensiones celulares

3.6.1. Métodos de extracción:

❖ Extracción con metanol al 80%

Hemos utilizado el método modificado de Díaz *et al.* (18) en el cual se realiza una extracción 1:1 (p/v) en metanol al 80%, seguido de una incubación a 70°C de temperatura durante 30 minutos.

3.6.2. Determinación de contenido de fenoles totales

❖ Recta de calibrado y método de Folin-Ciocalteu

Para medir el contenido de fenoles totales usamos el reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método de Slinkard & Singleton (19) y modificado por Kraujalyte *et al.* (20).

En primer lugar, mezclamos 100 μl de muestra con 1000 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu que se encuentra diluido 10 veces y a continuación agitamos. La muestra fue diluida hasta llegar a un volumen final de muestra de 100 μl . Transcurridos 4 minutos de incubación, se le añadió a cada tubo 1 ml de Na_2CO_3 al 7% y 400 μl de agua destilada (obteniendo un total de 1500 μl), se agitó y se incubó 90 minutos en oscuridad.

Seguidamente, se realizaron las lecturas de la absorbancia a 725 nm mediante un espectrofotómetro. Para la recta de calibrado utilizamos disoluciones de ácido gálico (de 0 mg/ml hasta 0,2 mg/ml). Los resultados se expresan en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por ml de extracto (mg GAE/ml) y por mg de peso fresco (PF) de muestra (mg GAE/g PF).

3.7. Determinación de actividad antioxidante

3.7.1. Ensayo de DPPH

La actividad antioxidante se determinó por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica del radical difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de los medio de cultivo de las suspensiones celulares elicidadas, usando la solución del radical DPPH como blanco según la técnica descrita por Thaipong *et al.* (21). La pérdida del color es proporcional al grado de captura del radical DPPH oxidado, y nos indica una medida de la eficiencia antioxidante de los extractos. Los valores fueron expresados en base a una recta de calibrado realizada con Trolox. Para las medidas de DPPH se preparó una disolución madre de DPPH a una concentración de 1mM (40 mg de DPPH en 100 ml de metanol absoluto). Esta disolución madre se diluyó en metanol hasta alcanzar valores de absorbancia cercanos a 0,800 y en cada uno de los casos se hicieron reaccionar 50 μ l del estándar antioxidante con 950 μ l de DPPH.

❖ Recta de calibrado Trolox

Para realizar la recta patrón de Trolox, preparamos una disolución madre de Trolox de 1 mM en etanol puro y a partir de ella preparamos disoluciones a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50 y 100 μ M). En este caso se midió la absorbancia de las muestras después de 3 minutos de incubación.

3.8. Análisis estadístico

Para el estudio de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos, los ensayos se realizan por triplicado. Los datos se expresaron con un análisis de la desviación estándar. La regresión lineal se llevó a cabo mediante el programa Microsoft Excel 2010.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la extracción de compuestos fenólicos

En primer lugar, para poder determinar el contenido en compuestos fenólicos totales es necesario realizar una recta patrón, que nos servirá para obtener las concentraciones con nuestras muestras. El patrón externo utilizado para hacer la recta de calibrado fue el ácido gálico.

Los datos obtenidos de las medidas de ácido gálico son representados en la figura 8.

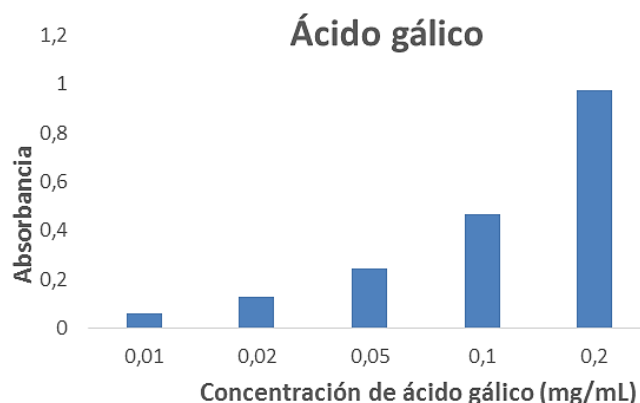


Fig.8. - Absorbancia de las muestras de ácido gálico a diferentes concentraciones (mg/ml)

Una vez obtenido los valores de absorbancia de cada concentración de ácido gálico se obtuvo la correspondiente recta de calibrado, que nos sirvió para evaluar la presencia de compuestos fenólicos en nuestras muestras.

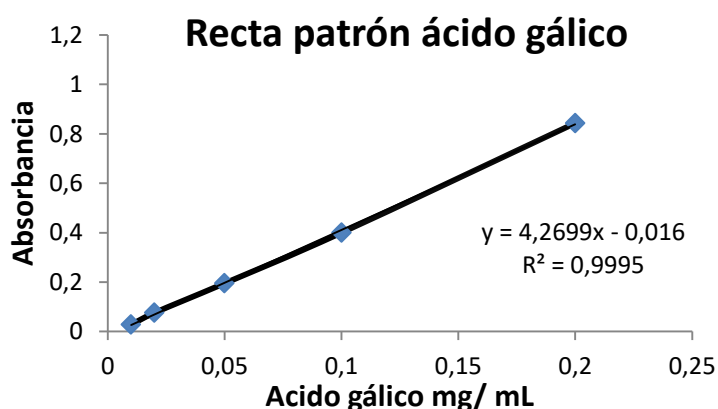


Fig. 9. – Recta de calibrado comparando la absorbancia de las diferentes concentraciones de ácido gálico en mg/ml.

La gráfica de la recta patrón del ácido gálico (Fig. 9) nos permite obtener una ecuación ($y = 4,2699x - 0,016$), la cual, se emplea para cuantificar las concentraciones de las muestras medidas a partir de los datos de la absorbancia. A continuación, se muestran las gráficas realizadas a partir de los datos obtenidos de las medidas de los fenoles totales a diferentes horas, con sus correspondientes análisis estadísticos (Figs. 10,11 y 12). Para el ensayo se han realizado las medidas en los siguientes puntos de elicitación: 1, 6 y 72 horas.

GRÁFICOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

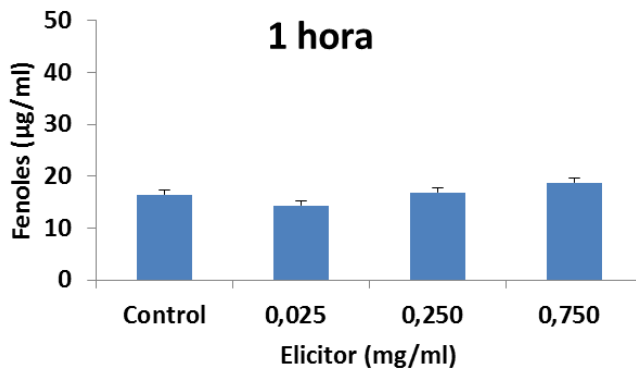


Fig.10. -Efecto de las distintas concentraciones del elicitor (hoja de *Moringa*) en mg/ml frente a las concentraciones de los fenoles en µg/ml, medido 1 hora después del tratamiento

Fig.11. -Efecto de las distintas concentraciones del elicitor (hoja de *Moringa*) en mg/ml frente a las concentraciones de los fenoles en µg/ml, medido 6 horas después del tratamiento.

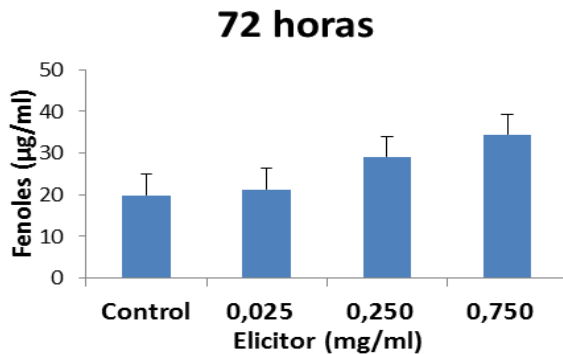
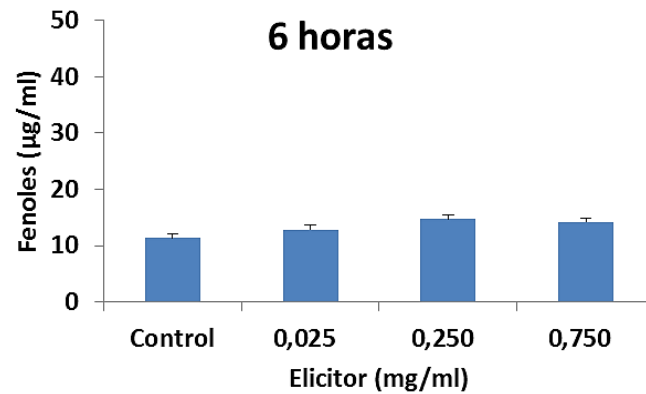


Fig.12. -Efecto de las distintas concentraciones del elicitor (hoja de *Moringa*) en mg/ml frente a las concentraciones de los fenoles en µg/ml, medido 72 horas después del tratamiento.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Ensayo: 1 hora	
Test de normalidad Shapiro-Wilk	<i>p</i> -valor=0.8325
Test de Bartlett (Prueba de la homogeneidad de las varianzas)	<i>p</i> -valor=0.4416
Test de Fligner-Killeen (Prueba de la homogeneidad de las varianzas)	<i>p</i> -valor=0.8271
ANOVA (Análisis de la varianza)	<i>p</i> -valor=0.0143

Tabla.3. - Resultados de las distintas pruebas estadísticas correspondientes al ensayo de compuestos fenólicos de las muestras recogidas 1 hora después del proceso de elicitación.

Ensayo: 6 horas	
Test de normalidad Shapiro-Wilk	<i>p</i> -valor=0.7727
Test de Bartlett (Prueba de la homogeneidad de las varianzas)	<i>p</i> -valor=0.5468
Test de Fligner-Killeen (Prueba de homogeneidad de las varianzas)	<i>p</i> -valor=0.6567
ANOVA (Análisis de la varianza)	<i>p</i> -valor=0.0331

Tabla.4. - Resultados de las distintas pruebas estadísticas correspondientes al ensayo de compuestos fenólicos de las muestras recogidas 6 horas después del proceso de elicitación

Ensayo: 72 horas	
Test de normalidad Shapiro-Wilk	<i>p</i> -valor=0.5939
Test de Bartlett (Prueba de la homogeneidad de las varianzas)	<i>p</i> -valor=0.3038
Test de Fligner-Killeen (Prueba de homogeneidad de las varianzas)	<i>p</i> -valor=0.6674
ANOVA (Análisis de la varianza)	<i>p</i> -valor=0.102

Tabla.5. - Resultados de las distintas pruebas estadísticas correspondientes al ensayo de compuestos fenólicos de las muestras recogidas 72 horas después del proceso de elicitación.

Como se observa en las figuras 10, 11 y 12, la presencia del extracto de *Moringa* en suspensiones celulares de *C. annum* provocó un ligero aumento de la concentración de fenoles transcurridas 1 y 6 horas de tratamiento mientras que a las 72 horas de elicitación se detectó un incremento significativo de estos compuestos. Además, también se observó un aumento en la concentración de fenoles conforme incrementó la concentración del extracto de *Moringa*. Por lo tanto, se observa que a medida que va pasando el tiempo desde que se añadió el extracto de hoja de *Moringa* a las suspensiones celulares hasta las observaciones realizadas (1, 6 y 72 horas), hay un incremento progresivo en la concentración de los compuestos fenólicos,

observándose los resultados más evidentes en la última gráfica correspondiente a las 72 horas de elicitación.

Se han realizado cuatros pruebas estadísticas que se basan en la obtención de p -valores para comprobar si nuestros resultados son significativos o no. Si en el Test de Shapiro-Wilk, Bartlett y Fligner-killeen el p -valor es mayor que 0,05 y en la ANOVA el p -valor es inferior a 0,05, nuestros resultados finales serán significativos.

Hay 4 análisis estadísticos que se hacen para obtener una valoración global. De estos 4 análisis, los más relevantes son el Test de Shapiro-Wilk y de la homogeneidad de las varianzas. En estas pruebas se observa que en los ensayos realizados a 1, 6 y 72 horas, los resultados son significativos.

En resumen, podemos concluir que tanto estadísticamente como gráficamente, los resultados obtenidos son significativos. Por lo tanto, los extractos de *Moringa* activan las respuestas de defensa vegetal en suspensiones celulares de pimiento que se ve reflejado en un incremento de compuestos fenólicos.

Nuestros resultados están de acuerdo con aquellos encontrados por Belchí-Navarro y Miras-Moreno (22) quienes observaron que la adicción de elicitors de naturaleza biótica a suspensiones celulares de *Vitis vinifera* y *Daucus carota* incrementaron la producción extracelular de compuestos fenólicos. Estos compuestos fenólicos son producidos por elicitors de diferente naturaleza indicando que estos compuestos están implicados en la respuesta de defensa frente a diferentes tipos de estreses.

Es importante destacar que en otro ensayo donde se utilizó como elicitor un extracto metanólico obtenido de la raíz de *M. oleifera* sobre suspensiones celulares de *C. annuum* se observó un incremento significativo de la producción de compuestos fenólicos a las 48 h (23).

4.2 Determinación de la capacidad antioxidante con DPPH

En primer lugar, para poder determinar la capacidad antioxidante es necesario realizar una recta patrón, que nos servirá para obtener la concentración en equivalentes de las muestras evaluadas. La recta de calibrado empleada en este ensayo se obtuvo con el patrón externo Trolox (Fig. 13).

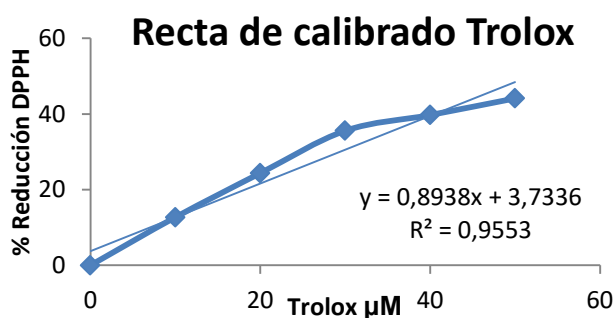
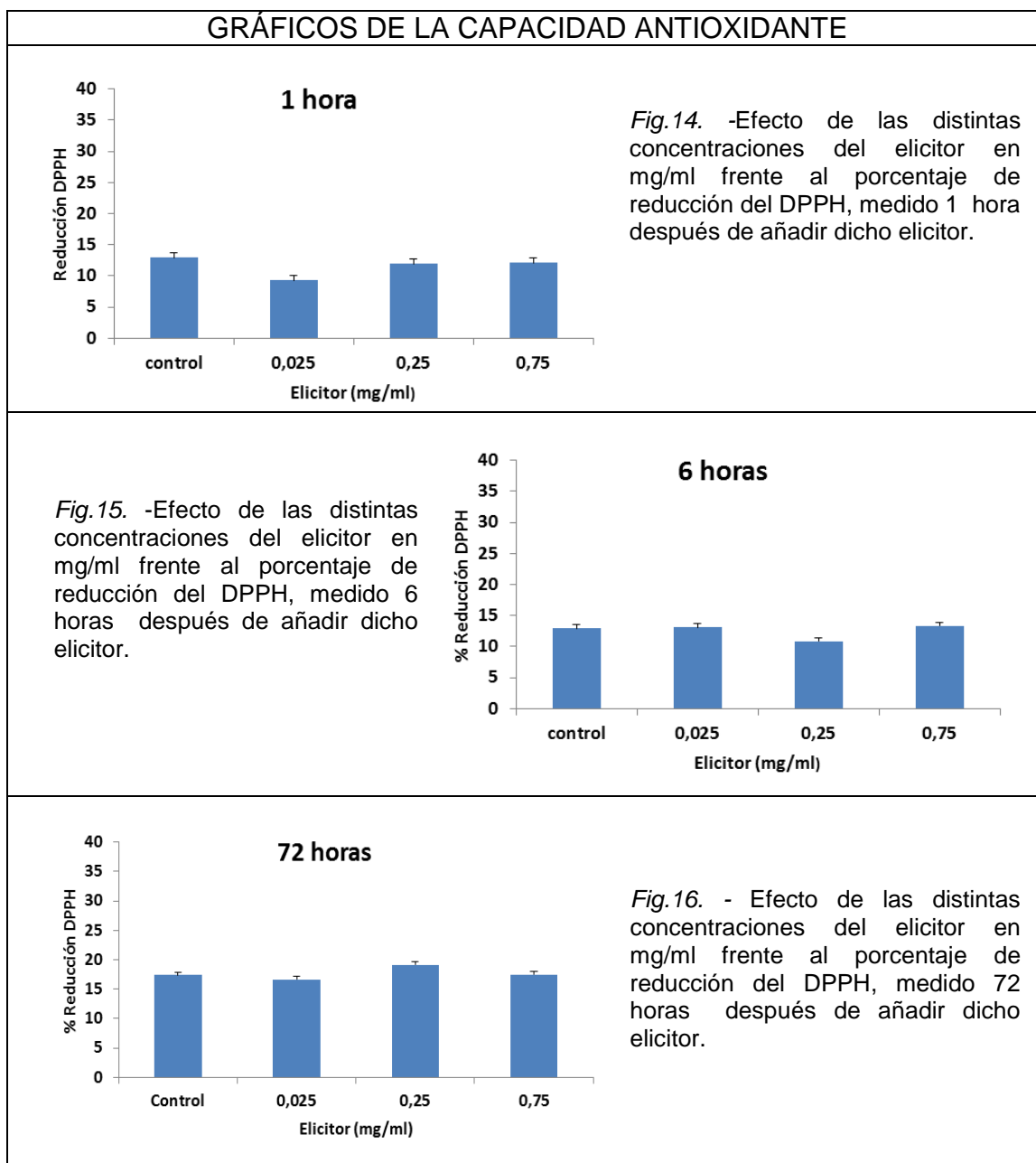


Fig. 13. – Recta de calibrado comparando el porcentaje de reducción en las diferentes concentraciones de Trolox.

La gráfica de la recta patrón del Trolox (Fig. 13) nos permite obtener una ecuación ($y = 0,8938x + 3,7336$) a partir de la cual se obtuvo la capacidad antioxidante de las muestras expresada en unidades de Trolox.

En este ensayo se ha determinado la capacidad antioxidante tras 1, 6 y 72 horas de elicitación en el medio extracelular de las suspensiones celulares de *C. annuum* tratadas con diferentes concentraciones del extracto de hoja de *Moringa*.



PRUEBAS ESTADÍSTICAS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Ensayo: 1 hora	
Test de normalidad Shapiro-Wilk	p -valor=0.0085
Test de Bartlett (Prueba de la homogeneidad de las varianzas)	p -valor=0.1143
Test de Fligner-Killeen (Prueba de homogeneidad de las varianzas)	p -valor=0.8233
ANOVA (Análisis de la varianza)	p -valor=0.3649

Tabla.6. - Resultados de las distintas pruebas estadísticas correspondientes al ensayo de la capacidad antioxidante de las muestras recogidas 1 hora después del proceso de elicitación.

Ensayo: 6 horas	
Test de normalidad Shapiro-Wilk	p -valor=0.4156
Test de Bartlett (Prueba de la homogeneidad de las varianzas)	p -valor=0.2246
Test de Fligner-Killeen (Prueba de homogeneidad de las varianzas)	p -valor=0.5810
ANOVA (Análisis de la varianza)	p -valor=0.9545

Tabla.7. - Resultados de las distintas pruebas estadísticas correspondientes al ensayo de la capacidad antioxidante de las muestras recogidas 6 horas después del proceso de elicitación.

Ensayo: 72 horas	
Test de normalidad Shapiro-Wilk	p -valor= $1.509e^{-06}$
Test de Bartlett (Prueba de la homogeneidad de las varianzas)	p -valor= $6.72e^{-11}$
Test de Fligner-Killeen (Prueba de homogeneidad de las varianzas)	p -valor=0.5312
ANOVA (Análisis de la varianza)	p -valor=0.6883

Tabla.8. - Resultados de las distintas pruebas estadísticas correspondientes al ensayo de la capacidad antioxidante de las muestras recogidas 72 horas después del proceso de elicitación.

En las gráficas correspondientes al ensayo de la capacidad antioxidante, según el porcentaje de reducción de DPPH, no se observó un aumento progresivo o significativo en el % de reducción del DPPH, sino que los niveles dependieron de la concentración del elicitor y el tiempo estudiado.

A diferencia del ensayo de compuestos fenólicos, todas las medidas que se han realizado a distintas horas, resultaron no significativas. Por lo que se puede

deducir que no existe un aumento de la capacidad antioxidante en las suspensiones celulares que contienen extracto de hoja de *Moringa*.

Estadísticamente, en esta prueba, comparado con el análisis estadístico de los compuestos fenólicos, se observa que los resultados obtenidos en los ensayos realizados a 1, 6 y 72 horas, no son significativos (apoyando lo que se observa gráficamente) pues los valores obtenidos en los test, no cumplen las pautas establecidas anteriormente.

Los resultados obtenidos indican que el extracto metanólico de hoja de *Moringa* incrementa la producción de compuestos fenólicos. En este estudio de investigación se ha realizado un método de extracción con metanol al 80%, seguido de una incubación a 70°C de temperatura durante 30 minutos. Pero existen otros métodos de extracción en los que se podrían obtener diferentes resultados, como por ejemplo con el acetonitrilo al 70% con ácido acético al 4% (16). Sin embargo, a pesar del incremento en el contenido de compuestos fenólicos no se observó un incremento de la capacidad antioxidante. Esto podría deberse al hecho de que necesitamos un método de detección de la capacidad antioxidante más sensible al DPPH porque el incremento sea pequeño y no se pueda detectar con un método espectrofotométrico.

Además, a diferencia de estos resultados, los metabolitos presentes en el extracto de raíz de *Moringa* si provocaron un incremento de la actividad antioxidante (23). Las diferencias observadas en ambos estudios sugieren que la raíz de *Moringa* produce determinados metabolitos que no son producidos por las hojas o en concentraciones más elevadas y que incrementan la capacidad antioxidante en las suspensiones celulares de *C. annuum*.

A pesar de que las concentraciones del extracto de *Moringa* utilizadas incrementaron la producción de compuestos fenólicos, se necesitan más ensayos como concentraciones crecientes del extracto, tiempos más largos de elicitación, uso de diferentes densidades celulares etc, con el fin de optimar este proceso y por tanto conseguir un sistema sostenible para la bioproducción de compuestos fenólicos.

5. CONCLUSIONES

1. Puesta a punto de un método de elicitación de suspensiones celulares de *C. annuum* var *annuum* con diferentes concentraciones de extractos metanólicos obtenidos a partir de hojas de *Moringa*.
2. La elicitación en presencia del extracto metanólico de hojas de *Moringa* provoca un aumento significativo de la producción de compuestos fenólicos, siendo este incremento de la pendiente a las 72 h y con las concentraciones del extracto.

3. La elicitación en presencia del extracto metanólico de hojas de *Moringa* no incremento significativamente la capacidad antioxidante de las suspensiones celulares de *C. annuum* con independencia del tipo y concentración de elicitor.
4. El extracto de hoja de *Moringa* podría actuar como elicitor en suspensiones celulares de *C. annuum* induciendo respuestas de defensa.

5. CONCLUSIONS

1. Fine-tuning an elicitation method for cell suspensions of *C. annuum* with different concentrations of methanolic extracts obtained from *Moringa* leaves.
2. The elicitation in the presence of the extract of leaves of *Moringa* provokes a significant increase on phenolic compound production.
3. The elicitation in the presence of the extract of leaves of *Moringa* did not provoke a significant increase on antioxidant capacity in cell suspensions of *C. annuum*.
4. The *Moringa* leaf extract could be able to act as elicitor in *C. annuum* cell suspensions.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Martín C, Martín G, García A, Fernández T, Hernández E. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleífera*: una revisión crítica. Pastos y forrajes [revista en línea]. 2013 [acceso 10 de febrero de 2017]; 36(2): 137-149. Disponible en: <http://ref.scielo.org/q53nzg>
2. Consejo Comunal Tierra Negra estado Lara. Mejorar el medio ambiente y la salud de la población larense mediante la siembra y cuidado del árbol con gran variedad de propiedades medicinales denominado "Moringa" en la comunidad de tierra negra, estado Lara. 24 de febrero de 2015 [acceso 28 de marzo de 2017]. Cultivos organopónicos y *Moringa* [Internet]. Disponible en: <http://cultivosorganoponicos2014.blogspot.com.es/2015/02/consejo-comunal-tierra-negra-estado.html>
3. Figueroa Vera RF. Efectos de diferentes dosis de citoquinina en interacción con un compuesto orgánico en la germinación in vitro de semilla de Moringa (*Moringa oleífera* Lam.) [tesis de pregrado]. Machala (Ecuador): Universidad Técnica de Machala; 2015 [acceso 28 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1087>

4. Arias Sabín C. Estudio de las posibles zonas de introducción de la *Moringa oleífera* Lam. en la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias [proyecto de fin de grado]. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid; 2014 [acceso 28 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://oa.upm.es/23094>
5. Torres-Castillo JA, Sinagawa-García SR, Martínez-Ávila GCG, López-Flores AB, Sánchez-González EI, Aguirre-Arzola VE, et al. *Moringa oleífera*: phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. *Phyton (B Aires)* [revista en línea]. 2013 [acceso 7 de junio de 2017]; 82(2): 193-202. Disponible en: <http://ref.scielo.org/cvszs2>
6. Bonal Ruiz R, Rivera Odio RM, Bolívar Carrión ME. *Moringa oleífera*: una opción saludable para el bienestar. *Medisan* [revista en línea]. 2012 [acceso 27 de febrero de 2017]; 16(10): 1596-1599. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=368448459014>
7. Mahamadou Bafoutché AN. Propiedades fungicida, bactericida y aglutinante de las semillas de *Moringa oleífera* [tesis de pregrado]. Santa Clara (Cuba): Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2014 [acceso 23 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/123456789/726>
8. Pierik RLM. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 1990.
9. Codesal García V. Diseño experimental para la obtención de suspensiones celulares de *Capsicum annum* L. var. *annuum* [trabajo de fin de grado]. A Coruña: Universidade da Coruña; 2016 [acceso 5 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2183/17326>
10. Delgado-Paredes GE, Kato MJ, Rojas-Idrogo C. Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper* sp. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* [revista en línea]. 2013 [acceso 5 de mayo de 2017]; 13(3): 269-282. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85626383012>
11. Roca WM, Mroginski LA. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones [monografía en línea]. Cali (Colombia): Centro Internacional de Agricultura Tropical; 1991 [acceso 5 de mayo de 2017]. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=EXijYNw55DUC>

12. Pérez-Alonso N, Jiménez E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* [revista en línea]. 2011 [acceso 7 de junio de 2017]; 11(4): 195-211. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/837>
13. Pérez-Urria Carril E, Ávalos García A. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología). Serie Fisiología Vegetal* [revista en línea]. 2009 [acceso 5 de febrero de 2017]; 2(3): 119–145. Disponible en: <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798/814>
14. Cés Martínez A. Evaluación de la actividad antioxidante de frambuesas comerciales [trabajo de fin de grado]. A Coruña: Universidade da Coruña; 2016 [acceso 5 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2183/17458>
15. Martínez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch Latinoam Nutr* [revista en línea]. 2000 [acceso 15 de marzo de 2017]; 50(1): 5-18. Disponible en: <http://ref.scielo.org/dmz9k8>
16. Castro A. Mejora de la propagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales [proyecto de fin de máster]. A Coruña: Universidad da Coruña; 2016 [acceso 7 de junio de 2017]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2183/17519>
17. Correa Higuera LJ. Efecto de la crioconcentración en película descendente sobre los componentes bioactivos del extracto acuoso de café [trabajo de grado]. Bogotá: Universidad de La Sabana; 2013 [acceso 14 de junio de 2017]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10818/9479>
18. Bernal Pita da Veiga A, Díaz Varela J. Capsicinoides y análogos no pungentes en el pimiento. En: *II Xornadas Técnicas sobre do Pemento do Couto*. A Coruña: Deputación da Coruña; 2012. 29-43.
19. Slinkard K, Singleton V. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic*. 1977; 28: 49-55.
20. Kraujalyte V, Venskutonis P, Pukalskas A, Cesoniene L, Daubaras L. Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chem* [revista en línea]. 2015 [acceso 17 de julio de 2017]; 188: 583-590. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.031>

21. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Ceballos L, Hawkins D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compost Anal* [revista en línea]. 2006 [acceso 17 de julio de 2017]; 19(6-7): 669-675. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
22. Miras-Moreno B, Sabater-Jara AB, Pedreño M, Almagro L. Bioactivity of phytosterols and their production in plant in vitro cultures. *J Agric Food Chem* [revista en línea]. 2016 [acceso 9 de junio de 2017]; 64(38): 7049-7058. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.afc.6b02345>
23. Iglesias, M., Gago, D., Castro, A., Verde, L., González, B., Vidal, N., Bernal, MA. Estudio sobre el potencial biotecnológico *in vivo* e *in vitro* de diferentes órganos de *Moringa oleífera*. [Congreso: Sebiot 2017]. Murcia: Universidad de Murcia; 2017.