

# Grao en Bioloxía

Departamento de Bioloxía

Área de Fisioloxía Vexetal

## Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Estudo da capacidade antioxidante do medio extracelular de suspensións elicidadas cun estrato de follas de *Moringa oleifera***

**Estudio de la capacidad antioxidante del medio extracelular de suspensiones elicidadas con un extracto de hojas de *Moringa oleifera***

**Study of the antioxidant capacity of the extracellular medium of suspensions elicited with an extract of *Moringa oleifera* leaves**



**M<sup>a</sup> Ángeles Fernández Vázquez**

Xullo, 2018

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1. <i>Moringa oleifera</i> Lam .....	2
1.2. Cultivo <i>in vitro</i> .....	2
1.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> .....	2
1.2.2. Suspensión celular .....	3
1.2.3. Elicitación.....	3
1.3. Papel do medio extracelular .....	4
1.4. Metabolismo secundario.....	4
1.4.1. Compostos fenólicos .....	4
1.4.2. Capacidade antioxidante .....	5
<b>2. OBXECTIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
3.1. <b>Medio de cultivo.</b> .....	<b>6</b>
3.2. <b>Inicio dunha liña celular</b> .....	<b>7</b>
3.2.1. <i>Vitro plant</i> .....	7
3.2.2. Inducción de callo e repicado. ....	7
3.2.3. Inicio de suspensión celular e repicado. ....	7
3.3. <b>Elaboración de extrato de <i>Moringa</i></b> .....	<b>8</b>
3.4. <b>Crecedemento celular das suspensións celulares</b> .....	<b>8</b>
3.4.1. Medición do empaquetamento celular (PVC) .....	8
3.4.2. Medición do pH.....	8
3.4.3. Medición conductividade .....	8
3.5. <b>Elicitación das suspensións celulares</b> .....	<b>9</b>
3.5.1. Obtención suspensións celulares para elicitar .....	9
3.5.2. Elicitación suspensións celulares .....	9
3.5.3. Recollida de mostras.....	9
3.5.4. Medición mostras .....	9
Extracción e determinación do contido de fenoles totais.....	9
Determinación da actividade antioxidante.....	10
3.5.5. Análise estatístico .....	10
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>11</b>
4.1. <b>Obtención <i>vitro plant</i></b> .....	<b>11</b>
4.2. <b>Obtención de callos e repicado</b> .....	<b>11</b>
4.3. <b>Obtención de suspensións celulares</b> .....	<b>12</b>
4.4. <b>Crecedemento das suspensións celulares</b> .....	<b>13</b>
4.5. <b>Determinación concentración de fenoles</b> .....	<b>14</b>
4.5.1. Concentración de fenoles as 24 horas.....	14
4.5.2. Concentración de fenoles as 96 horas.....	15
4.5.3. Análise das concentracións de fenoles as 24 horas e 96 horas .....	15
4.6. <b>Determinación actividade antioxidante</b> .....	<b>17</b>
4.6.1. Actividade antioxidante as 24 horas .....	17
4.6.2. Actividade antioxidante as 96 horas .....	18
4.6.3. Análise da actividade antioxidante as 24 horas e as 96 horas .....	18
<b>5. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>20</b>
<b>5. CONCLUSIONS</b> .....	<b>20</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>20</b>

## Resume

*Moringa oleifera* é unha árbore que destaca polas súas múltiples propiedades nutritivas e farmacolóxicas. Unha das propiedades que posúe *Moringa* é a cantidade de fenoles que contén e que lle aporta unha gran capacidade para sobrevivir en diferentes medios, entre outras capacidades. Neste traballo estudade a capacidade antioxidante do medio extracelular de suspensións celulares de *Capsicum annuum* var. *annuum*. elicitadas cun estrato de follas de *Moringa oleifera*. Posteriormente, realizouse unha medida da concentración de fenoles e da actividade antioxidante de dito medio extracelular ás 24 horas e 96 horas. Os resultados indican que o estrato de *Moringa* aumenta significativamente a concentración de fenoles do medio extracelular, sen embargo non ten o mesmo efecto na actividade antioxidante.

## Resumen

*Moringa oleifera* es un árbol que destaca por sus múltiples propiedades nutritivas y farmacológicas. Una de las propiedades que posee *Moringa* es la cantidad de fenoles que contiene y que le aporta una gran capacidad para sobrevivir en diferentes medios, entre otras capacidades. En este trabajo se estudia la capacidad antioxidante del medio extracelular de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* var. *annuum*. elicitadas con un extracto de hojas de *Moringa oleifera*. Posteriormente, se realizó una medida de la concentración de fenoles y de la actividad antioxidante de dicho medio extracelular a las 24 horas y a las 96 horas. Los resultados indican que el extracto de *Moringa* aumenta significativamente la concentración de fenoles del medio extracelular, sin embargo no tiene el mismo efecto en la actividad antioxidante.

## Abstract

*Moringa oleifera* is a tree that stands out for its multiple nutritional and pharmacological properties. One of the properties that *Moringa* possesses is the amount of phenols it contains and that gives it a great capacity to survive in different soils, among other capacities. In this work the antioxidant capacity of the extracellular medium of cell suspensions of *Capsicum annuum* var. *annuum* elicited with an extract of *Moringa oleifera* leaves. Subsequently, a measure of the concentration of phenols and the antioxidant activity of said extracellular medium was made at 24 hours and 96 hours. The results indicate that the extract of *Moringa* significantly increases the concentration of phenols of the extracellular medium; however it hasn't the same effect on the antioxidant activity.

## Palabras chave

Cultivo *in vitro*, *Moringa*, *Capsicum annuum*, compostos fenólicos, capacidade antioxidante, elicitor

## Palabras clave

Cultivo *in vitro*, *Moringa*, *Capsicum annuum*, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, elicitor

## Key words

*in vitro* culture, *Moringa*, *Capsicum annuum*, phenolic compounds, antioxidant capacity, elicitor

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. *Moringa oleifera* Lam.

*Moringa oleifera* Lam. é unha árbore nativa da India e Pakistán, pertencente a familia Moringaceae. Tamén se coñece como ravo picante, árbore de vara, árbore da vida ou alimento da fame. *Moringa* alcanza uns 12 metros de altura, é dicotiledónea, de follas perennes e propia de climas tropicais e subtropicais, tolerando eficazmente a seca e as condicións áridas e crescendo naqueles países onde a fame está a orde do día. Isto é grazas a súa gran plasticidade ecolóxica, polo que se pode encontrar en diferentes condicións de solo, precipitación e temperatura (Perez et al., 2010).

*Moringa oleifera* Lam. é unha árbore con múltiples propiedades, amplamente cultivada no Medio Oriente, África e o sur de Asia, xa que todas as partes desta árbore (raíces, froitos, follas e flores) ten propiedades nutricionais e medicinais. O talo, as raíces, follas, flores, vainas inmatargas e sementes desta planta teñen propiedades farmacolóxicas con diversos efectos, entre os que destacan: anticanceroso, antiinflamatorio, antidiabéticos, antioxidantes e antimicrobianos. Debido a isto é moi utilizada na medicina tradicional. As sementes teñen a capacidade de purificar a auga grazas a un floculante natural e conteñen un 31-47% de aceite, o cal é un potente antioxidante, ademais pódese utilizar para a obtención de biocombustible. Sen embargo, o máis destacábel desta árbore son as propiedades das follas, as cales son unha fonte potencial de vitamina A e C, ferro, calcio, riboflavina,  $\beta$ -caroteno (Yasmeen et al., 2013) aminoácidos esenciais e un alto contido compostos fenólicos que lles confire un gran poder antioxidante, que mostra tanto *in vivo* como *in vitro* e que lle confire protección fronte ao estrés biótico ou abiótico. Por todo o citado, as follas de *Moringa* son usadas polas industrias agroalimentarias e bioquímicas como alimento, forrageo, biopesticida, abono verde, coagulante natural para auga turbia e estimulador do crecemento vexetal, sendo máis rendible que os estimuladores comerciais (Nouman et al., 2016).

En conclusión, *Moringa* contén numerosos metabolitos secundarios como os fenoles, un alto valor nutricional e elevados rendementos de biomasa o que lle confire un gran potencial na industria biotecnolóxica.

### 1.2. Cultivo *in vitro*.

#### 1.2.1. Cultivo *in vitro*.

O cultivo *in vitro* é un conxunto de técnicas mediante as cales un explante (protoplasto, célula, tecido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida e se incuba en condicións ambientais controladas. Estes cultivos *in vitro* permiten estudar a fisioloxía, xenética e bioquímica dunha planta, a síntese de compostos desexables, a obtención de plantas libres de patóxenos, a propagación de plantas e a modificación do xenoma das plantas (Roca & Mroginski, 1991).

É moi complexo reproducir todos os factores ambientais necesarios para a planta, por iso escóllense aqueles factores máis importantes e que se poden controlar, como a exposición a luz, temperatura ou a humidade. Outra dificultade do cultivo *in vitro* é aportar todos os nutrientes, hormonas e outras substancias ao explante. Por isto o medio de cultivo vai ser unha mestura de sales minerais, vitaminas, reguladores de crecemento, azúcar, auga e agar.

Esta composición pode variar dependendo da especie vexetal e da súa etapa de micropropagación (Castillo, 2004).

### **1.2.2. Suspensión celular.**

Unha das formas de cultivo *in vitro* son as suspensións celulares. As suspensións celulares consisten en células libres ou agregados celulares distribuídos en un medio líquido en continuo movemento. A iniciación dunha suspensión celular basease en inocular unha porción de callo friable, preferiblemente a un alto grado de división celular, en un medio líquido que posteriormente se incuba en movemento continuo grazas a un axitador orbital a 80-150 r.p.m, baixo luz continua e a 25°C. Para elo, empréganse erlenmeyers, nos cales se coloca, até un 1/5 da súa capacidade, medio líquido xunto cos fragmentos do callo.

Ao cabo de varios días en incubación, a suspensión celular estará próxima ao punto de saturación, é dicir, o crecemento celular cesa e pronto dará lugar a morte celular causada por falta de nutrientes ou pola toxicidade dos produtos residuais do seu metabolismo. Para que isto non suceda debemos realizar subcultivos (repicar), é dicir, diluír a suspensión celular. O máis recomendable é usar unha taxa de dilución baixa como 1:4, utilizando catro partes de medio fresco por cada parte de suspensión celular (Roca & Mroginski, 1991).

Un callo friable é aquel que non presenta unha textura granulosa ou mostren cores pardas froito da oxidación, é dicir, un callo friable presenta unha coloración branca e unha textura xelatinosa sen grumos.

Unha ventaxa das suspensións celulares é que permiten a síntesis de compostos naturais. Pero ademais permite a bioconversión de ditos componentes de baixo valor en produtos de alto valor (Quijala et al., 2002). Por outro lado moitos de estos compostos non se producen en plantas intactas, pero a través do cultivo de células pódese inducir a formación de material vexetal específico (embrións, raíz, follas) o cal é moi ventaxoso, xa que algún destes metabolitos secundarios só se producen en estruturas específicas.

### **1.2.3. Elicitación.**

Un elicitor defínese como un factor de estres que desencadea unha resposta mediante unha ruta directa ou indirecta (Hassan & Soleimani, 2016), dando lugar a cambios fisiolóxicos ou morfolóxicos das plantas (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011). Dito factor pode ser de natureza química como os metais pesados ou física como a temperatura. Tamén se poden clasificar segundo teña orixe biótica (un organismo ou un produto sintetizado por el) ou abiótica.

A elicitación é unha estratexia eficiente por medio dun composto que induce as plantas a sintetizar un metabolito (Saini et al., 2014).

Os elicitores usados con máis frecuencia en cultivo *in vitro* co obxectivo de incrementar a produción de metabolitos secundarios inclúen hormonas, polisacáridos, extratos de fungos ou outros microorganismos (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

### **1.3. Papel do medio extracelular.**

O termo de medio extracelular refírese a “todo o que está fora da membrana plasmática” e componse da parede celular e o espazo entre elas (espazo intercelular) no que o líquido se move libremente. O líquido dentro do medio extracelular chámase fluído apoplástico. Este fluído apoplástico desempeña un papel fundamental na interacción planta-entorno (Agrawal et al., 2010). O apoplasto das células vegetales está composto por carbohidratos, proteínas, lignina, auga, metabolitos e diversos compostos inorgánicos. As proteínas que contén o apoplasto participan na defensa fronte ao estrés abiótico e biótico, expansión celular, comunicación inter e intracelular e asimilación de nutrientes. O apoplasto ten moita importancia na alimentación celular ao aportar ións e metabolitos (Díaz-Vivancos et al., 2006).

En cultivos de suspensión celulares o apoplasto ten a vantaxe que pode ser facilmente separado das células sen ruptura das mesmas, proporcionando unha fonte conveniente e continua de compostos, podendo considerarse o medio de cultivo onde crecen as células vexetais como un amplo espazo intercelular que forma un continuo coa parede vexetal (Amador, 2016).

### **1.4. Metabolismo secundario.**

#### **1.4.1. Compostos fenólicos.**

Os compostos fenólicos son metabolitos secundarios producidos polas plantas co fin de protexerse fronte a un estrés, xa sexa biótico ou abiótico. Estruturalmente, os fenoles están compostos por un anel aromático que pode conter un ou mais grupos hidroxilo, formando así moléculas simples ou complexas.

A función dos compostos fenólicos é protexer ao organismo de radicais libres froito do estrés, e dicir, teñen actividade antioxidante ao doar electróns a molécula co radical libre, estabilizándoa e evitando así que dane a estruturas celulares como a membrana lipídica. Esta actividade basease na propiedade rédox da estrutura da molécula fenólica e da natureza dos aneis aromáticos. Ademais, estes compostos contribúen a cor, olor e sabor das plantas. Os compostos fenólicos poden clasificarse en ácidos fenólicos, flavonoides (os máis representativos), taninos, estilbenos e lignanos (Varga et al., 2018). Ditos compostos poden encontrarse de forma libre ou formar parte da parede celular vexetal.

O corpo dun ser humano non é capaz de sintetizar compostos fenólicos polo que depende totalmente da dieta para obter ditos compostos. A principal fonte de compostos fenólicos para o ser humano son as froitas, verduras e bebidas. Os compostos fenólicos teñen efectos beneficios, previndo unha multitude de enfermidades, entre as que se inclúen o cancro, enfermidades cardiovasculares e os trastornos neurodegenerativos (Materska & Perucka, 2005). Ademais exhiben múltiples propiedades fisiolóxicas, como efectos antialérxicos, antiarteroxénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, cardioprotectores e vasodilatadores (Balasundram et al., 2006).

### 1.4.2. Capacidade antioxidante.

Os radicais libres son átomos ou grupo de átomos que teñen un electrón desaparellado ou libre, polo que son moi reactivos xa que tenden a captar un electrón de moléculas estables co fin de alcanzar a súa estabilidade electroquímica (Avello & Suwalsky, 2006). Debido a esta capacidade de reaccionar con moléculas estables, resultan perigosos para o organismo, xa que tende a danar a moléculas, membranas celulares e aos tecidos. A pesar disto a veces é o propio organismo quen produce radicais libres co fin de loitar contra patóxenos. Ditos radicais libres poden ter lugar de forma endóxena ou exóxena debido a radiación solar, toxinas fúngicas ou pesticidas.

Osíxeno é unha molécula oxidante, ata o punto que o propio osíxeno usado polas células é o principal responsable da produción de especies reactivas de osíxeno (ERO) (Avello & Suwalsky, 2006), aínda que en condición normais o osíxeno dá lugar a auga sen dar lugar a formas intermedias tóxicas.

As células contan con antioxidantes para protexerse dos radicais libres. Un antioxidante é unha sustancia capaz de neutralizar a acción oxidante dos radicais libres mediante a liberación de electróns que son captados polos radicais libres. Estes antioxidantes poden ser enzimáticos como as peroxidases ou non enzimáticos como os fenoles.

En certas circunstancias, a cantidade de ERO na célula excede a cantidade de antioxidante presente e provócase o estrés oxidativo, a resultas do cal prodúcese dano en lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e outros compoñentes celulares, alterando a funcionalidade celular que pode rematar coa morte da célula e finalmente coa do organismo.

## 2. OBXECTIVOS

---

Neste traballo preténdese estudar a capacidade elicitora do extracto de *Moringa oleifera* sobre o medio extracelular de suspensións celulares de *Capsicum annuum* var. *annuum* a diferentes momentos de crecemento celular. Para elo propóñense os seguintes obxectivos:

- Inicio dunha liña celular de *Capsicum annuum* var. *annuum* para obter suspensións.
- Determinación da concentración de fenoles totais no medio extracelular.
- Determinación da actividade antioxidante no medio extracelular

### 3. MATERIAL E MÉTODOS.

#### 3.1. Medio de cultivo.

Tipo de cultivo	Productos	Concentración
<b>Vitro plant</b>	Sales Murashige e Skoog	4.406 g/L
	Vitaminas de Morel	1 mL/L
	Caseína	0.25 g/L
	Sacarosa	30 g/L
	Ágar	8 g/L
<b>Cultivo de callos</b>	Sales Murashige e Skoog	4.406 g/L
	Vitaminas de Morel	1 mL/L
	Caseína	0.25 g/L
	Sacarosa	30 g/L
	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	3 mg/L
	Kinetina	0.05 mg/L
<b>Suspensión celulares</b>	Sales Murashige e Skoog	4.406 g/L
	Vitaminas de Morel	1 mL/L
	Caseína	0.25 g/L
	Sacarosa	30 g/L
	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	3 mg/L
	Kinetina	0.05 mg/L

Táboa 1: Composición e concentración empregadas nos medios de cultivo.

Os medios de cultivo realízanse nun matraz de 1l, onde se engaden 500 ml e os componentes nomeados na tabla. Todo elo lévase a un axitador magnético xunto cunha mosca co obxectivo de homoxeneizar a disolución. O pH debe ser de 5.8, axustándose mediante a adición de HCL ou NaOH.



## **3.2. Inicio dunha liña celular.**

### **3.2.1. Vitro plant.**

Partimos de sementes de *C. annum L. var. annum*, as cales se colocan nunha gasa, envólvense na mesma e cérranse con un clip. As sementes esterilízanse con etanol ao 70% durante 2 minutos e hipoclorito ao 20% durante 20 minutos, manténdose en axitación grazas a un axitador electromagnético e a unha mosca. Posteriormente, lévanse a cabina de fluxo laminar (esterilizada previamente), onde se realizan tres lavados das sementes con auga estéril co fin de quitar os restos de etanol e hipoclorito. Coa axuda dun papel de filtro, quítanse os restos de auga e nun novo papel de filtro cunhas pinzas e un bisturí, ambos esterilizados, ábrese a envoltura de gasa para extraer as sementes. Unha vez extraídas as sementes, depositanse nun papel de filtro onde se deixar secar durante 1 hora. Pasado este tempo, as sementes inocúlanse nun bote de cristal con tapa, no sentido das agullas do reloxo e deixando un espazo entre elas. Sélase o bote de cristal con parafilm e introdúcese na cámara de cultivo. O cabo duns 8 días obtéñense plantas de pemento *in vitro*.

### **3.2.2. Indución de callo e repicado.**

Os callos obtéñense a partir das *vitro plant*, realizándose todo dentro da cabina de fluxo laminar, previamente esterilizada. Cunha pinza extraese unha planta de pemento e depositase nunha placa Petri. Escóllense as follas máis novas, preferentemente. A estas follas quítaselles o pecíolo e realízanse cortes lonxitudinais. Se as follas son maduras, córtase o borde e logo córtanse lonxitudinalmente. O talo tamén se fragmenta. Unha vez obtidos os fragmentos, inocúlanse nunha placa Petri no sentido das agullas do reloxo e os fragmentos de follas co envés en contacto co medio de cultivo. Sélase a placa con parafilm e incúbanse en escuridade a temperatura ambiente.

Ao cabo de 1 mes aproximadamente realizase un repicado dos callos. Para elo vaise a cabina de fluxo laminar (previamente esterilizada) e cunhas pinzas e bisturí, retírase do callo a parte vexetal (a cal adquiriu unha coloración pardenta). A continuación lévase o callo para unha placa Petri con medio cultivo, onde se fragmenta co bisturí e prémese coa folla do mesmo, co fin de que o máximo número de células estean en contacto co medio de cultivo. Realízase o mesmo procedemento coas demais masas de callos, inoculándose no sentido das agullas do reloxo. Finalmente, sélase as placas Petri con parafilm e incúbanse a temperatura ambiente e en escuridade.

### **3.2.3. Inicio suspensión celular e repicado.**

O callo friable seleccionado fragmentase coa axuda dun bisturí e unhas pinzas. A continuación, pésanse 8 gramos nun erlenmeyer de volume 100 ml e engádese 40 ml medio líquido. Tapamos o erlenmeyer con papel de aluminio e incúbanse nunha cámara de cultivo, en escuridade e axitación mediante un axitador orbital.

O repicado das suspensións celulares realizase mediante unha dilución 1:2 con medio de cultivo fresco cada 10 días. Este repicado consiste en engadir 40 ml aos erlenmeyers coas suspensións celulares, axítase para homoxeneizar a suspensión e repártese en dous

erlenmeyers. Incúbanse nunha cámara de cultivo en escuridade e axitación mediante un axitador orbital a 105 r.p.m.

### **3.3. Elaboración de extracto de *Moringa*.**

A elaboración do extracto de *Moringa* realizase a partir de follas secas de *Moringa* en estado floral obtidas no invernadoiro de Fisioloxía Vexetal da Facultade de Ciencias, as cales son trituradas nun morteiro hasta obter un po fino. A continuación pésanse 200 mg de po de follas de *Moringa* e engádense a un vaso de precipitados xunto con 50 ml de metanol ao 80%. A continuación mantense en axitación durante 3 horas en escuridade nun axitador electromagnético e unha mosca. Pasado este tempo, a solución lévase a neveira para conservar as súas propiedades.

Ao día seguinte filtrase a solución cunha tea de nylon e o recuperado da filtración lévase ao rotavapor. Cando o disolvente se evaporou completamente, resuspéndese en 1.5 ml de etanol ao 70%. Esta solución é filtrada novamente cunha tea de nylon e o recuperado levase a cámara de fluxo laminar. Finalmente o extracto de *Moringa* filtrase cun filtro de 22 $\mu$ m de diámetro de poro coa finalidade de esterilizalo.

### **3.4. Crecemento celular das suspensións celulares.**

As medicións realízanse nos días 1, 2, 3, 6, 8 e 11.

#### **3.4.1. Medición do empaketamento celular (PVC).**

O empaketamento celular (PVC) é a cantidade de células que se atopan nun determinado volume. Para realizar a medición do empaketamento celular, pipetéanse 5ml da suspensión celular cunha punta cortada para que poder captar mellor a mostra e lévanse a un tubo de cristal graduado de 10ml, onde se deixa sedimentar as células durante 1 hora. Pasado este tempo tómase a medida do volume ocupado polas células.

#### **3.4.2. Medición do pH.**

O pH mide a acidez ou basicidade dunha solución, é dicir, se hai unha alta ou baixa concentración de ións, respectivamente. A medición do pH realizase a partir do sobrenadante obtido grazas ao apartado anterior. Con unha pipeta Pasteur recupérase dito sobrenadante para un tubo de plástico, o cal se lle toma medida nun pHmetro Cryson.

#### **3.4.3. Medición da conductividade.**

A conductividade é a capacidade dunha disolución de conducir a corrente eléctrica. Esta medida está relacionada coa cantidade de sales diluídas no medio, é dicir, coa cantidade de nutrientes que consumen as células. Un aumento na conductividade significa que os nutrientes están a ser consumidos polas células. Ésta medida tómase nun conductímetro Cryson a partir do sobrenadante da suspensión celular.

### **3.5. Elicitación das suspensións celulares.**

#### **3.5.1. Obtención de suspensións celulares para elicitar.**

A suspensión celular saturada fíltrase co coador e recollese o líquido no bote de cristal baleiro, prémese coa culler o filtrado para extraer o máximo medio posible, co fin de que o pesado corresponda ao material vexetal. Pésanse 4g do material vexetal recuperado (evitando os grumos) e engádense a un erlenmeyer. Na probeta, mídese 40 ml de medio de cultivo líquido e engádense ao dito erlenmeyer. Unha vez finalizado este proceso, os erlenmeyers incúbanse en escuridade e en axitación grazas a un axitador orbital.

#### **3.5.2. Elicitación das suspensións celulares.**

A elicitación realízase as 24 horas da iniciación das suspensións celulares para que o cultivo estea estabilizado. Este proceso consiste en engadir 150µl de elicitor á suspensión celular, obtendo tres réplicas de cada elicitor. Os elicitores son medio de cultivo (Control), etanol ao 100% (Etanol) e extrato de *Moringa* de concentración 0.133 mg/ml (Moringa), de maneira que nas suspensións a concentración final vai ser 0.5 mg/ml. Esta elicitación repítese 3 veces, obtendo 27 erlenmeyers. Unha vez elicitadas as suspensións celulares, incúbanse e en axitación nun axitador orbital a 105 r.p.m.

#### **3.5.3. Recollida de mostrás.**

A recollida das mostrás realízase ás 24 horas e 96 horas de elicitar. Para elo fíltrase a suspensión celular grazas a un coador e recóllese o medio extracelular nun erlenmeyer. De cada réplica, recóllese 1 ml de medio e lévase a un eppendorf.

#### **3.5.4. Medición das mostrás.**

- **Extracción e determinación do contido fenoles totais.**

A extracción de fenoles realízase en proporción 1:1 (p/v) en metanol ao 80% e incúbase durante 30 minutos a 70°C, seguindo a técnica Díaz et al. (2001).

Para determinar a concentración de fenoles úsase o reactivo de Folin-Ciocalteu, seguindo método de Slinkard & Singleton (1977) e modificado posteriormente por Kraujalyte et al. (2015) diluído 1:10. Para elo, engádense nun tubo de ensaio 1000µl de Folin-Ciocalteu xunto con 100µl de mostra. Incúbase durante 4 minutos en escuridade. Posteriormente, amecese 1000µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ao 7% e 400µl de auga destilada. Axítase e incúbase en escuridade durante 90 minutos. Para o branco, engádense 100µl de auga destilada en vez dos 100µl de mostra. Pasado o tempo de incubación realízase a lectura a unha absorbancia de 725nm.

Os datos obtidos extrapólanse da recta de calibrado realizada con ácido gálico. Para elo efectúase o mesmo procedemento que para os fenoles, sendo a mostra ácido gálico a diferentes concentracións, a saber: 0.01 mg/ml, 0.02 mg/ml, 0.05 mg/ml e 0.1 mg/ml.

A partir das diferentes concentracións de ácido gálico, obtívose unha recta de calibrado elaborada co programa Microsoft Office Excel 2007 (Fig.2.). A ecuación de dita recta é  $y = 5.599x + 0.013$  cuxa bondade de axuste é do 0.992, dende esta ecuación calcúlanse a concentración de fenoles grazas as absorbancias medidas.

#### ▪ **Determinación da actividade antioxidante.**

A determinación da actividade antioxidante realízase mediante a molécula 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) seguindo o método de Thaipong et al. (2006). Dita molécula presenta un color morado cando se encontra en estado oxidado, é dicir, presenta un radical libre que reacciona con compostos antioxidantes, cando isto ocorre a molécula cambia de cor, pasando a amarelo. Tendo como consecuencia unha diminución na absorbancia. Para elo partiuse dunha disolución nai de concentración 1mM, diluíndose hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0.800 a 525nm. Desta disolución lévase 950µL para unha cubeta xunto con 50 µl de mostra e mídese a absorbancia. Unha vez obtidos os datos, calcúlase a porcentaxe de antioxidantes da mostra mediante a fórmula:

$$\frac{A0 - AX}{A0} * 100$$

Onde A0 é a absorbancia da dilución da disolución nai e AX é a absorbancia da mostra.

Os datos obtidos extrapólanse da recta de calibrado realizada con Trolox, un análogo hidrosoluble á vitamina E e con actividade antioxidante. Para elo empregamos unha dilución nai de 1mM, da cal partimos para obter as seguintes concentracións: 10, 20, 30, 40, 50 e 100µM. Incúbase durante 3 minutos, posteriormente pipetéase 50µl de mostra e 950µl de DPPH e mídese a absorbancia.

A partir das diferentes concentracións de Trolox, obtívose unha recta de calibrado co programa Microsoft Office Excel 2007. A ecuación da recta é  $y = 0,8938x + 3,7336$  cunha bondade de axuste do 0.9553. A partir desta ecuación obtense a % de DPPH reducido.

#### **3.5.5. Análise estatístico.**

Durante o experimento tomáronse medidas do contido de fenoles e da actividade antioxidante as 24 horas e 96 horas da elicitación. Os resultados obtidos represéntanse en gráficas obtidas co programa Microsoft Office Excel 2007 e analízanse estatisticamente co programa R i386 3.4.3. Este estudo estatístico consistiu nun análise da varianza (ANOVA) cuxo obxectivo é determinar si as respostas medias por tratamento difiren significativamente. É dicir, hai diferenzas significativas entre os tratamentos cando o p-valor é menor que 0.05. Para que ANOVA sexa válido debe cumprir dous requisitos: normalidade dos residuos estandarizados e homoscedasticidad, en ambos casos os test non deben ser significativos (p-valor maior que 0.05). No caso que unha ou as dúas condicións non se cumpran, invalidase o test ANOVA, polo que realizase unha proba alternativa ao ANOVA. Esta proba consiste nun test non paramétrico chamado Kruskal-Wallis que consiste nun test de distribución libre baseada en rangos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSIÓN.

### 4.1. Obtención de *vitro plant*.

As sementes de *Capsicum annum* son esterilizadas con etanol ao 70% e posteriormente con hipoclorito sódico ao 20%. A continuación, lévanse a cabina de fluxo laminar (previamente esterilizada e con todo o material necesario esterilizado e colocado para traballar cómodamente). As sementes lávanse 3 veces en auga estéril co obxectivo de quitar os restos de etanol e hipoclorito sódico. Seguidamente colócanse nun papel de filtro onde se deixar secar durante 1 hora, co fin de evitar calquera contaminación por humidade. Finalmente inocúlanse en botes cristal e incúbase nunha cámara. Obtendo plántas de pemento aos 8 días. Todo elo está ilustrado na Fig. 1.

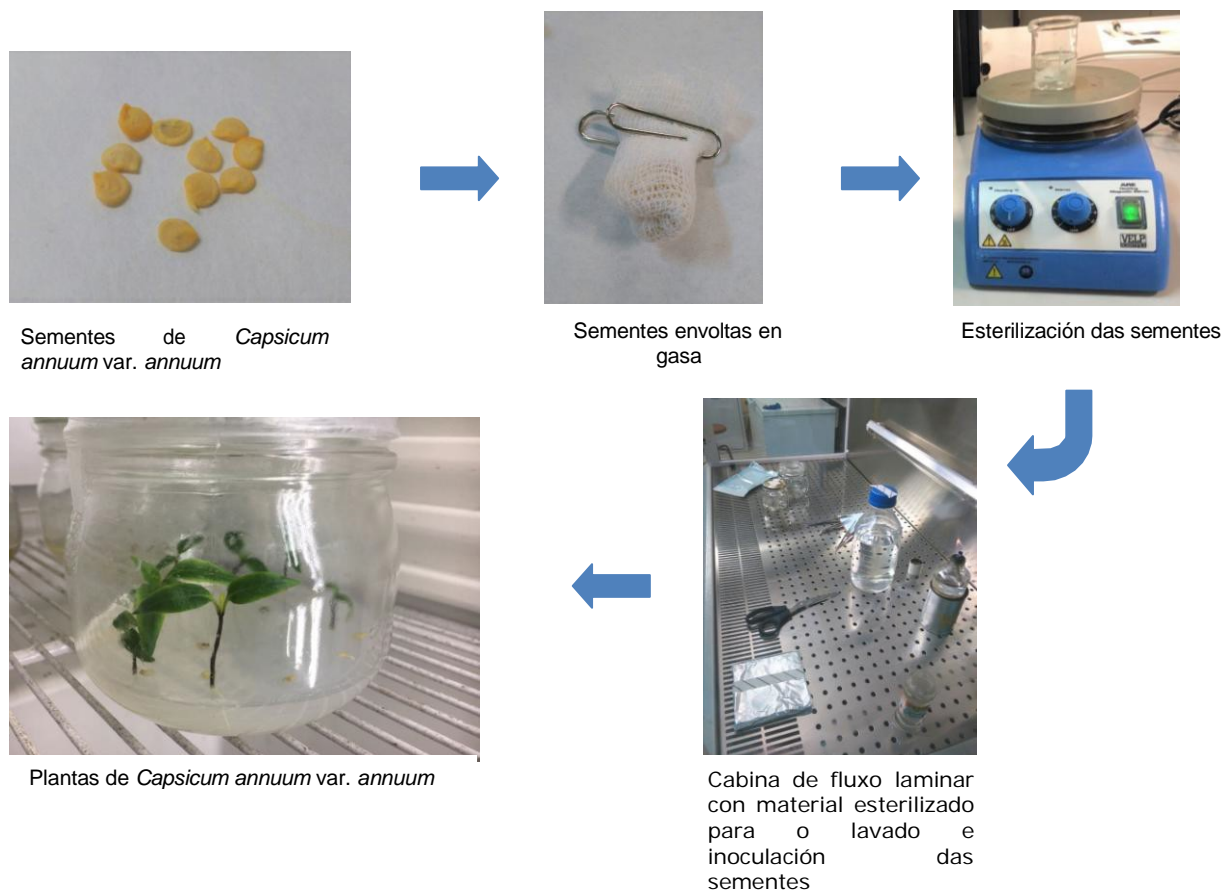


Fig. 1. -Esquema *vitro plant*.

### 4.2. Obtención de callos e repicado.

Unha vez que se obteñen as plantas de pemento completamente desenroladas, indúcese a formación de callo. Para elo traballamos na cabina de fluxo laminar e con material esterilizado para evitar contaminacións. Selecciónanse aquelas plantas con bo aspecto e sen signos de marchitez ou enfermidade. Destas plantas, seleccionamos as follas xoves e o talo co ápice, que se fragmentan para usar como explantes. Finalmente, inocúlanse os explantes en placas Petri con medio nutritivo enriquecido con hormonas. Sélanse as placas Petri con parafilm e incúbanse a temperatura ambiente e en escuridade.

Ao cabo de 1 mes, os explantes incubados presentan nos seus bordes masas celulares, é dicir, o callo, momento no que se realiza o repicado. Na cabina de fluxo e con material esterilizado, transfírense os callos a unha nova placa Petri con medio nutritivo enriquecido con hormonas, sélanse con parafilm e incúbanse a temperatura ambiente e en escuridade para que se desenrolen.

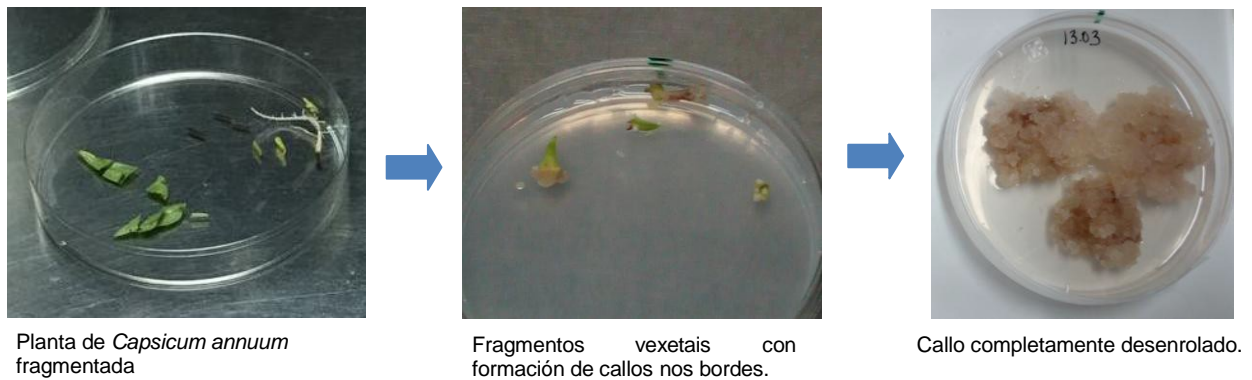


Fig. 2. -Esquema da obtención de callos.

#### 4.3. Obtención de suspensión celular e repicado.

O inicio dunha suspensión celular consiste en inocular nun erlenmeyer 8 gramos de callo friable en 40 ml medio líquido enriquecido con hormonas. Isto realízase na cabina de fluxo, previamente esterilizada e con material tamén estéril. Os erlenmeyers incúbanse nunha cámara de cultivo, en axitación e escuridade.

O repicado realízase cada 10 días, cando a suspensión está saturada. Para elo dilúese 1:2 a suspensión celular, axítase para homoxeneizar e repártese en dous erlenmeyers. As novas suspensións incúbanse nunha cámara de cultivo, en axitación e escuridade.

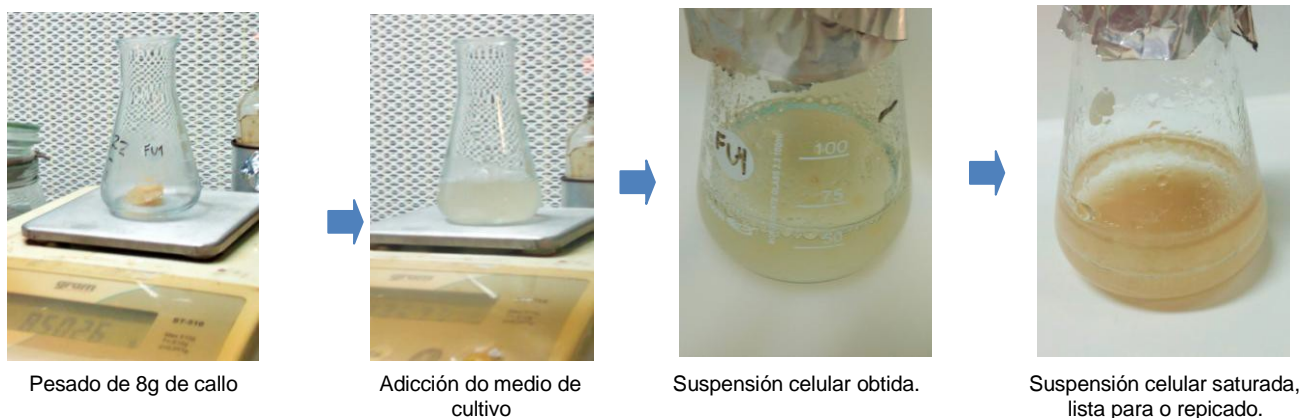


Fig. 3. -Esquema da obtención de suspensión celular e repicado.

#### 4.4. Crecemento das suspensión celulares.

O desenrolo dunha suspensión celular segue varias fases:

1. Fase de latencia, onde non se observa crecemento celular xa que a células están atravesando un momento de estres ao ser inoculadas e o cal superan nunhas 24 horas.
2. Fase exponencial ou logarítmica, o número de células aumenta de maneira exponencial.
3. Fase estacionaria. A taxa de replicación diminúe considerablemente, de maneira que o número de células se mantén máis ou menos constante. Isto ocorre debido a que os nutrientes empezan a ser limitantes.
4. Fase de morte celular. O número de células diminúe debido ao esgotamento dos nutrientes e a acumulación de produtos tóxicos. Prodúcese lise celular.

	1	2	3	6	8	11
<b>Empaquetamento (PVC)</b>	2.23	3.3	3.25	4.05	3.75	3.53
<b>Conductividade</b>	4.99	5.36	5.26	5.46	5.88	6.02
<b>pH</b>	4.98	4.88	4.79	4.77	4.86	4.58

Táboa 2. -Resultados de empaquetamento, conductividade e pH das suspensións celulares.

Na Tabla 2 mostranse os resultados obtidos. Con respecto ao empaquetamento observase a fase de crecemento exponencial dende o día 1 até o día 6, logo o número de células descende, é dicir, acadou a fase de morte celular. A conductividade aumenta de forma constante a medida que pasa o tempo. O aumento desta pode deberse a que se producen lisis celualres. E finalmente observase que o pH diminúe co paso do tempo, esta acidificación pode ser debida a que a medida que crece o numero de células, tamén existe certa lise celular.

#### 4.5. Determinación concentración de fenoles.

##### 4.5.1 Concentración de fenoles as 24 horas.

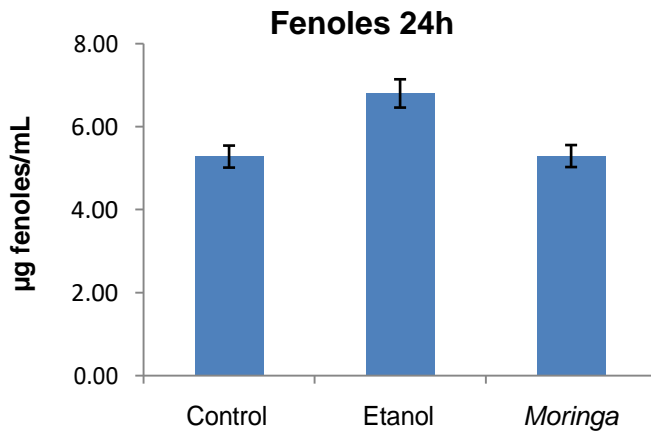


Fig. 4. -Efecto dos distintos elicitores fronte as concentracións de fenoles en µg/ml, medido as 24 horas despois do tratamento.

Os resultados para as 24 horas representáanse na Fig. 4., mostrando as concentracións de fenoles fronte aos tres tratamentos (Control, Etanol e extrato de Moringa). O medio extracelular da suspensión celular de *C. annuum* que maior concentración de fenoles presenta corresponde co tratamento etanol, sendo de 6.81 µg/mL. Mentres que o tratamento control e Moringa presentan valores de fenoles moi similares, sendo de 5.29 e 5.30µg/mL, respectivamente. Isto indica que o estrato de Moringa non inflúe na concentración de fenoles ás 24 horas, sen embargo si afecta o etanol, aumentando a cantidade de fenoles.

#### Análise estatístico de fenoles as 24h

Proba estatística	p-valor
Test de normalidade: <b>Shapiro-Wilk</b>	0.0005313
Test de homoxeneidade das varianzas: <b>Levene</b>	0.3558
Test no paramétrico: <b>Kruskal-Wallis</b>	0.09485

Táboa 3. -Resultados das distintas probas estatísticas realizadas a concentración de fenoles ás 24 horas do proceso de elicitación.

O análise estatístico para a concentración de fenoles as 24 horas representase na Táboa 2. O test non paramétrico de Kruskal-Wallis non é significativo, isto quere dicir que para as 24 horas non hai diferenzas significativas na concentración de fenoles entre os tratamentos.



#### 4.5.2. Concentración de fenoles as 96 horas.

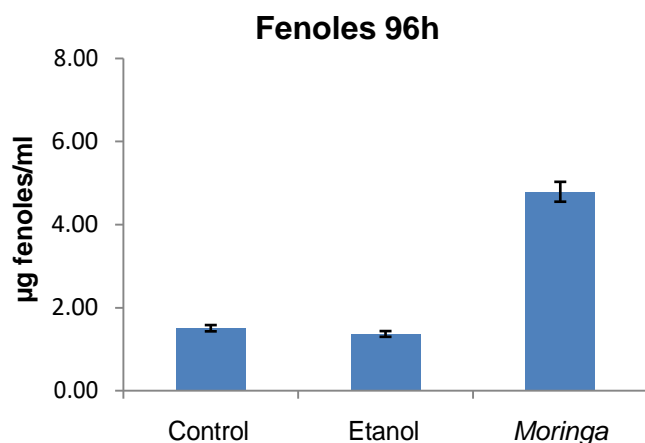


Fig. 5. - Efecto dos distintos elicitores fronte as concentracións de fenoles en µg/ml, medido as 96 horas despois do tratamento.

Na Fig. 5. representase a concentración de fenoles por tratamento (Control, Etanol e extrato de *Moringa*) para as 96 horas. O medio extracelular da suspensión celulares de *C. annuum* elicidadas con extrato de *Moringa* presentan unha concentración de 4.79 µg/ml, sendo a máis elevada. Por outro lado, o tratamento Control e Etanol presentan un valor moi inferior ao tratamento de *Moringa*, tendo unha concentración de fenoles de 1.51 e 1.37 µg/ml respectivamente.

#### Análise estatístico de fenoles as 96h

Proba estatística	p-valor
Test de normalidade: <b>Shapiro-Wilk</b>	2.06*10 <sup>-5</sup>
Test de homoxeneidade das varianzas: <b>Levene</b>	0.02711
Test no paramétrico: <b>Kruskal-Wallis</b>	1.45*10 <sup>-5</sup>

Táboa 4. Resultados das distintas probas estatísticas realizadas a concentración de fenoles ás 96 horas do proceso de elicitación.

O análise estatístico para a concentración de fenoles as 96 horas representase na Táboa 4. O test non paramétrico é significativo, é dicir, hai diferenzas significativas na concentración de fenoles entre os tratamentos.

#### 4.5.3. Análise das concentracións de fenoles obtidas as 24 horas e 96 horas.

Comparando os resultados as 24 horas e as 96 horas (Fig. 5. e Fig. 6.) obsérvase que incrementa a concentración de fenoles naquelas suspensións celulares de *C. annuum* tratadas con estrato de *Moringa*; mentres que as tratadas con medio de cultivo (Control) e con etanol diminúe a súa concentración.

O tratamento Etanol provoca un aumento significativo na concentración de fenoles as 24 horas para logo diminuír as 96 horas. Unha posible explicación é que o etanol produce un estres nas células de *C. annuum*, as cales responden sintetizando fenoles para defenderse a dito estrés. As 96 horas as células de *C. annuum* entran nunha fase de agotamento, é dicir, non son capaces de aclimatare ao estres polo que terminan morrendo debido a toxicidade do composto. Un resultado semellante foi obtivo por Ortega (2012), cuxo experimento consiste en elicitar liñas celulares de *Cardo mariano* con diferentes elicitores, un dos elicitores empregados é unha solución etanólica diluída. Como resultado diminúe a produción de silimarina e de biomasa celular naquelas suspensións tratadas con concentracións de 200 $\mu$ M de etanol.

O extrato de *Moringa* non mostra ningún efecto as 24 horas, isto pode deberse a que a cantidade inoculada (150 $\mu$ L obtendo unha concentración final de 0.5 mg/ml) non é suficiente para ter unha resposta inmediata. Sen embargo, nas suspensións celulares de *C. annuum* incubadas durante 96 horas aumenta considerablemente a concentración de fenoles. Estes resultados están de acordo cos obtidos por (Miras-Moreno et al., 2016) e coa tendencia que mostran dos experimentos realizados por González (2017) e Verde (2017), onde a concentración de fenoles aumenta según o tempo coas concentracións de 0.25 e 0.75 mg/ml de extracto de *Moringa*. Este aumento da concentración de fenoles por *Moringa* pode ser debido a que favorece a defensa da célula, xa sexa porque actúa como estrés ou pola súa riqueza en vitaminas, en ambos casos incitando á célula a sintetizar fenoles. En definitiva, a través da elicitación, os cultivos de células vexetais poden proporcionar cantidades adecuadas de un composto de interese (Miras-Moreno et al., 2016).

#### **Análise estatístico de fenoles as 24h e 96h**

<b>Proba estatística</b>	<b>p-valor</b>
Test de normalidade: <b>Shapiro-Wilk</b>	5.36*10 <sup>-7</sup>
Test de homoxeneidade das varianzas: <b>Levene</b>	0.02697
Test no paramétrico: <b>Kruskal-Wallis</b>	4.995*10 <sup>-11</sup>

Táboa 5. - Resultados das distintas probas estatísticas realizadas as medidas de fenoles ás 24 e 96 horas do proceso de elicitación.

O análise estatístico (Táboa 5.) conclúe que o test non paramétrico de Kruskal-Wallis é significativo. Isto quere dicir que hay diferenzas significativas nas concentracións de fenoles dos tratamentos as 24 horas e as 96 horas.

## 4.6. Determinación da actividade antioxidante.

### 4.6.1. Actividade antioxidante as 24 horas.

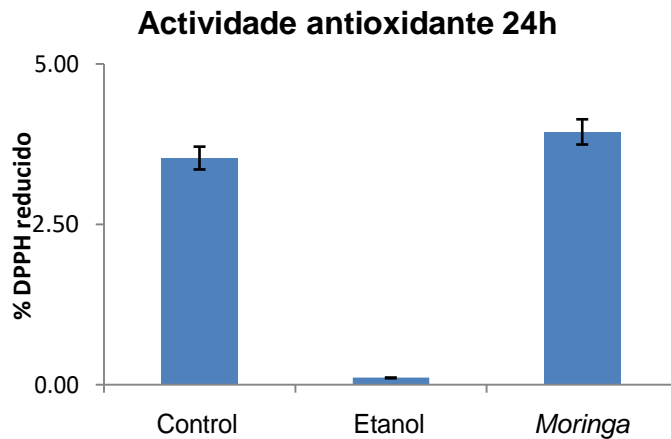


Fig. 6. - Efecto dos distintos elicitores fronte a actividade antioxidante en %, medido as 24 horas despois do tratamento.

Na Fig. 6. representase a actividade antioxidante as 24 horas de elicitar para cada tratamento (Control, Etanol e *Moringa*), observase que o medio extracelular das suspensións celulares de *C. annuum* tratadas con extrato de *Moringa* teñen unha maior porcentaxe de actividade antioxidante, sendo dun 3.94%, séguelle o Control que contén 3.54% de actividade antioxidante. Por outra banda, as suspensións celulares tratadas con Etanol case non presentan actividade antioxidante, tendo unha porcentaxe de 0.11%.

#### Análise estatístico para a actividade antioxidante as 24h

Proba estatística	p-valor
Test de normalidade: <b>Shapiro-Wilk</b>	0.01408
Test de homoxeneidade das varianzas: <b>Levene</b>	0.1877
Test non paramétrico: <b>Kruskal-Wallis</b>	0.004879

Táboa 6. -Resultados das distintas probas estatísticas realizadas as porcentaxes de actividade antioxidante as 24 horas do proceso de elicitación.

Os datos do análise estatístico represéntanse na Táboa 6. O test non paramétrico Kruskal-Wallis é significativo, o que indica que hai diferenzas significativas na actividade antioxidante nos distintos tratamentos.

#### 4.6.2. Actividade antioxidante as 96 horas.

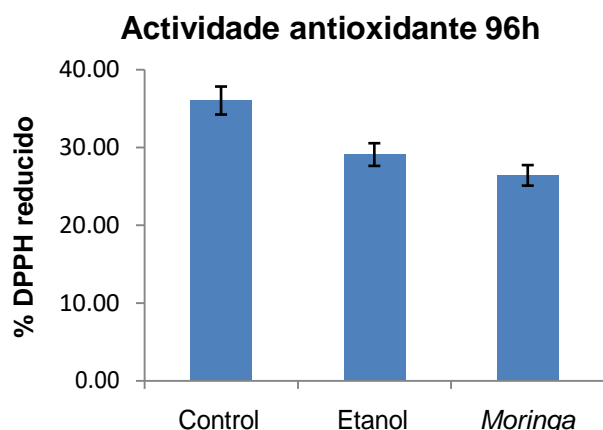


Fig. 7. -Efecto dos distintos elicitores fronte a actividade antioxidante en %, medido as 96 horas despois do tratamento.

Na Fig. 7. Representase a actividade antioxidante as 96 horas, o medio extracelular das suspensións celulares de *C. annuum* con maior actividade antioxidante son Control que obtivo unha porcentaxe do 36.03% , seguidas daquelas tratadas con Etanol con 29.09% de actividade antioxidante e finalmente as tratadas con extrato de *Moringa* que conteñen un 26.40% de actividade antioxidante.

Análise estatístico para a actividade antioxidante as 96h

Proba estatística	p-valor
Test de normalidade: <b>Shapiro-Wilk</b>	0.5008
Test de homoxeneidade das varianzas: <b>Levene</b>	0.6068
Análise das varianzas: <b>ANOVA</b>	$3.1 \cdot 10^{-6}$

Táboa 7. -Resultados das distintas probas estatísticas realizadas as porcentaxes de actividade antioxidante as 96 horas do proceso de elicitación.

Os datos estatísticos para a actividade antioxidante represéntanse na Táboa 7. O test ANOVA é significativo, o que indica que hai diferenzas significativas entre os tratamentos as 96 horas.

#### 4.6.3. Análise da actividade antioxidante as 24 horas e 96 horas.

Comparando as gráficas da actividade antioxidante as 24 horas e as 96 horas (Fig. 6 e Fig.7) observase que a actividade antioxidante aumenta para todos los tratamentos (Control, Etanol, *Moringa*). Sen embargo, a pesar que *Moringa* obtivo a máxima porcentaxe de actividade as 24 horas, as 96 horas é o tratamento con menor actividade antioxidante. Polo que se deduce que o extrato de *Moringa* non eleva significativamente a actividade antioxidante.

## Análise estatístico comparando actividade antioxidante as 24h e as 96h

Proba estatística	p-valor
Test de normalidade: <b>Shapiro-Wilk</b>	$3.1 \cdot 10^{-6}$
Test de homoxeneidade das varianzas: <b>Levene</b>	0.1332
Test no paramétrico: <b>Kruskal-Wallis</b>	$8.48 \cdot 10^{-8}$

Táboa 8. -Resultados das distintas probas estatísticas realizadas as porcentaxes de actividade antioxidante ás 24 horas e 96 horas do proceso de elicitación.

O análise estatístico (Táboa 8) indica que hai diferenzas significativas entre os tratamentos as 24 horas e as 96 horas, xa que o test non paramétrico de Kruskal-Wallis é significativo.

A concentración de fenoles e a actividade antioxidante obtidas non se relacionan, que concorda cos resultados obtidos por González (2017), onde non había correlación entre a concentración de fenoles e actividade antioxidante as 6 horas e 48 horas. Xeralmente, unha maior concentración de fenoles tradúcese nunha maior actividade antioxidante. Sen embargo neste experimento obsérvanse, por exemplo que o tratamento Control as 96 horas presenta unha baixa concentración de fenoles (Fig. 5.) e unha gran actividade antioxidante as 96 horas (Fig. 7.); ou o caso das suspensións celulares de *C. annuum* tratadas con extrato de *Moringa*, as 96 horas presentan unha alta concentración de fenoles (Fig. 5.), sen embargo, as 96 horas presentan unha baixa actividade antioxidante (Fig. 7). Isto é indicativo de que a capacidade antioxidante dunha planta débese ao efecto combinado de diversos factores, como pode ser a presenza de outro tipo de metabolitos antioxidantes (Avella et al., 2008). Outra posibilidade é que, naquelas suspensións celulares de *C. annuum* onde hai unha baixa concentración de fenoles pero unha alta actividade antioxidante, haxa compostos que non se están a medir teñan e que teñan unha gran contribución a capacidade antioxidante (Materska & Perucka, 2005)

## 5. CONCLUSIÓNS.

- Posta a punto dun método de obtención de suspensións celulares de *C. annuum* var *annuum* a partir de *vitro plant* co fin de realizar un ensaio de elicitación cun extrato de follas de *Moringa*.
- A elicitación con extrato de follas de *Moringa* eleva significativamente a concentración de fenoles no medio extracelular das suspensións celulares de *C. annuum* var *annuum* as 96 horas.
- A elicitación con extrato de follas de *Moringa* non eleva significativamente a concentración de fenoles no medio extracelular das suspensións celulares de *C. annuum* var *annuum*, independentemente do tempo.

## 5. CONCLUSIONES.

---

- Puesta a punto de un método de obtención de suspensiones celulares de *C. annuum* var *annuum* a partir de *vitro* plant con el fin de realizar un ensayo de elicitación con extracto de hojas de *Moringa*.
- La elicitación con extracto de hojas de *Moringa* eleva significativamente la concentración de fenoles del medio extracelular de las suspensiones celulares de *C. annuum* var *annuum* a las 96 horas.
- La elicitación con extracto de hojas de *Moringa* no eleva significativamente la concentración de fenoles medio extracelular de las suspensiones celulares de *C. annuum* var *annuum* independientemente del tiempo.

## 5. CONCLUSIONS

---

- Development of a method of obtaining cell suspensions of *C. annuum* var *annuum* from a *vitro* plant in order to carry out an elicitation test with *Moringa* leaf extract.
- The elicitation with *Moringa* leaf extract significantly increases the concentration of phenols in the extracellular medium of cellular suspensions of *C. annuum* var *annuum* at 96 hours.
- The elicitation with *Moringa* leaf extract does not significantly increase the concentration of extracellular phenols in cellular suspensions of *C. annuum* var *annuum*, regardless of time.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

---

- Agrawal, G. K., Jwa, N. S., Lebrun, M. H., Job, D., & Rakwal, R. (2010). Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, 10(4), 799-827.
- Amador, O. (2016). Estudio bromatológico de hojas de *Moringa oleifera* *in vitro* y *ex vitro* y análisis del efecto hipoglucemiante en ratas Wistar diabetizadas (Doctoral dissertation, Tesis de grado) Mexico. Universidad Autónoma de Aguascalientes).
- Avella, D. M. G., García, C. A. O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. In *Memorias del Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Querétaro*.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161-172.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food*

*chemistry*, 99(1), 191-203.

- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay*.
- Díaz, J., Bernal, Á., Pomar, F. & Merino, F. (2001) Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, 179-188.
- Díaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P. M., Ros Barceló, A., Martínez-Gómez, P., & Hernández, J. A. (2006). The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3813-3824.
- González Casas, B. (2017). Ensaio de elicitación de suspensións celulares, empregando como elicitor, extracto de raíz de *Moringa oleifera*. Grao en Bioloxía Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía Área de Fisioloxía Vexetal. Universidade da Coruña. Facultade de Ciencias.
- 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*, 7(13), 82-94.
- Kraujalytė, V., Venskutonis, P. R., Pukalskas, A., Česonienė, L., & Daubaras, R. (2015). Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, 188, 583-590.
- 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(5), 1750-1756.
- Miras-Moreno, B., Sabater-Jara, A. B., Pedreño, M. A., & Almagro, L. (2016). Bioactivity of phytosterols and their production in plant *in vitro* cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7049-7058.
- Nouman, W., Anwar, F., Gull, T., Newton, A., Rosa, E., & Domínguez-Perles, R. (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam. *Industrial Crops and Products*, 83, 166-176.
- Ortega Maldonado, L. (2012). Producción de silimarina en cultivos celulares de Cardo mariano (*Silybum marianum*): efecto de distintos elicitores (TFM, Universidad de Salamanca).
- Pérez, A., Sánchez, T., Armengol, N., & Reyes, F. (2010). Características y potencialidades de *Moringa oleifera* Lam: Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes*, 33(4), 1-1.
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195-211.

- Quiala, E., Barbón, R., Jiménez, E., de Feria, M., Capote, A., Pérez, N., ... & Bidot, I. (2002). Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Bioteología Vegetal*, 2(3), 155-161.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (No. 151). *Ciat*.19-40; 173-195.
- Saini, R. K., Prashanth, K. H., Shetty, N. P., & Giridhar, P. (2014). Elicitors, SA and MJ enhance carotenoids and tocopherol biosynthesis and expression of antioxidant related genes in *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(10), 2695-2704.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675.
- Varga, M., Jójárt, R., Fónad, P., Mihály, R., & Palágyi, A. (2018). Phenolic composition and antioxidant activity of colored oats. *Food Chemistry*, 268, 153-161.
- Verde Yáñez, L. (2017). Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitador un extracto de hojas de *Moringa oleifera*. Grao en Biología Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía Área de Fisiología Vexetal. A Coruña. Universidade da Coruña. Facultade de Ciencias.
- Yasmeen, A., Basra, S. M. A., Farooq, M., ur Rehman, H., & Hussain, N. (2013). Exogenous application of *Moringa* leaf extract modulates the antioxidant enzyme system to improve wheat performance under saline conditions. *Plant Growth Regulation*, 69(3), 225-233.



