

Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas fluorescens* sobre la producción de Flavonoides en *Calendula officinalis*.



Cristian Camilo Castillo Galvis

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

BOGOTÁ D.C.

2019

Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas fluorescens* sobre la producción de Flavonoides en *Calendula officinalis*.

Cristian Camilo Castillo Galvis

José Salvador Montaña Lara, PhD
Director

Geison Modesti Costa, PhD
Codirector

María Ximena Rodríguez, PhD
Evaluadora

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL BOGOTÁ D.C.

2019

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi familia que han sido un constante apoyo en todo mi proceso académico, a mis padres por siempre creer en mí, a mis hermanos por alentarme a cumplir mis metas y a mi hermana Diana en especial por enseñarme a soñar y ser un pilar en todos los aspectos de mi vida.

En segundo lugar, a mi director José Salvador Montaña por su amabilidad, su constante apoyo y sobre todo su paciencia, él ha sido parte fundamental de este trabajo por sus amplios aportes académicos; al igual agradecer a María Ximena por su preocupación por el proyecto y por todos los consejos dados que sirvieron de guía para la culminación de mi tesis. Agradecer a mi codirector Geison Modesti y su semillero de investigación por sus valiosos aportes en la realización de las cromatografías, a él un abrazo muy especial, a la profesora Claudia Rivera por su tiempo, amabilidad y consejos, a ella un sincero gracias.

Por último, a mi compañera de semillero Tatiana Rendón por su apoyo en la parte experimental y brindarme una mano amiga durante todo este tiempo, a Diego Garrido por brindarme tranquilidad y apoyo emocional durante el modelamiento del proyecto, a él un te pienso sincero. Agradecer en general a todas las personas que aportaron a la realización de este trabajo: Amigos, auxiliares de laboratorio, personas encargadas del aseo y guardias; a todos ustedes gracias infinitas por hacer posible este proyecto.

“Cuando el tiempo pase y tú me olvides,
Silencioso vivirás en mí; porque en la
Penumbra de mis pensamientos todos
Los recuerdos me hablarán de ti”

Atribuido a Gustavo Adolfo Becker

Tabla de contenido

Resumen	7
1.Introducción	8
2.Planteamiento del problema	9
2.1 Justificación	9
3 Marco Teórico	10
3.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR's)	10
3.1.1 <i>Azotobacter</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp, PGPRs como potenciales biofertilizantes en agricultura	11
3.2 <i>Calendula officinalis</i>	12
3.4 Flavonoides	13
4.0 Objetivo general	16
4.1 Objetivos específicos	16
5. Metodología	16
5.1 MICROORGANISMOS DE ESTUDIO	16
5.1.1 Reactivación de cepas bacterianas	16
5.2 MATERIAL VEGETAL	17
5.3 Pruebas de antagonismo in vitro	18
5.4 Preparación de LOS inóculos	18
5.5 Evaluación de temperatura y % de humedad relativa en el invernadero DURANTE EL EXPERIMENTO	19
5.6 Diseño experimental	20
5.7 Evaluación del crecimiento	20
5.8 Evaluación en la producción de flavonoides	21
5.9 TRATAMIENTO DE LOS DATOS	22
6.Resultados	22
6.1 Pruebas de Antagonismo	22
6.2 condiciones de Temperatura y Humedad Relativa en invernadero	23
6.3 Evaluación del crecimiento	25
6.4 Cuantificación de flavonoides	28
7. Discusión de resultados	33
8. Conclusiones	38
Recomendaciones	38
9.Referencias	38
Anexos	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Preparación de los tratamientos con base en los inóculos de cada una de las cepas de estudio	19
Tabla 2. Número de botones florales por semanas.....,,,	27

Índice de Figuras

Figura 1. Ruta Biosintética de distinto flavonoides.....	15
Figura 2. Clasificación de flavonoides según su estructura.....	16
Figura 3. Aislamientos de los microorganismos en medio LBA.....	17
Figura 4. Técnicas usadas para las pruebas de antagonismo.....	19
Figura 5. Disposición de material vegetal	21
Figura 6. Pruebas de antagonismo.....	24
Figura 7. Relación entre la temperatura máxima y mínima durante el periodo de evaluación del crecimiento del cultivo de Caléndula	25
Figura 8. Relación entre el porcentaje de humedad relativa máxima y mínima durante el periodo de evaluación del crecimiento del cultivo de Caléndula.....	23
Figura 9. Evaluación del crecimiento de plantas de caléndula bajo los tratamientos T1,T2,T3,T4 y T8 (Control)	28
Figura 10. Evaluación del crecimiento de caléndula en los tratamientos T5,T6,T7 y T8 (Contol)	29
Figura 11. Perfil cromatográfico de una muestra por tratamiento.....	31
Figura 12. Cromatograma del perfil fitoquímico de los tratamientos.....	32
Figura 13. Espectro de absorción de UV en los picos 1 ,2,3 y 4.....	33
Figura 14. Cromatograma de la muestra control y una muestra de tratamiento 5.....	35
Figura 15. Concentración de rutina en flores de caléndula.....	36

RESUMEN

La agricultura en el mundo representa un importante papel en el desarrollo de muchos países, haciendo fundamental el estudio de estrategias que permitan prácticas agrícolas amigables que respeten el medio ambiente y estén en concordancia con el cuidado del planeta. El uso de suelo para practicas agrícolas en cada país es dinámico y depende del contexto económico y social en cada caso. En este escenario, el uso del suelo para la actividad agrícola relacionada con el cultivo de plantas medicinales para aplicaciones en la industria farmacéutica, de alimentos, pigmentos y fertilizantes ha cobrado un especial interés. Una de las plantas más importantes en el mercado colombiano de plantas medicinales es *Calendula officinalis*, que aún cuando no representa un área de cultivo agrícola relevante, su importancia está dada por el uso en la industria farmacéutica. Aproximadamente el 70 % de laboratorios de fitomedicamentos la usan como materia prima debido a sus cualidades farmacológicas, determinadas por moléculas asociadas al metabolismo secundario. Considerando las nuevas políticas y lineamientos sobre el cuidado del suelo y el uso restringido de agroquímicos, es importante la búsqueda de esquemas de fertilización menos agresivos, que den un valor agregado a los sistemas productivos. En ese sentido, los biofertilizantes basados en microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPRs) aparecen como una buena opción para incrementar la producción de metabolitos secundarios de interés industrial en especies medicinales. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (*Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, y *Pseudomonas fluorescences*) sobre el crecimiento y producción flavonoides en caléndula. Se utilizaron plantas de un mes de edad, que fueron inoculadas con los microorganismos solos o en consorcio. Se evaluó el crecimiento de las plantas y la producción de flores durante 2 meses. La determinación de flavonoides y cuantificación de rutina (principal flavonoide de la flor) se realizó mediante UHPLC. Los resultados obtenidos permitieron concluir que los tratamientos más efectivos para promover el crecimiento de plantas de caléndula y la producción de flavonoides, particularmente “rutina” fueron T2 (*A. chroococcum*) T5 (*A. vinelandii* y *P. fluorescens*) y T6 (*A. chroococcum* y *P. fluorescens*).

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas el surgimiento de diversos acontecimientos, como la globalización, las cadenas de valor integradas, las rápidas innovaciones tecnológicas e institucionales, las restricciones ambientales y el aumento del precio de los bienes agrícolas, ha tenido como consecuencia que la agricultura retome a la agenda mundial. Así pues, la agricultura toma de nuevo un papel importante en el desarrollo de diversos aspectos como el crecimiento económico, la sostenibilidad ambiental, la reducción de la pobreza y del hambre, y el logro de mayores niveles de equidad y de seguridad alimentaria [1].

El aumento de la actividad agrícola conlleva una serie de responsabilidades ambientales que se deben abordar bajo una perspectiva multidisciplinar. El agotamiento de nutrientes por sobreexplotación agrícola, la contaminación de aguas subterráneas por esquemas erróneos de fertilización y el uso indiscriminado de fertilizantes químicos que afectan la salud humana, son algunos de los problemas que se deben abordar. Una de las estrategias empleadas para reemplazar parcialmente los fertilizantes químicos y mitigar los impactos ambientales, es el uso de biofertilizantes, considerados amigables con el suelo y en consecuencia un impacto positivo en la producción agrícola. Los biofertilizantes son productos que contienen microorganismos que son benéficos para las plantas [2]. Dentro de los microorganismos más usados en la formulación de los biofertilizantes se encuentran las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPRs por sus siglas en inglés (*plant growth promoting rhizobacteria*) que se definen como un grupo de bacterias que desarrollan una interacción bidireccional benéfica con las plantas, donde la planta provee nutrientes como azúcares y vitaminas a las bacterias y estas, mediante diversos procesos como la fijación del nitrógeno, la producción de fitohormonas o de sustancias como los sideróforos, promueven el crecimiento[3]. Algunas de las especies bacterianas reportadas como PGPR son: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas fluorescens*. Su actividad promotora del crecimiento vegetal, se encuentra determinada por la producción de algunos compuestos como: ácidos orgánicos (indolacético, indolbutírico, giberélico), que promueven el crecimiento apical del tallo o brotes, así como la elongación de las raíces [4,5]. Aunque estos microorganismos han sido empleados de manera individual en varios cultivos, con

resultados promisorios, su uso colectivo o en consorcio, permite potenciar la actividad promotora del crecimiento vegetal [3,5]. Las especies vegetales en las que se emplean con mayor frecuencia los biofertilizantes son aquellas que tienen algún interés agropecuario, industrial o inclusive valor ecológico [5,6].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción industrial de plantas para uso medicinal cada vez es más importante debido al impacto que tiene dentro de sectores como el farmacéutico, alimentos y agrícola. De igual manera, esta parte del sector agrícola también se enfrenta al uso intensivo del suelo con la aplicación excesiva de fertilizantes químicos que, por su uso indiscriminado, han generado un impacto negativo al medio ambiente, deteriorando suelos y cuerpos de agua e inclusive afectando, en gran medida, la salud del ser humano [2]. Como consecuencia de esto, la actividad agrícola, hoy en día está tomando otro rumbo, promoviendo estrategias de agricultura sostenibles y amigables con el medio ambiente. Una de estas estrategias busca reemplazar total o parcialmente los fertilizantes químicos por fertilizantes orgánicos o biofertilizantes.

2.1 JUSTIFICACIÓN

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas (flavonoides, carotenoides, saponinas entre otros,) adquieren especial importancia debido al uso industrial. Por ejemplo, en la industria farmacéutica es común el uso de extractos de algunas plantas para la producción de fitomedicamentos. Se encuentra documentado que aproximadamente el 60% de compuestos anticancerígenos y el 75% de medicamentos contra enfermedades infecciosas, son productos naturales de origen vegetal o derivados de estos [7]. Es importante entonces, generar conocimiento para optimizar la producción vegetal orientada a la obtención de metabolitos secundarios. Cuando se evalúa la eficiencia de una PGPR, generalmente los parámetros que se tienen en cuenta son, tamaño de la planta, peso seco, longitud de tallos y raíces, cantidad de hojas y antagonismo contra un patógeno [3], pero además de los parámetros tradicionales se ha demostrado que las PGPR pueden llegar a afectar de manera positiva la producción de metabolitos secundarios de la planta [8]. Una de las especies vegetales más usada para la obtención de metabolitos secundarios es *Calendula officinalis*. Esta especie ha demostrado tener un potente efecto farmacológico como antiinflamatorio, anticancerígeno, cicatrizante etc. Además, por tratarse de una planta de crecimiento

rápido en condiciones variables y porte herbáceo, se convierte en un modelo útil para evaluar el efecto de la aplicación de PGPRs sobre la producción de metabolitos [9,10].

Según la encuesta nacional de plantas medicinales y aromáticas de Colombia, realizada por el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt [11], la caléndula (*Calendula officinalis*) es empleada por el 72% de los laboratorios del país y es la especie con mayor volumen de comercialización con un porcentaje total de 26,9% [4]. Su carácter terapéutico y medicinal está determinado por la producción de metabolitos secundarios asociados a actividades antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobiana entre otras [9]. Algunos de los metabolitos asociados al carácter medicinal de la planta son los flavonoides, carotenoides y saponinas que se encuentran en su mayoría en la flor de la planta [12].

Los flavonoides son las moléculas más importantes del metabolismo secundario debido a la importancia que tiene en diversas funciones de la planta como: la comunicación celular y la protección contra los patógenos; además presenta importancia en la industria, ya que estas moléculas se utilizan como pigmentos en la industria de alimentos y como componente activo en la producción de medicamentos [13]. A través de técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se han identificado diversos flavonoides en la caléndula. Entre los más importantes se encuentran: la rutina, la quercetina y la narcisina [14].

3 MARCO TEÓRICO

3.1 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR'S)

La rizósfera se conoce como el espacio alrededor y bajo la influencia de las raíces de las plantas, además de la superficie de las raíces que están en contacto íntimo con las moléculas del suelo [15]. En la rizósfera, ocurren diversas interacciones entre las plantas, los microorganismos, el suelo y la micro y macro fauna; el estudio de estas interacciones resulta clave para entender procesos como los ciclos biológicos, la infección por parte de patógenos (bacterias, hongos y nemátodos fitoparásitos) y la promoción del crecimiento vegetal. En la rizósfera, las bacterias son los organismos más comunes de encontrar y estas pueden desarrollar tres tipos de relaciones con las plantas, neutral, antagónico o benéfico; entender la manera como suceden y se desarrollan estas relaciones ha sido objeto de estudio durante las últimas décadas [16].

Las bacterias que desarrollan una relación benéfica con la planta se conocen comúnmente como PGPRs (plant growth-promoting rhizobacteria) son bacterias que se encuentran asociadas a las raíces de la mayoría de plantas, las cuales tienen potencial para mejorar el crecimiento y la producción de algunos metabolitos secundarios [2,17]. Existen mecanismos directos que inciden en el crecimiento de la planta como la producción de reguladores de crecimiento vegetal, solubilización del fósforo o fijación del nitrógeno, y mecanismos indirectos como la inhibición de patógenos entre otros [6]. Los mecanismos de acción de las PGPRs están relacionados directamente con el género y especie de las bacterias, un ejemplo de esto es *Rhizobium* sp que es el único género de bacterias que, gracias a la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas y la acción de la enzima nitrogenasa, es capaz de fijar nitrógeno atmosférico para que de esta manera pueda ser asimilado por la planta [18].

Otro mecanismo relacionado con la promoción de crecimiento vegetal es la producción de sideróforos, que corresponden a agentes quelantes de metales como el hierro, haciéndolo asimilable para la planta [19] y la capacidad de estimular el sistema de respuesta de la planta frente al ataque de agentes patógenos [20]. Debido a la importancia que han tomado las PGPRs, se han realizado estudios para evaluar el efecto de estas sobre el crecimiento, producción y estado fitosanitario de especies vegetales de importancia agrícola como el tomate, banano y legumbres, obteniendo resultados positivos [18]. Todo lo anterior, ha motivado la búsqueda de PGPRs en suelos de cultivos agrícolas que sigan buenas prácticas y esquemas de sostenibilidad adecuados, con el fin de desarrollar y formular biofertilizantes que puedan ser usados a gran escala y así mitigar los problemas generados por la fertilización química [6].

Diversos microorganismos son capaces de desarrollar relaciones benéficas con plantas y por lo tanto se usan como biofertilizantes, pero existen en particular grupos de microorganismos que han sido ampliamente estudiados en diversas especies vegetales debido a la alta tasa de éxito, dentro de este grupo de microorganismos encontramos a: *Azotobacter* sp, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp y actinobacterias como *Streptomyces* sp [3,5]

3.1.1 *Azotobacter* sp. y *Pseudomonas* sp, PGPRs como potenciales biofertilizantes en agricultura

El género *Azotobacter* corresponde a bacterias con morfología de bacilos Gram negativos, heterótrofas y de vida libre, generalmente asociadas a la rizósfera de la planta. Son varios los estudios que reportan las especies *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *paspali* y *beijerinckii* como potenciales PGPRs [5,21], debido a la producción

de compuestos como ácido indol acético, ácido indol butírico, sideróforos o por la capacidad de fijar nitrógeno de forma no simbiótica y solubilizar fósforo [22,23,24].

De otra parte, *Pseudomonas fluorescens* es la especie más representativa del género *Pseudomonas* y se encuentra descrita como promotor de crecimiento vegetal. Algunos mecanismos por los cuales *P. fluorescens* ejerce esta actividad son: la producción de sideróforos y reguladores de crecimiento vegetal y la protección contra patógenos a través de diferentes mecanismos de antagonismo [25]. Tanto *Azotobacter* sp como *Pseudomonas* sp poseen mecanismos que pueden llegar a beneficiar de manera extraordinaria muchas especies de plantas, razón por la que hoy en día existe un gran interés en estudiar fisiología, genética y ecología de estos microorganismos, con el fin de desarrollar biofertilizantes que contenga de manera conjunta especies de ambos géneros. Aunque estas bacterias se han utilizado con el fin de aumentar la producción en varios cultivos de importancia agrícola, hoy en día persiste el interés de conocer el impacto que tienen estas bacterias, no solo en el crecimiento, sino en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico en algunas especies vegetales [8,10].

3.2 CALENDULA OFFICINALIS

Calendula officinalis es una planta aromática, clasificada taxonómicamente como: angiosperma, perteneciente al subfilo Barnadesiosidae y a la familia Asteraceae y. En el ámbito botánico, se describe como una planta herbácea anual de tallo robusto, anguloso, que alcanza una altura de 40 a 60 cm, sus hojas son oblanceoladas, con bordes levemente dentados [26]. Las flores se presentan en cabezuelas solitarias terminales de unos 5 cm de ancho, tubulosas y color amarillo a anaranjado [27-28]. El cultivo de la caléndula se lleva a cabo con éxito en climas templados, aunque tiene buena resistencia al frío y a las sequías [12]. *C. officinalis* Es poco exigente en cuanto al tipo de suelo, pero siempre son preferibles aquellos con buen contenido de materia orgánica y que no sean compactos ya que se debe permitir la germinación de las semillas [27]. Debido a que es una planta que sufre el anegamiento, es muy importante la nivelación del terreno antes de hacer cualquier labor [28]. En los procesos de fertilización siempre se recomienda el uso de fertilizantes orgánicos mezclados con alguno de naturaleza mineral, la fertilización debe ser más rica en potasio y fósforo que en nitrógeno, ya que un exceso de este causará un desarrollo exagerado del follaje y un detrimento en la floración y tamaño de las cabezuelas [26].

3.3 PGPRs Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CALÉNDULA

Estudios recientes relacionados con la producción de metabolitos secundarios en plantas aromáticas, han demostrado la influencia positiva de la inoculación con PGPRs en especies filogenéticamente relacionadas con la caléndula. A partir de estos trabajos se ha podido establecer, que la síntesis de metabolitos secundarios se ve incrementada, por la inoculación con estas bacterias. Por ejemplo: en una gama de 42 compuestos analizados en caléndula, 24 aumentaron en función de la inoculación con PGPRs [8,10].

Con respecto al perfil fitoquímico de la caléndula, existen diversos compuestos que le dan su carácter farmacológico, entre los grupos más importantes se encuentran los carotenoides y flavonoides. A través de técnicas como HPLC O HPTLC se ha determinado el contenido de estas moléculas en las plantas de caléndula [14]. El contenido de carotenoides, corresponde al 0,078% del peso seco de las flores. Algunos de los compuestos identificados son α , β , y γ -caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentiaxantina, auroxantina, microxantina, 5,6 epoxicaroteno, β -zeacaroteno, mutatoxantina y lutein epóxido [29].

Con relación a los flavonoides, se plantea un contenido de 0,88% en flores. Algunos de los compuestos descritos son isorhamnetina-3-O-glucósido, isorhamnetina-3-O-rutinósido, isorhamnetina-3-O-neohesperidósido, quercetina-3-O-glucósido, calendoflosido, calendoflavosido, calendoflavobiosido, narcisina, isoquercetina, quercetina, rutina y kaemferol [29,30,14].

3.4 FLAVONOIDES

Los flavonoides son un grupo de más de 4000 compuestos polifenólicos que se producen naturalmente en alimentos de origen vegetal. Estos compuestos poseen una estructura común de fenil benzopirona (C6-C3-C6) y se clasifican de acuerdo con el nivel de saturación y apertura del anillo de pirona central, principalmente en flavonas, flavanoles, isoflavonas, flavononas, y flavonoles (figura 2) [31]. Los flavonoides están presentes en todos los miembros del reino Plantae, y a ellos se atribuyen tres funciones como: 1. proporcionar los colores brillantes de las frutas y verduras en las que se encuentran, 2. ayudar a regular el crecimiento de las plantas, 3. absorber las radiaciones dañinas de la luz ultravioleta, 4. proteger la planta contra las plagas, 5. Capacidad para inhibir los agentes infecciosos y 6. ayudar a las células vegetales a comunicarse [32]. Los

flavonoides también afectan los sabores y olores de las frutas y verduras y proporcionan la astringencia de algunos tés y vinos [13].

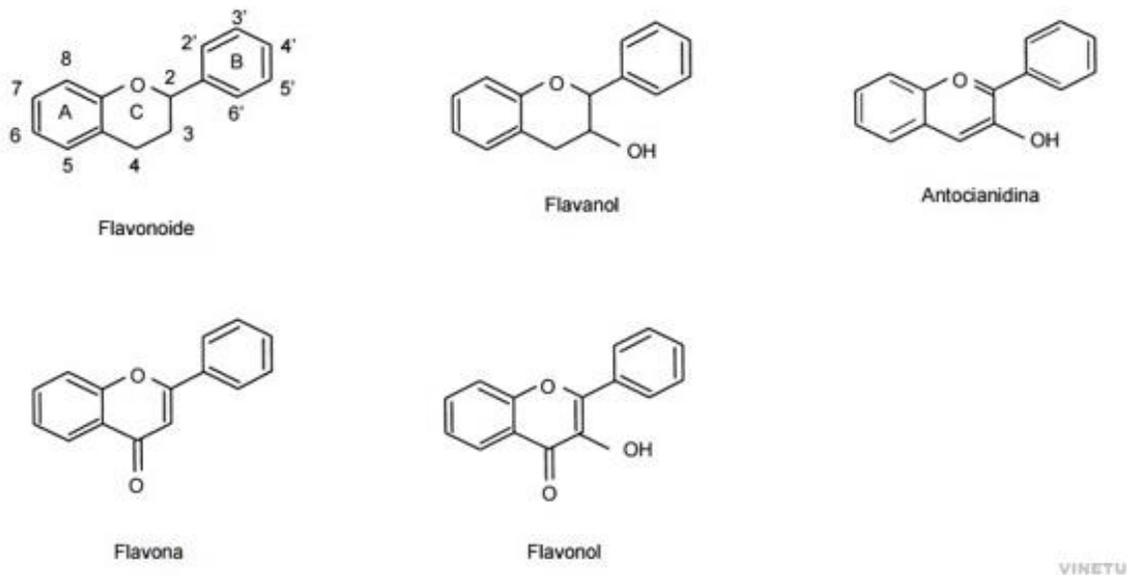


Figura 1. Clasificación de flavonoides según su estructura [13].

No existe un metabolito secundario producido en plantas más estudiado que los flavonoides y esto se debe a la importancia en procesos de reproducción en las plantas y al valor agregado que tiene sobre la salud del ser humano, ya que dentro del amplio grupo de los flavonoides existen moléculas que tienen un carácter farmacológico como antioxidantes, anti-inflamatorios y anticancerígenos [33]. Las isoflavonas por ejemplo son fitoestrógenos, lo que significa que actúan en las plantas, pero podrían funcionar como la hormona estrógeno que es producida por el cuerpo humano. Los investigadores no están seguros de si las isoflavonas funcionan como antioxidantes, pero sí piensan que podrían ayudar con algunos tipos de cáncer, así como con la pérdida ósea y algunas otras afecciones relacionadas con la menopausia [13].

La ruta de síntesis de los flavonoides puede variar debido a la diversidad de flavonoides y la complejidad de su estructura (figura 1), así como de los mecanismos de regulación de la expresión genética asociados a la especie vegetal. Existen moléculas precursoras comunes en todas las rutas de biosíntesis de compuestos polifenólicos, la clave para la biosíntesis de flavonoides es la fenilalanina que resulta de la ruta biosintética del ácido

shikímico, y el malonil- CoA derivado del citrato producido en el ciclo del ácido tricarbóxicos [13]. La enzima Fenilalanina amonio-liasa actúa sobre la fenilalanina produciendo cinamato que luego es transformado a 4-Coumarato por acción de la enzima cinamato 4-hidrolasa, luego actúa 4-Coumarato: CoA ligasa para producir 4-coumaroil- CoA, por último es necesario la presencia de 3 moléculas de malonil CoA y las enzimas chalcona sintasa y policétido reductasa, a partir de allí, como se observa en la figura 1 pueden ocurrir diversos procesos de transformación, dependiendo de la batería enzimática y la regulación génica [33].

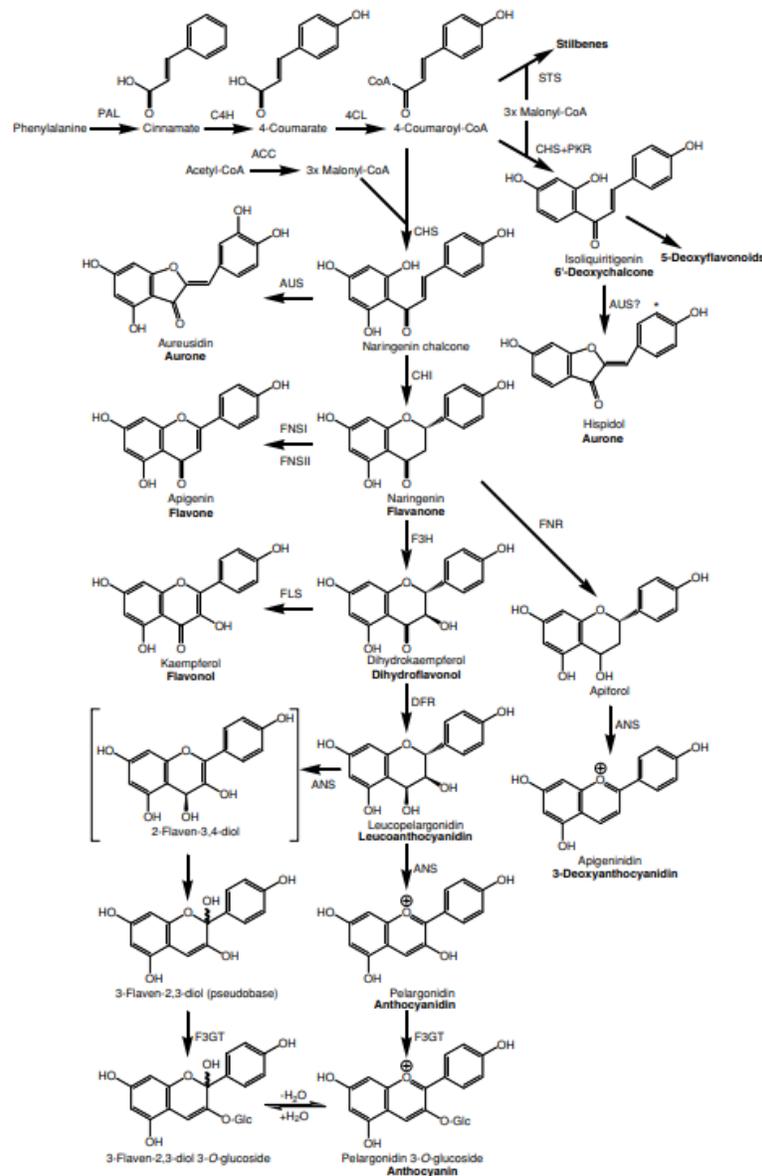


Figura 2 . Ruta biosintética de distintos Flavonoides. [13]

4.0 OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de *Azotobacter chroococcum*- *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas fluorescens* solos o en consorcio, sobre el crecimiento y la producción de flavonoides en *Calendula officinalis*

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar *in vitro* la relación antagónica entre *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas fluorescens*
- Evaluar el crecimiento de plantas de caléndula en función de la inoculación individual y conjunta de *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas fluorescens* bajo condiciones de invernadero.
- Cuantificar mediante UHPLC un marcador tipo flavonoide (rutina) en plantas de caléndula inoculadas con *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas fluorescens* bajo condiciones de invernadero.

5. METODOLOGÍA

5.1 MICROORGANISMOS DE ESTUDIO

Las cepas utilizadas en este estudio corresponden a una cepa aislada de un cultivo de tomate ubicado en el altiplano cundiboyacense (C5T) identificado en trabajos anteriores como *Azotobacter chroococcum* [28] y cepas de *Azotobacter vinelandii* ATCC (CAV) y *Pseudomonas fluorescens* ATCC (CPF) que fueron proporcionadas por la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ).

5.1.1 Reactivación de cepas bacterianas

La reactivación de las cepas se realizó en caldo BHI durante una noche en un agitador de órbita circular a 28 °C y 120 rpm. Con las cepas reactivadas, el cultivo se ajustó a una absorbancia de 0.2 a 540 nm, que corresponde a 10^8 células/ml y se elaboró un banco de trabajo con un volumen final de 1.5 mL con glicerol al 30 %. Durante el proceso se verificó la pureza de los bancos a través de tinción de Gram y microscopia 1000X (Figura3).

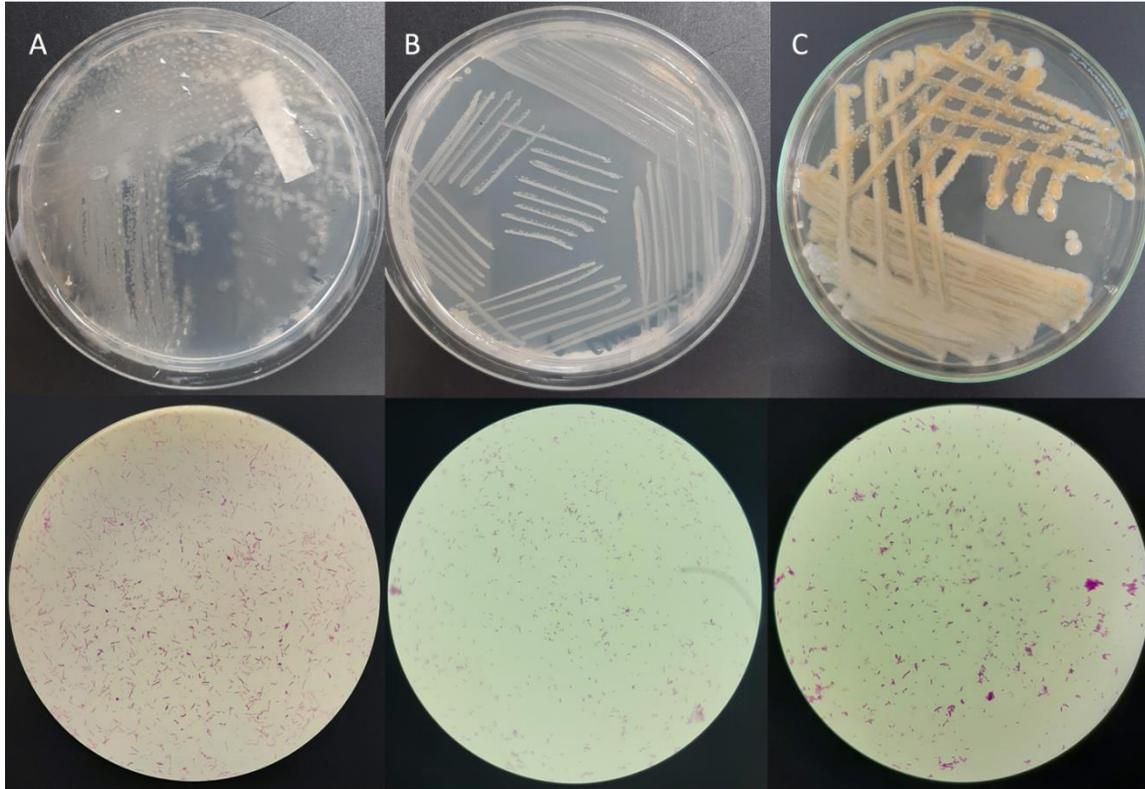


Figura 3. Aislamientos de los microorganismos en medio LBA (Luria Bertani Agar), con sus respectivas microscopías) A) *Azotobacter vinelandii*. B) *Pseudomonas fluorescens*. C) *Azotobacter chroococcum*

5.2 MATERIAL VEGETAL

Para el estudio se utilizaron plántulas de *Calendula officinalis* variedad Pacífex mix de un mes de crecimiento, adquiridas en el centro de bio-sistemas de la universidad Jorge Tadeo Lozano; estas plántulas fueron germinadas en condiciones de invernadero a una temperatura de 26 °C, humedad relativa de 90% y un pH del sustrato de 5.8. El crecimiento de la plántula se llevó a cabo a una temperatura de 18 °C, una humedad relativa de 75% y un pH del sustrato 5.8. En ambos casos, el sustrato empleado correspondió a una mezcla de Turba-Coco. El trasplante se realizó de manera individual a macetas plásticas de 14 cm de diámetro, altura de 12 cm y un volumen máximo de 1,6L. Todo el material fue dispuesto en el invernadero de docencia de la Universidad Javeriana. El sustrato utilizado fue una mezcla de suelo, cascarilla de arroz y turba en una relación 8:1:0.3, con un pH de 4.75.

5.3 PRUEBAS DE ANTAGONISMO IN VITRO

Para determinar si existía antagonismo entre los microorganismos propuestos en el estudio, se llevaron a cabo los procedimientos descritos por Holland [37] con algunas modificaciones. Una primera estrategia consistió en sembrar cada cepa de manera masiva la mitad de cada caja de medio LBA (Luria Bertani Agar) y posteriormente sembrar 3 estrías con las otras cepas en la otra mitad del medio a una distancia de 0.5 cm (Figura 4A). La segunda estrategia consistió en realizar una siembra masiva de cada cepa, posteriormente se hicieron 4 pozos en los cuales se colocó una suspensión de 50 μ l ajustada a una concentración de 10^8 células/mL de las cepas restantes (2 por cada uno), de igual manera cada cepa fue enfrentada entre sí (Figura 4B).

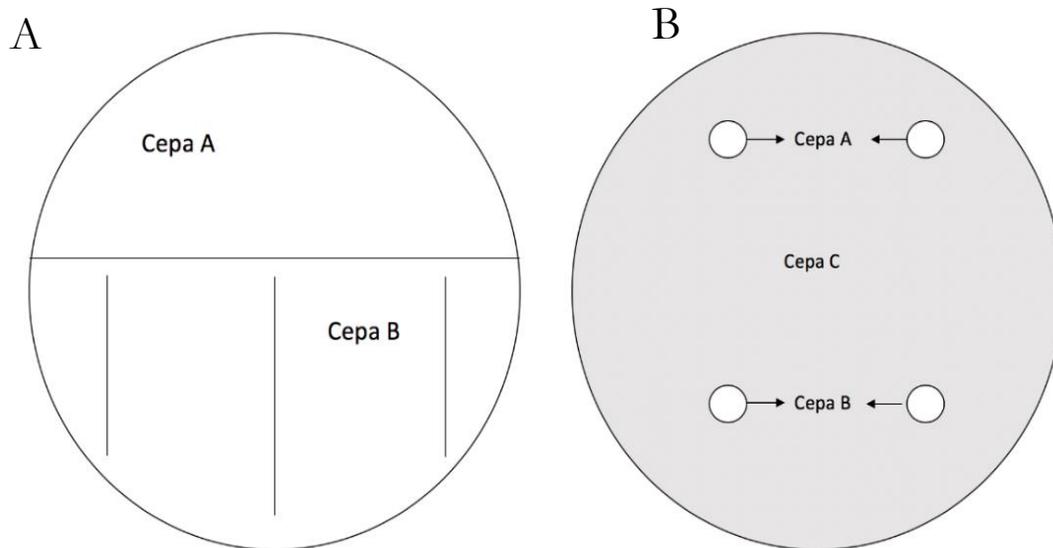


Figura 4. Técnicas usadas para las pruebas de antagonismo. A) técnica por estrías, B) prueba de pozos.

5.4 PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

Para preparar el inóculo, inicialmente se realizó una reactivación en caldo LB (Luria Bertani), luego de una noche de crecimiento a una temperatura de 28 ° C y 120 rpm, el cultivo se centrifugó a 3000 g por 15 minutos para separar las células del medio. Posteriormente se realizaron tres lavados, para garantizar que no quedaran restos del medio de cultivo. Las células bacterianas se suspendieron en solución salina al 0.85% ajustando a una concentración de 10^8 células/mL. A partir de los inóculos en solución

salina se prepararon los tratamientos descritos en la tabla 1. La pureza de las cepas fue verificada mediante tinción de Gram y la concentración del inóculo se determinó mediante absorbancia a 540 nm, ajustando una densidad óptica de 0,2 equivalente a una concentración inicial de 10^8 células/ml. El volumen inoculado a cada planta fue de 3 mL con el fin de mantener las proporciones en concentración de cada uno de los microorganismos. La forma de inoculación fue mediante la aplicación de la suspensión de manera superficial en el sustrato, 4 y 17 días después del trasplante [34].

Tabla 1. Preparación de los tratamientos con base en los inóculos de cada una de las cepas de estudio

Tratamiento	<i>Azotobacter vinelandii</i> (CAV) (mL)	<i>Azotobacter chroococcum</i> (C5T) (mL)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (CPF) (mL)	Solución Salina (mL)
1	50	0	0	0
2	0	50	0	0
3	0	0	50	0
4	25	25	0	0
5	25	0	25	0
6	0	25	25	0
7	20	20	20	0
8 Control -	0	0	0	50

5.5 EVALUACIÓN DE TEMPERATURA Y % DE HUMEDAD RELATIVA EN EL INVERNADERO DURANTE EL EXPERIMENTO

Con el fin de realizar un seguimiento a las condiciones de microclima del invernadero, durante el tiempo de experimentación, se registraron los valores máximos y mínimos de temperatura y humedad relativa durante 8 semanas. Para tal fin, se utilizó un termohigrómetro digital que fue colocado dentro del invernadero, sobre el mesón donde se colocó el material vegetal trasplantado. Los valores de temperatura y humedad relativa fueron registrados diariamente, sin embargo, luego de un análisis estadístico (anexos 6 y 7) para fines prácticos, solo se reportan los datos semanales.

5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

El material vegetal se dispuso en bloques en el invernadero, considerando un bloque por cada tratamiento. Para esto, se tomaron 15 plantas por cada uno de los tratamientos descritos en la tabla 1 para un total de 120 plantas. Debido a la naturaleza no homogénea del material vegetal, las plantas se dividieron en 3 grupos: plantas pequeñas hasta 7 cm de altura, plantas medianas de 7 a 9 cm de altura y plantas grandes, más de 10 cm de altura; en cada tratamiento se ubicaron 5 de cada grupo para un total de 15 (Fig 5)



Figura 5. Disposición del material vegetal en el invernadero. A la izquierda se muestra un bloque de 15 plantas (5 pequeñas, 5 medianas 5 grandes) correspondientes a un tratamiento y a la derecha el montaje completo en el invernadero.

5.7 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO

El crecimiento se evaluó en 20 momentos diferentes: Tiempo 0 una vez se realizó el trasplante, Tiempo 1 a los 15 días y posteriormente cada 3 días hasta finalizar el ensayo. Hacia el final del estudio se registraron parámetros adicionales como el aspecto general de la planta, cantidad de botones florales y tiempo de floración.

5.8 EVALUACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE FLAVONOIDES

Para la extracción y evaluación de flavonoides de la caléndula se usaron los protocolos establecidos por el Grupo de Investigación Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ). Las flores fueron recogidas una vez llegaron a su máxima apertura, en un tiempo máximo de dos semanas desde la aparición del botón floral. Una vez recolectado el material vegetal, las flores fueron maceradas en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. Como resultado se obtuvo un polvo fino que se almacenó a -70°C . Posterior a la recolecta y macerado, el material vegetal fue traspasado a un tubo Falcon, al cual se adicionaron metanol, agua y diclorometano, en una proporción de 1:1:2 (v/v/v). La relación masa de material vegetal y volumen de solvente fue 0,3:10. Posteriormente, se agitó la mezcla durante 30 segundos en vórtex y se extrajo durante 5 minutos en baño de ultrasonido, con posterior centrifugación de las muestras por 8 minutos a 3000Xg. Una vez separadas los solventes (Metanol + Agua y Diclorometano) y el material vegetal, se realizó el filtrado de 1 mL de la fase hidroalcohólica (Metanol + Agua) en membranas de PTFE $0.22\ \mu\text{m}$ (CNW[®]), esta solución, que contiene los flavonoides, fue llevada al cromatógrafo para su posterior análisis.

La técnica cualitativa y cuantitativa usada fue UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography Waters[®]), en donde se usó una columna Phenomenex Kinetex[®] 2.6 μm EVO C18 (100 X 2.1mm) a una temperatura de 45°C . La fase móvil fue utilizada en gradiente, la fase A era una solución de acetonitrilo y la solución B ácido fórmico al 0.1 %, de la siguiente manera: 0-1 min, 1% de A; 1-5 min 10% de A; 5-10 min 25% de A; 10-12 min, 95% de A; 12-13 min, 1% de A; 13-15 min, 1% de A. La longitud de onda empleada fue 350 nm, el volumen de inyección fue de $3\ \mu\text{L}$, el flujo de corrida fue de $0.65\text{mL}/\text{min}$ y la temperatura de la muestra fue de 20°C .

Para la cuantificación, además de las condiciones cromatográficas previamente descritas, se empleó una curva de calibración del flavonoide rutina, según metodología previamente validada por el grupo GIFUJ. Brevemente, la curva de calibración se construyó mediante 7 soluciones de rutina a concentraciones de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, $\mu\text{g}/\text{mL}$, por triplicado. El límite de detección (LOD) establecido fue de $0,195\ \mu\text{g}/\text{mL}$ y el límite de cuantificación (LOQ) fue de $0,39\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (Anexo 11).

5.9 TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Los datos de altura fueron promediados por cada grupo de 5 plantas (grandes, pequeñas, mediana) se procedió a realizar una normalización de datos mediante la determinación de la desviación estándar y el delta de variación entre los tiempos. Como resultado de la normalización y el análisis del delta de variación, se observó que era posible promediar todos los datos por tratamiento debido al que el delta era similar en todos los grupos de plantas.

Los datos obtenidos del pico de rutina fueron procesados con la ecuación de la recta de la curva patrón para determinar la concentración, luego se promediaron estos datos y se halló el coeficiente de variación para determinar la significancia de los valores encontrados. Los valores de área bajo la curva de los demás picos fueron promediados, de la misma forma se calculó el coeficiente de variación. Aunque no se conoce que compuestos son en particular y no se puede hallar la concentración, el área bajo la curva es un valor relativo que nos puede dar una aproximación a la cantidad de flavonoides producida.

6.RESULTADOS

6.1PRUEBAS DE ANTAGONISMO

Empleando las técnicas descritas en materiales y métodos, se determinó que no se presenta antagonismo entre las cepas empleadas en el estudio. En la técnica de enfrentamiento por estrías, no se observó crecimiento irregular o limitado del microorganismo que fue sembrado de forma masiva (Fig 6B, 6C, 6D). Por su parte, empleando la técnica de siembra masiva vs siembra en pozos, se observa crecimiento masivo del microorganismo alrededor de los pozos donde fueron inoculadas las otras cepas (Fig 6E). Empleando esta técnica, generalmente el antagonismo se evidencia por la falta de crecimiento del microorganismo sembrado de forma masiva alrededor de los pozos. Los resultados obtenidos, permiten confirmar que no se presenta antagonismo entre las cepas de estudio y es posible trabajar consorcios microbianos entre los microorganismos evaluados.

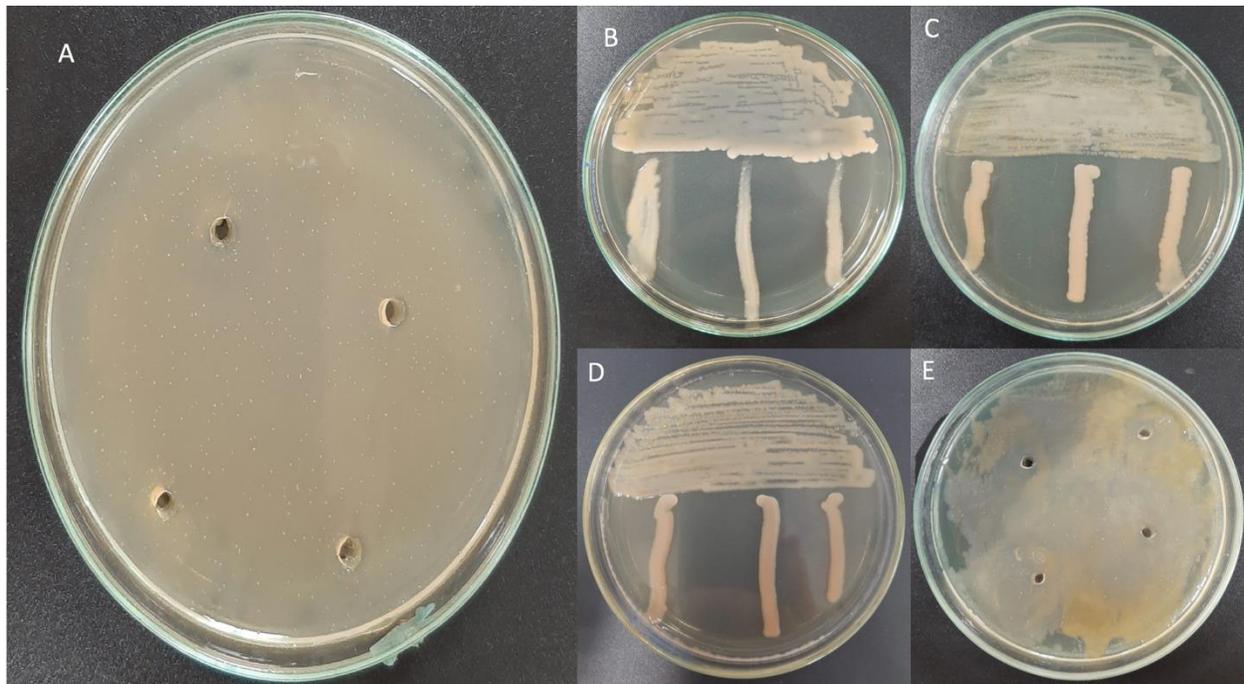


Figura 6. Pruebas de antagonismo A) *Pseudomonas fluorescens* (masivo) vs *Azotobacter chroococcum* (pozos), B) *Pseudomonas fluorescens* (masivo) vs *Azotobacter chroococcum* (estría), C) *Azotobacter chroococcum* (masivo) vs *Pseudomonas fluorescens* (estría), D) *Azotobacter vinelandii* (masivo) vs *Pseudomonas fluorescens* (estría), E) *Azotobacter chroococcum* (masivo) vs *Pseudomonas fluorescens* (pozo).

6.2 CONDICIONES DE TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA EN INVERNADERO.

Con el fin de hacer un seguimiento de las condiciones de microclima en el invernadero durante el ensayo y poder relacionarlas con el crecimiento de las plantas y la producción de flavonoides, se realizaron registros de temperatura ($T^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (HR) tal y como se describió en materiales y métodos. Como se observa en las figuras 7 y 8 los valores mínimos, tanto de T° como HR fueron constantes, oscilando entre valores de 11,2 y 12,5 en el caso de la temperatura y 10.57 % en el caso de la HR (Fig 7). Por su parte, Los valores máximos tuvieron una mayor variación. En el caso de la temperatura llegaron a registrarse valores de hasta 37, 14° C y para la HR valores de 35% (Fig 8). Sin embargo, en ninguno de los dos casos hubo una variación superior al 20 % por lo que podemos sugerir que las plantas no enfrentaron un alto nivel de stress, que pudiera afectar su crecimiento y floración

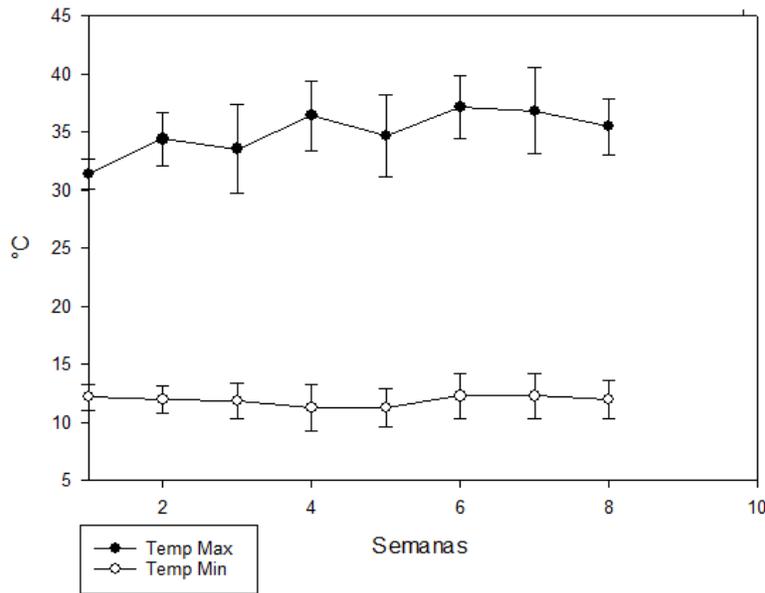


Figura 7. Temperatura máxima y mínima registrada en el invernadero durante el periodo de evaluación del crecimiento del cultivo de Caléndula.

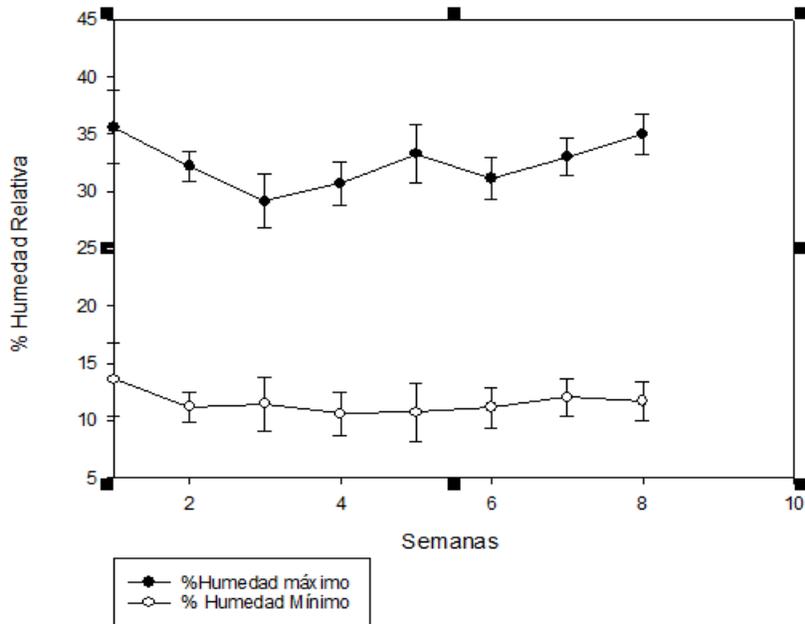


Figura 8. Humedad relativa máxima y mínima registrada en el invernadero durante el periodo de evaluación del crecimiento del cultivo de Caléndula

6.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO

El crecimiento fue evaluado tomando la altura de la planta en centímetros (cm), teniendo como inicio la base del tallo hasta lo alto de la última hoja, estos valores fueron analizados durante 2 meses, en total se obtuvieron 20 datos de crecimiento por planta que permitieron realizar un análisis estadístico para obtener un valor semanal (anexo 8). En la figura 7 podemos observar como el tratamiento 5 (*A. vinelandii* + *P.fluorescens*) obtuvo un crecimiento superior al tratamiento control (2.35 cm), además una altura promedio mayor con relación a los demás tratamientos. Así mismo en este tratamiento, se observó la aparición temprana de botones florales y en mayor número, en comparación con los demás tratamientos (Tabla 2). Los tratamientos 2,4 y 6, también mostraron mejor crecimiento que el control mientras que los tratamientos 1, 3 y 7 mostraron un crecimiento inferior. En general los tratamientos donde se evidenció mejor crecimiento también mostraron una mejor producción de botones florales. Cabe resaltar que el tratamiento 3 (*P. fluorescens*) fue el único que no floreció durante el periodo de estudio. Cuando se usaron 2 microorganismos en cocultivo T4 (*A. vinelandii*+ *A. chroococcum*), T5(*A. vinelandii*+ *P. fluorescens*), y T6 (*A. chroococcum*+ *P. fluorescens*), siempre se obtuvo un mejor crecimiento, mientras que inoculando solo 1 microorganismo T1(*A.vinelandii*), T2(*A.chroococcum*) y T3(*P. fluorescens*) no. Solo el tratamiento con *A. chroococcum* obtuvo una diferencia positiva con respecto al control; por último, el tratamiento donde se evaluó el consorcio de los 3 microorganismos T7 (*A.vinelandii*+ *A.chroococcum* +*P.fluorescens*), no tuvo diferencia con respecto al control. Por los resultados descritos se cree que los microorganismos *P.fluorescens* y *A.chroococcum* tienen mayor influencia sobre el crecimiento de la Caléndula cuando están en cocultivo.

Tabla 2. Número total de botones florales por semanas. *Solo el tratamiento 5 floreció antes de las semanas 4

Número de Botones					
TRATAMIENTO	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
1	2	2	4	5	7
2	1	3	5	5	5
3	0	0	0	0	0
4	2	3	3	3	4
5	*4	8	10	10	13
6	2	2	5	7	8
7	1	2	4	4	5
8	1	1	3	3	5

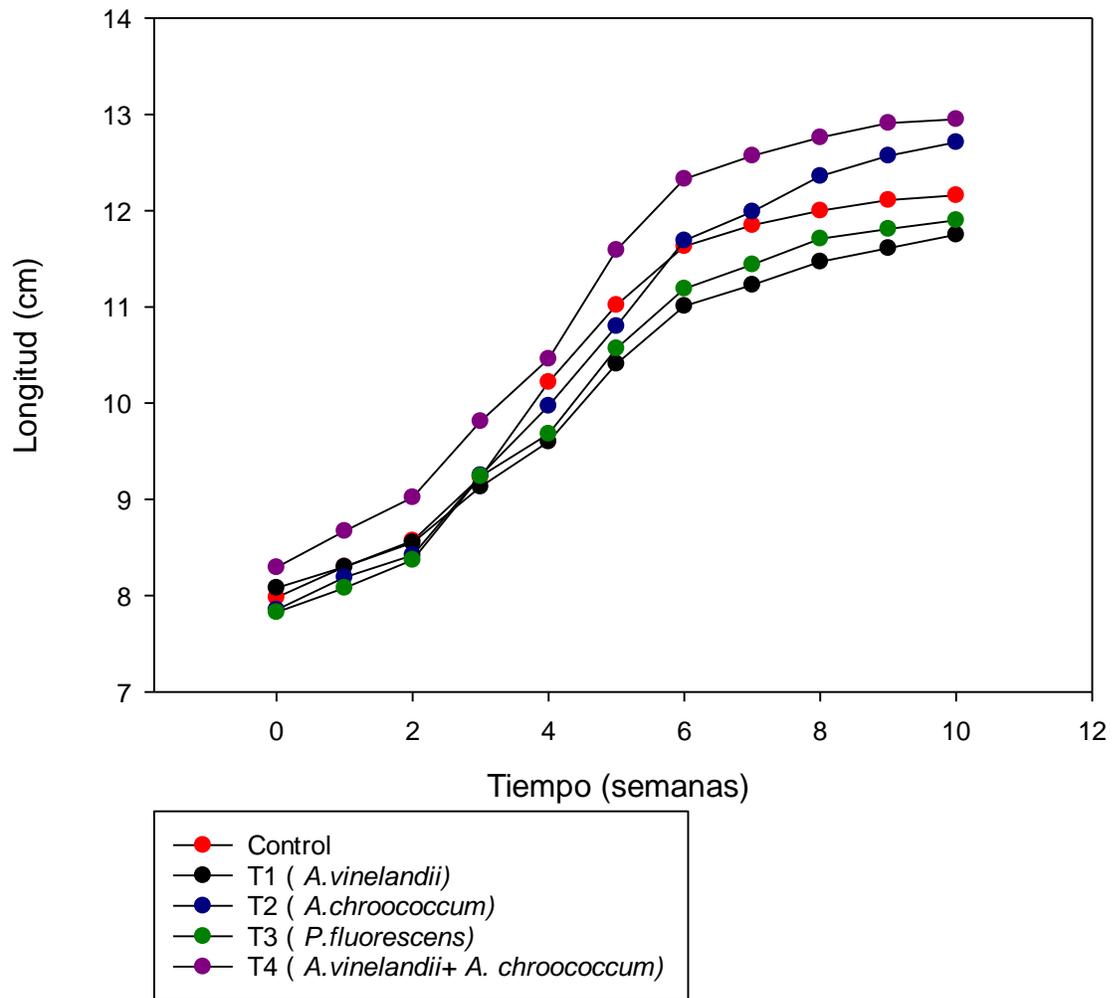


Figura 9. Evaluación del crecimiento de plantas de caléndula bajo los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T8 (Control)

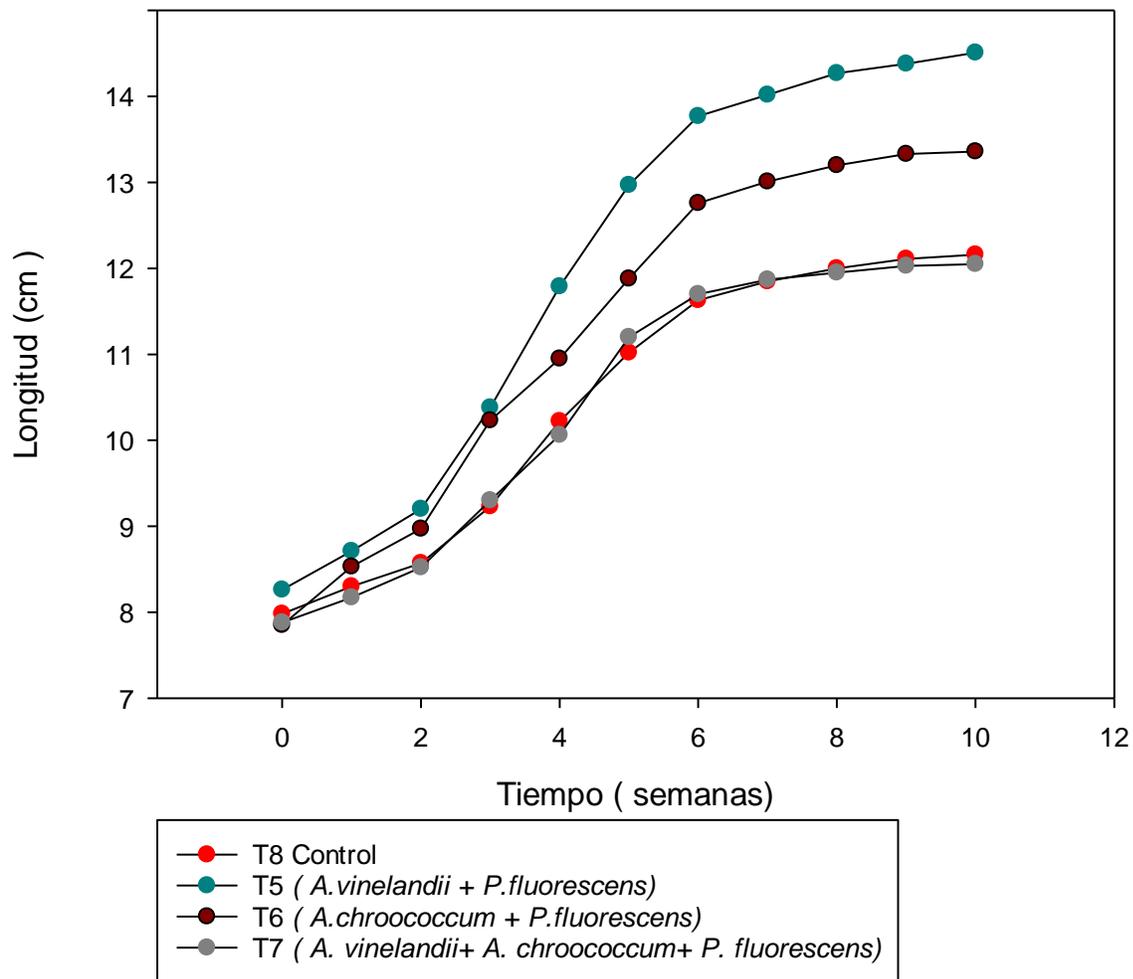


Figura 10. Evaluación del crecimiento de caléndula en los tratamientos T5, T6, T7 y T8 (Control)

6.4 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

En este trabajo, para la evaluación de flavonoides se tomaron 2 réplicas biológicas en los tratamientos donde fue posible, debido a que en el tratamiento 3 no presentó floración y en el tratamiento 4 solo floreció una planta. En el análisis estadístico se observa que las desviaciones estándar varían de acuerdo al tratamiento (anexo 10) y se encuentran coeficientes de variación de hasta 40 %. Se analizaron 4 picos representativos en todos los cromatogramas que fueron identificados como flavonoides debido al espectro de absorción UV (Figura 13 y 14).

Las cromatografías fueron realizadas en un equipo de UHPLC bajo las condiciones descritas anteriormente en la metodología. Como se observa en la Figura 11, los cromatogramas muestran 4 picos significativos y constantes en todas las muestras, con tiempos de retención entre 8 y 9 minutos, indicando que los perfiles químicos (*fingerprint*) de las muestras se mantuvieron constantes, lo que también se puede apreciar en la figura 12. En la Figura 13, se puede observar el espectro de absorción de los compuestos, representados por los picos principales en el cromatograma. A partir de estos espectros UV, se puede afirmar que los compuestos corresponden a flavonoides, considerando que sus valores de máxima absorción están representados en dos bandas principales, entre 250 y 270nm y entre 330 y 350 nm. Adicionalmente, por medio de una coinyección del estándar del flavonoide “rutina” con una muestra y con el control (datos no presentados), se pudo confirmar que uno de los picos mayoritarios presentes en las muestras y en el control corresponde a este flavonoide (tiempo de retención de 8.22 minutos).

De otra parte, en la figura 14 se pudo establecer una clara diferencia en la concentración de flavonoides entre el control y el tratamiento 5, observada por medio de la intensidad de los picos de la muestra 5 en comparación con la intensidad de los picos del control, indicando así, un aumento de la concentración de flavonoides. De este modo, el análisis cuantitativo de rutina de las muestras empleó la curva de calibración mencionada en la Metodología, y con el área del pico de rutina en las muestras se pudo establecer las concentraciones de este metabolito en las diferentes muestras (Figura 15).

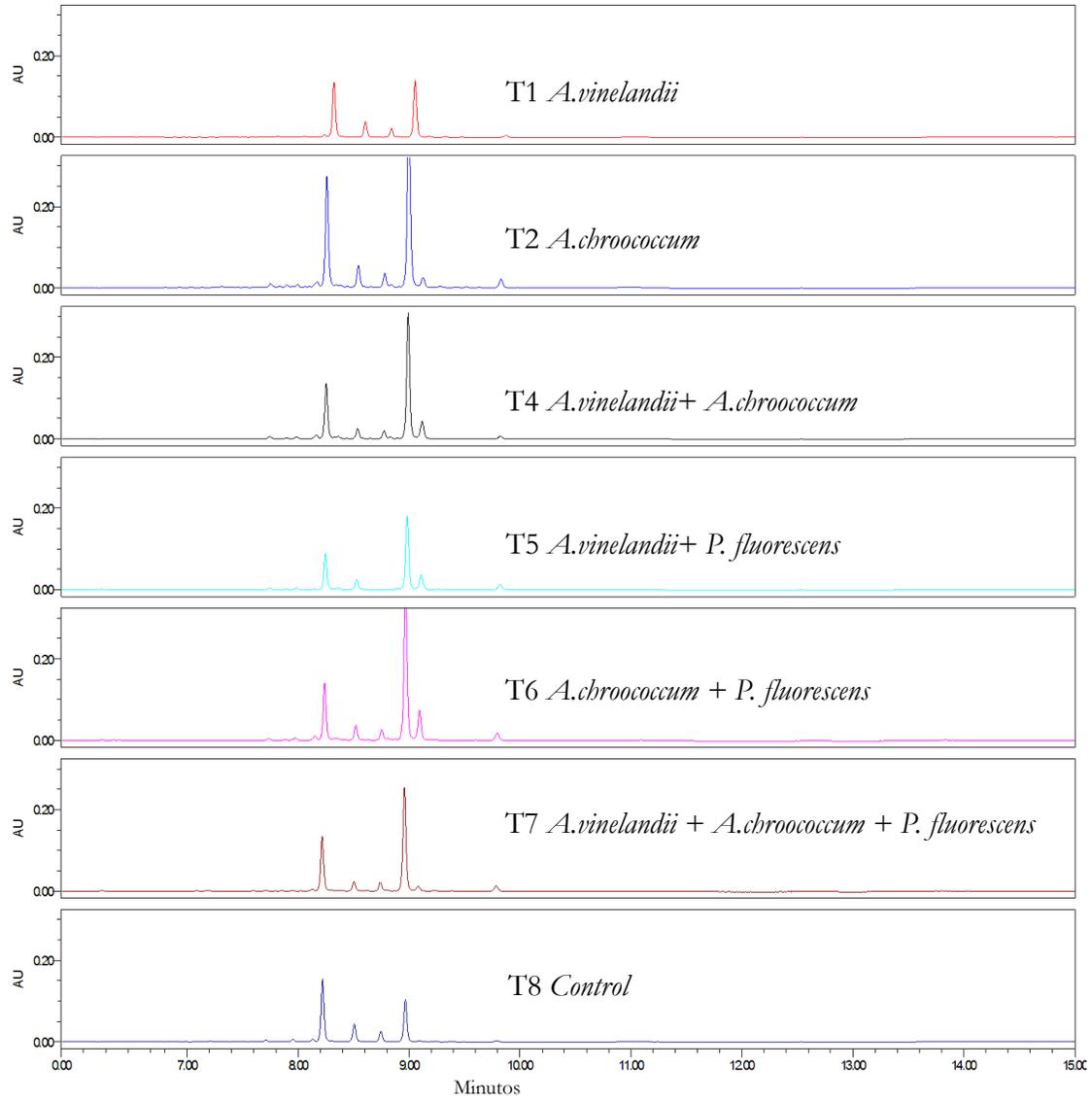


Figura 11. Perfil cromatográfico obtenido de una muestra por tratamiento a 350 mn.

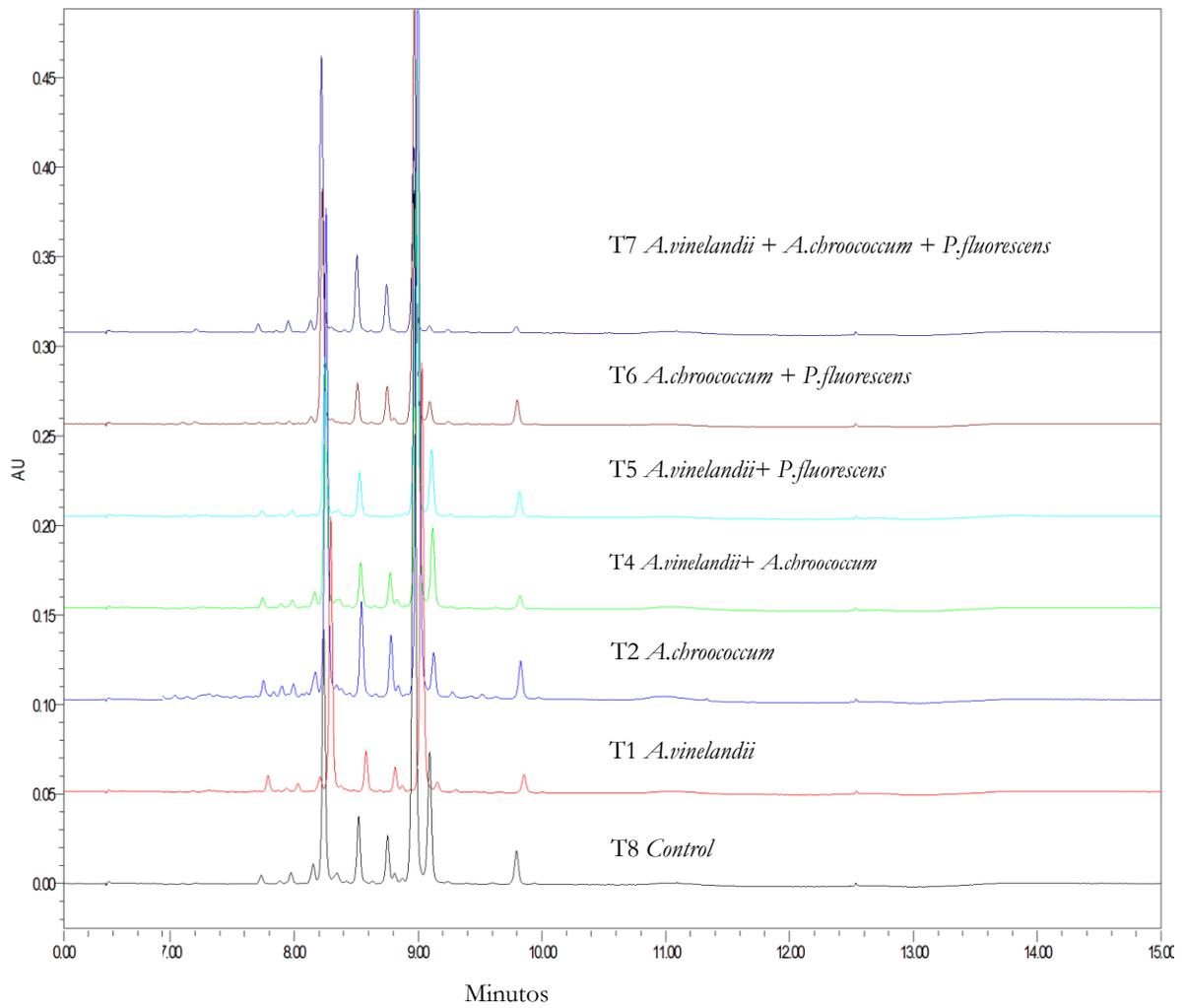


Figura 12 .Cromatograma del perfil fitoquímico de los tratamientos y el control

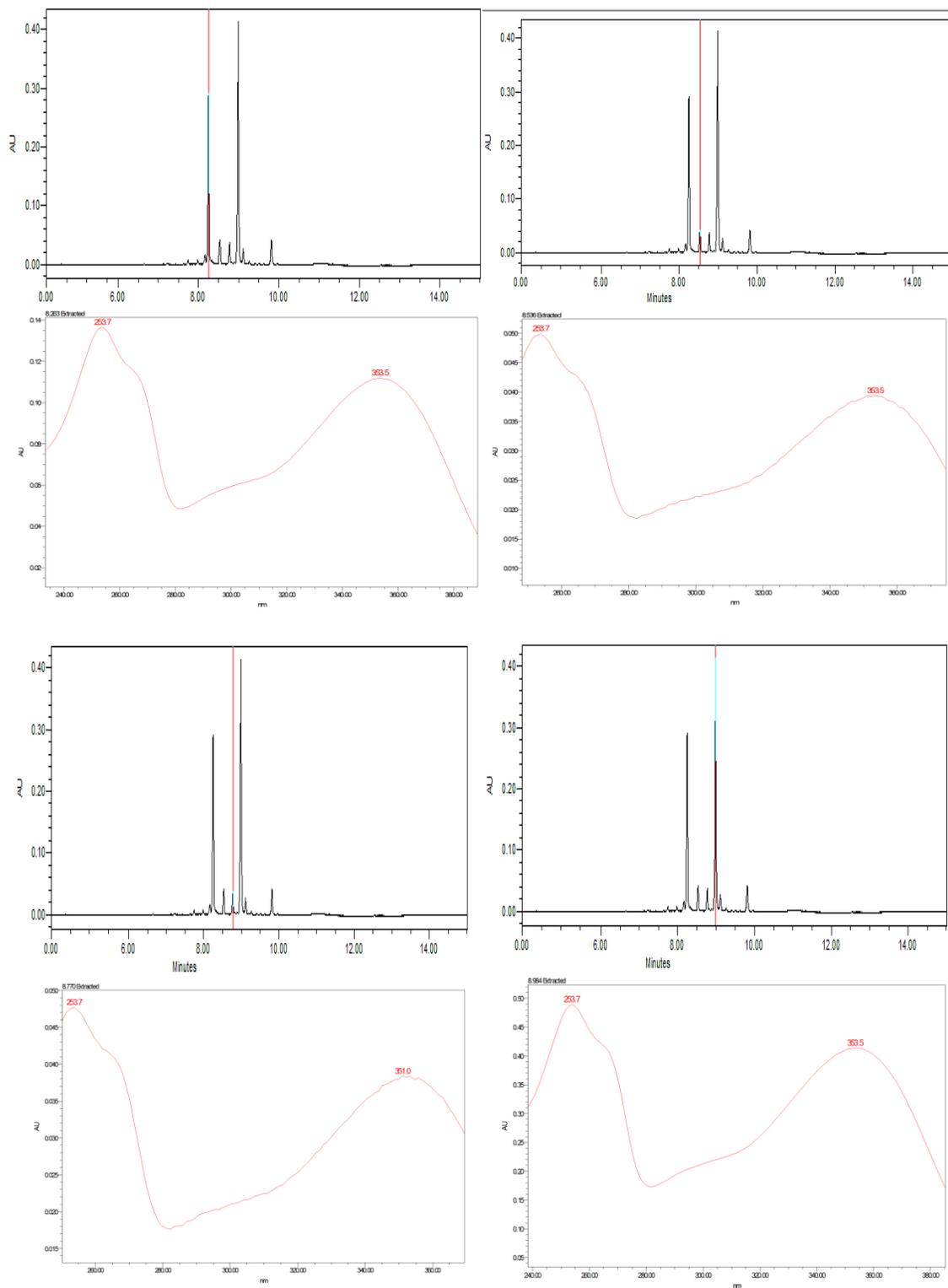


Figura 13. Espectro de absorción de UV en los picos 1 (rutina), 2, 3 y 4. Ordenados de manera descendente de arriba abajo y de izquierda a derecha.

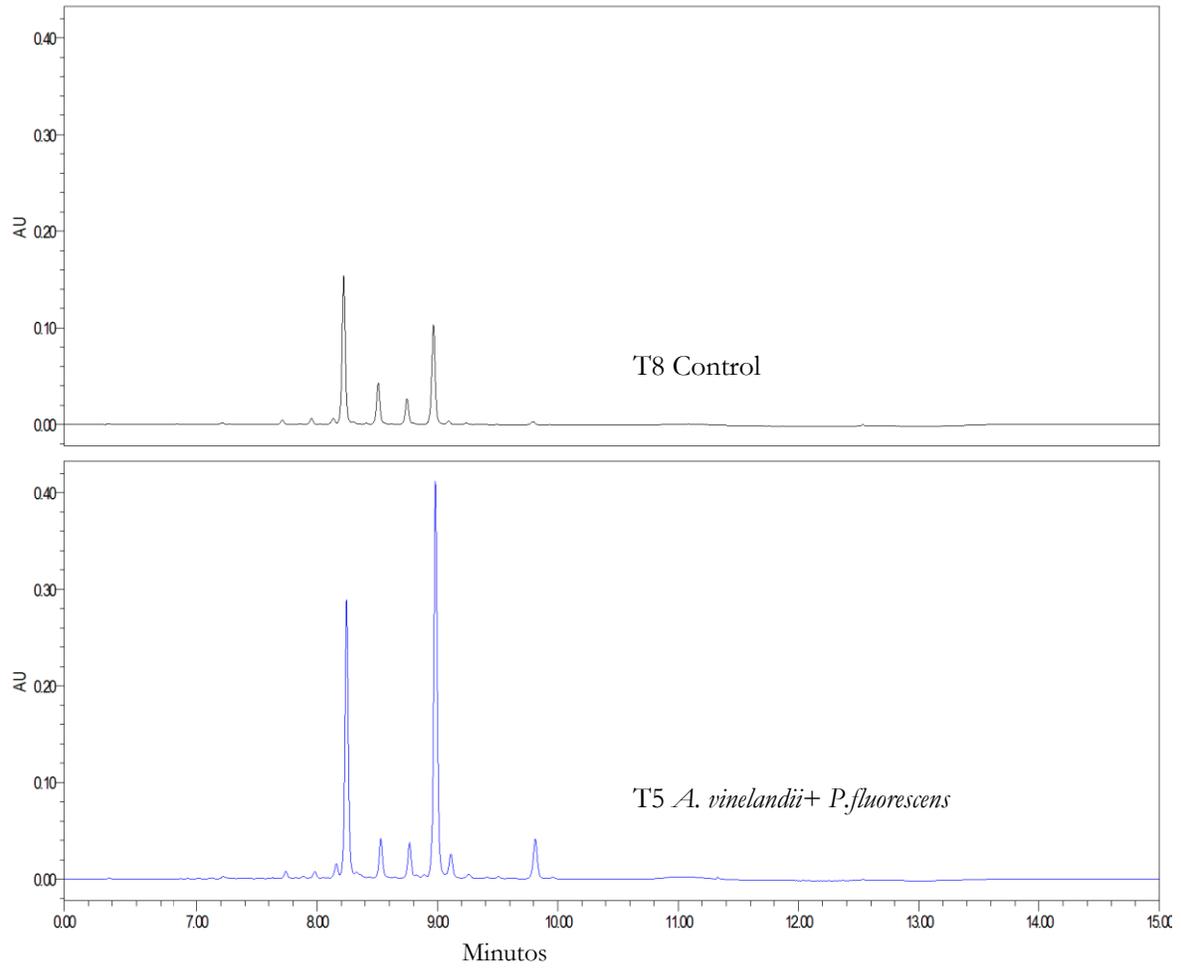


Figura 14. Cromatograma de la muestra control T8 (control) y una muestra del tratamiento (5). Longitud de onda de 350nm..

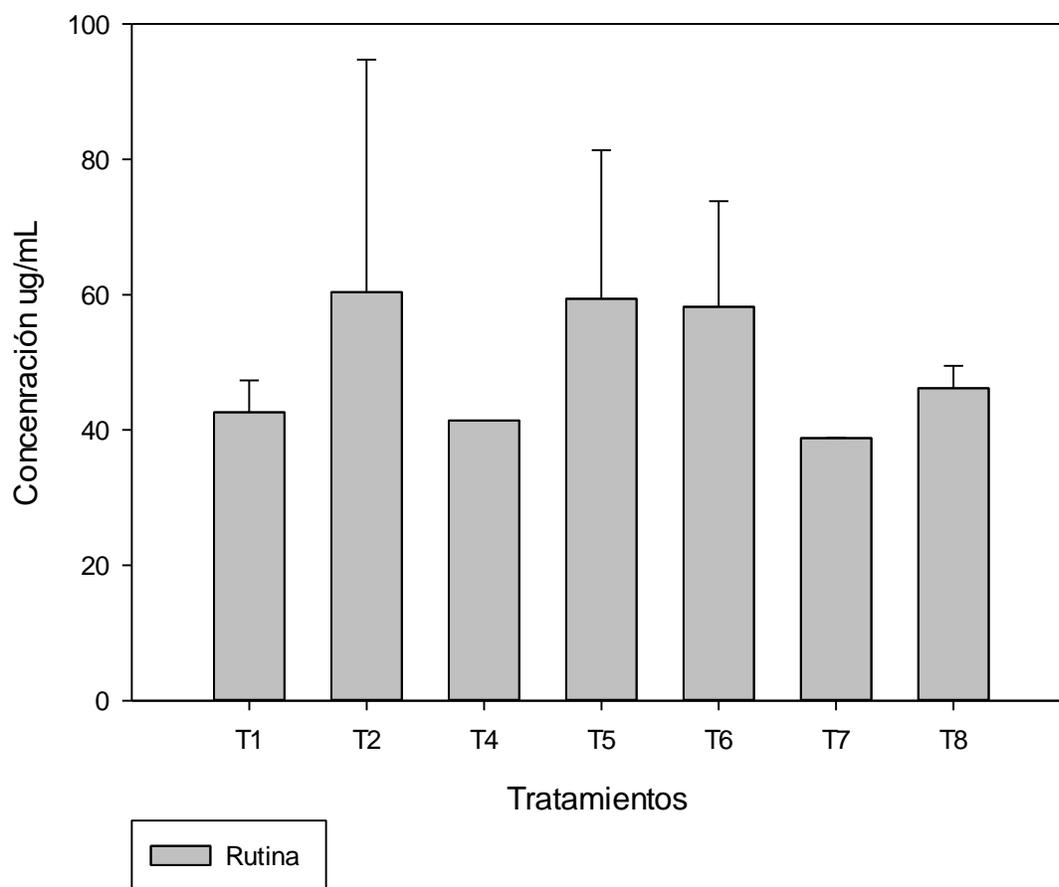


Figura 15. Concentración de Rutina (principal flavonoide presente en las flores de *Calendula officinalis*) en los diferentes tratamientos

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Generalidades

La Caléndula es la planta medicinal más importante de Colombia por su amplio uso en la industria farmacéutica y cosmética, esto debido a las características farmacológicas que presenta como: capacidad antibacteriana y antiinflamatoria e incluso anticancerígena. Estas características son dadas por moléculas asociadas al metabolismo secundario como los flavonoides [12]. Los flavonoides son un grupo de mas de 4000 compuestos polifenólicos importantes en procesos reproductivos, de comunicación

celular, protección contra la radiación UV y procesos de oxidación, además de estar involucrados en la protección contra patógenos [13-33].

El crecimiento de la planta y la producción de flavonoides puede ser afectado por diversos parámetros como la interacciones microorganismo-planta, microorganismo-microorganismo, la incidencia de la luz, la humedad relativa, la temperatura, el pH, la presencia de patógenos o en general cualquier situación que genere estrés en la planta [2-13-33]. Por esta razón en este trabajo consideramos importante analizar algunas de estas variables, especialmente la relación entre la inoculación con microorganismos y su posible incidencia en el crecimiento de la planta y la producción de flavonoides.

Antagonismo de los microorganismos de estudio

El antagonismo es un mecanismo de competencia utilizado por algunos organismos para tener ventaja dentro de un nicho o comunidad, generalmente este tipo de estrategias están asociados a condiciones ambientales específicas, que regulan la expresión de genes asociados a la síntesis de moléculas que causan daño o limitan el crecimiento y desarrollo de otros organismos [35]. Cuando se realiza un cocultivo es importante garantizar que no existe una relación antagónica que limite el crecimiento de alguno de los microorganismos. En la figura 6 se muestran los resultados de algunas pruebas de antagonismo realizadas en el estudio. Como se mencionó anteriormente no se observó alguna interacción antagónica entre las bacterias utilizadas en los consorcios. Diversos estudios [2-3-5] donde se ha evaluado el efecto de la inoculación de estas especies de forma individual o en consorcio, en algunas especies vegetales, ha revelado un importante impacto en el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios, sugiriendo la ausencia de interacciones antagónicas entre los microorganismos.

Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el crecimiento de caléndula y producción de flavonoides

Aunque se descarta el antagonismo microbiano entre las bacterias usadas en el consorcio como un factor que haya afectado el crecimiento de la Caléndula, es importante analizar el comportamiento de la temperatura y la humedad relativa que, en todos los modelos vegetales resulta ser de suma importancia para garantizar un adecuado crecimiento y desarrollo [36]. En las figuras 7 y 8 y anexos 3 y 4, se observa una variación en los valores de temperatura y humedad relativa máxima que podrían

afectar el desarrollo de las plantas, según Lastra Valdés [12] la Caléndula es una planta resistente a altas y bajas temperaturas, así como a grandes variaciones de la misma. Por esta razón las plantas de caléndula no vieron afectado su crecimiento a pesar de las variaciones de temperatura entre el día y la noche, que en el caso más extremo llegó a ser de 30 grados. Con respecto la producción de flavonoides, se encuentra documentado que la acumulación de estos compuestos aumenta cuando existen temperaturas fluctuantes. Con frecuencia, este aumento de la acumulación se explica por el papel de las antocianinas y flavonoides en la protección contra la fotoinhibición, que puede ser particularmente perjudicial en las bajas temperatura [37].

Es importante resaltar las variables adicionales no previstas que tuvo el estudio. En primer lugar, aunque las plantas de la variedad Pacific Mix de un mes de edad. fueron adquiridas en el centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, observamos que posiblemente existe una variabilidad genética, debido a que las flores no fueron homogéneas se encontraron flores de diferentes morfologías y colores. En una investigación realizada por Sytar y colaboradores [37] relacionada con el efecto de la temperatura en la acumulación de flavonoides en dos variedades de lechuga, encontraron que además del efecto de la temperatura, la variabilidad genética también jugaba un papel importante en la acumulación de flavonoides.

De otra parte, 3 semanas después de iniciar el experimento, se observó la presencia de un microorganismo, aunque no se realizó su identificación, sin embargo, por el aspecto y la presencia de esporas visibles se consideró como un hongo patógeno. En respuesta a esto y con el objetivo de evitar la diseminación de la enfermedad, se aplicó una solución de Hipoclorito de Sodio al 2.5 % en hojas y tallos, pero debido a las condiciones del invernadero, todas las plantas resultaron infectadas, especialmente en sus hojas basales. Como se mencionó anteriormente, la presencia de patógenos puede inducir la producción de algunos flavonoides por parte de la planta, como mecanismo de protección [13-33].

Efecto de la aplicación de microorganismos sobre el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios.

Es ampliamente conocido el beneficio que pueden llegar a tener las PGPRs el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya sea por mecanismos directos o indirectos estas bacterias son capaces de promover el crecimiento y garantizar un adecuado desarrollo. [2-5]. Se han utilizado en diversos modelos vegetales no solo con la finalidad

de evaluar la promoción del crecimiento vegetal sino también para evaluar la producción de metabolitos secundarios, y es imposible hablar del metabolismo secundario sin referirse al crecimiento y desarrollo, ya que una planta es capaz de producir los metabolitos secundarios únicamente cuando existen los nutrientes necesarios para crecer y tener un metabolismo primario adecuado [2,3,5,38].

En este trabajo se pudo establecer la relación entre la inoculación de microorganismos el crecimiento y la producción de flavonoides en flores de caléndula. Como se observa en la figura 9 y 10 los tratamientos que tuvieron mejor crecimiento que el control fueron T2, T4, T5 T6, de los cuales, 3 (T4, T5 Y T6) fueron cocultivo, esto nos indica claramente que el crecimiento responde mejor a la inoculación con un consorcio microbiano. Esto coincide con los estudios de Cappellari en 2013 [5] quienes evaluaron microorganismos solos y en consorcio. Los resultados de ese trabajo mostraron que los biofertilizantes que emplearon consorcios microbianos tuvieron un impacto mayor sobre el crecimiento.

Con respecto a la rutina, los tratamientos T2 T5 y T6 mostraron una producción superior al tratamiento control, aproximadamente 20 %. De la misma forma estos tratamientos tuvieron un efecto positivo en el crecimiento, lo que nos permite confirmar la relación entre el crecimiento y la producción de flavonoides. Se encuentra documentado que la inoculación con algunos microorganismos como *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus* sp entre otros, han incrementado la producción de metabolitos secundarios como: Terpenos y ácidos orgánicos en Huacatay, (*Tagetes minuta*) [5] y terpenos en *Caléndula officinalis* [10]. De otra parte, estudios realizados en albahaca *Ocimum basilicum*, mostraron que al inocular semillas con biofertilizantes comerciales basados en *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp. o *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp, el crecimiento de las plantas fue superior respecto a las plantas control y se observó un incremento en la producción de aceites esenciales [39].

El aumento en la producción de metabolitos secundarios puede ser explicados ya que algunos de los compuestos fenólicos están asociados a la respuesta defensiva de la planta frente a patógenos[5]. Cuando hay inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y colonización de las raíces por parte de esta, una de las respuestas de las plantas es activar la producción de compuestos fenólicos para la defensa. En un estudio realizado por Khanna y colaboradores [41] concluyeron que las PGPRs aumentaban la producción y actividad de enzimas como la PAL (E.C 4.3.1.24) indispensables para la síntesis de flavonoides.

Rai y colaboradores en 2016 [8] en su trabajo con *Rauwolfia serpentina* (shegen mu) compararon la respuesta a la aplicación de fertilizantes químicos y un biofertilizante basado en *A. chroococcum*, *A. brasilense* y *P. putida*, sobre la producción de alcaloides. Los investigadores observaron que independientemente de la estrategia de fertilización empleada, la producción de alcaloides aumentó de manera similar, lo que los llevó a concluir que la producción de metabolitos secundarios se relaciona fuertemente con la disponibilidad de nutrientes, especialmente nitrato, nitrito, amonio y fosfato.

La concentración de rutina, uno de los principales flavonoides encontrado en las flores de caléndula, fue mayor en los tratamientos T5 (*A. vinelandii* + *P. fluorescens*) y T6 (*A. chroococcum* + *P. fluorescens*). Estos tratamientos fueron los que presentaron mejor crecimiento de las plantas, confirmando la hipótesis planteada por algunos autores [9-5-49] sobre la relación que existe entre el crecimiento de la planta y la síntesis de metabolitos secundarios. Trabajos realizados por Houssinni [10] en plantas de caléndula, Tahami y colaboradores [39] en albahaca y Capellari [5] en Huacatay, han encontrado que la producción de metabolitos secundarios aumentó en función de la inoculación con PGPRs. En todos estos trabajos se determinó que el crecimiento de la planta se relacionaba con la producción de estos compuestos. Cabe aclarar, como se ha mencionado en diversas ocasiones, que existen parámetros adicionales a la inoculación con microorganismo que podrían afectar la ruta biosintética. Además, es necesario considerar que cada especie tiene rutas específicas para la síntesis de los diferentes tipos de metabolitos incluidos los flavonoides, y no todos responden de manera positiva a los factores bióticos y abióticos [13-33]

Análisis de UHPLC

Mediante el análisis cromatográfico se pudo establecer que el perfil fitoquímico obtenido es el mismo. Sin embargo, el área bajo la curva de los picos que representan el perfil en todos los tratamientos es diferente. Los tiempos de retención de los flavonoides en la columna C18 bajo las condiciones de separación, oscilan entre 8,2 y 9 minutos (Fig 10). Resultados similares fueron obtenidos Loesher y colaboradores en 2014 [40] analizando flavonoides producidos por flores de caléndula. Sin embargo, en ese estudio, el tiempo de retención para Rutina, uno de los principales flavonoides de la flor, fue de 7,55 minutos. Teniendo en cuenta las diferencias de condiciones de la corrida cromatográfica, es comprensible la variación en el tiempo de retención.

8. CONCLUSIONES

- No se presentó antagonismo entre los microorganismos empleados en el estudio.
- Los tratamientos T2 (*Azotobacter chroococcu*) T5(*A.vinelandii* y *P.fluorescens*) y T6 (*A.chroococcum* y *P.fluorescens*) que corresponden a consorcio entre 2 microorganismos, tienen un efecto positivo sobre el crecimiento de plantas de caléndula, siendo el tratamiento T5 el que presentó mayor.
- Los perfiles fitoquímicos obtenidos para todos los tratamientos fueron los mismo, sin embargo, la concentración de rutina fue mayor en los tratamientos que corresponden a los consorcios entre dos microorganismos.
- Los resultados sugieren una relación entre el crecimiento de plantas de caléndula y la producción de rutina. Esta relación se hizo evidente en los tratamientos T2, T5 y T6 donde la producción de rutina y el crecimiento aumentaron en aproximadamente un 20% respecto al control.
- Los resultados indican que los microorganismos empleados en este trabajo tienen un potencial uso como biofertilizantes.

RECOMENDACIONES

- Para próximos estudios se recomienda garantizar la homogeneidad del material vegetal (variedad genética y altura de plantas).
- Monitorear la presencia de microorganismos inoculados a lo largo del estudio.
- Evaluar variables adicionales de crecimiento como: Peso fresco, peso seco, numero de hojas y área foliar con el fin de establecer una relación mas precisa entre el crecimiento, desarrollo y la producción de flavonoides
- Confirmar mediante técnicas moleculares la identidad taxonómica de los microorganismos

9.REFERENCIAS

1. Perfetti JJ, Balcazar Á, Hernández A, Leibovich J. Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia. Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia. 2013.
2. Guricar C., Naik M.K, Sreenivasa M.Y. *Azotobacter*. PGPR Activities with Special Reference to Effect of Pesticides and Biodegradation. In: Singh D., Singh H.,Prabha. R. (Eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer, New Delhi 2016

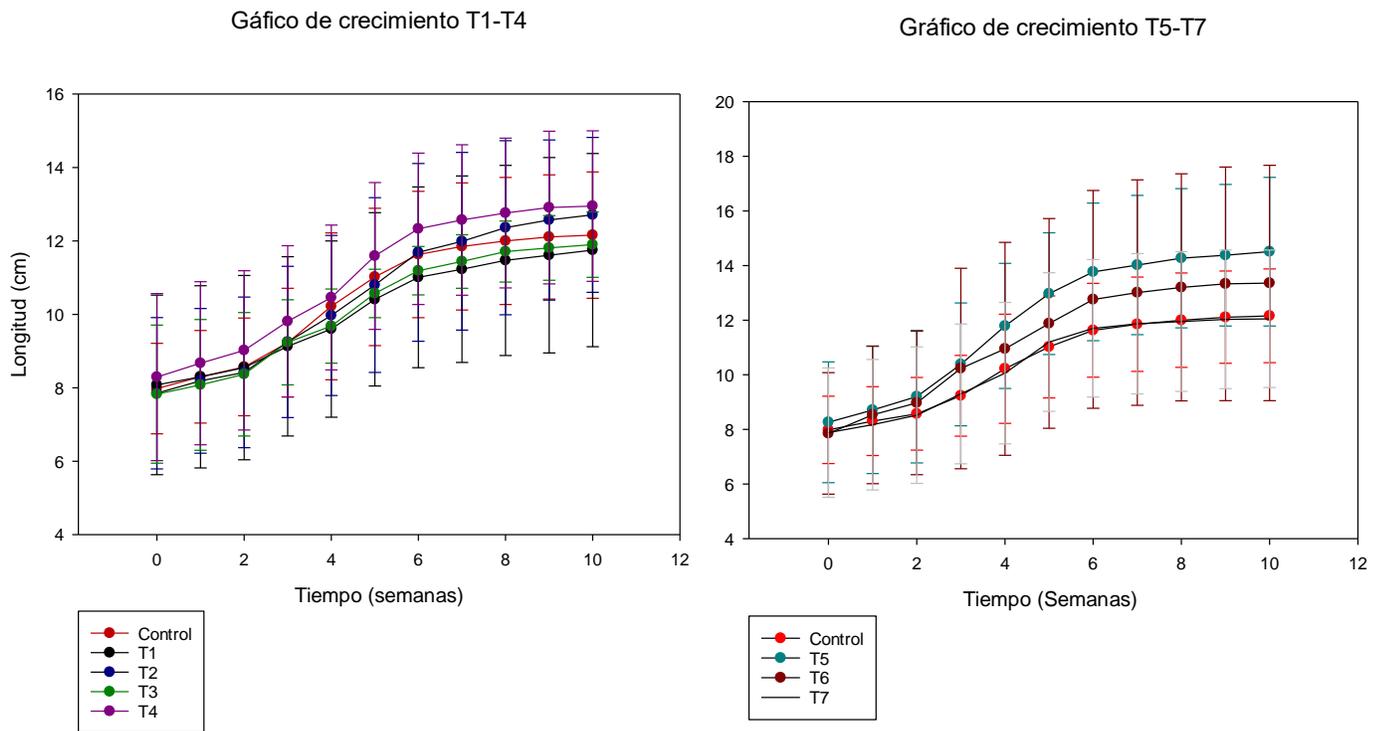
3. Rudolph N, Labuschagne N, Aveling TAS. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and seedling growth of maize. *Seed Sci Technol.* 2015;
4. Muñoz Muñoz, John Alexander Cuantificación de flavonoides, expresados como quercetina total, en algunos extractos y soluciones de uso oral a base de *Calendula officinalis*. Maestría thesis, Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá 2014
5. Cappellari, L. del R., Santoro, M. V., Nievas, F., Giordano, W., & Banchio, E.. Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*, 70, 16–22. 2013
6. Ilaio RO, Faylon PS, Dar WD, Batchelor WD, Sayyed R, Sudini HK, et al. Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) for Sustainable Agriculture [Internet]. Newcastle upon Tyne: Cambridge Scholars Publishing; 2014
7. Cragg GM, Newman DJ. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. In: *Pure and Applied Chemistry.* 2005.
8. Rai A, Kumar S, Baudh K, Singh N, Singh RP. Improvement in growth and alkaloid content of *rauwolfia serpentina* on application of organic matrix entrapped biofertilizers (*Azotobacter chroococcum*, *azospirillum brasilense* and *pseudomonas putida*). *J Plant Nutr.* 2017;
9. Muley BP, Khadabadi SS, Banarase NB. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2009.
10. Seyed-Mostafa Hoseini-Mazinani & Alireza Hadipour (2016) The Response of *Calendula officinalis* L. Essential Oil Constituents to Biofertilizer, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19:3, 632-639, DOI: 10.1080/0972060X.2014.897593
11. Díaz, J.A. ed. 2003. Informe Técnico. Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas. Instituto Alexander Von Humboldt - El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial 111 P. Bogotá D.C., Colombia.
12. Lastra Valdés, H., & Piquet García, R. *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Farmacia.* <http://doi.org/10.1055/s-2006-952092> 1999.
13. Andersen ØM, Markham KR. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.* 2005. 1-1239 p.
14. Bilia AR, Salvini D, Mazzi G, Vincieri FF. Characterization of calendula flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Chromatographia.* 2000;

15. Kennedy, A. C., 2005, Rhizosphere, in: Principles and Applications of Soil Microbiology, D.M., Sylvia, J.J., Fuhrmann, P.G., Hartel, and D.A., Zuberer, eds., 2nd ed. Pearson, Prentice Hall, New Jersey, pp.242-262
16. Siddiqui ZA. PGPR: Biocontrol and biofertilization [Internet]. Springer Netherlands; [cited 2019 Sep 3]. Available from: <https://search-ebscohost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/login.aspx?direct=true&db=edselc&AN=edselc.2-52.0-84900148714&lang=es&site=eds-live>
17. Dojima, T., & Craker, L. E. Potential benefits of soil microorganisms on medicinal and aromatic plants. In ACS Symposium Series. <http://doi.org/10.1021/bk-2016-1218.ch006> 2016.
18. Etesami H, Maheshwari DK. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. Ecotoxicology and Environmental Safety 2018
19. Middendorf D, Juadjur A, Bindrich U, Mischnick P. AFM approach to study the function of PGPR's emulsifying properties in cocoa butter based suspensions. Food Struct. 2015;
20. Fatnassi IC, Chiboub M, Saadani O, Jebara M, Jebara SH. Impact of dual inoculation with Rhizobium and PGPR on growth and antioxidant status of *Vicia faba* L. under copper stress. Comptes Rendus - Biol. 2015;
21. Irum Naz. Potential of *Azotobacter vinelandii* Khsr1 as bio-inoculant. AFRICAN J Biotechnol. 2012
22. Jiménez D. Caracterización Molecular de Cepas Nativas Colombianas de *Azotobacter* spp. mediante análisis de restricción del DNAr ribosomal 16S. Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
23. Quintero C. Evaluación de la producción de ácido indol acético (aia) y fijación libre de nitrógeno en cepas nativas de *Azotobacter* sp. Aisladas de suelos del altiplano cundiboyacense. Pontificia Universidad Javeriana; 2016
24. Salazar D. Producción de sideróforos por cepas de *Azotobacter* spp. Aisladas de suelos de cultivos hortícolas del altiplano cundiboyacense. Pontificia Universidad Javeriana; 2017
25. Sivasakthi S, Usharani G, Saranraj P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* : A review. African J Agric Res. 2014
26. Tsisin NB. Atlas de plantas medicinales de la URSS. Moscú: Editorial Literatura Médica, 1962:701.
27. Sánchez Orozco, Manuel Salvador and Bonilla Correa, Carmen Rosa and Dávila García, Mario Augusto and Ramírez, Hernando and Cardozo Conde, Carlos Iván and Torres Castañeda, Harlen Gerardo and Ortiz Escobar, Amanda and Guzmán Rivera, Sandra Patricia and Posso, Pedro S. and Saldarriaga, Luís F. El

- cultivo de la Caléndula (*Calendula officinalis* L.). Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. ISBN 978-958-8095-40-0. 2007;
28. Acosta De La Luz, L., Rodríguez Ferradá, C., & Sánchez Govín, E. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2001;
 29. Hernández-Saavedra, D., Pérez-Ramírez, I. F., Ramos-Gómez, M., Mendoza-Díaz, S., Loarca-Piña, G., & Reynoso-Camacho, R. . Phytochemical characterization and effect of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity-associated cardiovascular risk. *Medicinal Chemistry Research*, 25(1), 163–172. <http://doi.org/10.1007/s00044-015-1454-1> .2016;
 30. Hadison V. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in plant products of cosmetic interest. *Clujul Med* 1985;58(4):378-81.
 31. Lavanya V, Ganapathy D, Visalakshi RM. Flavonoids used in the treatment of malignancy - A review. *Drug Invention Today* [Internet]. 2019 May [cited 2019 Non4];12(5):1082–5. Available from: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=136927803&lang=es&site=eds-live>
 32. Ungvarsky J. Flavonoid. Salem Press Encyclopedia of Health [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 1];
 33. Harborne, J. B. (Ed.). (1988). *The Flavonoids*. doi:10.1007/978-1-4899-2913-6 .
 34. Holland A, Parker C. Studies on microbial antagonism in the establishment of clover pasture. *Plant & Soil* [Internet]. 1966 Dec [cited 2019 Jul 3];25(3):329. Available from: <https://search.ebscohost.com.ezproxy.javeriana.edu.co/login.aspx?direct=true&db=edb&AN=70912054&lang=es&site=eds-live>
 35. Duffy B, Schouten A, Raaijmakers JM. P ATHOGEN S ELF -D EFENSE : Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism . *Annu Rev Phytopathol*. 2003;
 36. **Russell, E.W.** 1961. Soil conditions and plant growth. 9ed. Longmans. 688 pp.
 37. Sytar O, Zivcak M, Bruckova K, Brestic M, Hemmerich I, Rauh C, et al. Shift in accumulation of flavonoids and phenolic acids in lettuce attributable to changes in ultraviolet radiation and temperature. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2018;
 38. Etesami H, Maheshwari DK. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018
 39. Tahami MK, Jahan M, Khalilzadeh H, Mehdizadeh M. Plant growth promoting rhizobacteria in an ecological cropping system: A study on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil production. *Ind Crops Prod*. 2017;
 40. Loescher CM, Morton DW, Razic S, Agatonovic-Kustrin S. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid

chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*-Advantages and limitations. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; 41. Khanna K, Jamwal VL, Sharma A, Gandhi SG, Ohri P, Bhardwaj R, et al. Supplementation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) alleviates cadmium toxicity in *Solanum lycopersicum* by modulating the expression of secondary metabolites. *Chemosphere.* 2019;

ANEXOS



Anexo 1 Gráficas de evaluación del crecimiento de los tratamientos T1,T2,T3,T4,T5,T6,T7 vs T8 (Control) con desviaciones estandar

Anexo 3 . Tabla con los datos usados para la figura 7

Promedio máxima	Temperatura	Desviación Estándar	Promedio Temperatura mínima	Desviación Estándar
31,40		1,34	12,20	1,10
34,40		2,30	12,00	1,22
33,57		3,82	11,86	1,57
36,43		2,99	11,29	1,98
34,71		3,50	11,29	1,70
37,14		2,73	12,29	1,98
36,86		3,67	12,29	1,98
35,50		2,43	12,00	1,67

Anexo 4 Tabla con los datos usados para la figura 8

Promedio relativa	humedad máxima	Desviación estándar	Promedio relativa	humedad mínima	Desviación estándar
	35,60	3,21		13,60	3,21
	32,20	1,30		11,20	1,30
	29,14	2,37		11,43	2,37
	30,71	1,90		10,57	1,90
	33,29	2,56		10,71	2,56
	31,14	1,77		11,14	1,77
	33,00	1,63		12,00	1,63
	35,00	1,75		11,67	1,75

Anexo 5 Tabla con los datos usados para la figura 9 y 10

Semana	T1		T2		T3		T4		T5		T6		T7		T8	
	Altura	Desviacion estandar														
0	8,08	2,444	7,85	2,06	7,83	1,88	8,3	2,274	8,26	2,21	7,85	2,224	7,88	2,37	7,98	1,232
1	8,3	2,48	8,19	1,97	8,08	1,78	8,67	2,22	8,71	2,33	8,53	2,52	8,17	2,39	8,3	1,26
2	8,55	2,51	8,42	2,05	8,37	1,68	9,02	2,17	9,2	2,43	8,97	2,63	8,52	2,5	8,57	1,33
3	9,13	2,44	9,25	2,06	9,24	1,16	9,81	2,06	10,38	2,25	10,23	3,67	9,3	2,56	9,23	1,48
4	9,6	2,4	9,97	2,18	9,68	1,01	10,46	1,97	11,79	2,29	10,95	3,9	10,06	2,59	10,22	2
5	10,41	2,36	10,8	2,38	10,57	0,66	11,59	2	12,97	2,23	11,88	3,84	11,2	2,54	11,02	1,87
6	11,01	2,46	11,69	2,42	11,19	0,66	12,33	2,06	13,77	2,52	12,76	3,99	11,7	2,52	11,63	1,72
7	11,23	2,54	11,99	2,42	11,44	0,73	12,57	2,05	14,02	2,55	13,01	4,13	11,87	2,57	11,85	1,73
8	11,47	2,59	12,36	2,37	11,71	0,83	12,76	2,04	14,27	2,55	13,2	4,16	11,95	2,56	12	1,73
9	11,61	2,66	12,57	2,18	11,81	0,88	12,91	2,08	14,38	2,59	13,33	4,28	12,03	2,54	12,11	1,69
10	11,75	2,63	12,71	2,11	11,9	0,89	12,95	2,05	14,51	2,72	13,36	4,31	12,05	2,52	12,16	1,72

Anexo 6 . Datos crudos y análisis estadísticos de la temperatura.

Día	Temperatura °C		Promedio max	Desviacion	Promedio min	Desviacion
	Max	Min				
15	30	13				
16	33	11				
17	32	13				
18	30	13				
19						
20						
21	32	11	31,40	1,34	12,20	1,10
22	34	12				
23	34	10				
24						
25						
26	37	13				
27	36	12				
28	31	13	34,40	2,30	12,00	1,22
29	41	11				
30	29	10				
31	31	13				
32	34	12				
33	35	14				
34	32	13				
35	33	10	33,57	3,82	11,86	1,57
36	36	9				
37	35	13				
38	39	12				
39	39	14				
40	34	9				
41	40	10				
42	32	12	36,43	2,99	11,29	1,98
43	33	11				
44	36	14				
45	37	9				
46	31	11				
47	32	10				
48	33	13				
49	41	11	34,71	3,50	11,29	1,70
50	41	12				
51	38	14				
52	34	11				
53	36	13				
54	34	15				
55	37	12				
56	40	9	37,14	2,73	12,29	1,98
57	33	12				
58	39	13				
59	31	14				
60	36	15				
61	39	12				
62	41	11				
63	39	9	36,86	3,67	12,29	1,98
64	37	10				
65	38	11				
66	32	12				
67	33	14				
68	36	11				
69	37	14				
			35,50	2,43	12,00	1,67

Anexo 7 . Datos crudos y análisis estadísticos de la humedad relativa .

Humedad relativa %		Promedio max	Desviacion	Promedio min	Desviacion
Max	Min				
44	19				
31	12				
30	14				
28	12				
45	11	35,60	3,21	13,60	3,21
26	11				
30	12				
28	10				
41	10				
36	13	32,20	1,30	11,20	1,30
37	9				
14	10				
23	9				
35	11				
33	12				
32	14				
30	15	29,14	2,37	11,43	2,37
29	9				
34	10				
30	12				
31	14				
33	9				
29	9				
29	11	30,71	1,90	10,57	1,90
30	14				
33	14				
31	12				
33	9				
32	9				
37	8				
37	9	33,29	2,56	10,71	2,56
31	14				
27	10				
34	11				
32	13				
30	10				
28	9				
36	11	31,14	1,77	11,14	1,77
37	14				
31	13				
32	11				
29	12				
33	9				
31	13				
38	12	33,00	1,63	12,00	1,63
40	14				
32	11				
33	11				
36	9				
37	12				
32	13				
		35,00	1,75	11,67	1,75

Anexo 8 Tablas de datos crudos de crecimiento y análisis estadístico. En orden descendente se muestran T1,T2,T3.T4,T5,T6,T7 y T8,

Planta	Tiempo 0						Tiempo 1						Tiempo 2						Tiempo 3					
	Dato	Promedio	Desviacion estandar	Promedio del promedio	Desvaicaon estandar	Delta	Dato	Promedio	Desviacion estandar	Promedio del promedio	Desvaicaon estandar	Delta	Dato	Promedio	Desviacion estandar	Promedio del promedio	Desvaicaon estandar	Delta	Dato	Promedio	Desviacion estandar	Promedio del promedio	Desvaicaon estandar	Delta
1	4						4,2						4,5						5,1					
2	4						6,4						6,4						7,1					
3	5,5	1					5,7	1,00					5,94	0,97					6,6	0,88				
4	6						6,3						6,6						7,1					
5	6,5						6,7						6,8						7,2					
6	7						7						7						7,7					
7	8,8						8						9,3						9,8					
8	8,7	8,38	0,78549348	8,08	2,444	0,22	8,56	0,88	8,30	2,48	0,25	8,7	8,78	1,01	8,55	2,51	0,57	9,3	9,3	1,35	9,13	2,44	0,47	
9	8,5						8,7						8,9						9,3					
10	8,5						9,1						9,4						10					
11	10						10,2						10,5						10,9					
12	10,5						10,7						11,2						11,9					
13	10,3	10,36	0,21908002				10,64	0,30				10,6	10,94	0,36				10,7	11,48	0,63				
14	10,5						10,9						11,2						12					
15	10,5						10,9						11,2						11,9					
1	6						6,3						6,5						7,5					
2	6,9						7,1						7,6						7,6					
3	6	5,92	0,64575537				6,36	0,58					6,4	6,52	0,53				7,1	7,26	0,47			
4	5,5						5,8						6						6,5					
5	5,3						5,6						6						7,6					
6	7,5						7,9						8						8,7					
7	7,2						7,7						8						9,2					
8	8,6						8,9						9,3						10					
9	7,5	7,62	0,56302753	7,853333333	2,060	0,34	7,5					7,7	8,14	0,67	8,42	2,05	0,83	8,8	9,12	0,53	9,25	2,06	0,72	
10	7,5						7,5						7,7						8,8					
11	11						11,4						11,7						12,3					
12	9,5						9,9						10,1						11,2					
13	10,5	10,02	0,69065187				10,28	0,69				10,5	10,6	0,63				10,9	11,38	0,75				
14	9,6						9,6						9,9						10,5					
15	9,5						9,7						10,4						12					
1	6,9						7,5						8,3						9,8					
2	5,4						5,5						5,5						6,1					
3	6,8	5,94	0,98132563				6,34	1,09					7,1	6,74	1,26				8,1	8,22	1,40			
4	6,3						6,8						7,4						8,1					
5	4,5						4,9						5,4						8					
6	7,7						7,8						8,3						9,7					
7	6,5						7,1						7,1						7,9					
8	8,2	7,84	0,75365775	7,826666667	1,880	0,25	8	0,66	8,08	1,78	0,29	8,2	8,26	0,70	8,37	1,68	0,87	9,1	9	0,97	9,24	1,16	0,44	
9	8,9						8,9						9						9,4					
10	7,5						7,9						8,4						9,5					
11	9,5						9,8						10,1						10,5					
12	9						9						9						10,9					
13	9,5	9,7	0,75828754				9,9	0,75				10	10,1	0,85				10,5	10,5	0,95				
14	11						11,1						11,4						11,6					
15	9,5						9,8						10						10,5					
1	6,5						6,7						7,2						7,2					
2	6,5						7,1						7,4						7,2					
3	5	6,18	0,73280294				5,9	0,48					6,5	7,16	0,42				8,4	8,24	0,78			
4	8						6,9						7,4						8,9					
5	6,5						7						7,4						9					
6	7,2						7,7						7,7						7,7					
7	8,3						8,6						8,7						9,1					
8	7	8	0,64807407	8,293333333	2,274	0,38	7,2	0,73	8,67	2,22	0,35	7,7	8,5	0,76	9,02	2,17	0,79	9	9,04	0,84	9,81	2,06	0,65	
9	8,5						8,7						9,3						10					
10	8,5						8,9						9,1						9,4					
11	9,5						9,7						10						10,4					
12	10,5						10,9						11,2						11,6					
13	12,5	10,7	1,15108644				11,08	1,13				11,2	11,4	1,17				12,14	12,14	1,23				
14	10						10,7						11						12,5					
15	11						11,3						11,6						12,5					
1	6,5						6,9						7,7						10,5					
2	6,5						6,7						7,3						9,3					
3	6,9	6,18	0,95498691				7,2	0,91					7,6	6,92	1,11				7,7	8,38	1,47			
4	6,5						6,8						7,4						7,4					
5	4,5						4,8						5						7					
6	8						9,2						10						10,5					
7	8,5						8,7						9						10,3					
8	7						7,3						7,5						8,1					
9	8	8,02	0,6340347	8,26	2,210	0,45	8,48	0,74	8,71	2,33	0,49	8,5	8,92	0,93	9,20	2,43	1,18	8,1	9,94	1,25	10,38	2,25	1,41	
10	8,6						8,9						9,5						11,4					
11	9,2						9,6						9,8						11					
12	10,2						10,5						11,2						11,9					
13	10,5	10,58	1,19874935				11,14	1,47				11,2	11,76	1,82				11,9	12,82	2,28				
14	12,5						13,3						14,6						16,					

Tempo 4					Tempo 5					Tempo 6					Tempo 7					Tempo 8					Tempo 9					Tempo 10									
Fecha	Promedio	Desviación estándar	Promedio del periodo	Desviación estándar	Fecha	Promedio	Desviación estándar	Promedio del periodo	Desviación estándar	Fecha	Promedio	Desviación estándar	Promedio del periodo	Desviación estándar	Fecha	Promedio	Desviación estándar	Promedio del periodo	Desviación estándar	Fecha	Promedio	Desviación estándar	Promedio del periodo	Desviación estándar	Fecha	Promedio	Desviación estándar	Promedio del periodo	Desviación estándar	Fecha	Promedio	Desviación estándar	Promedio del periodo	Desviación estándar	Fecha	Promedio	Desviación estándar	Promedio del periodo	Desviación estándar
1					6					1					7					2					8					3					9				
2					7					2					8					3					9					4					10				
3	7.16	0.84			8	7.96	1.14			3	8.42	1.21			9	8.6	1.02			4					10	8.82	0.83			5					11	9	0.73		
4					9					4					10					5					11					6					12				
5					10					5					11					6					12					7					13				
6					11					6					12					7					13					8					14				
7					12					7					13					8					14					9					15				
8					13					8					14					9					15					10					16				
9					14					9					15					10					16					11					17				
10					15					10					16					11					17					12					18				
11					16					11					17					12					18					13					19				
12					17					12					18					13					19					14					20				
13					18					13					19					14					20					15					21				
14					19					14					20					15					21					16					22				
15					20					15					21					16					22					17					23				
16					21					16					22					17					23					18					24				
17					22					17					23					18					24					19					25				
18					23					18					24					19					25					20					26				
19					24					19					25					20					26					21					27				
20					25					20					26					21					27					22					28				
21					26					21					27					22					28					23					29				
22					27					22					28					23					29					24					30				
23					28					23					29					24					30					25					31				
24					29					24					30					25					31					26					32				
25					30					25					31					26					32					27					33				
26					31					26					32					27					33					28					34				
27					32					27					33					28					34					29					35				
28					33					28					34					29					35					30					36				
29					34					29					35					30					36					31					37				
30					35					30					36					31					37					32					38				
31					36					31					37					32					38					33					39				
32					37					32					38					33					39					34					40				
33					38					33					39					34					40					35					41				
34					39					34					40					35					41					36					42				
35					40					35					41					36					42					37					43				
36					41					36					42					37					43					38					44				
37					42					37					43					38					44					39					45				
38					43					38					44					39					45					40					46				
39					44					39					45					40					46					41					47				
40					45					40					46					41					47					42					48				
41					46					41					47					42					48					43					49				
42					47					42					48					43					49					44					50				
43					48					43					49					44					50					45					51				
44					49					44					50					45					51					46					52				
45					50					45					51					46					52					47					53				
46					51					46					52					47					53					48					54				
47					52					47					53					48					54					49					55				
48					53					48					54					49					55					50					56				
49					54					49					55					50					56					51					57				
50					55					50					56					51					57					52					58				
51					56					51					57					52					58					53					59				
52					57					52					58					53					59					54					60				
53					58					53					59					54					60					55					61				
54					59					54					60					55					61					56					62				
55					60					55					61					56					62					57					63				
56					61					56					62					57					63					58					64				
57					62					57					63					58					64					59					65				
58					63					58					64					59					65					60					66				
59					64					59					65					60					66					61					67				
60					65					60					66					61					67					62					68				
61					66					61					67					62					68					63					69				
62					67					62					68					63					69					64					70				
63					68					63					69					64					70														

Tratamiento	Área	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Concentración
t1 p13	279420	303366,5	33865,46507	11,16321844	42,64830888
t1 p12	327313				
t2 p15	256987	430459,5	245327,1622	56,99192658	60,44047486
t2p14	603932				
t4p13	294499	294499,0	294499,0		41,40691847
t5 p15	187759	422946,7	156864,2708	37,0884282	59,38872867
t5p14	601761				
t5p11	308530				
t5p12	358549	414406,0	111574,379	26,92392943	58,19309273
t6p12	493301				
t6 p14	335511	275635,0	451,1341264	0,163670842	38,76608523
t7p10	275954				
t7p10 *	275316				
t8 p11	311803	328398,0	23468,87407	7,146472898	46,15255068
t8p11*	344993				

Anexo 9. Datos obtenidos del área de los picos en el cromatógrafo y análisis estadístico

Tratamiento	Concentración rutina ug/mL
T1	42,64830888
T2	60,44047486
T4	41,40691847
T5	59,38872867
T6	58,19309273
T7	38,76608523
T8	46,15255068

Anexo 10. Datos de concentración de Rutina por tratamiento

Tratamiento	Área Pico 2	Promedio	Desviación estándar	Coficiente
t1 p13	87055	73211,5	19577,66545	26,74124345
t1 p12	59368			
t2 p15	83232	115674,5	45880,6235	39,66355895
t2p14	148117			
t4p13	65137	65137	65137,0	
t5 p15	83232	79644,25		28,7857828
t5p14	104519		22926,22082	
t5p11	48979			
t5p12	81847			
t6p12	77292	84668	10431,23924	12,32016728
t6 p14	92044			
t7p10	62740	59749	4229,912765	7,079470393
t7p10 *	56758			
t8 p11	97997	98809	1148,341413	1,162183012
t8p11*	99621			

Anexo 11 Curva patrón Rutina

Concentración	Área
0,39000	2082,7
0,78000	5147,3
1,56000	11735,0
3,12000	20802,3
6,25000	43243,3
12,50000	87930,0
25,00000	171576,0
50,00000	358718,0

