

Obtención de Flavonoides a partir del cultivo en suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita* L.

Osmar Fernández Chuyn
Eduardo Ojito Céspedes
Lumey Pérez Artiles

RESUMEN

Se investigó la posible obtención de flavonoides por la tecnología del cultivo en suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita* L. Se prueban diferentes métodos de desinfección para las semillas de *Matricaria recutita* L. empleando soluciones de hipoclorito de sodio comercial a diferentes concentraciones que contienen tensioactivos. También se investigaron los tiempos de exposición tanto a las soluciones anteriores como al etanol 70%. Una vez en medio estéril se ensayaron diferentes medios de crecimiento y fitohormonas para la obtención de la plántula, sobresaliendo el MS suplementado con AIA 0.5 mg/L. Se procedió al cultivo de los hipocólitos y cotiledones en MS con diferentes fitohormonas con la finalidad de obtener callos, siendo el más propicio la combinación de 2mg/L de cinetina y 1 mg/L de 2,4 D. Los callos originados en este medio se transfirieron a medio líquido con la misma composición hormonal. Los mismos se ubicaron en zaranda giratoria a 180 rpm donde se valoró la existencia de los flavonoides en el medio por un método cualitativo, arrojando su presencia unido a residuos glicosídicos. Por tanto, el cultivo de células vegetales en suspensión es una alternativa viable en la obtención de estos metabolitos.

ABSTRACT

The cells culture is an alternative source for the production of the secondary metabolites. The aim is to research the expression of flavonoids by culture suspension of *Matricaria recutita* L vegetable cells. There are different methods in order to obtain primary callus from seeds. The calluses were transferred to a liquid medium with a phytohormonal composition, based in kinetine-2,4 dichlorophenoxyacetic, stirring in an orbital shaker at 180 r.p.m. with different culture medium volumes. The flavonoids were determined by qualitative method (Shinoda) in closed and semicontinuous culture process. In closed culture with less medium volume, a decrease of the expression of the flavonoids related to time. In the semi-continuous culture and with a higher medium volume there was a gradual time increase of the flavonoids expression. Viable structures identified as plastids, were also obtained.

PALABRAS CLAVES

• Biotecnología • Flavonoides • Metabolitos • Células vegetales.

OSMAR FERNÁNDEZ CHUYN. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba.

EDUARDO OJITO CÉSPEDES. Área Biotecnología. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba. Ingeniero Químico, Ph.D. en Biotecnología. E-mail: eoijtoc45@hotmail.com

LUMEY PÉREZ ARTILES. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 25 No. 455, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

INTRODUCCIÓN

El sistema de cultivo en suspensión de células vegetales es un poderoso implemento para llevar a cabo estudios en la inducción de embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación, organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición, bioquímica y metabolismo, así como en la obtención de metabolitos secundarios, tales como polifenoles, flavonoides, antocianinas, antquinonas, etc. (Pérez Ponce, 1998). En las plantas, los metabolitos secundarios en altas concentraciones tienden a acumularse en tipos celulares específicos en estados específicos de desarrollo. Así, no es sorprendente que las células de estas plantas en cultivo de tejido aumenten típicamente en cantidades grandes de compuestos secundarios sólo bajo las condiciones específicas de cultivo de la célula, manipulando los parámetros ambientales y de medio de cultivo (Street, 1977; Yeoman, 1980; Barz and Ellis, 1981; Shuler, 1981; Sahai, 1983). Por esta vía se han obtenido más de 30 productos naturales en mayores cantidades un las producidas en las plantas enteras (Staba, 1982).

Los flavonoides son pigmentos naturales que aparecen en las plantas superiores en los estadios de maduración y están presentes en los capítulos florales y en la superficie de los frutos. Muchos de ellos presentan propiedades farmacológicas contra numerosas patologías (Critchfield, 1996; Galve, 1997; Huang, 1996; Lee, 1997; Lepley, 1996; Viola, 1995). La *Matricaria recutita* L. en sus capítulos florales presenta un 0,33% de apigenina y 2.39% de 7-O-beta-glucósido apigenina (Pakic, 1989). En general no se pueden cultivar grandes extensiones de manzanilla, por requerir mucha area, y por otro lado su recogida es una vez al año, por lo que desarrollar una alternativa tecnológica del cultivo de células vegetales en suspensión es una alternativa atractiva para la obtención de flavonoides. Por ello, nuestro objetivo es desarrollar una biotecnología de cultivo en suspensión de estas células que sea capaz de expresar flavonoides en general y la apigenina en particular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección de las semillas. Las semillas de *Matricaria recutita* L. fueron generosamente cedidas por el Centro Experimental de Plantas Medicinales del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) en Guira de Melena, La Habana. Se realizaron en total tres

esquemas de desinfección, en los cuales el resultado del primero en cuanto a germinación de plántulas, originaba el diseño del segundo. El primero consistió en incluir las semillas 10 min en hipoclorito de sodio comercial al 0.5, 1.5 y 2.5%, lavándose tres veces con agua destilada. El segundo diseño, etanol 70 % 1 min, hipoclorito de sodio 2.5 y 3.5% + tween 20 (0.1%) por 15 min y lavado con agua destilada, mientras que la tercera experiencia, etanol 70% 1min, hipoclorito de sodio 3% + tween 20 (0.1%)10 min y lavar con agua destilada tres veces.

Nuestro objetivo es desarrollar una biotecnología de cultivo en suspensión de estas células que sea capaz de expresar flavonoides en general y la apigenina en particular.

Medios de cultivo: Se empleó el medio MS sólido y líquido (Murashigue & Skoog, 1962). En el medio MS sólido se añadió agar a concentraciones de 8mg/L y sacarosa 30mg/L. **Formación de plántulas.** Se empleó el MS sólido (Murashigue & Skoog, 1962) suplementado con AIA al 0.5%. También se empleó un medio de cultivo novedoso basado en la descomposición catalítica de residuos porcinos derivados de la misma Industria mediante procesos de oxidaciones controladas. A este medio también se le incorporó AIA 0.5%.

Formación y propagación de callos: Para la formación de callos se utilizaron los hipocótlitos y cotiledones formados a partir de la germinación de las semillas (Takano e Ikeda, 1983). Se diseñaron varios medios de cultivo: ANA 0.2 y 1mg/L + BAP 2mg/L así como 2,4 D 0,1 y 2 mg/L + Kinetina 0, 1 y 2 mg/L. Los callos seleccionados se propagaron en sus respectivos medios de cultivo. Por cada medios se realizaron 14 réplicas con 5 callos por réplica. Los fragmentos de callos se cortaron con escalpelo y tuvieron un tamaño aprox. de 3mm. Se mantuvieron a 25°C. El primer subcultivo se realizó a los 45 días y el segundo a los 75 días.

Cultivo en suspensión: Se empleó el MS líquido con 30 mg/L de sacarosa. Para el cultivo en suspensión se tomaron los desarrollados en 2,4D (1mg/L) + kinetina (2mg/L). Se añadieron 5 callos de segunda generación, con 30 días de subcultivados, por enlarmeyer de 100mL con 40mL de medio de cultivo. Cada frasco tenía una masa de callos de aprox. 4.28g. Se mantuvieron a una temperatura de 25°C. El cultivo se realizó en zaranda giratoria a 100 y 180 r.p.m. durante

28 días sin cambio de medio de cultivo. Las muestras (3) se colectaron cada 5 días a excepción del primero con 7 días. También se diseñó otro sistema que empleaba enlarmeyer de 250mL con 100 mL de medio de cultivo.

Parámetros: Peso fresco: Puede ser determinado colectando las muestras celulares en un papel de filtro circular prepesado. Las muestras se lavan con agua destilada para remover el medio. Se filtra al vacío y se pesa. Se utilizó una balanza de humedad Sartorius MA-40-000v2.

Peso seco: Con el procedimiento anterior pero se pone a secar a 85°C durante 18 horas.

Conteo celular: Se toma 1 mL de la suspensión y se diluye 1:10 con agua destilada. Se lee en cámara de Neubauer.

Viabilidad celular: Se toman muestras de las suspensiones y se le añade igual volumen de una solución acuosa de Azul de Evans 1% (p/v). Las preparaciones se observan al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Se consideran vivas aquellas células que se excluyen de la tinción.

Presencia de flavonoides: Ensayo de Shinoda (cualitativo). SE toma 1 mL de la suspensión y se le añade 1mL de HCl concentrado. Se agregan virutas de magnesio metálico y a los 5 min se agita con 1 mL de alcohol amílico. El ensayo es positivo si se colorea la fase superior de amarillo claro a pardo, dependiendo de la cantidad de flavonoide.

Análisis estadístico: Se procesaron los datos por un ANOVA de clasificación doble.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de las plántulas: Mediante la observación a las 48 horas se comprobó la germinación de las semillas en todos los medios utilizados para este fin. Los diseños que empleaban hipoclorito de sodio al 0.5 y 1.5% se contaminaron con hongos. A las 72 horas, 2.5 % se contaminó también. El segundo diseño experimental de desinfección con NaClO al 3.5% por 15 min. provocó una fuerte inhibición en la germinación de las semillas, si bien no hubo contaminación. Al probar el NaClO al 2.5% por el mismo tiempo, germinaron las semillas pero nuevamente se contaminó el medio.

La germinación presentó un lento crecimiento y desarrollo, por lo cual se empleó una tercera metodología: disminuir la exposición al NaClO a 10 min., manteniendo constante la

presencia del etanol 70 % y el tensioactivo Tween 20. Las semillas mostraron una adecuada germinación en ambos medios. En el proceso de crecimiento y formación de las plántulas se observaron diferencias en sus patrones. Las plantulas en medio MS tuvieron un crecimiento mas lento que las del medio novedoso girón, en primera instancia. Este es un medio basado en la descomposición catalítica de residuos porcinos que presenta en su composición macro y micronutrientes. Ha sido probado en otras especies con resultados satisfactorios. En el transcurso del tiempo, las plántulas crecidas en MS con AIA. mantuvieron un crecimiento y desarrollo uniformes, mientras que en las pertenecientes al medio novedoso, se apreció un retardo notable del desarrollo, que puede deberse a una limitación en cuanto a sustrato de este medio.

Formación de callos: Los explantes sembrados en los medios con BAP y ANA no presentaron crecimiento en todo el tiempo de muestreo, en ninguna concentración probada. Este resultado difiere de los obtenidos por Takano *et al*, 1991, al probar similares concentraciones de las fitohormonas y desarrollar callos friables.

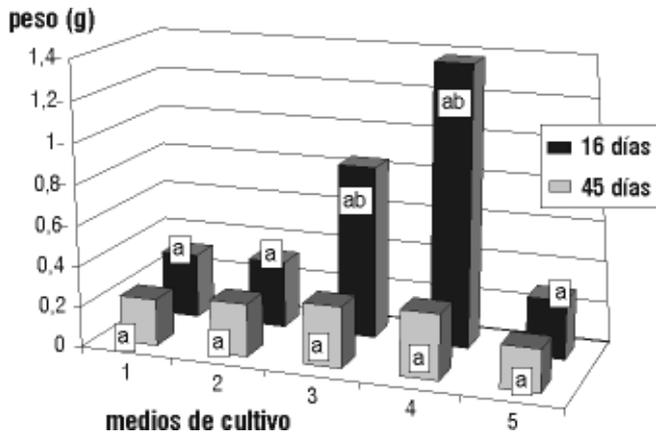
A los 16 días de siembra de los hipocolitos y cotiledones en los medios de cultivo que emplean 2 mg/L 2,4D + 2mg/L kinetina y 1 mg/L 2,4D y kinetina 2mg/L, se puede observar la formación, crecimiento y desarrollo de los callos. En el primero, se presenta un lento crecimiento de los callos así como la formación de estructuras y órganos vegetales. En el segundo, los callos no son muy grandes. De todos los medios es el que presenta una mayor cantidad de estructuras vegetales formadas. En los restantes medios apenas se aprecia la formación de callos. De modo general, hay una pobre formación y crecimiento de las callos a excepción de estos medios citados.

A los 45 días de sembrados se aprecia una diferencia significativa en el crecimiento de los callos de estos dos medios con respecto a los demás, avalados por el test de ANOVA realizado, apreciado en la Figura 1.

En el medio1 con concentraciones de 2 mg/L de 2,4D y sin la presencia de la citoquinina no hubo crecimiento, al igual que la variante del medio 5 con 2mg/L de kinetina con ausencia de la auxina. Una de las propiedades atribuidas a las auxinas es su capacidad para inducir procesos de diferenciación por lo que son necesarias para la iniciación del callo (Barba, 1987). De otro lado, los procesos de

FIGURA 1

Peso de los callos de *Matricaria recutita* L. en los diferentes medios de cultivo con respecto al tiempo



Leyenda: Medios de cultivo

1. 2,4D 2mg/L
2. 2,4D 2mg/L + cinetina 1mg/L
3. 2,4D 2mg/L + cinetina 2mg/L
4. 2,4D 1mg/L + cinetina 2mg/L
5. cinetina 2mg/L

Letras iguales, no hay diferencias significativas.

Letras diferentes, refieren diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

diferenciación celular son estimulados principalmente por las citoquininas, por lo que la ausencia de ellas en el medio de cultivo puede conllevar al no crecimiento del tejido vegetal.

Basándonos en estas propiedades y en el no crecimiento de los callos en el medio 1, se demuestra la importancia de las citoquininas en los procesos de formación del callo, al igual que en el medio 5 que indica la necesidad de utilizar auxinas exógenas para lograr callos en esta especie.

De las diferentes variantes de medios diseñados, el mejor comportamiento se evidenció en el medio 4, donde 1 gm/L fue suficiente para inducir la formación del callo a partir de un tejido joven y poco diferenciado como lo constituyen los hipocólitos y cotiledones. El doble de kinetina tuvo efecto al promover fuertemente la división celular, obteniéndose callos compactos de color pardo oscuro en la región en contacto con el medio de cultivo y un color crema en la parte mas externa.

En los primeros trabajos desarrollados para la obtención de los callos, se examinaron las semillas como material de partida. Se observó al cabo del tiempo que los callos tenían en su porción superior hipocólitos. Esto quiere decir, desde nuestra perspectiva, que de las semillas no pueden brotar directamente los callos, sino que primero ocurre la germinación de los embriones y a partir de ellos, la formación de los callos. Este resultado, tomando como base los medios diseñados, puede indicar que la concentración idónea para esta especie, con la finalidad de iniciar y propagar los callos de *Matricaria recutita* L. Es de 2mg/L de kinetina. Nos

basamos en la observación de que todos los callos que contenían en el medio esta concentración, presentaron crecimiento y en los medios sin kinetina o con concentraciones inferiores a este valor, no se desarrollaron los callos o presentaron un crecimiento muy pobre. Con respecto a las auxinas, a 1mg/L se verifica el crecimiento de los callos.

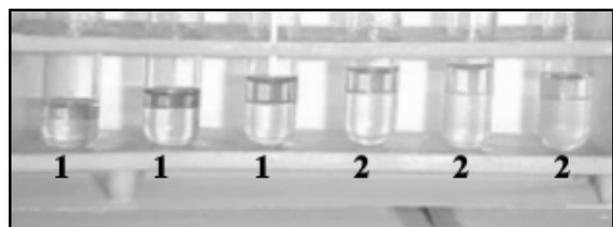
Determinación cualitativa de flavonoides: En el cultivo en suspensión se verificó la presencia de flavonoides por la metodología del ensayo de Shinoda, específico para este tipo de compuestos. En todos los intervalos muestreados, se encontró la presencia de flavonoides, aunque con variaciones en cantidad, a juzgar por las tonalidades. Como puede observarse en las Fig. 2 y 3, los flavonoides se expresaron desde la primera toma de muestra, aunque manifestaron una

FIGURA 2

Presencia de flavonoides en cultivo en suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita* L.

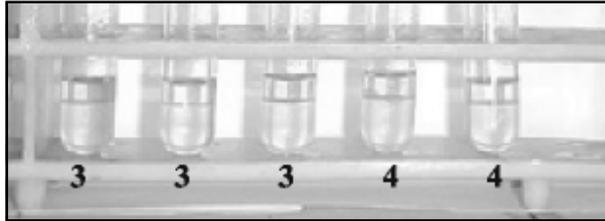
Ensayo de Shinoda.

Volumen de medio de cultivo 40 mL



Números similares son muestras similares a diferentes tiempos

FIGURA 3
Presencia de flavonoides en cultivo en suspensión
de células vegetales de *Matricaria recutita* L. Ensayo
de Shinoda Volumen de medio de cultivo 40 mL



Números similares son muestras similares
a diferentes tiempos

tendencia a disminuir en el transcurso del tiempo. Ello puede deberse, entre otros factores, a que no se cambió el medio de cultivo con posible acumulación de toxinas, desechos metabólicos, posible depleción de las fuentes de carbono, represión de las enzimas por los propios flavonoides y más que nada por las altas r.p.m. a las que se sometió el cultivo.

No obstante, a pesar de la presencia de flavonoides en todos los tiempos de muestreo, se observó una tendencia a la disminución en la expresión de los mismos a los intervalos más tardíos, dada por la disminución de la coloración a un amarillo más pálido. Ello puede deberse, también a una posible represión del sistema enzimático encargado de la síntesis de flavonoides debido a acumulación de éstos en el medio y las células, como postula Córdoba (1976) citando a (Hahlbrock *et al*, 1971) en sus trabajos con *Petroselinum crispum* cuando definieron la existencia de la represión de una de las enzimas claves en la síntesis de los flavonoides, la fenil-alanil amonoliasa, producto de la acumulación de estas sustancias en la célula.

Los resultados de la cromatografía realizados no muestran la presencia de los flavonoides. No obstante, el ensayo de Shinoda sí arroja la presencia de flavonoides en el medio de cultivo. Al usar en los ensayos cromatográficos patrones puros de comparación de flavonoides, no aparecen en el cromatograma picos coincidentes entre los patrones y las muestras del cultivo en suspensión. Los flavonoides en la naturaleza casi siempre están unidos a restos glicosídicos y es por ello que al comparar dos sustancias, flavonoides puros y flavonoides unidos a restos glicosídicos, con distinto peso molecular y patrón de comportamiento ante una técnica que se basa en estas propiedades, las técnicas analíticas no coincidieron.

Parámetros celulares: En cuanto al conteo celular, se pudo realizar a los 6 días de cultivo, no así en los restantes tiempos. En nuestra opinión se debe a las altas revoluciones por minuto a que estuvo sometido el cultivo, 180 r.p.m., donde las células vegetales no soportan tanta tensión y tienden a colapsar. La mayoría de los cultivos en suspensión se someten a 100-150 r.p.m., pero en nuestras condiciones experimentales, no se pudo disminuir esta condición. La densidad de las células en este conteo fue de 4.0×10^3 , considerada baja a la densidad crítica inicial en un cultivo en suspensión. Esta se debe encontrar en un rango de $9-15 \times 10^3$ (Street, 1977). La vitalidad celular también fue considerada baja (14.35%). Cuando existen muy pocas células en el medio de cultivo, estas generalmente mueren, pues necesitan de un número determinado para poder retroalimentarse

No obstante, al realizar las observaciones microscópicas, aparecieron estructuras de 2 a 3 micras. Se les realizó una tinción con diacetato de fluoresceína y fluorecieron a la luz ultravioleta. Conociendo que esta sustancia reacciona con las esterasas funcionales presentes en las membranas celulares, se puede afirmar que estamos en presencia de una estructura viva y que probablemente esté metabolizando.

Teniendo en consideración que las células de manzanilla observadas en el primer muestreo presentaban un tamaño relativamente grande, típico de células vegetales, que estamos en presencia de un cultivo estéril, consideramos que estas estructuras pueden ser plastidios, organelos celulares con membrana plasmática, DNA propio y capaz de realizar síntesis de compuestos celulares. Estos organelos se piensa derivaron de bacterias en simbiosis con células y se incorporaron a éstas (DeRobertis, 1981; Lehninger, 1980).

Debido a ciertos inconvenientes inherentes al sistema, los cultivos en forma de batch no son ideales para el estudio del crecimiento celular y su metabolismo (Street, 1977). Este tipo de cultivo está caracterizado por cambios constantes en el patrón de crecimiento celular y su metabolismo, así como en la composición del medio de cultivo. Aún así, se obtuvieron flavonoides.

Estos compuestos pueden ser sintetizados en primera instancia por las células externas del callo, cuando se inició la suspensión y posteriormente, al desprenderse estas células, por las mismas antes de colapsar y por la capa inmediata inferior del callo. Una vez desecha la pared celular

y liberados los componentes celulares, cabe la posibilidad de síntesis. La enzima microsomal flavonoide 3´hidroxilasa es capaz de formar dihidroquercetina y quercetina a partir del dihidrokaempferol (40pmol/min/mg proteína) y kaempfeol (3.25pmol/min/mg proteína), respectivamente. A la vez que la luz se comporta como un inductor de la flavonoide 3´hidroxilasa aumentando al doble la actividad específica e incrementando el contenido microsomal del citocromo p450 en un 30% por encima de las células sin exposición a la luz (Doostdar *et al*, 1995).

En la experiencia a 100 r.p.m. no se obtuvieron células al cabo de 7 días. Con posterioridad se contaminaron. A 180 r.p.m. sí se obtuvieron células al mismo tiempo de muestreo por lo que podemos esbozar que la condición de 100 r.p.m. no es suficiente para desagregar la células del callo, de por sí poco friable.

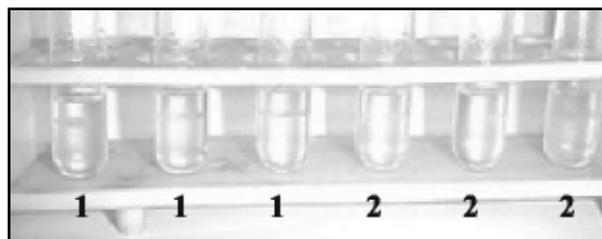
En otra experiencia, utilizando como inóculo la parte crema del callo, a los 7 días se obtuvieron células viables, aunque la viabilidad era muy baja (24%). La suspensión se mantuvo cristalina, sin tendencia a oscurecer el medio, como en las suspensiones iniciadas a partir de callos completos. Este comportamiento puede deberse a que al colocar el callo completo, se introducen células viejas, muchas de ellas diferenciadas o muertas, al contrario, ocurre al tomar la parte más externa del callo donde la mayor cantidad de las células son jóvenes y poco diferenciadas.

Una mayor densidad de células se observó en el medio de cultivo en los tres primeros muestreos ($5.0-5.5-6.7 \times 10^3$, respectivamente) con respecto a la suspensión iniciada a partir de callos completos con 50 mL de medio en las que sólo se observó células enteras y viables en el primer muestreo, lo que nos induce a pensar que la alternativa de aumentar la cantidad de medio de cultivo al doble y tomar sólo la parte más externa del callo, resultó positiva. Esta alternativa disminuye el stress mecánico producido por la altas r.p.m. sobre la pared celular, por lo que la cantidad de células colapsadas es menor. En esta suspensión encontramos las mismas estructuras que se definieron como plastidios en las experiencias anteriores.

La vitalidad celular se consideró baja en los tres muestreos con valores de 17.76%, 23.45% y 24.85%, aunque hay una tendencia a aumentar en cada subcultivo realizado al igual que la densidad de células.

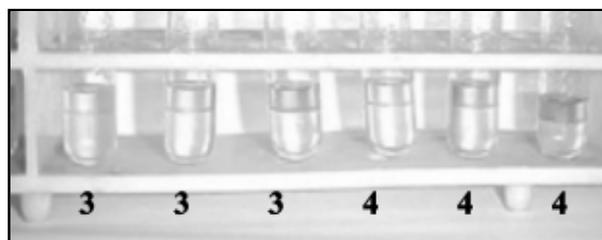
Al realizar el ensayo específico para flavonoides, encontramos la presencia de flavonoides, como se aprecia en las figuras 4 y 5.

FIGURA 4
Presencia de flavonoides en cultivo en suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita* L.
Ensayo de Shinoda.
Volumen de medio de cultivo 100 mL



Números similares son muestras similares a diferentes tiempos

Figura 5
Presencia de flavonoides en cultivo en suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita* L.
Ensayo de Shinoda.
Volumen de medio de cultivo 100 mL



Números similares son muestras similares a diferentes tiempos

Como se puede observar, a medida que transcurre el tiempo, el color es más intenso, por lo cual se deduce que la cantidad de flavonoides presentes es mayor. Al comparar estos resultados con los obtenidos en el experimento anterior, que emplea 40 mL de medio de cultivo y cerrado, se muestra una diferencia en la expresión de flavonoides a través del tiempo. Ello puede venir dado por las diferentes condiciones experimentales, como el recambio de medio de cultivo y su aumento al doble, lo que contribuye al mantenimiento de la suspensión verificado por el conteo celular y la vitalidad celular analizada hasta el tercer muestreo.

En conclusión, se desarrolló un sistema de cultivo de tejido en suspensión en el cual se logró obtener la expresión de flavonoides a partir de los callos de *Matricaria recutita* L.

ABREVIATURAS

- BAP.** Ácido bencilaminopurina
ANA. Ácido naftalénico
AIA. Ácido indolacético
2,4D. Ácido 2,4 diclorofenoacético
r.p.m. revoluciones por minuto

REFERENCIAS

- Córdoba, C. (1976). Fisiología vegetal. HIB. H Blume ediciones, pp. 408-412.
- Critchfield-JW; Butera-ST; Folks-TM. (1996). Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS-Res-Hum-Retroviruses*. Jan 1; 12(1): pp. 39-46.
- De Robertis, E; de Robertis, M. (1981). *Biología celular y molecular* I. 10a. ed. La Habana Edición revolucionaria.
- Doostdar, H.; Shapiro, J. P.; Niedz, R.; Burke, M. D.; McCollum, T. G.; McDonald, R. E., and Mayer, R. T. (1995). *A cytochrome P450 mediated naringenin 3-Hydroxylase from sweet orange cell cultures*. En: *PLANT-CELL-PHYSIOL*. Vol. 36, **No. 1**, pp. 69-77.
- Galve, I; Haro, A; Díaz, I. (1997). Induction of nerve growth factor synthesis by sphingomyelinase and ceramide in primary astrocyte cultures. En: *Brain-Res-Mol-Brain-Res*. 52(1), pp. 90-7.
- Huang-YT; Kuo-ML; Liu-JY; Huang-SY; Lin-JK. (1996). Inhibitions of protein kinase C and proto-oncogene expressions in NIH 3T3 cells by apigenin. En: *Eur-J-Cancer*. Jan; 32A(1), pp. 146-151.
- Lee, S.F.; Lin, J.K. (1997). Inhibitory effects of phytopolyphenols on TPA-induced transformation, PKC activation, and c-jun expression in mouse fibroblast cells. En: *Nutr-cancer*. Mahwah, N.J. : Lawrence Erlbaum Associates, Inc. v. 28 **No. 2**, pp. 177-183.
- Lehninger, A. (1996). Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da ed. La Habana Edición revolucionaria.
- Lepley-DM; Li-B; Birt-DF; Pelling-JC. (1996). The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. En: *Carcinogenesis*. **No. 11**, pp. 2367-75.
- M. L. Shuler, Ann. (1981). *N.Y. Acad. Sci.* 369, **No. 65**.
- Murashige, T and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. En: *Physiol. Plant*. **No. 15**, pp. 473-497
- Pakic,-B.; Lepojevic,-Z.; Slavica,-B. (1989). The determination of apigenin 7-0-beta-glucoside in the *Matricaria chamomilla* ligulate flowers. En: *Arhiv-za-farmaciju* (Yugoslavia). v. 39. **No. 5**, pp. 163-168.
- Perez Ponce, J.N. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas, pp. 13-56.
- Sahai O. P. and M.L. Shuler. (1983). *Biotechnol. Bioeng.* 26, **No. 111**.
- Staba E. J. (1982). In *Plant Tissue Culture 1982*, A. Fujiwara, Ed. (Maruzen, Tokyo, Japan).
- Street H.E. (1977). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, J. Reinert, Y. P. S. Bajaj, New York: Eds. Spnnger-Verlag, pp. 649-667;
- Takano, H; Hirano, M; Taniguchi, K; Tanaka, R; Kondo, K. (1991). Rapid clonal propagation of *Matricaria recutita* L. by tissue-cultured shoot primordia. Japan. En: *J. Breed.* **No. 41**, pp. 421-426.
- Viola,-H.; Wasowski,-C.; Stein,-M.L.-de; Wolfman,-C.; Silveira,-R.; Dajas,-F.; Medina,-J.H.; Paladini,-A.C. (1995). Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. D. En: *Planta-Médica* (Germany). v. 61. **No. 3**, pp. 213-216.
- W. Barz and B. E. Ellis. (1981). *Natural Products as Medicinal Agents*, J.L. Beal and E. Reinhard, Eds. (Hippokrates, Stuttgart, Germany).
- Yeoman M. M., M. B. Miedzybrodzka, K. Lindsey, and W. R. McLaughlan. (1980). *Plant Cell Cultures, Results and Perspectives*. F. Sala, B. Parisi, R. Cella, O. Cifferi, Eds. New York, Elsevier, pp. 327-343.