

PRODUCCIÓN DE ALOÍNA EN CALLOS Y HOJAS DE BROTES DE ZÁBILA (*Aloe vera* L.) REGENERADOS *in vitro*

Ángela Matos Acurero¹

RESUMEN

Aloe vera L. es actualmente una de las plantas de mayor importancia económica y medicinal debido a los metabolitos secundarios que produce, tales como la aloína, que es utilizada en la industria cosmética y farmacéutica. En este trabajo se cuantificó la producción de este compuesto en callos y hojas de brotes regenerados *in vitro*, cultivados durante 3, 6 y 12 meses, comparándolos con la producción en medios controles y plantas silvestres de esta especie. Se utilizó medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con diferentes concentraciones hormonales. La edad del cultivo fue factor importante en la producción de aloína en el material estudiado (hojas de brotes regenerados *in vitro*). Se observó que la producción de aloína fue muy variable, siendo mayor en callos basales cultivados en el medio que contenía 0,5 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 0,1 mg·L⁻¹ de cinetina, con resultados superiores a los encontrados en los medios controles y en hojas de plantas silvestres. El contenido de aloína en hojas de brotes regenerados *in vitro* cultivados en medio MS con 0,5 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 5 mg·L⁻¹ de cinetina, fue menor al de los callos pero levemente superior al de plantas silvestres. Estos resultados muestran que los cultivos de callos son una fuente importante para la producción de metabolitos secundarios en zábila.

Palabras clave adicionales: Metabolitos secundarios, tipo de explante, edad del cultivo

ABSTRACT

Aloin production in calli and leaves of *in vitro* regenerated shoots of aloe (*Aloe vera* L.)

Aloe vera L. is currently an important commercial and medicinal plant because it produces secondary metabolites, such as aloin, which is used in cosmetics and pharmaceuticals. In this research, we quantified the production of this compound in calluses and leaves of *in vitro* regenerated shoots, cultured for 3, 6 and 12 months, compared with the content in controls and wild plants. The Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with different hormone levels was used. The age of the cultures was an important factor for aloin production in the studied material (leaves of *in vitro* regenerated shoots). The aloin production was variable, being higher in basal callus grown on medium containing 2,4-D (0.5 mg·L⁻¹) and kinetin (0.1 mg·L⁻¹), and higher than the production observed in control media and wild plant leaves. The aloin content in leaves of *in vitro* regenerated shoots cultured in MS supplemented with 2,4-D (0.5 mg·L⁻¹) and kinetin (5 mg·L⁻¹) was lower than that in the callus but slightly higher than in wild plants. These results show that callus cultures represent a promising source for secondary metabolites production in *A. vera*.

Additional key words: Secondary metabolites, explant type, culture age

INTRODUCCIÓN

Aloe vera L. es una planta muy distribuida en todo el mundo. La mayoría de los autores señalan su origen en Sudáfrica; sin embargo, puede encontrarse en todo el mundo especialmente en las zonas tropicales y subtropicales (Carpano et al., 2009).

La zábila es una de las especies de mayor importancia económica y medicinal actualmente por la gran cantidad de metabolitos secundarios

con propiedades medicinales y cosméticas (Ndhala et al., 2009; Yun et al., 2009) y por su uso en la industria alimentaria (Ramachandra y Srinivasa Rao, 2008). Entre estos metabolitos de la zábila se encuentra la aloína que es el principal compuesto fenólico y el componente mayoritario en las hojas de esta planta (Groom y Reynolds, 1986), siendo uno de los compuestos que ésta secreta como defensa contra depredadores (Esteban et al., 2001).

El cultivo *in vitro* se ha utilizado para la

Recibido: Mayo 26, 2010

Aceptado: Abril 18, 2011

¹Dpto. de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apdo. 526. Maracaibo. Venezuela. e.mail: amatos@fec.luz.edu.ve; civefecluz@gmail.com

obtención de compuestos de interés farmacéutico, agroalimentario e industrial. De hecho, durante muchos años, las investigaciones en esta área demostraron que la producción de algunos compuestos era igual o superior a los de la planta parental. De esta manera, el empleo de los cultivos *in vitro* se convirtió en herramienta fundamental para la industria, que ha comercializado los metabolitos obtenidos a partir de diferentes especies de plantas (Vasconsuelo y Boland, 2007).

La alta demanda comercial que existe en la actualidad por la zábila y la expansión de las áreas cultivadas destinadas a satisfacer las exigencias del mercado han encontrado limitaciones debido a la carencia de técnicas eficientes de propagación tradicional y a la creciente incidencia de patógenos que genera cuantiosas pérdidas al provocar la muerte de plantas adultas en plena producción (Imery, 2006). Además, las plantaciones y explotación del cultivo se ven afectadas pues no pueden ser tratadas con fertilizantes ya que perderían su certificación para la exportación según las normas de la Asociación Internacional de la zábila (Piña-Zambrano, 2005; Piña-Zambrano y Chirino, 2008). Asimismo, las características fisiológicas y genéticas de esta planta de clima xerofítico, le impiden desarrollarse en climas templados. Esto ha impulsado el inicio de programas de cultivos *in vitro* con la finalidad de obtener plantas con mayores volúmenes de producción y obtención de metabolitos secundarios *in vitro* con las mismas propiedades terapéuticas que los producidos por la planta natural, pero con una alta productividad y pureza.

Son escasos los estudios sobre la identificación y cuantificación de aloína en cultivos *in vitro* de zábila. Trabajos previos acerca de la producción de metabolitos secundarios en esta planta y la utilización de elicitores fueron llevados a cabo por Matos (2005; 2008) y Tablante (2009) quienes midieron la producción de compuestos tales como aloesina, aloína y aloe-emodina. En tal sentido, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del tipo de explante, la edad del cultivo y la combinación hormonal sobre el contenido de aloína en callos y en hojas de brotes regenerados *in vitro* de *Aloe vera* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron una serie de medios de cultivo con distintas concentraciones de reguladores del crecimiento para evaluar el efecto sobre el contenido de aloína, tanto en callos como en hojas de brotes regenerados *in vitro*, en cultivos con distintas edades.

Hojas de brotes regenerados *in vitro*

Para el establecimiento de los cultivos se siguieron las metodologías de Matos et al. (2000) y Matos (2005), seleccionando plantas silvestres sanas, de 10 cm de longitud, colectadas y mantenidas bajo condiciones naturales en los jardines del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia, en Maracaibo, Venezuela, para aislar y obtener las yemas apicales que fueron utilizadas como explantes. Las yemas fueron desinfectadas bajo condiciones asépticas en una solución de hipoclorito de sodio al 6 %, durante 20 min en constante agitación. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril y se cultivaron en medios constituidos por las sales de Murashige y Skoog (MS), 3 % de sacarosa, 100 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico y 0,9 % de agar. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atm por 20 min, con pH ajustado a 5,7-5,8. Se colocaron yemas en medios sin hormonas (MS0, medio control) y en otros suplementados con diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento, denominados MS1, MS2 y MS3 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Combinación de los reguladores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo para el cultivo de yemas de *Aloe vera*

Medios de cultivo	Auxinas	Citocininas
	(mg·L ⁻¹) 2,4-D	(mg·L ⁻¹) Cinetina
MS0 (control)	-	-
MS1	0,1	5
MS2	0,5	5
MS3	1	5

Las yemas se cultivaron en frascos de vidrio cerrados (tres yemas por cada frasco) y se colocaron en un cuarto de cultivo a una temperatura de 26 ± 1 °C bajo luz continua fluorescente de 40 μmol·m⁻²·s⁻¹, con subcultivos

cada 30 días hasta el momento de la toma de las muestras. Para ello, se colectaron hojas de brotes que habían sido cultivados *in vitro* durante 3, 6 y 12 meses para los análisis de contenido de aloína, con un total de 72 brotes estudiados. Se colectaron las hojas más largas, de aproximadamente la misma longitud. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

Callos basales

Dado que se forman callos productores de metabolitos secundarios en la base de los brotes de *A. vera* obtenidos mediante cultivo *in vitro* (Matos, 2005), las yemas apicales provenientes de las plantas silvestres fueron cultivadas en medios MS con las combinaciones hormonales mostradas en el Cuadro 2. Los callos formados fueron aislados y transferidos a frascos de cultivo con el mismo medio MS y combinaciones hormonales donde crecieron los brotes. De los medios descritos en el Cuadro 2, sólo aquellos con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA (medio CB3) y $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D más $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinetina (medio CB4) produjeron suficiente cantidad de callo para llevar a cabo los análisis. Los callos se colocaron en frascos con 25 mL de medio a 26 ± 1 °C bajo las mismas condiciones antes descritas y fueron transferidos a medio fresco cada 30 días; después del cuarto subcultivo, los callos se colectaron para los análisis de producción de aloína.

Cuadro 2. Combinación de los reguladores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo para el cultivo de callos basales (CB) y callos obtenidos a partir de hojas silvestres (CH) de *Aloe vera*

Medios de cultivo	Auxinas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		Citocininas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	
	2,4-D	AIA	BA	Cinetina
CB1	0,1	-	5	-
CB2	0,5	-	5	-
CB3	1,0	-	5	-
CB4	0,5	-	-	0,1
CB5	0,5	-	-	0,5
CB6	0,5	-	-	1,0
CH1	1,0	-	5	-
CH2	-	1,0	5	-

Callos obtenidos a partir de hojas

Se lavaron y esterilizaron con hipoclorito de sodio al 10 % durante 20 min hojas de 10 cm de longitud de plantas silvestres de *A. vera* y se cortaron en piezas de $15\text{-}20 \text{ mm}^2$ bajo condiciones asépticas. Los fragmentos de hojas (explantes) se cultivaron en medios diferentes suplementados con auxinas (2,4-D y AIA) y citocininas (BA y cinetina) en varias combinaciones (Cuadro 2). Se cultivaron cuatro explantes por cada frasco y 10 frascos por cada medio, pasándolos a medio fresco cada 30 días. Después del cuarto subcultivo, los callos se colectaron para los análisis de producción de aloína. La mayoría de estos callos fueron pequeños, compactos (no friables), lo que dificultó su posterior procesamiento y la mayoría no sobrevivió por ennegrecimiento del medio y necrosis del tejido; por ello, en este trabajo sólo se presentan los resultados de los callos que crecieron en los medios identificados como CH1 y CH2 (Cuadro 2), donde se formaron callos friables, en suficiente cantidad para llevar a cabo los análisis.

El proceso de extracción y análisis del contenido de aloína se llevó a cabo por triplicado siguiendo el protocolo descrito por Park et al. (1998) en las muestras tanto de hojas de plantas silvestres como en callos y hojas de los brotes regenerados *in vitro*.

El análisis de los extractos etanólicos del compuesto estándar y de las muestras se llevó a cabo mediante separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en un sistema Agilent 1100, del Laboratorio de Tecnología de Alimentos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias del estado Zulia. Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza y prueba de medias de Tukey utilizando el programa SPSS v.17.

RESULTADOS

La curva de calibración para la detección de la aloína fue lineal, y mostró que el límite fue de $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un tiempo de retención de 42,494 min (Figura 1A). Dado que la aloína se presenta en sus dos isoformas: aloína A y aloína B, tal como se ha descrito con anterioridad (Manitto et al., 1990), para su cuantificación se sumaron los resultados obtenidos en cada pico, y así obtener el valor total de aloína presente en el

extracto. Al comparar los cromatogramas y tiempos de retención de los extractos de hojas silvestres con los resultados obtenidos al inyectar el compuesto estándar de aloína, se puede deducir que los picos 1a y 1b corresponden a los de la aloína A y B, respectivamente (Figura 1B).

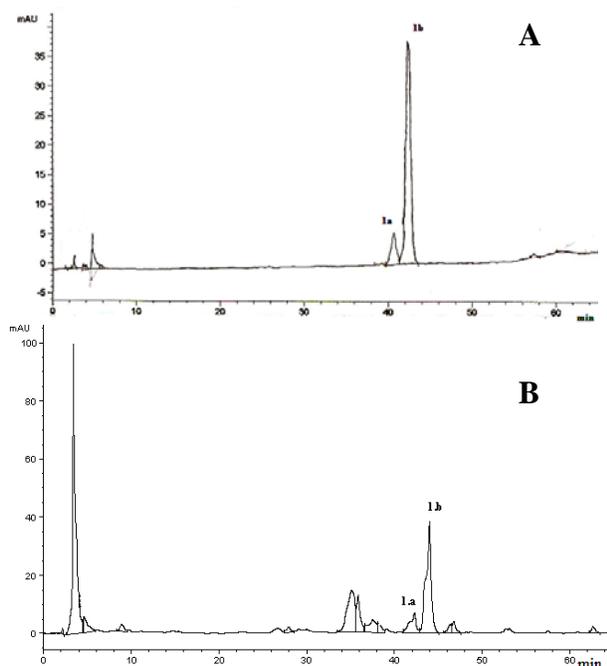


Figura 1. A. Cromatograma de la solución del compuesto estándar de aloína (Sigma, 97 %). B. Cromatograma del extracto etanólico de hojas de plantas silvestres de *Aloe vera*. 1a: aloína A, 1b: aloína B

Producción de aloína en hojas de brotes regenerados *in vitro*

En la Figura 2 se observa que la producción de aloína no varió con la edad en hojas de brotes crecidos en medio control, pero disminuyó con la edad ($P \leq 0,05$) en MS2 y MS3. En todos los casos, el contenido promedio de aloína en el control ($13,008 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) fue menor al compararlo con el observado en hojas de plantas silvestres, donde se encontró un valor de $15,073 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco.

En el medio MS1 el contenido de aloína en hojas de brotes cultivados durante 3 y 12 meses fue mayor al observado en hojas silvestres. La producción a la edad de 12 meses ($17,716 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) fue superior ($P \leq 0,05$) que a los 3 meses ($16,448 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). En ambos casos, el promedio de producción de aloína fue mayor que la del medio control sin hormonas (MS0).

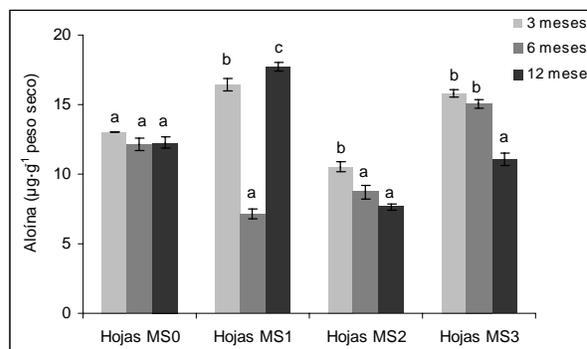


Figura 2. Contenido de aloína en hojas de brotes de *Aloe vera* regenerados *in vitro* con respecto a la edad del cultivo en medio control sin hormonas (MS0), medio MS1 ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D y $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinetina), MS2 ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D y $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cinetina) y medio MS3 (con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D y $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cinetina). Cada barra representa el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

En el medio MS2 los promedios encontrados fueron inferiores a los obtenidos tanto en el medio control como en las hojas de plantas silvestres (Figura 2). Por su parte, en el medio MS3 se observó que la producción fue disminuyendo a medida que aumentaba la edad del cultivo; el contenido en hojas de brotes cultivados durante 3 y 6 meses se incrementó entre 20 y 24 % por encima de lo observado en el medio control.

La edad de los cultivos tuvo efecto significativo sobre la producción de aloína; el medio más apropiado para la producción del metabolito resultó ser el MS1, especialmente en hojas de brotes mantenidos *in vitro* durante 12 meses.

Producción de aloína en callos

La producción de aloína en el material *in vitro* (callos) fue variable, en concordancia con el tipo de explante y la combinación hormonal (Figura 3). Los mejores medios para la producción de aloína en callos basales fueron CB4 y CB3. El contenido de aloína de estos dos medios fue un poco más del doble de lo encontrado en hojas de plantas silvestres; específicamente, en CB4 el contenido de aloína fue 2,8 veces superior y en CB3 el valor fue 2,3 veces superior.

En los callos obtenidos a partir de hojas de

plantas silvestres (Figura 3), el contenido de aloína fue bajo con ambos medios (CH1 y CH2), encontrándose diferencias ($P \leq 0,05$) al compararlo con los callos basales. No hubo diferencias con hojas de plantas silvestres. El contenido más alto de aloína se obtuvo con el medio CH1, con un promedio de $14,37 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco.

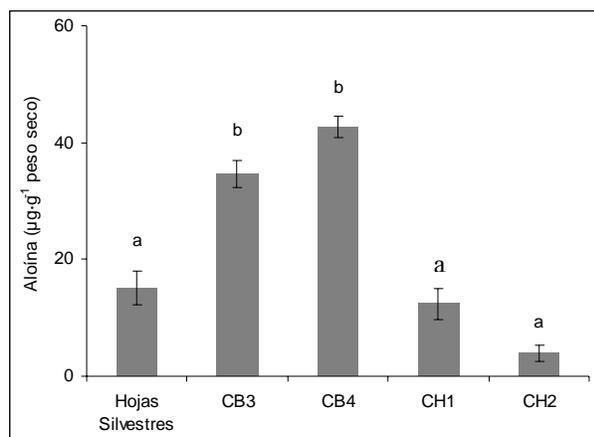


Figura 3. Contenido de aloína en hojas de plantas silvestres de *Aloe vera*, y en callos basales cultivados en medio CB3 ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D y $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA) y CB4 ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D y $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cinetina), callos obtenidos de hojas de plantas silvestres en medio CH1 ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D y $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA) y CH2 ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIA y $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA). Cada barra representa el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

DISCUSIÓN

En este trabajo pudieron observarse variaciones cualitativas y cuantitativas en los cromatogramas analizados, tanto en hojas de plantas silvestres como en el material *in vitro* analizado, debido principalmente a que los compuestos fenólicos, como la aloína, se sintetizan a través de rutas metabólicas complejas, muy susceptibles a las influencias ambientales, lo que provoca variaciones importantes, y por ello su producción depende, además de la edad y tipo de explante, de la composición del medio de cultivo y otros factores ambientales (Yan et al., 2009). Por tanto es indispensable la reducción de las variaciones ambientales en la mayor medida posible, para lo cual los sistemas de cultivo *in vitro* representan una herramienta de gran utilidad

mediante el uso de medios nutritivos de composición definida y el mantenimiento de los cultivos en condiciones de luz, temperatura y humedad muy semejantes.

No obstante, a pesar de la homogeneidad del sistema *in vitro*, persisten fuentes de variación difíciles de controlar, como las diferencias en la respuesta de unos brotes a otros y de unos subcultivos a otros. De hecho, según Botes et al. (2008), la fitoquímica de *Aloe* es muy susceptible debido a las variaciones inter-específicas y condiciones de clima y suelo. Incluso, dentro de un mismo brote, el contenido de un determinado compuesto puede variar dependiendo del tipo de tejido y de la zona que se seleccione como muestra (Gutterman y Chauser-Volfson, 2000). En este sentido, se considera que en el presente trabajo, las principales fuentes de variación del contenido de aloína han estado relacionadas con la edad de los cultivos, el tipo del material y las diferentes combinaciones hormonales.

Se demostró que la adición de reguladores al medio de cultivo no es necesaria para la producción de determinados metabolitos secundarios, ya que en el medio MS0, sin hormonas, también se sintetizó aloína; sin embargo, los reguladores son necesarios para incrementar su producción.

El contenido de aloína fue muy variable, dependiendo del tipo del explante, de la edad del cultivo y de la combinación hormonal utilizada. Por ejemplo, las producciones más altas de aloína en hojas se obtuvieron en brotes que se cultivaron en medio MS1 durante 3 y 12 meses. En callos, el contenido fue 2,4 veces mayor al encontrado en hojas, especialmente en callos basales cultivados en el medio CB4. Es posible que los altos valores de aloína encontrados en los cultivos de callos se deban a la presencia en éstos de células indiferenciadas y en constante división, lo que podría incrementar la producción de un determinado compuesto (Pasqua et al., 2003).

El contenido de compuestos fenólicos está relacionado con la edad de los cultivos y se ha encontrado que el contenido de metabolitos secundarios disminuye al aumentar la edad de los tejidos y/o cultivos (Nadeem et al., 2002; Henriques et al., 2004). Sin embargo, también ha habido efectos contrarios (García et al., 1981). Los resultados aquí presentados indican que en el

material estudiado de *Aloe vera*, con diferentes edades, la síntesis y acumulación de aloína fue muy variable; por ejemplo en el medio MS1 se encontraron valores altos y muy cercanos en hojas de cultivos de 3 y 12 meses, pero inferiores en cultivos de 6 meses. Estas variaciones podrían ser debidas a la existencia de factores endógenos que entran en juego en el proceso de síntesis de un metabolito secundario relacionados con el estado fisiológico del material estudiado en los distintos estadios de desarrollo de los cultivos junto con la capacidad de respuesta del explante ante reguladores de crecimiento suministrados de forma exógena.

Algunos reguladores del crecimiento pueden influir en la producción de un determinado metabolito secundario (Bourgaud et al., 2001; Zhao et al., 2001), estimulando (Lucchesini et al., 2009) o inhibiendo (Massot et al., 2000) la producción de éste. Asimismo, parece existir más de una combinación hormonal adecuada para la producción de un determinado compuesto secundario, lo que explicaría por qué el mismo compuesto se produce en mayor cantidad con diferentes combinaciones hormonales; por ejemplo, en un estudio anterior, las mejores respuestas en callos basales se obtuvieron al utilizar 2,4-D y BA (Matos, 2008), mientras que en el presente estudio, el contenido de aloína tanto en hojas como en callos fue variable con las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y mayor en los medios que contenían 2,4-D con cinetina y BA.

CONCLUSIONES

La edad de los cultivos mostró ser un factor importante para la producción de aloína en las hojas de los brotes de *A. vera* regenerados *in vitro*.

La adición de reguladores al medio de cultivo no resultó necesaria para la síntesis de este metabolito, aunque sí lo fue para incrementar su producción.

El análisis conjunto de las variaciones observadas en el contenido de aloína parece indicar que el cultivo *in vitro*, bien sea a través de la utilización de hojas de brotes o de callos, es una técnica idónea para la producción de compuestos fenólicos en *Aloe vera*. Sin embargo, el uso de callos permite la obtención de dicho compuesto en

mayor cantidad que las hojas de brotes. Observaciones como éstas podrían servir de base para posteriores estudios destinados a la producción a gran escala de un determinado metabolito.

LITERATURA CITADA

1. Botes, L., F. van der Westhuizen y D. Loots. 2008. Phytochemical contents and antioxidant capacities of two *Aloe greatheadii* var. davyana extracts. *Molecules* 13: 2169-2180.
2. Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi y E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
3. Carpano, S., M. Castro y E. Spegazzini. 2009. Caracterización morfoanatómica comparativa entre *Aloe vera* (L.) Burm. F., *Aloe arborescens* Mill., *Aloe saponaria* Haw. y *Aloe ciliaris* Haw. (Aloeaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19(1): 269-275.
4. Esteban, A., M. López, J. Zapata, B. Sabater y M. Martín. 2001. Oxidation of phenolic compounds from *Aloe barbadensis* by peroxidase activity: posible involvement in defence reactions. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 521-527.
5. García, M., A. Ballester y E. Vieitez. 1981. Study on the isolated growth substances in juvenile cuttings of *Castanea sativa* Mill. in relation with the rooting capacity. *An. Edaf. Agrobiol.* 40: 1235-1241.
6. Groom, Q. y T. Reynolds. 1986. Barbaloin in aloe species. *Planta Medica* 52: 345-348.
7. Gutterman, Y. y E. Chauser-Volfson. 2000. The distribution of the phenolic metabolites barbaloin, aloeresin and aloenin as a peripheral defense strategy in the succulent leaf parts of *Aloe arborescens*. *Biochemical Systematics and Ecology* 28(9): 825-838.
8. Henriques, A., S. Lopes, J. Parahnos, T. Gregianini y T. Lino. 2004. N, β -

- glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shorts of *Psychotria leiocarpa*. *Phytochemistry* 65(4): 449-454.
9. Imery, J. 2006. Caracterización genética de parentales e híbridos diploides [V_s] y triploides [VV_s] entre *Aloe vera* (L) Buró. F. [2v, 2v] y *Aloe saponaria* Haw [2s] (Aloaceae). Tesis. Universidad Central de Venezuela. Postgrado de Botánica. 147 p.
 10. Lucchesini, M., A. Bertoli, A. Mensuali-Sodi y L. Pistelli. 2009. Establishment of *in vitro* tissue cultures from *Echinacea angustifolia* D.C. adult plants for the production of phytochemicals compounds. *Scientia Horticulturae* 122(3): 484-490.
 11. Manitto, P., D. Monti y G. Speranza. 1990. I principali costituenti dell'Aloe di interesse farmaceutico e cosmetico. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*: 1297.
 12. Massot, B., S. Milesi, E. Gontier, F. Bourgaud y A. Guckert. 2000. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62(1): 11-19.
 13. Matos, A. 2005. Producción de aloesina, aloína A y B y aloe-emodina en cultivos *in vitro* de *Aloe vera* L. Tesis de Doctorado. Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago. España. 233 p.
 14. Matos, A. 2008. Aloesin, aloin and aloe-emodin production in *Aloe vera* L. calli. *Ciencia* 16(4): 389-395.
 15. Matos, A., J. Molina y D. Acosta. 2000. Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. *Ciencia* 8(3): 280-284.
 16. Nadeem, M., H. Rikhari, A. Kumar, L. Palni y S. Nandi. 2002. Taxol content in the bark of Himalayan yew in relation to tree age and sex. *Phytochemistry* 60(6): 627-631.
 17. Ndhlala, A., S. Amoo, G. Stafford, J. Finnie y J. Van Staden. 2009. Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the South African tree aloe (*Aloe barberae*). *Journal of Ethnopharmacology* 124(3): 404-408.
 18. Park, M., J. Park, N. Kim, Y. Shin, Y. Choi, J. Lee, K. Kim y S. Lee. 1998. Analysis of 13 phenolic compounds in *Aloe* species by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 9(4): 186-191.
 19. Pasqua, G., P. Avato, B. Monacelli, A. Santamaria y M. Argentieri. 2003. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science* 165: 977-982.
 20. Piña-Zambrano, H. P. 2005. Perfil preliminar del mercado de la zábila. (*Aloe barbadensis* Mill.) en el estado Falcón, Venezuela. *Bioagro* 17(2): 85-92.
 21. Piña-Zambrano, H. y L. Chirino. 2008. Mercado de la zábila (*Aloe vera* L.) en el estado Falcón. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 25: 364-392.
 22. Ramachandra, C. y P. Srinivasa Rao. 2008. Processing of *Aloe vera* leaf gel: a review. *Am. J. of Agricultural and Biological Sciences* 3(2): 502-510.
 23. Tablante, R. 2009. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y CoCl₂ sobre la producción de aloína en cultivos *in vitro* de *Aloe vera* L. Trabajo de Grado. Universidad del Zulia. 64 p.
 24. Vasconsuelo, A. y R. Boland. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* 172: 861-875.
 25. Yan, M., C. Xu, C. Kim, Y. Um, A. Bah y D. Guo. 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus

- induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). *Scientia Horticulturae* 123(1): 124-128.
26. Yun, N., C. Lee y M. Sun. 2009. Protective effect of *Aloe vera* on polymicrobial sepsis in mice. *Food and Chemical Toxicology* 47(6): 1341-1348.
27. Zhao, D., J. Xing, M. Li, D. Lu y Q. Zhao. 2001. Optimization of growth and jaceosdin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 227-234.