



Efecto del ácido salicílico, como elicitador, sobre la producción de metabolitos secundarios en callo *in vitro* obtenido a partir de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes)

Saraguro Olalla, Francisco Javier

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz PhD.

19 de enero del 2021



Document Information

Analyzed document	Urkund_Saraguro_Olalla_Francisco.docx (D92765513)
Submitted	1/19/2021 5:50:00 AM
Submitted by	JADAN GUERRERO MONICA BEATRIZ
Submitter email	mbjadan@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	mbjadan.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

W	URL: http://info.napo.gob.ec/assets/bio_comercio_descargas/PMI_Guayusa%20Ruku%20Kawsay% ... Fetched: 1/19/2021 5:51:00 AM		1
W	URL: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/16631/1/67151_1.pdf Fetched: 1/19/2021 5:51:00 AM		2
W	URL: https://library.co/subject/extracto-de-hojas-de-guayusa Fetched: 1/19/2021 5:51:00 AM		1
W	URL: http://repiica.iica.int/docs/B3414e/B3414e.pdf Fetched: 1/19/2021 5:51:00 AM		1
W	URL: https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13464/4/T-ESPE-057374.pdf Fetched: 11/22/2019 6:10:39 PM		2
W	URL: https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13375/1/T-ESPE-057330.pdf Fetched: 10/1/2019 10:27:04 PM		1
W	URL: https://aprenderly.com/doc/1514828/documento-completo-descargar-archivo---sedici Fetched: 12/27/2020 2:45:55 AM		1
W	URL: https://core.ac.uk/download/pdf/162862523.pdf Fetched: 8/12/2020 7:43:24 PM		1
W	URL: http://www.repositorio.usac.edu.gt/12028/1/KARLA%20LIZBETH%20CHINCHILLA%20PADILLA.pdf Fetched: 1/19/2021 5:51:00 AM		1



Firmado electrónicamente por:
MONICA BEATRIZ
JADAN GUERRERO

Mónica Beatriz Jadán Guerrero, Ph. D.

C.C. 1802278562

mbjadan@espe.edu.ec



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “**Efecto del ácido salicílico, como elicitador, sobre la producción de metabolitos secundarios en callo *in vitro* obtenido a partir de hojas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*)**” fue realizado por el señor, **Saraguro Olalla Francisco Javier** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de enero de 2021

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz PhD.

C. C.: 1802278562



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Saraguro Olalla, Francisco Javier**, con cédula de ciudadanía n° 1721813903, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Efecto del Ácido Salicílico, como elicitador, sobre la producción de metabolitos secundarios en callo *in vitro* obtenido a partir de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes)”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 19 de enero de 2021

Saraguro Olalla, Francisco Javier

C.C.: 1721813903



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Saraguro Olalla, Francisco Javier**, con cédula de ciudadanía n°1721813903, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Efecto del Ácido Salicílico, como elicitador, sobre la producción de metabolitos secundarios en callo *in vitro* obtenido a partir de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes)"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 19 de enero de 2021

Saraguro Olalla, Francisco Javier

C.C.: 1721813903

Dedicatoria

A mis padres Ramiro y Cristina, por su infinito apoyo en todas las etapas de mi vida.

Por enseñarme a ser un hombre de bien.

A mi hermana Anita y sobrina Camila, por siempre estar presente cuando las

necesito y alegrar mis días.

A mis dos angelitos, Majito y mamita Beatriz, por cuidarme desde el cielo y darme

fuerzas para seguir adelante.

A mis tíos Edgar y Lucila, por todo su cariño incondicional y cuidado.

Francisco Javier Saraguro Olalla

Agradecimiento

A mi familia, por demostrarme lo que es el trabajo fuerte y el sacrificio. Gracias por darme fuerza, cariño y esperanza cada vez que he caído, esto no hubiera sido posible sin ustedes.

A mi tutora Mónica Jadán, Ph.D. por todas las enseñanzas, dirección y regaños tanto en lo académico como personal. Gracias por permitirme formar parte del Laboratorio de Tejidos Vegetales. A la Doctora Blanca Naranjo por darme la primera lección de vida académica y por compartir sus conocimientos para la realización de este proyecto.

A la familia LCTV: Andre, Lau y Tany por su compañía, colaboración, desvelos y por compartir tanto las alegrías como las obligaciones del laboratorio.

A mis amigos Mario, Santiago, Yasmin, Nicolás, Fernando, Alex y Andrés, por cada aventura compartida.

Al Magíster Leandro Lorente, por su orientación y conocimiento que fueron de suma importancia para la culminación de este proyecto.

Francisco Javier Saraguro Olalla

Abreviaturas

UV-VIS Ultravioleta-Visible

NMT N-metiltransferasas

nm Nanómetros

PS Peso en Seco

mg Miligramos

µg Microgramos

PF Peso en Fresco

EAG Equivalente de Ácido Gálico

EAC Equivalente de Ácido Clorogénico

EQE Equivalente de Quercetina

ECA Equivalente de Catequina

ERU Equivalente de Rutina

HPLC High Performance Liquid Chromatography

rpm Revoluciones por minuto

MS Murashige & Skoog

ANA Ácido Naftalenacético

2,4-D 2,4-Diclorofenoxiacético

TDZ Thiadiazuron

Índice de contenidos

Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Abreviaturas.....	8
Índice de contenidos.....	9
Índice de tablas	14
Índice de figuras.....	16
Resumen	18
Abstract.....	19
Capítulo 1: Introducción.....	19
Antecedentes	19
Justificación.....	20
Objetivos.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos Específicos.....	22

	10
Hipótesis	22
Capítulo 2: Marco teórico	23
Género <i>Ilex</i>	23
Origen y distribución	23
Guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes)	24
Origen y Distribución.....	24
Clasificación taxonómica	26
Características botánicas.....	26
Cultivo de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes), plagas y enfermedades	27
Usos	28
Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales	29
Generalidades	30
Componentes del medio de cultivo	31
Inducción a callogénesis o células madre.....	36
Metabolitos Secundarios	37
Generalidades	37
Alcaloides.....	38
Compuestos fenólicos	40
Metabolitos Secundarios en <i>Ilex guayusa</i> Loes.....	41
Agentes Elicitores.....	42

	11
Métodos de Cuantificación de Principios activos	43
Generalidades	43
Espectrofotometría UV-Visible.....	44
Reactivo de Folin-Ciocalteu	45
Capítulo 3: Materiales y Métodos	46
Ubicación geográfica de la investigación	47
Fase de campo	47
Obtención del material vegetal.....	47
Tratamiento Fitosanitario	48
Recolección de muestras	48
Procedimientos generales.....	49
Medios de cultivo y condiciones de esterilización	49
Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	50
Fase de laboratorio	50
Desinfección de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes)	50
Inducción a callogénesis <i>in vitro</i> de explantes de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes).....	52
Aplicación de Ácido Salicílico como agente elicitor	53
Análisis teórico sobre la producción de principios activos en callo <i>in vitro</i> influenciado por ácido salicílico como elicitor.....	54
Capítulo 4: Resultados	56

	12
Desinfección de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes)	56
Inducción a callogénesis <i>in vitro</i> de explantes de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes).	61
Validación Estadística-Experimental Post-hoc para los tratamientos en medio de cultivo MS (CG1-CG5)	64
Validación Estadístico-Experimental Post-hoc para los medios de cultivo en ¼ MS (CG6-CG10)	67
Aplicación de Ácido Salicílico como agente elicitor	69
Análisis teórico sobre la producción de principios activos en callo <i>in vitro</i> influenciado por ácido salicílico como elicitor	71
Inducción a callogénesis <i>in vitro</i> y elicitación con ácido salicílico.....	72
Efecto del ácido salicílico sobre la producción de Fenoles Totales en cultivos de callo <i>in vitro</i>	74
Efecto del ácido salicílico sobre la producción de Flavonoides Totales en cultivos de callo <i>in vitro</i>	77
Efecto de Elictores sobre la producción de cafeína en cultivos de callo <i>in vitro</i>	79
Capítulo 5: Discusión.....	81
Desinfección de hojas de Guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes).....	81
Inducción a callogénesis <i>in vitro</i> de explantes de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes)	83
Efecto del Ácido Salicílico en la inducción a callogénesis <i>in vitro</i>	85
Análisis sobre la producción de principios activos en callo <i>in vitro</i> influenciado por ácido salicílico como elicitor	86

	13
Capítulo 6: Conclusiones	91
Capítulo 7: Recomendaciones.....	92
Capítulo 8: Bibliografía.....	93
Capítulo 9: Anexos	111

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de la especie <i>Ilex guayusa</i> Loes.....	26
Tabla 2 Concentración de los nutrientes inorgánicos del medio Murashige & Skoog.	32
Tabla 3 Concentración de vitaminas utilizadas con el medio Murashige & Skoog.....	33
Tabla 4 Concentración de cafeína, fenoles totales y carotenoides del género <i>Ilex</i>	42
Tabla 5 Combinaciones de fitorreguladores en el medio de cultivo para la inducción a callogénesis <i>in vitro</i> de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes).....	53
Tabla 6 Evaluación del protocolo de desinfección para los tratamientos pertenecientes a la inducción a callogénesis.....	56
Tabla 7 Análisis estadístico realizado a los explantes de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) después de 21 días de cultivo	60
Tabla 8 Análisis de rangos mediante la prueba de Kruskal-Wallis para la variable oxidación para los datos obtenidos luego de 21 días de cultivo.....	60
Tabla 9 Número de explantes obtenidos tras 75 días de cultivo.....	64
Tabla 10 Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error para los tratamientos en medio de cultivo MS después de 75 días de cultivo de los explantes	65
Tabla 11 Prueba de efectos inter-sujetos para los datos recolectados tras 75 días de cultivo de los explantes en medio MS.....	65
Tabla 12 Medias marginales estimadas para los datos recolectados tras 75 días de cultivo de los explantes en medio MS.....	66
Tabla 13 Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error para los tratamientos en medio de cultivo ¼ MS después de 75 días de cultivo	67

Tabla 14 Prueba de efectos inter-sujetos para los datos recolectados tras 75 días de cultivo de los explantes en medio ¼ MS	68
Tabla 15 Medias marginales estimadas para los datos recolectados tras 75 días de cultivo de los explantes en medio ¼ MS	68
Tabla 16 Resultado del análisis estadístico realizado para los tratamientos CG5 y CG5 suplementado con ácido salicílico.....	71
Tabla 17 Formulación de los medios de cultivo para la inducción a callogénesis <i>in vitro</i>	73
Tabla 18 Concentración de Fenoles Totales en muestras de callo seco elicidadas con ácido salicílico	74
Tabla 19 Concentración de Flavonoides Totales en muestras de callo seco elicidadas con ácido salicílico.....	77
Tabla 20 Estimación de metilxantinas en tejido de endospermo en tratamiento con 50 µM de ácido salicílico en la especie <i>Coffea canephora</i>	80

Índice de figuras

Figura 1 Distribución geográfica del género <i>Ilex</i>	23
Figura 2 Distribución geográfica de la guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) en América del Sur.	25
Figura 3 Estructura química de las auxinas AIA y ANA, respectivamente.	34
Figura 4 Estructura de Adenina (6-Aminopurina) con el sistema de numeración del anillo aromático y a los isómeros geométricos de zeatina	35
Figura 5 Alcaloides representativos de <i>Ilex guayusa</i> Loes.....	39
Figura 6 Vías biosintéticas de cafeína en <i>Coffea sp.</i>	40
Figura 7 Metodología para el desarrollo del estudio	46
Figura 8 Plantas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) ubicadas en el invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE	48
Figura 9 Hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) de 5-8 cm de largo utilizadas para la inducción a callogénesis <i>in vitro</i>	49
Figura 10 Protocolo de desinfección de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes).....	51
Figura 11 Resultados de las bases de datos en el periodo 2015-2020 usando varios criterios de búsqueda	55
Figura 12 Contaminación de tipo fúngica y oxidación de explantes de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) a los 21 días de cultivo	57
Figura 13 Porcentajes de Contaminación de los explantes de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes)	57
Figura 14 Porcentajes de Oxidación para los explantes de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) a los 7, 14 y 21 días de cultivo	58

Figura 15 Gráfica de normalidad de los datos para las variables Contaminación y Oxidación a los 21 días de cultivo de los explantes.....	59
Figura 16 Resultados de inducción a callogénesis <i>in vitro</i> de los explantes de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes)	61
Figura 17 Cambios morfológicos en los explantes en la etapa de inducción a callogénesis a los 60 días de cultivo	62
Figura 18 Explantes de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) cultivados en el tratamiento CG7.....	63
Figura 19 Resultado de inducción a callogénesis <i>in vitro</i> de explantes de hoja de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) cultivado en medio MS suplementado con 0,02 mg/L de ácido salicílico.....	69
Figura 20 Inducción a callogénesis <i>in vitro</i> de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) en el tratamiento CG5 suplementado con ácido salicílico	70
Figura 21 Países enfocados en la producción <i>in vitro</i> de principios activos usando ácido salicílico como elicitador	72
Figura 22 Cambios de la concentración de Fenoles en el tiempo	76
Figura 23 Cambios en la concentración de Flavonoides en el tiempo.....	79
Figura 24 Representación esquemática de la posible respuesta celular frente a un elicitador	89

Resumen

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes) se encuentra ampliamente distribuida en una variedad de hábitats y forma parte de la tradición agro-silvícola de pueblos indígenas. Actualmente, ha generado interés debido a que sus principales constituyentes son compuestos fenólicos, triterpenoides, flavonoides y alcaloides xantínicos; a los que se les atribuye la capacidad antioxidante. El cultivo de tejidos vegetales y producción de principios activos *in vitro* proporcionan nuevas formas de procesamiento de plantas con interés comercial de manera controlada y un complemento a la agricultura tradicional. Se inició con el tratamiento fitosanitario y la etapa de desinfección de las hojas, donde se aplicó detergente 2% (p/v), fungicida SKULL® 0,5% v/v e hipoclorito de sodio 3% (v/v). La contaminación y oxidación de los explantes se mantuvo a un porcentaje menor al 20%. Para la inducción a callogénesis *in vitro* se analizaron medios de cultivo Murashige & Skoog (1962), suplementado con diferentes dosis de Zeatina y de auxinas (2,4-D y ANA) y se observaron los explantes a los 30, 45, 60 y 75 días de cultivo. Los resultados a los 75 días de cultivo indicaron mejores resultados para el tratamiento en medio de cultivo MS suplementado con 1 mg/L de Zeatina y 4 mg/L de ANA (CG5) con un total de 34 explantes en fase de proliferación de callo. Mediante la adición de 0,02 mg/L de ácido salicílico al tratamiento CG5 se obtienen 47 explantes en fase de proliferación de callo. Con el análisis de la literatura relacionada se determina que la aplicación de ácido salicílico *in vitro* puede aumentar la concentración de Fenoles Totales en 1,463 veces, Flavonoides Totales en 1,524 veces y Cafeína en 1,42 veces en comparación con los ensayos de control.

Palabras clave:

- **GUAYUSA**
- **CALLOGÉNESIS**
- **ÁCIDO SALICÍLICO**
- **CULTIVO *IN VITRO***
- **METABOLITOS SECUNDARIOS**

Abstract

The guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) Is widely distributed in a variety of habitats and is part of the agro-silvicultural tradition of indigenous peoples. Currently, it has generated interest because its main constituents are phenolic compounds, triterpenoids, flavonoids and xanthine alkaloids; which are attributed the antioxidant capacity. The plant tissues culture and the production of active principles *in vitro*, provide new ways of processing plants with commercial interest in a controlled way and a complement to traditional agriculture. The study began with the phytosanitary treatment and the leaf disinfection stage, where 2% detergent (p/v), SKULL® fungicide 0,5% v/v and sodium hypochlorite 3% (v/v) were applied. It was possible to keep the contamination and oxidation of the explants to a percentage lower than 20%. For the induction of calllogenesis *in vitro*, Murashige & Skoog (1962) culture media were tested, supplemented with different doses of Zeatin and Auxins (2,4-D and NAA) and the explants were observed at 30, 45, 60 and 75 cultivation days. The results at 75 cultivstion days indicated better results for the treatment in MS culture medium supplemented with 1 mg/L of Zeatin and 4 mg/L of NAA (CG5) with a total of 34 explants in the callus proliferation phase. By adding 0,02 mg/L of salicylic acid to the CG5 treatment, 47 explants were obtained in the callus proliferation phase. The analysis of 16 scientific articles determined that the application of salicylic acid *in vitro* increased the concentration of Total Phenols by 1,463 times, Total Flavonoids by 1,524 times and Caffeine by 1,42 times compared to the control treatment.

Key words:

- **GUAYUSA**
- **CALLOGENESIS**
- **SALICYLIC ACID**
- **IN VITRO CULTURE**
- **SECONDARY METABOLITES**

Capítulo 1: Introducción

Antecedentes

El uso y cultivo de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) es tradicional y se tiene indicios de hace varios siglos atrás formando parte de una tradición agro-silvícola de los pueblos amazónicos. En 1682, el Jesuita Juan Lorenzo Lucero describió que indios Jíbaros se mantenían físicamente aptos y permanecían despiertos por muchos días, sin perder la conciencia, durante la invasión de enemigos mediante el uso de bebidas a base de ayahuasca, guayusa y tabaco (Patiño, 1968). En la historia de la humanidad, el paso que se da desde los saberes ancestrales a los racionales resulta de vital importancia para el desarrollo de nuevos fármacos.

A partir del año 2010 la venta de guayusa se ha impulsado hasta incrementar su cadena de valor, con participación de la empresa RUNA, se ha encontrado un mercado internacional favorable para el biocomercio (derivados de la biodiversidad nativa). Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería en Napo, se cultiva 2000 hectáreas de guayusa en Archidona, Tena y Arosemena Tola, a cargo de 3000 productores involucrados. Actualmente la Asociación Wiñak (conformada por 257 productores de las comunas de Talag, Aguano, Pano, Guiyuna, Misahuallí, Puerto Napo, entre otras) exporta 15 toneladas de guayusa con planes de incrementar a 40 toneladas de guayusa para el año 2019 a un precio de USD 5 por libra (Prefectura de Napo, 2017).

La producción y comercialización de guayusa en la provincia del Napo busca enmarcarse dentro de la economía popular y solidaria; y mantener las características ecológicas del entorno circundante a las comunidades que, a su vez, consideran que las políticas de producción

cumplan con el Convenio de diversidad Biológica, el cual establece: i) Conservación de la biodiversidad biológica, ii) Utilización sostenible de los recursos, y, iii) la distribución justa y equitativa de los beneficios (Prefectura de Napo, 2017).

Justificación

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) ha sido utilizada ancestralmente por los pueblos indígenas de la Amazonía y constituyen una fuente de conocimientos ancestrales, los pueblos indígenas, como el pueblo Kichwa, crecen con bebidas a base de guayusa y ha sido utilizada en problemas gastrointestinales, estimulante energético (como sustituto del café) y para fertilidad en las mujeres (Lewis, Kennelly, & Wedner, 1991). A su vez, existen registros de excavaciones en los Andes bolivianos fechadas de 1500 AP en las que muestra un tipo de comercio de guayusa para uso estimulante (Schultes, 1972).

Se ha registrado los principios activos mediante tamizaje fitoquímico a partir de extractos de las hojas secas de guayusa, siendo en su mayoría cafeína y teobromina, mientras que en bajas cantidades presenta polifenoles, terpenos, flavonoides, taninos y carotenoides (Fundación Chankuap, 2006). Además, se ha determinado mediante HPLC que, en extractos de guayusa la cantidad de cafeína y teobromina corresponde a un máximo de 16,64 mg/g y 0,56 mg/g, respectivamente (Melo, 2014).

Desde tiempos inmemoriales, se ha utilizado los productos vegetales como fuentes de productos farmacéuticos, agroquímicos y nutrición. Sin embargo, estos productos vegetales se encuentran influenciados por varios factores externos como: el tiempo de madurez de los cultivos, condiciones climáticas, calidad del suelo, la cantidad de material vegetal utilizada,

susceptibilidad a enfermedades y plagas de los cultivos, disponibilidad de mano de obra, entre otras (Calva & Perez, 2005).

Muchos productos naturales son difíciles de sintetizar. Por lo tanto, se necesitan posibilidades para la producción sostenible y rentable de grandes cantidades de principios activos. Bajo este contexto, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ofrece una oportunidad atractiva para la producción de sistemas que faciliten la generación de metabolitos secundarios y la elaboración de productos vegetales deseados. La biosíntesis de metabolitos secundarios en cultivos de plantas *in vitro* es generalmente baja y necesita ser mejorada para cumplir con propósitos comerciales. La biotecnología vegetal, mediante el uso de inductores bióticos o abióticos, como el ácido salicílico, permite promover y optimizar la formación de metabolitos secundarios (Kumar, 2010).

Todos los estudios realizados en hojas de *Ilex guayusa* demuestran la variedad de principios activos que contiene y el potencial farmacológico que podría brindar. Además, debido a la falta de investigación de los metabolitos secundarios a nivel de callogénesis *in vitro* de guayusa, es necesario un estudio de principios activos con la ayuda de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales y la estimulación química.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto del Ácido Salicílico, como elicitador, sobre la producción de metabolitos secundarios en callo *in vitro* obtenido a partir de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes).

Objetivos Específicos

- Definir las concentraciones de fitorreguladores necesarios para la inducción a callogénesis *in vitro* de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes).
- Analizar el contenido de cafeína, fenoles y flavonoides totales en callo *in vitro* inducido por ácido salicílico.

Hipótesis

Un balance entre auxina y citoquinina adecuado, junto con la aplicación de ácido salicílico como elicitador, proporciona las condiciones necesarias para la inducción a callogénesis y a un aumento en la producción de metabolitos secundarios de explantes de hoja *in vitro* de guayusa (*Ilex guayusa* Loes).

Capítulo 2: Marco teórico

Género *Ilex*

Origen y distribución

El género subcosmopolita *Ilex* constituye la familia monogénica Aquifoliaceae de al menos de 644 especies de árboles y arbustos dioicos caducifolios o de hoja perenne. Se encuentra ampliamente distribuido en las regiones de Asia Oriental, el Caribe y América, en climas templados, tropicales, subtropicales y montanos tropicales (Figura 1). Además, se ha determinado, según registros fósiles, que el antepasado más reciente relacionado a las especies existentes data entre los periodos Cretáceo y el Mioceno, con el registro fósil más antiguo de 69 millones de años (Manen, Barriera, Loizeau, & Naciri, 2010).

Figura 1

Distribución geográfica del género Ilex



Nota. La figura representa el número de especies registradas según la distribución geográfica (Cuénoud, y otros, 2000).

Usando el análisis de los datos de cloroplastos se identificó que el área ancestral del antepasado común más reciente del género *Ilex* se ubica en el hemisferio norte, principalmente en las regiones de Asia Oriental y América del norte. A partir de este hallazgo se propone que existieron eventos de dispersión bidireccionales entre América del norte con Asia Oriental y América del Norte con América del Sur que podrían explicar la actual distribución geográfica.

Estudios muestran que entre especies del género *Ilex* existe la presencia de barreras reproductivas débiles debido a eventos de hibridación e introgresión natural (Manen, Barrera, Loizeau, & Naciri, 2010). El género *Ilex* tiene una producción de pequeñas frutas carnosas que son consumidas por aves, esto junto con la polinización no especializada podría explicar la eficiente dispersión de las semillas y la extensión a nivel mundial que posee (Tsang & Corlett, 2005).

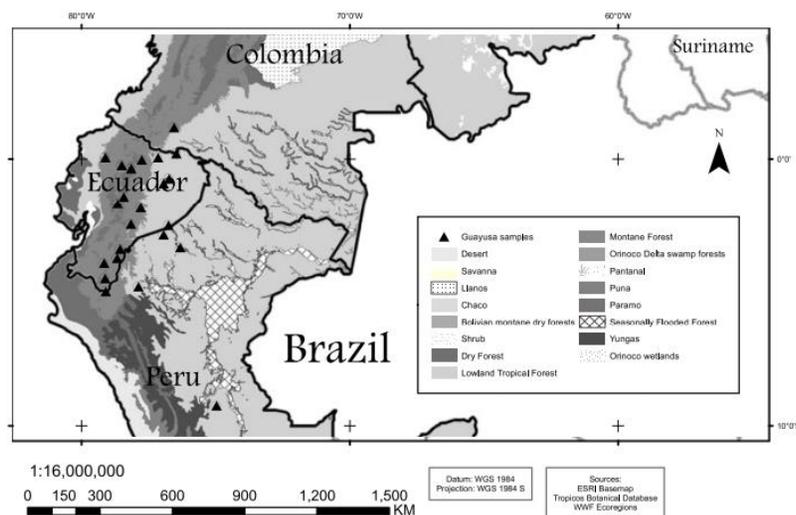
Guayusa (*Ilex guayusa* Loes)

Origen y Distribución

La guayusa es un árbol o arbusto de hoja perenne nativo de América del Sur, se ubica en la cuenca alta del Amazonas de Ecuador, Colombia y Perú (Figura 2) (Loizeau, Barrera, F, & Broennimann, 2005). Su cultivo sigue siendo tradicional, formando parte de la tradición agrosilvícola de los pueblos indígenas (Kichwa y Shuar). Se encuentra presente en una variedad de hábitats desde valles, laderas de montaña, terrenos planos, colinas e incluso huertos y pastizales. En Ecuador, se encuentra distribuida en las provincias de Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Dueñas, Jarrett, & Logan-Hines, 2016).

Figura 2

Distribución geográfica de la guayusa (Ilex guayusa Loes) en América del Sur.



Nota. La figura muestra un mapa con la probable distribución de guayusa usando ArcMap, junto con las ecorregiones. Adaptado de Amazonian Guayusa (Ilex guayusa Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview, por J.F. Dueñas, 2016.

El Sistema de Clasificación de Ecosistemas del Ecuador Continental ubica como zona de vida de la guayusa en el bosque siempreverde piemontano sobre mesetas de arenisca. El termotipo (It) es termotropical y mesotropical. Además, presenta un régimen de Inundación no inundable y un bioclima pluvial (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2013). Se desarrolla a altitudes que van desde los 200 a 2600 m.s.n.m., a temperaturas entre 18 y 26 °C con precipitaciones anuales de 1000 a 3000 mm (Collahuazo, 2012). Se registra que crece en suelos jóvenes (Entisoles) de meteorización reciente y de estado intermedio (Inceptisoles), con capacidad de adaptarse a suelos húmedos o secos y a suelos con pH ácidos (5,0-5,5) (Dueñas, Jarrett, & Logan-Hines, 2016).

Clasificación taxonómica

Ludwing Eduard Theodor Loesner (1901) describió de manera científica a la guayusa, asignándola en el género *Ilex*, el nombre de la especie (*guayusa*) se colocó por su significado etimológico y la abreviatura botánica (Loes) se debe al autor de su descripción (Ver clasificación en Tabla 1).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de la especie Ilex guayusa Loes.

Categoría	Taxón
Reino	Vegetal
Clase	Equisetopsida
Sub-clase	Magnoliidae
Super-orden	Asteranae
Orden	Aquifoliales
Familia	Aquifoliaceae
Género	<i>Ilex</i>
Especie	<i>guayusa</i>

Nota. Datos taxonómicos de acuerdo al sistema de clasificación APG IV (Angiosperm Phylogeny Group). Tomado de Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa del Cantón Pastaza, por J. C. Caranqui, 2011.

Características botánicas

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes) es un árbol de hoja perenne que se lo puede encontrar de manera silvestre a una altura aproximada de 25 m y un diámetro a la altura del pecho (DAP) de aproximadamente 50 cm. Cuando se encuentra bajo cultivo doméstico, alcanza un tamaño promedio de 10 m de altura (Shemluck, 1979; Melo, 2014). El tronco de guayusa presenta un

fuste con textura lisa y corteza blanca, con ramas flexibles y extendidas, copa irregular o redonda con un follaje amplio y denso (Schultes, 1972).

Sus hojas son simples, coriáceas, alternadas sin estípulas y dentadas, glabras en el haz y envés, oblongo-elípticas, con una base aguda y un ápice acuminado. Tienen un tamaño aproximado de 15 a 21 cm de largo, 5 a 8 cm de ancho y un peciolo relativamente corto de 1 cm de largo. La flor de guayusa se caracteriza por tener corola blanca verdosa con pétalos obtusos, igual número de estambres y pétalos, anteras oblongas, ovario sésil y fruto globoso (de 4 a 6 cavidades). El fruto es una baya globosa verde de 1 cm de ancho (García, 1992; Sequeda, Modesti, Celis, Gamboa, & Gutierrez, 2016).

Cultivo de guayusa (*Ilex guayusa* Loes), plagas y enfermedades

La guayusa es una especie que se la puede encontrar en forma nativa (silvestre) con una población baja, su reproducción es asexual con flores propensas a la poligamia y dificultades de propagación por semilla. Actualmente, por falta de especímenes con capacidad reproductiva, la intervención del hombre mantiene la selección y propagación vegetativa de guayusa por medio de enraizamiento de estacas o por acodos (Sequeda, Modesti, Celis, Gamboa, & Gutierrez, 2016).

La selección de la planta madre es de vital importancia para la producción de plantas de guayusa por el método de enraizamiento de estacas, se deben considerar árboles con buena formación, follaje denso y en grandes cantidades, resistencia a plagas y enfermedades, calidad y buen tamaño de las hojas, etc (Fundación Chankuap, 2014). La producción de guayusa se la puede realizar en viveros temporales o permanentes, cultivando 50 plantas por metro cuadrado de terreno. Debido al bajo rendimiento de la reproducción por estacas, se utiliza hormonas

(Hormonagro 1[®], Raiz Plant[®]) que favorezcan a la formación y desarrollo de raíces (Fundación Chankuap, 2006).

Las estacas cultivadas de guayusa estarán listas para la cosecha a partir de los 4 años de edad, usando inicialmente la cuarta parte del área foliar por año, hasta que la planta alcance los 6 años de edad y se pueda aprovechar el 50% del área foliar. Para determinar la tasa de cosecha anual se toma en cuenta la cantidad de plantas cultivadas en edad reproductiva, de la cantidad de total se considera que el 75% serán aprovechables para cosecha de hojas. Se hace una estimación anual mínima de 45 kg y un máximo de 70 kg de materia prima por planta (Fundación Chankuap, 2014).

Usos

Los registros de la terapia tradicional, como la prevención de enfermedades pulmonares, hepáticas, alivio de dolores y la prevención de efectos indeseables en el sistema nervioso central, han demostrado que las especies del género *Ilex* podrían ser remedios potenciales para las enfermedades modernas (Yi, Zhao, & Peng, 2016). La guayusa ha sido cultivada y consumida desde la antigüedad por las tribus indígenas del Amazonas, especialmente Kichwa y Shuar, que forman parte importante de sus rituales y ceremonias.

Se han aislado más de 200 compuestos de las plantas de *Ilex* siendo los principales constituyentes compuestos fenólicos, triterpenoides, saponinas, flavonoides, esteroides, ácidos carboxílicos y ésteres. Estos compuestos son de gran interés, ya que se les atribuye actividad antioxidante, importante para contrarrestar el estrés oxidativo. Además, los carotenoides se han asociado con numerosos efectos beneficiosos para la salud como la mejora de la respuesta

inmune y reducción del riesgo de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular (Vasantha, Nair, & Robinson, 2014).

El apogeo del cultivo de guayusa empezó en el año 2016 al iniciar exportaciones a mercados internacionales, gracias a esto, las comunidades indígenas de Archidona y Tena, en Napo, tienen un sustento económico. También pertenece a la tradición agro-silvícola de las provincias de Sucumbíos, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Moreta, 2018). Actualmente, la guayusa se comercializa en forma de infusiones, bebidas energéticas y/o como materia prima en la fabricación de varios productos en Ecuador, Estados Unidos, China y Europa (Kapp, Mendes, Roy, & Kraska, 2016).

Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales

Los avances en biotecnología vegetal, particularmente en los métodos de cultivo de células vegetales, proporcionan nuevas formas de procesamiento de plantas con interés comercial junto con los productos fitoquímicos que producen y que resultan escasos (Rady, Saker, & Matter, 2018). De esta manera se puede obtener una fuente continua de materia prima, independientemente de las condiciones del suelo, temperatura y clima (Karuppusamy, 2009).

Los cultivos de células y tejidos vegetales se establecen en condiciones estériles y controladas a partir de explantes, como las hojas de plantas, raíces, meristemas, etc., tanto para la micropropagación como para la producción de principios activos. Además, permite que la producción sea más confiable y predecible (Karuppusamy, 2009).

Generalidades

Una vez seleccionado el explante apropiado para el establecimiento, la desinfección de los explantes es la fase más importante para establecer un cultivo *in vitro*. Generalmente, se utilizan diferentes tipos de agentes descontaminantes (Etanol, Hipoclorito de Sodio, Cloruro de Mercurio, cetrimida, blanqueadores comerciales, etc.) haciendo una variación en la concentración, secuencia de uso de los mismos y tiempo de exposición del explante. Este proceso permite eliminar de forma efectiva a los microorganismos contaminantes que comprometen el desarrollo de cultivos *in vitro* (Buckley & Reed, 1994; Rady, Saker, & Matter, 2018). Mihaljevic y colaboradores (2013), definen que el procedimiento de desinfección es diferente para cada especie de planta y del explante que será utilizado.

Una vez recolectados y sometidos al proceso de desinfección superficial, los explantes se procesan usando protocolos estandarizados de regeneración mediante la formulación de medios de cultivo suplementados con vitaminas, carbohidratos, agentes solidificantes, reguladores de crecimiento y mantenidos en condiciones ambientales controladas (Temperatura, régimen de luz / oscuridad y humedad) (Gantait & Panigrahi, 2018).

Tanto el crecimiento organizado como desorganizado es posible mediante las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. El cultivo de estructuras organizadas permite el mantenimiento continuo de un órgano vegetal definido, siendo los más importantes: el cultivo de meristemas, brotes, nudos de yemas laterales, embriones y raíces. Mientras que el cultivo de estructuras no organizadas hace referencia a los agregados de células no organizadas como: cultivo de callos, suspensiones celulares, protoplastos, cultivo de anteras entre otros (George, 2008).

Como fase final de la regeneración *in vitro* es la formulación de un medio basal para la formación de raíces de los brotes, para su posterior aclimatación *ex vitro* y la transferencia a un entorno externo autotrófico (Gantait, Kundu, & Das, 2018).

Componentes del medio de cultivo

El ritmo de crecimiento de los tejidos y la calidad de los cambios morfogénéticos dependen del tipo y concentración de los nutrientes minerales suplementados en diferentes medios de cultivo. Sin embargo, resulta difícil diseñar una formulación adecuada para cada tipo de especie debido a las interacciones altamente complejas de los diversos químicos en el medio nutriente y a factores ambientales (fotoperiodo, consistencia del medio, pH, etc.). Para ello, es necesario realizar experimentos completos de diseño factorial, en los que todos los reactivos en el medio varíen en un amplio rango de concentración (Bonga & von Aderkas, 1992).

La mayoría de los medios de cultivo requiere cinco grupos de ingredientes: fuente de carbono, nutrientes inorgánicos, vitaminas, fitorreguladores y suplementos orgánicos. Los carbohidratos son uno de los componentes del medio de cultivo indispensables como fuente de energía, proporciona los esqueletos de carbono para procesos biosintéticos y para diferentes actividades metabólicas. Aloni (2001), sostiene que la presencia de una fuente de carbohidratos en el medio de cultivo es necesario para la diferenciación de elementos de xilema y floema en células cultivadas. A su vez, los requerimientos nutricionales y la capacidad de absorción de sacarosa son diferente para cada especie. Murashige y Skoog (1962) definieron que la aplicación de sacarosa a una concentración del 3% (p/v) proporcionaba una habilidad adicional para regenerar explantes *in vitro* en comparación con las otras concentraciones.

Medio Murashige & Skoog (MS)

Según Gamborg et al. (1976) existen dos factores que definen el éxito del cultivo *in vitro*: el origen del explante y el medio de cultivo. El medio Murashige & Skoog (MS), originalmente diseñado para el cultivo de células de tabaco, consiste en varios nutrientes inorgánicos en cantidades y proporciones necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales y fisiológicas de las células cultivadas. El medio MS se diferencia de otros medios por su alto contenido de nitrato, potasio y amonio.

Los nutrientes inorgánicos brindan los requerimientos de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Co, Zn, B, Mn, Mo, Cu, I), siendo importante, para la mayoría de los propósitos, mantener la concentración de nitrato y de potasio mayor a 25 mM como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Concentración de los nutrientes inorgánicos del medio Murashige & Skoog.

Nutriente	Concentración
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1,650 mg/L
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440 mg/L
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370 mg/L
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	170 mg/L
Nitrato de potasio (KNO_3)	1900 mg/L
Ácido bórico (H_3BO_3)	6,2 mg/L
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,025 mg/L
Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,025 mg/L
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27,8 mg/L
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22,3 mg/L
Yoduro de potasio (KI)	0,83 mg/L
Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,25 mg/L

Nutriente	Concentración
Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	8,6 mg/L
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37,2 mg/L

Nota. Tomado de (Fabela, Preciado, & Benavides, 2006).

Las vitaminas, como el ácido nicotínico y la piridoxina pueden mejorar el crecimiento, mediante la obtención de nitrógeno y coenzimas para el explante (Gamborg, Murashige, Thorpe, & Vasil, 1976). La solución de vitaminas utilizadas en la formulación del medio Murashige & Skoog se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Concentración de vitaminas utilizadas con el medio Murashige & Skoog.

Vitaminas	Concentración
Glicina	2 mg/L
Mio-Inositol	100 mg/L
Ácido Nicotínico	0,5 mg/L
HCl piridoxina	0,1 mg/L
Tiamina HCl	0,1 mg/L

Nota. (Murashige & Skoog, 1962).

Auxinas

Algunos estudios desarrollados definen que las auxinas se distribuyen en la planta mediante dos sistemas de transporte, que son distintos pero interconectados: una corriente no direccional rápida en el floema junto con asimilados fotosintéticos, y mediante transporte direccional polar (PAT) de célula a célula lento (Adamowski & Friml, 2015). A su vez, se destacan por su rol en los procesos órgano y morfogénicos como la formación de órganos vegetales, embriones, el inicio post embrionario, las respuestas a las señales ambientales y control de la

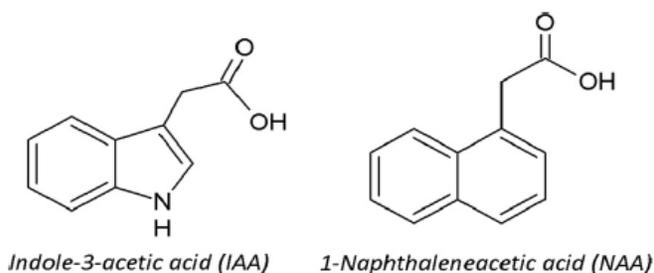
división celular (Semeradova, Montesinos, & Benkova, 2020; Perrot-Rechenmann & Napier, 2005).

Según Perrot (2005), las altas concentraciones de auxinas estimulan la división celular, mientras que las bajas concentraciones impulsan el alargamiento, agrandamiento y la diferenciación celular. Generalmente, la mayoría de las células que acaban de formarse salen del ciclo celular y se hacen inactivas, se alargan y pasan a la fase de diferenciación. Sin embargo, cuando se expone a las células a auxinas exógenas, estas mantienen la capacidad de desdiferenciarse y de volver al ciclo celular.

El ácido indol 3-acético (AIA) se considera como la principal auxina, debido a su prevalencia y a que fue el primer fitorregulador descubierto (Ljung, 2013). Uno de los análogos más cercanos, respecto a estructura química, es el ácido 1-naftalen acético (ANA) diseñado para simular las propiedades de fitorreguladores vegetales (Singh, Cheek, & Haigler, 2009). Estos compuestos han sido ampliamente utilizados en cultivos *in vitro* para inducir a la formación de callo, embriogénesis e inhibición del desarrollo de yemas axilares (Fuentes, Mesa, Ruiz, Peláez, & Fernández, 2005).

Figura 3

Estructura química de las auxinas AIA y ANA, respectivamente.

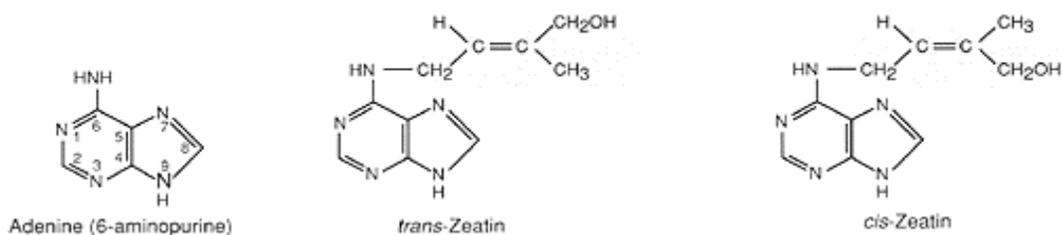


Citoquininas

Las citoquininas actúan en la estimulación de la división celular en meristemos, la prevención de la senescencia, la regulación del dominio apical, absorción de nutrientes, desarrollo vascular, entre otras funciones (Sujatha & Reddy, 1998). Todas las citoquininas naturales poseen una estructura de anillo con cadena lateral de isopentenilo de 5 carbonos a partir de N⁶ de la molécula de adenina, como se muestra en la Figura 4 (Srivastava, 2002). Varios estudios sugieren que la aplicación exógena de citoquininas influye en la actividad de clorofilasa, en la conductancia estomática y la concentración intercelular de CO₂ en hojas *in vitro* (Aremu, Bairu, Szüčová, Finnie, & Van Staden, 2012; Dobránszki & Mandler-Drienyovszki, 2014; Dobránszky, y otros, 2004).

Figura 4

Estructura de Adenina (6-Aminopurina) con el sistema de numeración del anillo aromático y a los isómeros geométricos de zeatina



Nota. Tomado de (Srivastava, 2002).

La trans-Zeatina es la citoquinina más abundante y activa biológicamente. Varios bioensayos indican que las bases de citoquinina son las más activas, por lo tanto, al encontrarse conjugadas regulan su actividad. Estos conjugados actúan como mecanismo de transporte,

almacenamiento debido a que son resistentes a la degradación por citoquinina oxidasa/deshidrogenasa (Auer, 2002; Blagoeva, y otros, 2004).

Inducción a callogénesis o células madre

Las células vegetales que se convierten en una masa amorfa de tejido mediante una proliferación desordenada se denominan callos. Según los reportes de Irvine *et al.* (1983), se probaron 79 diferentes reguladores de crecimiento con el fin de determinar la capacidad de inducción a callogénesis *in vitro* de hojas de caña de azúcar. De estos compuestos, el 96% estaban asociados con la actividad de auxinas.

Lo Schiavo y colaboradores (1989), sugirieron que mediante la aplicación de auxinas exógenas el ADN se vuelve más metilado y que esto influiría tanto en la reprogramación de las células diferenciadas como en la erradicación de los programas de diferenciación. Generalmente, se han usado auxinas como ácido 1-naftalenacético (ANA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o ácido Indolacético (AIA), solos o en combinación con citoquininas como cinetina (Kin), Benciladenina (BA) o Zeatina (Zea) en concentración variables en un rango de 0,25 a 5 mg/L (Rady, Saker, & Matter, 2018).

Se pueden establecer cultivos de callos de cualquier parte de la planta. Sin embargo, regiones específicas presentan mayor predisposición a una rápida desdiferenciación. El callo vegetal puede ser diferenciado con respecto a sus características macroscópicas, esta morfología es muy diversa y varía según la apariencia externa, composición celular y textura (CIDIA, 1987). Un callo, sin regeneración de órganos aparente, es friable cuando su consistencia es suave y de fácil desintegración; o compacto cuando su apariencia es dura. Los callos vegetales que presentan formación parcial de órganos se consideran callos rizogénicos o embriogénicos,

dependiendo de la estructura (Ikeuchi, Sugimoto, & Iwase, 2013). La pigmentación resulta variable y estará influenciada por los factores nutricionales y de la luz (CIDIA, 1987).

Metabolitos Secundarios

Generalidades

Se ha utilizado cultivo de tejidos como una alternativa para la generación de nuevos productos a partir de plantas, estas técnicas tienen el potencial de complementar la agricultura tradicional en la producción industrial de compuestos bioactivos de plantas. Desde 1950 se ha aumentado los estudios en la producción de metabolitos secundarios a través de la formación de callo y cultivos de suspensiones celulares (Filová, 2014).

La producción de los principios activos usando cultivos celulares se da gracias a la característica totipotente de las células, por lo tanto, cada célula contiene la información genética completa de la planta y la capacidad de producir los compuestos químicos que son producidos por la planta madre (Rao & Ravishankar, 2002).

Las principales ventajas de los sistemas de cultivo celular, en comparación con el cultivo convencional de toda planta, incluyen:

- Los metabolitos secundarios elegidos pueden generarse independientemente de factores externos (composición del suelo, clima, etc.).
- Las células cultivadas no se encuentran bajo amenaza por microorganismos o insectos.
- Se pueden generar sistemas de regulación para la producción de metabolitos secundarios, mejorando la productividad y disminuyendo los costos.

En el callo, la producción de metabolitos secundarios sigue dos fases: la primera fase consiste en el establecimiento del medio de cultivo para el crecimiento, multiplicación y acumulación de biomasa, y la segunda fase, consiste en la síntesis de compuestos a partir del callo (Niranjana, Lee, & Paek, 2014). Iriwati (2014) reporta que se encuentra una mayor cantidad de principios activos en callo no embriogénico, dado que los grupos homogéneos de células desdiferenciadas son capaces de producir cantidades sustanciales de compuestos. (Iriawati & Esyanti, 2014).

En varias industrias ya se ha aplicado el uso de callo en sus productos:

- L'Oréal ha lanzado productos basados en células de rosa desdiferenciadas (L'ORÉAL, 2017).
- La compañía italiana IRB ha lanzado la tecnología High Tech Nature™ (HTN), que proporciona los ingredientes bioactivos para aplicaciones nutricionales, farmacéuticas, dermo-cosméticos, etc.
- El compuesto taxol usado en la droga de alto valor paclitaxel se ha obtenido de cultivos celulares, reemplazando al método convencional a partir de corteza de *Taxus brevifolia* a la edad de 50 años.

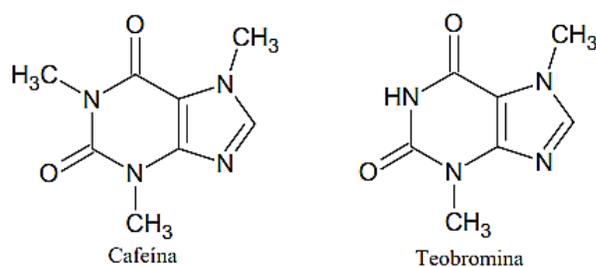
Alcaloides

Los alcaloides son producidos por varios organismos incluidos hongos, bacterias, plantas y algunos animales, poseen actividades farmacológicas y han sido usados para tratar una variedad de enfermedades (Nicolaou, Chen, & Corey, 2011). Los alcaloides son una clase de compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular, derivados principalmente de aminoácidos con orígenes biosintéticos únicos (Liu, y otros, 2019). El nitrógeno se encuentra

contenido en el anillo aromático y ejerce actividades biológicas significativas, estos átomos pueden ser secundarios, terciarios o cuaternarios en sus moléculas (Ziegler & Facchini, 2008). Se ha determinado que las hojas de guayusa poseen cantidades significantes de cafeína, teobromina. A su vez, se identificaron en bajas cantidades teofilina y otros alcaloides pertenecientes al grupo de las xantinas (Radice & Vidari, 2007).

Figura 5

Alcaloides representativos de Ilex guayusa Loes.

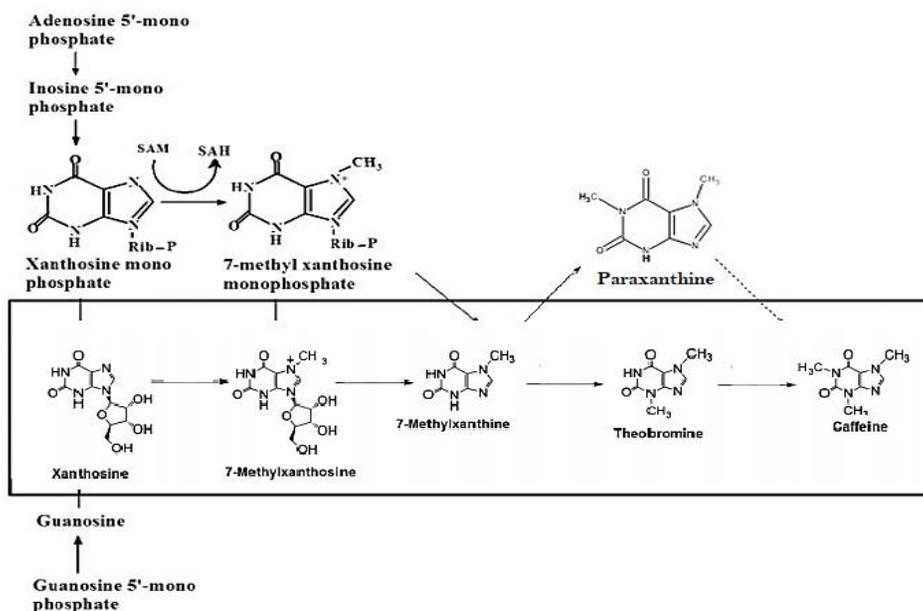


Nota. Tomado de (Filová, 2014).

La cafeína es un alcaloide derivado del nucleótido de purina. La principal vía biosintética de la cafeína (Figura 6) implica la metilación sucesiva de xantosina dando como resultado 7-metilxantosina, teobromina y finalmente cafeína (Suzuki & Waller, 1984).

Figura 6

Vías biosintéticas de cafeína en Coffea sp.



Nota. La vía de la xantósina a la cafeína se denomina como la vía biosintética central de la cafeína. Fuente: (Suzuki & Waller, 1984).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se caracterizan por una estructura de anillos aromáticos hidroxilados, que en estado libre confieren al compuesto capacidades antioxidantes, antiinflamatoria, antiséptica, bactericida y anticancerígena (Catalán, Barrubés, Valls, Solà, & Rubió, 2017). Se ha podido identificar más de 8000 compuestos fenólicos, se los clasifica en diferentes subclases según el número de anillos aromáticos, elementos que unen los anillos entre sí y los sustituyentes a los anillos (Dai & Mumper, 2010).

Se pueden identificar cuatro familias principales: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Se estima que el consumo diario de compuestos fenólicos es de 1564,56 mg de equivalente de ácido gálico por día (Pedret, y otros, 2012). Se considera a los flavonoides como el grupo más representativo, de polifenoles, caracterizados por tener el núcleo flavánico. Varios estudios revelan que los flavonoides ejercen efectos protectores contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares, además, han demostrado tener actividad antimicrobiana, antiviral, antitrombótica, antioxidante y antiinflamatoria (Babu & Liu, 2009).

Villacís y colaboradores (2017), han identificado 14 compuestos fenólicos en hojas de guayusa. La quercetina-3-O-hexosa y el ácido clorogénico fueron los más representativos. Además, identificaron 7 carotenoides como la luteína.

Metabolitos Secundarios en *Ilex guayusa* Loes.

Ilex es una fuente botánica de varios compuestos con interés farmacéutico. El creciente interés de nuevos productos ha llevado a la investigación de la fitoquímica, quimiotaxonomía, filogenia molecular y farmacología de las especies. En el género *Ilex* se han registrado terpenoides, alcaloides, polifenoles, saponinas, glucósidos entre otros compuestos (Hao, y otros, 2013).

Radice y Vidari (2007), mediante tamizaje fitoquímico de hojas de guayusa, identificaron que en extractos etéreos existen esteroides, terpenos cumarinas y alcaloides en mayor cantidad. Mientras que, en extractos acuosos y etanólicos se identificaron saponinas, fenoles, taninos, azúcares reductores, alcaloides esteroides, terpenos, flavonoides y quinonas. Varios estudios *in vivo* determinaron que el contenido de cafeína se mantuvo en una concentración de 12,20 a

19,08 mg/g de muestra seca (PS). A su vez, los fenoles totales mostraban una variación con respecto al lugar de recolección de la muestra con valores de 22,33 a 54,86 mg/g PS (Tabla 4).

Tabla 4

Concentración de cafeína, fenoles totales y carotenoides del género Ilex

Especie	Muestra	Principio Activo	Concentración	Fuente
<i>Ilex paraguariensis</i>	Callo <i>in vitro</i>	Fenoles Totales	40 mg EAG/g PS	(Grunenvaldt, 2018)
		Cafeína	1,196 mg Cafeína/g PS	
		Teobromina	0,087 mg Cafeína/g PS	
		3-Ácidos clorogénicos	3,16 mg EAC/g PS	
<i>Ilex guayusa</i> Loes	hoja <i>in vivo</i>	Cafeína	16,638 mg/g PS	(Melo, 2015)
		Teobromina	0,428 mg/g PS	
<i>Ilex guayusa</i> Loes	hoja <i>in vivo</i>	Fenoles Totales	22,33 mg EAG/g PS	(Cadena, Tramontin, Cruz, Bella, & Muller, 2019)
		Cafeína	12,20 mg/g PS	
		Escualeno	0,60 mg/g PS	
<i>Ilex guayusa</i> Loes	Hoja <i>in vivo</i>	Fenoles Totales	57,7 mg EAG/g PF	(Sequeda, Modesti, Celis, Gamboa, & Gutierrez, 2016)
		Flavonoides Totales	1,71 mg EQE/g PF	
<i>Ilex guayusa</i> Loes	Hoja <i>in vivo</i>	Cafeína	19,08 mg/g PS	(Wise & Santander, 2018)
<i>Ilex guayusa</i> Loes	Hoja <i>in vivo</i>	Fenoles Totales	33,44 mg/g PS	(Villacis-Chiriboga, y otros, 2018)
		Carotenoides Totales	44 µg/g PS	
<i>Ilex guayusa</i> Loes	Hoja <i>in vivo</i>	Fenoles Totales	54,86 mg/g PS	(Almudena, Nieves, Benítez, Stinco, & Meléndez, 2017)
		Carotenoides Totales	447,62 µg/g PS	

Agentes Elicitores

La elicitación de rutas metabólicas es un método usado para inducir la expresión de genes asociados con enzimas responsables para la producción de metabolitos secundarios como

mecanismo de respuesta ante un estrés. Mediante la adición de moléculas precursoras al medio, es posible estimular cualquier paso de las reacciones en las cadenas de biosíntesis enzimáticas con el fin de mejorar la formación del producto final deseado (Namdeo, 2007).

Los elicitores no funcionan de la misma manera en todas las especies, el tipo de compuesto deberá ser seleccionado dependiendo del producto final de interés. Los elicitores pueden ser abióticos (como estrés físico, iones metálicos pesados, estrés osmótico, choque térmico, temperatura y radiación UV) y bióticos (fracciones o compuestos de plantas y células microbianas), pueden actuar de forma individual o en combinación con otros elicitores (Weathers & Towler, 2010).

Los elicitores pueden ser reconocidos por receptores de la superficie de la membrana plasmática y activar los efectores, como los canales iónicos, proteínas de unión GTP, quinasas y estallido oxidativo (liberación de Especies Reactivas de Oxígeno). Los efectores promueven la síntesis de moléculas de señalización (ácido salicílico, óxido nítrico, etc.), los cuales transfieren las señales a los genes posteriores para amplificar la biosíntesis de metabolitos secundarios, como se muestra en la Figura 24 (Wang, y otros, 2017).

Métodos de Cuantificación de Principios activos

Generalidades

Existe una amplia gama de técnicas que se utilizan para caracterizar y cuantificar los principios activos presentes en plantas, algunos de naturaleza química y otros de tipo físico. Entre estas técnicas se encuentran: (1) la titulación con un compuesto apropiado, método económico y de fácil aplicación pero que requiere al principio activo en forma pura

(Pharmacopée Européenne, 2002), (2) la titulación potenciométrica en la que el punto final se determina por medio del cambio de pendiente en una curva de potencial pH versus el volumen de titulante agregado (Çakirer, Kılıç, & y Kenar, 1999), (3) la cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC que permite identificar y cuantificar el producto analizado y las impurezas que acompañan, pero a su vez el equipo es costoso y requiere el pretratamiento de la muestra (Lampert & Stewart, 1990; Pharmacopée Européenne, 2002), (4) la espectroscopía UV-VIS que ha ido adquiriendo popularidad con el tiempo por su sensibilidad y especificidad pero que requieren de equipamiento y condiciones óptimas de trabajo para garantizar sensibilidad y repetitividad de los ensayos (Butnariu & Coradini, 1999), así como otras técnicas más actuales como (5) la electroforesis capilar (Garrigues, Gallignani, & de la Guardia, 1993), entre otras.

La selección del método de cuantificación del principio activo dependerá de la sencillez, precisión, eficiencia, equipamiento y costo que requiera para su ejecución, así como la forma en que se tenga la muestra con el principio activo (Matkovic, Valle, & Briand, 2004).

Espectrofotometría UV-Visible

La espectroscopia óptica en el rango de luz ultravioleta y visible (UV/VIS) es una técnica fisicoquímica que se aplica ampliamente para investigación, producción y control de calidad de mercado para clasificar y estudiar diferentes sustancias (De Caro & Haller, 2015). La espectroscopia UV/VIS consiste en medir la absorción de luz por una muestra dada, y de acuerdo a la cantidad de luz y la longitud de onda absorbida por la muestra, se puede obtener información de una muestra, como su pureza (Oliveros-Bastidas, Carrera, & Marín, 2009).

Según Giorgi et al. (2020), la luz es un tipo de energía que oscila periódicamente entre un mínimo y un máximo en el tiempo, de ahí que se la identifique como una onda. La distancia

entre dos máximos o dos mínimos, respectivamente, de la onda electromagnética se define como la longitud de onda y se expresa en nanómetros (nm).

Cada color tiene una longitud de onda específica, como ejemplo la luz roja tiene una longitud de onda de 660 nm pero la luz verde tiene una longitud de onda de 520 nm. Así, los diferentes componentes de la luz se caracterizan por una longitud de onda específica. La suma de todos los componentes, es decir, de todas las longitudes de onda, se denomina espectro. El espectro electromagnético de la luz visible varía desde aproximadamente 390 nm hasta aproximadamente 780 nm (Olle & Virsile, 2013).

Reactivo de Folin-Ciocalteu

La absorción de luz se puede utilizar en química analítica para la caracterización y determinación cuantitativa de sustancias. Para esto la muestra se ilumina con rayos electromagnéticos de varias longitudes de onda en el visible y rangos adyacentes, es decir, ultravioleta (UV) y parte de la región infrarroja inferior (IR cercano) del espectro (Ikawa, Schaper, Dollar, & Sasner, 2003). Dependiendo de la sustancia, la luz se absorbe parcialmente. La luz restante, es decir, la luz reflejada, se registra en función de la longitud de onda mediante un detector adecuado, que proporciona el espectro UV/VIS de la muestra. Como resultado, cada sustancia absorbe la luz de una manera diferente, generando una relación única y específica entre la sustancia y su espectro UV/VIS. De esta manera, el espectro puede usarse para identificar o cuantificar una sustancia (De Caro & Haller, 2015).

Capítulo 3: Materiales y métodos

Se ha definido que *Ilex guayusa* Loes ha generado interés debido a que sus principales constituyentes son compuestos fenólicos, triterpenoides, flavonoides y alcaloides xantínicos; a los que se les atribuye la capacidad antioxidante, importante para contrarrestar el estrés oxidativo. El cultivo de tejidos vegetales y producción de principios activos *in vitro* proporcionan nuevas formas de procesamiento de plantas con interés comercial de manera controlada y un complemento a la agricultura tradicional. En el presente estudio se proporciona una alternativa a la producción de principios activos de *Ilex guayusa* Loes., mediante el cultivo de tejidos vegetales, la inducción a calogénesis y a la elicitación con ácido salicílico como se indica a continuación:

Figura 7

Metodología para el desarrollo del estudio



Ubicación geográfica de la investigación

La presente investigación se la realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, localizada en Sangolquí, Av. El Progreso, s/n, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; altitud 2516 m.s.n.m.

Fase de campo

Obtención del material vegetal

Para el presente proyecto se emplearon 10 estacas de plantas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) provenientes de la localidad de Archidona, provincia de Napo con temperatura promedio 25 °C, humedad relativa de 90% y altitud de 577 m.s.n.m. Las plantas que se utilizaron fueron de 7 meses de edad y 60 cm de altura, aproximadamente, con follaje denso y hojas visiblemente sanas de entre 3 cm a 9 cm de largo, como se muestra en la Figura 8. Las mismas fueron transportadas en una caja aislada portátil al invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE con temperatura promedio de 17°C y altitud de 2500 m.s.n.m.

Figura 8

Plantas de guayusa (Ilex guayusa Loes) ubicadas en el invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE

**Tratamiento Fitosanitario**

Las plantas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) mantenidas en el invernadero fueron sometidas a un control fitosanitario, que consistió en la aplicación semanal al área foliar de fungicida Mancozeb® a una concentración de 2,5% (p/v), junto con una solución de ácido giberélico (3 mg/L) y el bioestimulante Germo-BR02® a una concentración de 0,1% (v/v). Además, se aplicó agua corriente 3 veces por semana a primeras horas de la mañana.

Recolección de muestras

Para la introducción *in vitro* de los explantes se utilizaron 20 hojas jóvenes (5-8 cm de largo, aproximadamente) para cada tratamiento (Figura 9), que tienen una menor probabilidad de poseer microorganismos endógenos y un menor riesgo de contaminación (Shagufta, Sheeba,

& Sambreen, 2006). Las muestras fueron cortadas desde el peciolo con un bisturí estéril y desinfectado en cada corte con alcohol al 70% (v/v), se colocaron en un vaso de precipitación y fueron transportadas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales para el posterior procesamiento.

Figura 9

Hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes) de 5-8 cm de largo utilizadas para la inducción a callogénesis in vitro



Procedimientos generales

Medios de cultivo y condiciones de esterilización

Se utilizaron medios de cultivo semisólido Murashige & Skoog (1962), suplementados con 10 mL/L de Vitaminas, 30 g/L de Sacarosa, 8 g/L de Agar. El pH se ajustó en un rango de 5,7 – 5,8 con soluciones 1 N de Ácido Clorhídrico (HCl) e Hidróxido de Sodio (NaOH). El medio de cultivo se dosificó en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad a razón de 30 mL.

Los frascos de vidrio conteniendo los medios de cultivo e instrumentos de trabajo fueron esterilizados por 1 hora y 15 minutos, en autoclave horizontal (Marca: Tuttnauer, Clase:

N, Serie: E, Procedencia: Estados Unidos) a 121 °C y 1,2 kg/cm² de presión. Adicionalmente, se esterilizaron en la cámara de flujo laminar horizontal (Marca: Streamline, Procedencia: Estados Unidos) con radiación ultravioleta por 40 min.

Condiciones de cultivo *in vitro*

Para realizar el análisis de la fase de desinfección e inducción a callogénesis *in vitro* se tomó como unidad experimental a cuatro explantes por frasco de vidrio con 30 mL de medio de cultivo, y se realizaron 15 repeticiones para cada tratamiento (60 explantes).

Las hojas jóvenes recolectadas de 5-8 cm de longitud, fueron cortadas a la altura de la nervadura principal con dimensiones de 1 x 1 cm y se sembró con el envés en contacto con el medio de cultivo. Los explantes fueron cultivados con luz natural indirecta a fotoperiodos de 16 horas, con excepción de los medios de cultivos suplementados con 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), a una temperatura de 23±2 °C y 25% de humedad relativa.

Fase de laboratorio

Desinfección de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes)

Para este estudio se utilizará el protocolo de desinfección propuesto por Pico (2017) con modificaciones adecuadas a las condiciones iniciales de las plantas madre, con el objetivo de mantener los parámetros de contaminación y oxidación de los explantes a un porcentaje menor al 20%. Las hojas recolectadas se mantuvieron en agua corriente por 30 minutos, eliminando cualquier partícula adherida en la superficie de las hojas. De forma seguida, se sumergieron en una solución de detergente al 2% p/v con 12 gotas de tween-20/L durante 30 minutos,

posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. A continuación, se utilizó una solución de fungicida SKULL® a una concentración del 0,5% v/v por 20 minutos y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Finalmente, las hojas fueron sometidas a una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 3% v/v durante 3 minutos. Terminado el protocolo de desinfección, el material vegetal mantenido en hipoclorito de sodio fue trasladado a la cámara de flujo laminar (Marca: Streamline, Procedencia: Estados Unidos). Cada etapa de desinfección se la realizó en agitación constante a 250 rpm utilizando un agitador orbital múltiple (Marca: WiseStir, Procedencia: Estados Unidos).

Figura 10

Protocolo de desinfección de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes)



Nota. A) Inmersión de los explantes en la solución de detergente 2% (p/v), B) Hojas de guayusa en una solución de fungicida SKULL® a una concentración del 0,5% (v/v) y C) Materiales y hojas de guayusa en la cámara de flujo laminar (Marca: Streamline, Procedencia: Estados Unidos).

Se evaluó la contaminación y oxidación de cada uno de los frascos mediante observación a los 7, 14 y 21 días de cultivo. Además, se asignó el valor de 0:25:100%, dependiendo del nivel de contaminación y el necrosamiento o marchitamiento de los explantes.

Según los niveles de contaminación y oxidación se determinó la eficiencia del tratamiento fitosanitario junto con el protocolo de desinfección del material vegetal. Se empleó un análisis exploratorio de datos con gráficas y tablas de contingencia; e inferencial mediante el análisis de varianza (ANOVA), prueba de normalidad de Shapiro Wilks, además las diferencias significativas entre las medianas se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, utilizando el software estadístico InfoStat (versión 2017) con un valor de significancia $p < 0,05$.

Inducción a callogénesis *in vitro* de explantes de guayusa (*Ilex guayusa* Loes)

El presente ensayo tuvo como objetivo establecer la dosis óptima de auxinas y citoquininas sobre la inducción de callogénesis *in vitro* a partir de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes). Se suplementó al medio de cultivo Murashige & Skoog diferentes dosis de fitorreguladores tomando como referencia el protocolo establecido por Grunennvaldt (2018) para la inducción de callogénesis a partir de hojas de Mate (*Ilex paraguariensis*) como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

Combinaciones de fitorreguladores en el medio de cultivo para la inducción a callogénesis in vitro de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes)

Tratamiento	Medio de cultivo	Fitorreguladores (mg/L)		
		Zeatina	2,4-Diclorofenoxiacético	Ácido Naftalenacético
CG1	MS	0	0	0
CG2	MS	0,5	2	0
CG3	MS	0,5	0	2
CG4	MS	1	4	0
CG5	MS	1	0	4
CG6	¼ MS	0,5	2	0
CG7	¼ MS	0.5	0	2
CG8	¼ MS	1	4	0
CG9	¼ MS	1	0	4
CG10	¼ MS	0	0	0

Se evaluó el efecto de los fitorreguladores en la formación de callo a los 30, 45, 60 y 75 días de cultivo. Durante este periodo de tiempo, los explantes se evaluaron mediante la clasificación visual: (0) no hay cambio, (1) inicio de encurvamiento o ensanchamiento del explante, (2) formación parcial del callo y (3) proliferación de callo. A su vez, se evaluó la coloración del callo y textura después de los 75 días de cultivo. Los datos se analizaron estadísticamente mediante procesos experimentales univariantes para variación de varianza, empleando las Pruebas Post-hoc de Tukey y Bonferroni con un grado de significancia del 5%. Estos análisis fueron realizados en el software estadístico SPSS19.

Aplicación de Ácido Salicílico como agente elicitador

Una vez analizado el mejor tratamiento de inducción a callogénesis, según el análisis exploratorio e inferencial, se preparó nuevamente el medio de cultivo indicado en el literal

3.3.2, bajo las mismas condiciones de asepsia, suplementado con los fitorreguladores respectivos y 0,02 mg/L de Ácido Salicílico como lo indica el estudio de Fajardo et al. (2015).

Seguidamente, se realizó el mismo procedimiento de desinfección e introducción previamente descrito y se evaluó el efecto de los fitorreguladores, junto con el ácido salicílico, en la formación de callo por explante *in vitro* a los 30, 45, 60 y 75 días de cultivo. Se evaluó mediante la clasificación visual: (0) no hay cambio, (1) inicio de encorvamiento o ensanchamiento del explante, (2) formación parcial del callo y (3) proliferación de callo.

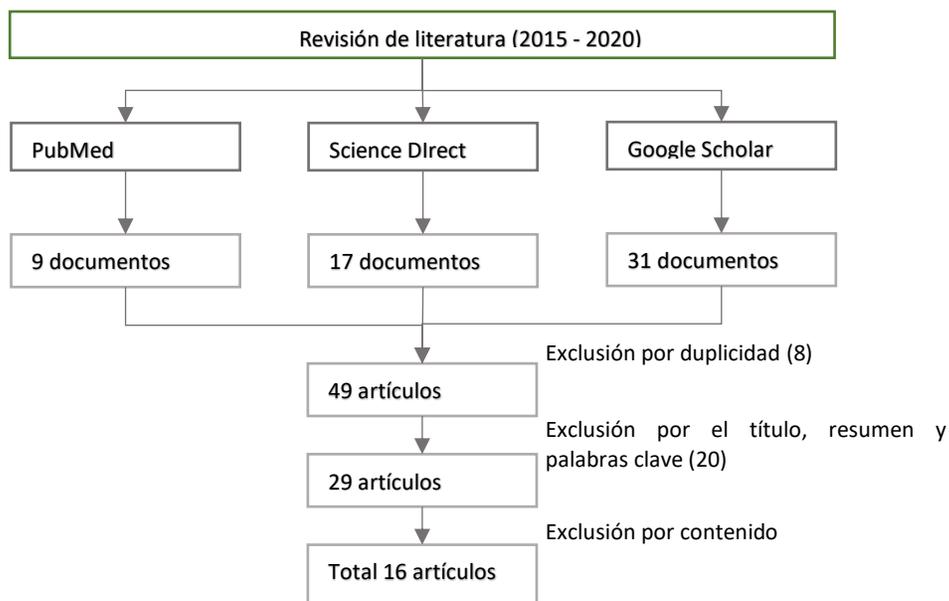
Análisis teórico sobre la producción de principios activos en callo *in vitro* influenciado por ácido salicílico como elicitador

Para esta etapa del proyecto, se realizó una búsqueda exhaustiva de documentos de revistas académicas actuales, publicados en el periodo de 2015-2020 en la base de datos de Google Scholar, Science Direct, y PubMed con el objetivo de determinar el efecto de la aplicación de ácido salicílico sobre la producción de principios activos *in vitro*. Se utilizó el criterio de búsqueda con las palabras clave: "Salicylic Acid", "Phenolic compounds", "Plant cell culture", "Elicitation" y "Callus". A su vez, se vinculó la búsqueda a título del artículo, resumen, palabras clave, enmarcados al análisis de principios activos y al efecto del ácido salicílico como agente elicitador en la producción de metabolitos secundarios a partir de callo *in vitro*.

Inicialmente, los resultados de la búsqueda arrojaron 57 documentos entre las tres bases de datos. Mediante exclusión por contenido se descartaron los artículos que no estaban relacionados con el tema. Finalmente, por exclusión por duplicidad se obtuvieron un total de 16 artículos científicos, como se muestra en la Figura 11.

Figura 11

Resultados de las bases de datos en el periodo 2015-2020 usando varios criterios de búsqueda



Con los artículos extraídos se realizó una base de datos en Microsoft Excel que incluyó los siguientes datos: Especie de estudio, medio de cultivo utilizado en la investigación para el establecimiento e inducción a callogénesis *in vitro*, las concentraciones de ácido salicílico y principios activos en presencia y ausencia de ácido salicílico durante tres tiempos de aplicación del elicitador. Además, se tomó en cuenta la razón de aumento final de los principios activos y la fuente de información. De manera similar, se organizó otra base de datos relacionados a: el nombre de los autores, título de la publicación, tipo de publicación, revista de publicación, país de edición y número de citas recibidas.

Esta información permitió realizar un análisis de forma descriptiva sobre el uso del ácido salicílico en medios de cultivo *in vitro* como potenciador de principios activos. También, se identificó los países, revistas y autores que se encuentran realizando investigaciones sobre el tema.

Capítulo 4: Resultados

Desinfección de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes)

El tratamiento fitosanitario conjuntamente con el protocolo de desinfección ha demostrado su eficacia en la disminución de la contaminación y oxidación de los explantes de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes). Cabe señalar que el porcentaje de contaminación disminuyó conforme se aplicó el tratamiento fitosanitario, debido a que los tratamientos CG5 a CG10 presentaron un porcentaje de contaminación y oxidación menor al 15% (Tabla 6).

Tabla 6

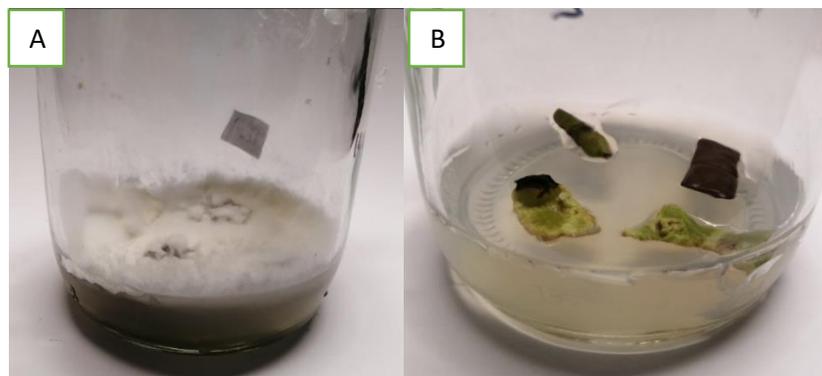
Evaluación del protocolo de desinfección para los tratamientos pertenecientes a la inducción a callogénesis

TRATAMIENTO	7 DÍAS		14 DÍAS		21 DÍAS	
	CONTAMINACIÓN (%)	OXIDACIÓN (%)	CONTAMINACIÓN (%)	OXIDACIÓN (%)	CONTAMINACIÓN (%)	OXIDACIÓN (%)
CG1	8,333	1,667	13,333	1,667	21,667	25,000
CG2	21,667	26,667	36,667	33,333	36,667	33,333
CG3	5,000	20,000	20,000	31,667	20,000	35,000
CG4	6,667	16,667	13,333	21,667	13,333	21,667
CG5	0,000	0,000	1,667	1,667	1,667	1,667
CG6	6,667	3,333	15,000	13,333	15,000	13,333
CG7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CG8	1,667	0,000	1,667	0,000	1,667	0,000
CG9	0,000	0,000	13,333	0,000	13,333	0,000
CG10	0,000	0,000	1,667	0,000	6,667	0,000

Se observó que a los 21 días la contaminación fúngica predominó en el cultivo de explantes de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes), mientras que la contaminación bacteriana fue nula en este ensayo (Figura 12).

Figura 12

Contaminación de tipo fúngica y oxidación de explantes de guayusa (Ilex guayusa Loes) a los 21 días de cultivo

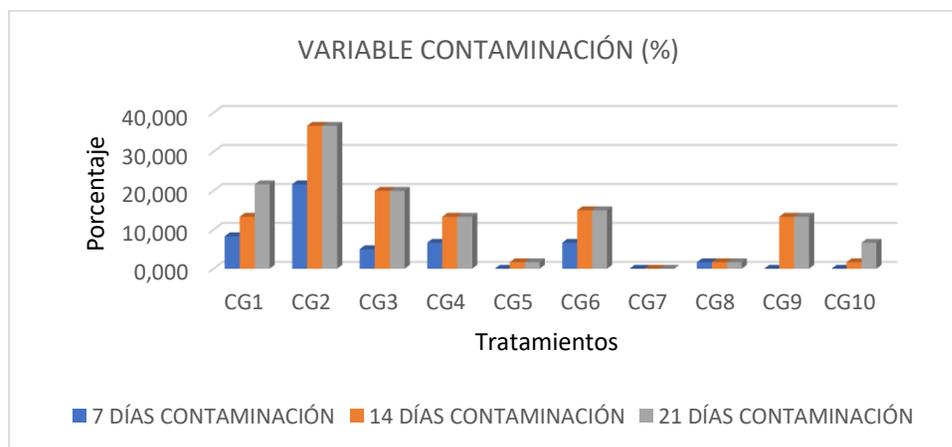


Nota. A) Contaminación fúngica del 100% de los explantes. B) Oxidación del 75% de los explantes.

El análisis exploratorio definió que la variable contaminación presentó un máximo de 36,67% en el Tratamiento CG2 a los 14 días de cultivo. La Figura 13, muestra que el tratamiento CG2 se encontró por encima de los demás tratamientos, siguiendo con el Tratamiento CG3 con un 20% de contaminación.

Figura 13

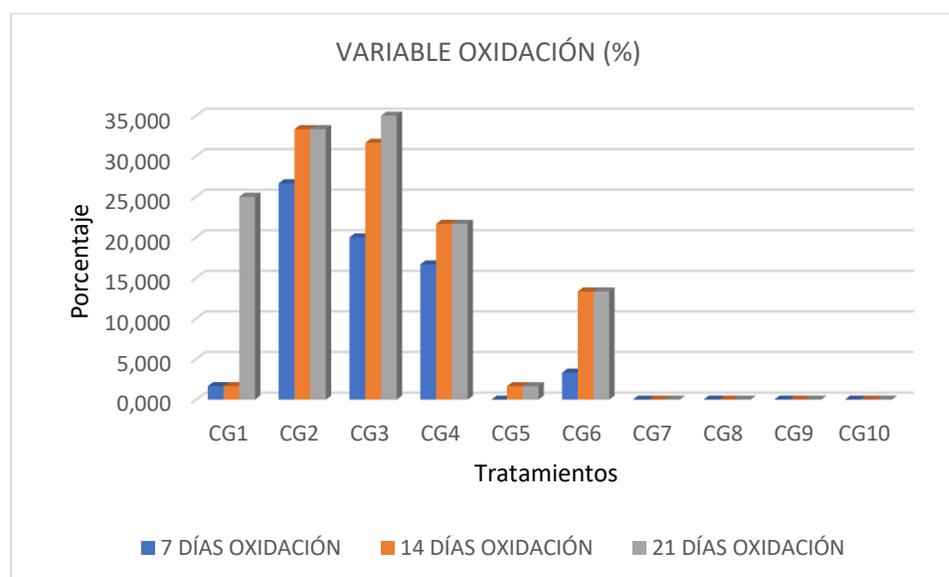
Porcentajes de Contaminación de los explantes de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes)



Para la variable oxidación, se encontró que el tratamiento CG3 alcanza el máximo porcentaje de oxidación con 35% a los 21 días, mientras que los tratamientos CG5, CG6, CG7, CG8, CG9 Y CG10 presentaron menos del 20% de oxidación de los explantes como se muestra en la Figura 14.

Figura 14

Porcentajes de Oxidación para los explantes de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes) a los 7, 14 y 21 días de cultivo



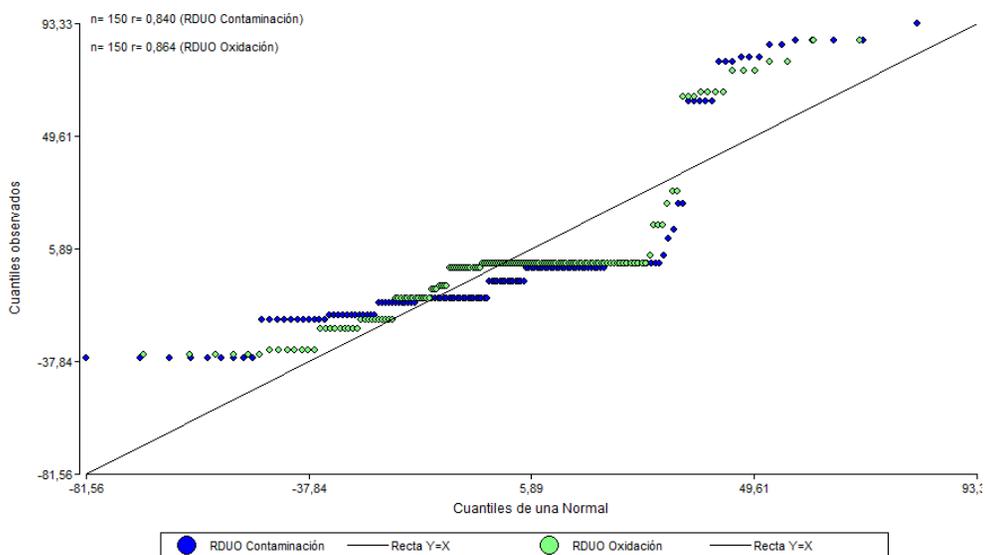
Se realizó un análisis de varianza ANOVA a los datos obtenidos a los 21 días de cultivo. Se determinó que para la variable contaminación no existió diferencia significativa entre cada tratamiento con un valor de $p = 0,0577$ ($p > 0,05$), mientras que para la variable oxidación sí existió una diferencia significativa entre cada tratamiento con un valor de $p = 0,0001$ ($p < 0,05$).

Usando la prueba de Shapiro Wilks (modificado) se analizó si los datos obtenidos siguen una distribución normal (Tabla 7). Los valores obtenidos indican un valor de $p < 0,0001$ para las variables de contaminación y oxidación, por lo que se concluyó que los datos no siguen una

distribución normal. La gráfica de probabilidad normal (Q-Q Plot) corroboraron esta hipótesis (Figura 15).

Figura 15

Gráfica de normalidad de los datos para las variables Contaminación y Oxidación a los 21 días de cultivo de los explantes



Debido a la tendencia de los datos, se utilizó el análisis de varianza no paramétrico según la prueba de Kruskal Wallis. Los resultados indicaron que para la variable contaminación no existió diferencia significativa entre los tratamientos con un valor de $p=0,0964$ ($p > 0,05$). Mientras que, para la variable oxidación existió al menos un tratamiento que difiere de los demás con un valor de $p<0,0001$.

Tabla 7

Análisis estadístico realizado a los explantes de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes) después de 21 días de cultivo

Variable	p-valor		
	ANOVA	Shapiro-Willks (Modificado)	Kruskal-Wallis
Contaminación	0,0577	<0,0001	0,0964
Oxidación	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Se clasificó a los tratamientos mediante la prueba de Kruskal-Wallis según los resultados obtenidos de la variable oxidación. Se determinó que los tratamientos CG4, CG1, CG2 Y CG3, difieren significativamente de los demás tratamientos (Tabla 8).

Tabla 8

Análisis de rangos mediante la prueba de Kruskal-Wallis para la variable oxidación para los datos obtenidos luego de 21 días de cultivo

Tratamiento	Medianas	Rango			
CG7	0	60	A		
CG8	0	60	A		
CG9	0	60	A		
CG10	0	60	A		
CG5	0	64,37	A		
CG6	0	71,13	A	B	
CG4	0	85,37	A	B	C
CG1	0	89,8	A	B	C
CG2	25	99,73		B	C
CG3	25	104,6			C

Nota. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Inducción a callogénesis *in vitro* de explantes de guayusa (*Ilex guayusa* Loes).

Los resultados indicaron que, después de 45 días de cultivo el tratamiento CG5, correspondiente al medio de cultivo MS suplementado con 2 mg/L de Zeatina y 4 mg/L de ANA, fue el único que presentó proliferación de callo (Figura 17C y 17D) en 20 explantes, alcanzando un total de 34 explantes tras los 75 días de cultivo, como se muestra en la Figura 16. La tabla de contingencia presentada en el Anexo 1 (Tabla 21) muestra el resumen de las observaciones realizadas a los 45, 60 y 75 días de cultivo.

Figura 16

Resultados de inducción a callogénesis in vitro de los explantes de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes)

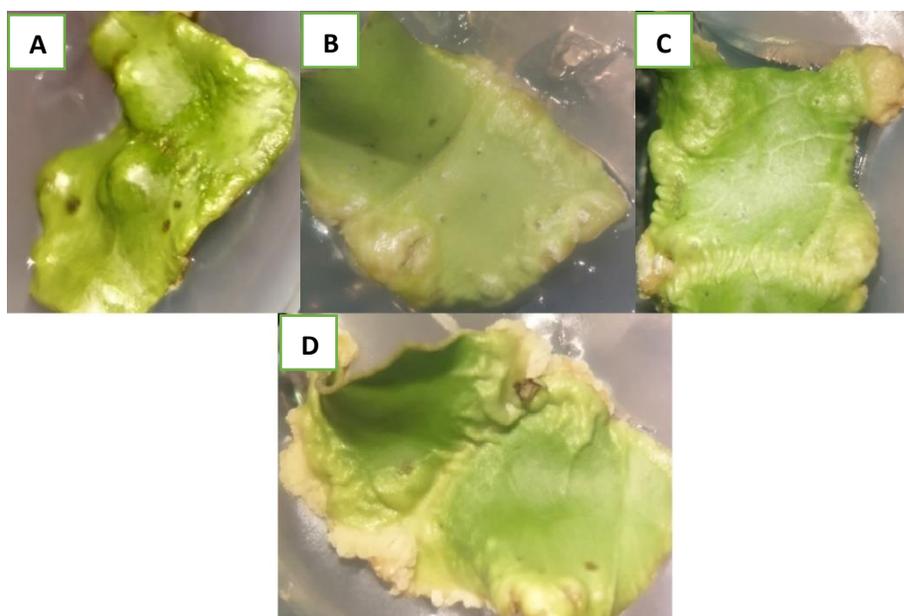


Nota. Se evaluó siguiendo la clasificación visual: (0) no hay cambio, (1) inicio de encorvamiento o ensanchamiento del explante, (2) formación parcial de callo y (3) proliferación de callo.

A los 30 días de cultivo, se observaron cambios morfológicos en los explantes. Se identificaron 197 explantes con encorvamiento pronunciado (Figura 17A), y 3 con indicios de formación parcial de callo (Figura 17B). A los 45 días de cultivo, los explantes en proliferación de callo mantuvieron una coloración amarilla pálida (RGB: 255, 255, 153) y una consistencia compacta del callo Figura 17C y 17D.

Figura 17

Cambios morfológicos en los explantes en la etapa de inducción a callogénesis a los 60 días de cultivo

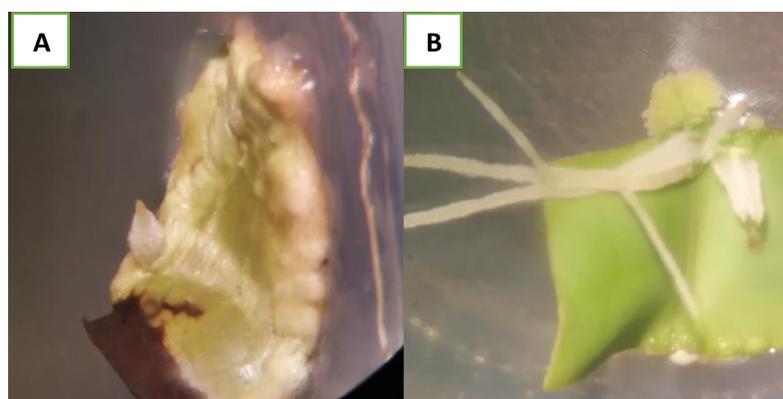


Nota. Explantes de guayusa (Ilex guayusa Loes) en proceso de formación de callo. A) Inicio de encorvamiento o ensanchamiento del explante para el tratamiento CG3, B) Explante del tratamiento CG4 que presentaron formación parcial de callo, C) y D) Explantes del tratamiento CG5 en fase de proliferación de callo.

A los 45 días de cultivo, se observó el inicio de formación de raíces adventicias en explantes del tratamiento CG7, cultivados en $\frac{1}{4}$ de medio MS suplementado con 0,5 mg/L de Zeatina y 2 mg/L de ANA (Figura 18A). A los 75 días de cultivo, se identificó la presencia de callo junto con la formación de raíces adventicias pronunciadas (Figura 18B).

Figura 18

Explantes de guayusa (Ilex guayusa Loes) cultivados en el tratamiento CG7



Nota. Los explantes fueron cultivados en medio $\frac{1}{4}$ MS suplementado con 0,5 mg/L de Zeatina y 2 mg/L de ANA. A) Inicio de formación de raíces adventicias a los 45 días de cultivo y B) Formación de raíces a los 75 días de cultivo.

Los datos obtenidos después de 75 días de cultivo se analizaron mediante pruebas Post-hoc, con el fin de: validar los datos recolectados, determinar las medias que difieren e identificar los tratamientos que no se diferencian entre sí. Se determinó como variable de respuesta a la resistencia de las muestras hacia la exposición de fitorreguladores en un periodo de 75 días de cultivo, mientras que la unidad experimental fue los cuatro explantes incubados en el frasco de vidrio de 30 mL para cada estado, a excepción de las muestras contaminadas y el factor de muestras final por cada estado de formación.

Se separaron los tratamientos en medio de cultivo MS (CG1-CG5) y ¼ MS (CG6-CG10) para ser analizados individualmente, al ser dos grupos fue posible aplicar el método ANOVA de un factor para identificar el nivel de significancia de la dosificación de fitorreguladores (Tabla 9).

Tabla 9

Número de explantes obtenidos tras 75 días de cultivo

Clasificación	Medio de Cultivo MS					Medio de Cultivo ¼ MS				
	CG1	CG2	CG3	CG4	CG5	CG6	CG7	CG8	CG9	CG10
0	44	0	0	4	0	0	17	18	10	52
1	0	8	11	6	0	6	39	24	18	0
2	0	13	12	20	4	2	0	0	3	0
3	0	16	0	4	34	0	0	0	0	0

Nota. Esta tabla muestra los datos recolectados a los 75 días de cultivo según la clasificación visual: (0) no hay cambio, (1) inicio de encorvamiento o ensanchamiento del explante, (2) formación parcial de callo y (3) proliferación de callo.

Validación Estadística-Experimental Post-hoc para los tratamientos en medio de cultivo MS (CG1-CG5)

Se utilizó el test de Levene basada en la media con el fin de evaluar la homogeneidad de varianzas, para los tratamientos en medio de cultivo MS después de 75 días de cultivo el nivel de significancia de la prueba fue de 0,104 ($p > 0,05$) por lo tanto no existen razones para decir que no sean las varianzas iguales y se definió que la variabilidad de cada tratamiento es igual, es decir, que la dosificación de fitorreguladores fue la adecuada, como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error para los tratamientos en medio de cultivo

MS después de 75 días de cultivo de los explantes

Resistencia	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Se basa en la media	2,326	4	15	0,104
Se basa en la mediana	0,213	4	15	0,927
se basa en la mediana y con gl ajustado	0,213	4	6,227	0,922
Se basa en la media recortada	1,733	4	15	0,195

Nota. Se utilizó un nivel de significancia del 5%.

Mediante la prueba de ANOVA, se utilizó como variable dependiente la resistencia de las características de los explantes hacia la exposición de los fitorreguladores. El valor de significancia para la prueba fue de 0,987, y mostró que no existen diferencias significativas en un aproximado del 75% de los datos, el restante tuvo un comportamiento atípico. ($R^2=2,1\%$ de variabilidad de datos). Por lo tanto, se dio correspondencia a que la dosificación utilizada para los tratamientos CG1-CG5 es la correcta y permitió evaluar los cambios de los explantes a la exposición del medio, como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11

Prueba de efectos inter-sujetos para los datos recolectados tras 75 días de cultivo de los

explantes en medio MS

Origen	suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	59,7	4	14,925	0,082	0,987
Intersección	1548,8	1	1548,8	8,536	0,011
Dosificación	59,7	4	14,925	0,082	0,987
Error	2721,5	15	181,433		

Origen	suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Total	4330	20			
Total corregido	2781,2	19			

Nota. Valor $R^2=0,021$.

Se realizó un análisis de las medias marginales estimadas y se obtuvo los estadísticos descriptivos. Los límites CG2 Y CG4 mostraron un leve solapamiento, es decir, los explantes presentaron una resistencia al cambio similar sobre los dos tratamientos. Además, según el análisis de las medias se obtuvo que los mejores tratamientos por fitorreguladores fueron el CG5, CG2, CG4, y se excluyó el tratamiento CG1 y CG3 debido a que no alcanzó el estado final de proliferación de callo (Tabla 12).

Tabla 12

Medias marginales estimadas para los datos recolectados tras 75 días de cultivo de los explantes en medio MS

Dosificación	Media	Desv. Error	Límite inferior	Límite superior
CG1	11	6,735	-3,355	25,355
CG2	9,25	6,735	-5,105	23,605
CG3	5,75	6,735	-8,605	20,105
CG4	8,5	6,735	-5,855	22,855
CG5	9,5	6,735	-4,855	23,855

Nota. Se utilizó un intervalo de confianza al 95%.

Una vez obtenido que las varianzas son homogéneas se usó el análisis de comparaciones múltiples de Tukey y Bonferroni. Se realizó la validación cruzada de los tratamientos y se analizó el comportamiento de cada tratamiento con respecto al resto, los resultados indicaron que no existió solapamiento y que los tratamientos se encontraron en condiciones diferentes con un nivel de significancia mayor a 0,05. Se analizó las diferencias de medias y significancia del

tratamiento CG5 con el tratamiento CG2 y se obtuvieron los valores de 0,25 y 1, respectivamente. Por lo tanto, el tratamiento CG5 obtuvo un promedio mayor y existió la probabilidad de más del 5% de que estos tratamientos puedan ser iguales.

Validación Estadístico-Experimental Post-hoc para los medios de cultivo en ¼ MS (CG6-CG10)

Para los tratamientos en medio de cultivo ¼ MS a los 75 días de cultivo de los explantes, la homogeneidad de varianzas mostró una significancia de 0,036 ($p < 0,05$). Por lo tanto, sí existieron razones para decir que no sean las varianzas iguales y que la variabilidad de cada tratamiento fue desigual, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error para los tratamientos en medio de cultivo ¼ MS después de 75 días de cultivo

Resistencia	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Se basa en la media	3,393	4	15	0,036
Se basa en la mediana	0,605	4	15	0,665
se basa en la mediana y con gl ajustado	0,605	4	4,319	0,679
Se basa en la media recortada	2,75	4	15	0,067

Nota. Se utilizó un nivel de significancia del 95%.

Se usó la prueba de ANOVA y se obtuvo un nivel de significancia del 0,824 mostrando que no existieron diferencias significativas en un aproximado del 75% de los datos, el restante presenta un comportamiento atípico. Además, el R^2 muestra que existe un 9.1% de variabilidad de los datos (Tabla 14).

Tabla 14

Prueba de efectos inter-sujetos para los datos recolectados tras 75 días de cultivo de los explantes en medio ¼ MS

Origen	suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	371,2	4	92,8	0,373	0,824
Intersección	1786,05	1	1786,05	7,183	0,017
Dosificación	371,2	4	92,8	0,373	0,824
Error	3729,75	15	248,65		
Total	5887	20			
Total corregido	4100,95	19			

Mediante un análisis de medias marginales estimadas para la variable de dosificación de fitorreguladores se obtuvo que los límites no presentaron solapamientos, es decir, no se identificó que existan tratamientos similares. Además, se obtuvo el mejor orden de resistencia, por ende, los mejores tratamientos por fitorreguladores fueron CG9 y CG6, excluyendo a los tratamientos CG7, CG10 y CG8 debido a que los explantes no formaron callo, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15

Medias marginales estimadas para los datos recolectados tras 75 días de cultivo de los explantes en medio ¼ MS

Dosificación	Media	Desv. Error	Límite inferior	Límite superior
CG6	2	7,884	-14,805	18,805
CG7	14	7,884	-2,805	30,805
CG8	10,5	7,884	-6,305	27,305
CG9	7,75	7,884	-9,055	24,555
CG10	13	7,884	-3,805	29,805

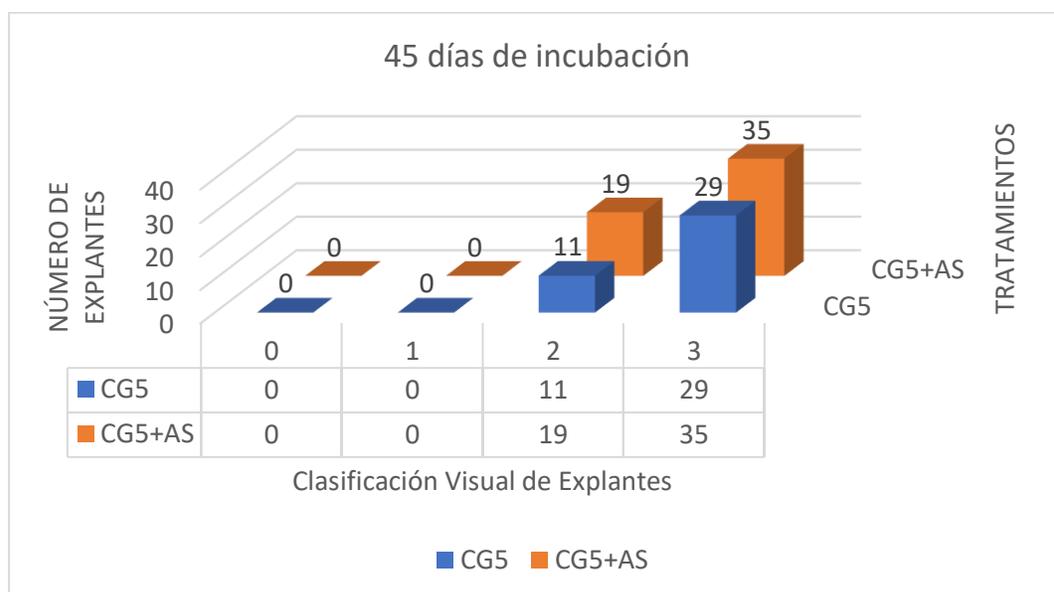
Nota. Se utilizó un intervalo de confianza al 95%.

Aplicación de Ácido Salicílico como agente elicitor

Durante esta fase del proyecto, se utilizó el medio de cultivo Murashige & Skoog suplementado con: 4 mg/L de Ácido Naftalenacético, 1 mg/L de Zeatina (Tratamiento CG5) y 0,02 mg/L de Ácido Salicílico. La unidad experimental para este estudio se definió como cuatro explantes por frasco de vidrio con medio de cultivo. A los 45 días de cultivo se observó que 35 explantes llegaron a la proliferación de callo, y el tratamiento alcanzó un total de 47 explantes después de los 75 días de cultivo, como se muestra en la Figura 19.

Figura 19

Resultado de inducción a callogénesis in vitro de explantes de hoja de guayusa (Ilex guayusa Loes) cultivado en medio MS suplementado con 0,02 mg/L de ácido salicílico

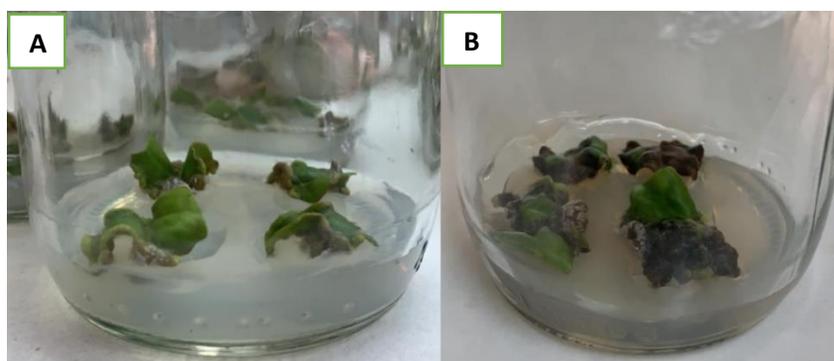


Nota. Se evaluó siguiendo la clasificación visual: (0) no hay cambio, (1) inicio de encorvamiento o ensanchamiento del explante, (2) formación parcial de callo y (3) proliferación de callo.

Se identificó las características morfológicas del callo tras la aplicación del ácido salicílico. A los 45 días de cultivo, se observó un cambio de coloración en el callo a Marrón (RGB: 121, 80, 48). Al final del experimento, se observó que el callo presentaba una coloración Marrón oscuro (RGB: 84, 56, 34) y se mantuvo la consistencia compacta, como se muestra en la Figura 20.

Figura 20

Inducción a callogénesis in vitro de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes) en el tratamiento CG5 suplementado con ácido salicílico



Nota. A) Callo de Ilex guayusa a los 45 días de cultivo. B) Callo de Ilex guayusa a los 75 días de cultivo.

Mediante un análisis de varianza a los datos de los explantes en fase de proliferación de callo (3) a los 75 días de cultivo, se determinó que entre los tratamientos CG5 y CG5+AS no existió una diferencia significativa, con un valor de $p=0,369$ ($p > 0,05$), sin embargo, mediante análisis exploratorio de los datos se vio que en el tratamiento CG5+AS existió mayor cantidad de explantes en fase de proliferación de callo. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilks mostró que no existió una distribución normal de los datos ($p < 0,0001$), por lo tanto, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Los resultados indicaron que no existió diferencia significativa

entre el tratamiento CG5 y CG5+AS con un valor $p=0,5828$ ($p > 0,05$), como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16

Resultado del análisis estadístico realizado para los tratamientos CG5 y CG5 suplementado con ácido salicílico

Variable	p-valor		
	ANOVA	Shapiro-Willks (Modificado)	Kruskal-Wallis
Resistencia	0,3690	<0,0001	0,5828

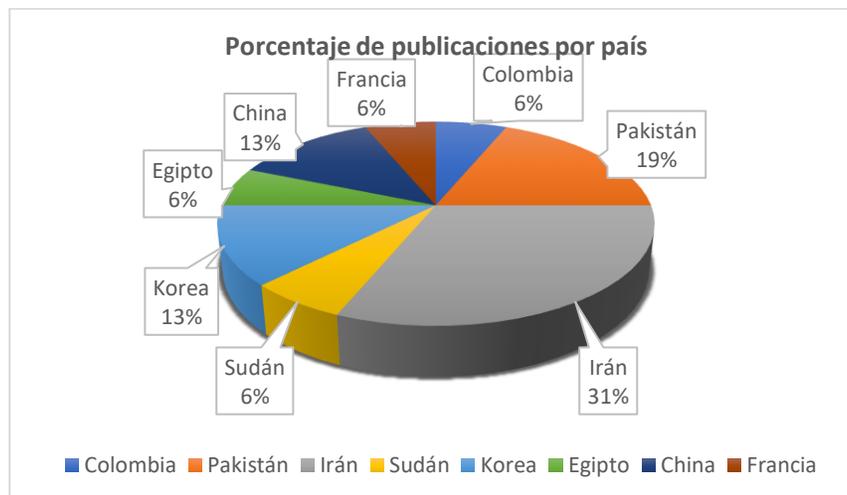
Nota. Se utilizó un nivel de significancia del 95%.

Análisis teórico sobre la producción de principios activos en callo *in vitro* influenciado por ácido salicílico como elicitador

Los criterios de búsqueda arrojaron 16 artículos científicos en el periodo de 2015-2020, publicados por autores con filiación a instituciones de 8 países. Como se muestra en la Figura 21, el mayor número de artículos se publicó por primeros autores de Irán (31%) y Pakistán (19%).

Figura 21

Países enfocados en la producción in vitro de principios activos usando ácido salicílico como elicitador



De estos artículos se encontró la prevalencia de la Revista de Cultivo de Células (n=5), Tejidos y Órganos Vegetales con Índice H de 77 y posicionada en el cuartil Q1 y con Editor Springer Países bajos (Anexo 2: Tabla 22).

Inducción a callogénesis *in vitro* y elicitación con ácido salicílico

El 81, 25% de los artículos (n=13) han utilizado medio MS para la inducción a callogénesis *in vitro* de 16 especies pertenecientes a 14 familias. Se han suplementado los medios con las auxinas 2,4-D (n=6) y ANA (n=7). Las citoquininas utilizadas en las investigaciones fueron Kinetina (n=5), 6-Bencilaminopurina (n=4) y Thidiazuron (n=2). En su mayoría, se determinó que la concentración de ácido salicílico aplicada fue mayor o igual a 100 μM (n=6), 50 μM (n=3) y 200 μM (n=2), los demás componentes se detallan en la Tabla 17.

Tabla 17

Formulación de los medios de cultivo para la inducción a callogénesis in vitro

Fuente	Especie	Medio de Cultivo	[Ácido Salicílico]
(Gadzovska, 2015)	<i>Hypericum perforatum</i>	MS/B5, 1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/L ANA, 3% sucrosa y 0.7% agar	50 µM
(Mendoza, Cuaspud, Arias, Ruiz, & Arias, 2018)	<i>Thevetia peruviana</i>	Schenk y Hildebrandt, 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L Kinetina, 7 g/L agar, 3% sacarosa, 1 g/L mioinositol	300 µM
(Saba Samadi, 2020)	<i>Gardenia jasminoides</i>	MS, 0.3 mg/L kinetina, 0.5 mg/L ANA, 0.7 % agar, 30 g/L sucrosa	50 µM
(Xu, Zhan, & Huang, 2015)	<i>Stevia rebaudiana</i>	MS, 2 mg/L 6-BAP, 2 mg/L ANA	200 µM
(Haider Abbasi, Ullah, Nadeem, Tugmunnithym, & Hano, 2020)	<i>Vitis vinifera</i>	B5, 3 g/L phytigel, 30 g/L sucrosa, 0.1 mg/L ANA, 0.2 mg/L kinetina	100 µM
(Sarmadi, Karimi, Palazón, Ghassempour, & Mirjalili, 2018) Sarmadi, 2018	<i>Ajuga integrifolia</i>	MS, 3% sucrosa, 0.8% agar, 1 mg/L 6-BAP	150 µM
(Chung, Rekha, & Thiruvengadam, 2017)	<i>Taxus baccata</i>	B5, 6 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetina, 30 g/L sucrosa, 8 g/L agar	5 µM
(Khan, Khan, Hano, & Abbasi, 2019)	<i>Momordica dioica</i>	MS, 30 g/L Sucrosa, 8 g/L agar, 1 mg/L ANA, 0.5 mg/L TDZ	100 µM
(Thiruvengadam, Rekha, Rajakumar, Lee, & Kim, 2016)	<i>Fagonia indica</i>	MS, 30 g/L Sucrosa, 0,8% Agar, 4.4 µM TDZ	20 µM
(Sayed, Khodary, Ahmed, Hammouda, & Hassan, 2017)	<i>Zingiber officinale</i>	MS, 1 mg 2,4-D	361,77 µM
(Golkar, Taghizadeh, & Yousefian, 2019)			
(Danaee, Farzinebrahimi, Kadir, Sinniah, & Mohamad, 2015)	<i>Polygonum multiflorum</i>	MS, 3% sacarosa, 1mg/L de 2,4-D, 0.5 mg/L de BAP y 0.5 mg/L BAP, 0.5 mg/L Kinetina, 0.8% Agar	100 µM
(Sharifi, Nematzadeh, Omran, Ghavami, & Ebrahimzadeh, 2020)	<i>Rumex vesicarius</i>	MS, 3% sucrosa, 0.5 mg/L IBA, 0,02 mM ácido cítrico	200 µM

(Nadeem, Ahmed, Zahir, Hano, & Abbasi, 2018)	<i>Carthamus tinctorius</i>	MS, 8 g/L agar, 100 mg/L mioinositol, 30 g/L sucrosa, 2 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L Kinetina	100 mg/L
(Gadzovska, 2015)	<i>Phyllanthus pulcher</i>	MS, 3% sucrosa, 4% agar, 1 mg/L 2,4-D	144 μ M
(Mendoza, Cuaspud, Arias, Ruiz, & Arias, 2018)	<i>Ruta graveolens</i>	MS, 3 mg/L ANA, 3% sacarosa, 0,8% agar	0,5 mg/ml
(Saba Samadi, 2020)	<i>Linum ussitatissimum</i>	MS, 1 mg/L ANA, 3% sacarosa, 0.8% agar	50 μ M

Efecto del ácido salicílico sobre la producción de Fenoles Totales en cultivos de callo *in vitro*

Mediante Espectrofotometría UV-Visible se han determinado las concentraciones de Fenoles Totales en muestras sometidas a elicitación con ácido salicílico. Todos los artículos extraídos utilizaron la técnica de óxido-reducción de Folin-Ciocalteu expresados como miligramos de fenoles equivalentes a ácido gálico (EAG) por gramos de peso de callo seco (PS). Las concentraciones de Fenoles Totales de las 16 especies se indica en la Tabla 18.

Tabla 18

Concentración de Fenoles Totales en muestras de callo seco elicidadas con ácido salicílico

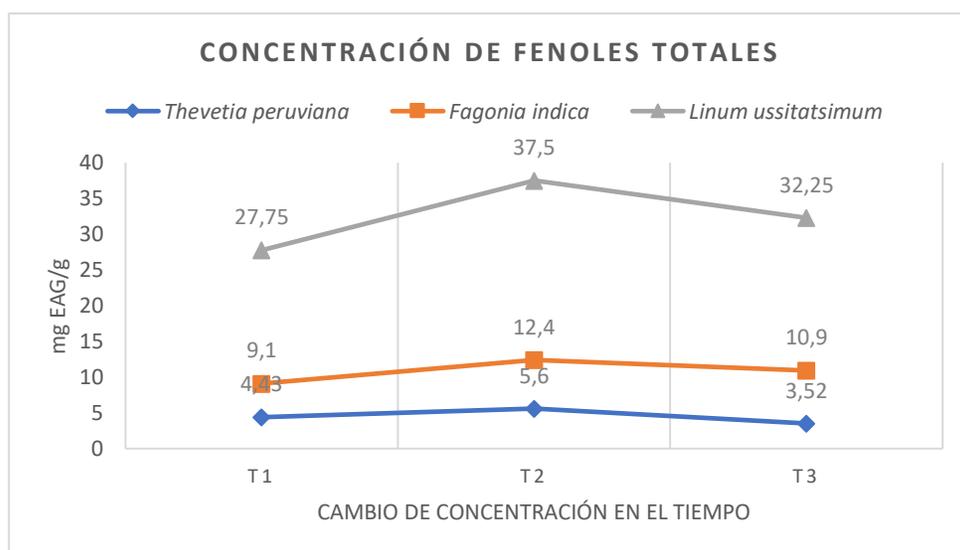
Fuente	Especie	[Ácido Salicílico]	Concentración de Fenoles Totales		Razón de aumento
			Control	Con Elicitor	
(Gadzovska, 2015)	<i>Hypericum perforatum</i>	50 μ M	0,8 mg/g PS	1,5 mg/g PS	1,875
(Mendoza, Cuaspud, Arias, Ruiz, & Arias, 2018)	<i>Thevetia peruviana</i>	300 μ M	3,91 mg EAG/g PS	5,60 mg EAG/g PS	1,432
(Saba Samadi, 2020)	<i>Stevia rebaudiana</i>	200 μ M	0,518 mg/g PS	0,65 mg/g PS	1,255
(Xu, Zhan, & Huang, 2015)	<i>Vitis vinifera</i>	100 μ M	362,79 mg EAG/g PS	415,38 mg EAG/g PS	1,145

Fuente	Especie	[Ácido Salicílico]	Concentración de Fenoles Totales		Razón de aumento
			Control	Con Elicitor	
(Haider Abbasi, Ullah, Nadeem, Tugmunnithym, & Hano, 2020)	<i>Ajuga integrifolia</i>	150 µM	10,21 mg/g PS	11,14 mg/g PS	1,091
(Sarmadi, Karimi, Palazón, Ghassempour, & Mirjalili, 2018)	<i>Taxus baccata</i>	5 µM	45,43 mg EAG/g PS	49,71 mg EAG/g PS	1,006
(Sarmadi, 2018)	<i>Momordica dioica</i>	100 µM	12,52 mg EAG/g PS	14,26 mg EAG/g PS	1,139
(Chung, Rekha, & Thiruvengadam, 2017)	<i>Fagonia indica</i>	20 µM	10,5 mg EAG/g PS	12,4 mg EAG/g PS	1,264
(Khan, Khan, Hano, & Abbasi, 2019)	<i>Zingiber officinale Rosc.</i>	361,77 µM	33,33 mg EAG/g	44,67 mg EAG/g	1,340
(Thiruvengadam, Rekha, Rajakumar, Lee, & Kim, 2016)	<i>Polygonum multiflorum</i>	100 µM	6,04 mg EAG/g PS	12,19 mg EAG/g PS	2,018
(Sayed, Khodary, Ahmed, Hammouda, & Hassan, 2017)	<i>Carthamus tinctorius</i>	100 mg/L	14,87 mg EAG/g PS	26,67 mg EAG/g PS	1,794
(Golkar, Taghizadeh, & Yousefian, 2019)	<i>Phyllanthus pulcher</i>	144 µM	1,360 mg EAG/g PS	2,554 mg EAG/g PS	1,878
(Danaee, Farzinebrahimi, Kadir, Sinniah, & Mohamad, 2015)	<i>Ruta graveolens</i>	0,5 mg/mL	21,15 mg EAG/g PS	225,32 mg EAG/g PS	10,653
(Sharifi, Nematzadeh, Omran, Ghavami, & Ebrahimzadeh, 2020)	<i>Linum ussitatsimum</i>	50 µM	21 mg EAG/g PS	37,5 mg EAG/g PS	1,786
(Nadeem, Ahmed, Zahir, Hano, & Abbasi, 2018)					

Se determinó que la mayor concentración de Fenoles Totales fue de 415,38 mg EAG/g PS siendo 1,145 veces mayor que las muestras de control para la especie *Vitis vinifera* y 225,32 mg EAG/g PS para la especie *Ruta graveolens*. Mediante la elicitación con ácido salicílico se obtuvo un aumento promedio de 1,463 veces el contenido de Fenoles Totales en comparación con las muestras no tratadas. Se dedujo que la mayor producción fue obtenida por Sharifi et al. (2019), se investigó el efecto de ácido salicílico sobre el contenido de Fenoles y Flavonoides Totales en callo de la especie *Ruta graveolens*. Los autores aplicaron 0,5 mg/mL de ácido salicílico y obtuvieron un aumento de 10,653 veces el contenido de Fenoles Totales. Mientras que la especie *Taxus baccata* mostró el menor cambio en la producción Fenoles Totales con un aumento de 1,006 veces.

Figura 22

Cambios de la concentración de Fenoles en el tiempo



Mendoza et al. (2018), Khan et al. (2019) y Nadeem (2018) evaluaron el efecto del ácido salicílico en el tiempo. Se definió que las muestras alcanzan un pico de concentración y luego disminuyen en el tiempo hasta acercarse a los valores del control, como se indica en la Figura 22.

Efecto del ácido salicílico sobre la producción de Flavonoides Totales en cultivos de callo *in vitro*

La cuantificación de Flavonoides Totales se la realizó mediante espectrofotometría ultravioleta, basándose en el método colorimétrico de Cloruro de Aluminio ($AlCl_3$) y usando soluciones estándar de Quercetina (n=7), Rutina (n=2) y Catequina (n=1). Los resultados se expresaron como miligramos Equivalentes de Quercetina (EQE), Rutina (ERU) y Catequina (ECA) por gramos de peso seco (PS), como se indica en la Tabla 19.

Tabla 19

Concentración de Flavonoides Totales en muestras de callo seco elicitadas con ácido salicílico

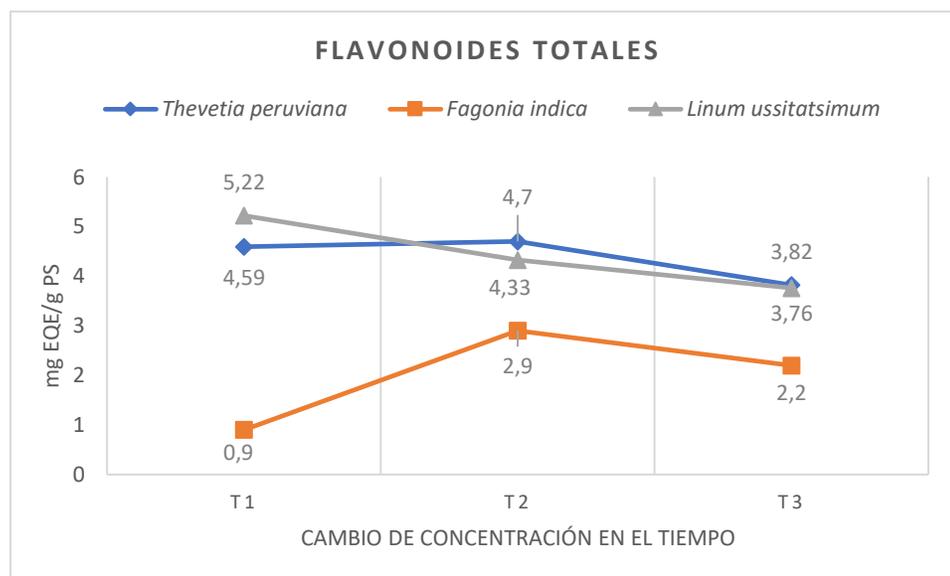
Fuente	Especie	[Ácido Salicílico]	Concentración de Flavonoides Totales		Razón de aumento
			Sin Elicitor	Con Elicitor	
(Gadzovska, 2015)	<i>Hypericum perforatum</i>	50 μ M	0,167 mol/g PS	0,83 mol/g PS	4,970
(Mendoza, Cuaspud, Arias, Ruiz, & Arias, 2018)	<i>Thevetia peruviana</i>	300 μ M	2,94 mg EQE/g PS	4,70 mg EQE/g PS	1,599
(Saba Samadi, 2020)	<i>Stevia rebaudiana</i>	200 μ M	0,2 mg/g PS	0,325 mg/g PS	1,625
(Xu, Zhan, & Huang, 2015)	<i>Vitis vinifera</i>	100 μ M	36 mg ECA/g PS	53,33 mg ECA/g PS	1,481
(Haider Abbasi, Ullah, Nadeem, Tugmunnithym, & Hano, 2020)	<i>Ajuga integrifolia</i>	150 μ M	1,33 mg EQE/g PS	1,79 mg EQE/g PS	1,346

Fuente	Especie	[Ácido Salicílico]	Concentración de Flavonoides Totales		Razón de aumento
			Sin Elicitor	Con Elicitor	
(Sarmadi, Karimi, Palazón, Ghassempour, & Mirjalili, 2018)	<i>Taxus baccata</i>	5 µM	16,71 mg ERU/g PS	17,79 mg EAG/g PS	1,065
(Sarmadi, 2018)	<i>Momordica dioica</i>	100 µM	1,8 mg EQE/g PS	2,275 mg EQE/g PS	1,264
(Chung, Rekha, & Thiruvengadam, 2017)	<i>Fagonia indica</i>	20 µM	2 mg EQE/g PS	2,9 mg EQE/g PS	1,450
(Khan, Khan, Hano, & Abbasi, 2019)	<i>Polygonum multiflorum</i>	100 µM	0,069 mg EQE/g PS	0,143 mg EQE/g PS	2,072
(Thiruvengadam, Rekha, Rajakumar, Lee, & Kim, 2016)	<i>Rumex vesicarius</i>	200 µM	12,6 mg EQE/g PS	18,8 mg EQE/g PS	1,492
(Sayed, Khodary, Ahmed, Hammouda, & Hassan, 2017)	<i>Carthamus tinctorius</i>	100 mg/L	1,34 mg ERU/g PF	3,54 mg ERU/g PF	2,642
(Golzar, Taghizadeh, & Yousefian, 2019)	<i>Phyllanthus pulcher</i>	144 µM	2,335 mg ERU/g	4,824 mg ERU/g PS	2,066
(Danaee, Farzinebrahimi, Kadir, Sinniah, & Mohamad, 2015)	<i>Ruta graveolens</i>	0,5 mg/ml	23,75 mg EQE/g PS	8,32 mg EQE/g PS	0,350
(Sharifi, Nematzadeh, Omran, Ghavami, & Ebrahimzadeh, 2020)	<i>Linum ussitatissimum</i>	50 µM	3,84 mg EQE/g PS	5,22 mg EQE/g PS	1,359
(Nadeem, Ahmed, Zahir, Hano, & Abbasi, 2018)					

La mayor concentración de flavonoides luego de la elicitación se encontró en la especie *Vitis vinifera* con 53,33 mg ECA/g PS y la especie *Rumex vesicarius* con 18,8 mg EQE/g PS. Además, se obtuvo un aumento promedio de 1,524 veces la concentración de Flavonoides, siendo las especies *Hypericum perforatum* y *Carthamus tinctorius* las que mostraron un mayor aumento con 4,97 y 2,64, respectivamente (Tabla 19).

Figura 23

Cambios en la concentración de Flavonoides en el tiempo



Mendoza et al. (2018), Khan et al. (2019) y Nadeem (2018) observaron un comportamiento con un pico de concentración después de la aplicación de ácido salicílico. Finalmente, la concentración de Flavonoides disminuyó en el tiempo (Figura 23).

Efecto de Elicitores sobre la producción de cafeína en cultivos de callo *in vitro*

Los resultados del análisis indicaron que no existen investigaciones relacionadas al aumento de contenido *in vitro* de cafeína en el género *Ilex* y familia Aquifoliaceae. Kumar y Giridhar (2015) investigaron el papel de las N-metiltransferasas (NMT) en la biosíntesis de cafeína y notaron que la aplicación exógena de ácido salicílico (50 μ M) en semillas de *Coffea canephora* sobreexpresaron las transcripciones de NMT. Se observó un aumento del contenido de teobromina y cafeína con 0,42 mg/g (1,14 veces más que el control) y 18,57 mg/g (1,42 veces más que el control) de muestra seca (PS), respectivamente (Tabla 20). En

estudios previos, se determinó que en hojas jóvenes tratadas con ácido salicílico existió una fuerte correlación entre el contenido de cafeína y el estado de expresión de los genes NMT (Kumar, Simmi, & Ravishankar, 2012). A su vez Kumar y Giridhar (2015) determinaron una disminución del contenido de 7-Metilxantina de 0,13 a 0,09 mg/g PS y Teofilina de 0,2 a 0,19 mg/g PS.

Tabla 20

Estimación de metilxantinas en tejido de endospermo en tratamiento con 50 μ M de ácido salicílico en la especie Coffea canephora

Principio Activo	Concentración (mg/g PS)		Razón de aumento
	Control	Ácido Salicílico	
7-Metilxantina	0,13	0,09	0,69
Teobromina	0,37	0,42	1,14
Teofilina	0,2	0,19	0,95
Cafeína	13,06	18,57	1,42

Capítulo 5: Discusión

El género *Ilex* es el más representativo de la familia Aquifoliaceae que incluye alrededor de 600 especies. Las características fitoquímicas y morfológicas han permitido la utilización de más de 40 especies en la industria maderera, alimentaria y farmacéutica. Por consiguiente, se han realizado estudios sobre la filogenia molecular y la quimiotaxonomía con el fin de facilitar la explotación de los recursos botánicos farmacéuticos y la propagación de las especies (Manem, Barrera, Loizeau, & Naciri, 2010). Se ha definido que la capacidad de cada especie vegetal para producir metabolitos secundarios está relacionada con susceptibilidad a varios tipos de estrés y a los herbívoros (Hussain, y otros, 2019).

En este proyecto, se analizó el efecto de distintas concentraciones de fitorreguladores y a la elicitación con ácido salicílico, en la inducción de calogénesis *in vitro* a partir de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes). A su vez, se proporcionó una perspectiva sobre las concentraciones de cafeína, fenoles y flavonoides totales obtenidas por cultivo de tejidos vegetales en presencia o ausencia de elicitores.

Desinfección de hojas de Guayusa (*Ilex guayusa* Loes)

Mediante la aplicación del tratamiento fitosanitario y el protocolo de desinfección de explantes se logró reducir la contaminación a un porcentaje menor del 15% a partir de la cuarta introducción de los explantes. Según Yahia, Jones y Thomas (2011) los sistemas de control fitosanitarios deben ser: claramente definidos, eficaces y sujetos a control. Así mismo, es necesario integrar tratamientos basados en diferentes mecanismos de acción formulados con

plaguicidas de nueva generación para reducir el riesgo de contaminación a niveles aceptablemente bajos (Hallman, 2017).

La aplicación de detergente, fungicida e hipoclorito de sodio fue el enfoque preliminar para la desinfección de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) según lo informado por Pico (2017). Tras la aplicación de detergente al 2% p/v, fungicida 0,5% v/v e hipoclorito de sodio 3% v/v se evidenció que no existe diferencia significativa en cada proceso de introducción de explantes con un valor $p=0,0577$ ($p > 0,05$). Por consiguiente, el protocolo de desinfección fue reproducible y puede ser usado en próximas investigaciones en *Ilex guayusa*. En un estudio similar para la esterilización de brotes de *Ilex paraguariensis* se utilizó soluciones de detergente, fungicida Captan® 0,5%, etanol 70% e hipoclorito de sodio al 2% obteniendo un porcentaje de contaminación menor al 15% (Ross, Arriaga, & Pechi, 2017). Según Gantait (2018) y Kundu et al. (2018) el éxito de un estudio de tejidos *in vitro* no solo depende de la práctica de esterilización de las superficies vegetales. Los autores definen que la selección de la planta madre y recolección apropiada de explantes resulta de vital importancia. Así mismo, se definen tres parámetros clave de esterilización: la categoría de desinfectante, sus niveles y el tiempo de exposición al desinfectante.

El rápido pardeamiento de los explantes, junto con la contaminación, son los problemas más importantes durante el establecimiento del cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos a los 21 días de cultivo mostraron un porcentaje de oxidación del 35% y 13% para los explantes en medio de cultivo MS y ¼ MS, respectivamente. Además, se evidenció un alto porcentaje de oxidación en explantes que presentaban niveles similares de contaminación en el medio de cultivo (Tabla 6). Roussos y Pontikis (2001) han atribuido este evento a la oxidación de compuestos fenólicos internos por enzimas oxidativas para producir quinonas reactivas, dando

como resultado la muerte del explante. Este contenido interno de compuestos fenólicos, está influenciado por factores ambientales, como la intensidad de luz, temperatura, patógenos y humedad (Verger, 1997). Según Tabiyeh et al. (2006) los principales causantes del proceso de oxidación son los agentes desinfectantes utilizados durante el protocolo de desinfección. Sin embargo, en este estudio se observó niveles bajos de oxidación en explantes con contaminación menores al 10%.

Inducción a callogénesis *in vitro* de explantes de guayusa (*Ilex guayusa* Loes)

Las auxinas y citoquininas son las sustancias más importantes para regular el crecimiento y morfogénesis en cultivos de órganos y tejidos vegetales (George, 2008). Se ha definido que los explantes de hoja poseen la capacidad de adaptarse a condiciones *in vitro* y sufrir activamente cuando se complementan con reguladores de crecimiento exógenos (Byamukama, Namukobe, & Kiremire, 2009). En el presente estudio se evaluó la inducción a callogénesis *in vitro* de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) de 7 meses utilizando varias concentraciones de Zeatina (citoquinina), 2,4-D y ANA (auxinas). Los resultados después de 75 días de cultivo indicaron la proliferación de callo en tres tratamientos cultivados en medio de cultivo MS: CG2 (16 explantes), CG4 (4 explantes) y CG5 (34 explantes). Grunennvaldt (2018) evaluó la proliferación de callo *in vitro* de hojas de Mate (*Ilex paraguariensis*) cultivada en $\frac{1}{4}$ MS con 1 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de Zeatina obteniendo como resultado un 77% de inducción después de 120 días de cultivo. Además, definió la fase de crecimiento exponencial del callo en el periodo de 15 a 75 días de cultivo. Por otro lado, en este estudio el tratamiento CG5, el cual consistió de 1 mg/L de Zeatina y 4 mg/L de ANA, presentó el número más alto de explantes con presencia de callo y una tasa de inducción de callo del 62,96% a los 75 días de cultivo.

Kandasamy et al. (2001) informaron la importancia genotípica del explante en el desarrollo de callos y definen que se requiere la expresión de genes específicos (ACT7) para responder rápidamente a los reguladores de crecimiento y generar una respuesta morfológica.

Se ha demostrado que el tipo de medio, la concentración y combinación de reguladores de crecimiento de las plantas, temperatura, luz, pH, fuente de carbono, entre otros factores físicos y químicos, afectaron directamente en la inducción de callos y esta variabilidad de necesidades resultaron ser extremadamente variables, dependiendo del contenido endógeno de cada especie (Pierik, 1990; Wang J. , Li, Li, & Liu, 2017), esto pudo evidenciarse en el presente trabajo.

Mediante el análisis Post-hoc se examinó los datos de inducción a callogénesis *in vitro* a los 75 días de cultivo de los explantes. Se encontró las relaciones específicas entre los tratamientos frente a la exposición a fitorreguladores. Para los explantes en medio MS, se identificó la igualdad de las varianzas ($p > 0,05$) y se definió que la dosificación de fitorreguladores fue la adecuada con un $R^2=2,1\%$ de variabilidad de los datos. En este estudio se mostró que la concentración de sales del medio de cultivo y la concentración de auxinas y citoquininas tienen efectos significativos sobre la inducción y proliferación de callo en *Ilex guayusa* Loes. Varios autores han demostrado que el uso de Zeatina en concentraciones de 0,5 a 1 mg/L ha sido más efectiva para la producción de callo en combinación con 2,4-D y ANA a un rango de concentraciones entre 1 a 5 mg/L (Grunennvaldt, 2018; Bonfill, Cusidó, Palazón, Piñol, & Morales, 2002; Liu & Saxena, 2009) que actuando en forma individual (Quoirin, Bittencourt, Zanette, & Oliveira, 1998). Análogamente, Dunlap et al. (1986) demostraron que la reducción de sales del medio de cultivo no influye en la pérdida de concentración en el tiempo de 2,4-D y ANA.

A los 75 días de cultivo de los explantes se observó cambios morfológicos en el callo, presentando una tonalidad amarillo pálida (RGB: 255, 255, 153) y consistencia compacta. Varios estudios han informado la producción de callo compacto y amarillento en medios suplementados con ANA y 2,4-D a distintas concentraciones. A su vez, sugieren que estos reguladores poseen un efecto inhibitor sobre la formación de clorofila y la coloración amarilla se la atribuye a la producción de metabolitos secundarios, específicamente antraquinonas (Paneque, Vega, Pupo, Reyes, & Leonardo, 2003; Rodríguez, Iatsague, Chacón, & Astorga, 2014; Zhang, Liu, Sheng, Ma, & Wu, 2011).

Los resultados a los 75 días de cultivo indican la formación de raíces adventicias en medios de cultivo ¼ MS suplementado con 0,5 mg/L de Zeatina y 2 mg/L de ANA. Análogamente, la prueba de ANOVA para los tratamientos en medio de cultivo ¼ MS mostraron una mayor variabilidad de los datos ($R^2= 9,1\%$) y no existieron razones para decir que las varianzas sean iguales. Resultados similares fueron reportados por Zhang et al. (2020) en los que altas concentraciones de ANA (0,5 - 2 mg/L) inducen tanto la producción de callo como de raíces adventicias en medios con una reducción de las sales del medio MS.

Efecto del Ácido Salicílico en la inducción a callogénesis *in vitro*

Generalmente, el suministro exógeno de elicitores químicos, como el ácido salicílico, a diferentes sistemas de cultivo *in vitro* imita el entorno externo similar a las condiciones naturales relacionados con el estrés en las plantas. En este proyecto se utilizó 0,02 mg/L de ácido salicílico en medio de cultivo MS con 4 mg/L de ANA y 1 mg/L de Zeatina. A los 45 días de cultivo, se observó un incremento en la producción del callo en el medio de cultivo CG5 con ácido salicílico (35 explantes en fase de proliferación de callo) en comparación con el

tratamiento CG5 sin elicitador (29 explantes). Al finalizar el análisis se obtuvo un porcentaje de formación de callo del 87% (47 explantes), siendo mayor en comparación con el medio de cultivo sin suplementación con ácido salicílico (62,96%). Este aumento de producción de callo ha sido similar al estudio realizado por Singh et al. (2017), quienes, mediante la aplicación de ácido salicílico, obtuvieron una producción de callo 7,4 mayor en comparación con los grupos de control. De forma similar, Chung et al. (2017) determinaron un aumento significativo en la producción de callo y compuestos bioactivos tras la suplementación con ácido salicílico.

En este estudio se observó un cambio de coloración a los 75 días de cultivo de los callos, tomando una tonalidad de Marrón Oscuro (RGB: 84, 56, 34). Azofeifa (2008) y Tabiyeh et al. (2006) relacionan el oscurecimiento de los explantes a un incremento en la producción de sustancias fenólicas complejas, oxidándose hasta generar quinonas. Además, se ha definido que los elicitores no solo mejoran el rendimiento de las biomoléculas existentes (cambios cuantitativos) sino que también alteran o sintetizan metabolitos secundarios de forma cualitativa (Caretto, Quarta, Durante, Nisi, & De Paolis, 2011; Murthy, Lee, & Paek, 2014; Ramirez, Vidal, Moyano, & Golenioswki, 2016).

Análisis sobre la producción de principios activos en callo *in vitro* influenciado por ácido salicílico como elicitador

Los metabolitos vegetales se pueden aislar de forma natural, pero su producción queda restringida a las limitaciones ambientales y regionales. El cultivo de tejidos vegetales debido a sus diversos beneficios se ha utilizado como una de las principales plataformas para la producción de metabolitos secundarios (Yue, Ming, Lin, Tahman, & Zheng, 2016). En el presente análisis se utilizaron 16 artículos científicos que utilizaron el cultivo de callos con el objetivo de

evaluar la producción de principios activos bajo la influencia del ácido salicílico como elicitador. Se ha informado que para la producción de metabolitos secundarios se utilizan estructuras organizadas como brotes, callos, raíces, suspensiones celulares, entre otras. Siendo la inducción de callo el método más utilizado comercialmente para la fabricación de compuestos con importancia terapéutica (Efferth, 2019).

Kumar (2015) definió que se requieren concentraciones bajas (0,5 a 5 μM) de elicitores bióticos como ácido salicílico o metil jasmonato para mejorar la producción de metabolitos utilizando cultivos *in vitro*. Conjuntamente, Giri y Zaheer (2016) revelaron que la concentración de ácido salicílico usada en estudios que involucran sistemas de cultivo de tejidos y células vegetales *in vitro* variaba desde 5 μM hasta 500 μM , siendo los 100 μM la concentración más usada. Como se indica en la Tabla 18, se evidenció que la concentración de ácido salicílico se mantuvo en un rango de 5 μM a 500 mg/L y fue diferente para cada especie. Según Efferth (2019) las condiciones de laboratorio para mantener los cultivos de callo e inducir alguna respuesta morfológica varían de una especie a otra, y se elabora en cada caso individualmente.

Teniendo en cuenta muchos hallazgos de investigación y la importancia de la cuantificación de principios activos de especies con importancia comercial o terapéutica, se obtuvo que en los 16 artículos analizados predominó el método de Espectrofotometría Ultravioleta-Visible, basándose en la medición del cambio de absorbancia como una función de tiempo (cinética) (Qarah, Basavaiah, & Abdulrahman, 2017). El ensayo con Folin-Ciocalteu y la reacción colorimétrica con tricloruro de aluminio (AlCl_3) continúa siendo ampliamente utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides en matrices y extractos vegetales, pero carece de especificidad. Según Muñoz et al. (2017) el ensayo puede verse afectado por interacciones con otras moléculas interferentes como azúcares (fructosa y sacarosa), ácido

ascórbico, aminas aromáticas, dióxido de azufre, entre otros compuestos orgánicos que se encuentran en los medios de extracción, por lo que requieren un control de todas las variables experimentales involucradas. Prior et al. (2005) afirma que las características que deben considerarse para estandarizar un ensayo incluyen: el rango analítico, la recuperación, repetibilidad, reproducibilidad y reconocimiento de compuestos interferentes.

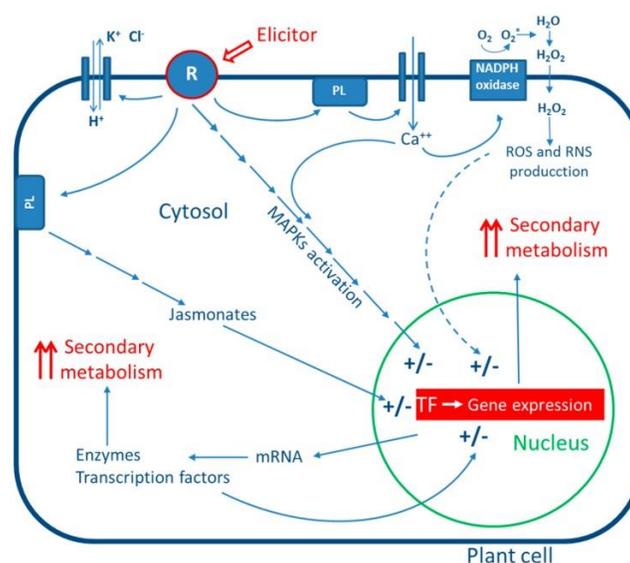
Halliwell (2015) y Granato et al. (2018) afirman que un antioxidante es una sustancia que, inhibe la oxidación de un sustrato oxidable cuando se encuentra presente en una baja concentración en el medio. Los compuestos fenólicos derivados del metabolismo secundario de las plantas, protegen a múltiples órganos de la oxidación y neutralizan la acción deletérea de especies reactivas en membranas celulares. En el presente análisis se evidenció que los cultivos de células vegetales representan un modelo conveniente para estudiar la regulación de la amplia gama de mecanismos secundarios de las plantas relacionados a la acumulación de metabolitos secundarios.

Mediante la aplicación de ácido salicílico se obtuvo un aumento de la concentración de fenoles y flavonoides totales en 1,463 y 1,524 veces en comparación con las muestras sin presencia del inductor. En el estudio realizado por Sharifi et al. (2020) en muestras de callo *in vitro* de *Ruta graveolens*, se informó que 0,5 mg/ml de ácido salicílico aplicado al medio de cultivo (Tabla 20) aumentó la concentración de fenoles totales de 21,15 mg EAG/g PS a 225,32 mg EAG/g PS. De manera similar, Golkar et al. (2019) determinaron que tras la aplicación de 100 mg/L de ácido salicílico, aumentó en 2,64 veces el contenido de Flavonoides totales de callo *in vitro* de *Carthamus tinctorius* en comparación con las muestras de control. Ferrari (2010) sostiene que la percepción de un elicitador por su receptor desencadena eventos de fosforilación y desfosforilación de la membrana plasmática y proteínas citosólicas, flujos iónicos,

despolarización de la membrana, acidificación citoplasmática y alcalinización extracelular. Posteriormente, la activación de NADPH oxidasas y peroxidasas apoplásicas conduce a la acumulación transitoria de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS), que inicia la producción de moléculas de señalización específicas de defensa (etileno, ácido salicílico y jasmonato) y producción de metabolitos secundarios (Figura 24) (Ramirez, Vidal, Moyano, & Golenioswki, 2016; Ferrari, 2010; Zhang, Liu, Sheng, Ma, & Wu, 2011).

Figura 24

Representación esquemática de la posible respuesta celular frente a un elicitor



Nota. R: receptor; PL: fosfolipasa; MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos; ROS: especies reactivas de oxígeno; RNS: especies de nitrógeno reactivo; TF: factores de transcripción.

Fuente: (Ramirez, Vidal, Moyano, & Golenioswki, 2016)

Los estudios realizados por Kumar y Giridhar (2015) en *Coffea canephora* revelaron que la regulación transcripcional fue uno de los principales pasos reguladores en la acumulación biológica de cafeína, teofilina, teobromina y 7-Metilxantina. Mediante la aplicación exógena de

ácido salicílico (50 μ M) en medio hidropónico, aumentó el contenido neto de Cafeína de 13,06 mg/g PS a 18,57 mg/g PS y Teobromina de 0,37 mg/g PS a 0,42 mg/g PS. Por otro lado, se produjo una disminución no significativa de 7-Metilxantina. Los autores relacionan el aumento de Cafeína y Teobromina (sin cambio significativo de Teofilina) con una mayor actividad biosintética en respuesta al elicitor. Además, sostienen que dosis altas de ácido salicílico pueden tener un efecto adverso sobre la maquinaria transcripcional de los tejidos y generar una regulación postranscripcional que mantiene los niveles de cafeína bajo control.

Capítulo 6: Conclusiones

- Mediante la combinación del tratamiento fitosanitario (ácido giberélico 3mg/L, bioestimulante Germo-BR02® 0,1% y fungicida Mancozeb® 2,5%) y el protocolo de desinfección (detergente 2%, fungicida SKULL® 0,5% e hipoclorito de sodio 3%) se logró mantener la contaminación y oxidación de los explantes a un porcentaje menor del 15%.
- Se definieron las concentraciones de fitorreguladores necesarios para la inducción a callogénesis *in vitro*. A los 75 días de cultivo, se determinó que el tratamiento CG5 (1 mg/L de Zeatina y 4 mg/L de ANA) presentó la mayor cantidad de explantes en fase de proliferación de callo (34 explantes en comparación con el resto de tratamientos).
- El análisis estadístico experimental Post-hoc determinó que los tratamientos en medio de cultivo MS presentaban varianzas iguales y se definió que la variabilidad de cada tratamiento es igual, es decir, la dosificación de fitorreguladores fue la adecuada.
- La aplicación de 0,02 mg/L de ácido salicílico al medio de cultivo aumentó la cantidad de explantes en fase de proliferación de callo después de los 75 días de cultivo (47 explantes).
- Con la aplicación de diferentes concentraciones de ácido salicílico *in vitro*, se determinó un aumento promedio de la concentración de Fenoles Totales en 1,463 veces, Flavonoides Totales en 1,524 veces y Cafeína en 1,42 veces en comparación con los ensayos de control.

Capítulo 7: Recomendaciones

- Analizar los principios activos en hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) *in vivo* previo a la elección de la planta madre.
- Ampliar estudios acerca de la respuesta de los explantes a diferentes dosis de ácido salicílico aplicado en el medio de cultivo.
- Establecer las suspensiones celulares de explantes de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) con la finalidad de examinar otras formas de aplicación de ácido salicílico como elicitador.
- Se debe continuar con el análisis de principios activos en callo *in vitro* de guayusa (*Ilex guayusa* Loes).

Capítulo 8: Bibliografía

- Adamowski, M., & Friml, J. (2015). PIN-dependent auxin transport: Action, regulation, and evolution. *Plant Cell*, 27(1), 20-32.
- Almudena, G., Nieves, B., Benítez, A., Stinco, C., & Meléndez, A. (2017). Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Aloni, R. (2001). Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22-34.
- Aremu, A., Bairu, M., Szűčová, L., Finnie, J., & Van Staden, J. (15 de 10 de 2012). The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated 'Williams' bananas. *Journal of Plant Physiology*, 169(15), 1530-1541.
- Auer, C. (2002). Discoveries and dilemmas concerning cytokinin metabolism. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(1), 24-31.
- Azofeifa, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 153-156.
- Babu, P., & Liu, D. (2009). Flavonoids and Cardiovascular Health. En P. Babu, & D. Liu, *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population* (págs. 371-392). Elsevier Inc.
- Blagoeva, E., Dobrev, P., Malbeck, J., Motyka, V., Gaudinová, A., & Vaňková, R. (9 de 2004). Effect of exogenous cytokinins, auxins and adenine on cytokinin N-glycosylation and

- cytokinin oxidase/dehydrogenase activity in de-rooted radish seedlings. *Plant Growth Regulation*, 44(1), 15-23.
- Bonfill, M., Cusidó, R., Palazón, J., Piñol, M., & Morales, C. (2002). Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73-78.
- Bonga, J., & von Aderkas, P. (1992). Media preparation. En J. Bonga, & P. von Aderkas, *In vitro Culture of Trees* (págs. 12-54).
- Buckley, P., & Reed, B. (1994). Antibiotic Susceptibility of Plant-Associated Bacteria. *Hort Science*, 434c-434.
- Butnariu, M., & Coradini, C. (1999). Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. *Chemistry central journal*, 35-47.
- Byamukama, R., Namukobe, J., & Kiremire, B. (2009). Anthocyanins from leaf stalks of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 20-25.
- Cadena, S., Tramontin, D., Cruz, A., Bella, R., & Muller, J. (2019). Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. *Journal of Supercritical Fluids*.
- Çakırer, O., Kılıç, E. A., & Kenar, A. (1999). The non-aqueous titrimetric assay of the selected anti-inflammatory agents using tetra-n-butylammonium hydroxide as titrant. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 19-26.
- Calva, J., & Perez, G. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. Vol. 6, 11.

- Caretto, S., Quarta, A., Durante, M., Nisi, R., & De Paolis, A. (2011). Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures. *Plant Biology*, 51-58.
- Catalán, Ú., Barrubés, L., Valls, R., Solà, R., & Rubió, L. (1 de 8 de 2017). In vitro Metabolomic Approaches to Investigating the Potential Biological Effects of Phenolic Compounds: An Update. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 15(4), 236-245. Beijing Genomics Institute.
- Chung, I., Rekha, K. R., & Thiruvengadam, M. (2017). Jasmonic and salicylic acid enhanced phytochemical production and biological activities in cell suspension cultures of spine gourd (*Momordica dioica* roxb). *Acta Biológica Hungárica*, 88-100.
- CIDIA. (1987). *Memoria: Curso de Cultivo de Tejidos*. Turrialba: IICA.
- Collahuazo, P. (4 de 03 de 2012). *Chankuap*. Obtenido de <http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/4.-Plan-de-Manejo-Guayusa-Wapu.pdf>
- Cuénoud, P., Martinez, M., Loizeau, P., Spichiger, R., Andrews, S., & Manen, J. (2000). Molecular phylogeny and biogeography of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae). *Annals of Botany*, 111-122.
- Dai, J., & Mumper, J. (2010). Plant Phenolics Extraction. *Molecules*, 7313-7352.
- Danaee, M., Farzinebrahimi, R., Kadir, M., Sinniah, U., & Mohamad, R. (2015). Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. *Revista Brasileira de Botanica*, 265-272.

- De Caro, C., & Haller, C. (2015). UV/VIS spectrophotometry-fundamentals and applications. *Mettler-Toledo Internacional*.
- Dobránszki, J., & Mandler-Drienyovszki, N. (15 de 10 de 2014). Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *Journal of Plant Physiology*, 171(16), 1472-1478.
- Dobránszky, J., Hudák, I., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Galli, Z., & Kiss, E. (16 de 3 de 2004). Effects of different cytokinins on the shoot regeneration from apple leaves of 'Royal Gala' and 'M.26'. *International Journal of Horticultural Science*, 10(1), 69-75.
- Dueñas, J., Jarrett, C. C., & Logan-Hines, E. (2016). *Amazonian Guayusa (Ilex guayusa Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview*. Urcuquí: Economic Botany.
- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 50-59.
- Fabela, E., Preciado, P., & Benavides, A. (2006). *Manual para la preparación de soluciones nutritivas*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/305280176_Manual_para_la_preparacion_de_soluciones_nutritivas
- Ferrari, S. (2010). Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceuticals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 152-166.
- Filová, A. (2014). Production of secondary metabolites. *Journal of Plant Physiology*, 236-246.
- Fuentes, L., Mesa, A., Ruiz, M., Peláez, M., & Fernández, M. (2005). Estudio Histológico en callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. *Pastos y Forrajes*, 199-208.

- Fundación Chankuap. (2006). *Línea de base y monitoreo de Ilex guayusa en el valle del Upano*. Macas.
- Fundación Chankuap. (Marzo de 2014). *El Aprovechamiento de la Guayusa: Manual de Buenas Prácticas de Recolección para la Cosecha de Hojas*. Obtenido de Chankuap.org: <http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/Manual-de-buenas-practicas-de-la-Guayusa.pdf>
- Gamborg, O., Murashige, T., Thorpe, T., & Vasil, I. (7 de 1976). Plant tissue culture media. *In Vitro*, 12(7), 473-478.
- Gantait, S., & Panigrahi, J. (1 de 12 de 2018). In vitro biotechnological advancements in Malabar nut (*Adhatoda vasica* Nees): Achievements, status and prospects. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 545-552. Academy of Scientific Research and Technology.
- Gantait, S., Kundu, S., & Das, P. (1 de 4 de 2018). Acacia: An exclusive survey on in vitro propagation. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 163-177. King Saud University.
- García, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia. Segunda Edición*. Bogotá: Editores Tercer Mundo.
- Garrigues, S., Gallignani, M., & de la Guardia, M. (1993). FIA-FT-IR determination of ibuprofen in pharmaceuticals. *Talanta*, 89-93.
- George, E. (2008). *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition*. Netherland: Springer .

- Giorgi, G., Gomes, R., Henriques, J., Gato, L., Bracco, G., & Mattiazzo, G. (2020). Detecting parametric resonance in a floating oscillating water column device for wave energy conversion: Numerical simulations and validation with physical model tests. *Applied Energy*.
- Giri, C., & Zaheer, M. (2016). Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-18.
- Golkar, P., Taghizadeh, M., & Yousefian, Z. (2019). The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 575-585.
- Granato, F., Shahidi, R., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L., Hidalgo, F., & Miyashita, K. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*, 471-475.
- Grunenvaldt, R. (2018). *Production of Secondary Compounds in Ilex paraguariensis* A. St. Hill. *Callus Culture*. Curitiba: Universidad de Paraná.
- Haider Abbasi, B., Ullah, M., Nadeem, M., Tugmunnithym, D., & Hano, C. (2020). Exogenous application of salicylic acid and gibberellic acid on biomass accumulation, antioxidant and anti-inflammatory secondary metabolites production in multiple shoot culture of *Ajuga integrifolia* Buch. Ham. ex D. Don. *Industrial Crops and Products*.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine. Fifth Edition*. Oxford: Oxford University Press.

- Hallman, G. (2017). Process control in phytosanitary irradiation of fresh fruits and vegetables as model for other phytosanitary treatment processes. *Food Control*, 372-377.
- Hao, D., Gu, X., Xiao, P., Liang, Z., Xu, L., & Peng, Y. (1 de 2 de 2013). Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(1), 8-19.
- Hussain, M., Debnath, B., Qasim, M., Steve, B., Islam, W., Hameed, M., Qiu, D. (2019). Role of saponins in plant defense against specialist herbivores. *Molecules*.
- Ikawa, M., Schaper, T., Dollar, C., & Sasner, J. (2003). Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1811-1815.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 3159-3173.
- Iqbal, S., & Srivastava, P. (30 de 12 de 2000). In vitro micropropagation of *Silybum marianum* L from various explants and silybin content. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 9(2), 81-87.
- Iriawati, A., & Esyanti, R. (2014). Analysis of secondary metabolite production in somatic embryo of *Pasak Bumi* (*Eurycoma longifolia* Jack.). *Procedia Chemistry*, 112-118.
- Irvine, J., Fitch, M., & Moore, P. (6 de 1983). The induction of callus in sugareane tissue cultures by selected chemicals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2(2), 141-149.

- Kandasamy, M., Gilliland, L., McKinney, E., & Meagher, R. (2001). One Plant Actin Isovariant, ACT7, Is induced by Auxin and Required for Normal Callus Formation. *The Plant Cell*, 1541-1554.
- Kapp, M., Mendes, O., Roy, S., & Kraska, R. (2016). General and genetic toxicology of guayusa concentrate (*Ilex guayusa*). *Int J Toxicol*, 222-242.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Medicinal Plants Research*, 1222-1239.
- Khan, T., Khan, T., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2019). Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*, 525-535.
- Kumar, A. (2010). Plant genetic transformation and molecular markers. *Pointer Publisher*.
- Kumar, A., & Giridhar, P. (2015). Salicylic acid and methyljasmonate restore the transcription of caffeine biosynthetic N-methyltransferases from a transcription inhibition noticed during late endosperm maturation in coffee. *Plant Gene*, 38-44.
- Kumar, G., Simmi, P., & Ravishankar, G. (2012). Differential expression of WRKY transcriptional factors in endosperm tissues during stress and ontogeny of fruits of *Coffea canephora* with respecto to caffeine biosynthesis. *Proceedings of 24th International Conference on Coffe Science (ASIC)*, 522-526.
- L'ORÉAL. (1 de Mayo de 2017). *Para criar novos ingredientes ativo altamente eficientes, os pesquisadores da L'Oréal fazem uso da química sintética e das biotecnologias*. Obtenido de <http://www.loreal.com.br/pesquisa,-a,-inova/nossas-grandes-descobertas/principais-ingredientes-ativos>

- Lampert, B., & Stewart, J. (1990). Determination of non-steroidal anti-inflammatory analgesics in solid dosage forms by high-performance liquid chromatography on underivatized silica with aqueous mobile phase. *Journal of Chromatography*, 381-389.
- Lewis, K., Kennelly, B., & Wedner, E. (1991). Uso ritualista rápida del acebo guayusa *Ilex* por los indios shuar de la Amazonía. *Diarío de Etnofarmacología*, 25-30.
- Liu, C. Z., & Saxena, P. (2009). Saussurea medusa cell suspension cultures for flavonoid production. *Methods in Molecular biology*, 53-59.
- Liu, C., Yang, S., Wang, K., Bao, X., Liu, Y., Zhou, S., . . . Yu, H. (1 de 12 de 2019). Alkaloids from Traditional Chinese Medicine against hepatocellular carcinoma. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 120, 109543. Elsevier Masson SAS.
- Ljung, K. (1 de 3 de 2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development (Cambridge)*, 140(5), 943-950.
- Loizeau, P., Barriera, J., F, M., & Broennimann, O. (2005). Towards an understanding of the distribution of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) on a World-wide scale. . *Biologiske Skrifter*, 501-520.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., . . . Terzi, M. (3 de 1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77(3), 325-331.
- Manem, J., Barriera, P., Loizeau, P., & Naciri, Y. (2010). The history of extant *Ilex* species (Aquifoliaceae): Evidence of hybridization within a Miocene radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 961-977.

- Manen, J., Barriera, G., Loizeau, P., & Naciri, Y. (2010). The History of extant *Ilex* species (Aquifoliaceae): evidence of hybridization within a Miocene radiation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 961-977.
- Matkovic, S., Valle, G., & Briand, L. (2004). Desarrollo y validación del análisis cuantitativo de ibuprofeno en comprimidos por espectroscopia infrarroja. *Acta Farm. Bonaerense*, 527-532.
- Melo, V. (2014). *Composición y Análisis Químico de la Especie Ilex guayusa* Loes. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Melo, V. (2015). *Composición y Análisis Químico de la Especie Ilex guayusa* Loes. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Mendoza, D., Cuaspuud, O., Arias, J. P., Ruiz, O., & Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*.
- Mihaljevic, I., Dugalic, K., Tomas, V., Viljevac, M., Pranjic, A., Cmelik, Z., Jurkovic, Z. (2013). In vitro sterilization procedures for micropropagation of 'oblacinska' sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 58(2), 117-126.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2013). *Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental*. Quito: Subsecretaría de Patrimonio Natural.
- Moreta, M. (11 de Septiembre de 2018). Napo exporta 120 toneladas de la hoja sagrada de guayusa a tres países. *El Comercio*.

- Muñoz, Ó., Torres, G., Núñez, J., & de la Rosa, L. G. (2017). NUEVO ACERCAMIENTO A LA INTERACCIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN-CIICALTEU CON AZÚCARES DURANTE LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES. *TIP*, 23-28.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 473-497.
- Murthy, H., Lee, E., & Paek, K. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-16.
- Nadeem, M., Ahmed, W., Zahir, A., Hano, C., & Abbasi, B. (2018). Salicylic acid-enhanced biosynthesis of pharmacologically important lignans and neo lignans in cell suspension culture of *Linum ussitatissimum* L. *Engineering in Life Sciences*.
- Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 69-79.
- Nicolaou, K., Chen, J., & Corey, E. (2011). *Classics in Total Synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Niranjana, H., Lee, M., & Paek, K. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1-16.
- Oliveros-Bastidas, A., Carrera, C., & Marín, D. (2009). Estudio por espectrofotometría Uv-Vis de la reacción entre los iones cianuro y picrato. Un ejemplo práctico de aplicaciones analíticas y estudios cinéticos. *Revista Colombiana de Química*, 61-82.

- Olle, M., & Virsile, A. (2013). The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. *Agricultural and food science*, 223-234.
- Paneque, O., Vega, I., Pupo, J., Reyes, A., & Leonardo, P. (2003). Determinación de las concentraciones adecuadas de 2,4-D y 6-BAP para la inducción de callos morfogénicos de boniato. *Biotecnología Vegetal*.
- Patiño, V. (1968). Guayusa, a neglected stimulant from the eastern Andean foothills. *Economic Botany*, 311-316.
- Pedret, A., Valls, R., Fernández-Castillejo, S., Catalán, Ú., Romeu, M., Giral, M., Solà, R. (2012). Polyphenol-rich foods exhibit DNA antioxidative properties and protect the glutathione system in healthy subjects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(7), 1025-1033.
- Perrot-Rechenmann, C., & Napier, R. (2005). Auxins. *Vitamins and Hormones*, 72, 203-233. Academic Press.
- Pharmacopée Européenne. (2002). European Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopée Européenne*, 1471-1472.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Prefectura de Napo. (Septiembre de 2017). *InfoNapo: Biocomercio*. Obtenido de InfoNapo Web site:
http://www.infonapo.org/assets/bio_comercio_descargas/PMI_Guayusa%20Ruku%20Kawsay%20PKR_Portada.pdf

- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4290-4302.
- Qarah, N., Basavaiah, K., & Abdulrahman, S. (2017). Spectrophotometric determination of ethionamide in pharmaceuticals using Folin–Ciocalteu reagent and iron(III)-ferricyanide as chromogenic agents. *Journal of Taibah University for Science*, 718-728.
- Quoirin, M., Bittencourt, J., Zanette, F., & Oliveira, D. (1998). Effect of growth regulators on indirect organogenesis of *Acacia mearnsii* tissues cultured in vitro. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal*, 101-105.
- Radice, M., & Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja*, 3-11.
- Rady, M., Saker, M., & Matter, M. (1 de 12 de 2018). In vitro culture, transformation and genetic fidelity of Milk Thistle. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 563-572. Academy of Scientific Research and Technology.
- Ramirez, K., Vidal, H. H., Moyano, E., & Golenioswki, M. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*.
- Rao, S., & Ravishankar, G. (2002). Plant Cell Cultures: Chemical factories of Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 101-153.
- Rodríguez, B., Iatsague, M., Chacón, M., & Astorga, P. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocóilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 111-118.

- Ross, S., Arriaga, M., & Pechi, E. (2017). Establecimiento in vitro de Yerba mate (*Ilex paraguariensis* Hil.) nativa de Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 15-23.
- Roussos, P., & Pontikis, C. (2001). Oxidative browning in 'Koroneiki' olive explants as influenced by oxidative enzyme activities and endogenous phenolic compounds. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 441-446.
- Saba Samadi, A. (2020). Fresh weigh, Total phenol, Total flavonoids, Antioxidant and PAL enzyme activity of stevia callus variation affected by salicylic acid and methyl jasmonate. *Journal of Plant Process and Function*, 325-337.
- Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A., & Mirjalili, M. (2018). The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 271-280.
- Sayed, M., Khodary, S., Ahmed, E., Hammouda, O., & Hassan, H. (2017). Elicitation of flavonoids by chitosan and salicylic acid in callus of *Rumex vesicarius* L. *Acta Horticulturae*, 165-176.
- Schultes, R. (1972). *Ilex guayusa* from 500 A.D. to present. In: Wassen SH (ed) A medicine-man's implements and plants in the Tiahuanacoid Tomb in Highland Bolivia. Göteborg: Göteborg Etnografiska Museum.
- Semeradova, H., Montesinos, J., & Benkova, E. (11 de 5 de 2020). All Roads Lead to Auxin: Post-translational Regulation of Auxin Transport by Multiple Hormonal Pathways. *Plant Communications*, 1(3), 100048.
- Sequeda, L., Modesti, G., Celis, C., Gamboa, F., & Gutierrez, S. (2016). *Ilex guayusa* Loes (Aquifoliaceae) Amazon and Andean native plant. *Pharmacologyonline*, 193-202.

- Shagufta, N., Sheeba, N., & Sambreen, Z. (2006). Direct Organogenesis of Plant Tissue culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology Division*.
- Sharifi, Y., Nematzadeh, G., Omran, V., Ghavami, T., & Ebrahimzadeh, M. (2020). Effect of salicylic acid on phenols and flavonoids content in callus culture of Iranian sodab (*Ruta graveolens*): A threatened medicinal plant of north of Iran. *Tabari Biomedical Student Research Journal*.
- Shemluck, M. (1979). The flowers of *Ilex guayusa*. *Museum Leaflets*, 155-160.
- Singh, B., Cheek, H., & Haigler, C. (29 de 6 de 2009). A synthetic auxin (NAA) suppresses secondary wall cellulose synthesis and enhances elongation in cultured cotton fiber. *Plant Cell Reports*, 28(7), 1023-1032.
- Singh, B., Sahu, P., & Sharma, R. (2017). Effect of elicitors on the production of pyrroloquinazoline alkaloids by stimulating anthranilate synthase activity in *Adhatoda vasica* Nees cell cultures. *Planta*, 1125-1137.
- Srivastava, L. (2002). *Plant Growth and Development*. Burnaby: Academic Press.
- Sujatha, M., & Reddy, T. (1998). Differential cytokinin effects on the stimulation of in vitro shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). *Plant Cell Reports*, 17(6-7), 561-566.
- Suzuki, T., & Waller, G. (1984). Biosynthesis and biodegradation of caffeine, theobromine, and theophylline in *Coffea arabica*. L. Fruits. *Journal of agricultural and Food chemistry*, 845-848.

- Tabiyeh, D., Bernard, F., & Shacker, H. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in pistacia vera shoot tips culture. *Acta Horticulturae*, 201-204.
- Thiruvengadam, M., Rekha, K., Rajakumar, G., Lee, T. J., & Kim, S. H. (2016). Enhanced production of anthraquinones and phenolic compounds and biological activities in the cell suspension cultures of *Polygonum multiflorum*. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Tsang, A., & Corlett, R. (2005). Reproductive biology of the *Ilex* species (Aquifoliaceae) in Hong Kong. *Botany*, 1645-1654.
- Vasantha, H., Nair, S., & Robinson, R. (2014). Chemopreventive properties of fruit phenolic compounds and their possible mode of actions. *Studies In Natural Products Chemistry*, 229-266.
- Verger, R. (1997). 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*.
- Villacís-Chiriboga, J., García-Ruiz, A., Baenas, N., Moreno, D., Meléndez-Martínez, A., Stinco, C., . . . Ruales, J. (2018). Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1927-1934.
- Wang, J., Li, J.-L., Li, J. L.-X., & Liu, S.-j. (2017). Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 115-125.
- Wang, J., Li, J.-l., Li, J., Li, J.-x., Liu, S.-j., Huang, L.-q., & Gao, W.-y. (2017). Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 9(2), 115-125.

- Weathers, P., & Towler, M. (2010). Bench to barch: Advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1339-1351.
- Wise, G., & Santander, D. (2018). Comparative composition analysis of dried leaves of *Ilex guayusa* Loes. *Journal of Food and Nutrition Research*, 638-644.
- Xu, A., Zhan, J. C., & Huang, W. (2015). Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultura*, 197-211.
- Yahia, E., Jones, R., & Thomas, D. (2011). Quarantine pests of tropial and subtropical fruits and their control. *Posthervest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, 224-287.
- Yi, F., Zhao, X., & Peng, Y. (2016). *Phytochemistry, Ethnopharmacology, and Pharmacology*. Chinesse Herbal Medicine.
- Yue, W., Ming, Q., Lin, B., Tahman, K., & Zheng, C. (2016). Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 215-232.
- Zhang, B., Chen, L., Huo, Y., Zhang, J., Zhu, C., Zhang, X., & Ma, Z. (2020). Establishment of adventitious root cultures from leaf explants of *Tripterygium wilfordii* (thunder god vine) for the production of celastrol. *Industrial Crops and Products*.
- Zhang, S., Liu, N., Sheng, A., Ma, G., & Wu, G. (2011). In vitro plant regeneration from organogenic callus of *Curcuma Kwangsiensis* Lindl. (Zingberaceae). *Plant Growth Regulation*, 141-145.

Ziegler, J., & Facchini, P. (29 de 4 de 2008). Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking.

Annual Review of Plant Biology, 59, 735-769. Annual Reviews .

