



**Evaluación del efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la concentración de antocianinas en callo *in vitro* obtenido a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.)**

Maila Gutiérrez, Alexis Stalin

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 Ph.D.

26 de Julio del 2022



TESIS ALEXIS MAILA G.docx  
Scanned on: 21:55 July 21, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	0
Words with Minor Changes	24
Paraphrased Words	144
Omitted Words	402





**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación: **“Evaluación del efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la concentración de antocianinas en callo *in vitro* obtenido a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.)”** fue realizado por el señor **Maila Gutiérrez, Alexis Stalin**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 27 de julio 2022**



Firmado electrónicamente por:  
**MONICA BEATRIZ  
JADAN GUERRERO**

**Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph.D.**  
C. I. 1802278562



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Maila Gutiérrez, Alexis Stalin**, con cédula de ciudadanía n° 1720756129, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación del efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la concentración de antocianinas en callo *in vitro* obtenido a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.)** 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, 22 de julio de 2022

.....  
**Maila Gutiérrez, Alexis Stalin**  
C.I.: 1720756129



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura  
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

#### Autorización de Publicación

Yo **Maila Gutiérrez, Alexis Stalin**, con cédula de ciudadanía n° 1720756129, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación del efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la concentración de antocianinas en callo *in vitro* obtenido a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.)** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 22 de julio de 2022

.....  
**Maila Gutiérrez, Alexis Stalin**

C.I.: 1720756129

## Dedicatoria

A mi madre quien con su esfuerzo, amor, cariño y paciencia supo guiarme en esta etapa de mi vida, sin ella nada de esto hubiese sido posible.

A mi hermana y esposo, por ser un ejemplo para lograr grandes cosas.

En memoria a mi padre que desde el cielo me motivó para poder finalizar mi vida universitaria.

A Alan y Amaya quienes con sus travesuras me llenan de alegría la vida.

En memoria de mis abuelitos por cuidarme y guiarme mientras estuvieron conmigo.

*Alexis Stalin Maila Gutiérrez*

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme la dicha de seguir disfrutando de mi familia y amigos y permitir conseguir mis sueños.

A mi familia, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por enseñarme que el esfuerzo trae sus recompensas. Gracias por todo el cariño y apoyo brindado en este proceso. Sin ustedes nada de esto hubiese sido posible.

A mi tutora Mónica Jadán Ph.D., por compartirme sus conocimientos y enseñarme a ser una mejor persona y profesional. Gracias por acogerme en el laboratorio de cultivo de tejidos y permitirme ser parte de esta familia. A la Doctora Blanca Naranjo por compartir sus conocimientos para la realización de mi proyecto.

A Andrea Ortega, por su guía en la ejecución de mi trabajo de titulación, además, por ser una gran persona y amiga enseñándome a no darme por vencido en los momentos más difíciles.

A mis compañeros de tesis Nathy, Mateo y Andre C., por los lindos momentos compartidos en el laboratorio.

A mis amigos Michu, Gaby, Tefi, y Oscar por todos las risas y momentos compartidos, y en especial a mis mejores amigos Gabriel, Nicole, J., y Kathy por estar siempre conmigo en las buenas y malas, por todas las anécdotas que tuvimos en nuestra vida universitaria, siempre serán muy importantes en mi vida.

*Alexis Stalin Maila Gutiérrez*

## Índice de contenido

Resultado del análisis de Copyleaks.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de contenido.....	8
Índice de tablas.....	12
Índice de figuras.....	13
Abreviaturas .....	15
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Planteamiento del problema.....	18
Justificación del problema .....	20
Objetivos .....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
Hipótesis .....	22

Capítulo II: Marco Teórico .....	23
Motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).....	23
Origen y Distribución.....	23
Taxonomía .....	24
Características Botánicas.....	25
Fenología .....	26
Usos y Beneficios .....	27
Inducción a Callogénesis Mediante Cultivo in vitro.....	27
Reguladores de crecimiento.....	29
Auxinas .....	29
Citoquininas .....	30
Producción de Metabolitos Secundarios Mediante Cultivo in vitro de Células Vegetales .....	30
Antocianinas.....	32
Química y bioquímica de las antocianinas.....	33
Ruta biosintética de las antocianinas .....	36
Actividad antioxidante.....	38
Antocianinas en los alimentos .....	38
Biodisponibilidad de las antocianinas.....	40
Métodos analíticos de cuantificación.....	41
Mediciones espectrofotométricas .....	41
Elicitación .....	42
Manitol.....	43
Jasmonatos.....	43
Capítulo III: Metodología.....	45

	10
Fase de Campo .....	45
Recolección del Material Vegetal .....	45
Fase de Laboratorio.....	46
Selección del explante .....	46
Desinfección de Explante .....	46
Inducción de la callogénesis.....	48
Extracción de Antocianinas de callo in vitro de motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) ..	49
Cuantificación de antocianinas del callo in vitro mediante el método espectroscópico diferencial de pH .....	51
Efecto del Manitol y Ácido Jasmónico sobre la concentración de antocianinas .....	52
Capítulo IV: Resultados .....	55
Desinfección del Explante .....	55
Inducción a Callogénesis in vitro .....	57
Cuantificación de antocianinas del callo in vitro mediante el método espectroscópico diferencial de pH .....	63
Efecto del Manitol y Ácido Jasmónico sobre la concentración de antocianinas .....	66
Capítulo V: Discusión .....	74
Desinfección del fruto motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) .....	74
Inducción a callogénesis.....	75
Cuantificación de antocianinas del callo de <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.....	79
Efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la biosíntesis de antocianinas en el callo de <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr. ....	81
Capítulo VI: Conclusiones .....	86

Capítulo VII: Recomendaciones.....	87
Bibliografía .....	88
Apéndices .....	100

### Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Clasificación taxonómica de <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.....	25
<b>Tabla 2</b> Concentración de antocianinas en algunas frutas de tipo baya. ....	39
<b>Tabla 3</b> Concentración de reguladores de crecimiento para la inducción a callogénesis del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).....	49
<b>Tabla 4</b> Concentraciones de elicitores para promover la biosíntesis y acumulación de antocianinas en callo in vitro obtenido a partir de mesocarpio del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).....	54
<b>Tabla 5</b> Análisis de varianza de la inducción a la callogénesis <i>in vitro</i> en los explantes del motilón.....	61
<b>Tabla 6</b> Test: Duncan Alfa=0.05 de la etapa de inducción a callogénesis. ....	62
<b>Tabla 7</b> Concentración de antocianinas obtenidas en el fruto inmaduro y callo del motilón.....	66
<b>Tabla 8</b> Concentración de antocianinas totales presentes en el callo de motilón expuesto a los diferentes tratamientos con los elicitores. ....	70
<b>Tabla 9</b> Test: Duncan Alfa=0.05 de las concentraciones de antocianinas presentes en el callo del motilón al ser expuestos a los diferentes tratamientos de elicitación.....	71
<b>Tabla 10</b> Intervalos de confianza de los datos obtenidos en la cuantificación de antocianinas del callo de motilón con los diferentes tratamientos de elicitación.....	72

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Fruto del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).....	23
<b>Figura 2</b> Ubicación geográfica del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) .....	24
<b>Figura 3</b> Ejemplar del árbol del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).....	26
<b>Figura 4</b> Estructura química del catión flavilio y del esqueleto de la antocianidina. ....	34
<b>Figura 5</b> Estados moleculares y deslocalización electrónica de la cianidina a diferentes valores de pH.....	35
<b>Figura 6</b> Ruta general de la biosíntesis de antocianinas. ....	37
<b>Figura 7</b> Frutos del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) recolectados en la provincia de Imbabura. ....	45
<b>Figura 8</b> Frutos del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) de 2 cm de longitud utilizados para la inducción a callogénesis <i>in vitro</i> . ....	46
<b>Figura 9</b> Protocolo de desinfección de los frutos del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).	47
<b>Figura 10</b> Proceso de extracción de las antocianinas del fruto inmaduro del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).....	50
<b>Figura 11</b> Extractos de callo del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).....	52
<b>Figura 12</b> Extractos de callo del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) expuesto a los elicitores manitol y ácido jasmónico. ....	53
<b>Figura 13</b> Porcentajes de contaminación presentes en el protocolo de desinfección de los explantes de motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).....	55
<b>Figura 14</b> Representación gráfica de la contaminación fúngica y bacteriana que presentan los explantes del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) .....	56
<b>Figura 15</b> Insecto perteneciente al orden Himenóptera encontrado dentro de la semilla del motilón.....	57
<b>Figura 16</b> Proceso de inducción a callogénesis <i>in vitro</i> a partir de mesocarpio del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) en el transcurso de 49 días. ....	58

<b>Figura 17</b> Diferencias morfológicas que presentan los callos de motilón incubados en medios de cultivo MS y WPM.....	59
<b>Figura 18</b> Incidencia de la luz sobre la coloración del callo de <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.	60
<b>Figura 19</b> Pruebas de normalidad de los datos obtenidos del porcentaje de inducción a callogénesis del motilón.....	61
<b>Figura 20</b> Diagrama de barras de las medias de cada tratamiento utilizado en la inducción a callogénesis de mesocarpio del motilón.....	63
<b>Figura 21</b> Características espectrales de la antocianina del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) inmaduro.....	64
<b>Figura 22</b> Características espectrales de las antocianinas del fruto maduro y del callo del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.).....	65
<b>Figura 23</b> Cambios que presentan los callos de <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr. durante 37 días de cultivo con los diferentes tratamientos de elicitación .....	67
<b>Figura 24</b> Características espectrales de las antocianinas del motilón ( <i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.) expuestos a diferentes concentraciones de manitol y ácido jasmónico .....	68
<b>Figura 25</b> Pruebas de normalidad de los datos obtenidos de la cuantificación de antocianinas en el callo del motilón expuesto a manitol y ácido jasmónico. ....	69
<b>Figura 26</b> Concentración de antocianinas en el callo <i>in vitro</i> de mesocarpio del motilón con los diferentes tratamientos de elicitación. ....	73

## Abreviaturas

**2,4-D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**6-BAP:** 6-bencilaminopurina

**ANOVA:** Análisis de varianza

**MS:** Murashige y Skoog

**WPM:** Woody Plant Medium

**NaClO:** Hipoclorito de sodio

**pH:** Potencial de hidrógeno

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**NOS:** Especies reactivas de nitrógeno

**JA:** Ácido jasmónico

**MeJ:** Jasmonato de metilo

**UV-VIS** Ultravioleta-Visible

**nm:** Nanómetros

**mg:** Miligramos

**rpm:** Revoluciones por minuto

**msnm:** Metros sobre el nivel del mar

## Resumen

El motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) es un fruto silvestre que tiene características antioxidantes por la presencia de antocianinas, por lo que se ha tenido un gran interés en el estudio de esta especie. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una técnica biotecnológica que proporciona nuevas metodologías para la producción de metabolitos secundarios de manera controlada. En la presente investigación para la etapa de inducción a callogénesis *in vitro* se estudiaron dos medios de cultivo Woody Plant Medium (WPM) y Murashige & Skoog (MS) suplementados con diferentes concentraciones de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), obteniendo como resultado que el medio de cultivo WPM con 4mg/L de 2,4-D + 1mg/L de 6-BAP indujo un 80% la formación de callo a los 49 días de su introducción. Posteriormente mediante el método espectroscópico diferencial de pH se cuantificó la concentración de antocianinas en el callo del motilón obteniendo una concentración de  $2,41 \pm 0,065$  mg/g de callo. Finalmente se evaluó el efecto de dos elicitores abióticos (manitol y ácido jasmónico) sobre la acumulación de antocianinas en un cultivo de callos del motilón. La aplicación de un sistema de cultivo de dos etapas con un tratamiento combinado de manitol (2mM) y ácido jasmónico (40 $\mu$ M) dio lugar a la acumulación de antocianinas en la biomasa del callo, obteniendo una concentración de  $6,290 \pm 0,160$  mg por gramo en comparación a su control que contiene  $2,270 \pm 0,155$  mg/g.

*Palabras clave:* ácido jasmónico, manitol, antocianinas, *Hyeronima macrocarpa*, cultivo *in vitro*, metabolitos secundarios.

### Abstract

Motilon (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) is a wild fruit that has antioxidant characteristics due to the presence of anthocyanins, so there has been great interest in the study of this species. *In vitro* plant tissue culture is a biotechnological technique that provides new methodologies for the controlled production of secondary metabolites. In the present research, two culture media Woody Plant Medium (WPM) and Murashige & Skoog (MS) supplemented with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-Benzylaminopurine (6-BAP) were studied for the *in vitro* callogenesis induction stage, obtaining as a result that WPM culture medium with 4mg/L of 2,4-D + 1mg/L of 6-BAP induced 80% callus formation 49 days after its introduction. Subsequently, using the pH differential spectroscopic method, the concentration of anthocyanins in the callus of the motilon was quantified, obtaining a concentration of  $2.41 \pm 0.065$  mg/g of callus. Finally, the effect of two abiotic elicitors (mannitol and jasmonic acid) on the accumulation of anthocyanins in a motilon callus culture was evaluated. The application of a two-stage culture system with a combined treatment of mannitol (2mM) and jasmonic acid (40 $\mu$ M) resulted in anthocyanin accumulation in callus biomass, obtaining a concentration of  $6,290 \pm 0.160$  mg per gram compared to its control containing  $2,270 \pm 0.155$  mg/g.

*Key words:* jasmonic acid, mannitol, anthocyanins, *Hyeronima macrocarpa*, tissue culture, secondary metabolites.

## Capítulo I: Introducción

### Planteamiento del problema

Desde la aparición de la humanidad su principal fuente de energía han sido los vegetales, al pasar de los años se ha dado un alto crecimiento poblacional por lo que ha sido necesario el uso de técnicas de explotación agropecuarias para satisfacer sus necesidades, lo que ha dado como resultado la destrucción de varias poblaciones vegetales (Levitus *et al.*, 2010).

El Ecuador siendo un país pequeño posee una gran biodiversidad animal y vegetal, así mismo existen en esta región especies vegetales que son propósito de estudio como es el caso del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.), fruto poco conocido que se encuentra en la sierra y oriente ecuatoriano (Matute, 2019).

*Hyeronima macrocarpa* Schltr., es una especie forestal que ha sido declarada vulnerable, según la categoría Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), ya que tiene una alta probabilidad de convertirse en una especie en peligro de extinción (Ministerio del Ambiente y Agua, 2020), debido a la explotación forestal y a la tala ilegal que existe, perjudicando los beneficios que presenta para el ambiente (Iglesias, 2016).

Según Martínez (2019), en Ecuador el motilón es utilizado en la preparación de la colada morada, ya que presenta un color morado intenso y buen sabor; además, de ser nutritivo y poseer un alto contenido de antocianinas.

Las antocianinas son pigmentos moleculares con propiedades antioxidantes capaces de capturar radicales libres. Dado que presentan estas características existe un gran interés por

parte de las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica, en explotar materia prima natural con alto contenido de principios activos o capaz de generar nuevos pigmentos (Martínez, 2019). En ese sentido, el desconocimiento de las características y beneficios que presenta el motilón, ha provocado que la población desperdicie o incluso deseche el fruto, desaprovechando su potencial como materia prima para su industrialización y comercialización (Iglesias, 2016).

Según Martínez (2019), en la provincia de Imbabura el motilón se cosecha en dos temporadas al año, la primera en los meses de mayo a junio y la segunda de octubre a enero. Debido al potencial de este fruto, se propone utilizar técnicas biotecnológicas para la obtención de callo *in vitro*, teniendo así disponibilidad del material necesario durante todo el año, sin depender de la temporada en la que se dé *ex vitro*.

En los años 60 se introdujo técnicas de cultivos vegetales como posible herramienta para la investigación de metabolitos secundarios, las cuales no tuvieron los resultados esperados, ya que su producción era inferior a la que posee la planta nativa. Este hecho fue atribuido a la falta de desdiferenciación celular, indispensable para que las rutas metabólicas se expresen de manera correcta. Gracias a los avances del cultivo de células vegetales, a partir de los años 90 se ha visto un crecimiento en la producción de compuestos bioactivos de gran valor (Belchí, 2012).

En el siglo XX inició el estudio de la funcionalidad de metabolitos secundarios, en primera instancia eran denominados productos naturales, ya que se utilizaban como venenos, saborizantes o drogas y en las plantas se consideraban productos de desecho o detoxificantes. Esta visión cambió al pasar de los años, donde los metabolitos secundarios dejaron de considerarse productos inertes para ser conocidos como componentes dinámicos del

metabolismo de las plantas, ya que juega un papel importante en la ecología de las especies vegetales debido a propiedades como sabor amargo y toxicidad, características que protegen a las plantas de patógenos y de ser ingeridas por algunos herbívoros (Belchí, 2012).

### **Justificación del problema**

*Hyeronima macrocarpa* Schltr., pertenece a la familia Phyllanthaceae, especie forestal que la podemos encontrar en los bosques andinos de Ecuador, Colombia y Perú. Solo en Ecuador existen al menos 10 especies de *Hyeronima* y en su mayoría conocidas como motilón (García, 2019).

Según Martínez (2019) evidenció la presencia de compuestos antioxidantes a partir del extracto de pulpa del motilón, con niveles altos de antocianinas. Por lo cual, el conocimiento de su composición de fenoles y antocianinas junto con su capacidad antioxidante brindará información relevante y necesaria para el desarrollo de nuevos mercados para este fruto (Santacruz *et al.*, 2012).

Los metabolitos secundarios o productos naturales son sustancias que se derivan del metabolismo primario, pero están restringidos a un grupo taxonómico particular. Los metabolitos secundarios tienen una función ecológica como defensa contra insectos y herbívoros, sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasores nutritivos. Además, cumplen funciones fisiológicas por ejemplo: los compuestos fenólicos como los flavonoides son protectores de la luz ultravioleta (UV). La mayoría de medicamentos se obtienen por síntesis química y sus principales estructuras están basadas en productos naturales. En el mundo el 44% de los medicamentos están basados en metabolitos secundarios y el 25% son derivados de plantas (Pérez & Jiménez, 2011). Las antocianinas son metabolitos secundarios que

pertenecen al grupo de los flavonoides, son pigmentos naturales que se encuentran en frutas y vegetales. Son solubles en agua lo que facilita su uso en la alimentación, además presenta beneficios y efectos terapéuticos en enfermedades coronarias, cáncer, tumores, diabetes e inflamaciones (García, 2019).

Existen metabolitos secundarios que se sintetizan en cantidades pequeñas y no en todas las plantas, por lo que su producción es limitada a cierto género, familia o incluso algunas especies de plantas (Ávalos & Pérez-Urria, 2009). Es por esto que se requiere procesos tecnológicos para la producción y extracción de principios activos. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* nos ofrece técnicas para facilitar la producción de productos naturales deseados. La producción *in vitro* de metabolitos secundarios es sumamente baja, por lo que es necesario encontrar técnicas de mejoramiento para su producción industrial y comercialización (Saraguro, 2021). 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 deseados y de interés. Actualmente, la biotecnología vegetal cuenta con gran variedad de procesos con los cuales se puede llevar a cabo estos objetivos, por medio del cultivo *in vitro* se busca la inducción a callogénesis *in vitro*. Dado que no se han realizado estudios en especies relacionadas sobre metabolitos secundarios en callo *in vitro* es necesario investigar la presencia de estos, e incluso aumentar su concentración mediante el uso de elicitores abióticos como el manitol y el ácido jasmónico (Mihai *et al.*, 2011).

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Evaluar el efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la concentración de antocianinas en callo *in vitro* obtenido a partir del cultivo de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.).

### ***Objetivos específicos***

- Establecer el medio de cultivo para la inducción a calogénesis *in vitro* a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.).
- Cuantificar la concentración de antocianinas presentes en el callo *in vitro* obtenido de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.).
- Cuantificar la concentración de antocianinas presentes en el callo *in vitro* obtenido de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) al ser expuestos a manitol y ácido jasmónico.

## **Hipótesis**

El manitol y el ácido jasmónico aumentan la concentración de antocianinas en los callos *in vitro* obtenidos a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.).

## Capítulo II: Marco Teórico

### Motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.)

#### *Origen y Distribución*

*Hyeronima macrocarpa* Schltr., comúnmente conocido como motilón, crece en los bosques andinos de Ecuador, Perú y Colombia (García, 2019). Pertenece al género *Hyeronima* de la cual existen 15 especies distribuidas por América del Sur. El fruto del motilón se considera una drupa comestible y contiene altos niveles de antocianinas, las cuales presentan características antioxidantes (Martínez, 2019).

#### Figura 1

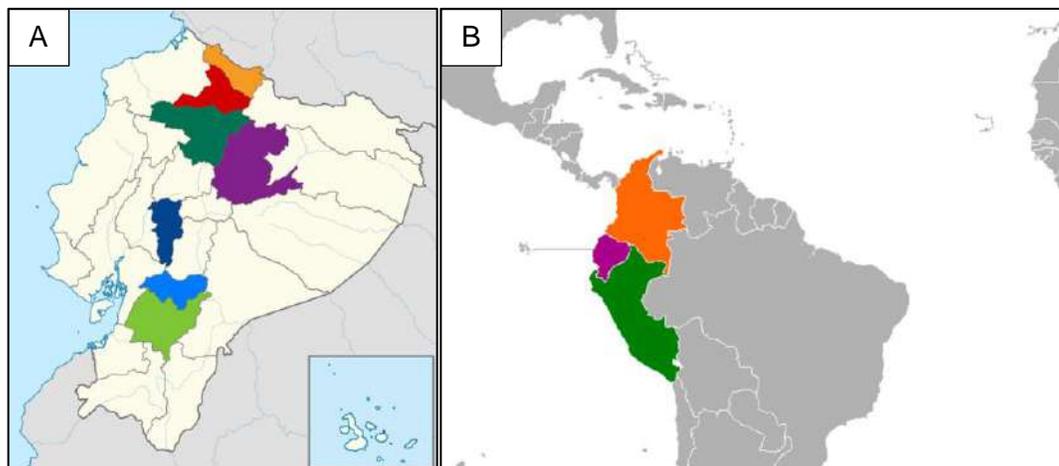
*Fruto del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)*



En el Ecuador, el motilón se ha localizado en altitudes que van desde los 1500 a 3500 msnm en diferentes provincias como Carchi, Imbabura, Pichincha, Cañar y Napo (Iglesias, 2016). Según Prado *et al.*, (2000) esta especie crece mejor a una altura de 2900 a 3200 msnm.

**Figura 2**

*Ubicación geográfica del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)*



*Nota.* En la Figura 2A se puede observar la ubicación geográfica de *Hyeronima macrocarpa* Schltr. en las diferentes provincias del Ecuador, 2B) se muestra la ubicación geográfica en América del Sur.

***Taxonomía***

El género *Hyeronima* pertenece al filo Angiospermophyta, clase Magnoliopsida, familia Phyllanthaceae, como se observa en la Tabla 1 (Martínez, 2019).

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de Hyeronima macrocarpa Schltr.*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Angiospermophyta
<b>Orden</b>	Magnoliopsida
<b>Familia</b>	Phyllanthaceae
<b>Género</b>	<i>Hyeronima</i>
<b>Especie</b>	<i>macrocarpa</i>
<b>Nombre común</b>	Motilón
<b>Nombre científico</b>	<i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.

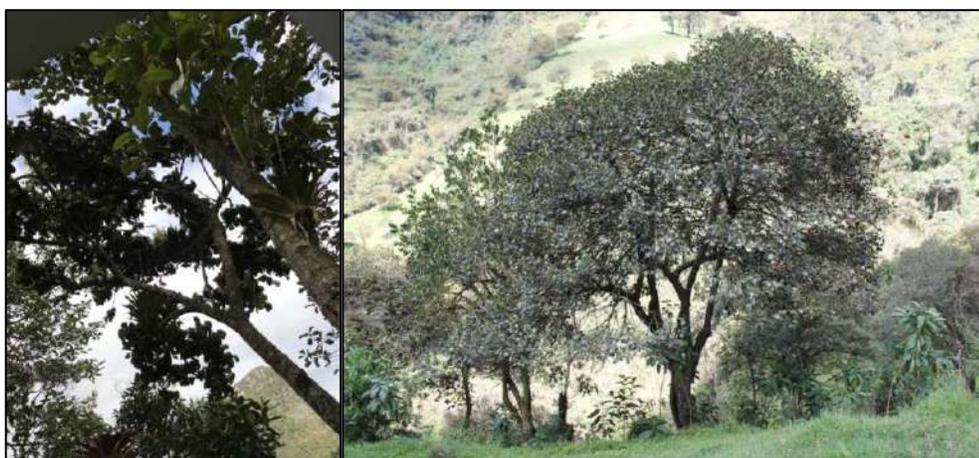
### **Características Botánicas**

El motilón es un árbol que tiene un tronco cilíndrico que puede alcanzar los 20 metros de altura, su corteza externa es agrietada de tono gris, su madera tiene la característica de ser duradera y de color rojizo (Iglesias, 2016). Sus hojas son simples, elípticas, alternadas, presenta nervios en el haz y envés de la hoja, con una longitud de 4 - 9 cm y de 2,5 - 4 cm de ancho, tiene un peciolo relativamente pequeño que mide de 2 a 2,5 cm (Vargas, 2002), cuando las hojas están jóvenes son de color verde claro, pasando a color amarillo y finalmente cuando caen al piso son de color rojo amarillento (Mueller, 2003). Las flores son de tonalidad verde amarillentas y poco atractivas (Santa Cruz, 2011).

Su fruto es comestible, drupáceo, elipsoide, de color verde en su estado inmaduro y a medida que va madurando cambia a color morado y negro que es el indicativo que el fruto está en estado óptimo para su consumo, puede llegar a medir hasta 2 cm de longitud (Santacruz *et al.*, 2012). Además, tiene una sola semilla de color café con testa dura (Vargas, 2002).

### Figura 3

*Ejemplar del árbol del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)*



### **Fenología**

*Hyeronima macrocarpa* Schltr., es una especie vegetal silvestre que permanece el 75% del año con follaje. En el mes de marzo a mayo es donde se puede observar una completa formación de hojas y plena floración, mientras que en la provincia de Cañar la floración se da entre junio y septiembre. En las partes más bajas se puede encontrar frutos en los meses de febrero a mayo, mientras que en zonas que tienen mayor altura estos salen entre junio y octubre (Iglesias, 2016).

## **Usos y Beneficios**

En Ecuador, en el sector gastronómico el motilón ha sido utilizado en la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, postres, mermeladas, batidos, helados, entre otros. Esto se debe al buen sabor y color que este presenta (Matute, 2019).

Los frutos del motilón tienen potencial en la alimentación humana, ya que son ricos en vitamina C y tienen abundante cantidad de antocianinas, que mejora la circulación sanguínea en la retina y refuerzan la pared de vasos venosos (Mina & Torres, 2015). Las antocianinas poseen propiedades terapéuticas y benéficas como efectos anticancerígenos, antitumorales, antidiabéticos y antiinflamatorios, además, estos pigmentos pueden reemplazar los colorantes sintéticos que son muy utilizados en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética (Garzón, 2008).

El motilón además de poseer antocianinas contiene un nivel considerado de fenoles. Los compuestos fenólicos de los extractos de fruta actualmente han adquirido mucha importancia, esto debido a que contienen metabolitos secundarios, los cuales tienen propiedades antioxidantes naturales. Además, son beneficiosos para la salud humana ya que ayuda a prevenir enfermedades degenerativas y cardiovasculares (Tipaz *et al.*, 2018).

## **Inducción a Callogénesis Mediante Cultivo *in vitro***

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica amplia que implica el cultivo de células, tejidos y órganos de cualquier parte de la planta, estos cultivos se los realiza en medios artificiales, en condiciones asépticas y controladas. Esta técnica surgió como un enfoque experimental para demostrar la teoría celular, la cual se fundamenta en que todos los organismos vivos están constituidos por células, además, del término totipotencia el cual se

refiere al potencial genético de una célula para dar origen a un organismo celular completo (Loyola & Ochoa, 2018).

En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se debe tener en cuenta los siguientes principios básicos i) seleccionar un explante apropiado de una planta sana, ii) eliminar la contaminación microbiana o fúngica de la superficie del explante, iii) inocular el explante en un medio de cultivo adecuado, y iv) proporcionar al explante cultivado las condiciones ambientales adecuadas (Loyola & Ochoa, 2018).

Algunos frutos silvestres, como el motilón, poseen sustancias con un alto potencial para ser industrializados, sin embargo, los frutos recolectados de las plantaciones y bosques presentan una variación en cuanto al contenido de sus componentes. Esto se convierte en un problema, ya que no se puede asegurar una cantidad uniforme de metabolitos secundarios en cada fruto. Es por eso que actualmente la biotecnología abarca varios campos, uno de ellos es la biotecnología vegetal, que nos brinda técnicas como el cultivo *in vitro* que permite producir plantas y productos vegetales de interés de manera uniforme e ilimitada (Córdova *et al.*, 2014).

El cultivo de tejidos nos permite la inducción y multiplicación de callos, esta técnica ha sido utilizada en la producción de compuestos derivados de especies vegetales a gran escala en comparación con otras técnicas convencionales, esto se debe a que la inducción de callos *in vitro* es un sistema rápido y sencillo de multiplicación celular (Kapoor *et al.*, 2018). Los factores que inducen la formación de callo son altamente consistentes y se han venido utilizando durante algunos años en el cultivo de tejidos para otras aplicaciones (Cardoso *et al.*, 2019).

El tipo y la concentración de auxina y citoquinina son factores determinantes clave que afectan a la callogénesis y la regeneración *in vitro*. La relación auxina/citoquinina es el factor más importante en este sentido (Kazeroonian *et al.*, 2018)

### **Reguladores de crecimiento**

Los fitorreguladores son productos naturales que esencialmente regulan todos los procesos de desarrollo y fisiológicos durante todo el ciclo de vida de la planta (Bajguz & Piotrowska, 2009). Estas moléculas son derivadas de metabolitos secundarios responsables de la adaptación de las plantas a los estímulos del ambiente. Las plantas necesitan de las fitohormonas para tener respuestas adecuadas frente a cualquier cambio que pueda presentarse. Una sola fitohormona puede regular un solo proceso como también la interacción de varias influyen en un solo proceso (Ishibashi, 1999).

Dependiendo de su estructura y diversidad química son agrupadas como citoquininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico, brasinoesteroides y el grupo que se ha descubierto más recientemente las estrigolactonas (Chu *et al.*, 2017).

El correcto entendimiento de los mecanismos de acción de los fitorreguladores contribuye a la comprensión de la biología de las plantas y a la mejora de los mecanismos de cultivo *in vitro*. La actividad biológica de cada fitorregulador dependerá de su concentración en la planta (Chu *et al.*, 2017).

### **Auxinas**

Las auxinas son hormonas vegetales que están involucradas en diferentes procesos de la planta, tal como en la morfogénesis celular (división, diferenciación y crecimiento) y también

en la dominancia apical (Bakshi *et al.*, 2022). Se caracterizan por su gran capacidad de estimular varios procesos dentro de la planta: inducir la elongación de brotes, promover la división celular en callos además de formar raíces adventicias en hojas, todo esto lo logra gracias a que están distribuidas entre células y tejidos lo que les permite estar involucradas en procesos completamente diferentes dentro de una misma planta (Garay-Arroyo *et al.*, 2014). La auxina más conocida es el ácido 3-indol-acético (AIA) que es la principal auxina natural, también se tienen auxinas producidas de manera sintética como el ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D), el ácido indol-butírico (IBA) y el ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) (Alcántara-Cortes *et al.*, 2109). El 2,4-D es la auxina más usada no solamente *in vitro* sino también *ex vitro* como un potente herbicida, para el cultivo *in vitro* se la usa en combinación con citoquininas para la inducción a callos (Malik *et al.*, 2003).

### **Citoquininas**

Las citoquininas son fitohormonas que tienen un papel importante en la regulación del ciclo celular de las plantas y en varios procesos de desarrollo. La primera citoquinina descubierta fue un derivado de la adenina y se denominó kinetina y la primera citoquinina natural identificada fue la zeatina. Se encuentran presentes en todos los tejidos vegetales, pero son principalmente abundantes en la punta de la raíz, en el ápice del brote y en semilla en estado inmaduro (Schmülling, 2013). Una de sus principales características es el promover la división y diferenciación celular (Srivastava, 2002). La citoquinina sintética más usada es la 6-bencilaminopurina (6-BAP) la cual promueve el crecimiento de la planta (Van Staden & Lall, 2018). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular (Costa, 2005).

### **Producción de Metabolitos Secundarios Mediante Cultivo *in vitro* de Células Vegetales**

El uso de cultivos de células vegetales *in vitro* para la producción de productos químicos y farmacéuticos ha dado grandes pasos, ya que el uso de herramientas genéticas y la

regulación de las vías para el metabolismo secundario proporcionan la base para la producción comercial de metabolitos secundarios. El aumento del nivel de productos naturales con fines medicinales, junto con los bajos rendimientos de los productos y las preocupaciones de suministro de plantas *ex vitro*, ha renovado el interés en la tecnología de cultivo de células vegetales *in vitro* a gran escala (Ramakrishna & Ravishankar, 2011).

Según Belchí (2012) a lo largo de años las plantas han evolucionado desarrollando mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y factores no favorables para su desarrollo. Los mecanismos de defensa pueden ser físicos, tal es el caso que algunas especies vegetales pueden desarrollar espinas o cortezas para evitar que sean atacadas o también la biosíntesis de metabolitos secundarios que son usados efectivamente para su defensa (fitoalexinas).

En la actualidad los metabolitos secundarios pueden producirse a partir de callos *in vitro* o en muchos casos de suspensiones celulares, esto se debe a que para la producción de un metabolito específico es necesario que la estructura de órganos o microplantas estén bien diferenciadas (Belchí, 2012). El cultivo de callos es una herramienta efectiva para la acumulación de metabolitos. Sin embargo, las rutas biosintéticas de estos metabolitos secundarios son marcadamente influida por varios elicitores. La adición o exposición de estos elicitores a los medios de cultivo puede modular la producción de metabolitos secundarios. En su mayoría, el estrés abiótico y biótico alteran la acumulación de compuestos bioactivos en cantidades más altas en comparación con el crecimiento natural plantas (Ahmad *et al.*, 2016).

Según Cardoso *et al.* (2019), el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es un conjunto de técnicas que nos facilitan la producción de células, tejidos e incluso órganos. El uso de las técnicas *in vitro* trae grandes ventajas en la obtención de metabolitos secundarios ya que su

producción es bajo un ambiente totalmente controlado. Estas se desarrollan paso a paso bajo estrictos protocolos lo que acelera la producción del metabolito secundario deseado y nos brinda una mayor seguridad de la pureza de este al no tener agentes externos con los que se pueda contaminar.

La producción de metabolitos secundarios *in vitro* se logra a través de la siembra de un explante que ha sido previamente seleccionado de una planta madre que se encuentre en óptimas condiciones. El explante elegido debe ser desinfectado para posteriormente ser introducido en un medio de cultivo que provea las condiciones adecuadas para su crecimiento. El medio de cultivo debe contener los minerales necesarios para nutrir el tejido, azúcares que brinden energía, reguladores de crecimiento adecuados para estimular la producción de células indiferenciadas, aminoácidos, vitaminas, agentes antioxidantes y otros; dependiendo del producto deseado. Esto en condiciones controladas de luz, humedad y temperatura (Cardoso *et al.*, 2019).

Existe una serie de ventajas el utilizar el cultivo de tejidos *in vitro*, en cuanto a la producción de metabolitos secundarios, por ejemplo: independencia estacional, no hay restricciones en cuanto a especies y géneros, y se puede inducir a partir de cualquier órgano de la planta (Belchí, 2012).

### **Antocianinas**

Las antocianinas producen varios tonos como rosa, rojo, púrpura y azul en flores, verduras y frutas. Las antocianinas también desempeñan un papel importante en la propagación de las plantas, la ecofisiología y los mecanismos de defensa. Estructuralmente, las antocianinas son antocianidinas modificadas por azúcares y ácidos, además, los colores de las antocianinas son susceptibles al pH, luz, temperaturas e iones metálicos. Los métodos

cromatográficos y espectrométricos se han utilizado ampliamente para la extracción, el aislamiento y la identificación de antocianinas. Es importante conocer que las antocianinas desempeñan un papel importante en las industrias farmacéutica, nutracéutica y de coloración, aromatización y conservación de alimentos (Alappat & Alappat, 2020). En las plantas actúan como señales visuales para atraer a insectos ayudando en la polinización y dispersión de semillas. Además, al absorber luz protegen a las plantas del daño provocado por la irradiación UV y bajas temperaturas (Qiu *et al.*, 2016).

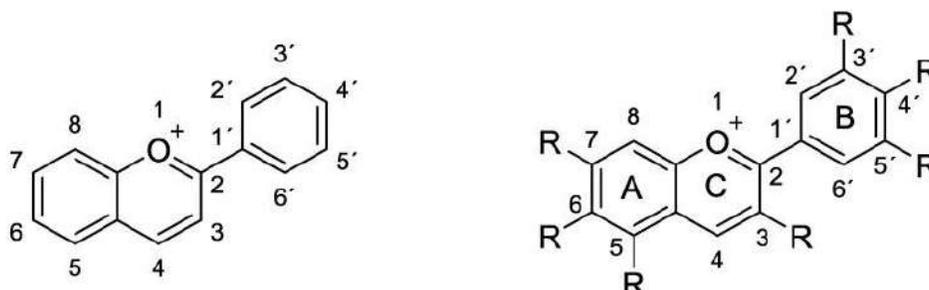
Las antocianinas son una clase de flavonoides solubles en agua, la fuente dietética de este metabolito secundario incluye uvas, bayas rojas y moradas, ciruelas, manzanas o en alimentos que presentan niveles altos de colorantes naturales. Las antocianinas más comunes que se encuentran en estos alimentos son la cianidina, la delfinina, la malvidina, la peonidina, la petunidina y la pelargonidina. Se han descrito beneficios para la salud por parte de las antocianinas, especialmente en la prevención de enfermedades relacionadas al estrés oxidativo, como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Mattioli *et al.*, 2020).

### ***Química y bioquímica de las antocianinas***

Las antocianinas son las formas glicosiladas de las antocianidinas una clase de agliconas, estos compuestos se encuentran formados por un esqueleto de catión flavilio hidroxilado en diferentes posiciones generalmente en los carbonos C3, C5, C6, C7 y C3', C4', C5' para dar lugar a diferentes antocianinas como se muestra en la Figura 4.

## Figura 4

*Estructura química del catión flavilio y del esqueleto de la antocianidina.*



*Nota.* Estructura química del catión flavilio a la izquierda y del esqueleto de la antocianidina a la derecha con la numeración de los átomos y la etiqueta del anillo (R = H, OH), dependiendo de la posición de los OH en la estructura de la antocianidina se forman las diferentes antocianinas, por ejemplo: pelargonidina en 3,5,7,4'-OH, cianidina en 3,5,7,3', 4'-OH, petunidina en 3,5,7,3',4'; 5'OMe.

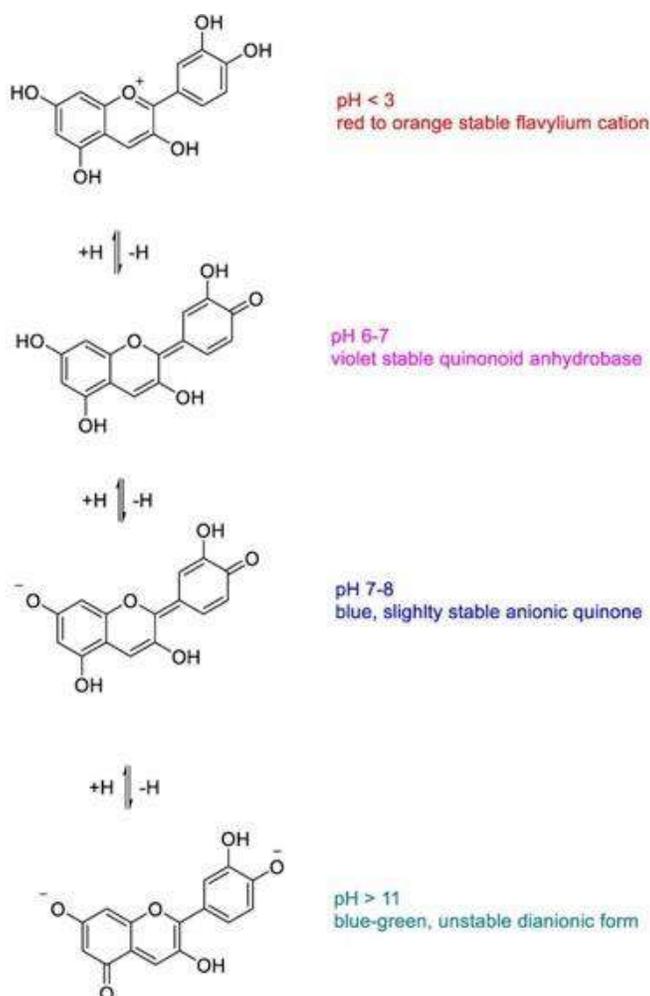
Las antocianinas son compuestos que presentan diferentes colores; rojo, púrpura y azul, esto depende de la acumulación y de la absorción de luz complementaria a la clorofila. Además, la absorción de luz, coloración dependiente del pH y su estabilidad presentan características relacionadas con las propiedades de conjugación electrónica en torno a la fracción de oxonio que es característico de este tipo de compuestos (He & Giusti, 2010). El color de algunas frutas y plantas es el resultado de la absorción de luz en conjunto con clorofila y antocianinas, por lo que estos cambios de color pueden ser un mecanismo de defensa de ciertas plantas, protegiéndolas de depredadores y herbívoros (Santos-Buelga *et al.*, 2014).

Según Mattioli *et al.* (2020) los colores intrínsecos de las antocianidinas y las antocianinas están relacionados con sus propiedades de absorción espectral UV-visible, conjugación electrónica y deslocalización. Estos efectos son inducidos por los diferentes

estados de ionización y reordenamientos electrónicos en las moléculas que están fuertemente influenciados por las concentraciones protónicas en el ambiente. En valores bajos de pH, las antocianinas se presentan como cationes de flavilio (oxígeno cargado de oxonio), mientras que en condiciones neutras se forman quinonas no cargadas. En condiciones básicas, todas las antocianinas son ligeramente estables y pueden sufrir diferentes vías de degradación con la consiguiente pérdida de coloración como se muestra en la Figura 5.

### Figura 5

*Estados moleculares y deslocalización electrónica de la cianidina a diferentes valores de pH.*



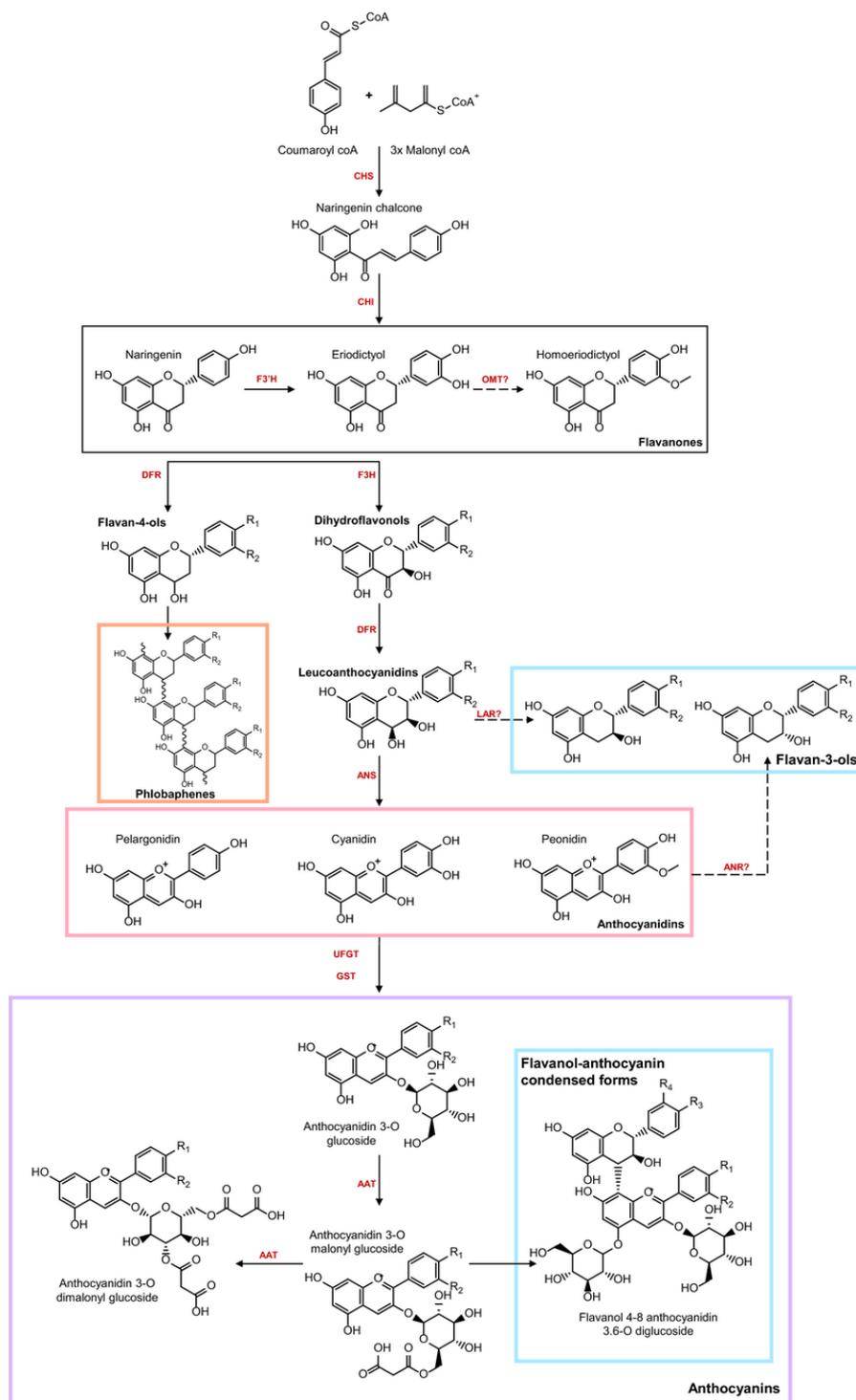
*Nota:* Tomado de Mattioli *et al.*, 2020

### ***Ruta biosintética de las antocianinas***

La ruta biosintética de las antocianinas ha sido bien caracterizada tanto en una planta modelo de *Arabidopsis thaliana* como en varios cultivos, y parece estar fuertemente conservada. La biosíntesis de las antocianinas constituye una importante rama de la vía de los fenilpropanoides y comparte, en las etapas iniciales, algunas enzimas biosintéticas de otros flavonoides como las flavonas y las flavononas. La ruta biosintética de las antocianinas comienza con la fenilalanina, que es convertida en ácido cinámico por la enzima fenilalanina amoniacal (PAL). A continuación, el ácido cinámico se convierte en ácido cumárico por la acción de la cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y posteriormente se convierte en 4-cumaril CoA por la 4-cumaril CoA ligasa (4CL). Como se muestra en la Figura 6, tras la condensación del 4-cumarilo CoA con el malonilo CoA, la chalcona de la naringenina es producida por la chalcona sintasa (CHS) y posteriormente convertida en naringenina por la chalcona isomerasa (CHI) y en dihidroflavonoles, como el dihidrokaempferol y la dihidroquercetina a partir de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y la flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H), respectivamente. Los últimos pasos de la vía biosintética conducen a la producción de leucocianidinas, cianidinas y antocianinas mediante la dihidroflavonol reductasa (DFR), la antocianidina sintasa (ANS) y la UDP-glucosa:flavonoide-3-O-glicosiltransferasa (UFGT), respectivamente. Aunque la biosíntesis de las antocianinas se produce en el citosol, éstas se almacenan en la vacuola mediante transportadores específicos (Mattioli *et al.*, 2020).

Figura 6

Ruta general de la biosíntesis de antocianinas.



Nota. Tomado de Chatham *et al.*, 2019.

### ***Actividad antioxidante***

Los antioxidantes son moléculas que inhiben las reacciones de los radicales libres retrasando el daño celular. En la actualidad las reacciones bioquímicas naturales, la exposición al medio ambiente y niveles altos de xenobióticos en la dieta inducen la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (NOS), estas son responsables del estrés oxidativo, ocasionando que los componentes celulares del cuerpo se alteren, dando lugar a diferentes enfermedades crónicas como cáncer, enfermedades coronarias y la osteoporosis. Este estrés oxidativo puede ser contrarrestado eficazmente incrementando las defensas del cuerpo humano con la ingesta de antioxidantes (Nimse & Pal, 2015).

Las antocianinas, antocianidinas, polifenoles y flavonoides tienen la capacidad de captar estos radicales libres. Las antocianinas tienen la capacidad de apagar estas especies de radicales reactivos mediante una reacción que implica la transferencia de un solo electrón y a través de la separación de átomos de hidrógeno de los grupos fenólicos. Las posiciones 3' y 4' de la antocianidina son esenciales para la capacidad antioxidante de estos compuestos (Qiu *et al.*, 2016).

### ***Antocianinas en los alimentos***

Las antocianinas se encuentran muy extendidas en las frutas y verduras rojas, azules y púrpuras, su contenido varía entre especies, esto depende del cultivar o variedad, zona de cultivo, el clima, métodos de cultivo, tiempo de cosecha, maduración, variabilidad estacional, temperatura y la exposición a la luz. Una rica fuente de antocianinas son frutos de tipo bayas como las fresas, moras, grosella negra y roja, arándanos, frambuesas, estos contienen una concentración que oscila entre 100 y 700 mg por cada 100g de producto fresco, el contenido más alto de antocianinas lo tiene la baya de saúco que va en el rango de 1,4 a 1,8 g/100g de

producto como se muestra en la Tabla 2. Además, otras fuentes de antocianinas son el maíz morado, cerezas, ciruelas, granada, vino, uvas, zanahoria negra, col morada, que contienen unos pocos miligramos hasta 200-300 mg/100g (Mattioli *et al.*, 2020).

**Tabla 2**

*Concentración de antocianinas en algunas frutas de tipo baya.*

<b>Taxonomía</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Concentración (mg/100g de fruta)</b>	<b>Estándar</b>
<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	Arándano alpino	256	Mv-3-glu
<i>Rubus occidentalis</i> L.	Frambuesa negra	627	Cy-3-glu
<i>V. parvifolium</i>	Arándano rojo	34	Cy-3-glu
<i>R. nigrum</i> cv	Grosella negra	411	Cy-3-glu
<i>Sambucus nigra</i>	Cauco negro	200-1000	Cy-3-glu
<i>V. vinifera</i>	Uva de vid	350-750	Cy-3-glu
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja dulce	200	Cy-3-glu

*Nota.* Mv: Malvidina, Cy: Cianidina y glu: Glucosa. Tomado de Santacruz, 2011.

Teniendo en cuenta los efectos protectores a la salud por parte de las antocianinas, es conveniente promover la ingesta de frutas y verduras para garantizar un nivel adecuado de compuestos antioxidantes. El consumo regular de estos alimentos es un factor muy importante para un estilo de vida saludable, además, puede proporcionar una protección frente a

enfermedades crónicas y degenerativas. La dieta mediterránea es rica en alimentos que contienen antocianinas, por lo que se le ha asociado a una reducción del riesgo de padecer diferentes enfermedades como obesidad, diabetes, cáncer y enfermedades cardiovasculares. Por el contrario, se calcula que 1,7 millones de muertes en el mundo se debe a la baja ingesta de frutas y verduras, dentro de las cuales se encuentran el cáncer gastrointestinal (14%), cardiopatía isquémica (11%) y accidentes cerebrovasculares (9%) (Tosti *et al.*, 2018).

### ***Biodisponibilidad de las antocianinas***

La biodisponibilidad es un término el cual se refiere al grado de disponibilidad de un compuesto ingerido para un tejido objetivo (Lila *et al.*, 2016). Para ejercer un efecto biológico una sustancia de cualquier alimento debe ser absorbido y llegar a los tejidos en cantidades suficientes para provocar una respuesta, es decir, tiene que ser biodisponible (Mattioli *et al.*, 2020). Las antocianinas tienen una biodisponibilidad sumamente baja, ya que solo entre el 1% y 2% de las antocianinas ingeridas mantienen su estructura original (C6-C3-C6) en el organismo (Tena *et al.*, 2020). Además, la biodisponibilidad de las antocianinas es baja debido a su sensibilidad a los cambios de pH. En general, las antocianinas son estables a valores de pH de 3,5 e inferiores y se degradan a valores de pH más altos (Robert & Fredes, 2015).

Otro factor que puede afectar la biodisponibilidad de las antocianinas es la matriz alimentaria y el procesamiento de alimentos, que pueden modular la bioaccesibilidad de la antocianina. La composición de la comida también podría ser un factor que afecta a la biodisponibilidad, es decir, los componentes alimentarios como el alcohol, los azúcares, las proteínas y las grasas pueden modular la absorción intestinal (Eker *et al.*, 2019). La estructura de la antocianidina es un determinante de la biodisponibilidad, ya que las antocianinas a base de pelargonidina se absorben más fácilmente que las antocianinas con más sustituyentes en el anillo B (Felgines *et al.*, 2007).

Las antocianinas son absorbidas en el intestino y llegan al hígado por medio de la vena porta. Aquí, se metabolizan, se secretan y se reabsorben en el círculo enterohepático para reiniciar la vía a lo largo de todo el proceso. De este modo, las antocianinas se metabolizan cada vez más, dando lugar a muchos intermediarios moleculares diferentes que pueden poseer propiedades y actividades biológicas específicas (Lila *et al.*, 2016).

## **Métodos analíticos de cuantificación**

### ***Mediciones espectrofotométricas.***

La cuantificación espectrofotométrica de las antocianinas totales está basada en la absorbancia de luz, característica que tienen esta clase de compuestos en función al estado de ionización. El color rojo-anaranjado característico de las antocianinas en medios ácidos está relacionado al elevado coeficiente de extinción molar en el rango de luz visible, dependiendo de la molécula se encuentran entre 465 y 550 nanómetros (nm). Como se puede observar en la Figura 5 dependiendo del pH existen diferentes estados de deslocalización electrónica de las moléculas, cada uno relacionado con un color. Estos valores de pH están asociados con absorciones características debido a la ampliación o disminución de la conjugación electrónica entre los anillos A-B y el anillo C a través de intermediarios aromáticos o quinónicos. A elevados valores de pH, las antocianinas pierden su color como consecuencia de su degradación. Existe otro rango de pH incoloro donde se mantiene la integridad de las antocianinas, sin embargo, estas moléculas no tienen propiedades espectroscópicas en el rango de luz visible (Mattioli *et al.*, 2020).

El método de pH diferencial es la metodología más fiable para la cuantificación espectroscópica de las antocianinas, ya que se registran los espectros de absorción UV-visible de los extractos o muestras a pH 1,0 y 4,5. Este método se basa en la diferencia entre los dos

valores de absorción en el rango de luz visible, lo que permite la estimación precisa de las antocianinas, inclusive si existieran otros pigmentos o polímeros que puedan interferir (Lao & Giusti, 2016).

### **Elicitación**

La elicitación es una de las herramientas biotecnológicas más eficaces y ampliamente empleadas para la inducción de nuevos productos naturales o la mejora de la biosíntesis, así como la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Los elicitors son moléculas bióticas o abióticas que pertenecen a varias clases de compuestos, no comparten una estructura química común, y pueden inducir o mejorar la biosíntesis de metabolitos secundarios específicos. Diversos parámetros, como el tipo de elicitor, las concentraciones, la duración de la exposición, el tratamiento, el tipo de cultivo, la línea celular, la composición del medio de cultivo, la presencia o ausencia de regulación del crecimiento y la edad o el estadio del cultivo en el momento del tratamiento con elicitors son los principales factores que pueden determinar la eficacia de las estrategias de elicitación en la producción de biomasa y metabolitos secundarios (Halder *et al.*, 2019).

La elicitación comienza con la percepción de la señal por parte de los receptores específicos del elicitor presentes en la membrana de la célula vegetal, seguida del inicio de la cascada de transducción de señales y, en última instancia, cambia el nivel de expresión de varios factores o genes de transcripción reguladores y genes limitadores de la tasa de las vías metabólicas secundarias, lo que resulta en un aumento de la síntesis y la acumulación de metabolitos secundarios (Zhai *et al.*, 2017).

Los metabolitos secundarios pueden sintetizarse desde cero o aumentar su concentración ya existente en la planta, esto en respuesta a agresiones externas o al

encontrarse compartimentalizada. Estas respuestas de defensa se deben en gran parte a los elicitores, ya que al ponerlas en contacto con células vegetales vivas y a concentraciones bajas producen una alteración en el metabolismo celular, con lo cual aumentan la producción de metabolitos secundarios específicos (Belchí, 2012).

En el cultivo *in vitro* vegetal es muy común la utilización de elicitores para inducir la biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios. Existen elicitores de origen biológico como el extracto de levadura, virus, hongos, bacterias, quitosán y el ácido aminobutírico; inductores abióticos o de origen no biológico como la luz ultravioleta (UV), benzotiodiazol, fosetil de aluminio y ortovanadato (Belchí, 2012; Amagua, 2020).

### ***Manitol***

El manitol es un azúcar sintetizado por plantas superiores y es utilizado para simular el déficit hídrico, además tiene tolerancia a la salinidad, estrés osmótico y respuesta al ataque de patógenos (Amagua, 2020). Es importante que la presión osmótica sea regulada en los cultivos de células vegetales, ya que este afecta al crecimiento celular y a la producción de metabolitos secundarios. Al agregar manitol, sorbitol y polietilenglicol al medio de cultivo, se regula la presión osmótica y se mantiene el balance hídrico idóneo para el crecimiento de las células (Arias *et al.*, 2009).

### ***Jasmonatos***

Los jasmonatos pertenecen a la ruta de los octadecanoides, cuando se activa esta ruta se produce ácido 12-oxo-fitodienóico y ácido jasmónico, compuestos biológicamente activos. El papel de los jasmonatos en el crecimiento y desarrollo de especies vegetales es importante ya que ejerce efectos como resistencia a patógenos, crecimiento de raíces y maduración de frutos.

Además, la aplicación exógena de estos compuestos podría inducir directamente la acumulación de metabolitos secundarios como fenoles, alcaloides y cumarinas (Belchí, 2012).

El ácido jasmónico es una hormona vegetal que deriva de los ácidos linoleico y linolénico, este actúa como molécula de señalización de la planta en respuesta al estrés producido por diferentes factores, por lo tanto, induce a la acumulación de metabolitos secundarios (Portu, 2018). El ácido jasmónico y sus derivados han sido considerados como compuestos que inducen la biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios en algunas especies vegetales (Amagua, 2020).

### Capítulo III: Metodología

#### Fase de Campo

##### *Recolección del Material Vegetal*

En la comunidad San Luis de la Carbonería, provincia de Imbabura, se recolectó los frutos del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.), para lo cual se recogieron los motilones y se colocaron en fundas de polietileno con papel humedecido para conservar la muestra hasta ser transportadas al laboratorio de cultivos vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, donde las muestras fueron procesadas.

#### Figura 7

*Frutos del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.) recolectados en la provincia de Imbabura.*



*Nota.* Frutos del motilón recolectados en estado de inmadurez para su posterior introducción.

## Fase de Laboratorio

### ***Selección del explante***

El porcentaje de inducción a callogénesis en frutos inmaduros es mayor comparada con el porcentaje de inducción que se presenta los frutos maduros (Córdova *et al.*, 2014), por lo cual se utilizó explantes inmaduros. En el laboratorio se seleccionaron los frutos inmaduros del motilón que no presentaban golpes, contaminación, aberturas y que se encontraban en buen estado para su introducción. Cada uno de los frutos se limpió con papel toalla para eliminar suciedad y exceso de humedad.

### **Figura 8**

*Frutos del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.) de 2 cm de longitud utilizados para la inducción a callogénesis in vitro.*



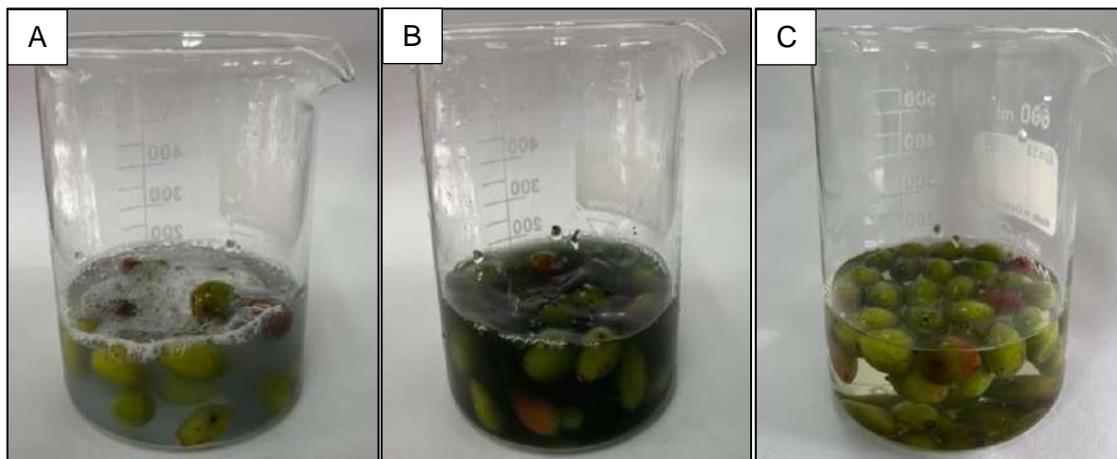
### ***Desinfección de Explante***

Se realizó el protocolo de desinfección sugerido por Córdova *et al.* (2014) con modificaciones ya que este presentó contaminación. Para ello se seleccionó los motilones

inmaduros y se lavó tres veces con agua corriente durante dos minutos para eliminar los residuos adheridos a las muestras, siguiendo con el protocolo los frutos fueron expuestos a una solución de detergente al 2% (p/v), la solución debe mantenerse en agitación a 150 rpm aproximadamente durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se realizó enjuagues con agua destilada para retirar completamente el detergente. Posteriormente se colocó a los explantes una solución de fungicida-bactericida NATURAM al 3% (v/v) durante 10 minutos en agitación a 150 rpm y se enjuagó con agua destilada. Se añadió fungicida al protocolo de desinfección ya que presentó contaminación por hongo en la mayoría de los explantes introducidos. Finalmente, los motilones fueron expuestos a una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) en agitación constante a 150 rpm durante 10 minutos y se enjuagaron tres veces dentro de la cámara de flujo laminar con agua destilada estéril.

### Figura 9

*Protocolo de desinfección de los frutos del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)*



*Nota.* A) Explantes expuestos a una solución de detergente al 2% (p/v), B) frutos del motilón sumergidos en una solución de fungicida-bactericida NATURAM a una concentración de 3% (v/v), C) motilones en una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v).

### ***Inducción de la callogénesis***

Una vez realizado el protocolo de desinfección, en una cámara de flujo laminar marca ESCO modelo SHC-4A2 previamente desinfectada con etanol al 70% y esterilizada con radiación ultravioleta (UV) durante 45 minutos, se realizó la introducción del material vegetal. Con una pinza y bisturí estériles se retiró el epicarpio del motilón para luego cortar alrededor de 1 cm<sup>2</sup> del mesocarpio del fruto. Según Roca y Mroginski (1991), una alta concentración de reguladores de crecimiento auxina:citoquinina (4:1) en el medio de cultivo induce la callogénesis, por lo tanto, para la inducción de callo del fruto motilón se utilizaron los medios de cultivo Woody Plant Medium (WPM) y Murashige & Skoog (MS) añadiendo dos reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones como se muestra en la Tabla 3. Una vez que se obtuvo cuatro explantes estos fueron inoculados en medios de cultivo WPM y MS suplementado con vitaminas, 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 7,8 gL<sup>-1</sup> de Bacto agar, diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) ajustado a un pH de 5,7 - 5,8.

Posteriormente los explantes inoculados se colocaron en el banco de germoplasma durante 15 días en oscuridad a una temperatura de 25±2 °C, transcurrido ese tiempo los explantes fueron expuestos a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Córdova *et al.*, 2014). Una vez introducidos los explantes se evaluó cada ocho días la formación de callogenesis *in vitro* y porcentaje de contaminación considerando hongos y bacterias como agentes contaminantes.

**Tabla 3**

*Concentración de reguladores de crecimiento para la inducción a callogénesis del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)*

Tratamiento	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	
		2,4-D mg/L	6-BAP mg/L
TC0 (control)	WPM	0	0
TC1	WPM	3	0,75
TC2	WPM	4	1
TC3	WPM	5	1,25
TC01 (control)	MS	0	0
TC4	MS	3	0,75
TC5	MS	4	1
TC6	MS	5	1,25

*Nota.* La tabla muestra los diferentes tratamientos de inducción a callogénesis utilizados en el ensayo, con los componentes de los medios de cultivo y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento 2,4-D y 6-BAP con las que fueron enriquecidos.

***Extracción de Antocianinas de callo in vitro de motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)***

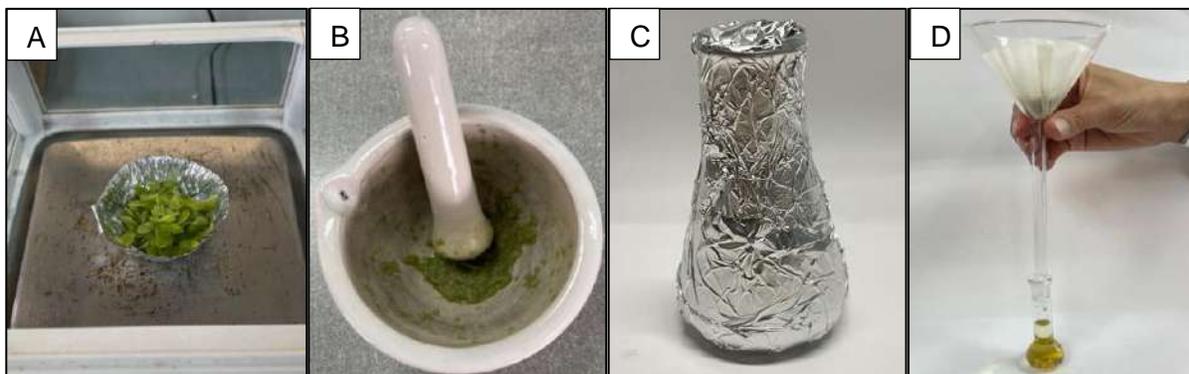
Para la extracción de las antocianinas se utilizará el método de Tipaz *et al.*, (2018) con modificaciones, una vez que se indujo la formación de callogénesis del motilón (*Hyeronima*

*macrocarpa* Schltr.), se pesó 3g de callo y se maceró en un mortero, posteriormente se separó en tres vasos de precipitación de 10mL, 1g de callo en cada uno, a estos se les añadió el solvente de extracción Metanol/Ácido acético al 100 % 19:1 (v/v) hasta que cubra completamente el callo macerado, el extracto debe permanecer en oscuridad durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de extracción, los extractos se filtraron en un balón aforado de 10mL con papel filtro. Finalmente, el extracto se filtró nuevamente con un Filtro Millipore Desechable de 0,20  $\mu\text{m}$ .

El mismo proceso se aplica para la extracción de las antocianinas en el fruto inmaduro del motilón, con el fin de comparar la concentración que estos poseen frente a los del callo del fruto fresco.

### Figura 10

*Proceso de extracción de las antocianinas del fruto inmaduro del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)*



*Nota.* A) Se muestra el pesaje del mesocarpio del motilón, B) maceración del mesocarpio del fruto inmaduro, C) macerado del motilón con el solvente de extracción y D) proceso de filtración después de las 24 horas de extracción con el solvente.

### ***Cuantificación de antocianinas del callo in vitro mediante el método espectroscópico diferencial de pH***

Para la cuantificación de las antocianinas se utilizó el método espectroscópico diferencial de pH sugerido por Lao & Giusti (2016), para lo cual se preparó una solución tampón de pH 1,0 con cloruro de potasio 0,025 M y una solución amortiguadora de pH 4,5 de acetato de sodio 0,4 M. Posteriormente se tomó 1mL del extracto y se colocó 9mL de la solución de cloruro de potasio, y 1ml del extracto del callo de motilón con 9mL acetato de sodio.

Se utilizó el Espectrofotómetro Marca: Thermo, Modelo: GENESYS 10 UV/VIS junto con el programa VisonLite para medir las absorbancias a una longitud de onda de 520nm y 700nm a pH 1,0 y pH 4,5. Además, se realizó un barrido de absorción lo cual nos permite observar la presencia de antocianinas ya que tienen un pico de absorción entre los 465 y 550 nm, dependiendo de la antocianina.

Según Lao & Giusti (2016) la concentración de antocianinas presentes en el extracto del callo se calcula mediante las siguientes ecuaciones:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4,5} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Antocianinas (mg/L)} = \frac{A \times PM \times DF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde

A: Absorbancia

DF: Factor de dilución

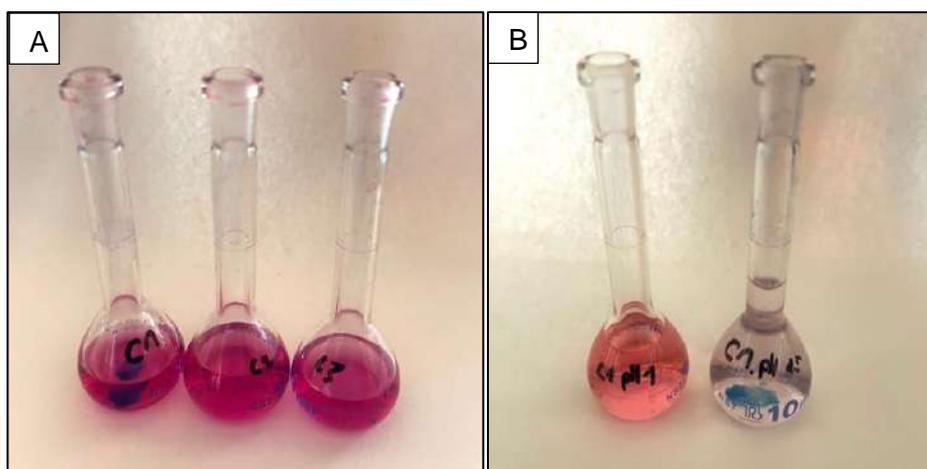
PM: Peso molecular

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar

La cuantificación de extractos de muestras biológicas es posible calculando la concentración de la antocianina predominante mediante los valores de absorbancia diferencial, peso molecular (PM) y coeficiente molar de extinción ( $\epsilon$ ). Cuando la muestra es desconocida y no caracterizada la cuantificación se realiza utilizando la cianidina 3-glucósido como equivalente para la estimación de las antocianinas. Para lo cual, se utiliza  $PM=449,2$  g/mol y  $\epsilon=26000$ .

### Figura 11

*Extractos de callo del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)*



*Nota.* A) Se muestra el extracto de callo del fruto de motilón (por triplicado) y B) es el extracto con la solución tampón pH 1,0 y solución amortiguadora pH 4,5 respectivamente.

### ***Efecto del Manitol y Ácido Jasmónico sobre la concentración de antocianinas***

Según Mihai *et al.* (2011) el ácido jasmónico y el manitol en el medio de cultivo promueven la biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios. Para lo cual se preparó un medio de cultivo WPM añadiendo diferentes concentraciones de manitol como se muestra en la Tabla 4. Los callos de motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) fueron cambiados a este medio

de cultivo y se dejó en fotoperiodo de luz 16 horas y 8 horas de oscuridad durante 30 días. Posteriormente se preparó un medio de cultivo con diferentes concentraciones de ácido jasmónico, siguiendo con el ensayo los callos del motilón se cambiaron a este medio de cultivo durante 7 días, los tratamientos a realizar se muestran en la Tabla 4.

Transcurrido los 37 días del tratamiento con el manitol y el ácido jasmónico se pesó 3g de callo de cada uno de los tratamientos y se maceró en un mortero, posteriormente se separó en tres vasos de precipitación de 10mL, 1g de callo en cada uno, se les añadió el solvente de extracción Metanol/Ácido acético 19:1 (v/v) hasta que cubra completamente el callo macerado, el extracto debe permanecer en oscuridad durante 24 horas (Tipaz *et al.*, 2018). Transcurrido el tiempo de extracción, los extractos se filtraron en un balón aforado de 10mL con papel filtro. Finalmente, el extracto se filtró nuevamente con un Filtro Millipore Desechable de 0,20  $\mu\text{m}$ .

## Figura 12

*Extractos de callo del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.) expuesto a los elicitores manitol y ácido jasmónico.*



*Nota.* Se muestra el extracto de callo del motilón (TE2), además, se muestra el extracto con solución de pH 1,0 y pH 4,5 respectivamente.

**Tabla 4**

*Concentraciones de elicitores para promover la biosíntesis y acumulación de antocianinas en callo in vitro obtenido a partir de mesocarpio del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)*

Tratamiento	Medio de cultivo	Elicitores	
		Manitol mM/L	Ácido jasmónico µM/L
<b>TE0:</b> <b>(control)</b>	WPM + 4mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BAP	0	0
<b>TE1</b>	WPM + 4mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BAP	1	20
<b>TE2</b>	WPM + 4mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BAP	2	40
<b>TE3</b>	WPM + 4mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BAP	3	60

Nota. Tratamientos aplicados para inducir la biosíntesis y acumulación de antocianinas en el callo de motilón utilizados en el ensayo, con los componentes de los medios de cultivo y concentraciones de (2,4-D y 6-BAP) ya establecidas y diferentes concentraciones de elicitores (manitol y ácido jasmónico) con las que fueron enriquecidos.

Se utilizó el Espectrofotómetro y el programa VisonLite para medir las absorbancias a una longitud de onda de 520nm y 700nm a pH 1,0 y pH 4,5, para la cuantificación de las antocianinas. Además, se realizó un barrido de absorción lo cual nos permite observar la presencia de antocianinas ya que tienen un pico de absorción máximo a 465 y 550 nm.

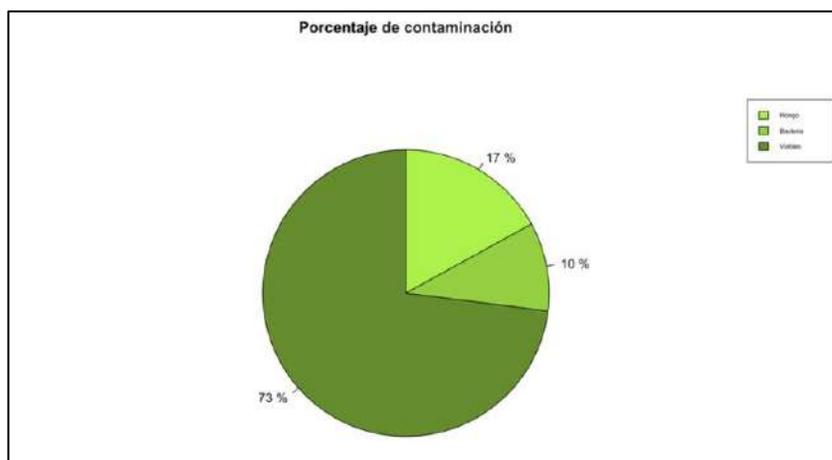
## Capítulo IV: Resultados

### Desinfección del Explante

En la etapa de desinfección de los frutos maduros de *Hyeronima macrocarpa* Schltr., al aplicar el protocolo de desinfección sugerido por Córdova *et al.* (2014) el porcentaje de contaminación que presentaron los explantes fue del 96%, la contaminación se evidenció desde el día tres, por lo que se modificó el protocolo y se procedió a utilizar frutos en estado de inmadurez. Con lo cual se obtuvo un porcentaje de contaminación del 27%, mientras que el 73% de los explantes fueron viables y se continuó con el proceso de inducción a calogénesis. Dentro del 27% de contaminación se pudo observar la presencia de contaminación fúngica (17%) y bacteriana (10%) como se muestra en la Figura 13. Los explantes no presentaron oxidación ni necrosamiento con el protocolo aplicado.

### Figura 13

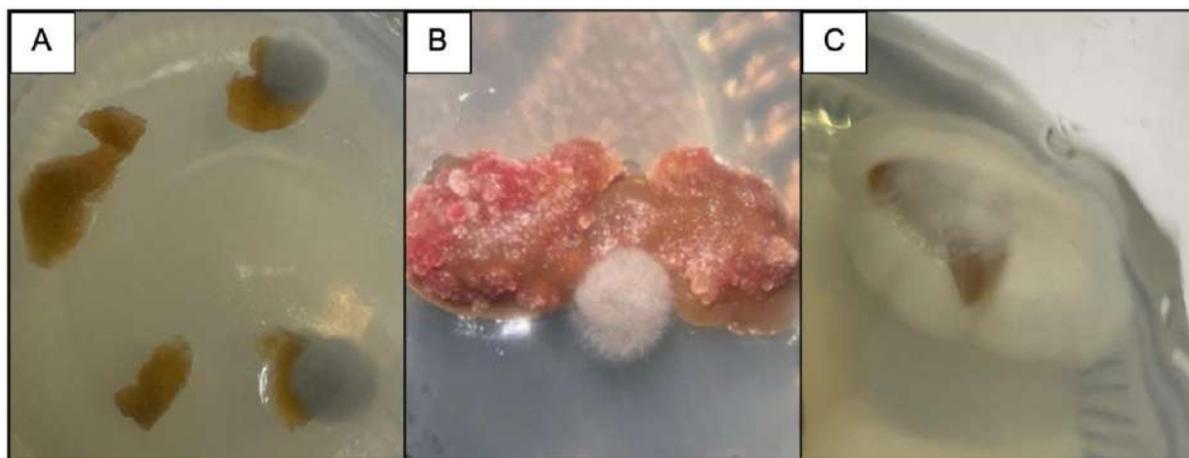
*Porcentajes de contaminación presentes en el protocolo de desinfección de los explantes de motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.)*



*Nota.* Se muestran los porcentajes de contaminación fúngica, bacteriana y viabilidad de los explantes del fruto motilón.

**Figura 14**

*Representación gráfica de la contaminación fúngica y bacteriana que presentan los explantes del motilón (*Hieronima macrocarpa* Schltr.)*



*Nota.* Se muestra en A) la presencia de contaminación por hongo a los siete días de la siembra de los explantes, sin embargo, en B) observamos la aparición de contaminación fúngica a pesar de que ha comenzado la formación de callo a los 21 días, lo que no permite que se siga desdiferenciando el explante incubado, y en C) evidenciamos la presencia de un halo lechoso en el explante, contaminación bacteriana, a los siete días de la introducción de los explantes.

Además, algunos frutos del motilón presentaron un agujero en su tegumento y dentro de la semilla se encontraron insectos. Según Iglesias (2016) estos insectos pertenecen al orden Himenóptera como se muestra en la Figura 15.

**Figura 15**

*Insecto perteneciente al orden Himenóptera encontrado dentro de la semilla del motilón.*



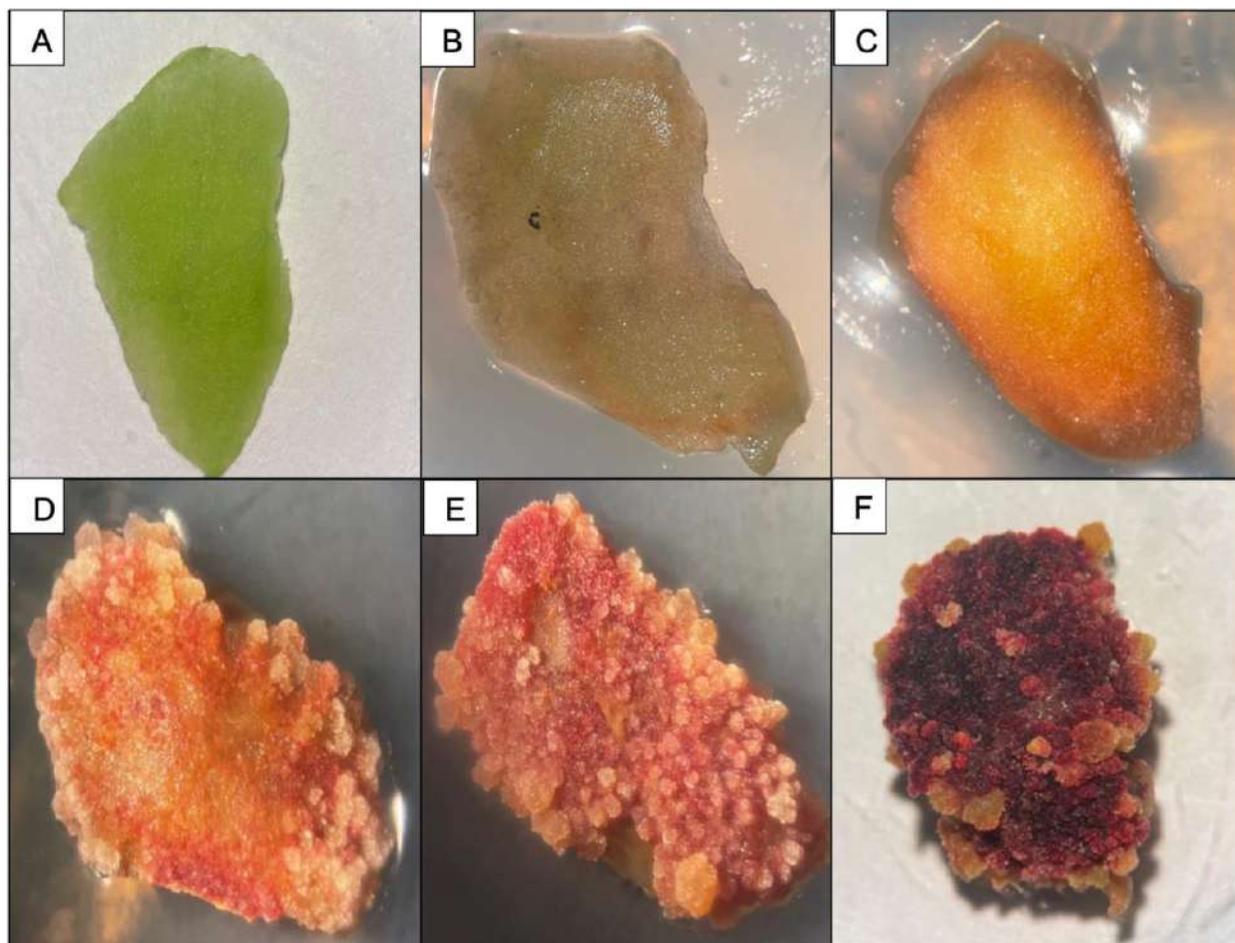
*Nota.* Se muestra el insecto del orden Himenóptera observado en un estereoscopio con aumento (1X).

**Inducción a Callogénesis *in vitro***

Las combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal indujeron la formación de callo no friables en los explantes del fruto de *Hyeronima macrocarpa* Schltr. Todos los tratamientos presentaron formación de callo, sin embargo, en el medio de cultivo MS se observaron morfologías diferentes que en los callos incubados en el medio de cultivo WPM. El medio de cultivo WPM suplementado con 4mg/L de 2,4-D y 1mg/L de 6-BAP (TC2) fue el mejor tratamiento para la inducción del callo, ya que este empezó su formación a los 21 días (Figura 16C). El proceso completo de la formación de callo desde el día 1 hasta el día 49 en el que se completó su formación se puede observar en la Figura 16. Los tratamientos TC1 y TC3 también indujeron la formación de callo, pero a partir de los 28 días de su introducción. Mientras que los tratamientos TC4, TC5 y TC6 el inicio de la formación de callo se evidenció a los 35 días.

### Figura 16

*Proceso de inducción a callogénesis in vitro a partir de mesocarpio del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.) en el transcurso de 49 días.*

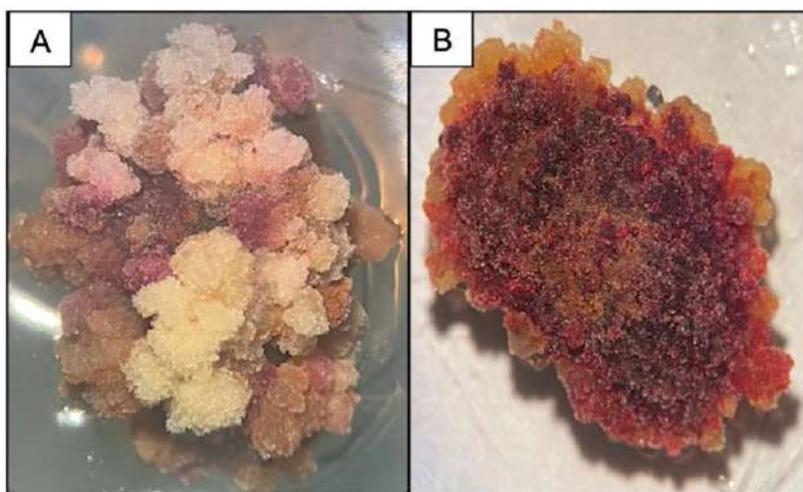


*Nota.* Se muestra el proceso de desdiferenciación celular a partir del mesocarpio de *Hyeronima macrocarpa* Schltr. A) Día uno de siembra, B) Al día siete de su introducción se observa el cambio de color del explante, C) Día 21, el explante toma otro color y empieza la formación del callo, D) El día 28 el explante presenta la formación del 50% de callo y toma un color rojizo, E) Se ha formado un 75% del callo al día 35, y F) El callo se ha formado por completo a los 49 días de su introducción y presenta un color morado-rojizo. Todas las figuras se observaron en un estereoscopio con aumento (1X).

Las características morfológicas del callo se vieron influenciadas por el medio de cultivo, ya que como se observa en la Figura 17A los explantes del mesocarpio de motilón que fueron inoculados en medio de cultivo MS, mientras que la Figura 17B la introducción de los explantes fueron en medio de cultivo WPM. Evidenciando que los dos callos presentan colores diferentes.

### Figura 17

*Diferencias morfológicas que presentan los callos de motilón incubados en medios de cultivo MS y WPM.*

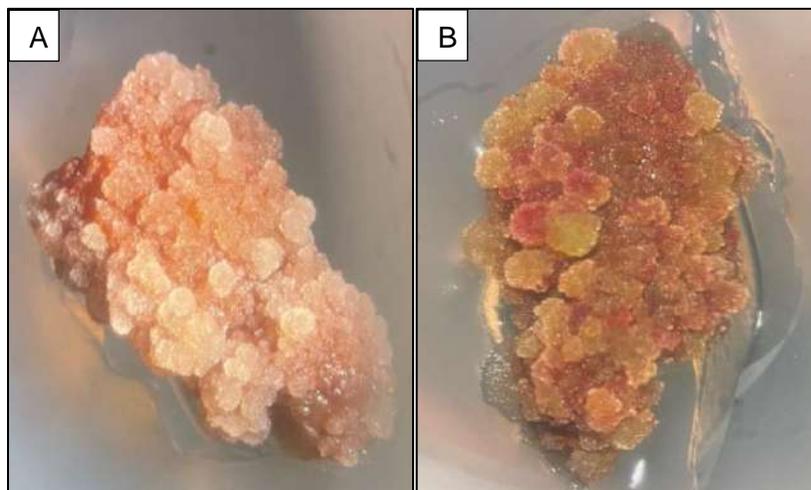


*Nota.* Se muestra el callo de motilón tomadas en el estereoscopio con aumento (1X). A) Inducción de callo en medio de cultivo MS y B) inducción de callo en medio de cultivo WPM.

Estudios preliminares mostraron que la luz influye en la coloración del callo, ya que el callo de la Figura 18A no fue expuesto a la luz durante 28 días y el callo es transparente, mientras que la Figura 18B es el mismo callo, pero expuesto a luz fluorescente a partir del día 29 durante ocho días, evidenciando que este empieza a tornarse de color rojizo. Por lo que para la inducción a callo se utilizó un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad a partir del día 15 de su introducción.

## Figura 18

*Incidencia de la luz sobre la coloración del callo de Hyeronima macrocarpa Schltr.*



*Nota.* A) Callo de 28 días incubado en oscuridad. B) Callo que ha sido expuesto a luz fluorescente durante ocho días, posterior al periodo de incubación sin luz.

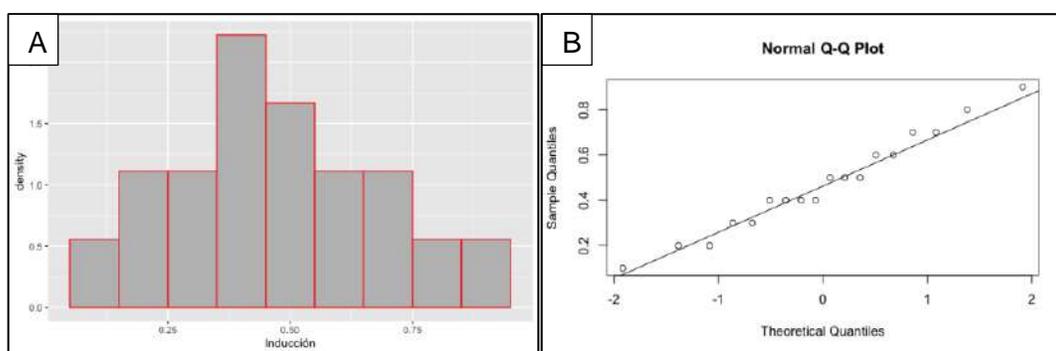
Para evaluar estadísticamente los datos obtenidos del porcentaje de formación de callo se realizó un histograma (Figura 19A), el cual nos indica que los valores siguen una tendencia normal, además se realizó un Q-Q Plot (Figura 19B) evidenciando que los valores no se alejan de la línea de tendencia, corroborando la normalidad de los datos. Esto se corroboró realizando la prueba de Shapiro-Wilks donde el valor P (0.8913) es mayor al nivel de significancia (0,05) por lo cual los datos siguen una distribución normal. En este caso al tener una tendencia normal podemos utilizar la prueba paramétrica ANOVA donde se analizaron dos hipótesis:

- Hipótesis nula: El porcentaje de formación de callo es igual en todos los tratamientos, con 95% de confiabilidad.
- Hipótesis alternativa: El porcentaje de formación de callo es diferente en alguno de los tratamientos, con el 95% de confiabilidad.

Como muestra la Tabla 5 el valor P (0,00091) es menor al nivel de significancia (0,05) por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los porcentajes de formación de callo en los diferentes tratamientos presentan diferencias significativas.

**Figura 19**

*Pruebas de normalidad de los datos obtenidos del porcentaje de inducción a callogénesis del motilón.*



**Tabla 5**

*Análisis de varianza de la inducción a la callogénesis in vitro en los explantes del motilón.*

Análisis de varianza					
Fuente	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Ensayos	5	0,6694	0,13389	12,68	0,00091
Residuals	12	0,1267	0,01056		

El test de Duncan (Tabla 6) indica que hubo diferencias significativas en el porcentaje de inducción a callo en los tratamientos. El medio de cultivo WPM suplementado con 4mg/l de 2,4-D y 1mg/L de 6-BAP (TC2) fue el más efectivo para inducir la formación de callo del motilón con un porcentaje de inducción del 80%, mientras que el tratamiento menos efectivo fue el medio de cultivo MS suplementado con 5mg/l de 2,4-D y 1,25 mg/L de 6-BAP, con un porcentaje de inducción del 27%. Esto se corroboró con el diagrama de barras (Figura 20) donde se puede evidenciar las diferencias significativas entre tratamiento, siendo el tratamiento TC2 el que tiene un mayor porcentaje de inducción a callogénesis. Además, se realizó el test de Tukey (Anexo 1 Tabla 11).

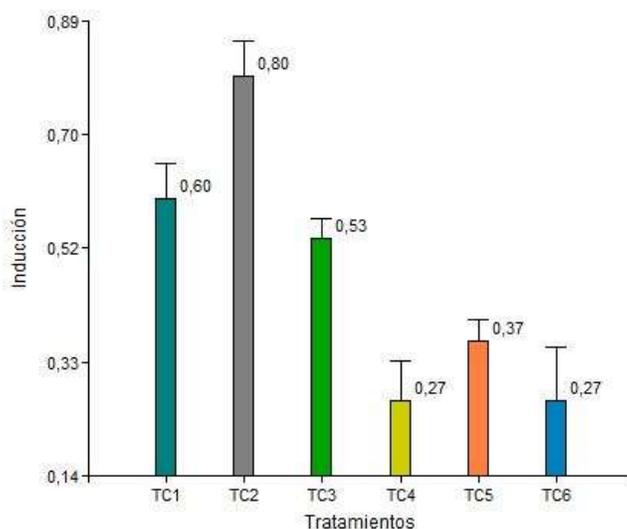
**Tabla 6**

*Test: Duncan Alfa=0.05 de la etapa de inducción a callogénesis.*

<b>Tratamientos</b>	<b>n</b>	<b>Medias</b>	<b>E.E.</b>	<b>Agrupación</b>	
<b>TC6</b>	3	0,27	0,06	A	
<b>TC4</b>	3	0,27	0,06	A	B
<b>TC5</b>	3	0,37	0,06	A	B
<b>TC3</b>	3	0,53	0,06	C	
<b>TC1</b>	3	0,60	0,06	C	
<b>TC2</b>	3	0,80	0,06	D	

## Figura 20

Diagrama de barras de las medias de cada tratamiento utilizado en la inducción a callogénesis de mesocarpio del motilón.



*Nota.* El diagrama de barras nos indica que la media más alta de porcentaje de inducción a callo lo tiene el tratamiento TC2.

### Cuantificación de antocianinas del callo *in vitro* mediante el método espectroscópico diferencial de pH

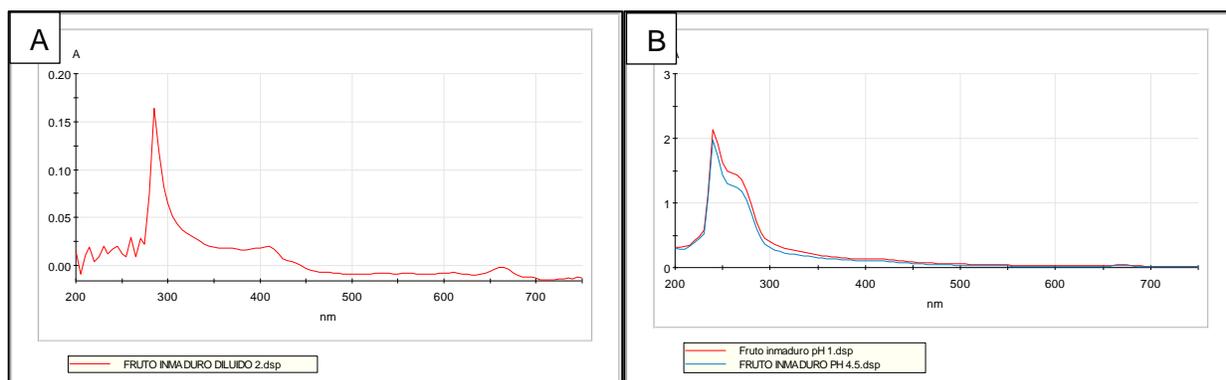
Para la determinación de antocianinas totales se tomó los callos de *Hyeronima macrocarpa* Schltr. del tratamiento de inducción TC2, ya que fue el que obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo, además, según Alappat & Alappat (2020) las antocianinas son de color rojo y morado, características que presentaron los callos inducidos con el tratamiento TC2.

Las antocianinas se analizaron aplicando espectroscopía de absorción, cuantificando la concentración de las mismas. Según Santacruz (2011) este compuesto tiene un pico de

absorción en un ancho de banda entre los 465 y 550nm dependiendo de la antocianina. Como se utilizó el fruto en estado inmaduro para la inducción a callo, se realizó un extracto del mismo para evidenciar la presencia de antocianinas. En la Figura 21A el extracto del fruto inmaduro no presenta un pico de absorción en el rango de banda establecido, esto se comprobó realizando un espectro a pH 1,0 donde las antocianinas son estables, y a pH 4,5 donde las mismas se degradan (Figura 21B), con lo cual podemos observar que el extracto no contiene este metabolito secundario.

## Figura 21

*Características espectrales de la antocianina del motilón (Hyeronima macrocarpa Schltr.) inmaduro.*



Nota. A) Espectrofotometría UV-Vis del extracto de fruto del motilón inmaduro.

B) Espectrofotometría UV-Vis del extracto del fruto inmaduro del motilón a pH 1 y pH 4,5.

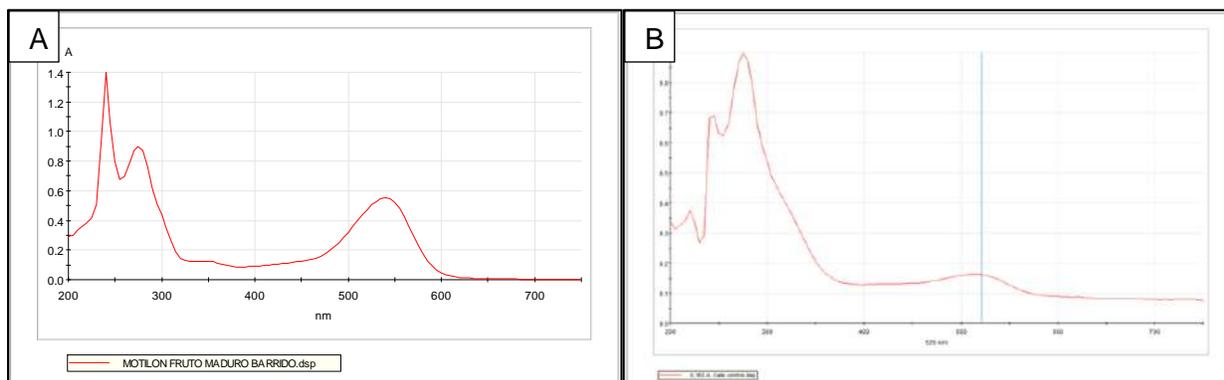
Para evidenciar la presencia de antocianinas en el fruto de *Hyeronima macrocarpa* Schltr., realizamos un extracto con el fruto completamente maduro (Figura 22A), donde se puede observar que hay un pico de absorción en una longitud de onda de 530nm, comprobando así la presencia de este metabolito secundario en el fruto maduro. Por otra parte, en la Figura 22B observamos el espectro del extracto del callo del mesocarpio del motilón,

donde se puede observar un pico de absorción a 520nm, rango en el que se encuentran las antocianinas, con lo cual se corrobora la presencia de este metabolito secundario en el callo.

## Figura 22

*Características espectrales de las antocianinas del fruto maduro y del callo del motilón*

*(Hyeronima macrocarpa Schltr.)*



*Nota.* A) Espectro UV-Vis de la antocianina presente fruto maduro del motilón, y B) espectro UV-Vis de la antocianina presente en el callo del motilón.

La cuantificación espectrofotométrica de las antocianinas totales está basada en la absorbancia de luz, por lo cual se utilizó el método espectroscópico de diferencial de pH, el cual consiste en medir las absorbancias a pH 1,0 y pH 4,5 en diferentes longitudes de onda, en este caso se midió a 520nm y 700nm. Estos valores se midieron en el programa Thermo Scientific™ VISIONlite™ Spectrophotometer Software (Anexo 2 Tabla 12). Cuando la muestra no ha sido caracterizada la cuantificación se realiza utilizando como marcador la cianidina 3-glucósido equivalente para la estimación de las antocianinas, por lo tanto, utilizando la ecuación 1 y 2 se obtuvo que el fruto inmaduro contiene una concentración de  $0,049 \pm 0,02\text{mg/g}$  de fruto fresco, mientras que la concentración de antocianinas totales en el callo de motilón fue de  $2,411 \pm 0,065\text{mg/g}$  de callo como se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7**

*Concentración de antocianinas obtenidas en el fruto inmaduro y callo del motilón.*

	<b>Concentración Antocianinas mg/L</b>	<b>Concentración Antocianinas mg/g</b>
<b>Fruto inmaduro 1</b>	0,333	0,032
<b>Fruto inmaduro 2</b>	0,500	0,048
<b>Fruto inmaduro 3</b>	0,667	0,067
<b>Callo T1</b>	24,881	2,463
<b>Callo T2</b>	23,712	2,348
<b>Callo T3</b>	25,048	2,422

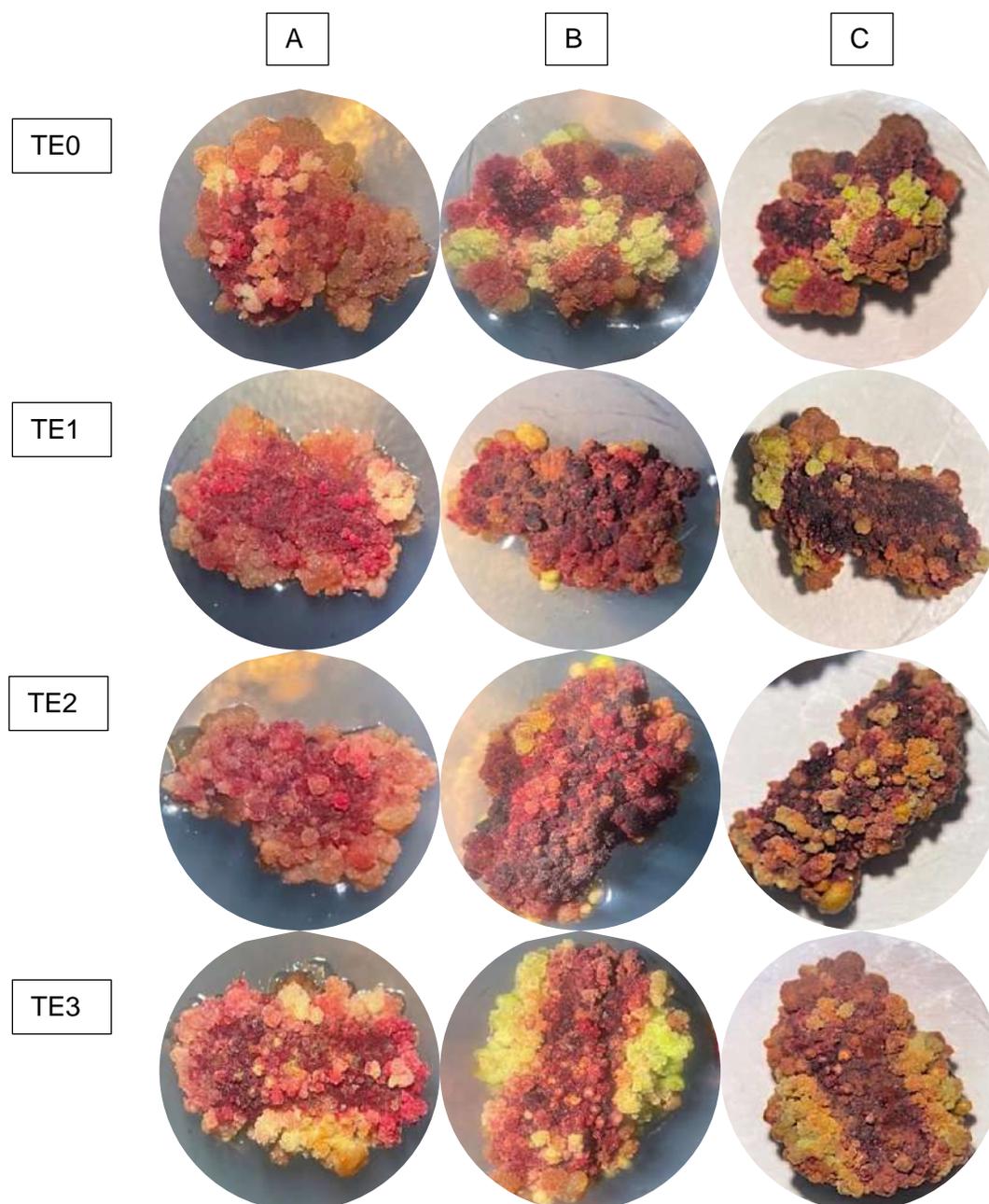
*Nota.* Se muestra las repeticiones de cada tratamiento aplicado en la investigación

### **Efecto del Manitol y Ácido Jasmónico sobre la concentración de antocianinas**

Después de la aplicación del manitol y el ácido jasmónico durante 37 días se pueden visualizar cambios morfológicos en los callos del motilón. Como se puede observar en la Figura 23 TE0 (control) los callos luego de 37 días de cultivo presentan un color café-rojizo, mientras que en la Figura 23B se muestran los callos expuestos a diferentes concentraciones de Manitol (1, 2 y 3mM) durante 30 días, estos presentan cambios en su color ya que son más oscuros y morados, y finalmente la Figura 23C se observa el callo de motilón en los que se aplicó el ácido jasmónico a diferentes concentraciones (20, 40 y 60 $\mu$ M) durante siete días, donde los callos se tornan cafés-morados.

**Figura 23**

*Cambios que presentan los callos de Hyeronima macrocarpa Schltr. durante 37 días de cultivo con los diferentes tratamientos de elicitación*

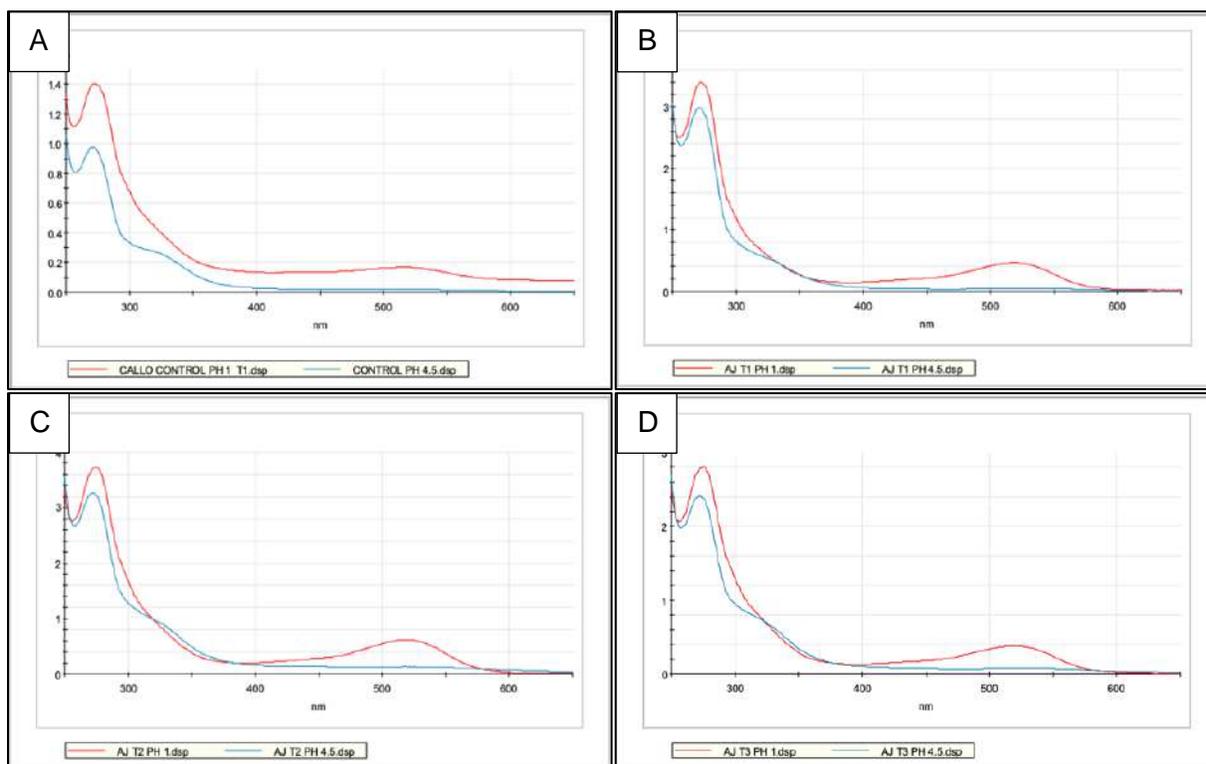


*Nota.* Se muestra los cambios morfológicos de los callos de *Hyeronima macrocarpa* Schltr. con B) manitol 30 días, C) ácido jasmónico siete días.

Para evidenciar la presencia de antocianinas en los callos expuestos a los diferentes tratamientos se realizó un barrido espectrofotométrico UV-Vis utilizando el software Thermo Scientific™ VISIONlite™ Spectrophotometer. Se sabe que las antocianinas son estables a pH ácido (1,0) y se van degradando conforme se aumenta el mismo (4,5). Como se muestra la Figura 24 A, B, C y D se puede observar que hay un pico de absorción a 520nm a pH 1,0 mientras que a pH 4,5 no se puede evidenciar el pico a dicha longitud de onda, con lo cual podemos asegurar la presencia de antocianinas.

**Figura 24**

*Características espectrales de las antocianinas del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) expuestos a diferentes concentraciones de manitol y ácido jasmónico*



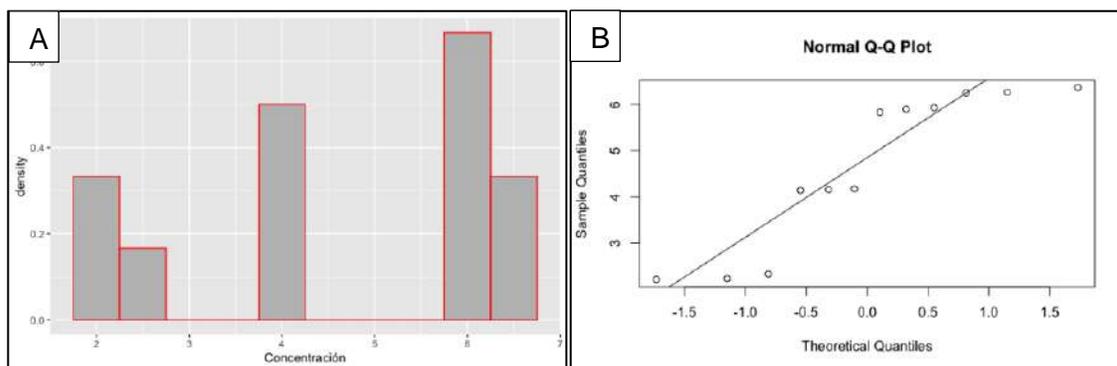
*Nota.* Espectrofotometría UV-Vis de la antocianina presente en callo. A) TE0, B) TE1, C) TE2 y D) TE3.

El manitol y el ácido jasmónico estimulan la biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios, para esta investigación se utilizaron los dos elicitores para evaluar si aumentan la concentración de antocianinas en el callo del motilón. Mediante el método espectroscópico diferencial de pH el cual consiste en medir las absorbancias a pH 1,0 y pH 4,5 a una longitud de onda de 520nm y 700nm (Anexo 3 Tabla 13), se cuantificó la concentración de antocianinas presentes en cada uno de los extractos. Los resultados de las antocianinas totales del estudio se presentan en la Tabla 8.

Al realizar el histograma (Figura 25A), podemos observar que los datos son dispersos y no presentan una tendencia normal, esto se comprobó con la Figura 25B donde podemos ver que ciertos valores se encuentran alejados de la línea de tendencia. Para verificar este supuesto se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, donde el valor P (0,0192) obtenido de este test es menor que el nivel de significancia (0,05) comprobando que los datos no tienen normalidad. Por lo tanto se realizó pruebas no paramétricas para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

## Figura 25

*Pruebas de normalidad de los datos obtenidos de la cuantificación de antocianinas en el callo del motilón expuesto a manitol y ácido jasmónico.*



**Tabla 8**

*Concentración de antocianinas totales presentes en el callo de motilón expuesto a los diferentes tratamientos con los elicitores.*

<b>Tratamientos</b>	<b>Concentración antocianinas mg/L</b>	<b>Concentración antocianinas mg/g</b>
<b>TE0.1</b>	23,378	2,338
<b>TE0.2</b>	22,377	2,238
<b>TE0.3</b>	22,210	2,221
<b>TE1.1</b>	59,281	5,928
<b>TE1.2</b>	58,947	5,895
<b>TE1.3</b>	58,279	5,828
<b>TE2.1</b>	62,454	6,245
<b>TE2.2</b>	62,621	6,262
<b>TE2.3</b>	63,623	6,362
<b>TE3.1</b>	41,413	4,141
<b>TE3.2</b>	41,580	4,158
<b>TE3.3</b>	41,747	4,175

*Nota.* Se muestra la concentración de antocianinas con sus repeticiones de cada tratamiento aplicado en la investigación.

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis donde el P valor (0,0155) es menor que el nivel de significancia (0,05), es decir la diferencia entre los tratamientos es estadísticamente significativa. Además, se realizó el test de Duncan (Tabla 9), este test prueba las diferencias entre las medias, empezando con la media de mayor valor contra la segunda más grande, y así sucesivamente, evidenciando que el tratamiento TE2 tiene la media más alta con una concentración de antocianinas totales de  $6,290 \pm 0,160\text{mg/g}$ . Además, en la Tabla 10 se muestra los valores de la prueba de intervalos de confianza, donde se muestran las medias de la concentración de cada uno de los tratamientos.

**Tabla 9**

*Test: Duncan Alfa=0.05 de las concentraciones de antocianinas presentes en el callo del motilón al ser expuestos a los diferentes tratamientos de elicitación.*

<b>Tratamientos</b>	<b>n</b>	<b>Medias</b>	<b>E.E.</b>	<b>Agrupación</b>
<b>TE0</b>	3	2,27	0,03	A
<b>TE3</b>	3	4,16	0,03	B
<b>TE1</b>	3	5,88	0,03	C
<b>TE2</b>	3	6,29	0,03	D

**Tabla 10**

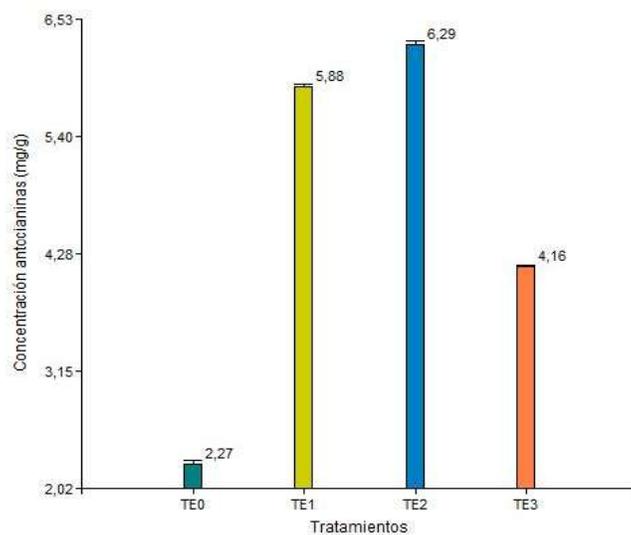
*Intervalos de confianza de los datos obtenidos en la cuantificación de antocianinas del callo de motilón con los diferentes tratamientos de elicitación.*

Tratamientos	Variable	Parámetro	Estimación	E.E.	n	LI (95%)	LS (95%)
TE0	Concentración	Media	2,27	0,04	3	2,11	2,42
TE1	Concentración	Media	5,88	0,03	3	5,76	6,01
TE2	Concentración	Media	6,29	0,04	3	6,13	6,45
TE3	Concentración	Media	4,16	0,01	3	4,12	4,20

En la Figura 26 se puede evidenciar que existen diferencias significativas en la concentración de metabolitos secundarios debido a la adición de manitol y ácido jasmónico al medio de cultivo. El tratamiento TE2 (2mM/L de manitol y 20µM/L de ácido jasmónico) fue la más efectiva para estimular la producción de antocianinas en el callo de manera significativa obteniendo una concentración de  $6,290 \pm 0,160$  mg/g de callo, mientras que el tratamiento TE3 (3mM/L de manitol y 60µM/L de ácido jasmónico) tuvo menor acumulación de este metabolito teniendo una concentración de  $4,160 \pm 0,040$  mg/g de callo, sin embargo esta concentración es mayor que del tratamiento control que se obtuvo una concentración de antocianinas de  $2,270 \pm 0,155$ mg/g de callo.

**Figura 26**

Concentración de antocianinas en el callo *in vitro* de mesocarpio del motilón con los diferentes tratamientos de elicitación.



*Nota.* El diagrama de barras nos indica que el tratamiento TE2 es el que logra inducir la biosíntesis y mayor acumulación de antocianinas en los callos de motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.)

## Capítulo V: Discusión

Las antocianinas pertenecen a los flavonoides, una clase de compuestos con fuertes propiedades antioxidantes. En las últimas décadas se ha visto un aumento constante en el interés de los consumidores en todas las especies de frutas ricas en compuestos bioactivos con actividad antioxidante beneficiosa para la salud, así como en la investigación de estos compuestos. Las bayas y drupas tienen una importancia especial entre otras frutas debido a sus propiedades organolépticas únicas, como color, sabor, olor, valor nutricional y la posibilidad de diversas aplicaciones en la gastronomía, industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Gündeşli *et al.*, 2019). El motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) se considera una fruta de tipo drupa comestible el cual contiene altos niveles de antocianinas, las cuales presentan características antioxidantes (Martínez, 2019), además, se ha descubierto que las antocianinas inhiben el crecimiento de las células cancerosas y previenen la aparición de enfermedades coronarias. Por lo que se ha visto impulsado el desarrollo de nuevas técnicas para la producción de antocianinas, el cultivo *in vitro* de células vegetales se ha sugerido como una metodología viable para la producción de algunos metabolitos secundarios de interés.

En el presente proyecto de investigación, se analizó distintas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal para la inducción a callogénesis a partir del mesocarpio del motilón, además, se evaluó el efecto del manitol y el ácido jasmónico, ya que estos elicitores intervienen en la síntesis y acumulación de antocianinas totales.

### **Desinfección del fruto motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.)**

Un requisito previo para la introducción de cualquier material vegetal en cultivo *in vitro* es la esterilización superficial del explante para eliminar los microorganismos adheridos, lo que suele realizarse con soluciones acuosas de desinfectantes como hipoclorito de sodio y solución

de detergente (Wawrosch & Zotchev, 2021). Mediante la aplicación del protocolo de desinfección de los frutos de motilón se obtuvo un porcentaje de contaminación del 27%. Al no existir reportes bibliográficos de cultivo *in vitro* de esta especie, la contaminación puede deberse a que el motilón se encuentra en bosques silvestres del Ecuador. Además, según Iglesias (2016) el 29% de los frutos presenta un agujero en su tegumento, donde se encontró un insecto el cual pertenece al orden Himenóptera, este insecto ataca únicamente a los frutos, perfora el pericarpio y destruye los embriones, ya que se alimentan de los mismos. Este ataque es mayor entre los meses de julio a octubre, fechas que coinciden con la recolección de los explantes para su introducción. Teniendo en cuenta estas observaciones y la contaminación del 96% al aplicar el protocolo sugerido por Córdova *et al.* (2014), se modificó dicho protocolo añadiendo una concentración de Fungicida-Bactericida al 3% (v/v) e hipoclorito de sodio 10% (v/v).

### **Inducción a callogénesis**

Los explantes que han pasado por el proceso de desinfección son inoculados en un medio de cultivo semisólido que contiene cantidades adecuadas de nutrientes, sobre todo reguladores de crecimiento vegetal, y se cultivan en condiciones ambientales controladas. Dependiendo del material de partida y del medio de cultivo nutritivo, se pueden establecer diferentes tipos de cultivos que se clasifican como cultivos celulares (suspensiones celulares, protoplastos o células gaméticas), cultivos de tejidos (callos o tejidos diferenciados) o cultivos de órganos (brotes, raíces o embriones cigóticos) (Wawrosch & Zotchev, 2021). Como se ha visto un gran interés en el consumo de frutos de tipo baya y drupa ya que contienen una concentración alta de antocianinas, para este estudio se indujo la formación de callo a partir del mesocarpio del motilón, ya que según Santacruz *et al.* (2012) encontró antocianinas en el fruto

fresco, por lo que en este estudio se cuantificó el extracto a partir de callo del mesocarpio del motilón para determinar su concentración.

Según Roca & Mroginski (1991) afirman que utilizar una alta proporción de auxina:citoquinina induce la formación de callo. En esta investigación los reguladores de crecimiento indujeron la formación de callo a partir del mesocarpio del fruto inmaduro de *Hyeronima macrocarpa* Schltr. en los tratamientos TC1, TC2, TC3, TC4, TC5 y TC6, variando el porcentaje de formación de callo en todos los tratamientos, siendo TC2, el cual contiene una proporción de auxina:citoquinina (4:1) (4mg/L de 2,4-D y 1mg/L de 6-BAP) fue el que indujo mayor formación de callo (80%). Estos resultados concuerdan con Córdova *et al.* (2014) quienes obtienen callos tratando los explantes del mesocarpio de camu camu (*Myrciaria dubia* Kunth.) con 2mg/L de 2,4-D y 0,1mg/L de 6-BAP. Por otra parte, Alayón *et al.* (2006) obtienen callos del mesocarpio de manzana utilizando 1mg/L de 2,4-D y 0,1mg/L de 6-BAP. Sin embargo, la formación de callo en *Myrciaria dubia* fue del 8% al 55% utilizando medio de cultivo MS, al igual que la formación de callo en pulpa de manzana. Mientras que para la formación de callo de *Hyeronima macrocarpa* Schltr. se utilizó el medio de cultivo WPM, obteniendo un porcentaje mayor (80%), sin embargo, en el medio de cultivo enriquecido con sales minerales de MS la formación de callo del motilón fue de 40%, el cual concuerda con la investigación de Córdova *et al.* (2014). Por otra parte, Alayón *et al.* (2006) & Córdova *et al.* (2014) afirman que al utilizar frutos inmaduros logran inducir a callogénesis en un 20% y 30% más que utilizando frutos maduros. Además, los explantes de mesocarpio inmaduro son más callogénicos que los de mesocarpio maduro.

Por lo general, los cultivos se generan a partir de los órganos o tejidos vegetales en los que se acumula naturalmente el principio activo deseado. Por ejemplo, las raíces se utilizan para la producción de ginsenósido (Rahimi *et al.*, 2016), las semillas de *Trigonella* spp. se

utilizan para la producción de diosgenina (Chaudhary *et al.*, 2015), las hojas de *Catharanthus roseus* se utilizan para la producción de vinblastina (Antonio *et al.*, 2013; Parthasarathy *et al.*, 2020) y el callo a partir del pericarpio para la producción de resveratrol (Mihai *et al.*, 2011). En esta investigación para la producción de antocianinas se indujo la formación de callo a partir del mesocarpio de *Hyeronima macrocarpa* Schltr.

La producción de metabolitos secundarios mediante el cultivo de tejidos y órganos vegetales ha sido muy estudiada. Se han realizado ensayos para mejorar la productividad de dichos compuestos, composición del medio de cultivo y exposición a la luz (Ramakrishna & Ravishankar, 2011), así mismo se han hecho investigaciones para inducir la biosíntesis y acumulación de antocianinas probando diferentes concentraciones de fitohormonas como 2,4-D, ácido indol acético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) en suspensiones celulares de fresa (*Fragaria ananassa*) (Nakamura *et al.* 1999), *Daucus carota* (Narayan *et al.* 2005) y *Ipomoea batatas* (Nozue *et al.* 1997) las cuales ayudaron al crecimiento y síntesis de antocianinas. Según Ramakrishna & Ravishankar (2011), señalan que una menor concentración de 2,4-D en el medio de cultivo limitó el crecimiento celular y mejoró la producción de antocianinas. Sin embargo, en nuestra investigación se utilizó una concentración de 4mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de 6-BAP, ya que a menor concentración de reguladores de crecimiento no se indujo la formación de callo, a pesar de ello, al momento de la cuantificación de los extractos de callo de *Hyeronima macrocarpa* Schltr. se encontró una concentración de 2,42 mg/g utilizando dicha concentración de fitorreguladores.

Así mismo, las condiciones de cultivo *in vitro* simulan una combinación de factores de estrés a las células vegetales cultivadas como heridas de tejidos extirpados, concentraciones de reguladores de crecimiento, concentraciones bajas o altas de sal, niveles de bajos o altos de luz. Esto puede llevar a la inducción de vías de los metabolitos secundarios, dependiendo del

estado fisiológico de las células vegetales (Isah, 2019). Por lo tanto, la elicitación basada en el principio de la inducción de estrés es la estrategia más eficaz para aumentar la producción de los metabolitos mediante el uso de elicitores bióticos y abióticos que promueven la biosíntesis de las moléculas cuando se añaden al medio de cultivo (Narayani & Srivastava, 2017).

La elicitación es un método viable para aumentar el contenido de productos naturales y mejorar la calidad de plantas, frutas y verduras. La obtención de cultivos *in vitro* activa la respuesta de defensa de la planta y aumenta la síntesis de metabolitos secundarios en mayores proporciones. En este contexto, la luz se ha convertido en un elicitor único y eficaz para mejorar la producción *in vitro* de metabolitos secundarios farmacológicamente importantes (Hashim *et al.*, 2021). Las luces fluorescentes son una fuente importante de energía lumínica para estimular la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro*, por lo cual para la inducción de la callogénesis del motilón, los explantes fueron sometidos a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, después de 15 días de su introducción, obteniendo así un callo de color morado-rojizo. Según Hashim *et al.* (2021) en estudios anteriores han confirmado que, dependiendo de las especies de plantas, la calidad de la luz tiene un impacto directo en las respuestas morfológicas y fisiológicas. Así mismo en el estudio de Ahmad *et al.* (2016) reporta que la mayor acumulación de metabolitos secundarios en callos de *Stevia rebaudiana* se dio cuando los callos fueron sometidos a luz azul.

La temperatura es otro factor importante que afecta la producción de antocianinas, según Gómez & Jiménez (2011) las condiciones bajas de temperatura aumentan la síntesis de antocianinas en petunias, por el contrario, en híbridos de *Aster* donde a temperatura promedio de 25 °C la concentración de antocianinas es mayor. Por lo que para la inducción de la callogénesis del motilón la temperatura de incubación fue de 25 ± 2 °C. Sin embargo, Simões *et*

*al.* (2009) combinó la luz y la temperatura para la producción de antocianinas en callo de *Cleome rosea*, evidenciando el aumento de la concentración de este metabolito secundario.

Como se mencionó antes la producción de metabolitos secundarios *in vitro* no sigue el mismo modelo que los cultivos *ex vitro*, estas diferencias pueden deberse a la falta de estímulos, a la maquinaria enzimática, a la poca o nula expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de antocianinas.

### **Cuantificación de antocianinas del callo de *Hyeronima macrocarpa* Schltr.**

Utilizando el método diferencial de pH el contenido de antocianinas en el fruto del motilón fresco es de 2,4 mg/g (Rojas *et al.*,2017). Lo cual concuerda con el contenido de antocianinas totales encontrado en el callo del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) el cual es de 2,41 mg/g, sin embargo esta concentración es mucho menor a la reportada por Santacruz *et al.* (2012) donde el extracto del fruto contiene 29,64 mg/g de antocianinas, esto puede diferir dependiendo el método de extracción y cuantificación, ya que se utilizó HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia), al contrario a nuestro estudio en el que se utilizó el método espectroscópico diferencial de pH.

Al no existir información bibliográfica sobre cuantificación de antocianinas en callo de motilón ni de otro género, los datos obtenidos son comparados con estudios realizados en frutos frescos. Según Ponder *et al.* (2021) las especies de bayas más oscuras son las que contienen más antocianinas totales, la mora (*Rubus* L.) tiene un contenido de antocianinas totales de 94,76 mg/100g, grosella negra (*Ribes nigrum* L.) 113,79 mg/100g, frambuesa (*Rubus idaeus* L.), arándano de arbusto alto (*Vaccinium corymbosum* L.) y en grosella roja (*Ribes* L.) 4,95 mg/100g. Sin embargo, dependiendo del cultivar el contenido total de antocianinas de

grosella negra Titania acumuló el mayor contenido total de antocianinas (127,15 mg/100g). Para la cuantificación de los extractos de los frutos tipo baya se utilizó HPLC. En la investigación de Moyer *et al.* (2002), utilizando el método diferencial de pH, la grosella negra (*Ribes nigrum*) contiene 411 mg/100g de antocianinas, uva de vid (*Vitis vinifera L.*) 35-750 mg/100 g (Bridle *et al.*,1997). Teniendo en cuenta estas investigaciones previas se puede predecir que la producción de antocianinas generadas difiere de forma significativa, por otra parte, la variabilidad de las concentraciones de antocianinas en los diferentes estudios depende del tipo de extracción, condiciones físicas, ambientales, geográficas y de luz en las que se encuentra el fruto. Por lo que es necesario recurrir a estudios biotecnológicos para investigar la variación de estos resultados. Por medio del cultivo de tejidos *in vitro* y la inducción a calogénesis se puede controlar estas variables como la humedad, luz, temperatura, concentración de reguladores de crecimiento, concentración de sal, las cuales influyen directamente en la producción de metabolitos secundarios, obteniendo así resultados más reproducibles.

La extracción de antocianinas es una parte fundamental para su cuantificación, ya que se debe tener en cuenta los factores que alteran la integridad de estos compuestos. Debido a que las antocianinas son compuestos solubles en solventes polares, estas se extraen utilizando metanol o etanol junto con ácido clorhídrico, ácido acético o ácido fórmico. La adición del ácido evita la degradación de las antocianinas (Santacruz, 2011). Para la extracción del callo de motilón se utilizó un compuesto polar (metanol) junto con ácido acético (19:1) v/v acorde con lo citado por Santacruz (2011) y Tipaz *et al.* (2018), de esta manera se evitó la degradación de las antocianinas y se mantuvo su integridad para su cuantificación.

Con lo mencionado anteriormente la sensibilidad de las antocianinas a los cambios de pH se debe a que ejercen un efecto en su estructura y estabilidad. A un pH inferior a 2 el

extracto es más estable por que se encuentra en su forma de ion oxonio o catión flavilio el cual presenta un color rojo, mientras que a un pH más alto pierde el protón y al adicionar una molécula de agua en la posición 2 de la estructura de la antocianina da lugar a una pseudobase o chalcona las cuales son incoloras e inestables (Santacruz, 2011). Para la cuantificación del extracto del motilón se utilizó el método diferencial de pH, donde el extracto se diluyó en tampones a pH 1 y a pH 4,5, evidenciando las diferencias que el pH 1 ejerce en el extracto, ya que toma un color rojo, mientras que a pH 4,5 se torna incoloro.

### **Efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la biosíntesis de antocianinas en el callo de *Hyeronima macrocarpa* Schltr.**

La elicitación es un proceso para inducir la síntesis y acumulación de principios activos en plantas, con el objetivo de asegurar su supervivencia, persistencia y competitividad. La presencia de elicitors biótico y abióticos estimulan la formación de metabolitos secundarios en cultivo de células vegetales (Smetanska, 2008).

El ácido jasmónico (JA) y el jasmonato de metilo (MeJ) actúan como elicitors de varias vías metabólicas. Según Ramakrishna & Ravishankar (2011) se ha demostrado que el MeJ y el AJ son capaces de inducir la biosíntesis y acumulación de varios metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos, compuestos fenólicos, antocianinas, cumarinas y terpenoides en algunas especies vegetales. Además, los jasmonatos han sido asociados con la acumulación de metabolitos secundarios, que también son parte de la respuesta de defensa de la planta. Esto se evidenció en los callos de fruto del motilón ya que en un inicio estos presentaban una concentración de antocianinas de  $2,270 \pm 0,155$ mg/g de callo, mientras que al estar en contacto durante siete días en un medio de cultivo semisólido el cual contenía una concentración de  $40\mu\text{M}$  de ácido jasmónico, la concentración de antocianinas incrementó a  $6,290 \pm 0,160$ mg/g de callo, comprobando así que el AJ estimula la biosíntesis de antocianinas.

El ácido jasmónico ha sido propuesto como un compuesto clave de la vía de transducción de señales involucrada en la elicitación de la biosíntesis de metabolitos secundarios, que participan en las reacciones de defensa de la planta. La aplicación de ácido jasmónico en los cultivos de células vegetales puede inducir la acumulación de metabolitos secundarios (Mihai *et al.*, 2011). Esto podría ser una explicación para la mayor cantidad de antocianinas reportadas en las células de callo cultivadas en el sistema de dos etapas que implica la exposición de manitol durante 30 días y ácido jasmónico por siete días. Además, los elicitors bióticos y abióticos tienen diferentes mecanismos de elicitación y cuando se utilizan en combinación, aumentan la biosíntesis y acumulación de metabolitos en las células cultivadas, este es también el caso de la acumulación de antocianinas en el cultivo de callos del *Hyeronima macrocarpa* Schltr., ya que al utilizar el manitol y el ácido jasmónico estos estimularon la síntesis de este metabolito secundario incrementado su concentración.

Análogamente Zhang *et al.* (2002) analizaron las suspensiones celulares de *Vitis vinífera* tras la adición del ácido jasmónico, la biosíntesis de antocianina se inhibió significativamente cuando se trató con 100 mM de ácido jasmónico y dio lugar a los niveles más bajos de contenido de antocianina, mientras que los cultivos tratados con 1 mM de ácido jasmónico produjeron un 43% más de antocianina que el control no elicitado. Además, el crecimiento celular no se vio afectado significativamente en los cultivos tratados con ácido jasmónico 1 y 10 mM. Sin embargo, el contenido máximo de antocianinas en la suspensión celular se vio al día siete de haberse añadido el ácido jasmónico (20  $\mu$ M) y al estar expuesto a una intensidad lumínica de 8000lux, la concentración de antocianinas fue 13,9 veces superior al del control. En este estudio al aplicar diferentes concentraciones de manitol (1, 2 y 3mM) durante 30 días y ácido jasmónico (20, 40 y 60 $\mu$ M) durante siete días, además, del fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, el tratamiento que contenía 2mM de manitol y 40 $\mu$ M de

ácido jasmónico incrementó la concentración de antocianinas en 2,77 veces en comparación con su control. Comprobando así que combinando el tratamiento con ácido jasmónico y luz fluorescente dio como resultado una mejora sinérgica significativa en la acumulación de antocianinas. Twaij *et al.* (2022) en su estudio de producción de metabolitos secundarios en callos de *Datura innoxia* indica que la adición de manitol en pequeñas cantidades induce el crecimiento del callo, mientras que, al añadir una mayor concentración de manitol, disminuye el crecimiento del mismo, además el manitol provoca estrés en las células vegetales y conduce a un aumento de la producción de compuestos secundarios.

Ozeki & Komamine (1986) identificaron en cultivos celulares de zanahoria que la auxina 2,4-D tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de antocianinas, ya que al añadir 2,4-D al medio de cultivo este promovía la dediferenciación celular, en cambio disminuyó la acumulación de antocianinas. Según Nozue *et al.* (1993) los cultivos celulares de camote expuestos a un medio de cultivo desprovisto de 2,4-D promovieron la biosíntesis de antocianinas. Por el contrario, el añadir citoquininas (6-BAP, kinetina, zeatina) al medio de cultivo estas promovieron la síntesis de antocianinas. Mizukami *et al.* (1998) observaron que la adición de 2,4-D al medio de cultivo induce la acumulación de antocianinas en callos de *Hibiscus sudariffa*, además la combinación de auxina:citoquinina incrementó en mayor grado la síntesis del compuesto en comparación de cuando se añadía solo la auxina. Teniendo en cuenta estas investigaciones, el 2,4-D y 6-BAP estimularon la biosíntesis de antocianinas en el callo de *Hyeronima macrocarpa* Schltr., ya que el fruto inmaduro del motilón de donde se partió para la formación de callo presenta una concentración de antocianinas de  $0,049 \pm 0,02$ mg/g, mientras que el callo de motilón contiene 49,20 veces más antocianinas que el fruto inmaduro. Evidenciando que, no todas las plantas tienen el mismo comportamiento, estas difieren según su familia, género y especie.

Un factor importante que se debe tener en cuenta en la producción de metabolitos secundarios de callos es su edad, ya que según Keskin & Kunter (2008) la mayor producción de trans-resveratrol la obtuvieron en callos de Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) de 12 días ( $62,66 \pm 0.40 \mu\text{g/g}$ ), mientras que a los 15 días esta concentración bajo drásticamente obteniendo una con concentración de  $18,12 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$  de este metabolito. Estos callos fueron sometidos a luz UV durante 15 minutos. Por otra parte, Zhang *et al.* (2001) encontró que el mayor contenido de antocianinas en la suspensión celular de *Vitis vinifera* se obtuvo a los dos días de la elicitación con 10 mM de ácido jasmónico, mientras que la concentración de antocianinas en el día cuatro fue menor. En el caso del callo de motilón se determinó su concentración a los 49 días de su inducción obteniendo una concentración de  $2,411 \pm 0,065 \text{ mg/g}$  de antocianinas siendo esta mayor en comparación con los callos de 97 días donde la concentración de antocianinas fue de  $2,270 \pm 0,155 \text{ mg/g}$ . Cabe señalar que la concentración del metabolito no presenta cambios drásticos, sin embargo, el callo de 147 días de cultivo empieza a perder el color morado rojizo característico del callo del motilón tornándose café y su concentración de antocianinas disminuye a  $0,771 \text{ mg/g}$ .

La concentración de antocianinas en los callos expuestos a los elicitores presentaron diferencias significativas entre cada tratamiento: TE1 ( $5,88 \pm 0,125 \text{ mg/g}$ ), TE2 ( $6,29 \pm 0,16 \text{ mg/g}$ ) y TE3 ( $4,16 \pm 0,04 \text{ mg/g}$ ), donde la concentración menor de antocianinas la presenta el tratamiento TE3 (medio de cultivo WPM + 4mg 2,4-D + 1mg de 6-BAP + 3mM de manitol +  $60\mu\text{M}$  de ácido jasmónico). Este hecho se debe a lo reportado por Belchí (2012), donde en su estudio de suspensiones celulares de callo de *Vitis vinifera* cv Monastrell al aplicar una mayor concentración de ácido jasmónico (270 y  $450 \mu\text{M}$ ) la acumulación del metabolito no incrementa en cuanto al control, mientras que con una concentración de AJ (5 y  $25 \mu\text{M}$ ) aumenta 1,7 veces con comparación con su control. Sin embargo, el mejor resultado lo obtiene con una concentración de AJ ( $100\mu\text{M}$ ) siendo esta 3,1 veces superior al control. Con lo cual se

corroborar este hecho, ya que el tratamiento que contiene menor contenido de antocianinas totales es el que presenta mayor concentración de AJ. Además, se debe tener en cuenta que son diferentes metabolitos secundarios y para el estudio del resveratrol se parte de suspensiones celulares, mientras que el contenido de antocianinas se analiza en callo.

El cultivo de células y tejidos vegetales es una alternativa para la extracción de metabolitos secundarios a partir de material vegetal. Por medio de investigaciones se ha visto que los sistemas de cultivo *in vitro* de plantas como el cultivo de callos, suspensiones celulares y los cultivos de órganos vegetales, tiene un potencial prometedor como fuentes de principios activos. Es importante el progreso que ha tenido la biotecnología en la actualidad para aclarar y comprender las rutas biosintéticas de diferentes compuestos, además, la manipulación genética ha ampliado las posibilidades de utilizar la ingeniería metabólica para la producción de un sinnúmero de metabolitos secundarios.

## Capítulo VI: Conclusiones

- El protocolo de desinfección aplicado a los frutos del motilón (detergente 2%, fungicida-bactericida 3%, e hipoclorito de sodio 10%) permitió que el 73% de los explantes introducidos no presenten contaminación fúngica ni bacteriana, para su posterior inducción a callogénesis.
- Se estableció que el medio de cultivo WPM suplementado con 4mg/L de 2,4-D y 1mg/L de BAP indujo la mayor formación de callo (80%) en los explantes introducidos de mesocarpio del motilón, mientras que el medio de cultivo MS suplementado con 5mg/L de 2,4-D y 1,25mg/L de BAP presentó el menor porcentaje de inducción de callo (27%).
- Mediante el método espectroscópico diferencial de pH se cuantificó la concentración de antocianinas totales presentes el fruto inmaduro y en el callo de *Hyeronima macrocarpa* Schltr., para lo cual se realizó un extracto con el solvente (metanol:ácido acético 19:1) donde la concentración del fruto inmaduro es  $0,049 \pm 0,02$ mg/g y en el callo de motilón es  $2,411 \pm 0,065$ mg de antocianinas por cada gramo de callo. Evidenciando que el cultivo *in vitro* es una técnica que nos permite la producción de metabolitos secundarios como es el caso de las antocianinas.
- El sistema de cultivo de dos etapas con un tratamiento combinado de manitol (2mM) y ácido jasmónico (40 $\mu$ M) dio lugar a la acumulación de antocianinas en la biomasa del callo, obteniendo mediante el método espectroscópico diferencial de pH una concentración de  $6,290 \pm 0,160$ mg por gramo en comparación a su control que contiene  $2,270 \pm 0,155$ mg/g aumentando en 2,77 veces el contenido de antocianinas.

## Capítulo VII: Recomendaciones

- Además de las antocianinas se debería analizar otros metabolitos secundarios en el callo de *Hieronima macrocarpa* Schltr., ya que en los espectros se puede observar que existen otros picos de absorción aún no descritos.
- Evaluar otros elicitores que estimulen la biosíntesis y acumulación de antocianinas y de otros metabolitos secundarios.
- Establecer suspensiones celulares del callo del motilón, ya que según la bibliografía los metabolitos secundarios se producen en mayor cantidad por esta técnica de cultivo de tejidos.
- Se sabe que las antocianinas son asimiladas entre el 1 y 2% en el cuerpo humano, esto se debe a la inestabilidad que estas presentan, por lo que se recomienda investigar un proceso de extracción de las misma a partir del callo de motilón en donde ya se ha demostrado su presencia. De esta manera se podría usar las antocianinas extraídas para la producción de tabletas, jarabes, o soluciones que aumenten la biodisponibilidad al momento de ingerirlas.

## Bibliografía

- Ahmad, N., Rab, A., & Ahmad, N. (2016). Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus culture of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Journal of Photochemical and Photobiology B: Biology*, 154, 51-56.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.11.015>
- Alappat, B., & Alappat, J. (2020). Anthocyanin Pigments: Beyond Aesthetics. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23), 5500. <https://doi.org/10.3390/molecules25235500>
- Alayón, P., Tarragó, J., Mroginski, L., Pagano, E., Sozzi, G. (2006). *Obtención de callos por cultivo in vitro de pulpa de manzana cv 'Anna': Detección de actividad de Alfa-L-arabinofuranosidasa*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional del NORDESTE].
- Alcántara-Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Amagua, B. (2020). *Aplicación De Elicitores En Plantas De Babaco Para La Obtención De Metabolitos Secundarios Y Tolerancia A Fusarium oxysporumf. sp. vasconcellae*. [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE].
- Antonio, C., Mustafa, N. R., Osorio, S., Tohge, T., Giavalisco, P., Willmitzer, L., Rischer, H., Oksman-Caldentey, K. M., Verpoorte, R., & Fernie, A. R. (2013). Analysis of the interface between primary and secondary metabolism in *catharanthus roseus* cell cultures using (13) C-stable isotope feeding and coupled mass spectrometry. *Molecular plant*, 6(2), 581–584. <https://doi.org/10.1093/mp/sss156>

- Arias, M., Angarita, M., Aguirre, A., Restrepo, J., & Montoya, C. (2009). Strategies For The Improvement Of Secondary Metabolites Production In Plan Cell Culture. *Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62, 4881–4895.
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)*, 2(3), 119-145. <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
- Bajguz, A., & Piotrowska, A. (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70(8), 957-969. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.006>
- Bakshi, P., Kohli, S. K., Bali, S., Kaur, P., Kumar, V., Sharma, P., & Bhardwaj, R. (2022). No and phytohormones cross-talk in plant defense against abiotic stress. *In Nitric Oxide in Plant Biology*. 573-596. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818797-5.00028-5>
- Belchí, S. (2012). *Caracterización de la producción de resveratrol y análisis de proteínas en cultivos celulares de Vitis vinifera cv Monastrell*. [Tesis doctoral, Universidad de Murcia].
- Bridle, P.; Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colors – selected aspects. *Food Chem*, 58(1-2), 103–109. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00222-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00222-1)
- Cardoso, J. C., de Oliveira, M. E. B. S., & Cardoso, F. de C. I. (2019). Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37(2), 124–132. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620190201>
- Chatham, L., Paulsmeyer, M., & Juvik, J. (2019). Prospects for economical natural colorants: insights from maize. *Theoretical and Applied Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03414-0>
- Chaudhary, S., Chikara, S. K., Sharma, M. C., Chaudhary, A., Alam Syed, B., Chaudhary, P. S., Mehta, A., Patel, M., Ghosh, A., & Iriti, M. (2015). Elicitation of Diosgenin Production in

- Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) Seedlings by Methyl Jasmonate. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 29889–29899.  
<https://doi.org/10.3390/ijms161226208>
- Chu, J., Fang, S., Xin, P., Guo, Z., & Chen, Y. (2017). Quantitative analysis of plant hormones based on LC-MS/MS. *Hormone metabolism and signaling in plants*, 471-537.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128115626000141?via%3Dihub>
- Costa, M. L. (2005). Análisis de la senescencia postcosecha de broccoli – Efecto de la aplicación de tratamientos físicos [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata].
- Córdova, A., Cobos, M., Imán, S., & Castro, J. C. (2014). Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu. *Scientia Agropecuaria*, 5, 25–34. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.03>
- Eker, M. E., Aaby, K., Budic-Leto, I., Brnčić, S. R., El, S. N., Karakaya, S., Simsek, S., Manach, C., Wiczowski, W., & Pascual-Teresa, S. (2019). A Review of Factors Affecting Anthocyanin Bioavailability: Possible Implications for the Inter-Individual Variability. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(1), 2. <https://doi.org/10.3390/foods9010002>
- Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lyan, B., Lamaison, J. L., & Scalbert, A. (2007). Strawberry pelargonidin glycosides are excreted in urine as intact glycosides and glucuronidated pelargonidin derivatives in rats. *The British journal of nutrition*, 98(6), 1126–1131.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114507764772>
- Garay-Arroyo, A., De la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E., & Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. *Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S166519952014000100003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S166519952014000100003&lng=es&tlng=es)

- García, J. (2019). *Optimización De La Extracción De Antocianinas De Hieronyma Macrocarpa Müll. Arg (Motilón) Mediante Metodología De Superficie De Respuesta*. [Tesis de pregrado, Universidad Estatal Amazónica].
- Garzón, G. (2008). Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 27–36.
- Gómez, J., Jiménez, V. M. (2011). Producción *in vitro* de antocianinas – revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 16(1), 3–20. <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027887001.pdf>
- Gündeşli, M. A., Korkmaz, N. & Okatan, V. (2019). Polyphenol content and antioxidant capacity of berries: A review. *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 3(2), 350-361. <https://dergipark.org.tr/en/pub/ijafsls/issue/47015/649812>
- Halder, M., Sarkar, S., & Jha, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in life sciences*, 19(12), 880–895. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900058>
- Hashim, M., Ahmad, B., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, S. (2021). Comparative Effects of Different Light Sources on the Production of Key Secondary Metabolites in Plants *In Vitro* Cultures. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(8), 1521. <https://doi.org/10.3390/plants10081521>
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*, 1, 163–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>
- Iglesias, G. (2016). *Evaluación De La Propagación De Hyeronima Macrocarpa Schltr. (Motilón) En Tres Tipos De Sustratos, En La Parroquia Ulba, Cantón Baños De Agua Santa*,

- Provincia De Tungurahua*. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica De Chimborazo].
- Isah T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological research*, 52(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Ishibashi, M. (1999). Miscellaneous Natural Products Including Marine Products, Pheromones, Plant Hormones, and Aspects of Ecology. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 8, 415-650. <https://www.sciencedirect.com/journal/phytochemistry/vol/59/issue/2>
- Kapoor, S., Raghuvanshi, R., Bhardwaj, P., Sood, H., Saxena, S., & Chaurasia, O.P. (2018). Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. *Journal of Photochemical and Photobiology. B, Biology*, 183: 258-265. 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.018
- Kazeroonian, R., Mousavi, A., Jari, S., & Tohidfar, M. (2018). Factors Influencing *in Vitro* Organogenesis of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Resomee Splendid'. *Iranian Journal of Biotechnology*, 16, 132-139. 10.21859/ijb.1454
- Keskin N, Kunter B (2008). Production of trans-resveratrol in "Cabernet Sauvignon" (*Vitis vinifera* L.) callus culture in response to ultraviolet-C irradiation. *Vitis* 47(4),193-196. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2730891>
- Lao, F., Giusti, M.M. (2016). Quantification of Purple Corn (*Zea mays* L.) Anthocyanins Using Spectrophotometric and HPLC Approaches: Method Comparison and Correlation. *Food Anal. Methods*, 9, 1367–1380. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0318-0>
- Levitus, G., Echennique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski. (2010). *Biotecnología Y Mejoramiento Vegetal II*. ArgenBio.

- Lila, M. A., Burton-Freeman, B., Grace, M., & Kalt, W. (2016). Unraveling Anthocyanin Bioavailability for Human Health. *Annual review of food science and technology*, 7, 375–393. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033346>
- Loyola-Vargas, V. M., y Ochoa-Alejo, N. (2018). Introducción al cultivo de tejidos vegetales: avances y perspectivas. *Métodos de biología molecular (Clifton, N.J.)*, 1815, 3-13. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1)
- Martínez, M. (2019). *Evaluación Del Efecto De Los Estados De Madurez Sobre Las Propiedades Nutracéuticas Del Fruto De Motilón Hyeronima macrocarpa*. [Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte].
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., & Silva, P. (2020). Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17), 3809. <https://doi.org/10.3390/molecules25173809>
- Matute, T. (2019). *Caracterización de las propiedades organolépticas y bromatológicas de la fruta exótica motilón de la zona de Sevilla de Oro y propuesta de aplicación en bebidas, postres y salsas*. [Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca].
- Malik, S. I., Rashid, H., Yasmin, T. A. Y. Y. A. B. A., & Minhas, N. M. (2003). Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. *Int. J. Agric. Biol*, 6, 156-159. [https://www.researchgate.net/publication/242453014\\_Effect\\_of\\_24-dichlorophenoxyacetic\\_Acid\\_on\\_Callus\\_Induction\\_from\\_Mature\\_Wheat\\_Triticum\\_aestivum\\_L\\_Seeds](https://www.researchgate.net/publication/242453014_Effect_of_24-dichlorophenoxyacetic_Acid_on_Callus_Induction_from_Mature_Wheat_Triticum_aestivum_L_Seeds)
- Mihai, R., Balaş, C., Helepiciuc, F., & Stoian, G. (2011). Biotic and abiotic elicitors induce biosynthesis and accumulation of resveratrol with antitumoral activity in the long-term

- Vitis vinifera L. callus cultures. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6), 6683-6689.  
<https://www.researchgate.net/publication/286533896>
- Mina, J., & Torres, F. (2015). Extraction Of Natural Pigments From Cerote (*Hesperomeles Heterophylla*), Motilón (*Hyeronima Macrocarpa*), Mortiño (*Vaccinium Floribundum*) And Its Application In The Production Of Blackberry Yogurt (*Rubus Glaucus Benth*). *Agropecuaria*, 9, 87–103.
- Ministerio del Ambiente y Agua. (2020). Plan de Manejo del Parque Nacional Cayambe Coca 2020 - 2030. *Ministerio del Ambiente y Agua*. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2020/07/Acuerdo-Ministerial-Nro.-MAAE-2020-007.pdf>
- Mizukami, H., Tomita, K., Ohashi, H., Hiraoka, N. (1998). Anthocyanin production in callus cultures of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Plant Cell Rep*, 7(7), 553-556.  
<https://doi.org/10.1007/BF00272755>
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Agric. Food Chem*, 50, 519–525. <https://doi.org/10.1021/jf011062r>
- Mueller, J. (2003). *El Motilón, Hyeronima cf. Macrocarpa: especie promisoría para la región Andina Ecuatoriana*. Proyecto Apoyo al Desarrollo Forestal Comunal en los Andes del Ecuador.
- Nakamura, M., Takeuchi, Y., Miyanaga, K. (1999). High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus. *Biotechnology Letters* 21, 695–699.  
<https://doi.org/10.1023/A:1005558325058>

Narayan, M.S., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. (2005). Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochemistry*, 40 (1), 351-358.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.009>

Narayani, M., Srivastava, S. (2017). Elicitación: una estimulación del estrés en cultivos de células/tejidos vegetales *in vitro* para mejorar la producción de metabolitos secundarios. *Phytochem Rev* 16, 1227–1252. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>

Nimse, S.B., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv*, 5, 27986–28006.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ra/c4ra13315c#!divAbstract>

Nozue, M., Yamada, K., Nakamura, T., Kubo, H., Kondo, M., & Nishimura, M. (1997).

Expression of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant physiology*, 115(3), 1065–1072.

<https://doi.org/10.1104/pp.115.3.1065>

Nozue, M., Kubo, H., Nishimura, M., Katou, A., Hattori, C., Usuda, N. (1993). Characterization of intravacuolar pigmented structures in anthocyanin-containing cells of sweet potato suspension cultures. *Plant Cell Physiol*, 34(6), 803-808.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078487>

Ozeki & Komamine, A. (1986). Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultures. *Plant Cell Physiol*, 27(7), 1361-1368.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077234>

Parthasarathy, R., Shanmuganathan, R., & Pugazhendhi, A. (2020). Vinblastine production by the endophytic fungus *Curvularia verruculosa* from the leaves of *Catharanthus roseus*

- and it's *in vitro* cytotoxicity against HeLa cell line. *Analytical biochemistry*, 593, 113530.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113530>
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4).  
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/228>
- Ponder, A., Hallmann, E., Kwolek, M., Średnicka-Tober, D., & Kazimierczak, R. (2021). Genetic Differentiation in Anthocyanin Content among Berry Fruits. *Current issues in molecular biology*, 43(1), 36–51. <https://doi.org/10.3390/cimb43010004>
- Portu, J. (2018). *Aplicación foliar de elicitores y compuestos nitrogenados como estrategia para mejorar la composición fenólica de la uva y del vino*. [Tesis doctoral, Universidad de la Rioja].
- Prado, L., & Valdebenito, H. (2000). *Contribución a la fenología de especies forestales nativas Andinas de Bolivia y Ecuador*. Intercoperation-FOSEFOR.
- Qiu, Z., Wang, X., Gao, J., Guo, Y., Huang, Z., & Du, Y. (2016). The Tomato *Hoffman's Anthocyaninless* Gene Encodes a bHLH Transcription Factor Involved in Anthocyanin Biosynthesis That Is Developmentally Regulated and Induced by Low Temperatures. *PloS one*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151067>
- Rahimi, S., Kim, Y. J., Sukweenadhi, J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). PgLOX6 encoding a lipoxygenase contributes to jasmonic acid biosynthesis and ginsenoside production in *Panax ginseng*. *Journal of experimental botany*, 67(21), 6007–6019.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw358>

- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720–1731.  
<https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Robert, P., & Fredes, C. (2015). The encapsulation of anthocyanins from berry-type fruits. Trends in foods. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(4), 5875–5888.  
<https://doi.org/10.3390/molecules20045875>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Rojas, H., Forero, M.A., Fischer, G., Herrera, A., Marquínez, X. (2017). Comportamiento poscosecha de "motilón" *hyeronima macrocarpa*, evaluando dos temperaturas de almacenamiento. <https://www.researchgate.net/publication/322035939>
- Santacruz, L., Carriazo, J. G., Almanza, O., & Osorio, C. (2012). Anthocyanin composition of wild Colombian fruits and antioxidant capacity measurement by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1397–1404.  
<https://doi.org/10.1021/jf2042533>
- Santacruz, L. (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Colombia].
- Santos-Buelga C., Mateus N., De Freitas V. (2014). Antocianinas. Pigmentos vegetales y más allá. *J. Agric. Food Chem*, 62, 6879–6884.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v13n3/v13n3a2.pdf>
- Saraguro, F. (2021). *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)*. [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE]

Schmülling, T. (2013). Cytokinin. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 627–631.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00456-4>

Simões, C., Bizarri, C. H. B., Cordeiro, L. S., De Castro, T. C., Coutada, L. C. M., Da Silva, A. J.

R. (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC- DAD/ESIMS.

*Plant Physiol Biochem*, 47(10), 895-903.

Smetanska, I. (2008). Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. *Food*

*Biotechnology*, 111. [https://doi.org/10.1007/10\\_2008\\_103](https://doi.org/10.1007/10_2008_103)

Srivastava, L. M. (2002). Plant growth and development: hormones and environment. *Elsevier*,

(8), 191-204. <https://doi.org/10.1016/B978-012660570-9/50149-0>

Tena, N., Martín, J., & Asuero, A. G. (2020). State of the Art of Anthocyanins: Antioxidant

Activity, Sources, Bioavailability, and Therapeutic Effect in Human Health. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(5), 451. <https://doi.org/10.3390/antiox9050451>

Tipaz, E. A., Mena, N. L., Restrepo, C.V., & del Carmen Benavides, Y. (2018). Evaluación de la

extracción de compuestos antioxidantes a partir de los extractos del fruto del *Hyeronima macrocarpa*.

Tosti, V., Bertozzi, B., & Fontana, L. (2018). Health Benefits of the Mediterranean Diet:

Metabolic and Molecular Mechanisms. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 73(3), 318–326. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx227>

Twaij, B. M., Taha, A. J., Bhuiyan, F. H., & Hasan, M. N. (2022). Effect of saccharides on

secondary compounds production from stem derived callus of *Datura*

*inoxia*. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 33, 701.

<https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00701>

- Van Staden, A. B., & Lall, N. (2018). Medicinal plants as alternative treatments for progressive macular hypomelanosis. *In Medicinal Plants for Holistic Health and Well-Being. Academic Press*, 145-182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812475-8.00005-6>
- Vargas, W. (2002). *Guía Ilustrada de las Plantas de las Montañas del Quindío y Los Andes Centrales*. Universidad de Caldas.
- Wawrosch, C., & Zotchev, S. B. (2021). Production of bioactive plant secondary metabolites through *in vitro* technologies-status and outlook. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(18), 6649–6668. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11539-w>
- Zhai, X., Jia, M., Chen, L., Zheng, C. J., Rahman, K., Han, T., & Qin, L. P. (2017). The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants. *Critical reviews in microbiology*, 43(2), 238–261. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1201041>
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., & Franco, C. (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, 162(3), 459-468.

## Apéndices