



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA

Evaluación del efecto del extracto de hoja de *Moringa oleífera* Lam como protector del estrés oxidativo y promotor de crecimiento en el carácter antioxidante y regeneración in vitro de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi

Autor: Erly Johanna Melo Heras

Directora: Raluca Alexandra Mihai, Ph.D.

Sangolquí, 23 de agosto de 2023



01**Introducción**

02**Objetivos e
hipótesis**

03**Materiales y
Métodos**

04**Resultados y
Discusión**

05**Conclusiones**

06**Recomendaciones**

07**Agradecimientos**



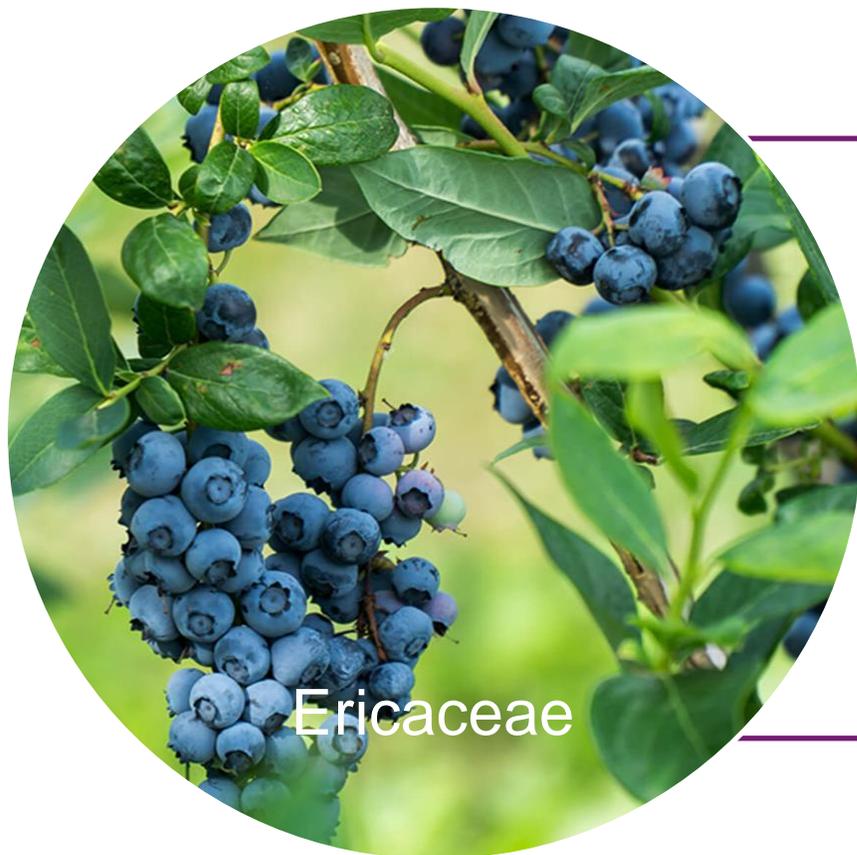
01

Introducción



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Vaccinium corymbosum L. var Biloxi - Arándano



Ericaceae

<https://ecuablue.farm/img/choose/08.jpg>



Propiedades antioxidantes superiores
Alto contenido mineral



Propiedades nutracéuticas: efecto protector en el sistema cardiovascular, el sistema inmune y en el desarrollo y el crecimiento celular



Variedad Biloxi tiene alta adaptabilidad, no requiere épocas de frío

Variedad Biloxi



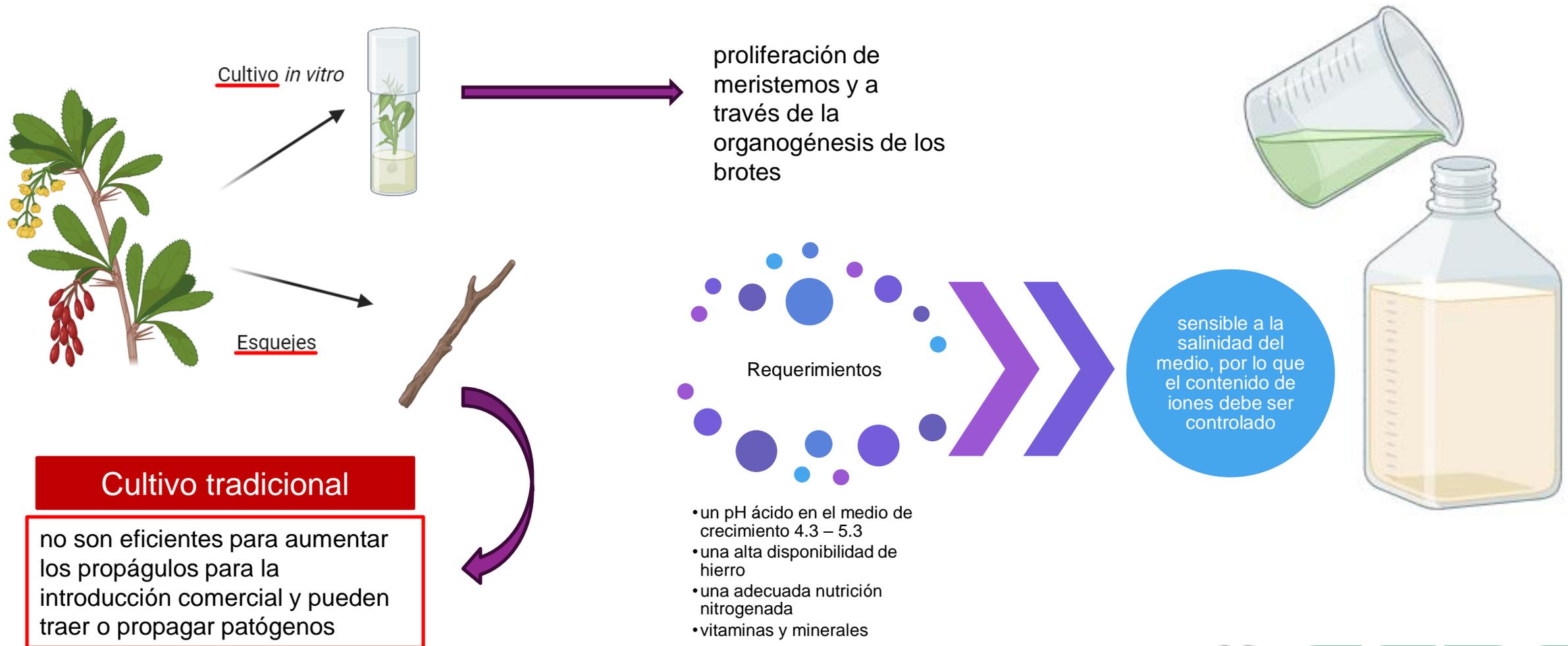
Cultivo incipiente en Ecuador, por su suelo fértil y condiciones ambientales óptimas

tallos erectos, con fruta de tipo baya mediana; su cultivo se desarrolla a bajo pH, con alta materia orgánica y es altamente sensible a la fertilización excesiva



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Cultivo *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L. var Biloxi



Moringa oleífera Lam. como biofertilizante



Anzano, A.; Ammar, M.; Papaianni, M.; Grauso, L.; Sabbah, M.; Capparelli, R.; Lanzotti, V. *Moringa oleifera* Lam.: A Phytochemical and Pharmacological Overview. *Horticulturae* 2021, 7, 409. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100409>

Diferentes partes del árbol de *Moringa oleifera* Lam son:

buenas fuentes de carotenoides, tocoferoles, ácidos grasos

Minerales altamente biodisponibles y ácido fólico

HOJAS

Nativa de Asia, desde donde se han propagado en muchas partes del mundo

Apta en países cálidos y tropicales, como el Ecuador

Puede tolerar temperaturas de 19°C a 28°C

Tiene una altura de 5 a 10 m y puede ser cultivado en toda la llanura

contenido de proteínas y una excelente fuente de vitaminas A, B, C y E, con un alto contenido de calcio, hierro y potasio

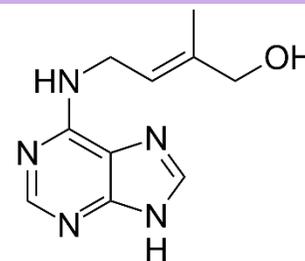
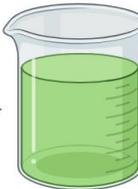
Quercetina, kaempferol, zeatina, campesterol, sitosterol, entre otros

Mitigar los efectos de la salinidad y el estrés abiótico que limitan el crecimiento y productividad de los cultivos

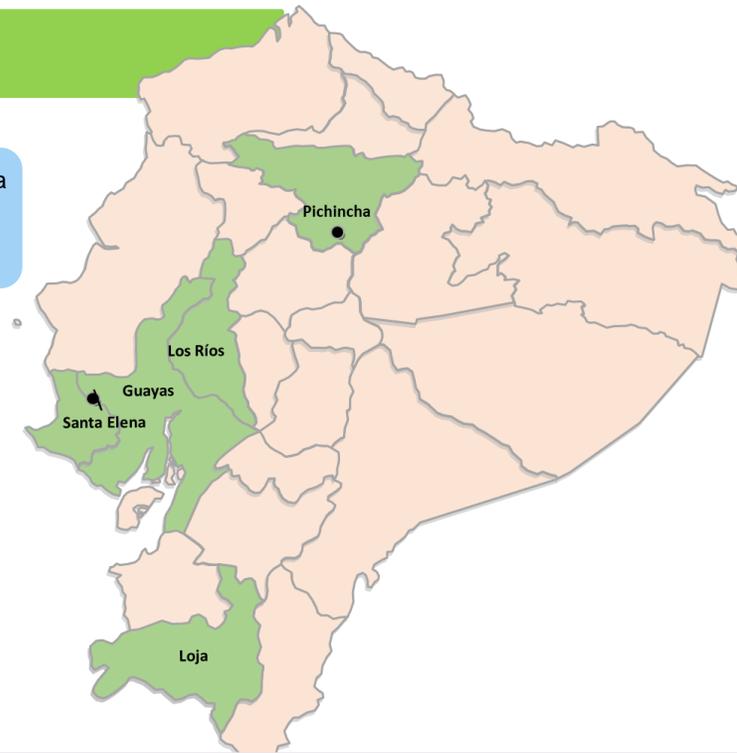
Cantidades mejoradas de zeatina – Citoquinina reguladora del crecimiento



Extracto de Hoja de Moringa



<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f7/Zeatin.svg/1200px-Zeatin.svg.png>



El suelo ecuatoriano es muy favorable a la producción

Fácil adaptación al suelo tropical, árido y semiárido

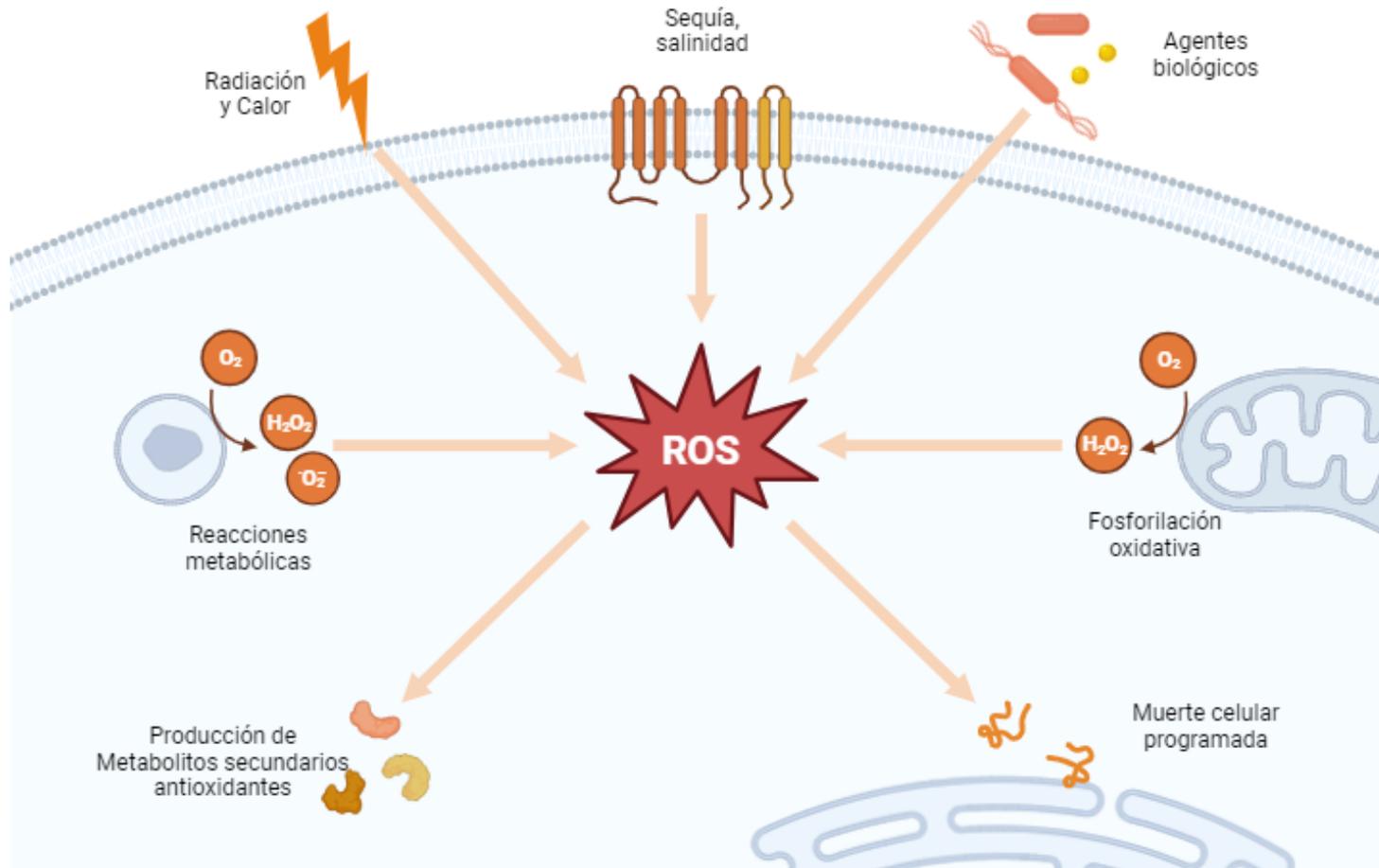
Planta es resistente a la sequía y a las enfermedades



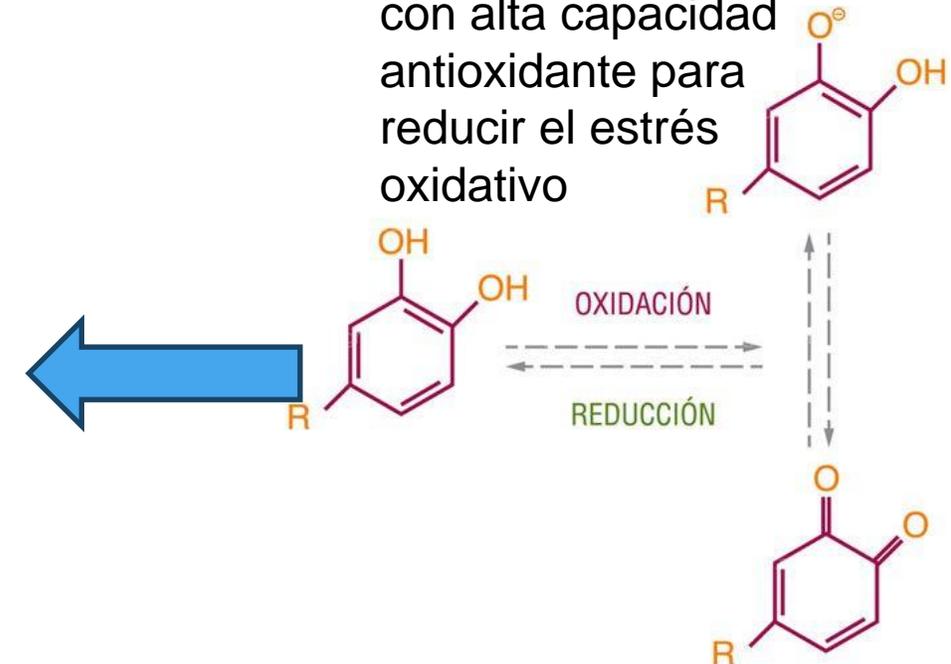
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Estrés oxidativo y mecanismos de defensa de las plantas

ROS se clasifica en:

bióticos que incluyen patógenos,
insectos y roedoresabióticos son el calor, la salinidad,
la sequía, la radiación ultravioleta y
la toxicidad de los metales

Compuestos fenólicos
con alta capacidad
antioxidante para
reducir el estrés
oxidativo



https://www.infoagro.com/documentos/los_compuestos_fenolicos_como_antioxidantes_naturales_superar_situaciones_estres_abiotico.asp



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

02

Objetivos e Hipótesis



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Objetivo General

Evaluar el efecto del extracto de hoja de *Moringa oleífera* Lam como protector del estrés oxidativo y promotor de crecimiento en el carácter antioxidante y regeneración *in vitro* de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi.

Objetivos Específicos

Obtener un extracto a partir de hojas de *Moringa oleífera* Lam mediante un proceso de maceración utilizando etanol como solvente.

Determinar la concentración óptima de extracto de hoja de *Moringa oleífera* Lam para promover el crecimiento y la producción de antioxidantes en callos y plántulas de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi.

Comparar el crecimiento *in vitro* de los explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi con aplicación de extracto de moringa mediante el coeficiente de Pearson.

Identificar los compuestos fenólicos totales, flavonoides y carácter antioxidante presentes en *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, método colorimétrico de Cloruro de Aluminio, DPPH, ABTS y FRAP respectivamente.



La aplicación del extracto de hoja de Moringa oleífera Lam en el medio de cultivo para *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi promueve la formación de compuestos antioxidantes y la regeneración *in vitro* de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi.

03

Materiales y Métodos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Obtención y
tratamiento de las
muestras

Cultivo *in vitro* de *V.
corymbosum* L. cv
Biloxi

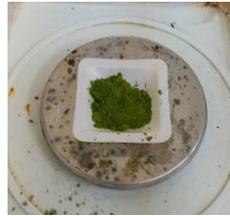
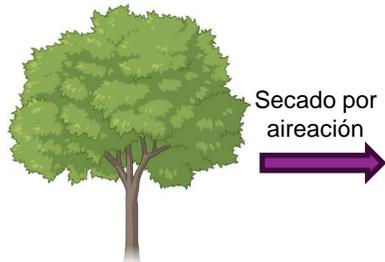
Determinación de la
Capacidad
Antioxidante

Preparación del
extracto etanólico de
hojas de *M. oleifera*.

Determinación de
Compuestos
Antioxidantes

Análisis estadístico

1 Recolección material vegetal



Pulverización

Cultivo de Moringa en
Guasaganda

Explantos utilizados para la micropropagación



2 Preparación del extracto etanólico de hojas de *M. oleifera*

Se mezclaron 50 g de hojas pulverizadas de *M. oleifera* Lam con 500 mL de etanol al 80%, luego se filtraron por millipore 0.22 μ m



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

3 Cultivo *in vitro* de *V. corymbosum* L. cv Biloxi

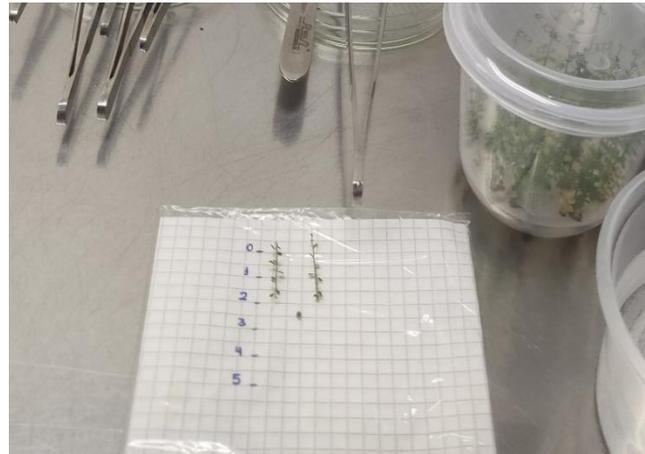


Ajuste de pH del medio de cultivo



pH = 5.2
 C0 = 0.5 ppm
 zeatina
 C1 = 2.5 ppm ZM
 C2 = 2 ppm ZM
 C3 = 1.5 ppm ZM

Tamaño del corte del explante entre 1,5 a 2 cm.

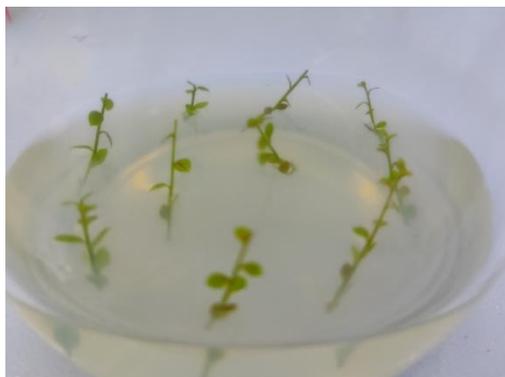


Frascos de cultivos experimentales colocados en la sala de crecimiento.

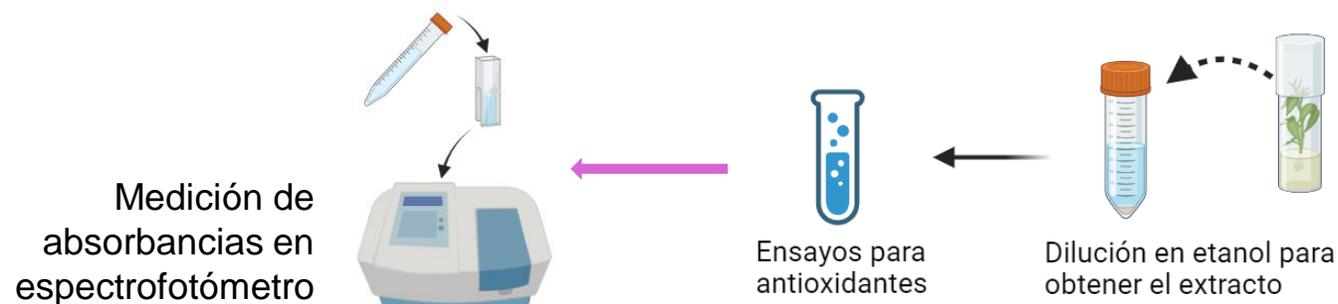


Evaluación de parámetros de crecimiento: Peso fresco, Tasa de propagación y longitud media

4 Determinación de Compuestos Antioxidantes y capacidad antioxidante



Se obtuvo 1 g de cada tratamiento experimental



FOLIN-CIOCALTEU

- TPC – Contenido total de fenoles – mg GAE / g fw

Método colorimétrico de AlCl₃

- TFC – Contenido total de flavonoids – mg QE / 10 g fw

ABTS

- Capacidad antioxidante de inhibición de radicales - $\mu\text{mol TROLOX} / \text{g fw}$

DPPH

- Capacidad antioxidante de inhibición de radicales - $\mu\text{mol TROLOX} / \text{g fw}$

FRAP

- Poder reductor de iones de hierro $\mu\text{mol Fe } 2+ / \text{g fw}$



5 Análisis estadístico

Modelo estadístico

Diseño factorial
anidado 2x3 y 2x2

Tratamientos estadísticos

Análisis de varianza

Anova para Rangos
Alineados

Correlación Pearson

Software estadístico



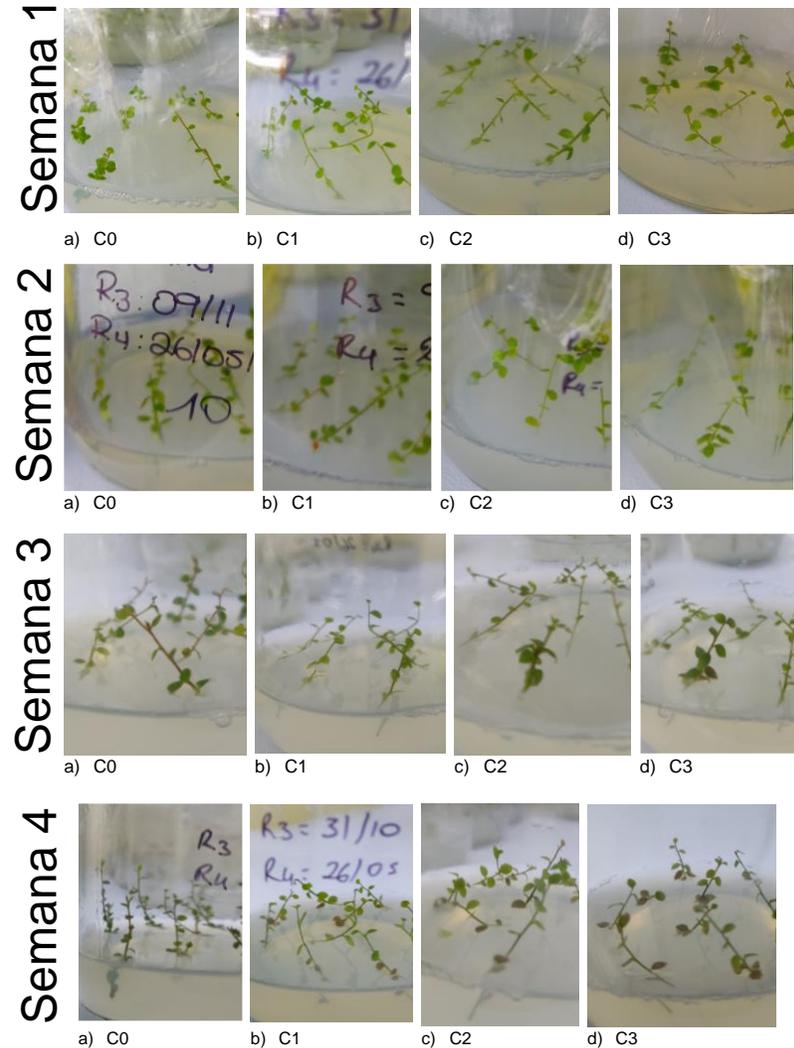
04

Resultados y Discusión

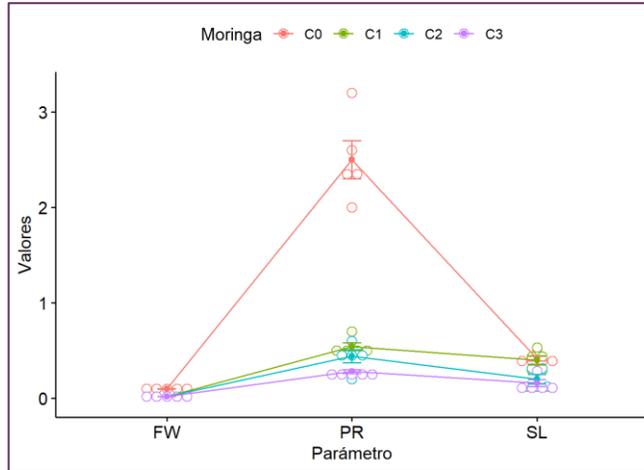


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Cultivo *in vitro* de *V. corymbosum* L. cv Biloxi – Mejores resultados: C2 (2 ppm) y C1 (2.5 ppm) de ZM



Evaluación de parámetros de crecimiento:
Peso fresco, Tasa de propagación y longitud media



Los principales problemas: oxidación de los explantes y una baja tasa de multiplicación mientras que los brotes crecen demasiado.

Nikoloff (2015) explica: oxidación está relacionada con diversos estresores provocados por el efecto abrasivo causado por agentes desinfectantes, cortes del explante, cambios en el pH, composición del medio de cultivo, entre otros

Mientras que excesivo crecimiento se basa en concentraciones muy altas o bajas de citoquinina, según Ngomuo et al. (2013)

ANOVA no paramétrico ART

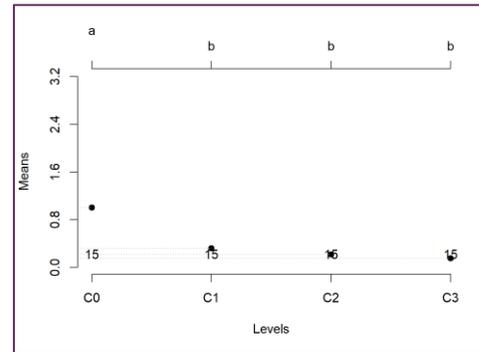
Analysis of Variance of Aligned Rank Transformed Data

Table Type: Anova Table (Type III tests)
Model: No Repeated Measures (1m)
Response: art(trat)

	Df	Df.res	F value	Pr(>F)
1 factor(Assay)	2	48	192.930	< 2.22e-16 ***
2 factor(Moringa)	3	48	61.987	< 2.22e-16 ***
3 factor(Assay):factor(Moringa)	6	48	65.807	< 2.22e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Comparación de grupos (Tukey)

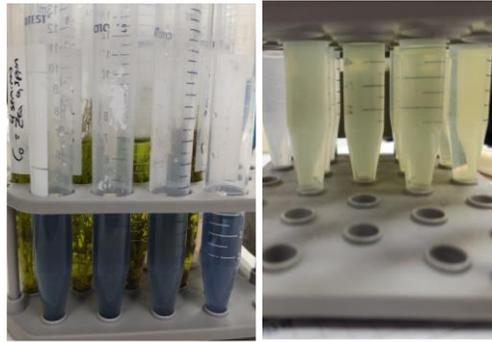


Composición del medio

Uso de etanol 80%. Se prefieren se prefiere la combinación de etanol y agua a la de los demás solventes en moringa (Abebe, 2023), ya que contiene muchos grupos funcionales. El disolvente binario etanol-agua no ha añadido ninguna toxicidad pero ha mejorado el proceso de extracción, pero puede resultar estresor para explantes

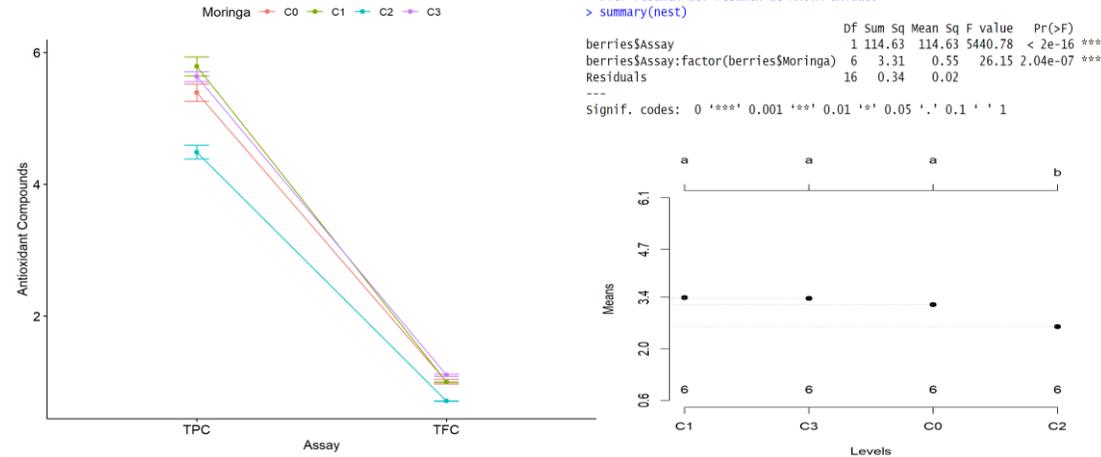
Determinación de Compuestos Antioxidantes

Determinación de Fenoles y Flavonoides

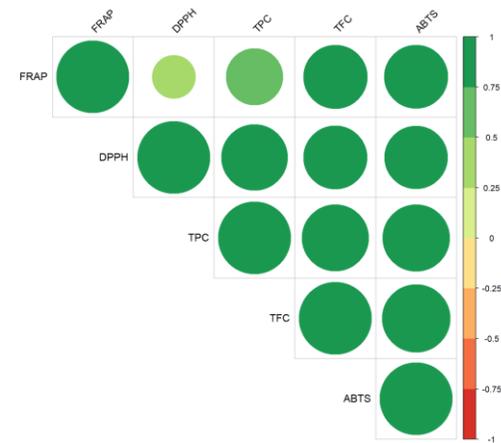


a) TPC b) TFC

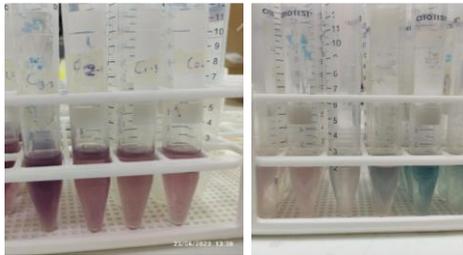
ANOVA anidado para valores de composición antioxidante (TPC y TFC)



Correlación de Pearson

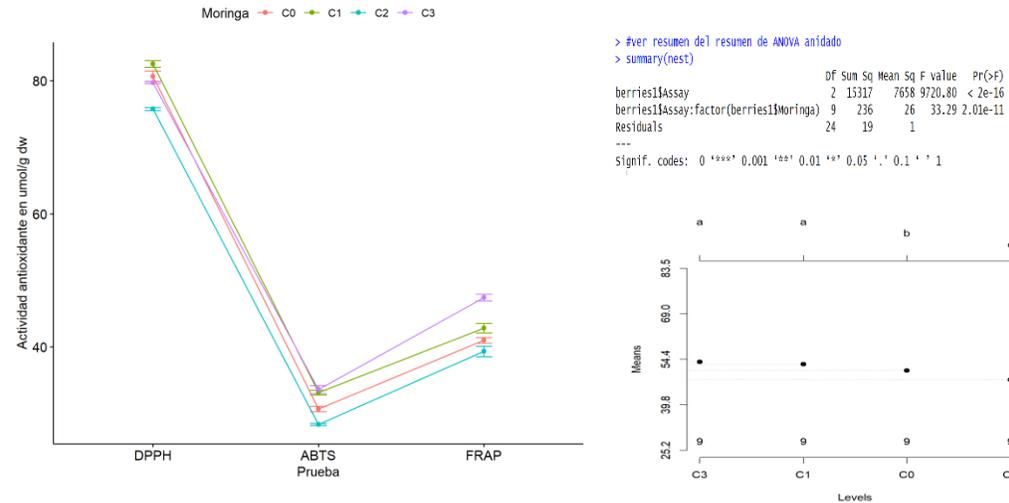


Determinación de Capacidad antioxidante



a) DPPH b) ABTS

ANOVA anidado para valores de capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP)



c) FRAP

Importancia del mecanismo de defensa para reducir la muerte celular programada (Fujita & Hasanuzzaman, 2022)

Los factores ambientales pueden afectar la producción de antioxidantes y metabolitos secundarios (Maury et al., 2020)

Según Šamec et al. (2021), la ruta biosintética de los fenilpropanoides generalmente se activa en condiciones ambientales nocivas de estrés abiótico que da como resultado la acumulación de varios compuestos fenólicos

El extracto de moringa contiene quercetina, beta-sitosterol, kaempferol y ácido cafeoilgúinico además de minerales que incluyen hierro, potasio, calcio, cobre, zinc, magnesio, manganeso, etc. (Paikra et al., 2017)

05

Conclusiones



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Se obtuvo un extracto de *M. oleifera* Lam mediante maceración con etanol al 80% que se utilizó en la composición de los medios de cultivo experimentales.

El extracto incidió en el crecimiento *in vitro* de los grupos experimentales al actuar como un bioestimulante y promotor del crecimiento en los explantes que fueron evaluados durante 30 días, encontrando que a una concentración de 2 ppm y de 2.5 ppm de Zeatina en Moringa los explantes tenían un desarrollo favorable, pero menor al grupo control. Los valores más altos para los grupos experimentales C1 y C2 fueron Peso fresco (C1 = 0.0197 ± 0.000228 g, C2 = 0.0196 ± 0.0002593 g), Tasa de propagación (C1 = 0.54 ± 0.0799 u, C2 = 0.44 ± 0.1356 u) y Longitud media de los brotes (C1 = 0.399 ± 0.0934 cm, C2 = 0.201 ± 0.0993 cm).

La composición de antioxidantes se evaluó mediante la determinación del contenido total de fenoles y el contenido total de flavonoides en las muestras vegetales. Las concentraciones más altas se registraron en los grupos control (C0) y experimentales C1 y C3, mientras que se encontró que el contenido total de fenoles y flavonoides presentes en el grupo experimental C2 (TPC = 4.48765 ± 0.14705 mg GAE/g fw, TFC = 0.6991 ± 0.01738 mg QE/10g fw) presentó los valores más bajos.

Se determinó que el carácter antioxidante más bajo lo presentó el grupo experimental C2, con valores de DPPH (75.76309 ± 0.31714 $\mu\text{mol TROLOX/g fw}$), ABTS (28.30978 ± 0.22088 $\mu\text{mol TROLOX/g fw}$) y FRAP (39.3145 ± 1.09317 $\mu\text{mol Fe}^{3+}/\text{g fw}$), valores relacionados con una menor exposición a los factores de estrés oxidativo.

Los resultados del contenido total de fenoles y flavonoides presentaron concordancia con los resultados de capacidad antioxidante. Mediante los coeficientes de Pearson se registró una correlación positiva alta entre los antioxidantes generados durante el crecimiento *in vitro* frente a la capacidad antioxidante.

En conclusión, se determinó que el extracto de hoja de *Moringa oleifera* Lam tiene un efecto bioestimulante, promotor del crecimiento, debido a la presencia de la hormona vegetal de crecimiento zeatina y minerales, y como protector del estrés oxidativo gracias a sus propiedades antioxidantes en el cultivo *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L.



06

Recomendaciones



Para futuras investigaciones, evaluar el efecto bioestimulante del extracto de moringa macerado con diferentes solventes, especialmente aquellos con diferentes proporciones de agua y etanol, sobre los cultivos *in vitro*.

Analizar la composición mineral y de zeatina en los extractos de moringa y su posterior aplicación en el cultivo de tejidos vegetales.

Realizar una cuantificación en HPLC-MS para identificar los compuestos antioxidantes presentes en diferentes muestras de las hojas de moringa que inciden en el efecto bioestimulante.



07

Agradecimientos





Raluca Alexandra Mihai, Ph. D.
Directora del proyecto

Laboratorio de Biotecnología del Centro
de Investigación de Aplicaciones Militares
“CICTE – ESPE”

Estimados colegas del laboratorio

Familia y estimados amigos

