

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

Melo Heras, Erly Johanna

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 Ingeniera en Biotecnología

Ph.D. Mihai, Raluca Alexandra

23 de agosto de 2023

Informe de Originalidad



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ
 RALUCA ALEXANDRA
 TITULAR



Plagiarism report

TESIS-AGOSTO-Erly_Melo_sincertf.docx

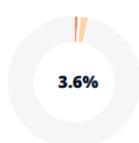
Scan details

Scan time:
August 21th, 2023 at 17:15 UTC

Total Pages:
44

Total Words:
10792

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	1%	110
Minor Changes	0.4%	45
Paraphrased	2.2%	233
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
 ● AI text
 ○ Human text

🔍 Plagiarism Results: (18)

🌐 **Mejora de la propagación in vitro de "Vaccinium cor...** 0.9%

<https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/17519/cas...>

Ana María Castro Fernández

"Mejora de la propagación in vitro de Vaccinium corymbosum y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales" "In vitro...

🌐 **T010_71528996_T.pdf?sequence=1** 0.9%

<https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12...>

EDSON HILMER JULCA MARCELO

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS HUMANAS ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA...

🌐 **T010_71528996_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y** 0.9%

<https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12...>

EDSON HILMER JULCA MARCELO

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS HUMANAS ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA...

Certificación



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 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**” fue realizado por la señorita **Melo Heras, Erly Johanna**, 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, 23 de agosto del 2023

Firma:



Raluca Alexandra Mihai, Ph.D.

C.I. 1757487507



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Melo Heras, Ery Johanna**, con cédula de ciudadanía n° **1724198955**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**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**" 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, 23 de agosto del 2023

Firma:

Melo Heras Ery Johanna

C.I. 1724198955



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Melo Heras, Ery Johanna**, con cédula de ciudadanía n° **1724198955**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Evaluación del efecto del extracto de hoja de *Moringa oleifera* 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**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 23 de agosto del 2023

Firma:

Melo Heras Ery Johanna

C.I. 1724198955

Dedicatoria

A mis padres, Fredy Melo y Alicia Heras, que han alentado todos mis sueños hoy, ahora y siempre, que jamás cortaron mis alas y me dieron todo el cariño para seguir adelante.

A mis hermanos, Sabi y Thomy, compañeros de desvelos, esto va por ustedes, son mi más grande inspiración y motivación de vida, nunca dejen de soñar alto.

A mis tíos, Jorge y Maris, educadores de vida, amigos, refugio seguro y aliento.

A mis abuelas, Elisa y Teresa, amor y gratitud eterna.

A las generaciones anteriores a mí, que no nacieron en el privilegio, pero que, con su trabajo duro y perseverancia, consiguieron grandes cosas y hoy son un ejemplo a seguir.

A las niñas que sueñan con ser científicas, que lo hoy desarrollado sea inspiración y guía, que las barreras se pueden romper, las mujeres también podemos ser STEM, y triunfar en ello.

Erly Johanna Melo Heras

Agradecimientos

A Dios,

por la fortaleza, salud, protección y sabiduría, a través de cuya Gracia he podido completar mi curso, superando los obstáculos en el camino de la búsqueda académica.

A mis amados padres,

quienes han sido mi pilar, soporte y cobijo, por su sacrificio y arduo labor al educarnos en un mundo cambiante, por inculcarnos los valores con los que hoy nos hemos formado como buenas personas, gracias por ser ejemplo, guía y refugio, por su amor y cariño a veces raro pero sólido, sé que sin importar lo que pase estarán ahí para mí, así

como yo lo estaré para ustedes.

A mis amados hermanos,

mis compañeritos de matriz, mis angelitos que han inspirado cada paso y sueño en mi vida, muchas gracias por todos los momentos compartidos, por cada ocurrencia, desvelo, por cada risa interminable, por el amor y la camaradería, gracias por no dejarme caer, por darme la fuerza necesaria para cumplir este sueño, por ser el faro en la tormenta,

saben que siempre estoy aquí para ustedes.

A mi tío Jorge,

inspiración de vida, infinita gratitud por cuidarnos siempre, por todo el cariño y apoyo, por cada palabra de aliento, por compartir su sabiduría, por darnos la motivación de alcanzar nuestros sueños, de seguir adelante a pesar de las dificultades, por ser un segundo padre y no solo velar por nosotros sino guiarnos con todo el cariño por el buen

camino.

A mi ñaña Maris,

quien siempre me ha querido por quien soy, que me ha apoyado en todas las circunstancias, quien supo inspirarme a ser una mujer profesional en una rama de la ciencia, y quien sabe más que nadie lo mucho que siempre quise ser científica, gracias por

siempre creer en mí.

A mis tías, Martha y Catalina,
mujeres fuertes que supieron salir adelante en un país extraño, que con su esfuerzo y sacrificio han sacado adelante a toda una familia y que siguen velando por nosotros a pesar de la distancia, gracias por todo el afecto, la paciencia y el apoyo.

A mamita Elisa,
que ha estado para mí en las buenas y en las malas, que siempre nos alegra la vida con su sonrisa, mamita muchas gracias por su carisma, por confiarme su conocimiento y sabiduría, por transmitir esa calidez y abrigo capaz de sanar cualquier herida. Muchas gracias por estar conmigo y compartir aquí este logro tan importante.

A mamita Tere,
quien con su fuerza y dedicación ha construido mucho más que un hogar, una familia, un ejemplo de mujeres valientes que aún sigue inspirando de generación en generación. Gracias por guiar nuestros pasos.

A la profe Raluca Mihai,
mi directora de tesis, la mejor científica que he tenido el gusto de conocer. Gracias profe por creer en mí, por las grandes oportunidades que me ha dado en el transcurso de mi desarrollo estudiantil y profesional, por su paciencia, su sabiduría, su comprensión y todas las coyunturas que hemos podido resolver en conjunto, muchas gracias por ser un gran ejemplo a seguir como mujer científica, por enseñarnos que la ciencia es divertida pero muy importante, que no importa qué tan pequeño o descabellado sea el proyecto, a veces una idea puede convertirse en un gran descubrimiento. Las palabras quedan cortas para describir la gratitud hacia todo el apoyo y la fe puestos en mí.

A Hernán,
que me ayudó a superar los momentos más difíciles con su paciencia y sus sabios consejos, muchas gracias por romper los estigmas de la salud mental y brindar un enorme apoyo a la comunidad estudiantil con su labor.

A Dianita Sánchez,
por ser la primera jefa en creer en mí y mis capacidades, por brindarme la

oportunidad de conocer mucho más sobre la biotecnología vegetal, por compartir sus conocimientos y enseñanzas, por ser parte importante en el desarrollo de este trabajo,

Dianita mil gracias por todo el apoyo.

Al equipo GRT, María José, Tanita y Stephy,

Por su comprensión y apoyo para el desarrollo de esta investigación

A Alejo,

gran amigo que siempre estuvo ahí en las buenas y en las malas, hemos compartido miles de momentos desde serios hasta divertidos a lo largo de la vida universitaria, muchas gracias por los consejos y palabras de aliento.

A Nelson,

amigo muchas gracias por todo el apoyo tanto en el laboratorio como en la universidad. No sé qué sería de nosotros sin tu gestión.

A los amigos con los que hemos formado grandes recuerdos a lo largo del camino.

Y no menos importante, el agradecimiento más especial: a Amon, el compañerito fiel durante todas las noches de desvelo, el consuelo en la desesperación, mi pequeño ángel de la guarda. Gracias por rescatarme y permitir que llegue a cumplir mis sueños a pesar de toda la adversidad.

Erly Johanna Melo Heras

Índice de contenidos

Informe de Originalidad	2
Certificación	3
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	10
Índice de tablas	12
Índice de figuras	13
Índice de abreviaturas	14
Resumen	15
Abstract	16
Capítulo I: Introducción	17
Antecedentes	17
Justificación del problema	19
Objetivos del proyecto	21
Objetivo General	21
Objetivos específicos	21
Hipótesis	21
Capítulo II: Marco referencial	22
Cultivo de arándano en el Ecuador	22
Taxonomía de <i>Vaccinium corymbosum</i> L	23
Características de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv Biloxi	23
Valor nutricional y carácter antioxidante <i>Vaccinium corymbosum</i> L	24
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Vaccinium corymbosum</i> L	24
Cultivo de Moringa en el Ecuador	25
Taxonomía de <i>Moringa oleifera</i> Lam	26
Composición fitoquímica y capacidad antioxidante de <i>Moringa oleifera</i> Lam	26

	11
<i>Moringa oleifera</i> Lam como biofertilizante.....	27
Estrés oxidativo y mecanismos de defensa de las plantas.....	28
Compuestos fenólicos.....	28
Capacidad antioxidante.....	29
Capítulo III: Metodología.....	31
Obtención y tratamiento de las muestras.....	31
Preparación del extracto etanólico de hojas de <i>M. oleifera</i>	32
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>V. corymbosum</i> L. cv Biloxi.....	33
Preparación del extracto para ensayos de antioxidantes.....	35
Determinación de Compuestos Antioxidantes.....	36
Determinación de la Capacidad Antioxidante.....	36
Análisis estadístico.....	38
Factores de estudio.....	38
Unidad experimental.....	38
Tratamientos.....	38
Capítulo IV: Resultados.....	41
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>V. corymbosum</i> L. cv Biloxi.....	41
Preparación del extracto para ensayos de antioxidantes.....	45
Determinación de Compuestos Antioxidantes.....	46
Determinación de la Capacidad Antioxidante.....	50
Análisis de Correlación de Pearson.....	54
Capítulo V: Discusión.....	56
Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones.....	60
Conclusiones.....	60
Recomendaciones.....	61
Referencias.....	62
Apéndices.....	80

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Taxonomía de Vaccinium corymbosum L.</i>	23
Tabla 2 <i>Taxonomía de Moringa oleifera Lam.</i>	26
Tabla 3 <i>Diseño Experimental Anidado para la determinación de fenoles y flavonoides.</i>	39
Tabla 4 <i>Diseño Experimental Anidado para la determinación de la capacidad antioxidante.</i>	39
Tabla 5 <i>Diseño Experimental Anidado para la determinación de la regeneración in vitro.</i> ...	39
Tabla 6 <i>Valores esperados de los cuadrados medios (CM) en el diseño anidado con dos factores.</i>	40
Tabla 7 <i>Parámetros de crecimiento vegetal in vitro.</i>	43
Tabla 8 <i>Nomenclatura de las muestras utilizadas para los extractos etanólicos</i>	46
Tabla 9 <i>Contenido de compuestos antioxidantes</i>	48
Tabla 10 <i>Capacidad Antioxidante (DPPH, ABTS) y Poder reductor (FRAP)</i>	52
Tabla 11 <i>Coeeficientes de Correlación de Pearson en el rango de -1 a +1</i>	55

Índice de figuras

Figura 1 <i>Hojas secas de moringa pulverizadas</i>	31
Figura 2 <i>Explantes utilizados para la micropropagación</i>	31
Figura 3 <i>Extracto etanólico de hojas de Moringa oleifera L. (EHM)</i>	32
Figura 4 <i>Filtración del extracto de EHM mediante filtro millipore 0.22 μm</i>	33
Figura 5 <i>Ajuste de pH del medio de cultivo</i>	34
Figura 6 <i>Tamaño del corte del explante entre 1,5 a 2 cm.</i>	34
Figura 7 <i>Frascos de cultivos experimentales colocados en la sala de crecimiento</i>	35
Figura 8 <i>Crecimiento vegetal a los 7 días de la introducción</i>	41
Figura 9 <i>Crecimiento vegetal a los 15 días de la introducción</i>	42
Figura 10 <i>Crecimiento vegetal a los 21 días de la introducción</i>	42
Figura 11 <i>Crecimiento vegetal a los 30 días de la introducción</i>	43
Figura 12 <i>Parámetros de crecimiento in vitro</i>	44
Figura 13 <i>Análisis de Varianzas de los datos con Transformada de Rango Alineado</i>	45
Figura 14 <i>Prueba de Tukey para la comparación de medias</i>	45
Figura 15 <i>Pruebas colorimétricas de contenido de antioxidantes TPC y TFC</i>	47
Figura 16 <i>Determinación de compuestos antioxidantes mediante TPC y TFC</i>	48
Figura 17 <i>ANOVA anidado de dos factores para TPC y TFC</i>	49
Figura 18 <i>Prueba de Tukey para la comparación de medias</i>	49
Figura 19 <i>Pruebas colorimétricas de DPPH, ABTS y FRAP</i>	50
Figura 20 <i>Capacidad Antioxidante (DPPH, ABTS) y Poder reductor (FRAP)</i>	52
Figura 21 <i>ANOVA anidado para valores de capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP)</i>	53
Figura 22 <i>Prueba de Tukey para valores de capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP)</i>	53
Figura 23 <i>Matriz de correlación de los coeficientes de Pearson</i>	54

Índice de abreviaturas

ART Transformada de rangos alineados (Aligned Ranks Transformed)

CM Cuadrados Medios

EHM Extracto de Hoja de Moringa

F-C Folin-Ciocalteu

Fw Peso fresco (Fresh Weight)

GAE Equivalente de ácido gálico

PR Tasa de propagación (Proliferation Rate)

QE Equivalente de quercetina

ROS Especies reactivas en oxígeno

SL Longitud media de los brotes (Shoot Length)

TFC Contenido Total de Flavonoides (Total Flavonoid Content)

TPC Contenido Total de Fenoles (Total Phenolic Content)

ZM Concentración de zeatina presente en el extracto de Moringa.

Resumen

La producción de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) en Ecuador se ha documentado recientemente en los últimos años. La variedad Biloxi de arándano presenta el mejor desempeño agronómico, debido a que están influenciados por su potencial genético inherente a la variedad, y es de alto interés comercial ya que es una de las bayas con diversas propiedades nutraceuticas. Varios estudios se han centrado en el medio de cultivo adecuado para la rápida propagación de esta especie. El uso del extracto de *Moringa oleifera* Lam se considera una alternativa prometedora ya que mejora el crecimiento vegetal al aliviar las deficiencias de macro y micronutrientes de las plantas y promueve el crecimiento debido a la presencia de cantidades mejoradas de zeatina. Los explantes se extajeron del cultivo *in vitro* de arándanos biloxi en medio de cultivo Anderson Rhododendron – AN (Anderson, 1980), se ajustó el pH del medio a 5.2 y se esterilizó en autoclave a $1 \text{ kg}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ (15 psi), 121°C , durante 20 min. El extracto de moringa y la zeatina se filtraron mediante millipore $0.22 \mu\text{m}$. Los parámetros de crecimiento se determinaron transcurridos 30 días de la introducción del cultivo. El contenido total de fenoles se determinó mediante la prueba de Folin-Ciocalteu y el método colorimétrico del cloruro de aluminio se usó para evaluar el contenido total de flavonoides. La capacidad antioxidante se evaluó mediante los métodos de DPPH, ABTS y FRAP. Se determinó 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 al igual que en capacidad antioxidante con valores de DPPH ($75.76309 \pm 0.31714 \mu\text{mol}$ TROLOX/g fw), ABTS ($28.30978 \pm 0.22088 \mu\text{mol}$ TROLOX/g fw) y FRAP ($39.3145 \pm 1.09317 \mu\text{mol Fe}^{3+}$ /g fw), valores relacionados con una menor exposición a los factores de estrés oxidativo. Se determinó que el extracto de hoja de *Moringa oleifera* Lam tiene un efecto promotor del crecimiento y como protector del estrés oxidativo gracias a sus propiedades antioxidantes en el cultivo *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L.

Palabras clave: Moringa, Arándano Biloxi, *in vitro*, bioestimulante, fenoles.

Abstract

Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) production in Ecuador has been recently documented in present years. The Biloxi blueberry variety presents the best agronomic performance, since it is influenced by its genetic potential inherent to the variety, and it is of high commercial interest since it the major berry with various nutraceutical properties. Several studies have tested the proper culture medium for the rapid propagation of this species. The use of *Moringa oleifera* Lam extract is considered a promising alternative as it improves plant growth by alleviating macro- and micronutrient deficiencies of plants and promotes growth due to the presence of enhanced amounts of zeatin. The explants were extracted from the *in vitro* culture of biloxi blueberries in Anderson Rhododendron – AN culture medium (Anderson, 1980), the pH of the medium was adjusted to 5.2 and sterilized in an autoclave at 1 kg-1 cm-2 (15 psi), 121°C, for 20 min. The moringa extract and zeatin were filtered through a 0.22 µm millipore. The growth parameters were determined 30 days after the introduction of the culture. The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu assay and the colorimetric method of aluminum chloride was used to evaluate the total flavonoid content. The antioxidant capacity was evaluated using the DPPH, ABTS and FRAP methods. It was determined that the total phenolic and flavonoid content present in the experimental group C2 (TPC = 4.48765 ± 0.14705 mg GAE/g fw, TFC = 0.6991 ± 0.01738 mg QE/10g fw) presented the lowest values as well as antioxidant capacity with values of DPPH (75.76309 ± 0.31714 µmol TROLOX/g fw), ABTS (28.30978 ± 0.22088 µmol TROLOX/g fw) and FRAP (39.3145 ± 1.09317 µmol Fe³⁺/g fw), which are related to lower exposure to oxidative and stress factors. It was determined that the *Moringa oleifera* Lam leaf extract has a growth-promoting effect and protects against oxidative stress thanks to its antioxidant properties in the *in vitro* culture of *Vaccinium corymbosum* L.

Keywords: Moringa, Blueberry var Biloxi, *in vitro*, biostimulant, phenols.

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

El arándano pertenece a la familia Ericaceae, género *Vaccinium*, y tiene una notable capacidad antioxidante, tres veces mayor que la fresa o la frambuesa y contenidos significativos de antocianinas, flavonoides (Cortés-Rojas et al., 2016) y ácido clorogénico, por lo cual son considerados un súper alimento por poseer un gran potencial en el tratamiento del cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y la demencia (Páscoa et al., 2019).

El arándano es uno de los cultivos de bayas de mayor importancia comercial. Se cultiva principalmente en Estados Unidos y Canadá y la producción de este cultivo ha aumentado en respuesta a la mayor demanda de alimentos saludables por parte de los consumidores, puesto que se considera un alimento rico en antioxidantes (Prodorutti et al., 2007). Entre el 2000 y el 2010, el cultivo de arándano a nivel global aumentó en un 275%, mientras que en América latina se ha experimentado un fuerte auge en la producción de arándano, especialmente mediante la propagación vegetativa por cultivo de tejidos o micropropagación (Brenes Angulo et al., 2015).

La producción de arándanos en Ecuador se ha documentado en los últimos años con datos incipientes al ser un cultivo recientemente introducido al país. Se cultiva en climas de Sierra y Costa, en zonas de altas temperaturas por el día y bajas en las noches (P. González, 2018). En Ecuador el cultivo inició en el año 2016 y se ha incrementado desde el 2021 en las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua y Azuay con 50 hectáreas en producción ya que estas provincias son aptas para este cultivo no tradicional (Redacción Sierra Norte (I), 2021). La variedad Biloxi de arándano presenta el mejor desempeño agronómico, debido a que están influenciados por su potencial genético inherente a la variedad, según estudios previos realizados en el Ecuador (Villegas-Lozada, 2021). El arándano es una de las bayas con diversas propiedades nutraceuticas, de las plantas más ricas en nutrientes, fibra, vitaminas y componentes antioxidantes pertenecientes a los flavonoides y ácidos fenólicos con propiedades funcionales relevantes

para la salud, ya que disminuyen el riesgo de enfermedades cardíacas, diabetes y neurodegeneración (Cabrera, Carlier, & Marina Zapata, 2021; Kalt et al., 2020; Silva et al., 2020). El mercado de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) ha experimentado un incremento en la demanda en los últimos 10 años, ubicándolo a nivel mundial como el cuarto fruto de importancia económica debido a sus propiedades (Villegas-Lozada, 2021). La demanda de los consumidores de arándanos se ha disparado a nivel mundial, lo que ha llevado a un aumento de la producción a una tasa anual promedio del 6.1 %, mientras el área de plantación de arándanos también aumentó un 12.1 % y se espera que aumente un 25.3 % en los próximos años (Krishna et al., 2023).

Varios estudios han examinado el cultivo *in vitro* de arándanos y muchos se han centrado en el medio de cultivo adecuado para la rápida propagación de esta especie (Georgieva & Kondakova, 2021). El medio de cultivo de tejidos vegetales contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, dado que se compone principalmente de macro y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos u otras fuentes de nitrógeno, carbohidratos o azúcares, agentes gelificantes en caso de medio sólido y reguladores del crecimiento vegetal (Chimdessa & Agricultural, 2020; Hussain, 2012).

La micropropagación de especies de arándano a partir de meristemos axilares, así como la organogénesis de brotes a partir de explantes de hojas con diferentes reguladores del crecimiento de las plantas, han sido bien establecidas, no obstante, algunos tipos de dificultades que pueden presentarse son el bajo contenido de oxígeno, hiperhidricidad en los regenerantes, la formación de callos no deseados en las bases (Debnath & Goyali, 2020a). Durante las diferentes fases del cultivo *in vitro*, los tejidos de las plantas pueden estar expuestos a algunas tensiones que nunca se encuentran en sus hábitats naturales, entre los que se encuentran la contaminación patógena y el pardeamiento, no obstante, se conoce que los métodos de desinfección, las composiciones de los medios de cultivo y las condiciones de luz son variables que se requieren controlar para prevenir el estrés (Taghizadeh & Dastjerdi, 2021).

La planta de Moringa (*Moringa oleifera* Lam) se encuentra entre una de sus 13 especies que pertenece al género *Moringa* y la familia Moringaceae (F. González, 2018), descrita como la planta milagrosa, puesto que los aceites y hojas de moringa contienen algunos de los antioxidantes más potentes y tienen concentraciones más altas de minerales biodisponibles como hierro, calcio, ácido fenólico y vitaminas como vitamina A, C, riboflavina y betacaroteno (Mehmood et al., 2021). Más allá de los usos de la Moringa como alimento y para la salud humana, existen otros posibles usos ya que, como explica Leone et al., (2015) se puede utilizar como potenciador natural del crecimiento de las plantas y aumentar el rendimiento de los cultivos, pues, de hecho, las hojas son ricas en zeatina (Bakry et al., 2021), una hormona vegetal que pertenece al grupo de las citoquininas que están involucrados directa o indirectamente en diferentes procesos fisiológicos de las plantas, como la regulación de la germinación de semillas, elongación y proliferación de brotes, la inducción de la floración, la fructificación y el cuajado de semillas, y la senescencia (Aremu et al., 2020).

Justificación del problema

La producción comercial de arándanos se basa mayormente en variedades o cultivares de *V. corymbosum* L., que requieren horas de frío de acuerdo a su división, y que, además, poseen un alto contenido de antioxidantes que tienen diferentes efectos terapéuticos: antiulceroso, antitumorales, antiinflamatorios y antioxidantes (Brenes Angulo et al., 2015).

Las frutas producidas en países de zonas templadas se asemejan a las frutas producidas en la sierra ecuatoriana bajo grandes inversiones económicas que requieren una alta capacitación, por lo que no existe una producción representativa que promueva la exportación debido a la poca tecnificación (Galarza, 2019). Por lo que la producción de arándano en las provincias de la sierra es una alternativa viable y accesible que tiene el potencial de satisfacer tanto las necesidades económicas de los agricultores como la demanda en productos saludables para los consumidores.

Una ventaja competitiva que tiene Ecuador frente al mercado mundial son las

condiciones del medioambiente y un clima similar durante todos los meses que permite recoger cosecha en cualquier época y supone un nicho económico potencial (P. González, 2018). En los últimos años, el interés en la producción mundial de arándano ha incrementado debido al alto valor nutricional y los beneficios para la salud, por lo que al ser una planta de alta calidad, el establecimiento de plantaciones presupone la adopción de técnicas modernas de propagación (Ružić et al., 2012).

Los arándanos se propagan tradicionalmente a través de esquejes, no obstante, no son eficientes para aumentar los propágulos para la introducción comercial y pueden traer o propagar patógenos (Qiu et al., 2018). La aplicación de métodos de cultivo de tejidos vegetales para la propagación *in vitro* de arándano es una tecnología importante para la producción de plantas sanas, fuertes y genéticamente idénticas, que supone una ventaja científica y comercial (Georgieva & Kondakova, 2021).

El papel estimulante de la micropropagación en el aumento del contenido fenólico podría deberse a los reguladores del crecimiento, como las citoquinas que en combinación con auxinas incrementa significativamente la producción de antioxidantes (Debnath & Goyali, 2020b). No obstante, la menor disponibilidad de nutrientes y el estrés oxidativo tienen el potencial de limitar el rendimiento de los explantes, por lo que una alternativa es el uso de extractos orgánicos que pueden inducir inmunidad en plantas bajo estrés nutricional para aumentar su supervivencia (Lalarukh et al., 2022), ya que se conoce que las plantas de moringa tienen potencial como fuente de reguladores del crecimiento para el cultivo de tejidos porque las hojas de moringa contienen la hormona zeatina (Nihayati & Najah, 2021).

En consecuencia, ante el posible potencial del uso de la moringa como un biofertilizante natural y de bajo costo, el presente estudio plantea evaluar el efecto del extracto de hoja de *Moringa oleifera* 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 del proyecto

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.

Hipótesis

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.

Capítulo II: Marco referencial

Cultivo de arándano en el Ecuador

El cultivo de arándano ha tenido un desarrollo notable y progresivo en los mercados internacionales, mientras que su siembra es muy joven en el Ecuador, siendo en los Andes ecuatorianos donde este cultivo se ha desarrollado con mayor apogeo en los años más recientes, dado que el sector agrícola ha iniciado una diversificación en la producción de frutales como el arándano ya que es una fruta con alto potencial en cuanto a propiedades nutricionales y medicinales se refiere (OCARU, 2022). En Ecuador se cultiva en las provincias andinas de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Azuay, mientras que en la zona costera se cultiva en Santa Elena, Manabí y El Oro (Sánchez, 2022), siendo los cultivares Biloxi y Esmerald las variedades más destacadas, ya que son de excelente producción, alta calidad y no requieren épocas de frío (Paredes-Caiza, 2021).

El cultivo en el Ecuador se favorece porque el suelo es fértil, las condiciones climáticas son óptimas, mientras que la zona geográfica permite el desarrollo de frutos competitivos a escala internacional (Redacción Economía, 2022), oportunidades que empujan al Ecuador a convertirse en un destino de inversión agroexportadora, ya que, además, cuenta con mano de obra local calificada para este tipo de productos y actividades económicas. En Ecuador el cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) para el consumo interno se incrementó en un 100% en los últimos años (Fuentes-Morán, 2021). Las ventajas más prominentes del Ecuador, que le favorecen para competir con otros mercados, son las condiciones medioambientales, la luminosidad de la línea Ecuatorial, que influye en el tamaño y grados brix del fruto, además de las condiciones climáticas que permanecen constantes y permiten la cosecha y siembra de diversas plantas en cualquier época del año (P. González, 2018).

Taxonomía de *Vaccinium corymbosum* L

Tabla 1

Taxonomía de Vaccinium corymbosum L.

Categoría	Taxón
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Subfamilia	Vaccinioideae
Género	<i>Vaccinium</i>
Especie	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.
Variedad	cv. Biloxi

Nota. Adaptado de *Fungosis del Arándano (Vaccinium corymbosum* L.) *var. Biloxi en el distrito de Jesús - Cajamarca*, por Edquén-Quintana, (2019)

Características de *Vaccinium corymbosum* L. cv Biloxi

El genoma del género *Vaccinium* es complejo y presenta variabilidad en el número de cromosomas que son consecuencia del cruce de varias especies, mismo que está asociado a las características morfológicas y fisiológicas de las plantas (Meléndez-Jácome et al., 2021). La variedad Biloxi pertenece al tipo “highbush” y es una planta con 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 (Huamantingo-Tello, 2016). Es una variedad que requiere menos horas de frío, presenta una altura de 50 a 180 cm, raíces fibrosas con una profundidad de hasta 60 cm (Lima, 2019; Undurraga-Díaz & Vargas-Schuldes, 2013), las hojas son simples, enteras o aserradas, y ubicadas alternamente a lo largo del tallo, su forma varía ampliamente, desde elípticas, espatuladas, oblanceolada u oval, mientras que posee flores pedunculadas con crecimiento axilar o terminal de color blanco (Caballero-Carvajal, 2015).

Valor nutricional y carácter antioxidante *Vaccinium corymbosum* L

Los arándanos (*Vaccinium* spp.) son conocidos por ser ricos en minerales, vitaminas y compuestos bioactivos, incluidos flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y antocianinas, cuya capacidad antioxidante se correlaciona significativamente con estos compuestos (Okan et al., 2018). Además, en comparación con las frutas tradicionales, como uvas, manzanas y tomates, los arándanos contienen más antioxidantes, entre los cuales las antocianinas son las más efectivas (Wu et al., 2022). En la actualidad, se ha confirmado que los arándanos contienen antioxidantes, antihipertensivos, protectores cardiovasculares y otras sustancias que evitan enfermedades crónicas y realizan otras funciones (Wu et al., 2022).

Los frutos de arándano, con un valor energético de 192 kJ por cada 100 g, contienen una gran cantidad de sustancias orgánicas e inorgánicas, lo que está determinado principalmente por el genotipo de la variedad, las condiciones de cultivo, así como el estado de madurez de la baya, además que representan una buena fuente de fibra nutritiva (Bunea et al., 2011; Shevchuk et al., 2021).

El contenido mineral depende de la variedad. Los arándanos conservan su máxima cantidad de nutrientes y sabor cuando se disfrutan frescos, con un alto contenido nutracéutico, ya que los oligoelementos presentes (como N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, B) juegan un rol fundamental en el funcionamiento del cuerpo humano (Drózdź et al., 2018; Karlsons et al., 2018), con un efecto protector en el sistema cardiovascular, el sistema inmune y en el desarrollo y el crecimiento celular (Abbaspour et al., 2014; Roohani et al., 2013; Weaver, 2013). Según Cabrera et al. (2021) el arándano tiene un alto contenido de potasio, 417,650-1073,058 mg/100 g; hierro, 3,274-7,518 mg/100 g; cinc, 1,245-2,761 mg/100 g; calcio (54.738-206.104 mg/100 g), entre otros nutrientes esenciales. Los arándanos se pueden calificar nutricionalmente como una excelente fuente de hierro, zinc, potasio y calcio.

Cultivo *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L

El cultivo *in vitro* se ha convertido en un enfoque confiable para la producción masiva

de material vegetal a medida que el mercado de enfoques medicinales innovadores derivados de plantas ha crecido significativamente (Clapa et al., 2022b). La propagación *in vitro* se lleva a cabo en ambientes de control utilizando células, tejidos u órganos de una planta como explantes. Los explantes se cultivan en un medio artificial compuesto por agua, macronutrientes y micronutrientes, fuente de carbono, vitaminas, reguladores del crecimiento y un agente quelante bajo condiciones asépticas (Debnath & Goyali, 2020a).

Los arándanos se micropropagan a través del cultivo de brotes mediante proliferación de meristemas y a través de la organogénesis de los brotes (Qiu et al., 2018). La mayoría de las especies cultivadas del género *Vaccinium* requieren un pH ácido en el medio de crecimiento, una alta disponibilidad de hierro, una adecuada nutrición nitrogenada y vitaminas y minerales para su óptimo desarrollo, no obstante, es sensible a la salinidad del medio, por lo que el contenido de iones debe ser controlado (Frías-Ortega et al., 2020).

Las plantas de arándanos a menudo muestran un crecimiento óptimo a un pH más bajo, generalmente entre 4,3 y 5,3 (Jiang et al., 2019), sin embargo, en tales condiciones, la disponibilidad de la mayoría de los nutrientes es limitada y, en consecuencia, se ha descrito durante mucho tiempo como una planta con requisitos nutricionales relativamente más bajos y un hábito de crecimiento más lento (Doyle et al., 2021).

Cultivo de Moringa en el Ecuador

La moringa llegó a Ecuador alrededor de 2013 y era utilizada inicialmente como alimento de los animales, y posteriormente como superalimento procesado. Es una planta que alcanza los 4 m de alto, que en el Ecuador se ha extendido su cultivo en las zonas secas de la península de Santa Elena y Loja y en climas subtropicales de Guayas, Los Ríos y Pichincha (Redacción Primicias, 2021). El cultivo de Moringa en Ecuador muestra rendimientos positivos ante la variabilidad climática en la región tropical, es así que durante la época seca esta especie arbustiva como sistema de producción es más eficiente (Montecé-Lozano et al., 2021).

El suelo ecuatoriano es muy favorable a la producción, puesto que la planta se adapta con facilidad al suelo tropical, árido y semiárido, además que se ha observado que

es resistente a la sequía y a las enfermedades, lo que promueve su crecimiento rápido y alta producción (Redacción Primicias, 2021). Las bondades de esta planta han hecho que los productores lo cultiven como un producto rentable ya que en cada hectárea se han llegado a producir más de 7 toneladas de hoja seca por año, que se llegan a vender por \$ 3.000 en el mercado internacional (Redacción El Productor, 2017).

Taxonomía de *Moringa oleifera* Lam

Las especies de *Moringa* son todas nativas de Asia, desde donde se han propagado en muchas partes del mundo, especialmente en países cálidos y tropicales, como el Ecuador, ya que este árbol 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 y se clasifica taxonómicamente como (Mallenakuppe et al., 2019):

Tabla 2

Taxonomía de Moringa oleifera Lam.

Categoría	Taxón
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Capparales
Familia	Moringaceae
Género	<i>Moringa</i>
Especie	<i>Moringa oleifera</i> Lam.

Nota: Adaptado de *History, Taxonomy and Propagation of Moringa oleifera-A Review*, por Mallenakuppe et al., 2019

Composición fitoquímica y capacidad antioxidante de *Moringa oleifera* Lam

Las especies de moringa contienen varios fitoconstituyentes como alcaloides, saponinas, taninos, esteroides, ácidos fenólicos, glucosinolatos, flavonoides y terpenos (Abd Rani et al., 2018). Además, se ha establecido que diferentes partes del árbol de *Moringa oleifera* Lam son buenas fuentes de carotenoides, tocoferoles, ácidos grasos, minerales

altamente biodisponibles y ácido fólico (Saini et al., 2016). En el caso de las hojas, estas contienen la mayor cantidad de nutrientes en comparación con otras partes de *M. oleifera*, especialmente en términos de contenido de proteínas y una excelente fuente de vitaminas A, B, C y E, con un alto contenido de calcio, hierro y potasio (Trigo et al., 2020).

Se ha informado que la actividad antioxidante observada en la planta es directamente proporcional al contenido de fenoles y flavonoides totales, pues presentan una alta capacidad como donadores de hidrógenos (Olaoye et al., 2021). Estos compuestos también han demostrado ser anticancerígenos, antimicrobianos y antioxidantes efectivos (Tungmunnithum et al., 2018). La planta posee metabolitos importantes como quercetina, kaempferol, zeatina, campesterol, sitosterol, entre otros, que también se han reportado en el extracto hidroetanólico de hoja de moringa (Vats & Gupta, 2017).

***Moringa oleifera* Lam como biofertilizante**

Moringa oleifera se considera una alternativa prometedora al uso de fertilizantes inorgánicos costosos ya que mejora el crecimiento vegetal al aliviar las deficiencias de macro y micronutrientes de las plantas sin afectar el suelo (Jain et al., 2020). El extracto de hoja de *M. oleifera* puede mitigar los efectos de la salinidad y el estrés abiótico que limitan el crecimiento y productividad de los cultivos (Napoleão et al., 2019). La disponibilidad de nutrientes minerales en la hoja de moringa, que tiene cantidades mejoradas de zeatina, podría utilizarse para complementar las necesidades nutricionales de los cultivos hortícolas, mientras que en concentraciones bajas o diluidas, el extracto de hoja de moringa actúa como bioestimulante o regulador del crecimiento vegetal (Mehmood et al., 2021).

Los reguladores del crecimiento vegetal incluyen hormonas vegetales y sustancias químicas no nutrientes que no se encuentran naturalmente en las plantas que se utilizan para influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas y aprovechar mejor su potencial genético, como auxinas, citoquininas y giberelinas (Pidlisnyuk et al., 2022). Los reguladores del crecimiento de las plantas se utilizan ampliamente en el sector agrícola para diferentes propósitos, desde la germinación de semillas hasta el rendimiento final, ya que tienen un excelente efecto sobre la expresión sexual y la floración en diferentes vegetales (Mir et al.,

2019).

En los últimos años, se ha extendido un interés significativo en el potencial promotor del crecimiento de los extractos de hojas de moringa, pues se conoce que tienen la capacidad de aumentar la biomasa vegetal y el contenido de materia seca, la ramificación, la floración y la retención de flores entre una amplia variedad de especies de plantas (Basra & Lovatt, 2016).

Estrés oxidativo y mecanismos de defensa de las plantas

Las plantas superiores están continuamente expuestas a diferentes factores de estrés ambiental, tales como sequía, salinidad, metales pesados, desórdenes nutricionales, radiación produciendo el estrés oxidativo por sobreproducción de especies reactivas en oxígeno (ROS) (Şen, 2012). El estrés se puede clasificar en tipos bióticos que incluyen patógenos, insectos y roedores; mientras que los estreses abióticos son el calor, la salinidad, la sequía, la radiación ultravioleta y la toxicidad de los metales (QAMER et al., 2021). En las células vegetales, el sistema de defensa antioxidante y la acumulación de ROS mantienen un equilibrio estable entre la producción de ROS y la eliminación de ROS, sin embargo, como explican Hasanuzzaman et al., (2020), durante condiciones de estrés, la generación excesiva de ROS causa daño celular, muerte celular programada y a la disminución de la productividad de la planta. Para hacer frente al estrés oxidativo, las plantas han desarrollado varias estrategias enzimáticas y no enzimáticas para eliminar las ROS libres en las células (Dumont & Rivoal, 2019). Entre las no enzimáticas, destacan el ascorbato soluble en agua, el glutatión, fenoles, tocoferoles, tocotrienoles y carotenoides liposolubles, moléculas capaces de inhibir o suprimir las reacciones de los radicales libres (Dumanović et al., 2021).

Compuestos fenólicos

Los fenoles son metabolitos secundarios de las plantas, con propiedad antioxidante efectiva, distribuida en forma de compuestos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, entre otros (Zhao et al., 2014). Los flavonoides incluyen también flavonoles, antocianinas e isoflavonas, que tienen algunas funciones biológicas y farmacológicas,

incluidas las sustancias antioxidantes (Hu et al., 2022)

El contenido fenólico total de los extractos se determina mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, que es un ensayo basado en la transferencia de electrones y proporciona una capacidad reductora que se expresa como contenido fenólico, y es dependiente del solvente de la extracción (Noreen et al., 2017). El reactivo consiste en una mezcla de molibdato de sodio, tungstato de sodio y otros reactivos que al reaccionar con fenoles, produce un color azul que se absorbe a 765 nm, que se debe a una especie complejada de Mo(V) (Everette et al., 2010).

Mientras que la determinación de flavonoides se utiliza el método colorimétrico de cloruro de aluminio, cuyo principio se basa en la formación de complejos entre el cloruro de aluminio y el grupo ceto en los átomos C-4 y los grupos hidroxilo en los átomos vecinos C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, obteniendo una coloración amarilla tras el uso de NaNO₂ y NaOH formará un sistema complejo NaNO₂-AlCl₃-NaOH que muestra colores especiales basados en la reacción de los iones de aluminio con flavonoides en ambientes alcalinos para formar compuestos complejos (Ahmed, 2018; Martono et al., 2019).

Capacidad antioxidante

Los metabolitos secundarios de las plantas debido a sus propiedades antioxidantes, pueden eliminar los radicales libres, como las especies reactivas del oxígeno, y proteger los alimentos de los procesos de oxidación, mejorando significativamente su estabilidad y calidad durante el almacenamiento (Platzer et al., 2022). Los radicales libres se asocian principalmente con el estrés oxidativo, que al interactuar con los antioxidantes se puede detener el daño antes de que comience al neutralizarlos (Baliyan et al., 2022). La investigación de captación de radicales tiende a utilizar radicales más estables como sondas, como DPPH, galvinoxyl, ABTS⁺ y DMPD⁺ que son estables y coloreados y tienen una fuerte absorción en la región visible (Lü et al., 2010).

El método de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato), un radical de nitrógeno orgánico de larga duración con un color púrpura intenso, es un ensayo antioxidante basado en la transferencia de electrones que produce una solución violeta en

etanol. Cuando una solución de DPPH se mezcla con un antioxidante, su color cambia de púrpura a amarillo de la hidrazina correspondiente, que evalúa la capacidad reductora de los antioxidantes a una absorbancia de 515 a 528 nm. (García et al., 2012; Xiao et al., 2020). Mientras que la prueba ABTS mide la capacidad de los antioxidantes para neutralizar el catión radical estable 2,20-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}), un cromóforo azul-verde de máxima absorción a 734 nm, que está formado por la pérdida de un electrón por parte del átomo de nitrógeno de ABTS, ya que en presencia de Trolox (o de otro antioxidante donador de hidrógeno), el átomo de nitrógeno apaga el átomo de hidrógeno, produciendo la decoloración de la solución (Munteanu & Apetrei, 2021; Pisoschi & Negulescu, 2012). Entre las diversas técnicas disponibles, el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) se utiliza para evaluar la capacidad de la muestra para reducir las especies férricas. El ensayo se basa en la reducción de un complejo incoloro Fe³⁺-TPTZ a Fe²⁺-TPTZ azul intenso una vez que interactúa con un antioxidante potencial a una absorbancia de 593 nm (Henríquez et al., 2011; Spiegel et al., 2020).

Capítulo III: Metodología

Obtención y tratamiento de las muestras

Se recolectaron las hojas de *M. oleífera* Lam del sector de Guasaganda, La Maná, en Cotopaxi. Las hojas fueron secadas al ambiente y fueron pulverizadas con una procesadora de alimentos (fig. 1). Los explantes de arándano que se utilizaron para la propagación fueron proporcionados por YURA YURABUSINESS SAS (fig. 2), empresa dedicada a la micropropagación de especies vegetales de interés comercial.

Figura 1

Hojas secas de moringa pulverizadas



Figura 2

Explantes utilizados para la micropropagación

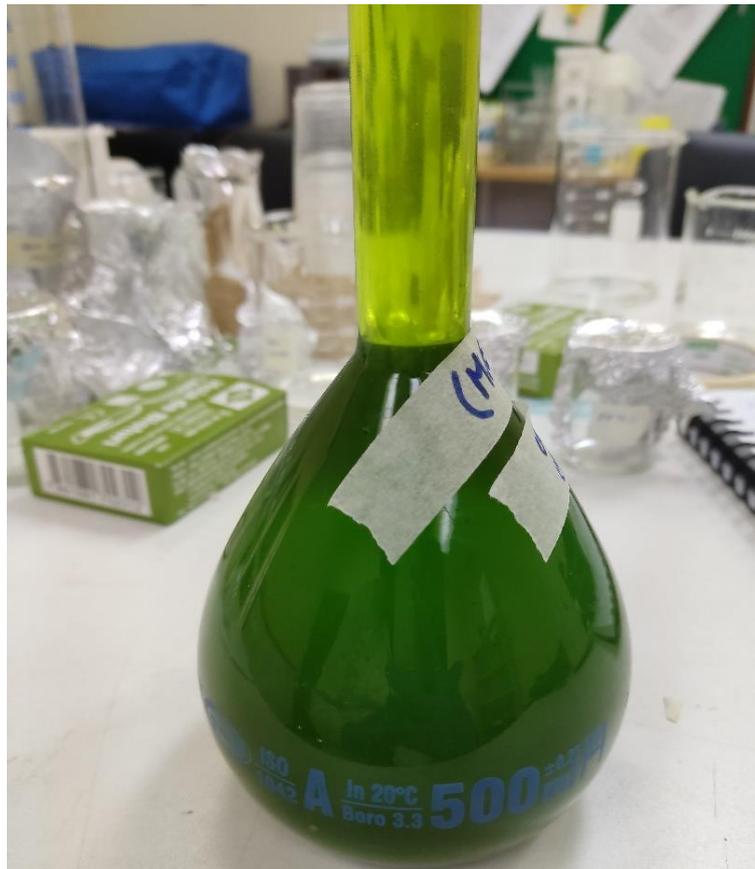


Preparación del extracto etanólico de hojas de *M. oleifera*.

El extracto de hoja de *Moringa oleifera* Lam (EHM) se preparó utilizando el método establecido por Yap et al. (2021) con modificaciones. Se mezclaron 50 g de hojas pulverizadas de *M. oleifera* Lam con 500 mL de etanol al 80% que se dejó reposar durante 72 h a temperatura ambiente con agitación manual ocasional (fig. 3).

Figura 3

Extracto etanólico de hojas de *Moringa oleifera* Lam. (EHM)



Se utilizó un filtro millipore 0.22 μm para filtrar el extracto (fig. 4), obteniendo una solución con una concentración equivalente a 10 ppm de zeatina presente en el extracto de moringa ya que, según reportan Mashamaite et al. (2022), el contenido aproximado de zeatina presente en las hojas de moringa es de 0.2 mg/g. Las concentraciones utilizadas fueron de C1 = 2.5 ppm, C2 = 2 ppm y C3 = 1.5 ppm de zeatina presente en el EHM como indica Nihayati & Najah (2021) para el cultivo *in vitro*.

Figura 4

Filtración del extracto de EHM mediante filtro millipore 0.22 μm



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

En el presente estudio, se utilizó el protocolo establecido por Clapa et al., (2022) con ligeras modificaciones. Los explantes se extajeron del cultivo *in vitro* de arándanos biloxi que habían sido cultivados previamente en medio de cultivo Anderson Rhododendron – AN (Anderson, 1980), que es un medio de cultivo basal eficiente para la iniciación de brotes en *Vaccinium corymbosum* L. La preparación del medio se realizó según las pautas descritas por Gajdosova & Laimer (2009), a partir de una mezcla de sales macro y microminerales que incluye vitaminas; para la preparación de 1 litro de medio, se disolvieron completamente 2 g de medio en agua bidestilada, con 30 g de sacarosa, 8 g de agar y se ajustó el pH del medio a 5.2 con HCl y KOH (fig. 5). Las hormonas vegetales (soluciones de extracto de hoja de moringa) se colocaron una vez que se disolvieron los reactivos sólidos. El medio se esterilizó en autoclave a $1 \text{ kg}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ (15 psi), 121°C , durante 20 min. La zeatina se utilizó como control, a una concentración de 0.5 ppm, mismo que es un constituyente lábil al calor

se esterilizó por filtración y se añadió al medio después del autoclave.

Para los medios sólidos se utilizaron como recipientes de cultivo frascos de 500 mL, de 9 cm de diámetro y 13,5 cm de alto. En cada recipiente (unidad experimental) se inocularon 10 fragmentos de brotes, cada uno de 1,5-2 cm (fig. 6).

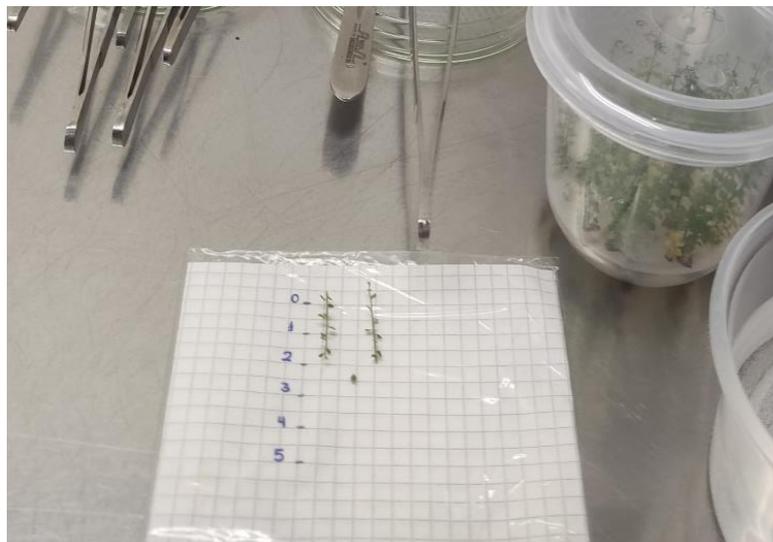
Figura 5

Ajuste de pH del medio de cultivo



Figura 6

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



Los cultivos *in vitro* se incubaron en la sala de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h con una intensidad de luz de $32,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $23 \pm 3^\circ\text{C}$ y $50 \pm 2\%$ de humedad (fig. 7). Los datos fueron recogidos luego de 4 semanas de cultivo para su análisis en ensayos de antioxidantes y de regeneración *in vitro* como tasa de proliferación (PR), representada por número de brotes obtenidos/explante inicial; la longitud media de los brotes (SL) y el peso fresco (FW), que se calculó como explantes/cultivar/tratamiento.

Figura 7

Fascos de cultivos experimentales colocados en la sala de crecimiento.



Preparación del extracto para ensayos de antioxidantes

La metodología se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Mihai, Landazuri-Abarca, et al. (2022). De cada tratamiento experimental se extrajo 1 g de muestra que se llevó a maceración en 10 mL etanol al 99.5% para obtener un extracto etanólico que se dejó en reposo durante 72 h.

Determinación de Compuestos Antioxidantes

La preparación de las muestras se llevó a cabo según lo descrito por Mihai, Melo Heras, et al. (2022). El extracto se obtuvo al mezclar 1 g de muestra con 10 mL de etanol 99.5% y llevado a maceración. El extracto filtrado se ajustó para cada ensayo, en caso de observarse una absorbancia alta o incongruente, ya que se aplicó un factor de dilución para obtener las mediciones de absorbancias.

La obtención del contenido de fenoles totales (TPC) de los extractos de *V. corymbosum* L. se realizó mediante la metodología descrita por Madaan et al. (2011), basada en el método de Folin-Ciocalteu. Se utilizó una solución de Folin-Ciocalteu 1 N. En un tubo de ensayo se colocaron 1 mL de muestra, 1 mL de agua destilada y 1.5 mL de reactivo de Folin 1 N. Se dejaron incubar durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se colocaron 0.4 mL de Na₂CO₃ al 20% (p/p) a cada tubo de ensayo, dejándolos reposar a temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia del estándar se midió a 765 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS, con etanol 99.5% como blanco. El contenido fenólico total se expresó como equivalente de ácido gálico (GAE) obtenidos de la curva de calibración $y = 0.0112x + 0.1759$ ($R^2 = 0.9794$).

El método de cuantificación del contenido total de flavonoides (TFC) se llevó a cabo siguiendo el método de Madaan et al. (2011). En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de muestra y mezclado con 0.3 mL NaNO₃, dejado en reposo durante 5 min. Luego, se añadió 0.3 mL de AlCl₃ al 10 %, seguido de 2 mL de NaOH 1 M. La absorbancia se registró a 435 nm con quercetina (QE) como estándar. Los resultados se expresaron en mg QE/ g de muestra fresca, obtenidos de la curva $y = 0.0296x + 0.067$ ($R^2 = 0.9878$).

Determinación de la Capacidad Antioxidante

El ensayo de capacidad antioxidante se analizó de acuerdo a los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP. La solución de DPPH se preparó según lo descrito por Shimamura et al. (2014), al pesar 7.89 mg DPPH en una balanza química que se disolvió en etanol al 99.5%, obteniendo una concentración final de 0.2 mM DPPH mantenida en la oscuridad por un mínimo de 2 h para establecer la absorbancia. Después de pesar 7.89 mg DPPH en una

balanza química, se disolvió en etanol al 99.5% para obtener un volumen constante llenando 100 mL de un matraz de medición (0.2 mM DPPH). Se agregó 1 mL de solución de DPPH a un tubo de ensayo, seguido de 200 μ L de etanol. Después de mezclar, se midió la absorbancia a 517 nm. La solución de prueba fue ajustada a una absorbancia en un rango de 0.7-0.8. La solución ajustada se utilizó para el ensayo de barrido de radicales DPPH que consistió en agregar una alícuota (40 μ L) de extracto de hongos a 3 mL de solución etanólica de DPPH. El cambio de absorbancia a 517 nm se midió después de 30 min contra el blanco.

La actividad de captación de cationes radicales ABTS es un ensayo similar a DPPH, y se realizó de acuerdo con Mingle & Newsome (2020) con ligeras modificaciones. Se preparó una solución madre de ABTS a concentración 7 mM que se hizo reaccionar con una solución de persulfato de potasio 2.45 mM durante 24 h en oscuridad para producir una solución de color verde oscuro que contiene el catión radical ABTS. A partir de la solución madre se ajustó la solución de trabajo a una absorbancia de 0.7-0.8. La actividad eliminadora de radicales libres se ensayó mezclando 100 μ l de muestra de prueba con 2,9 ml de un estándar de trabajo ABTS en una microcubeta. La disminución de la absorbancia se midió exactamente a 7 min después de mezclar la solución. La absorbancia se midió a 734 nm en un espectrofotómetro.

Tanto para ABTS como para DPPH se utilizó la ecuación 1 descrita a continuación para determinar la capacidad antioxidante.

$$AA\% = 100\% * \frac{Abs_{blanco} - Abs_{muestra}}{Abs_{blanco}} \quad (1)$$

La capacidad antioxidante se reportó como equivalente molar de TROLOX por gramo de peso fresco de la muestra, cuyas concentraciones se obtuvieron mediante la curva de calibración $y = 18.073x + 1.2252$ ($R^2 = 0.9868$) para DPPH e $y = 34.102x + 9.2946$ ($R^2 = 0.9612$) para ABTS.

La capacidad para reducir los iones férricos, analizada en el ensayo de reducción FRAP, se midió utilizando un método modificado de Ibrahim & Jaafar (2011). La solución

FRAP fue preparada mezclando 100 mL buffer acetato 300 mM a un pH de 3.6, 10 mL de TPTZ 10 mM y 10 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. El ensayo se realizó añadiendo una alícuota de 200 μL del extracto de arándanos con la dilución adecuada a 3 mL de reactivo FRAP. La mezcla se incubó a 37°C en baño maría. Se midió la absorbancia a 593 nm y los resultados se reportaron como $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ de masa fresca obtenido mediante la curva de calibración $y = 0.5981x - 0.0082$ ($R^2 = 0.9989$).

Análisis estadístico

Las muestras fueron recolectadas luego de 30 días de haber sido propagados los explantes, en el momento de formación de callo y aparecimiento de los brotes.

Factores de estudio

Los factores de estudio planteados fueron el contenido de antioxidantes determinados por ensayos y la concentración de extracto de hoja de moringa utilizado evaluados en el tipo de muestra obtenida de los explantes.

Unidad experimental

La unidad experimental fue cada frasco de medio de cultivo modificado con la concentración de extracto de moringa y un total de 10 explantes propagados por unidad.

Tratamientos

El tratamiento estadístico se dividió en tres partes: análisis de fenoles y flavonoides como los principales compuestos fitoquímicos estudiados (tabla 3), capacidad antioxidante, detallada por los resultados de las pruebas de ABTS, DPPH y FRAP (tabla 4); y regeneración *in vitro* descrita por tasa de proliferación (PR), la longitud media de los brotes (SL) y el peso fresco (FW) respecto de las concentraciones de extracto de hoja de moringa utilizada (tabla 5). Se propuso un diseño experimental factorial anidado, que se usa cuando las clases de un factor interno no están relacionadas entre las clases del factor externo, los factores anidados son siempre factores aleatorios (Legendre, 2009), en el presente caso con dos factores cruzados A(resultados) y B(concentración). El experimento se realizó con cinco réplicas y un grupo control.

Tabla 3

Diseño Experimental Anidado para la determinación de fenoles y flavonoides.

Métodos	Concentración de zeatina en EHM (ZM) (ppm)			
	0	C1	C2	C3
Fenoles totales (TPC)	5	5	5	5
Flavonoides totales (TFC)	5	5	5	5

Tabla 4

Diseño Experimental Anidado para la determinación de la capacidad antioxidante.

Métodos	Concentración de zeatina en EHM (ZM) (ppm)			
	0	C1	C2	C3
DPPH	5	5	5	5
ABTS	5	5	5	5
FRAP	5	5	5	5

Tabla 5

Diseño Experimental Anidado para la determinación de la regeneración in vitro.

Métodos	Concentración de zeatina en EHM (ZM) (ppm)			
	0	C1	C2	C3
Tasa de regeneración <i>in vitro</i> (PR)	5	5	5	5
Longitud media de los brotes (SL)	5	5	5	5
Peso fresco (FW)	5	5	5	5

Según Gutiérrez & De la Vara (2012), el diseño anidado más simple describe dos factores A y B, con los niveles anidados en cada nivel de A, con ambos factores considerados como fijos para el tratamiento estadístico en el programa R. Por tanto, el modelo estadístico se describe como un ANOVA anidado (tabla 6).

Tabla 6

Valores esperados de los cuadrados medios (CM) en el diseño anidado con dos factores.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Fo
A: ZM	a-1	$CM = \sigma^2 + \frac{bn \sum \alpha_i^2}{a-1}$	$F_0^A = \frac{CM_A}{CM_E}$
B: antioxidantes	b-1	$CM = \sigma^2 + \frac{n \sum \sum \beta_{j(i)}^2}{a(b-1)}$	$F_0^{B(A)} = \frac{CM_{B(A)}}{CM_E}$
Error	N-a	$CM = \sigma^2$	
Total	a*b		

El estudio de correlación y comparación de compuestos fitoquímicos se realizó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

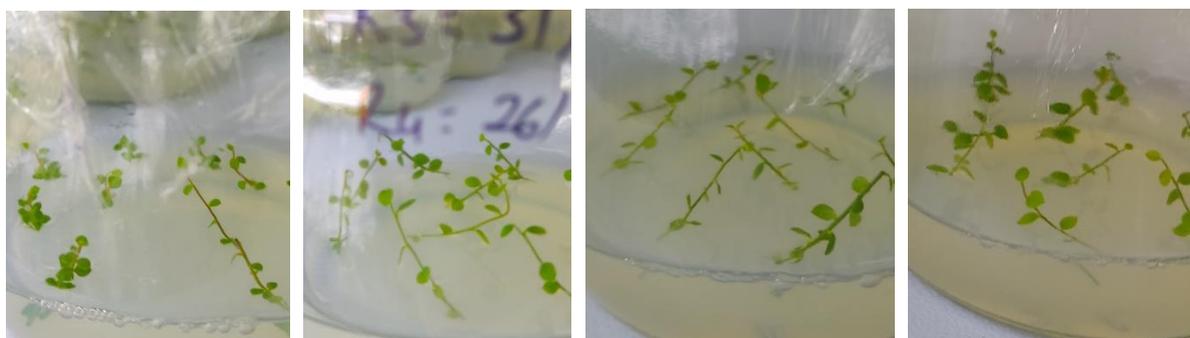
Capítulo IV: Resultados

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

El material vegetal micropropagado fue introducido en los medios de cultivo experimentales y control bajo condiciones de estricta asepsia total, en cámara de flujo. Los frascos fueron almacenados bajo oscuridad en el cuarto de crecimiento durante siete días. Al octavo día se registraron las primeras observaciones de la interacción entre los explantes y el medio experimental (fig. 8); siendo los grupos C1 y C2 los que presentaron un crecimiento mayor en los explantes.

Figura 8

Crecimiento vegetal a los 7 días de la introducción



a) C0

b) C1

c) C2

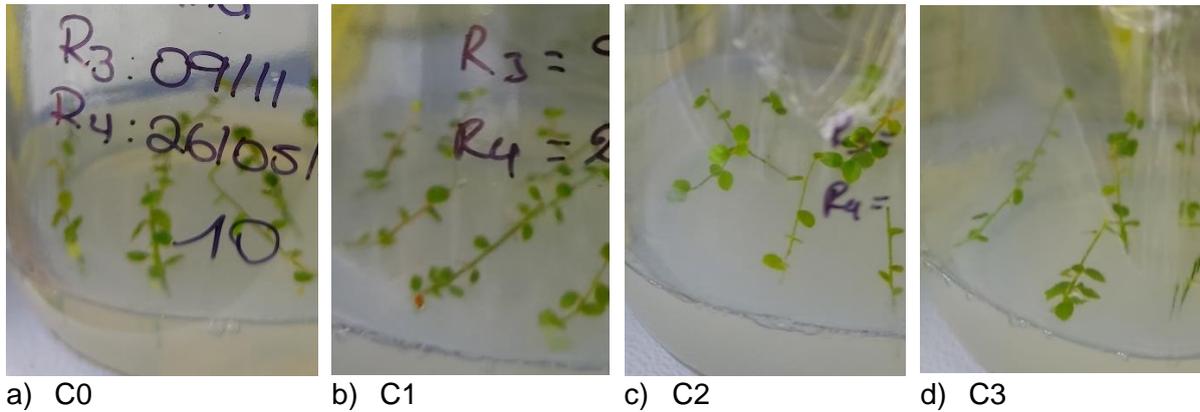
d) C3

Nota. a) Grupo control; b) concentración a 2.5 ppm ZM; c) concentración 2 a 2 ppm ZM; d) concentración 3 a 1.5 ppm ZM.

Al quinceavo día se registró en los grupos C1 y C2 un crecimiento uniforme y similar al crecimiento en el grupo control con zeatina 0.5 pmm (fig. 9). El día 21 se registró un crecimiento uniforme entre los grupos control y C1, el grupo C2 registró un crecimiento levemente menor a los grupos anteriores, mientras que el grupo C3 permaneció con los valores más bajos (fig. 10). Los datos de crecimiento se registraron cada siete días hasta completar 30 días de crecimiento en el que se observó el crecimiento de brotes en el medio control, mientras que en los medios experimentales se registró la presencia de pardeamiento en las hojas del material vegetal (fig. 11).

Figura 9

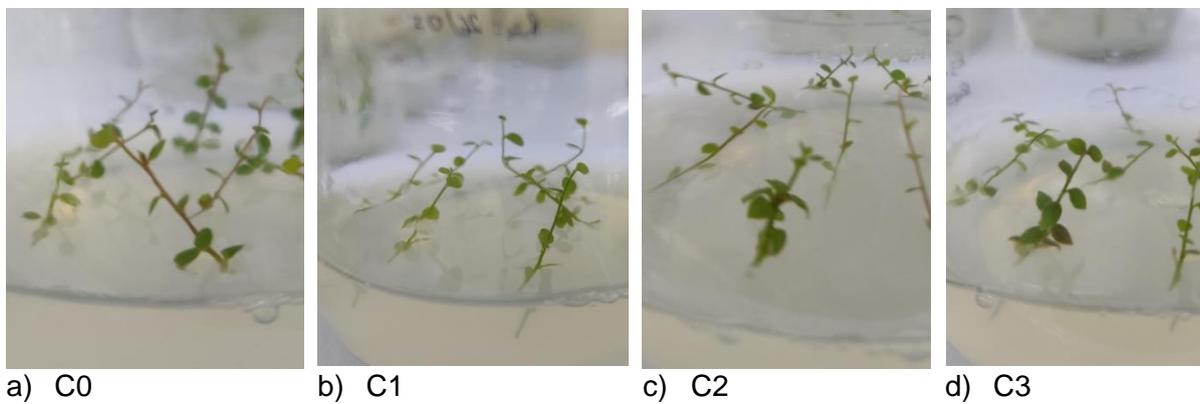
Crecimiento vegetal a los 15 días de la introducción



Nota. a) Grupo control; b) concentración a 2.5 ppm ZM; c) concentración 2 a 2 ppm ZM; d) concentración 3 a 1.5 ppm ZM.

Figura 10

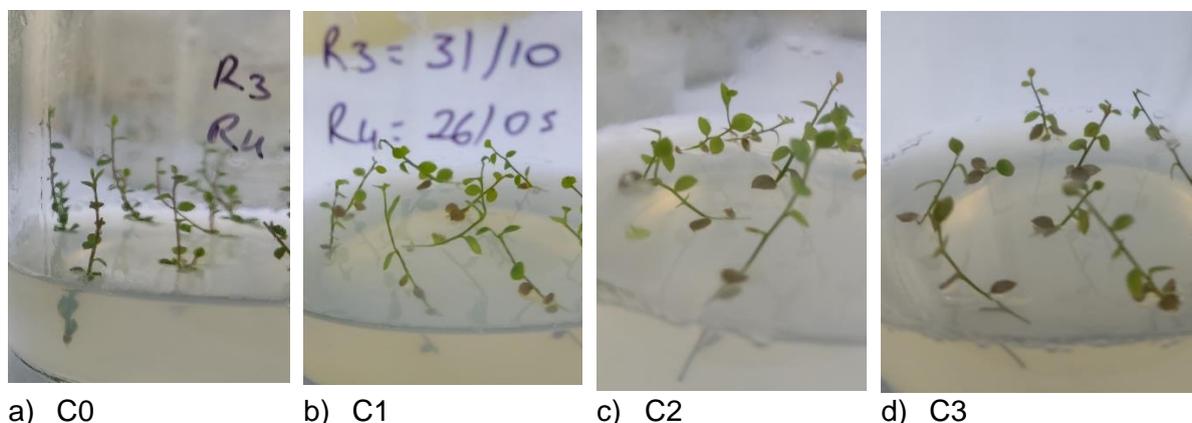
Crecimiento vegetal a los 21 días de la introducción



Nota. a) Grupo control; b) concentración a 2.5 ppm ZM; c) concentración 2 a 2 ppm ZM; d) concentración 3 a 1.5 ppm ZM.

Figura 11

Crecimiento vegetal a los 30 días de la introducción



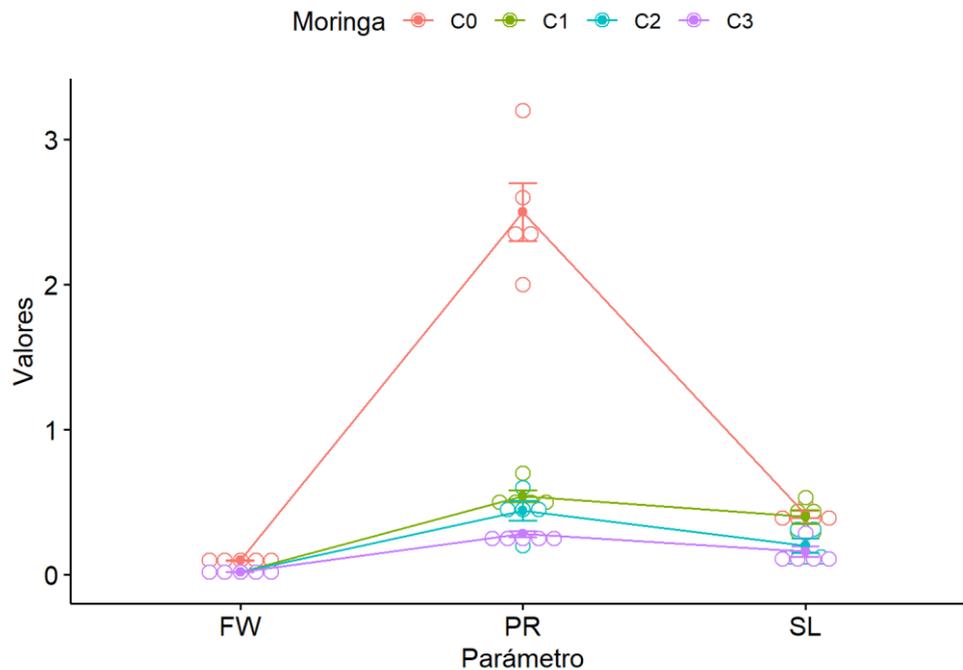
Nota. a) Grupo control; b) concentración a 2.5 ppm ZM; c) concentración 2 a 2 ppm ZM; d) concentración 3 a 1.5 ppm ZM.

Los resultados de las mediciones de los parámetros de crecimiento se muestran en la tabla 7. El peso fresco del material vegetal es más alto en el grupo control (C0), mientras que entre grupos experimentales es similar entre tratamientos, siendo el valor más bajo el tratamiento 3 (C3). Mientras que, para la tasa de propagación, el valor más alto se obtuvo en el grupo control (C0), con una diferencia marcada entre los demás grupos. La longitud media de los brotes reveló un crecimiento similar entre el material vegetal del grupo control (C0) y el tratamiento 1 (C1) (fig. 12).

Tabla 7

Parámetros de crecimiento vegetal in vitro.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Tasa de propagación (unidades)	Longitud media (cm)
C0	0.0983±0.00074	2.5±0.4000	0.4154±0.0466
C1	0.0197±0.000228	0.54±0.0799	0.399±0.0934
C2	0.0196±0.0002593	0.44±0.1356	0.201±0.0993
C3	0.0194±0.0003087	0.28±0.0399	0.159±0.0696

Figura 12*Parámetros de crecimiento in vitro*

Nota. Peso fresco (FW) en g, Tasa de proliferación (PR) en unidades, Longitud media de los brotes (SL) en cm.

El análisis estadístico de los resultados y la verificación de supuestos reveló que no existe normalidad ni homocedasticidad para los datos de tasa de regeneración *in vitro* (PR), longitud media de los brotes (SL) y el peso fresco (FW), por lo que se procedió a realizar una transformación logarítmica y aplicando la transformada de rango alineado (ART) (apéndice 1). La Transformada de rango alineado (ART) proporciona un tratamiento no paramétrico preciso para los efectos principal y de interacción, que es una alternativa robusta para los modelos factoriales. Este modelo consiguió valores aceptables de homocedasticidad y normalidad, por lo que se aplicó un ART Anova (fig. 13) en los datos no paramétricos, obteniendo diferencias significativas entre los grupos control y experimentales ($P_{valor} < 0.0001$). Finalmente, la prueba de Tukey reveló la distribución de las diferencias significativas entre grupos, siendo el grupo control (C0) el que se diferencia de los otros grupos (fig. 14).

Figura 13

Análisis de Varianzas de los datos con Transformada de Rango Alineado

Analysis of Variance of Aligned Rank Transformed Data

Table Type: Anova Table (Type III tests)

Model: No Repeated Measures (lm)

Response: art(trat)

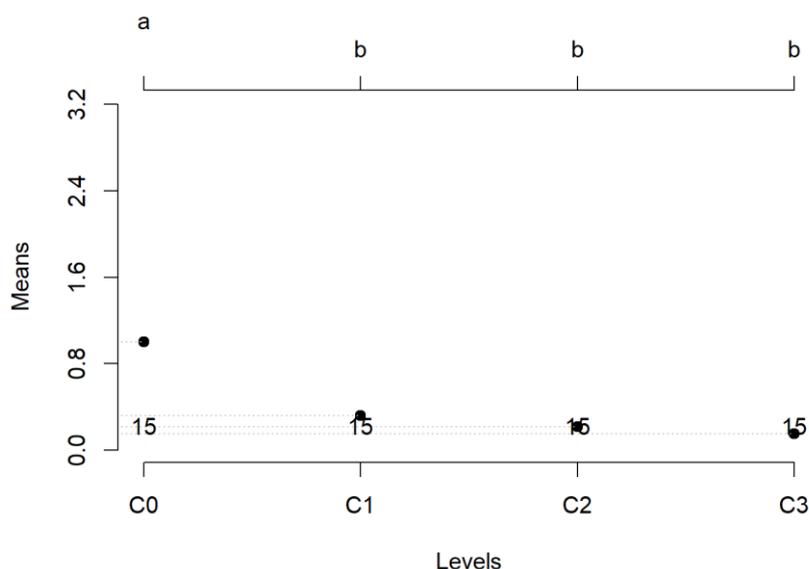
	Df	Df.res	F value	Pr(>F)
1 factor(Assay)	2	48	192.930	< 2.22e-16 ***
2 factor(Moringa)	3	48	61.987	< 2.22e-16 ***
3 factor(Assay):factor(Moringa)	6	48	65.807	< 2.22e-16 ***

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

Nota. Análisis de Varianza de los datos con Transformada de Rango Alineado no paramétrico (ART Anova) para modelo factorial.

Figura 14

Prueba de Tukey para la comparación de medias.



Preparación del extracto para ensayos de antioxidantes

Se recolectó 1 g de cada grupo experimental y 1 g del grupo control, utilizando el material vegetal de las cinco unidades experimentales, según el peso fresco (FW) registrado en la tabla 7. El extracto etanólico se dejó reposar durante 72 horas y se obtuvieron diluciones 1:2 y 1:4 con coloraciones más leves que el extracto original. Los extractos se registraron bajo la nomenclatura descrita en la tabla 8.

Tabla 8

Nomenclatura de las muestras utilizadas para los extractos etanólicos

Muestra	Descripción	Código
Muestra 1	Material vegetal del grupo control (Zeatina 0.5 ppm)	C0
Muestra 2	Material vegetal del grupo experimental 1 (ZM 2.5 ppm)	C1
Muestra 3	Material vegetal del grupo experimental 2 (ZM 2.0 ppm)	C2
Muestra 4	Material vegetal del grupo experimental 3 (ZM 1.5 ppm)	C3

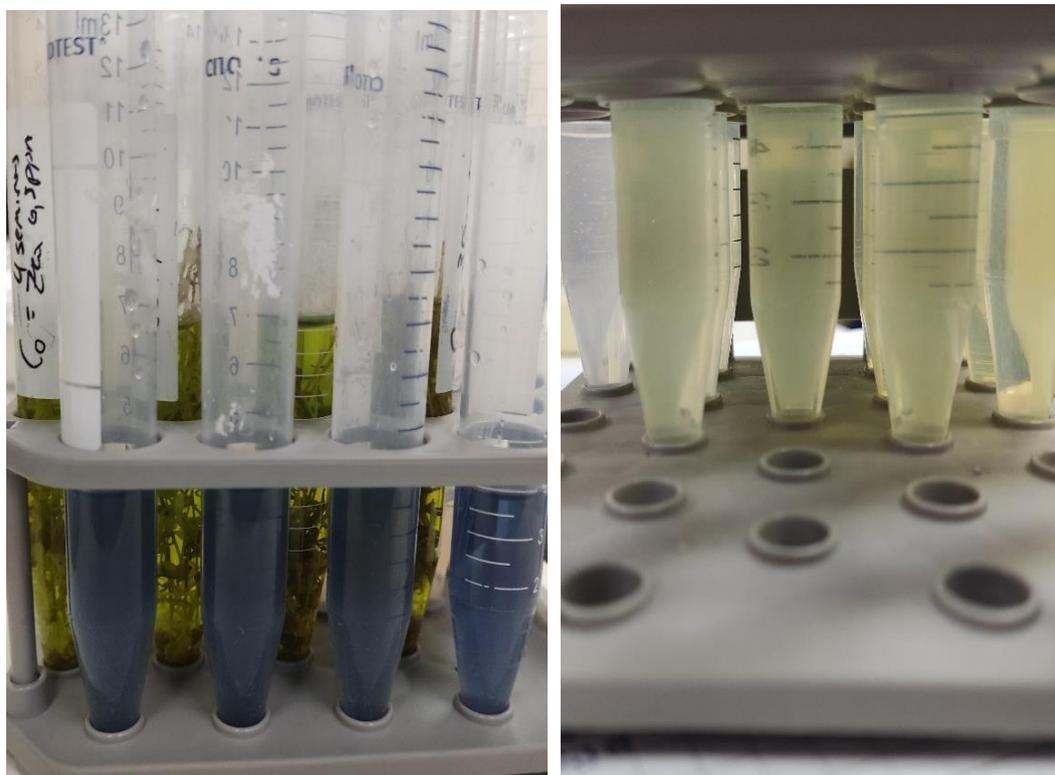
Determinación de Compuestos Antioxidantes

Los fenoles y flavonoides vegetales poseen una actividad biológica potente ya que, como mencionan Chowdhary et al. (2021), están encargados de regular funciones fisiológicas cruciales en las plantas para proporcionar resistencia contra diversas condiciones de estrés biótico y abiótico, por lo que resalta la necesidad de su determinación en las muestras vegetales. La investigación del contenido de compuestos antioxidantes en los extractos de arándano se llevó a cabo mediante la determinación del contenido total de fenoles (TPC) y el contenido total de flavonoides (TFC) mediante las pruebas de Folin-Ciocalteu (F-C) y Método colorimétrico del cloruro de aluminio, respectivamente.

El ensayo F-C implica la reducción del reactivo F-C con compuestos fenólicos en un medio alcalino, resultando en la formación de un complejo de color azul evaluado a una absorbancia de 765 nm (Molole et al., 2022). En el presente estudio, se realizó el ensayo F-C utilizando los extractos obtenidos del material vegetal, obteniendo una reacción positiva al registrar una coloración azul en los tubos respectivos, confirmando la presencia de fenoles en el extracto (fig. 15a). La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría a una absorbancia de 765 nm, las absorbancias registradas se procesaron mediante la ecuación $y = 0.0112x + 0.1759$ ($R^2 = 0.9794$) obtenida de la curva de calibración de F-C, realizada a partir de soluciones seriadas del estándar de ácido gálico a concentraciones en un rango de 0 a 500 mg/L (apéndice 2). Los resultados fueron reportados en mg de equivalente a ácido gálico por gramo de peso fresco (Tabla 9).

Figura 15

Pruebas colorimétricas de contenido de antioxidantes TPC y TFC



a) TPC

b) TFC

El contenido total de flavonoides (TFC) se determinó mediante el ensayo colorimétrico con cloruro de aluminio, que se basa en la formación de quelatos de Al(III)-flavonoides, debido a sus muchos grupos oxo e hidroxilo; por consiguiente la adición de NaNO_2 provoca la formación de complejos de Al(III)-flavonoides de color amarillo que se miden una longitud de onda específica en el rango de 410 a 440 nm (Shraim et al., 2021). En el presente estudio, la prueba cualitativa dio resultados positivos, con una coloración amarilla leve presente en todos los tubos de ensayo de cada grupo (fig. 15b). La cuantificación espectrofotométrica se realizó a 435 nm, posteriormente las absorbancias se procesaron con la ecuación $y = 0.0296x + 0.067$ ($R^2 = 0.9878$), resultante de la curva de calibración para flavonoides realizada a partir de soluciones estándares de quercetina en el rango de 0 a 200 mg/L (apéndice 3). Los resultados se reportaron como mg de equivalente a quercetina por cada 10 g de peso fresco (tabla 9).

Tabla 9

Contenido de compuestos antioxidantes

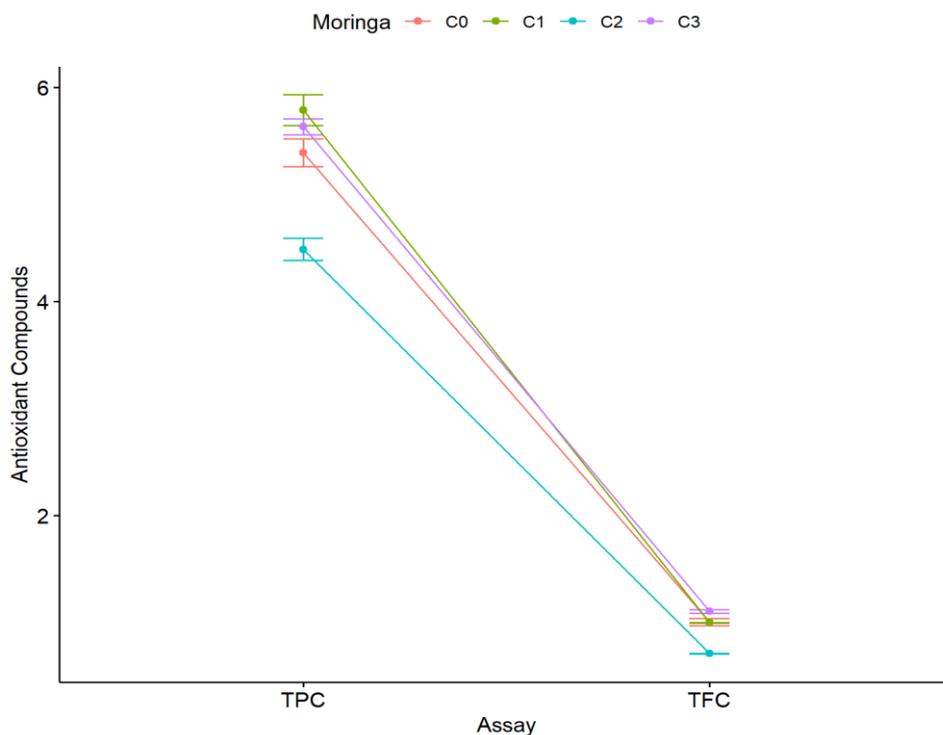
Tratamiento	TPC (mg GAE/g fw)	TFC (mg QE/10 g fw)
C0	5.38965±0.18655	0.98919±0.04594
C1	5.7882±0.20465	1.00135±0
C2	4.48765±0.14705	0.6991±0.01738
C3	5.63301±0.10726	1.1009±0.02155

Nota. Contenido total de fenoles (TPC) en mg GAE/g fw y contenido total de flavonoides (TFC) en mg QE/10 g fw.

Los grupos control (C0) y los grupos experimentales C1 y C3 presentan valores similares. El tratamiento C2 presenta los valores más bajos tanto para TPC (4.48765 ± 0.14705) como para TFC (0.6991 ± 0.01738), como se visualiza en la figura 16.

Figura 16

Determinación de compuestos antioxidantes mediante TPC y TFC



Nota. Contenido total de fenoles (TPC) en mg GAE/g fw y contenido total de flavonoides (TFC) en mg QE/10 g fw.

Posteriormente, se demostró la existencia de diferencias significativas mediante el análisis de varianza anidado para dos factores con un $P_{valor} < 0.0001$ (fig. 17). Se verificó que el modelo cumple los supuestos de homocedasticidad mediante la prueba de Levene y de normalidad mediante Shapiro-Wilk (apéndice 4). La prueba de Tukey fue utilizada para verificar las diferencias entre medias, hallando que el grupo experimental C2 es distinto de los demás grupos a nivel de contenido antioxidante (fig. 18).

Figura 17

ANOVA anidado de dos factores para TPC y TFC

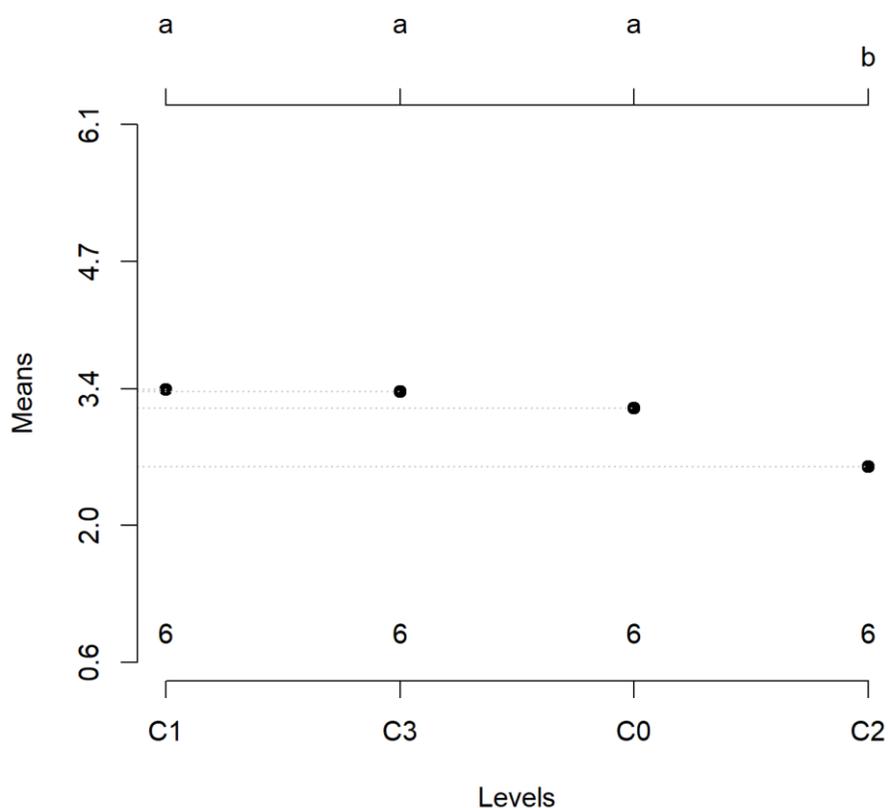
```
> #ver resumen del resumen de ANOVA anidado
> summary(nest)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
berries\$Assay	1	114.63	114.63	5440.78	< 2e-16 ***
berries\$Assay:factor(berries\$Moringa)	6	3.31	0.55	26.15	2.04e-07 ***
Residuals	16	0.34	0.02		

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

Figura 18

Prueba de Tukey para la comparación de medias

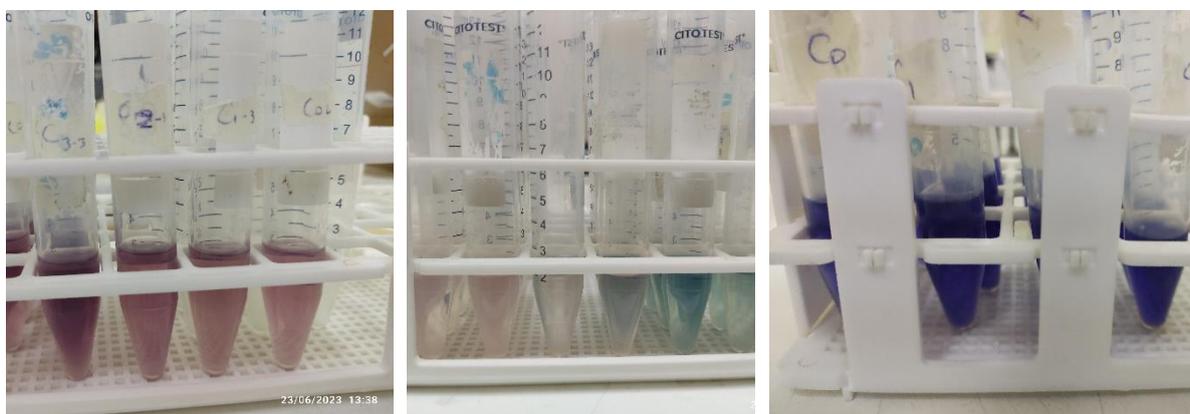


Determinación de la Capacidad Antioxidante

Los compuestos fenólicos cumplen un rol fundamental frente al estrés oxidativo puesto que actúan como antioxidantes no solo por su capacidad para donar hidrógeno o electrones, sino también porque son intermediarios radicales (Chaves et al., 2020) es así que, la actividad antioxidante representa la capacidad de inhibir el proceso de oxidación, en consecuencia, todos los sistemas probados que utilizan un radical libre estable (DPPH, ABTS, FRAP, etc.) dan información sobre la actividad antioxidante o captadora de radicales (Moharram & Youssef, 2014). La capacidad de los antioxidantes cuantificados mediante TPC y TFC fue evaluada mediante las pruebas de DPPH, ABTS y FRAP. La prueba de DPPH determina la capacidad de donación de átomos de hidrógeno de los extractos de plantas mediante la decoloración de una solución de metanol de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), pasando de un color violeta/púrpura en solución de metanol a tonos de color amarillo en presencia de antioxidantes, mientras que la absorbancia se mide espectrofotométricamente a 517 nm (Rahman et al., 2015). En el presente estudio, la prueba colorimétrica cualitativa dio resultados positivos al presentarse un cambio notable en la coloración de la solución de DPPH frente a la presencia de compuestos antioxidantes para todos los extractos (fig. 19a).

Figura 19

Pruebas colorimétricas de DPPH, ABTS y FRAP



a) DPPH

b) ABTS

c) FRAP

Las absorbancias registradas a 517 nm se transformaron a porcentajes de inhibición que a su vez se procesaron mediante la ecuación $y = 18.073x + 1.2252$ ($R^2 = 0.9868$), obtenida de la curva de calibración construida a partir de soluciones estándar de TROLOX en el rango de 0 a 5 mM (apéndice 5). Los resultados se reportaron como μmol equivalente de TROLOX por gramo de peso fresco (tabla 10).

La actividad de eliminación de radicales libres también se determinó mediante el ensayo de decoloración de cationes radicales ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), un ensayo espectrofotométrico que utiliza el catión radical ABTS oxidado ($ABTS^{•+}$) para reaccionar con antioxidantes para reducir el radical ABTS y perder su color verde azulado, medido a 734 nm (Cano et al., 2023). Como se observa en la figura 19b, la prueba colorimétrica fue positiva al presentar una decoloración de la solución de ABTS frente a la presencia de antioxidantes en el extracto. Las absorbancias obtenidas a 734 nm se procesaron para obtener los porcentajes de inhibición del extracto, estos valores se utilizaron para determinar la concentración mediante la ecuación $y = 34.102x + 9.2946$ ($R^2 = 0.9612$), obtenida mediante la curva de calibración de TROLOX realizada con soluciones estándar en un rango de 0 a 2.5 mM (apéndice 6). Los resultados se expresaron como μmol equivalente de TROLOX por gramo de peso fresco (tabla 10).

El poder reductor complementa las pruebas de capacidad antioxidante, por lo que se usó el método FRAP para evaluar esta propiedad. El método se basa en la reducción del complejo Fe^{3+} TPTZ (complejo incoloro) a Fe^{2+} -tripirydyltriazine (complejo de color azul) formado por la acción de antioxidantes donantes de electrones a bajo pH, con medición de absorbancia a 593 nm (Rajurkar & Hande, 2011). La prueba cualitativa dio resultados positivos para todos los extractos ya que se registra el cambio de color a un azul intenso en los tubos de cada extracto (fig. 19c). Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro a 593 nm. Posteriormente los valores se procesaron utilizando la ecuación $y = 0.5981x - 0.0082$ ($R^2 = 0.9989$) resultante de la curva de calibración construida a partir de soluciones estándar a diferentes concentraciones de FeSO_4 en un rango de 0 a 2.5 mM (apéndice 7). Los resultados se expresaron como μmol de Fe^{3+} por gramo de peso fresco.

Tabla 10

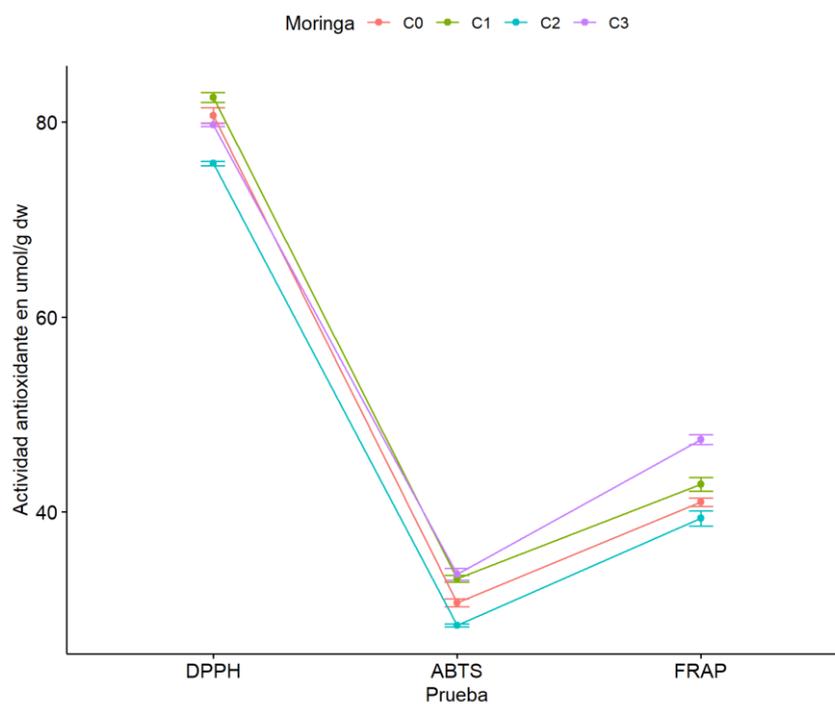
Capacidad Antioxidante (DPPH, ABTS) y Poder reductor (FRAP)

Tratamiento	DPPH	ABTS	FRAP
C0	80.70199±1.11138	30.63882±0.55653	40.99203±0.60582
C1	82.54551±0.71049	33.11931±0.48407	42.79032±0.99623
C2	75.76309±0.31714	28.30978±0.22088	39.3145±1.09317
C3	79.70735±0.23135	33.56547±0.86606	47.3845±0.71498

El grupo control (C0) y los grupos experimentales C1 y C3 presentaron valores similares entre los tres ensayos de capacidad antioxidante y poder reductor. Para DPPH, el valor más alto se encontró en la muestra de material vegetal de C1, mientras que la muestra vegetal C3 presenta los valores más altos en ABTS (33.56547±0.86606) y FRAP (47.3845±0.71498). Por otro lado, las muestras de C2 presentan los valores más bajos para los tres tratamientos (fig. 20).

Figura 20

Capacidad Antioxidante (DPPH, ABTS) y Poder reductor (FRAP)



Nota. Capacidad antioxidante en $\mu\text{mol TROLOX/g fw}$ y poder reductor en $\mu\text{mol Fe}^{3+}/\text{g fw}$.

Para realizar el análisis estadístico del modelo planteado para capacidad antioxidante se verificaron los supuestos de homocedasticidad y normalidad mediante las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk respectivamente (apéndice 8). El modelo cumple los supuestos, por lo que se procedió a realizar el ANOVA anidado para los valores de capacidad antioxidante, demostrando que existen diferencias significativas entre grupos con un $P_{valor} < 0.0001$ (fig. 21). Finalmente, se realizó la prueba de Tukey para verificar las diferencias entre medias, mediante el cual se clasifican tres grupos distintos, como se muestra en la figura 22.

Figura 21

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

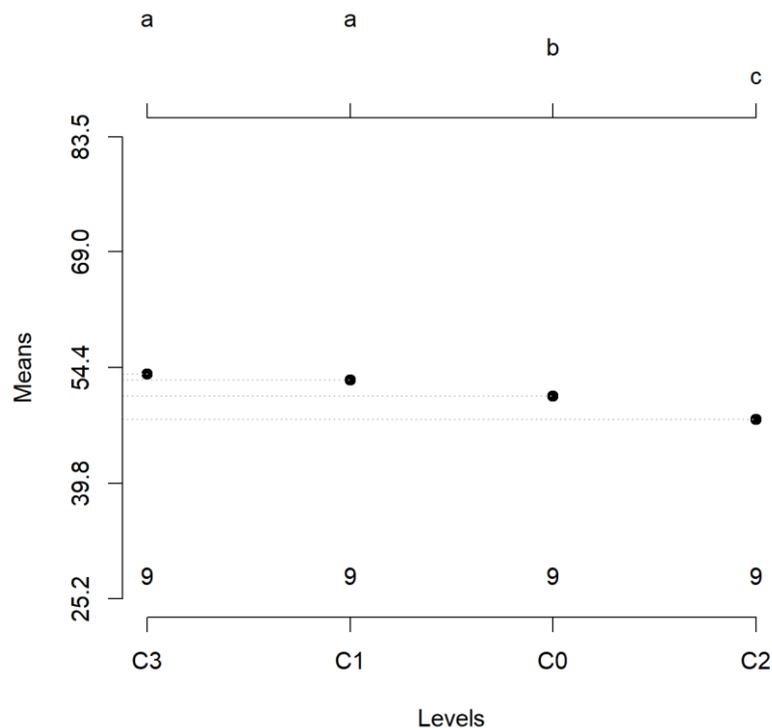
```
> #ver resumen del resumen de ANOVA anidado
> summary(nest)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
berries1\$Assay	2	15317	7658	9720.80	< 2e-16	***
berries1\$Assay:factor(berries1\$Moringa)	9	236	26	33.29	2.01e-11	***
Residuals	24	19	1			

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

Figura 22

Prueba de Tukey para valores de capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP)



Análisis de Correlación de Pearson.

La correlación implica la medición de la asociación, la relación o la correlación entre dos variables mediante coeficientes de correlación varían de -1 a +1, que indican coeficientes de correlación perfectos negativos y perfectos positivos respectivamente, mientras que un coeficiente de correlación de 0 implica que no hay correlación, entre variables (Esezi Isaac & Eric Chikweru, 2018). La correlación de Pearson entre TFC, TPC y Capacidad Antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP) para las muestras vegetales muestra una correlación significativa ($P_{valor} < 0.0001$) y positiva (fig. 23), con coeficientes de Pearson (R) en TPC de 0.83083 para DPPH, 0.851777 para ABTS y 0.610988 para FRAP, mientras que en TFC se hallaron coeficientes de 0.768352 en DPPH, 0.880531 para ABTS y 0.772579 para FRAP (tabla 11). Esto indica que el contenido de polifenoles de los extractos de *V. corymbosum* L. sí contribuye a su actividad antioxidante debido a su capacidad donadora de electrones de hidrógeno.

Figura 23

Matriz de correlación de los coeficientes de Pearson

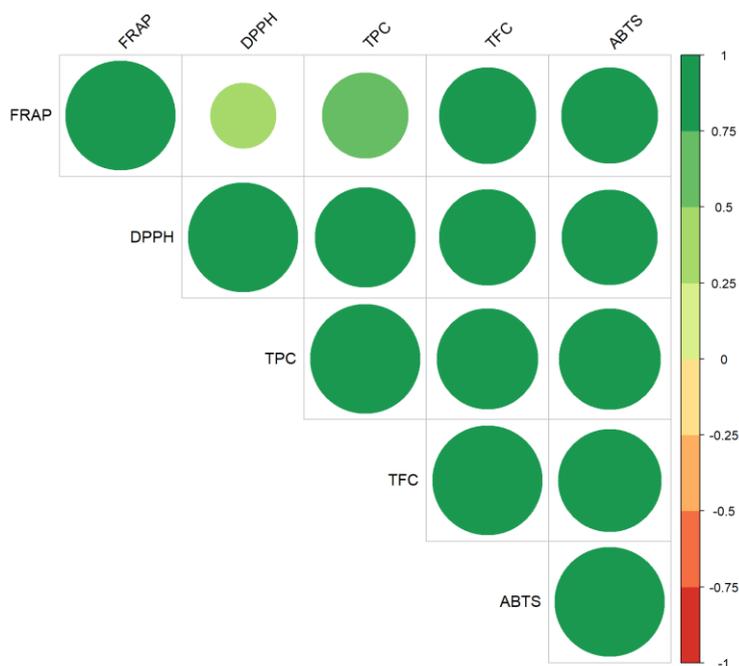


Tabla 11*Coeficientes de Correlación de Pearson en el rango de -1 a +1*

Prueba	TPC	TFC	DPPH	ABTS	FRAP
TPC	1	0.847472	0.83083	0.851777	0.610988
TFC	0.847472	1	0.768352	0.880531	0.772579
DPPH	0.83083	0.768352	1	0.754753	0.360216
ABTS	0.851777	0.880531	0.754753	1	0.76692
FRAP	0.610988	0.772579	0.360216	0.76692	1

Capítulo V: Discusión

Ecuador tiene una alta biodiversidad en relación a su superficie relativamente pequeña, y esto es reconocido a nivel mundial. Un subgrupo de esta biodiversidad, la agrobiodiversidad, es particularmente importante, ya que constituye la base de la seguridad y soberanía alimentaria de todos los ecuatorianos (Naranjo et al., 2018). El Ecuador cuenta con 24 formaciones bioclimáticas que son aptas para desarrollar actividades agrícolas diversas que permiten obtener productos de acuerdo a las demandas del mercado (Mihai et al., 2023).

El Ecuador ya tiene un inicio en el mercado internacional del arándano debido a que el cultivo ha mostrado índices rentables, debido al aumento de la demanda de la fruta y la tasa de cultivo exhibido en el 2021 son competitivos a nivel internacional (Agrocalidad, 2022). Por lo cual el fortalecimiento de su cultivo mediante técnicas de propagación *in vitro* es necesario para la mejora e incremento de la producción y su valor en el mercado internacional. *V. corymbosum* L. ha demostrado ser una especie excepcionalmente adecuada para cultivos *in vitro*, respaldado por varios estudios, como indican Clapa et al.(2022a) en los que se afirma que la zeatina y la 2-isopenteniladeniana (2iP) son los más efectivos en la micropropagación de arándanos. Como tal, el uso de bioestimulantes de origen vegetal como la moringa que contiene zeatina y comprenden numerosos compuestos bioactivos que pueden mejorar diversos procesos fisiológicos, puede aumentar el crecimiento de las plantas y el rendimiento económico a nivel *in vitro* (Mashamaite et al., 2022).

En el presente estudio se tomaron en cuenta las concentraciones presentes de zeatina en el extracto de moringa (EHM). Se observó un crecimiento positivo durante el período analizado en las unidades experimentales, lo que indica que el extracto sí cuenta con las propiedades bioestimulantes mencionadas anteriormente. En base al experimento conducido por Nihayati & Najah (2021), el efecto de la concentración de 2 ppm y 2.5 ppm de ZM fue positivo en el crecimiento *in vitro* tanto en su estudio como en la presente investigación.

Los resultados obtenidos para composición de compuestos fenólicos, flavonoides y su capacidad antioxidante demostraron uniformidad en cuanto a los tratamientos con el extracto de moringa. Se observaron valores similares en los grupos control (C0) y en los grupos experimentales C1 y C3, mientras que el tratamiento C2, todos los valores de TPC (4.48765 ± 0.14705 mg GAE/g fw), TFC (0.6991 ± 0.01738 mg QE/10g fw), DPPH (75.76309 ± 0.31714 μ mol TROLOX/g fw), ABTS (28.30978 ± 0.22088 μ mol TROLOX/g fw) y FRAP (39.3145 ± 1.09317 μ mol Fe³⁺/g fw) fueron los más bajos. El análisis de correlación de Pearson se utilizó para dilucidar la relación entre TFC, TPC y la capacidad antioxidante para la muestra obtenida, como explica Lim et al. (2019) lo que indica que el contenido de polifenoles del extracto vegetal contribuye a su capacidad donadora de electrones de hidrógeno. Entre ensayos se observa una correlación positiva alta entre sí, con un $P_{valor} < 0.0001$, demostrando que a mayor capacidad antioxidante mayor es el contenido de cada muestra vegetal.

Los resultados más bajos de C2, pueden explicarse en base al sistema de defensa antioxidante innato de las plantas. La importancia de un sistema de defensa antioxidante en las plantas es crucial para las plantas en ambientes estresantes, ya que retrasa la muerte celular programada al contrarrestar el efecto de los ROS, por lo tanto, al proporcionar una protección celular general, esto permite la capacidad de tolerancia al estrés de las plantas (Fujita & Hasanuzzaman, 2022). Los factores ambientales pueden afectar la producción de antioxidantes y metabolitos secundarios, esto a su vez afecta el valor nutricional y medicinal de la planta (Maury et al., 2020). Los polifenoles desempeñan funciones fisiológicas cruciales a lo largo del ciclo de vida de la planta, incluidas las respuestas al estrés, según Šamec et al. (2021), dado que la ruta biosintética de los fenilpropanoides generalmente se activa en condiciones ambientales nocivas como salinidad, contaminación, radiación, entre otros, lo que da como resultado la acumulación de varios compuestos fenólicos. Bajo este concepto, se destaca que el grupo C2 presentó un menor estrés oxidativo, con un crecimiento positivo, lo que se complementa en el estudio de Nihayati & Najah (2021), destacando la concentración de ZM de 2 ppm.

Dado que el estrés por salinidad también se ve inducido por la presencia de minerales, cabe mencionar que en el extracto de moringa se puede encontrar una combinación de quercetina, beta-sitosterol, kaempferol y ácido cafeoilgúinico además de minerales que incluyen hierro, potasio, calcio, cobre, zinc, magnesio, manganeso, etc. (Paikra et al., 2017). Sus hojas se pueden usar frescas, o los extractos secos y preparados se pueden aplicar foliarmente en las plantas que induce la síntesis de citoquininas, lo que provoca una variedad de respuestas fisiológicas que podrían incluir un aumento del área foliar y la actividad fotosintética (Mehdawe et al., 2023), otros estudios corroboran las aplicaciones del extracto de moringa como biofertilizante foliar (Abd El-Mageed et al., 2017; Yuniati et al., 2022). En concentraciones muy bajas o diluidas, el extracto de hoja de moringa actúa como bioestimulante, además que las cantidades mejoradas de zeatina hace que las plantas sean más verdes e imparte tolerancia al estrés en las plantas, sin embargo aún hay muy poca información disponible sobre su uso *in vitro* (Mehmood et al., 2021). En exceso o déficit los minerales pueden inducir estrés sobre el material vegetal, mientras que tiene un efecto protector en la concentración óptima de ZM.

El pardeamiento observado en los explantes experimentales transcurridos los 30 días de propagación puede deberse a distintas razones. La micropropagación de arándanos, que ha sido ampliamente estudiada, tiende a reflejar respuestas variables porque hay factores que inciden en el cultivo como el genotipo introducido, la composición del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento y la condiciones de aclimatación (Tejada-Alvarado et al., 2022). Los principales problemas encontrados en los medios experimentales fue la oxidación de los explantes y una baja tasa de multiplicación mientras que los brotes crecen demasiado. La oxidación es un problema común en las especies leñosas, como explica Nikoloff (2015), y 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.

Una baja tasa de multiplicación y un decrecimiento en el alargamiento de brotes puede darse por concentraciones muy altas o muy bajas de citoquinina, como explica

Ngomuo et al. (2013). Mientras que la composición del medio se puede explicar por la adición del extracto de moringa que se disolvió en etanol al 80%. Davis et al. (1978) indican que las respuestas de crecimiento de las células a los solventes orgánicos variaron según la especie de planta, pero en general los efectos tóxicos de los solventes aumentaron en el siguiente orden: cloroformo, DMSO (dimetilsulfóxido), metanol, acetona, isopropanol y etanol. En general, se prefiere la combinación de etanol y agua a la de los demás solventes, ya que, según los resultados hallados por Abebe (2023), el extracto de moringa contiene muchos grupos funcionales y el fuerte enlace de hidrógeno del solvente binario disolvió los componentes con éxito y que el disolvente binario etanol-agua no ha añadido ninguna toxicidad pero ha mejorado el proceso de extracción, en disoluciones con mayor proporción de agua. A pesar de que el etanol es el solvente con menos efectos, para los explantes que están forzados a diversos tipos de estrés, puede representar un compuesto con alta toxicidad.

Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

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.

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.

Referencias

- Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(2), 164–174.
- Abd El-Mageed, T. A., Semida, W. M., & Rady, M. M. (2017). Moringa leaf extract as biostimulant improves water use efficiency, physio-biochemical attributes of squash plants under deficit irrigation. *Agricultural Water Management*, 193, 46–54.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.08.004>
- Abd Rani, N. Z., Husain, K., & Kumolosasi, E. (2018). Moringa Genus: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 108.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00108>
- Abebe, M. (2023). “*Moringa Oleifera* Leaf Extract Using Binary Solvent Mixtures.” *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 48(2), 39492–39496.
<https://doi.org/10.26717/bjstr.2023.48.007617>
- Agrocalidad. (2022). *Arándanos ecuatorianos ya conquistan el mercado de Estados Unidos*. Noticias. <https://www.agrocalidad.gob.ec/arandanos-ecuatorianos-ya-conquistan-el-mercado-de-estados-unidos/>
- Ahmed, F. (2018). Antioxidant activity of *Ricinus Communis*. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 5(4), 3–8. <https://doi.org/10.19080/omcij.2018.05.555667>
- Aremu, A. O., Fawole, O. A., Makunga, N. P., Masondo, N. A., Moyo, M., Buthelezi, N. M. D., Amoo, S. O., Spíchal, L., & Doležal, K. (2020). Applications of Cytokinins in Horticultural Fruit Crops: Trends and Future Prospects. *Biomolecules*, 10(9).
<https://doi.org/10.3390/biom10091222>
- Bakry, B. A., Sadak, M. S., Abd El-Razik, T. M., & El-Karamany, M. F. (2021). Moringa leaves extract and zeatin for maximizing yield and quality traits of two flax cultivars.

Asian Journal of Plant Sciences, 20(4), 620–630.

<https://doi.org/10.3923/ajps.2021.620.630>

Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C.-M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>

Basra, S. M. A., & Lovatt, C. J. (2016). Exogenous applications of moringa leaf extract and cytokinins improve plant growth, yield, and fruit quality of cherry tomato. *HortTechnology*, 26(3), 327–337. <https://doi.org/10.21273/horttech.26.3.327>

Brenes Angulo, A., Castillo Matamoros, R., & Gómez-Alpizar, L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium* spp.) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía Costarricense*, 39(1), 7–23. <https://doi.org/10.15517/rac.v39i1.19541>

Bunea, A., Ruginǎ, D. O., Pinteǎ, A. M., Sconța, Z., Bunea, C. I., & Socaciu, C. (2011). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(2), 70–76. <https://doi.org/10.15835/nbha3926265>

Caballero-Carvajal, J. de J. (2015). *CRECIMIENTO Y DESARROLLO VEGETATIVO DE DOS CULTIVARES DE ARANDANO (Vaccinium corymbosum L) BILOXI Y SHARPBLUE EN LA SABANA DE BOGOTA* (Issue 16.1.2015) [Universidad militar Nueva Granada]. [https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/6443/TRABAJO DE GRADO ENTREGADO..pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/6443/TRABAJO_DE_GRADO_ENTREGADO..pdf?sequence=2&isAllowed=y)

Cabrera, C., Carlier, E., & Marina Zapata, L. (2021). *Mineral composition of blueberries (Vaccinium corymbosum) cultivated in the northeast region of Argentina*. 22. <https://orcid.org/0000-0002-4362-5014>

- Cabrera, C., Carlier, E., & Zapata, L. M. (2021). Mineral composition of blueberries (*Vaccinium corymbosum*) cultivated in the northeast region of Argentina. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 22(1).
<https://www.redalyc.org/journal/813/81367929007/html/#:~:text=The contribution of these minerals,and manganese 28.5-224.5 %25.>
- Cano, A., Maestre, A. B., Hernández-Ruiz, J., & Arnao, M. B. (2023). ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. *Processes*, 11(1).
<https://doi.org/10.3390/pr11010185>
- Chaves, N., Santiago, A., & Alías, J. C. (2020). Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010076>
- Chimdessa, E., & Agricultural, O. (2020). Composition and Preparation of Plant Tissue Culture Medium. *Journal of Tissue Culture and Bioengineering*, 3(01).
<https://doi.org/10.29011/2688-6502.000020>
- Chowdhary, V., Alooparampil, S., Pandya, R. V., & Tank, J. G. (2021). Physiological Function of Phenolic Compounds in Plant Defense System. In F. A. Badria (Ed.), *Phenolic Compounds - Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications* (p. Ch. 10). IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.101131>
- Clapa, D., Nemeş, S.-A., Ranga, F., Hârţa, M., Vodnar, D.-C., & Călinoiu, L.-F. (2022a). Micropropagation of *Vaccinium corymbosum* L.: An Alternative Procedure for the Production of Secondary Metabolites. In *Horticulturae* (Vol. 8, Issue 6).
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8060480>
- Clapa, D., Nemeş, S. A., Ranga, F., Hârţa, M., Vodnar, D. C., & Călinoiu, L. F. (2022b). Micropropagation of *Vaccinium corymbosum* L.: An Alternative Procedure for the Production of Secondary Metabolites. *Horticulturae*, 8(6).

<https://doi.org/10.3390/horticulturae8060480>

- Cortés-Rojas, M. E., Mesa-Torres, P. A., Grijalba-Rativa, C. M., & Pérez-Trujillo, M. M. (2016). Rendimiento y calidad de frutos de los cultivares de arándano Biloxi y Sharpblue en Guasca, Colombia. *Agronomía Colombiana*, *34*(1), 33–41.
<https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1.54897>
- Davis, D. G., Wergin, W. P., & Dusbabek, K. E. (1978). Effects of organic solvents on growth and ultrastructure of plant cell suspensions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *8*(1), 84–97. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-3575\(78\)90095-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-3575(78)90095-0)
- Debnath, S. C., & Goyal, J. C. (2020a). *In Vitro* Propagation and Variation of Antioxidant Properties in Micropropagated Vaccinium Berry Plants—A Review. *Molecules*, *25*(4).
<https://doi.org/10.3390/molecules25040788>
- Debnath, S. C., & Goyal, J. C. (2020b). Properties in Micropropagated Vaccinium Berry. *Molecules*, *25*(4), 1–26.
- Doyle, J. W., Nambeesan, S. U., & Malladi, A. (2021). Physiology of nitrogen and calcium nutrition in blueberry (*Vaccinium* sp.). *Agronomy*, *11*(4).
<https://doi.org/10.3390/agronomy11040765>
- Drózdź, P., Šežienė, V., & Pyrzyńska, K. (2018). Mineral Composition of Wild and Cultivated Blueberries. *Biological Trace Element Research*, *181*(1), 173–177.
<https://doi.org/10.1007/s12011-017-1033-z>
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jačević, V. (2021). The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Frontiers in Plant Science*, *11*(January).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>
- Dumont, S., & Rivoal, J. (2019). Consequences of Oxidative Stress on Plant Glycolytic and Respiratory Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, *10*.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00166>

- Edquén-Quintana, M. N. (2019). *Fungosis del Arándano (Vaccinium corymbosum L.) var. Biloxi en el distrito de Jesús - Cajamarca* [UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA]. <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/493>
- Ezezi Isaac, O., & Eric Chikweru, A. (2018). Test for Significance of Pearson's Correlation Coefficient (r). *International Journal of Innovative Mathematics, Statistics & Energy Policies*, 1(1), 11–23. <http://seahipaj.org/journals-ci/mar-2018/IJIMSEP/full/IJIMSEP-M-2-2018.pdf>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- Frías-Ortega, C. E., Alejo Santiago, G., Bugarín-Montoya, R., Aburto-González, C. A., Juárez-Rosete, C. R., Urbina-Sánchez, E., & Sánchez-Hernández, E. (2020). Concentración de la solución nutritiva y su relación con la producción y calidad de arándano azul. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(3), 1–14. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1296
- Fuentes-Morán, A. Y. (2021). *Arándanos Azules Aplicando Dos Presentaciones De Levaduras (Hidratada Y Deshidratada) a Diferentes Temperaturas De Activación (30 ° C Y 35 ° C)* [UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR]. <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/FUENTES MORAN ALLISSON YRINA.pdf>
- Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2022). Approaches to Enhancing Antioxidant Defense in Plants. In *Antioxidants (Basel, Switzerland)* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/antiox11050925>
- Gajdosova, A., & Laimer, M. (2009). Protocol for *in vitro* micropropagation of blueberry and

lingonberry. In *A Guide to some in vitro techniques—Small Fruit* (Issue January, pp. 34–40).

- Galarza, J. M. (2019). *Estudio de factibilidad para la creación de la empresa “Arandeanblue”, productora y comercializadora de arándano, ubicada en el sector de Chaquibamba, provincia de Pichincha* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/16067/1/T-ESPE-038590.pdf>
- García, E., Oldoni, T., De Alencar, S., Reis, A., Loguercio, A., & Grande, R. (2012). Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth. *Brazilian Dental Journal*, 23(1), 22–27. <https://doi.org/10.1056/nejm197611182952105>
- Georgieva, M., & Kondakova, V. (2021). *In vitro* propagation of *vaccinium corymbosum* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 27(2), 323–327.
- González, F. (2018). Un estudio transversal de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) Revisión A Transversal Study of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) Review. *Dominguezia*, 34(1), 5–25.
- González, P. (2018). El arándano, un fruto de reciente producción en el país. *Líderes*, 4. <https://www.revistalideres.ec/lideres/arandano-fruto-reciente-produccion-ecuador.html>
- Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos* (third). McGraw-Hill Interamericana.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Henríquez, C., López-Alarcón, C., Lutz, M. G. M., & Speisky, H. (2011). Time-dependence of

- ferric reducing antioxidant power (FRAP) index in Chilean apples and berries. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 61(3), 323–332.
- Hu, W., Sarengaowa, Guan, Y., & Feng, K. (2022). Biosynthesis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Fresh-Cut Fruits and Vegetables . In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.906069>
- Huamantingo-Tello, J. A. (2016). EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTINES DE DOS VARIETADES DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) EN TRES PISOS ALTITUDINALES A CONDICIONES DE VIVERO EN ABANCAY - APURÍMAC [UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LOS ANDES]. In *UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LOS ANDES*. <https://repositorio.utea.edu.pe/bitstream/utea/33/1/Tesis - Evaluacion del Crecimiento de Plantines de Arandonos.pdf>
- Hussain, A. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In I. A. Qarshi (Ed.), *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (p. Ch. 1). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/50568>
- Ibrahim, M. H., & Jaafar, H. Z. E. (2011). The relationship of nitrogen and C/N ratio with secondary metabolites levels and antioxidant activities in three varieties of malaysian kaci fatimah (*Labisia pumila* Blume). *Molecules*, 16(7), 5514–5526. <https://doi.org/10.3390/molecules16075514>
- Jain, P., Farooq, B., Lamba, S., & Koul, B. (2020). Foliar spray of *Moringa oleifera* Lam. leaf extracts (MLE) enhances the stevioside, zeatin and mineral contents in *Stevia rebaudiana* Betoni. *South African Journal of Botany*, 132, 249–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.026>
- Jiang, Y., Zeng, Q., Wei, J., Jiang, J., Li, Y., Chen, J., & Yu, H. (2019). Growth, fruit yield, photosynthetic characteristics, and leaf microelement concentration of two blueberry cultivars under different long-term soil pH treatments. *Agronomy*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/agronomy9070357>

- Kalt, W., Cassidy, A., Howard, L. R., Krikorian, R., Stull, A. J., Tremblay, F., & Zamora-Ros, R. (2020). Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins. *Advances in Nutrition*, 11(2), 224–236.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1093/advances/nmz065>
- Karlsons, A., Osvalde, A., Čekstere, G., & Ponnale, J. (2018). Research on the mineral composition of cultivated and wild blueberries and cranberries. *Agronomy Research*, 16(2), 454–463. <https://doi.org/10.15159/AR.18.039>
- Krishna, P., Pandey, G., Thomas, R., & Parks, S. (2023). Improving Blueberry Fruit Nutritional Quality through Physiological and Genetic Interventions: A Review of Current Research and Future Directions. *Antioxidants*, 12(4).
<https://doi.org/10.3390/antiox12040810>
- Lalarukh, I., Al-Dhumri, S. A., Al-Ani, L. K. T., Hussain, R., Al Mutairi, K. A., Mansoor, N., Amjad, S. F., Abbas, M. H. H., Abdelhafez, A. A., Poczar, P., Meena, K. R., & Galal, T. M. (2022). A Combined Use of Rhizobacteria and Moringa Leaf Extract Mitigates the Adverse Effects of Drought Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Microbiology*, 13(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.813415>
- Legendre, P. (2009). *Nested and two-way* (Issue August).
http://numericalecology.com/documents_enseignement/Nested_and_two-way_anova.pdf
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12791–12835.
<https://doi.org/10.3390/ijms160612791>
- Lim, Y. P., Pang, S. F., Yusoff, M. M., & Bin Gimbin, J. (2019). Correlation between the total phenolic, total flavonoid and antioxidant content of *Phaleriamacrocarpa* extract. *International Journal of Recent Technology and Engineering*, 8(2 Special Issue), 91–96.

- Lima, A. (2019). Crecimiento y desarrollo vegetativo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. Var. Biloxi), en tres tipos de pisos altitudinales de la provincia de Loja. In *Repositorio Universidad Nacional de Loja*.
http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS_WILSON_FERNANDO.pdf
- Lü, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840–860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>
- Madaan, R., Bansal, G., Kumar, S., & Sharma, A. (2011). Estimation of Total Phenols and Flavonoids in Extracts of *Actaea spicata* Roots and Antioxidant Activity Studies. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(6), 666–669. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.100242>
- Mallenakuppe, R., Homabalegowda, H., Gouri, M. D., Basavaraju, P. S., & Chandrashekharaiyah, U. B. (2019). History, Taxonomy and Propagation of *Moringa oleifera*-A Review. *SSR Institute of International Journal of Life Sciences*, 5(3), 2322–2327. <https://doi.org/10.21276/ssr-ijls.2019.5.3.7>
- Martono, Y., Yanuarsih, F. F., Aminu, N. R., & Muninggar, J. (2019). Fractionation and determination of phenolic and flavonoid compound from *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Physics: Conference Series*, 1307(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1307/1/012014>
- Mashamaite, C. V., Ngcobo, B. L., Manyevere, A., Bertling, I., & Fawole, O. A. (2022). Assessing the Usefulness of *Moringa oleifera* Leaf Extract as a Biostimulant to Supplement Synthetic Fertilizers: A Review. In *Plants* (Vol. 11, Issue 17). <https://doi.org/10.3390/plants11172214>
- Maury, G. L., Rodríguez, D. M., Hendrix, S., Arranz, J. C. E., Boix, Y. F., Pacheco, A. O., Díaz, J. G., Morris-Quevedo, H. J., Dubois, A. F., Aleman, E. I., Beenaerts, N., Méndez-

- Santos, I. E., Ratón, T. O., Cos, P., & Cuypers, A. (2020). Antioxidants in Plants: A Valorization Potential Emphasizing the Need for the Conservation of Plant Biodiversity in Cuba. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *9*(11). <https://doi.org/10.3390/antiox9111048>
- Mehdawe, A., Mahadeen, A., & Al-Ramamneh, E. A. D. (2023). Foliar Application of Moringa Leaf Extracts Affects Growth, Yield and Mineral Composition of Pepper (*Capsicum Annuum* L.) under Greenhouse Conditions. *Journal of Ecological Engineering*, *24*(6), 329–337. <https://doi.org/10.12911/22998993/163196>
- Mehmood, A., Naveed, K., Ayub, Q., Alamri, S., Siddiqui, M. H., Wu, C., Wang, D., Saud, S., Banout, J., Danish, S., Datta, R., Hammad, H. M., Nasim, W., Mubeen, M., Shah, F., & Fahad, S. (2021). Exploring the potential of moringa leaf extract as bio stimulant for improving yield and quality of black cumin oil. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03617-w>
- Meléndez-Jácome, M. R., Flor-Romero, L. E., Sandoval-Pacheco, M. E., Vasquez-Castillo, W. A., & Racines-Oliva, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Karyotypic and phylogenetic characteristics, nutritional composition, edaphoclimatic conditions, biotic factors and beneficial microorganisms in the rhizosphere. *Scientia Agropecuaria*, *12*(1), 109–120. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.013>
- Mihai, R. A., Landazuri-Abarca, P. A., Tinizaray-Romero, B. A., Florescu, L. I., Catană, R., & Kosakyan, A. (2022). Abiotic Factors from Different Ecuadorian Regions and Their Contribution to Antioxidant, Metabolomic and Organoleptic Quality of *Theobroma cacao* L. Beans, Variety “Arriba Nacional.” *Plants*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/plants11070976>
- Mihai, R. A., Melo Heras, E. J., Florescu, L. I., & Catana, R. D. (2022). The Edible Gray Oyster Fungi *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm a Potent Waste Consumer, a Biofriendly Species with Antioxidant Activity Depending on the Growth Substrate. *Journal of Fungi*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/jof8030274>

- Mihai, R. A., Melo Heras, E. J., Terán Maza, V. A., Espinoza Caiza, I. A., Pinto Valdiviezo, E. A., & Catana, R. D. (2023). The Panoramic View of Ecuadorian Soil Nutrients (Deficit/Toxicity) from Different Climatic Regions and Their Possible Influence on the Metabolism of Important Crops. *Toxics*, *11*(2), 1–21.
<https://doi.org/10.3390/toxics11020123>
- Mingle, C. E., & Newsome, A. L. (2020). An amended potassium persulfate ABTS antioxidant assay used for medicinal plant extracts revealed variable antioxidant capacity based upon plant extraction process Short. *BioRxiv*, *35*(5), 35–42.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.07.15.204065>
- Mir, A. A., Sadat, A., Amin, R., & Islam, N. (2019). Plant growth regulators: One of the techniques of enhancing growth and yield of Bangladeshi local cucumber variety (*Cucumis sativus*). *Plant Science Today*, *6*(2), 252.
<https://doi.org/https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.2.534> ISSN:
- Moharram, H. A., & Youssef, M. . (2014). Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, *11*(1), 31–42.
<https://doi.org/10.12816/0025348>
- Molole, G. J., Gure, A., & Abdissa, N. (2022). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl. resin. *BMC Chemistry*, *16*(1), 48.
<https://doi.org/10.1186/s13065-022-00841-x>
- Montecé-Lozano, M. K., Peláez-Mendoza, F. R., Godoy-Espinoza, V. H., & Flora del Carmen, V. M. (2021). Sistema de producción y calidad del forraje de Moringa en Ecuador. *Revista de Ciencias Sociales*, *27*(ESPECIAL 3), 459–470.
<https://doi.org/10.31876/rcs.v27i.36531>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

- Napoleão, T. H., Santos, A. F. S., Luz, L. A., Pontual, E. V., Paiva, P. M. G., & Coelho, L. C. B. B. (2019). Moringa oleifera: A Powerful Source of Environmentally, Medicinally and Biotechnologically Relevant Compounds. In *Biology, Chemical Composition, Cultivation and Applications of Cacti from the Opuntia Genus* (Issue July, pp. 1–18). Book Publisher International. <https://doi.org/10.9734/bpi/aast/v5>
- Naranjo, E., Rosero, L., Tapia, C., Monteros-Altamirano, A., Tacán, M., Lima, L., Peña, G., Paredes, N., & Villarroel, J. (2018). Ecuadorian catalogue of wild species related to sweetpotato, rice, lima bean, potato and eggplant. In *Miscellaneous publication No. 455*. [https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5539/1/CWR Ecuador Catalog Web %281%29.pdf](https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5539/1/CWR%20Ecuador%20Catalog%20Web%281%29.pdf)
- Ngomuo, M., Mneney, E., & Ndakidemi, P. (2013). The Effects of Auxins and Cytokinin on Growth and Development of (<i>Musa&/i> sp.) Var. “Yangambi” Explants in Tissue Culture. *American Journal of Plant Sciences*, *04*(11), 2174–2180. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.411269>
- Nihayati, E., & Najah, M. W. (2021). Comparative assessment of The Effect of Moringa oleifera Leaf Extract (MLE) and Zeatin on invitro Regeneration Response of Pogostemon cablin Bud Explants. *AIMS Agriculture and Food*, *6*(1), 308–320. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021019>
- Nikoloff, N. (2015). No siempre sale todo bien. Problemas de cultivo de tejidos vegetales. In *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. <https://doi.org/10.35537/10915/46738>
- Noreen, H., Semmar, N., Farman, M., & McCullagh, J. S. O. (2017). Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *10*(8), 792–801. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.024>

- OCARU. (2022). *En Ecuador crece la producción de arándanos con precaución para no saturar el mercado interno*. Instituto de Estudios Ecuatorianos IEE.
<https://ocaru.org.ec/2022/01/31/en-ecuador-crece-la-produccion-de-arandanos-con-precaucion-para-no-saturar-el-mercado-interno/>
- Okan, O. T., Deniz, I., Yayli, N., Şat, I. G., öz, M., & Serdar, G. H. (2018). Antioxidant activity, sugar content and phenolic profiling of blueberries cultivars: A comprehensive comparison. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 639–652.
<https://doi.org/10.15835/nbha46211120>
- Olaoye, A. B., Ologunde, C. A., Molehin, O. R., & Nwankwo, I. (2021). Comparative Antioxidant Analysis of Moringa oleifera Leaf Extracts from South Western States in Nigeria. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/s43094-021-00204-8>
- Paikra, B. K., Dhongade, H. K. J., & Gidwani, B. (2017). Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Lam. *Journal of Pharmacopuncture*, 20(3), 194–200.
<https://doi.org/10.3831/KPI.2017.20.022>
- Paredes-Caiza, D. M. (2021). *Adaptación de dos variedades de arándano (Vaccinium corymbosum) Biloxi y Esmeralda, bajo cubierta y semidescubierta en el centro de Investigación e Innovación Tecnológica Agropecuaria Tungurahua-Pillaro (CIITAT) [Universidad Técnica de Ambato]*.
<https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/34713>
- Páscoa, R. N. M. J., Gomes, M. J., & Sousa, C. (2019). Antioxidant Activity of Blueberry (Vaccinium spp.) Cultivar Leaves: Differences Across the Vegetative Stage and the Application of Near Infrared Spectroscopy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(21).
<https://doi.org/10.3390/molecules24213900>
- Pidlisnyuk, V., Stefanovska, T., Zhukov, O., Medkow, A., Shapoval, P., Stadnik, V., & Sozanskyi, M. (2022). Impact of Plant Growth Regulators to Development of the

Second Generation Energy Crop *Miscanthus × giganteus* Produced Two Years in Marginal Post-Military Soil. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(2).

<https://doi.org/10.3390/app12020881>

Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01), 1–10.

<https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>

Platzer, M., Kiese, S., Tybussek, T., Herfellner, T., Schneider, F., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2022). Radical Scavenging Mechanisms of Phenolic Compounds: A Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) Study . In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 9). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.882458>

Prodorutti, D., Pertot, I., Giongo, L., & Gessler, C. (2007). Highbush blueberry: cultivation, protection, breeding and biotechnology. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 44–56.

QAMER, Z., CHAUDHARY, M. T., DU, X., HINZE, L., & AZHAR, M. T. (2021). Review of oxidative stress and antioxidative defense mechanisms in *Gossypium hirsutum* L. in response to extreme abiotic conditions. *Journal of Cotton Research*, 4(1), 9.

<https://doi.org/10.1186/s42397-021-00086-4>

Qiu, D., Wei, X., Fan, S., Jian, D., & Chen, J. (2018). Regeneration of blueberry cultivars through indirect shoot organogenesis. *HortScience*, 53(7), 1045–1049.

<https://doi.org/10.21273/HORTSCI113059-18>

Rahman, M. M., Islam, M. B., Biswas, M., & Khurshid Alam, A. H. M. (2015). *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1186/s13104-015-1618-6>

Rajurkar, N. S., & Hande, S. M. (2011). Estimation of phytochemical content and antioxidant

activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 146–151. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.91574>

Redacción Economía. (2022, April 5). De diez hectáreas de arándanos en Patate saldrá la primera cosecha del fideicomiso agroexportador de Nobis. *El Universo*, 1. <https://www.eluniverso.com/noticias/economia/de-diez-hectareas-de-arandanos-en-patate-saldra-la-primera-cosecha-del-fideicomiso-agroexportador-de-nobis-nota/>

Redacción El Productor. (2017, January 12). Ecuador: La moringa, una planta que siembra negocio. *El Productor*, 1. <https://elproductor.com/2017/01/ecuador-la-moringa-una-planta-que-siembra-negocios/>

Redacción Primicias. (2021, February 28). La moringa, el ‘superalimento’ que seduce a los agricultores ecuatorianos. *Primicias*, 1. <https://www.primicias.ec/noticias/economia/negocios/moringa-seduca-agricultores-ecuatorianos/>

Redacción Sierra Norte (I). (2021, November 27). El cultivo del arándano se abre campo en el país. *El Comercio*, 2. <https://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador/cultivo-arandano-se-abre-campo.html>

Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., & Schulin, R. (2013). Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 18(2), 144–157.

Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G., Cerović, R., & Gajdošova, A. (2012). Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Berry Research*, 2(2), 97–103. <https://doi.org/10.3233/JBR-2012-030>

Saini, R. K., Sivanesan, I., & Keum, Y.-S. (2016). Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *3 Biotech*, 6(2), 203. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0526-3>

- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. In *Plants* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/plants10010118>
- Sánchez, D. (2022). *EFECTO DE SUSTRATOS ORGÁNICOS EN EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO DE ARÁNDANO (Ericaceae vaccinium) VARIEDAD BILOXI A NIVEL DE VIVERO EN GUAYAQUIL* [Universidad de Guayaquil]. http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/59546/1/DOMENICA_SANCHEZ_PANIMBOZA- TESIS_FINAL_FINAL .pdf
- Şen, A. (2012). Oxidative Stress Studies in Plant Tissue Culture. In M. A. El-Missiry (Ed.), *Antioxidant Enzyme* (p. Ch. 3). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/48292>
- Shevchuk, L. M., Grynyk, I. V., Levchuk, L. M., Yareshchenko, O. M., Tereshchenko, Y. Y., & Babenko, S. M. (2021). Biochemical contents of highbush blueberry fruits grown in the western forest-steppe of ukraine. *Agronomy Research*, *19*(1), 232–249. <https://doi.org/10.15159/AR.21.012>
- Shimamura, T., Sumikura, Y., Yamazaki, T., Tada, A., Kashiwagi, T., Ishikawa, H., Matsui, T., Sugimoto, N., Akiyama, H., & Ukeda, H. (2014). Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives - inter-laboratory evaluation study. *Analytical Sciences*, *30*(7), 717–721. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.717>
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, *150*, 111932. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Silva, S., Costa, E. M., Veiga, M., Morais, R. M., Calhau, C., & Pintado, M. (2020). Health promoting properties of blueberries: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(2), 181–200. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1518895>
- Spiegel, M., Kapusta, K., Kołodziejczyk, W., Saloni, J., Zbikowska, B., Hill, G. A., & Sroka, Z.

- (2020). Antioxidant Activity of Selected Phenolic Acids–Ferric Reducing Antioxidant Power Assay and QSAR Analysis of the Structural Features. *Molecules*, 25(13). <https://doi.org/10.3390/molecules25133088>
- Taghizadeh, M., & Dastjerdi, M. G. (2021). Inhibition of browning problem during the callogenesis of *Spartium junceum* L. *Ornamental Horticulture*, 27(1), 68–77. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.V27I1.2230>
- Tejada-Alvarado, J. J., Meléndez-Mori, J. B., Vilca-Valqui, N. C., Huaman-Huaman, E., Lapiz-Culqui, Y. K., Neri, J. C., Prat, M. L., & Oliva, M. (2022). Optimizing factors influencing micropropagation of ‘Bluecrop’ and ‘Biloxi’ blueberries and evaluation of their morpho-physiological characteristics during ex vitro acclimatization. *Journal of Berry Research*, 12, 347–364. <https://doi.org/10.3233/JBR-211565>
- Trigo, C., Castelló, M. L., Ortolá, M. D., García-Mares, F. J., & Desamparados Soriano, M. (2020). *Moringa oleifera*: An Unknown Crop in Developed Countries with Great Potential for Industry and Adapted to Climate Change. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/foods10010031>
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Undurraga-Díaz, P., & Vargas-Schuldes, S. (2013). Manual de arandanos. Boletín IIA N° 263. In *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. Trama Impresores. <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/7627>
- Vats, S., & Gupta, T. (2017). Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. from Rajasthan, India. *Physiology and Molecular Biology of Plants : An International Journal of Functional Plant Biology*, 23(1), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0407-6>

- Villegas-Lozada, L. A. (2021). *EVALUACIÓN DE TRES SUSTRATOS PARA EL DESARROLLO DEL CULTIVO DE ARÁNDANO (Vaccinium corymbosum L.), VARIEDAD BILOXI EN LA PARROQUIA MONTALVO* [Universidad Técnica de Ambato]. [https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/34563/1/Tesis-303 Ingeniería Agronómica - Villegas Lozada Lissette Aracelly.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/34563/1/Tesis-303%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-%20Villegas%20Lozada%20Lissette%20Aracelly.pdf)
- Weaver, C. M. (2013). Potassium and health. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, *4*(3), 368S-77S. <https://doi.org/10.3945/an.112.003533>
- Wu, Y., Yang, H., Huang, Z., Zhang, C., Lyu, L., Li, W., & Wu, W. (2022). Metabolite Profiling and Classification of Highbush Blueberry Leaves under Different Shade Treatments. *Metabolites*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/metabo12010079>
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, *1*(1), 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>
- Yap, Y. K., El-sherif, F., Habib, E. S., & Khattab, S. (2021). Moringa oleifera leaf extract enhanced growth, yield and silybin content while mitigating salt-induced adverse effects on the growth of silybum marianum. *Agronomy*, *11*(12). <https://doi.org/10.3390/agronomy11122500>
- Yuniati, N., Kusumiyati, K., Mubarak, S., & Nurhadi, B. (2022). The Role of Moringa Leaf Extract as a Plant Biostimulant in Improving the Quality of Agricultural Products. *Plants (Basel, Switzerland)*, *11*(17). <https://doi.org/10.3390/plants11172186>
- Zhao, H., Zhang, H., & Yang, S. (2014). Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. *Food Science and Human Wellness*, *3*(3), 183–190. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.12.005](https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.12.005)

Apéndices