



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE JUÁREZ”
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Área temática en Biotecnología Alimentaria

PROYECTO DE TESIS

**“Producción de polifenoles bajo diferentes estímulos en callo de *Rubus
glaucus*”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. ERÉNDIRA RUBIO OCHOA

**ASESOR:
DR. PEDRO ANTONIO GARCÍA SAUCEDO**

marzo del 2018, Uruapan, Michoacán

Este trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Bromatología de la facultad de agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; al mismo tiempo fue impulsado por el laboratorio de Cultivos Vegetales de la facultad de Química de la Universidad Autónoma de México, al igual que el laboratorio de Botánica Estructural del Centro de Investigación de Biotecnología de Universidad Autónoma de Morelos.

Dedicación y agradecimientos

A dios por ponerse en mi camino a través de personas que permitieron el culminó de este trabajo.

Con amor dedico este trabajo:

A Braulio Elyan, por sacrificase conmigo y motivarme a ser la mejor versión de mi misma, sin juzgarme ni reprocharme nada.

A Carmelo Rubio y Ma. Dolores Ochoa por ser inspiración, pilar e impulsarme durante toda mi vida.

A Sandra Rubio, Irere Rubio y Alejandro Rubio, por ser cómplices durante cualquier etapa de mí desarrollo.

Agradezco en general a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta aportaron en el desarrollo de esta investigación, así como a mi fortalecimiento profesional.

Índice general

Índice general.....	I
Índice de figuras	II
Índice de cuadros	III
Abreviaturas	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
1-. Introducción.....	1
2-. Marco teórico.....	2
2.1-. Género <i>Rubus</i>	2
2.2 -. Los Polifenoles.....	5
2.2.1-. Ácidos fenólicos.....	6
2.2.2-. Estilbenos.....	7
2.2.3-. Taninos.....	7
2.2.4-. Lignanos.....	7
2.2.5-. Diferuloilmetanos.....	8
2.2.6-. Flavonoides.....	8
2.3-. Síntesis de polifenoles	9
2.4-. Bioactividad de los polifenoles.....	12
2.4.1-. Efecto antioxidante.....	13
2.4.2-. Anti-aterosclerosis y cardioprotección.....	14
2.4.3-. Propiedades antiinflamatorias.....	15
2.4.4-. Propiedades antimutagénicas y anticancerígenas.....	16
2.4.5-. Propiedades antidiabética.....	16
2.4.6-. Efectos neuroprotectores.....	17
2.4.7-. Otros efectos.....	17
2.5.- Aplicaciones de los polifenoles.....	18
2.6-. Extracción y cuantificación de polifenoles.....	19
2.7-. Cultivo de tejidos vegetales.....	22
2.7.1-. Medios de cultivo.....	23
2.7.2-. Reguladores de crecimiento.....	25
2.7.3-. Condiciones ambientales.....	28
2.7.4-. Tipos de cultivo.....	29
2.8-. Producción de metabolitos polifenólicos mediante el cultivo <i>in vitro</i>	30
3-. Justificación.....	34
4-. Hipótesis.....	35
5-. Objetivos.....	35

5.1-. Objetivos generales.....	35
5.2-. Objetivos específicos.....	35
6-. Materiales y métodos.....	36
6.1 Colecta y establecimiento <i>in vitro</i> de yemas axilares de <i>Rubus glaucus</i> .	36
6.2-. Inducción de callo.....	38
6.3-. Evaluación de compuestos antioxidantes en la oxidación de callo.....	38
6.4-. Proliferación de callo.....	39
6.5-. Evaluación de polivinilpirrolidona (PVP).....	41
6.6-. Estimulación de polifenoles.....	41
6.7-. Condiciones de cultivo	42
6.8-. Extracción y cuantificación de polifenoles.....	43
6.9-. Determinación de flavonoides totales.....	43
6.10-. Actividad antioxidantes.....	44
6.10.1-. Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).....	44
6.10.2-.Radical ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS).....	44
6.10.3-. Poder reductor de hierro (III) o FRAP.....	45
6.11 -. Cromatografía de alta eficacia (CLAR o HPLC).....	45
6.12-. Análisis estadísticos.....	46
7-. Resultados.....	47
7.1 Colecta y establecimiento <i>in vitro</i> de yemas axilares de <i>Rubus glaucus</i> .	47
7.2-. Inducción de callo.....	49
7.3-. Evaluación de compuestos antioxidantes en la oxidación de callo.....	51
7.4-. Proliferación de callo.....	53
7.5-. Evaluación de polivinilpirrolidona (PVP).....	57
7.6.- Estimulación de polifenoles	60
7.7-. Acumulación de peso fresco.....	66
7.8-. Determinación de Flavonoides totales y actividad antioxidante.....	71
7.9-. Cromatografía líquida de alta eficacia.....	78
8-. Conclusiones.....	84
9-. Perspectivas.....	85
10-. Literatura.....	86

Índice figuras

Figura 1. Estructura de compuestos polifenólicos.....	6
Figura 2. Clasificación y estructura de flavonoides.....	9
Figura 3. Rutas de síntesis de compuestos fenólicos.....	10
Figura 4. Ruta de biosíntesis de los polifenoles a partir de fenilalanina.....	11
Figura 5. Propiedades bioactivas y mecanismos de acción que presentan los polifenoles.....	14
Figura 6. Respuesta de explantes <i>in vitro</i> bajo la presencia de auxinas y citocininas.....	27
Figura 7. Porcentaje de mortandad y establecimiento <i>in vitro</i> de yemas axilares de <i>Rubus glaucus</i>	
Figura 8. Evolución de la formación de callo en hoja y tallo de <i>Rubus glaucus</i>	
Figura 9. Porcentaje de oxidación tras la adición de diferentes antioxidantes en callo de <i>Rubus galucus</i>	
Figura 10. Cinética de crecimiento de tejido calloso proveniente de hoja de <i>Rubus glaucus</i>	
Figura 11. Cinética de crecimiento de tejido calloso proveniente de tallo de <i>Rubus glaucus</i>	
Figura 12. Medios y callos de <i>Rubus glaucus</i> , tras 15 días de incubación.....	
Figura 13. Cuantificación de polifenoles en medios y callos de <i>Rubus glaucus</i> , tras 15 días de incubación.	
Figura 14. Comparación del contenido de polifenoles en extractos de callo estimulado proveniente de hoja de <i>Rubus glaucus</i>	
Figura 15. Comparación del contenido de polifenoles en extractos de callo estimulado proveniente de tallo de <i>Rubus glaucus</i>	
Figura 16. Cinéticas de crecimiento de callo proveniente de hoja de <i>Rubus glaucus</i>	

Figura 17. Cinéticas de crecimiento de callo proveniente de tallo de <i>Rubus glaucus</i> obtenidas tras los 18 tratamientos.	
Figura 18. Cromatograma y espectros de absorbancia UV- visible obtenidos de acacetina y quercetina.	
Figura 19. Cromatogramas obtenidos del extracto de callo proveniente del tratamiento M-15, M-2 y M-7.	
Figura 20. Espectros de UV- visible obtenidos de los cromatogramas de callo proveniente del tratamiento M-15, M-2 y M-7.	

Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición de macro y micronutrientes en medios comúnmente utilizados en el cultivo <i>in vitro</i>	24
Cuadro 2. Clasificación de los reguladores de crecimiento comúnmente utilizados en CTV.....	26
Cuadro 3. Estudios reportados de condiciones fisicoquímicas que incrementan el contenido de polifenoles	
Cuadro 3. Tratamientos de asepsia para la especie silvestre de <i>Rubus glaucus</i>	27
Cuadro 4. Tratamientos formulados para inhibir la oxidación de callo de <i>Rubus glaucus</i>	28
Cuadro 5. Combinación de hormonas utilizadas para proliferación de callo de <i>Rubus glaucus</i>	29
Cuadro 6. Aditivos utilizados en la valoración de PVP como captador de polifenoles.....	27
Cuadro 7. Tratamientos formulados con diferentes concentraciones de sacarosa, nitrato y dilución de sales minerales.....	30
Cuadro 8. Peso alcanzado de callo de <i>Rubus glaucus</i> en los medios para proliferación de callo.....	41
Cuadro 9. Influencia de los factores sacarosa, NH ₄ NO ₃ : KNO ₃ y dilución de sales minerales e interacciones sobre la acumulación de polifenoles en extractos etanólicos de callos de hoja.	46

Cuadro 10. Influencia de los factores sacarosa, NH ₄ NO ₃ : KNO ₃ y dilución de sales minerales e interacciones sobre la acumulación de polifenoles en extractos etanólicos de callos de tallo.....	48
Cuadro 11. Acumulación de peso fresco de callo proveniente de hoja y tallo tras los 18 tratamientos.....	50
Cuadro 12. Influencia de los factores sacarosa, NH ₄ NO ₃ : KNO ₃ y dilución de sales minerales e interacciones sobre la acumulación de biomasa en callos de hoja.....	51
Cuadro 13. Influencia de los factores sacarosa, NH ₄ NO ₃ : KNO ₃ y dilución de sales minerales e interacciones sobre la acumulación de biomasa en callos de tallo.....	52
Cuadro 14. Cuantificación de polifenoles totales y flavonoides totales de 18 tratamientos en callo de hoja y tallo de <i>Rubus glaucus</i>	54
Cuadro 15. Resultados obtenidos de la AA de mediante DPPH, ABTS y FRAP, en extractos de callo proveniente de hoja y tallo.....	56
Cuadro 16. Valor obtenido para la R en la correlación de Pearson entre polifenoles, flavonoides y las técnicas de la evaluación antioxidante.....	57

Abreviaturas

Co A	Coenzima A		μM	Micromolar
PAL	Fenilalanina aminoliasa		g	Gramos
CHS	Chalcona sintasa		L	Litros
C4H	Cinamato 4 hidroxilasa		mM	Milimolar
4CL	Cumarato 4 liasa		MS	Murashige y Skoog
F3H	Flavonol 3 hidroxilasa		WPM	Woody plant medium
CHI	Chalcona isomerasa		B-5	Gamborg
BHA	Hidroxanisol butilado		NN	Nitsch y Nitsch
BHT	Hidroxitolueno butilado		SH	Schenk y Hildebrandt
ERO	Especies reactivas de oxigeno		m	Metros
LDL			mL	Mililitros
COX-2	Ciclooxigenasa 2		μg	Microgramos

iNOS	Óxido nítrico inducible sintasa		EAG	Equivalente a ácido gálico
LPO	Lipoxigenasas		EQ	Equivalente a quercetina
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas		M	Molaridad
AP-1	Proteína activador 1		DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracil
IL-1β	Interleucina-1- beta		ABTS	Ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
TNF-a	Factor necrótico tumoral alfa		FRAP	Poder reductor del ion férrico
MAPKs			TPTZ	2, 4, 6 tripiridil-s-triazina- ferroso
SNC	Sistema nervioso central		Min	Minutos
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana		PF	Peso fresco
EFS	Extracción en fase solida		PS	Peso seco
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución		AA	Actividad antioxidante
FC	Folin ciocalteau		TR	Tiempo de retención
UV-vis	Ultravioleta - visible		nm	Nanómetros
PDA	Matriz de fotodiodos		abs	Absorbancia
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal		g·L⁻¹	Gramos por litro
CTV	Cultivo de tejidos vegetales		mg·L⁻¹	Miligramos por Litro

°C	Grados centígrados		$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Microgramo por mili litro
----	--------------------	--	----------------------------------	------------------------------

Resumen

Los compuestos polifenólicos han sido utilizados como antioxidantes y pigmentos alimentarios, así como suplementos alimenticios esto debido a su destacada capacidad antioxidante y sus propiedades organolépticas. La mayoría de estos compuestos son obtenidos de especies vegetales cultivadas de forma convencional, donde su producción se ve sujeta a la especie y etapa fenológica de la planta, así como a diversos factores bióticos y abióticos que limitan su producción. Por lo que, se ha recurrido a técnicas como el cultivo *in vitro*, que permite controlar las condiciones fisicoquímicas de incubación y desarrollo, convirtiéndola en una técnica eficaz para la síntesis controlada de compuestos fenólicos y su optimización. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta en la producción de polifenoles, flavonoides y capacidad antioxidantes bajo diferentes estímulos en callo proveniente de hoja y tallo de *Rubus glaucus*. Para ello, se diseñaron 18 tratamientos a base de medio MS con 1

mg. L⁻¹ de 2,4- D combinado con diferentes concentraciones de sacarosa (15, 30 y 60 g•L⁻¹), proporción de nitrato de potasio (0, 1, 2) y sales minerales (50 y 100 %); 7 g•L⁻¹ de agar y 1 g•L⁻¹ de PVP. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de 2 x 3 x 3. Se realizó un Análisis de varianza con comparación múltiple de medias con un intervalo de confianza del 95 %. En los resultados reportados, para callo de hoja, el extracto proveniente del tratamiento 7 (compuesto por 60 g•L⁻¹ de sacarosa, 0 de KNO₃ y 50 % de dilución de sales minerales) fue el que registró mayor contenido de polifenoles con 841.82 ± 3.59 µgEAG•g⁻¹PF, mostrando incrementos significativos con respecto del control (220.69 ± 2.24 µgEAG•g⁻¹). En contraste, el callo de tallo, reportó mayor acumulación tras el tratamiento 14 (constituido por 30 g•L⁻¹ de sacarosa, 0 de KNO₃ y 100 % de dilución de sales minerales) con 788.74 ± 3.94 µg EAG•g⁻¹, mientras su control mostró 253.60 ± 6.63 µg EAG•g⁻¹; por lo que, no sé observó la misma tendencia de acumulación en polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante en los extractos de ambos tejidos. Con estos resultados se logró establecer un tratamiento que incremente el contenido de polifenoles de entre 3 a 4 veces más con respeto al control. Por otro lado, se observó que las interacciones entre factores tienen influencia positiva sobre la acumulación de polifenoles. A su vez mediante CLAR se corroboró el incremento de compuestos fenólicos y se sugiere la presencia de Vitamina C y ácido gálico en los extractos obtenidos.

Palabras clave: estimulación, tejidos indiferenciados, cultivo *in vitro*.

Abstract

1. INTRODUCCIÓN

El género *Rubus* cuenta con 12 subgéneros y aproximadamente 700 especies distribuidas en Asia, Europa y América. Como miembros representativos de este género, se encuentran las frambuesas y zarzamoras, siendo conocidas por sus frutos comestibles y comerciales. En México se reportan alrededor de 15 especies silvestres distribuidas en el territorio nacional (Segura y col., 2009). Dentro del estado de Michoacán, se han encontrado diferentes especies de zarzamoras y frambuesas, principalmente en los municipios de la meseta purépecha, donde localmente sus frutos son colectados para comercializarlos, contribuyendo así al ingreso familiar ya que son incorporados en la gastronomía regional y en la medicina tradicional. Michoacán, además de contar con una diversidad en materiales silvestres del género *Rubus* como *Rubus glaucus*, también es el principal productor a nivel nacional de zarzamoras, mismas que se comercializan en todo el mundo, su éxito comercial no sólo estriba en su atractivo color, aroma, sabor dulce y ácido que es característico en ellas, sino también en las propiedades nutraceuticas que se les ha conferido, entre las que destacan su actividad antioxidante, antidiabética, anticancerígena, antimicrobiana, entre otras propiedades, atribuidas a la presencia y acción de sus fitoquímicos o metabolitos secundarios de tipo fenólico, compuestos también utilizados como pigmentos naturales (Paredes y col., 2010).

El cuidado de la salud humana a través de la dieta es una preocupación constante del mundo actual; el incremento de la incidencia de enfermedades degenerativas y su asociación con procesos oxidativos mediados por la presencia de radicales libres, genera nuevas tendencias de consumo, recurriendo a compuestos con propiedades nutraceuticas, que no sólo busquen cumplir con el objetivo de mantener las propiedades sensoriales de un producto, sino que también otorguen distintos tipos de funcionalidad. Los compuestos polifenólicos han sido utilizados

como aditivos alimentarios y por su destacada actividad antioxidante como suplemento y conservador alimenticio. Debido a la aplicabilidad de los compuestos polifenólicos, la industria ha visto la oportunidad de comercio de estas sustancias recurriendo a diversas fuentes naturales con mayor contenido de polifenoles, como las plantas silvestres del género *Rubus*. Sin embargo, los factores que limitan su producción estimulan la búsqueda de opciones que incrementen su contenido, trayendo gran atención al desarrollo de técnicas como el cultivo de tejidos vegetales, que permite controlar las condiciones de incubación y desarrollo, convirtiéndola en una técnica eficaz para la producción de polifenoles y su optimización.

2.- MARCO TEÓRICO

2.1.- Género *Rubus*

El género *Rubus* cuenta con 12 subgéneros y un estimado de 900 a 1000 especies (Tatjana y col., 2010). Comúnmente habitan en regiones templadas del noroeste de Asia, Europa, al Norte de África, Norteamérica y Sudamérica, y se considera a China, donde se concentra la mayor diversidad de especies de *Rubus* entre 250 a 700 (Graham y col., 2011); son consideradas como plantas perennes que generalmente durante el primer año se encuentran en estado vegetativo, fructificando hasta el segundo (Clark y Finn, 2014). Como miembros representativos de este género, se encuentran las frambuesas y zarzamoras, conocidas por sus frutos comestibles, los cuáles son clasificados como polidrupas, ya que son agregados de pequeños frutos carnosos denominados drupelas y cada una con semilla, reunidas alrededor de un eje común. En estadíos inmaduros las drupelas suelen ser de color verde y a medida que maduran se tornan de color rojizo, en caso de las frambuesas, o hasta llegar a un morado intenso y brillante en las zarzamoras (Chávez y col., 2012), esto comúnmente se lleva a cabo en la época de verano, entre los meses de junio a agosto (Clark y Finn, 2014).

Históricamente la producción de zarzamora y frambuesa ha tenido un crecimiento considerable, ya que, en 1990, la producción norteamericana fue de 4,385 ha, aportando el 75 % el Noroeste del Pacífico. Entre los países que han tenido un desarrollo exponencial en la producción de zarzamora, se encuentran Reino Unido, Italia, España, Chile, E.U.A. y México (Clark y Finn, 2014). En recientes años, se calcula alrededor de 25,000 ha de zarzamoras plantadas y cultivadas comercialmente en todo el mundo, además de 8,000 ha de fruta cosechada en condiciones silvestre para una estimación total de 140,292 ton (Finn y col., 2011). Esta expansión fue y sigue siendo impulsada por factores que incluyen un suministro estable en todos los meses del año, así como cultivares que faciliten su

transporte a mercados distantes. Con el fin de superar estos problemas, se han desarrollado variedades mejoradas como: 'Marion', 'Thornless', 'Evergreen', 'Chester Thornless', 'Tupy', 'Brazos' y algunos híbridos como 'Boysen' y 'Logan', (Strik y col, 2011). A pesar de la abundancia de cultivares mejorados, casi todas las regiones del mundo donde *Rubus* es nativo, han desarrollado prósperas industrias basadas en sus especies locales, tal es el caso de *Rubus glaucus* o mejor conocida como "mora de catilla" en Colombia (Ayala y col., 2013).

En general, las zarzamoras son consideradas como especies con amplia capacidad de adaptación a condiciones ambientales, por lo que, algunas son catalogadas como hierba invasiva, promoviendo su eliminación y amenazando la pérdida de especies silvestres. Aunado a esto, las implicaciones actuales del cambio climático influyen sobre los ejemplares silvestres, lo que representan la pérdida de un recurso genético con alto potencial para ser utilizado dentro de programas para el desarrollo de cultivares mejor adaptados a los cambios de su entorno (Graham y col., 2011).

En México las zarzamoras comúnmente cultivadas son las variedades "Tupy" y "Brazos", siendo los estados de Jalisco y Michoacán quienes tienen mayor actividad productora (Clark y Finn, 2014); sin embargo, se reportan alrededor de 15 especies silvestres distribuidas en el territorio nacional (Segura y col., 2009). Dentro del estado de Michoacán, se han encontrado diferentes especies de zarzamoras y frambuesas silvestres, principalmente en los municipios de la meseta purépecha, donde sus frutos son colectados para comercializarlos en mercados regionales para su consumo en fresco, aunque comúnmente son incorporados en la gastronomía regional, ya sea en elaboración de tamales o bebidas refrescantes y fermentadas. Por otro lado, sus hojas y tallos se han utilizado dentro de la herbolaria tradicional para curar algunas afecciones como gripe, náuseas durante el embarazo, malestares menstruales y facilitar el parto, además el fruto se considera un laxante suave si se come en grandes cantidades (Hummer y col., 2010). Estos beneficios en la salud son atribuidos a la presencia y acción de sus metabolitos polifenólicos como los flavonoides y antocianinas

(Cuevas y col., 2010), que comúnmente son conocidos por su actividad antidiabética, anticancerígena, antimicrobiana, antiinflamatoria y su destacada actividad antioxidante (Azofeifa y col., 2013).

2.2.- Los polifenoles

Los compuestos fenólicos son fitoquímicos distribuidos en los diferentes órganos de la planta. Son encargados de la atracción de polinizadores y dispersores de semillas; de igual manera destaca su actividad antioxidante en tejidos dañados por el ataque de diversos patógenos, además de que actúan como fotoprotectores y filtros de radiación ultravioleta (Paredes y col, 2010; Simões y col, 2012). Químicamente los compuestos fenólicos presentan una estructura molecular caracterizada por poseer mínimo un anillo aromático con grupos hidroxilo como sustituyente, y que comúnmente es conocida como fenol; con base en el número de anillos fenólicos que tienen, se clasifican en diferentes grupos dentro de los que se encuentran (Figura 1): ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides (flavanoles o catequinas, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonoides, antocianinas), taninos y lignanos (Manach y col, 2004; Paredes y col., 2010).

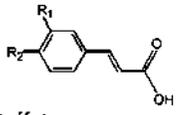
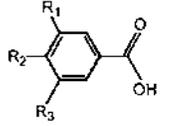
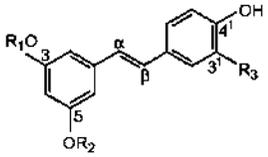
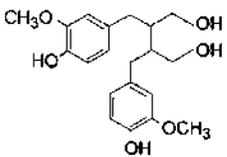
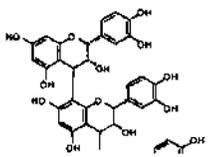
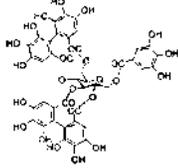
Ácidos fenólicos	Estilbenos	Lignanos	Taninos
<p>Ácidos hidroxi-cinámico</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Caffeico • Ferulico • P- cumarico <p>Ácidos hidroxi-benzoico</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Galico • Vanillico • Protocatequina 	 <ul style="list-style-type: none"> • Resveratrol • Pterostilbeno • Piceatannol 		<p>Proantocianidina</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Taninos condensado <p>Elagitaninos</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Taninos hidrolizables

Figura 1. Estructura de compuestos polifenólicos. Clasificación y estructura de ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y taninos (Manach y col, 2004; Paredes y col., 2010).

2.2.1.- Ácidos fenólicos

La familia de los ácidos fenólicos consiste en dos subgrupos, conocidos como hidroxibenzoico e hidroxicinámico (Figura 1). Los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxilbenzoico tienen una estructura C6-C1 e incluyen el ácido gálico, vanílico, protocatecuico y siringico. Por otro lado, los derivados de ácido hidroxilcinámico cuentan con una cadena lateral de tres carbonos (C6-C3), los más comunes son p-cumarico, cafeico, ferulicos y sinápico (Balasundram y col., 2006), algunos son responsables del sabor agrio en frutas y productos frutales como los ácidos clorogénicos (ésteres de ácido cafeico y ácido quínico), que en presencia de la enzima polifenol oxidasa se oxidan fácilmente y se transforman en compuestos de color pardo (Agnieszka y Borowska, 2008).

2.2.2.- Estilbenos

Este grupo de compuestos se caracteriza estructuralmente por tener una estructura básica llamada 1,2- difeniletieno, posee grupos hidroxilo en los anillos aromáticos; se pueden encontrar en forma de monómeros y oligómeros. Los compuestos representativos de este grupo son el resveratrol y trans-resveratrol, (Riles y col, 2006; Agnieszka y Borowska, 2008). El resveratrol es un polifenol generado en respuesta al estrés en algunas plantas, principalmente en respuesta a infecciones fúngicas, aunado también se ha visto en bayas maduras, en la piel de las uvas, cacahuete y vino tinto (Creasy y Coffe, 1997), sin embargo, se encuentra en concentraciones bajas en frutas y vegetales.

2.2.3.- Taninos.

Son compuestos de relativo alto peso molecular. Se clasifican en dos grupos: taninos hidrolizables o elagitaninos y taninos condensados o proantocianinas. Los primeros son ésteres de ácido gálico, mientras que los últimos son polímeros de monómeros de polihidroxifavan-3-ol (Balasundram y col., 2006). Una gran variedad de alimentos de origen vegetal contiene taninos tal como el té, vinos granos y frutas como: manzana, mango, plátano, uvas, ciruelas, peras, durazno, sorgo, mijo, cebada, chicharos y fresa (Han y col, 2007; Serrano y col, 2009; Wu-Yang y Yi- zong, 2010).

2.2.4.- Lignanós

Los lignanos son considerados como el segundo grupo más abundante en el reino vegetal después de la celulosa; están compuestos por polímeros fenólicos. Su función biológica es proporcionar apoyo estructural en las plantas, tal es el caso del transporte del agua a través de los tejidos (Peñarrieta y col., 2014). Los lignanos han demostrado tener una actividad antioxidante significativa, y se consideran como fuentes de fitoestrógenos en la dieta, en particular el sésamo, un derivado de la estructura de la sesamina. Al igual están presentes en varios alimentos, especialmente en los cereales de grano entero (Vinardell y col., 2007).

2.2.5.- Diferuloimetanos

Son un grupo pequeño de compuestos con dos anillos aromáticos sustituidos con grupos hidroxilos y unidos por una cadena alifática con sustituyentes carbonilo (Schaffer y col., 2007). Los curcuminoides son el grupo más común de diferuloimetanos, son aislados de la raíz de curcumina (cúrcuma longa). La curcumina habitualmente se presenta junto con desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina y ciclocurcumina, juntas forman un complejo conocido como azafrán indio o amarillo natural 3 y son responsables del color que presentan las raíces de las plantas de cúrcuma (González-Albadalejo y col., 2015). Debido a que los curcuminoides logran actuar directamente y modulan la actividad en células diana e influyen indirectamente en la regulación de determinadas funciones, ejerciendo una variedad de beneficios a la salud como: antioxidante, antiinflamatorio, anticoagulante, anticarcinogénico, además de que Inhiben la mutagenicidad inducida por aminas heterocíclicas de alimentos cocinados, fritos o rostizados (Shishu y col., 2008; González-Albadalejo y col., 2015).

2.2.6.- Flavonoides.

Los flavonoides constituyen el mayor grupo fenólico de las plantas, son compuestos de bajo peso molecular. La estructura básica de los flavonoides es el núcleo flavan, que consta de 15 átomos de carbonos distribuidos en tres anillos (C6-C3-C6). Esencialmente la estructura posee dos anillos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B), unidos por un pseudoanillo (C) compuesto por tres carbonos (Aguilera y col., 2011).

Existen varios subgrupos de flavonoides, siendo el estado de oxidación del anillo C y la posición del anillo B, quienes permiten distinguir entre subgrupos, mientras que los compuestos individuales dentro de un subgrupo se diferencian por sustituciones en los anillos A y B, que pueden incluir oxigenación, alquilación, acilación, sulfatación y glicosilación (Balasundram y col., 2006; Quiñones y col., 2012). Los flavonoides frecuentemente se encuentran como glucósidos, sin embargo, pueden aparecer en forma libre, siendo conocidas como agliconas.

Además, pueden agruparse como dímeros o polímeros. Los principales subgrupos de compuestos flavonoides (Figura 2) son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Quiñones y col., 2012).

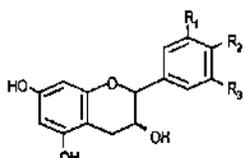
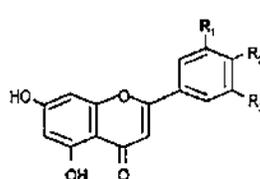
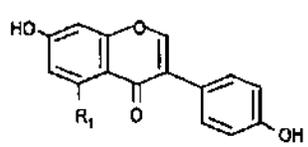
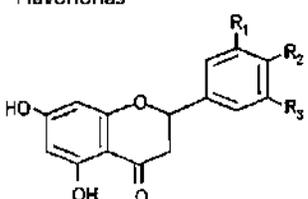
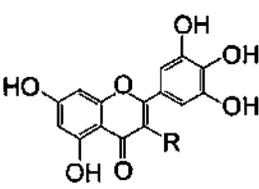
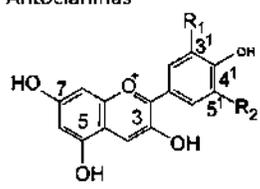
Flavonoides		
<p>Flavonoles (catequinas)</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Catequina • Galocatequinas • Epicatequina 	<p>Flavonas</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Apigenina • Luteolina 	<p>Isoflavonas</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Daidzeína • Genisteína
<p>Flavononas</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Narinenina • Hesperatina 	<p>Flavonoles</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Quercetina • Miricetin • kaempfenol 	<p>Antocianinas</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Cianidina • Pelargonidina • Delfinidina

Figura 2. Clasificación y estructura de flavonoides. Los sustituyentes (R) comunes que pueden llegar a presentarse son: O, OCH₃, OH, H y glicósidos (Paredes y col., 2010; Quiñones y col., 2012).

2.3.- Síntesis de polifenoles

La síntesis de los compuestos polifenólicos dentro de las plantas se da a través de dos importantes rutas: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos (Figura 3). La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula de acetil-CoA, y a través de una serie de reacciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y las xantonas; algunos otros metabolitos se generan a través de rutas mixtas (tanto de la vía del ácido

shikímico como de la ruta de los poliacetatos) como es el caso de los flavonoides (Quiñones y col., 2012).

La ruta del ácido shikímico provee la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), al igual que, los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano); inicia a partir de la eritrosa-4-fostato y el fosfoenolpiruvato (Figura 3). La participación enzimática de algunas deshidrogenasas como shikimato deshidrogenasa, promueve la obtención del ácido shikímico, el cual es el precursor de la fenilalanina, un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas y, de igual manera para la formación de la mayoría de los metabolitos fenólicos.

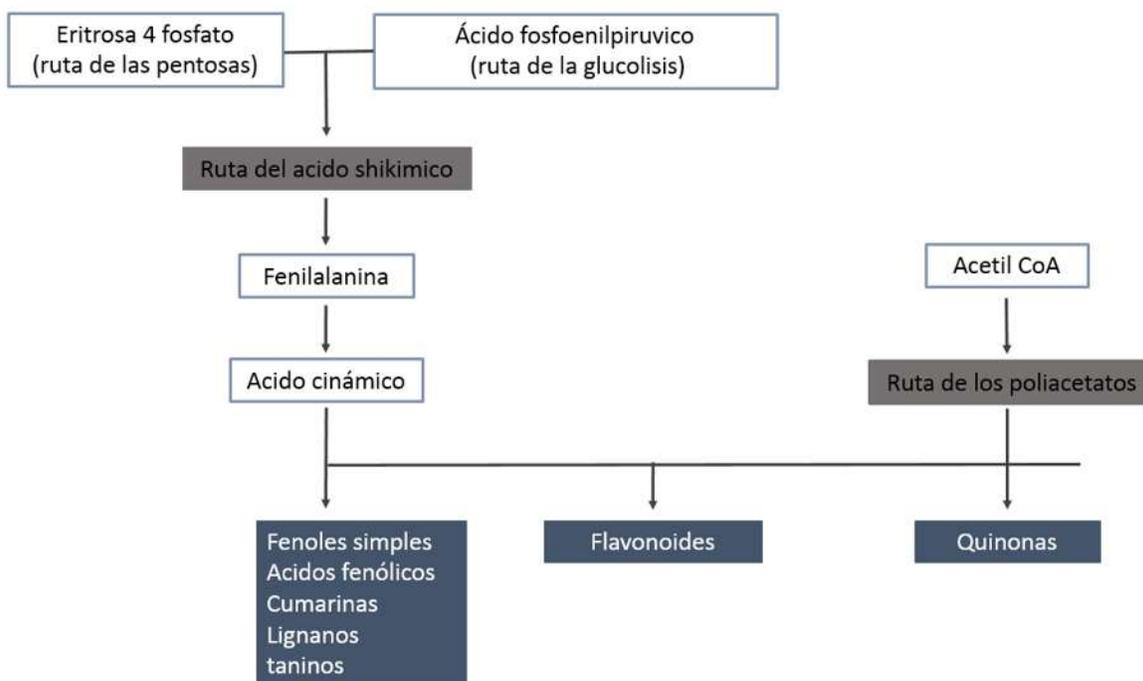


Figura 3. Rutas de síntesis de compuestos fenólicos. La eritrosa 4 fosfato provienen de la ruta de las pentosas, mientras el fosfoenolpiruvato de la glucolisis (Quiñones y col., 2012).

La fenilalanina forma parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina aminoliasa (PAL), que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en ácido cinámico; a su vez, el ácido cinámico se transforma en ácido *P*-cumarico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático (Figura 4). El ácido *P*-cumarico podrá dar origen a los ácidos fenólicos, estilbenos y elagitaninos, o bajo la acción de la 4 CoA-ligasa, es transformado en 4- Cumaroil -CoA, que en adición de tres moléculas de malonil-CoA y bajo la influencia de chalcona sintasa (CHS), condensa una molécula de chalcona también conocida como naringenina chalcona, un intermediario clave en la formación de los flavonoides (To y Wang, 2006).

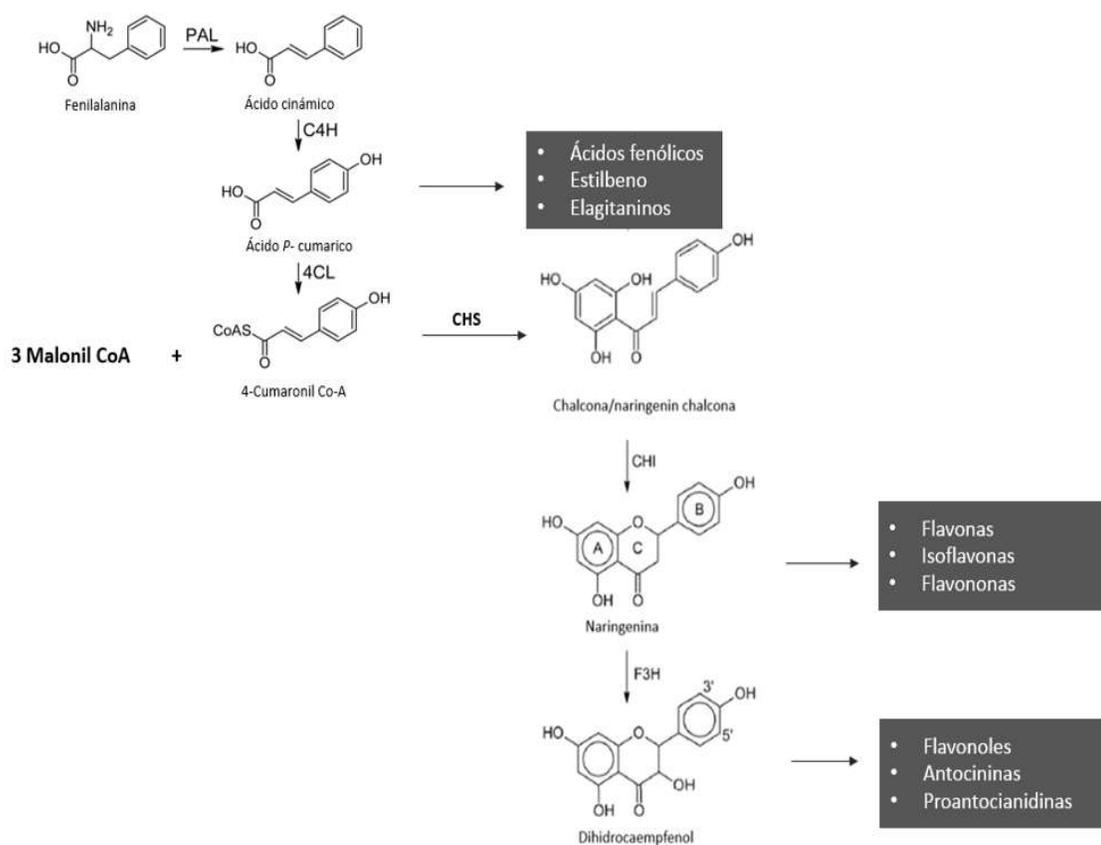


Figura 4. Ruta de biosíntesis de los polifenoles a partir de fenilalanina. Fenilalanina aminoliasa (PAL); cinamato 4 hidroxilasa (C4H); 4-Cumarato liasa (4CL); chalcona sintasa (CHS); chalcona isomerasa (CHI); Flavonol 3- hidroxilasa (F3H), (Deroles, 2009).

La chalcona puede convertirse rápidamente en naringenina por acción de la chalcona isomerasa (CHI); posteriormente la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) cataliza la naringenina a dihidrokaempferol, seguido de esto se llevan a cabo modificaciones extensas para formar las antocianidina y proantocianidinas.

La posición, los grupos y el número de sustituyentes encontrados en la estructura de los polifenoles, le confiere la capacidad de donar átomos de hidrógeno o electrones, o atrapar quelatos de cationes metálicos (Amarowicz y col., 2004; Balasundram y col., 2006); por ende, son conocidos como potentes antioxidantes, ya que tienen la capacidad de neutralizar o eliminar radicales libres. Esta propiedad ha sido estudiada en varios sistemas de alimentos y modelos alimentarios, con el objetivo de generar opciones de sustitución para antioxidantes sintéticos tales como hidroxianisol butilado (BHA) y hidroxitolueno butilado (BHT) (Frankel y col., 1996; Basaga y col., 1997; Wanasundara y Shahidi., 1998). Sin embargo, algunos polifenoles como las antocianinas son consideradas colorantes importantes con alto valor en el mercado (US\$ 1250-2000/kg) (Chan y col., 2010). En países como Europa, Japón, Estados Unidos y otros países, son utilizadas en la elaboración de bebidas, conservas de frutas, confitería, derivados lácteos, mezclas secas (bebidas en polvo), helados de crema y bebidas alcohólicas (Mateus y Freitas, 2009).

2.4.- Bioactividad de los polifenoles

Los compuestos fenólicos han tenido gran apreciación dentro de la industria farmacéutica, incrementando el interés en estos compuestos, debido a la asociación de su potencial antioxidante con la reducción de enfermedades crónico-degenerativas como: enfermedades coronarias, cáncer, alzhéimer, diabetes, además de otros beneficios a la salud como: efecto antiinflamatorio, hipoglucemiante, hepatoprotector, antimicrobiano y antiviral, (Wang y col., 2000; Suzutani y col., 2003; Joseph y col., 2003; Galvano y col., 2004; Werlein y col., 2005; Jayaprakasam y col., 2005; Simões y col., 2012).

2.4.1.- Efecto antioxidante

Comúnmente el organismo humano produce especies reactivas de oxígeno (ERO) como: radicales superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno y algunos otros radicales libres. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de ERO y la defensa antioxidante; esto puede conducir a un daño oxidativo irreversible. Esta condición biológica puede ser el resultado de la deficiencia de los mecanismos de antioxidantes, así como a una extensa y excesiva producción de ERO (Paredes y col., 2010). El estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la patogenia del envejecimiento y el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, como la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II, cáncer (Gerber y col., 2002), trastornos inflamatorios (Sreejayan y Rao, 1996) y accidentes cerebrovasculares (Azofeifa y col., 2013).

El cuerpo humano con el fin de combatir el exceso de radicales libres, ha desarrollado mecanismos endógenos como la producción de antioxidantes enzimáticos (por ejemplo, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) y exógenos (Quiñones y col., 2012), entre estos, los compuestos fenólicos han sido ampliamente estudiados por su destacada actividad antioxidante, además de la influencia que poseen sobre los mecanismos de acción celular (Figuras 5). Sus propiedades antioxidantes, se han visto ejecutadas por diversas estrategias, ya que han demostrado un incremento en la síntesis de enzimas antioxidantes o mejorando las defensas no enzimáticas a través de medios dietéticos o farmacológicos, por lo que los polifenoles son considerados compuestos con potente actividad antioxidante por mecanismos endógenos y exógenos (Han y col., 2007).

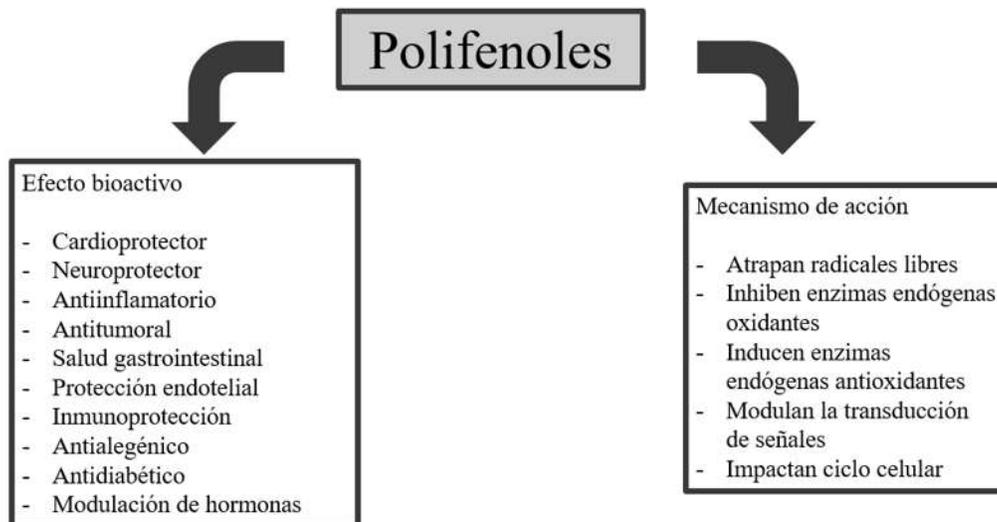


Figura 5. Propiedades bioactivas y mecanismos de acción que presentan los polifenoles (Han y col., 2007).

Algunos de los polifenoles que actúan como antioxidantes exógenos son ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y taninos (Seram y col., 2008), sin embargo otros compuestos fenólicos exhiben diversos mecanismos de acción biológicamente significativos, como agentes secuestrantes o de desintoxicación de ERO, también se ha visto que intervienen en la producción de ERO, supresión de tumores, modulación de la señal de transducción, apoptosis, desintoxicación enzimática y metabólica (Paredes y col., 2010).

2.4.2.- Anti-aterosclerosis y cardioprotección

Dentro de las propiedades estudiadas de los polifenoles esta su capacidad para mejorar el perfil lipídico. De este modo, pueden prevenir la aparición y desarrollo de aterosclerosis, cuya enfermedad se caracteriza por el bloqueo progresivo de las arterias como consecuencia de la acumulación de lípidos en la pared arterial. Estos lípidos atraviesan el endotelio y se oxidan en las células endoteliales (Quiñones y col., 2012), dicha oxidación puede amplificarse por la producción de ERO.

Estudios han demostrado que los polifenoles ejercen un efecto antiaterosclerótico y por ende cardioprotector, como ejemplo la quercetina disminuyó la peroxidación lipídica, regulando positivamente la expresión de la densidad sérica alta lipoproteína (Gouedard y col, 2004); al igual inhibió la apoptosis desencadenada por la oxidación del LDL (Han y col., 2007). Por otro lado, se ha observado que la combinación de curcumina y resveratrol tienden a disminuir los niveles sanguíneos de triglicéridos en ratones diabéticos y silvestres, así como los niveles de glucosa en ratones diabéticos, por lo que esta combinación pudiera controlar los niveles de glucosa y triglicéridos (González-Villegas y col, 2017).

2.4.3.- Propiedades antiinflamatorias

La inflamación crónica está asociada con diversas patologías humanas, cuyas causas son la irregularidad de proteínas proinflamatorias como el óxido nítrico inducible sintasa (iNOS), ciclooxigenasa 2 (COX-2), liposixenasas (LPO); de igual manera se sabe que los procesos inflamatorios están mediados por la activación de diversos factores como: el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) y de proteína activador 1 (AP-1). Este último permite la expresión de genes proinflamatorios tales como interleucina-1-beta (IL-1 β), factor necrótico tumoral alfa (TNF- α) e iNOS (Cuevas y col., 2010). Los polifenoles han exhibido un efecto antiinflamatorio, este es el caso del resveratrol que se considera una molécula capaz de inhibir la biosíntesis de prostaglandinas implicadas en los procesos inflamatorios (Badia y col., 2004). Por otro lado, los polifenoles encontrados en el cacao, también poseen la capacidad de modular y mejorar los mediadores inflamatorios, en pacientes con enfermedades cardiovasculares de alto riesgo (Selmi y col., 2008). Al igual, la apigenina, luteína y quercetina han inhibido la expresión de iNOS, así como las moléculas de adhesión en macrófagos y las células endoteliales durante los procesos inflamatorios (Abe y col., 2011).

2.4.4.- Propiedades antimutagénicas y anticancerígenas

Los polifenoles pueden actuar y alterar la estabilidad genómica de puntos subsecuentes de transformaciones malignas, interviniendo en la iniciación, promoción y progresión del cáncer. Diversos sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo*, han sido utilizados para determinar el potencial mutagénico y anticarcinogénico de estos fitoquímicos (Duthie, 2007). Entre estos se encuentra, la curcumina que ejerce actividad antitumoral por inhibición de la proliferación celular, angiogénesis y la progresión del ciclo celular tumoral, además que promueve la apoptosis (Kunnumakkara y col., 2007). Por otro lado, el resveratrol inhibe la activación de MAPKs y AP-1 en la piel de los ratones (Kundu y col., 2004), y a su vez la actividad de mitógenos a nivel celular. También se ha reportado que el consumo de bayas y frutos rojos ricos en polifenoles contribuyen a la reducción del cáncer a través de varios mecanismos tales como la inhibición *in vitro* de monooxigenasas humanas (Han y col., 2007).

2.4.5.- Propiedad antidiabética

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica, la cual comprende una serie de trastornos metabólicos, cuya característica principal es la hiperglicemia. Esto puede ser debido a la progresiva incapacidad de las células para utilizar la glucosa, o la incapacidad del páncreas para segregar la insulina requerida (Dávila y col., 2015). La enzima aldosa reductasa cataliza la reducción de glucosa a sorbitol, aumentando la producción de sorbitol en un estado diabético hiperglucémico. Esta síntesis elevada, se ha asociado a complicaciones microvasculares como retinopatías, neuropatías y nefropatías. Por lo que, la inhibición de la aldosa reductasa es un mecanismo antidiabético útil. Algunos compuestos que han exhibido esta propiedad son los terpenos, ya que han mostrado una fuerte inhibición de la aldosa reductasa (Burns y col. 2008). Por otro lado, las fracciones enriquecidas con flavonoides y polifenoles han mostrado inhibición de la absorción de glucosa en células endoteliales (Johnston y col, 2005). A su vez, la combinación de curcumina y resveratrol han mostrado efectos

hipoglucemiantes en ratones diabéticos, por lo que esta combinación pudiera controlar los niveles de glucosa en sangre de humanos (González-Villegas y col, 2017).

2.4.6.- Efectos neuroprotectores

Los radicales libres inducen peroxidación de lípidos en las membranas celulares e inician una disfunción y muerte neuronal (González-Jiménez y col., 2015), debido a esto, los polifenoles también han sido evaluados sobre el sistema nervioso central (SNC). Se ha visto que el consumo de antioxidantes capaces de inhibir esta peroxidación de lípidos se asocia con la disminución del riesgo de padecer alguna enfermedad neurodegenerativa, como el Alzheimer y Parkinson. Silveira y col., (2011) presentaron al menos cuatro sustancias de naturaleza polifenólica del fruto guabiyú, capaces de inhibir la acetilcolinesterasa, la cual es una enzima cuya sobreexpresión es responsable de los efectos clínicos del Alzheimer. Además, la curcumina podría alterar las placas existentes y restaurar las neuritas distorsionadas en un modelo de ratón con Alzheimer (García-Alloza y col., 2007). Del mismo modo, el vino tinto puede tener un papel neuroprotector, esto debido a los compuestos antioxidantes que posee, entre los que destacan la catequina, epicatequina, quercetina y procianidinas, estos compuestos disminuyen la generación de ERO, aumentando la expresión y actividad de enzimas antioxidantes como: la glutatión reductasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, controlando así el balance redox en el cuerpo (Martín y col. 2011).

2.4.7.- Otros efectos

Entre algunas de las propiedades que han mostrado los polifenoles ha destacado su efecto antimicrobiano (Sakagami y col., 2007; Bodet y col., 2008), tal es el caso de los taninos que pueden inhibir la adhesión de *Escherichia coli* en células uroepiteliales en el tracto urinario, así como la inhibición la adhesión de *Helicobacter pylori* a la mucosa gástrica (Paredes y col., 2010). Extractos de

arándano contienen proantocianidinas que han mostrado un efecto inhibitor de la adherencia viral y la infectividad del virus de influenza A y B (Weiss y col., 2005), también evidenciaron un efecto antiviral sobre el VIH (Nair y col., 2002) y han exhibido su capacidad hepatoprotectora y angiogénica (Han y col., 2007).

De esta manera, los polifenoles además de tener propiedades antioxidantes tienen acciones biológicas específicas para prevenir y tratar enfermedades, por lo que se ha promovido el consumo de compuestos fenólicos y sus derivados con fines terapéuticos, surgiendo suplementos alimenticios elaborados a base de concentrados (Balasundram y col., 2006; Aguilera y col., 2011), incrementando el interés por los compuestos polifenólicos, tanto por sus usos potenciales como por sus propiedades nutracéuticas.

2.5.- Aplicaciones de los polifenoles

Debido al potencial antioxidante que presentan los polifenoles, la industria alimentaria ha evaluado esta propiedad en varios sistemas y modelos alimentarios, con el objetivo de generar opciones de sustitución para antioxidantes sintéticos tales como hidroxianisol butilado (BHA) y hidroxitolueno butilado (Basaga y col., 1997; Wanasundara y Shahidi., 1998; Caleja y col., 2016). Además, su incorporación en productos lácteos como yogurt ha generado productos nutracéuticos con alto potencial antioxidante (Karaaslan y col., 2011). En este mismo contexto, Dos Santos y col. (2017), demostraron mejoras en las características sensoriales como sabor, color y aceptabilidad general de leche fermentada con *L. rhamnosus*, tras agregar extractos fenólicos de orujo de uva. Otro ejemplo claro de la incorporación de polifenoles en el sector alimenticio son las antocianinas, consideradas colorantes naturales con alto valor (US\$ 1250-2000/kg) en el mercado (Chan y col., 2010); en países como Europa, Japón, Estados Unidos y otros países, son utilizadas en la elaboración de bebidas, conservas de frutas, confitería, derivados lácteos, mezclas secas (bebidas en polvo), helados de crema y bebidas alcohólicas (Mateus y Freitas, 2009).

Dentro de otros usos potenciales se encuentra lo estudiado por Mora y col., (2017) donde evaluaron el efecto de la suplementación con isoflavonas derivadas de la soja sobre los síntomas climatéricos en mujeres postmenopáusicas, disminuyendo significativamente la sintomatología. A su vez, la elaboración de cremas con extractos etanólicos ricos en polifenoles, han probado un efecto cicatrizante en ratas con incisiones circulares y lineales, sin mostrar diferencias significativas con marcas comerciales como Madecassol® (Süntar y col., 2011). Se observado el efecto que tienen las proantocininas, para inhibir biopelículas bacterianas compuestas por *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, lo que genera una ruta de control de enfermedades con importancia clínica sin promover la resistencia de los patógenos (Neto y col., 2014).

En contraste, Kostyuk y col., (2017) encontraron que los fenilpropanoides, flavonoides y ácidos leontopodicos tiene la capacidad de prevenir y reducir el fotoenvejecimiento de la piel, abriéndoles pasó en la industria cosmética. Debido a su sensibilidad a la luz, cambios radicales de temperatura y pH, son considerados inestables a largo plazo, por lo que, para mejorar sus aplicaciones terapéuticas, se han realizado investigaciones exitosas basadas en la nano encapsulación de polifenoles como: el resveratrol, la quercetina, epigallocatequina-3-galato y cúrcumina (Conte y col., 2017), esto representa una estrategia prometedora para la incorporación de fitofármacos.

2.6.- Extracción y cuantificación de polifenoles

Los compuestos fenólicos poseen amplia distribución en vegetales (frutas, verduras cereales, aceitunas, legumbres, chocolate, etc.) y bebidas (té, café, cerveza, vino, etc.); son considerados parcialmente responsables de las propiedades sensoriales de algunos vegetales. Si bien, ciertos polifenoles como la quercetina se encuentran en una amplia gama de productos vegetales; frutas, verduras, cereales; otros como las flavanonas e isoflavonas son específicas en

determinados alimentos como soya, uvas, fresa, cítricos y frutos rojos (Bhooshan y Ibrahim, 2009; Mateus y Freitas, 2009), esto restringe las fuentes de obtención.

La extracción de compuestos bioactivos de materiales vegetales es el primer paso de la incorporación de fitoquímicos en la preparación de suplementos dietéticos o nutraceuticos, aditivos alimentarios, productos farmacéuticos y cosméticos. Los compuestos fenólicos se pueden extraer de plantas frescas, congeladas o muestras secas; del mismo modo también se ha implementado la extracción a partir del jugo de frutas o verduras (Deroles, 2009). En general, se sabe que el rendimiento de la extracción química depende del tipo y polaridad del solvente, tiempo de extracción y temperatura, relación muestra-disolvente, así como en la naturaleza química y física de la muestra (Dai y Mumper., 2010). Por lo tanto, no existe un procedimiento de extracción universal adecuado para la extracción de todos los compuestos fenólicos vegetales (Dai y Mumper., 2010). Sin embargo, los métodos usualmente implementados son la maceración y la extracción por Soxhlet; por la naturaleza química de los compuestos fenólicos, los solventes utilizados para su extracción son el metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, siendo utilizadas combinaciones con agua (Xu y Chang, 2007; Deroles, 2009).

Una vez que se obtienen extractos polares de plantas, se recomienda realizar un método de purificación preliminar, siendo una técnica clásica la precipitación con acetato de plomo aunque, en ocasiones es ineficiente, ya que algunos compuestos fenólicos no precipitan; otros compuestos pueden coprecipitar y no siempre es fácil eliminar las sales de plomo (Marston y Hostettmann, 2006). Alternativamente, se han desarrollado algunas técnicas como la extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida (EFS), siendo esta última una de las más recurridas, ya que es rápido, económico y sensible, además de la que se puede usar una gran variedad de fases sólidas, tales como Amberlite XAD-2 , XAD-7 , XAD-16 , Oasis HLB, (Dai y Mumper., 2010), en algunos casos, la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAR o HPLC) a escala preparativa, también se ha utilizado en la purificación de muestras de polifenoles (Agarwal y col., 2007).

Los ensayos utilizados para el análisis de compuestos fenólicos generalmente se clasifican como aquellos que miden el total contenido fenólico y los que cuantifican un grupo específico o clases de compuestos fenólicos. Se sabe, que la cuantificación de los compuestos fenólicos en extractos está influenciada por la naturaleza química del analito, así como el método de ensayo, la selección de patrones y la presencia de contaminantes (Naczki y col 2006). Los métodos más populares para la cuantificación de polifenoles totales son: el método Folin-Denis (FD), método de Folin-Ciocalteu (F-C), colorimetría con sales de hierro, los cuales son métodos espectrofotométricos.

Otro grupo de polifenoles ampliamente cuantificado por métodos espectrofotométricos son los flavonoides, para esto comúnmente se utiliza cloruro de aluminio y cuyos rangos de lectura son entre 300-500 nm (Madaan y col., 2011; Ramos y col., 2017). A su vez las antocianinas son un subgrupo de los flavonoides y al igual que los anteriores, se pueden evaluar a longitudes de onda entre 490 nm y 550 nm; el método más común y económico para la evaluación de los compuestos antociánicos es el método de pH diferencial, donde la absorción de la muestra se mide a un pH 1 (antocianinas como sales coloreadas de oxonio), así como a pH 4.5 (Giusti y Wrolstad., 2001). Por otro lado, el ensayo para medir el contenido total de proantocianidina (tanino condensado), se lleva a cabo mediante el butanol y ácido clorhídrico concentrado; durante este proceso las proantocianidinas se separan en antocianidinas coloreadas, que son cuantificadas (Dai y Mumper, 2010).

En general, los ensayos espectrofotométricos proporcionan métodos de cuantificación simples y rápidos. Sin embargo, las técnicas cromatográficas modernas de alto rendimiento acompañadas del análisis instrumental son recomendadas para el perfil y la cuantificación de metabolitos fenólicos (Simoes y col., 2012). La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC) es la técnica más popular y confiable para el análisis de compuestos fenólicos, sin embargo debido a la presencia de dobles enlace, grupos sustituyentes y

glicosilaciones, los compuestos fenólicos exhiben una absorción más alta o más baja en la región ultravioleta (UV) o ultravioleta - visible (UV-Vis). Por lo que, la mayoría es común encontrar CLAR acoplados a equipos de detección, como UV-Visible, matriz de fotodiodos (PDA), fluorescencia UV, espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (Dai y Mumper., 2010).

2.7.- Cultivo de tejidos vegetales

En el caso de la obtención y abastecimiento de metabolitos polifenólicos existen limitaciones, ya que la disponibilidad de materia prima está sujeta a largos periodos de cultivo, efectos estacionales, variaciones climáticas, ataque de enfermedades y plagas, además del costo de la agricultura intensiva, junto con la disminución de la disponibilidad de tierra cultivable (Ramachandra y Ravishankar., 2002; Bhooshan y Ibrahim, 2009). Todos estos factores afectan la producción en cantidad y calidad adecuada. Por lo que, el desarrollo de nuevas técnicas para la producción de compuestos polifenólicos y su optimización, ha traído gran atención. Una fuente alternativa a la que se ha recurrido es mediante el uso de cultivo de tejidos vegetales, también conocido como cultivo *in vitro* de células vegetales (Delgado y col., 2000; Ramachandra y Ravishankar, 2002; Lila, 2004; Deroles, 2009).

El cultivo de tejidos vegetales consiste en un conjunto de técnicas mediante las cuales un explante, es decir, una parte aislada de la planta se cultiva asépticamente en un medio nutritivo con composición química definida e incubado bajo condiciones ambientales controladas. Estas técnicas permiten el establecimiento, desarrollo y mantenimiento de un tejido, órgano, célula o protoplasto, basándose en el principio de totipotencialidad celular, que establece que a partir de cualquier célula de una planta es posible regenerar un individuo completo; esta condición es aprovechada dentro del cultivo *in vitro* para cumplir con tres objetivos principales: la micropropagación, el estudio genético, fisiológico y bioquímico y la producción de metabolitos secundarios de interés (Zhong, 2001). No obstante, existen factores que influyen en la respuesta del explante dentro del

cultivo *in vitro* como: la composición del medio, el uso de reguladores de crecimiento, las condiciones ambientales y el genotipo o variedad vegetal con la que se esté trabajando.

2.7.1.- Medios de cultivo

La composición del medio implementado en cultivo de tejidos vegetales depende de la especie a cultivar, por lo que se han descrito un gran número de medios nutritivos (Cuadro 1), sin embargo, todos constan de elementos generales como sales minerales, vitaminas, aminoácidos y azúcares. La composición de sales minerales fue diseñada en forma precisa para cada uno de los medios y está dada tanto por macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración que permita un apropiado desarrollo vegetal (Triyano y Gray, 2011). Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos vegetales y algunos comúnmente utilizados son: tiamina (B1), piridoxina (B6) y ácido nicotínico (Krikorian, 1991). Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B2), colina, cianocobalamina (B12) y ácido fólico. El papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales es complejo, ya que los tejidos responden en forma diversa (Triyano y Gray, 2011).

Cuadro 1. Composición de macro y micronutrientes en medios comúnmente utilizados en el cultivo *in vitro*

Compuesto	MS	B-5	WPM	NN	SH	White	Chu
Macronutrientes mg·L⁻¹							
KNO ₃	1900	2500	-	950	2500	80	2830
NH ₄ NO ₃	1650	-	400	720	-	-	-
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	-	556	-	-	300	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	96	166	200	-	166
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	370	185	400	720	185
KCl	-	-	-	-	-	65	-
KH ₂ PO ₄	170	-	170	68	-	-	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-	-	300	-	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	150	-	-	-	16.5	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	200	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-	-	-	463
K ₂ SO ₄	-	-	990	-	-	-	-
Micronutrientes mg·L⁻¹							
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3	-	-	-	-	7.0	-
MnSO ₄ ·4H ₂ O	-	10	22.3	25.0	10.0	-	4.4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	2.0	8.6	10	1.0	3.0	1.5
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	6.2	10	5.0	1.5	1.6
KI	0.83	0.75	-	-	1.0	0.75	0.8
CuSO ₄ ·5H ₂ O	25 MC	25MC	0.25	0.025	0.2	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	250 MC	250 MC	0.25	0.26	0.1	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	25 MC	25 MC	-	-	0.1	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	-	27.8	27.8	15.0	-	27.85
NaFeEDTA	-	28	-	-	-	-	-
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3	-	37.2	37.3	20.0	-	37.25
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	-	-	2.5	-
Vitaminas mg·L⁻¹							

Myo-inositol	100	100	100	100	1000	-	-
Tiamina	0.1	10	1.0	0.5	5	-	1.0
Acido nicotínico	0.5	1	0.5	5	5	-	0.5
Piridoxina HCl	0.5	1	0.5	0.5	0.5	-	0.5
Biotin	-	-	-	0.2	-	-	0.05
Ácido fólico	-	-	-	-	-	-	0.5

Medios Murashige y Skoog (MS), Woody Plant. Medium (WPM) Gamborg (B-5) Nitsch y Nitsch (NN), Schenk y Hildebrandt (SH), White y Chu.

Debido a que los tejidos cultivados *in vitro* son incapaces de fijar CO₂, se agregan azúcares al medio con la finalidad de que actúen como fuente de carbono; usualmente la más implementada es la sacarosa cuyas concentraciones van del 2 al 4 % (p/v), sin embargo, otros azúcares capaces de sostener el desarrollo vegetal son glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y lactosa (Triyano y Gray, 2011). Además de que su incremento está relacionado directamente con la producción de algunos metabolitos secundarios.

2.7.2.- Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) son moléculas orgánicas que en pequeñas concentraciones afectan diferentes procesos como la división celular, el crecimiento y morfogénesis vegetal. Estos compuestos al ser sintetizados en la planta son llamados fitohormonas u hormonas, no obstante, también existen RCV sintéticos siendo ampliamente aplicados en la horticultura (Jankiewicz, 1997). En el cultivo de tejidos vegetales comúnmente son aprovechadas para la estimulación del desarrollo de embriones somáticos, inducción y crecimiento de callo, proliferación de brotes axilares, crecimiento de tallo y desarrollo de raíces adventicias. Los RCV son clasificados en cinco grupos, los cuales son: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de los reguladores de crecimiento comúnmente utilizados en CTV (Triyano y Gray, 2011)

Tipo de RCV	Nombre	Abreviatura
Auxina	Ácido α -naftalenacético	ANA
	Ácido indolbutírico	AIB
	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D
	Dicamba	DIC
	Picloram	PIC
Citocinina	Zeatina	ZEA
	N-isopentenil adenina	2-IP
	Bencil adenina	BA
	Cinetina	K
Giberelinas	Ácido giberelico	AG3
Ácido abscísico	Ácido abscísico	ABA
Etileno	Etileno	Etileno

Se muestran las abreviaturas regularmente utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales (CTV) para cada regulador de crecimiento vegetal (RCV).

Las auxinas, generalmente estimulan procesos como: crecimiento celular, formación de raíces, elongación de los tallos, división celular en el cambium vascular y diferenciación del xilema secundario (Jankiewicz, 1997). En el cultivo de tejidos, las auxinas son comúnmente utilizadas en la inducción de callos y formación de raíces, aunque combinadas con citocininas promueven crecimiento de callos y suspensiones celulares (Triyano y Gray, 2011). Las citocininas participan en procesos como: la división y diferenciación celular, retraso de la senescencia, desarrollo de cloroplastos, desarrollo vascular, así como iniciación y desarrollo de brotes (Jankiewicz, 1997). Comúnmente se aplican en el cultivo *in*

in vitro para inducir la proliferación de brotes, y estimular la división celular frecuentemente en conjunto con auxinas (Triyano y Gray, 2011).

La proporción entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la dediferenciación de los tejidos, por lo que se deben establecer las concentraciones de auxinas/citocininas para cada especie vegetal y según el objetivo del trabajo (Figura 6).

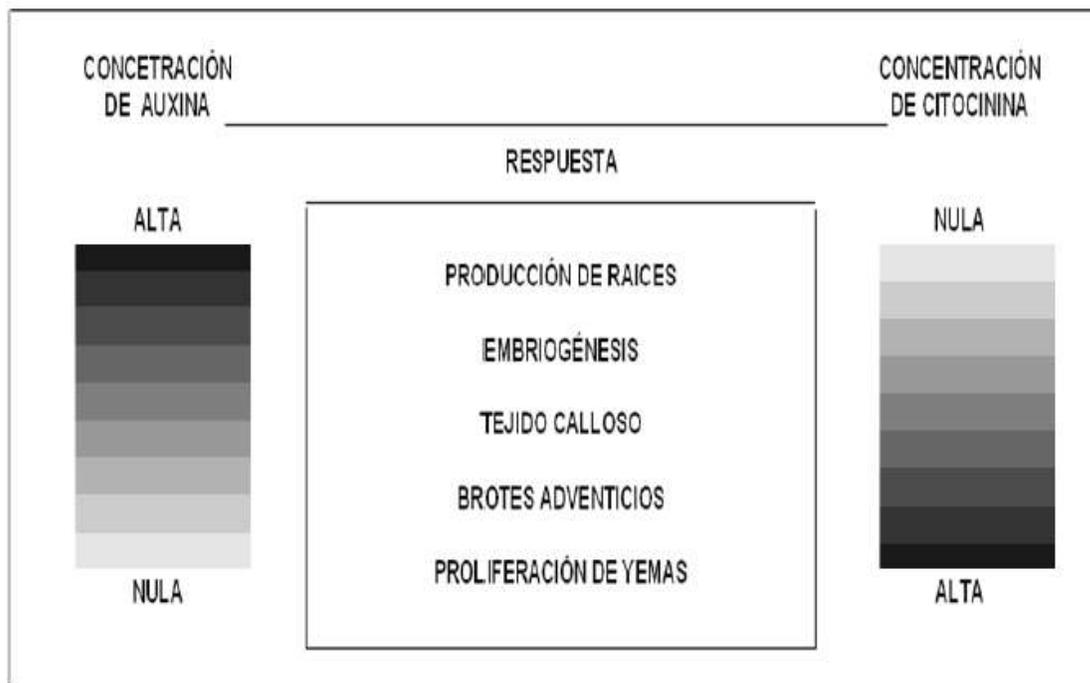


Figura 6. Respuesta de explantes *in vitro* bajo la presencia de auxinas y citocininas (Pérez y col., 1999).

Las giberelinas, en plantas ejercen efecto sobre la elongación del tallo, la expresión sexual, sobre el tiempo de latencia y germinación (Jankiewicz, 1997). Las giberelinas típicamente no desempeñan un papel importante en la regulación

del desarrollo *in vitro*, aunque se han utilizado para aumentar el alargamiento de los brotes antes del enraizamiento (Triyano y Gray, 2011).

El ácido abscísico o ABA desempeña un papel en la germinación e inactividad de las semillas, el control estomático, la abscisión de las hojas y la senescencia (Jankiewicz, 1997). En sistemas de cultivo de tejidos, el ABA es generalmente positivo en concentraciones relativamente bajas, pero en altas concentraciones inhiben tanto el crecimiento del callo como la formación de yemas, raíces y embriones. ABA se utiliza con mayor frecuencia para mejorar la maduración y el crecimiento normal de los embriones somáticos (Triyano y Gray, 2011). El etileno influye en el proceso de maduración de frutos, la senescencia, la abscisión y el estrés (Jankiewicz, 1997); se sabe que el cultivo de tejidos a concentraciones altas puede inhibir el crecimiento de tejidos (Triyano y Gray, 2011), y aunque no es común su aplicación se utiliza para estudiar procesos de estrés.

2.7.3.- Condiciones ambientales

Los principales factores ambientales que inciden sobre los cultivos son la luz, la temperatura y la humedad relativa. Por lo que, en el cultivo *in vitro* estas condiciones suelen ser lo más semejante posible. Si bien la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas, en general se utiliza luz blanca a una intensidad lumínica entre 1000 a 5000 lux. El fotoperíodo normalmente es ajustado a 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, aunque algunos cultivos requieren oscuridad para un eficiente crecimiento (Triyano y Gray, 2011); aun cuando cada especie presenta un intervalo de temperatura óptimo, las cámaras de cultivo frecuentemente se regulan entre 22 y 28 °C obteniendo resultados satisfactorios (Gamborg, 2002). La humedad relativa dentro del cultivo de tejidos vegetales no es comúnmente reportada, sin embargo, se mantiene alrededor del 70 % y varía con la temperatura de la cámara y el tipo de cierre de los recipientes (George, 1987).

2.7.4.- Tipos de cultivo

Los explantes, al ser cultivados bajo condiciones específicas, pueden generar tejidos vegetales diferenciados o indiferenciados. Los tejidos diferenciados dentro del cultivo *in vitro*, hacen alusión a la regeneración de partes de la planta o bien plantas completas, esto puede ocurrir a través de dos procesos: la embriogénesis somática u organogénesis. La embriogénesis somática, es decir embriones que no resultan de la fusión de gametos, siendo estructuras bipolares, capaces de crecer y formar plantas normales (Litz y Jarret, 1991; Jiménez González, 1998). La embriogénesis somática se puede obtener directamente de un explante (embriogénesis directa) o utilizando tejidos indiferenciados (embriogénesis indirecta) (Walden y Wingender, 1995). Ahora bien, la organogénesis se basa en la regeneración de plantas mediante la producción de brotes, pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Jiménez González, 1998; Sugiyama, 1999). La organogénesis es la técnica más común empleada en propagación masiva de plantas.

En el caso de los cultivos vegetales indiferenciados se obtienen a partir de órganos o tejidos organizados que son capaces de desdiferenciarse ante la presencia de RCV exógenos. Dicha estrategia genera la formación de tejido calloso, que es una masa amorfa de células con proliferación continua, acelerada y desorganizada (Ikeuchi y col., 2011). Una de las propiedades importantes del callo es la llamada friabilidad, que se define como la tendencia de las células a separarse unas de otras, por lo que un callo friable es aquel que se disgrega fácilmente; el callo friable puede establecerse en un medio líquido con agitación constante para dar origen a las llamadas suspensiones celulares formadas por células libres agregadas, facilitando el contacto con los nutrientes (Arias y col., 2009). En ambos cultivos los procesos de transferencia de masa son eficientes y pueden desarrollarse con densidades celulares más elevadas, lo que representa ventajas para el desarrollo, control y manipulación (Trejo y Rodríguez, 2007), siendo óptimos para la producción de metabolitos secundarios de interés como los polifenoles.

2.8.- Producción de metabolitos polifenólicos mediante el cultivo *in vitro*

Si bien diversas estrategias han sido desarrolladas para incrementar la producción de metabolitos secundarios en tejidos indiferenciados, en general los estudios biotecnológicos sobre la producción de metabolitos polifenólicos dentro del cultivo *in vitro* han reportado la influencia de diversos factores como: las condiciones físicas del desarrollo de los cultivos (temperatura, luz, fotoperiodo, etc.), la composición química del medio (tipo y concentración de la fuente de carbono, disponibilidad de nutrientes, etc.), adición de precursores y elicitación (Pascual y col., 2008; Simões y col., 2012), por lo que se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Estudios reportados de condiciones fisicoquímicas que incrementan el contenido de polifenoles en tejidos indiferenciados de diferentes especies

Clasificación	Condiciones específicas	Especie	Tratamiento	Incremento del compuesto	Enzimas implicadas	Referencia
Condiciones físicas	Luz	<i>Artemisia absinthium</i> L.	Luz continua 40 μ M	50 % de polifenoles totales	-	Ali y col., 2014
		<i>Melastoma malabathricum</i> L.	301-600 lux con luz continua	710 % de antocianinas totales	-	Chan y col., 2010
	pH	<i>Fragaria X ananassa</i>	pH de 8.7	100 % de antocianinas totales	-	Zhang y Furusaki., 1997
	Temperatura	<i>Fragaria X ananassa</i>	15 °C	400 % antocianinas totales	-	Zhang y col., 1997
Condiciones químicas	Sacarosa	<i>Prunella vulgaris</i>	20 g·L ⁻¹ de sacarosa	78 % polifenoles totales	-	Fazal y col., 2015
			25 g·L ⁻¹ de sacarosa	15 % de flavonoides totales	-	
	<i>R. sachalinensis</i>	50 g·L ⁻¹ de sacarosa	50 % de polifenoles totales	-	Li y col., 2016	
	Dilución de sales minerales	<i>Cleome roseae</i>	MS 1/2 suplementado con 30 g·L ⁻¹ de sacarosa	600 % de antocianinas totales	-	Simões y col., 2011

Cuadro 3. Estudios reportados de condiciones fisicoquímicas que incrementan el contenido de polifenoles en tejidos indiferenciados de diferentes especies

Clasificación	Condiciones específicas	Especie	Tratamiento	Incremento del compuesto	Enzimas implicadas	Referencia
Condiciones químicas	Dilución de sales minerales	<i>Rhodiola sachalinensis</i>	50 % sales minerales	30 % de polifenoles totales 20 % de flavonoides totales	-	Li y col., 2016
	Sacarosa	<i>Vitis Vinifera</i>	sacarosa a 234 mM y reduciendo las sales de Mg, P y N	13 veces de taninos 20 veces de antocianinas	--	Decendit y Merillon., 1996
		<i>Eurycoma longifolia</i>	3/4 MS suplementado NH4 :NO3 45:0 mM	50% de polifenoles totales 60 % de flavonoides totales	-	Lulu y col., 2015
	Sacarosa	<i>Rosa hybrida</i>	Ausencia de NH4, 70 g·L ⁻¹ de sacarosa	7 - 34 veces de antocianinas	-	Ram y col., 2011
	Nitratos	<i>Malus ssp</i>	270 mM de sacarosa y 60 mM de nitrógeno total	500 % de antocianinas y flavonoides	CHS, F3H, DFR, ANS, UFGT	Wan y col., 2015

Cuadro 3. Estudios reportados de condiciones fisicoquímicas que incrementan el contenido de polifenoles en tejidos indiferenciados de diferentes especies

Clasificación	Condiciones específicas	Especie	Tratamiento	Incremento del compuesto	Enzimas implicadas	Referencia
	Hormonas	<i>Panax sikkimensis</i>	2.5 µM ANA + 1.2 µM K, 24 h luz, 70 g·L ⁻¹ de sacarosa	900 % de antocianinas	-	Mathur y col., 2010
	Sacarosa					
	Luz					
Condiciones químicas	Precursor	<i>Fragaria X ananassa</i>	1.0 mM de L-fenilalanina	80 % de antocianinas	-	Edahiro y col., 2005
		<i>Ocimum basilicum</i>	0.05 mM de L-fenilalanina	40 % polifenoles totales 40 % de flavonoides totales	PAL	Koca y col., 2015
		<i>Ocimum basilicum</i>	1.0 mM de espermina y Metil jasmonato	70 % de polifenoles totales	PAL	Koca y col., 2015
	Elicitores	<i>Scrophularia kakudensis</i>	200 µM de Metil jasmonato 150 µM de Metil jasmonato	200 % flavonoides y acetina 150 % polifenoles totales	-	Manivannan y col 2016

Con base en estos reportes se ha observado la eficacia de la manipulación de factores fisicoquímicos en la producción de polifenoles, flavonoides y capacidad antioxidante, sin embargo no todas las especies ni variedades responden de la misma manera ante los estímulos, por lo que es necesario ampliar los estudios para el desarrollo de una técnica eficiente y aplicable en especies del género *Rubus*.

3-. JUSTIFICACIÓN

La industria farmacéutica, cosmética y alimentaria ha intensificado su interés en los metabolitos polifenólicos, debido a las propiedades nutraceuticas y aplicaciones que han evidenciado estos compuestos. El número de factores que afectan la producción de los polifenoles dentro de las plantas, junto con las fuentes naturales limitadas, restringe su obtención en cantidad y calidad adecuada impidiendo su eficiente explotación. Por esta razón es necesario explorar fuentes y estrategias para la obtención de compuestos polifenólicos, como los presentes en las especies silvestres del género *Rubus* encontradas en el estado de Michoacán. Una de las alternativas a las que se ha recurrido es el uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro*, que ha dado la oportunidad de aumentar la producción de compuestos de interés industrial, cuya calidad y costos no sean afectados por el tiempo de desarrollo, condiciones climáticas y sanitarias de la planta. El cultivo de tejidos vegetales puede ayudar a intensificar la producción de metabolitos fenólicos de especies silvestres como *Rubus glaucus* a través de la generación de callo, aportando nuevos elementos para su eficiente producción, abriendo así nuevas perspectivas para el uso de los polifenoles y la obtención de alimentos funcionales ricos en antioxidantes, conlleva esto a generar nuevas fuentes de empleo dentro de la industria.

4. HIPÓTESIS

La exposición de callo de *Rubus glaucus* a diferentes estímulos incrementa la producción de polifenoles.

5. OBJETIVOS

5.1.- Objetivo General

Evaluar la respuesta de la producción de polifenoles en callo de *Rubus glaucus* expuesto a diferentes estímulos químicos.

5.2.- Objetivos específicos

- Establecer un sistema de propagación de callo proveniente de hoja y tallo de *Rubus glaucus*.
- Activar la respuesta de la producción de polifenoles en callo de *Rubus glaucus* bajo diferentes estímulos químicos.
- Comparar la concentración de polifenoles y flavonoides en extractos de callo bajo diferentes estímulos químicos.
- Evaluar la capacidad antioxidante de callo con y sin estímulo.
- Confirmar el incremento de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Colecta y establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Rubus glaucus*

Se colectaron yemas axilares en estado vegetativo de zarzamora silvestre y que fueron utilizados como explante. El sitio de colecta fue ubicado en el estado de Michoacán; se registraron las coordenadas geográficas, las cuales fueron altitud (msnm) 1889, latitud 19° 28' 38"; y longitud 102° 4' 31". La colecta se llevó a cabo entre los meses de abril y mayo del 2016; se seleccionaron tallos jóvenes sin daño aparente o ataque de patógenos. Los explantes se seccionaron en fragmentos de 5 cm con una yema axilar en estado de crecimiento, posteriormente fueron colocados en papel estroza húmedo y en bolsa hermética para ser trasladados al laboratorio de bromatología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en Uruapan, Michoacán. Una vez en el laboratorio fueron sometidos al sistema de asepsia para su establecimiento *in vitro* en medio MS. A la par algunas muestras fueron transportadas al laboratorio de biología molecular del Tecnológico de Tlajomulco de Zúñiga Jalisco, donde la especie colectada fue identificada como *Rubus glaucus*.

Para el establecimiento de los explantes se diseñaron tres tratamientos de asepsia; debido a que los tallos de *Rubus glaucus* cuentan con una capa de ceras denominada pruina, en los tratamientos se incorporó una solución de jabón líquido comercial que contiene componentes tensoactivos aniónicos (Salvo) y una solución de jabón comercial con tensoactivos no iónicos y peróxido de hidrogeno al 50 % (Vanish), para facilitar la eliminación de partículas y grasas. Cada tratamiento se describe en el Cuadro 3, tomándose como control el tratamiento T-0.

Cuadro 3. Tratamientos de asepsia para la especie silvestre de *Rubus glaucus*

Elementos	Tratamientos			
	T-0	T-1	T-2	T-3
Enjuague con agua corriente	X	X	X	X
Solución de jabón líquido comercial al 5 % con alquil sulfato de sodio (Salvo) por 10 min.	X	X	X	X
Solución de jabón comercial al 6 % con peróxido de hidrogeno y tenso activos no iónicos (Vanish) por 15 min.		X	X	X
Alcohol al 70 % por 3 min.		X	X	X
Solución 10 % de hipoclorito de sodio por 10 min.		X	X	
Solución 10 % de hipoclorito de sodio por 20 min.				X
Solución antioxidante (0.5 g. L ⁻¹ de ácido ascórbico y cítrico) estéril por 40 min.			X	X

Cada tratamiento fue resumido con la letra 'T' seguido del número de cada tratamiento.

Se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril en cada etapa para eliminar residuos de los productos utilizados, excepto tras el uso de la solución antioxidante. Cada tratamiento se llevó a cabo con siete repeticiones. Cada repetición consistió en un frasco con tres explantes en 20 mL de medio MS suplementado con $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, $8.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbón activado, todos a un pH de 5.7. Se evaluó el porcentaje de explantes establecidos, mortandad por oxidación y contaminación tras 30 días de incubación.

6.2.- Inducción de callo

Para la inducción de callo se tomó el protocolo previamente establecido por Tapia-Pérez y col., (2014), por lo que se seleccionaron hojas de 1 cm^2 y tallos aproximadamente de 2 cm proveniente de plantas previamente establecidas *in vitro*. Se colocaron cinco hojas y tres tallos por frasco con 20 mL de medio MS suplementado con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4- D); $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar y pH a 5.7. Se realizaron cambios de medio de cultivo cada 15 días, hasta tener una masa de 1 g (aproximado) de callo friable por frasco.

6.3.- Evaluación de compuestos antioxidantes en la oxidación de callo

En esta etapa se colocaron 0.5 g de callo friable en cajas con 10 mL de medio MS suplementado con $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4 D y diferentes concentraciones de antioxidante. Los antioxidantes evaluados fueron: ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína, polivinil pirrolidona (PVP), cuyas proporciones se describen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos formulados para inhibir la oxidación de callo de *Rubus glaucus*

Tratamientos	Ácido ascórbico mg·L ⁻¹)	Ácido cítrico mg·L ⁻¹)	L- cisteína mg·L ⁻¹)	PVP (g·L ⁻¹)
A-0	-	-	-	-
A-1	50	50	-	-
A-2	100	100	-	-
A-3	50	50	20	-
A-4	-	-	-	1

Para resumir cada tratamiento se utilizó la letra 'A' seguido del número del tratamiento. A-0 corresponde al grupo control.

Cada tratamiento consistió en tres repeticiones, cada repetición fue compuesta por cuatro cajas Petri con un callo cada una. Se evaluó el porcentaje de oxidación a los 21 días de incubación.

6.4.- Proliferación de callo

Para la proliferación de callo se colocaron 0.5 g de callo friable en cajas Petri con 10 mL de medio MS suplementado con 7 g·L⁻¹ de agar, 1 g·L⁻¹ de PVP y diferentes concentraciones de 2,4 D y BA; ANA y BA, los cuales se describen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Combinación de hormonas utilizadas para proliferación de callo de *Rubus glaucus*

Medio	BA (mg. L⁻¹)	ANA (mg. L⁻¹)	2,4- D (mg. L⁻¹)
P-0	-	-	1
P-1	0.6	0.6	-
P-2	2	1	-
P-3	2	-	1
P-4	1	-	0.5

'P' (proliferación), seguido del número del tratamiento. P-0 se consideró como control.

Cada tratamiento se hizo por triplicado, cada repetición estuvo compuesta por una caja Petri con un callo. Se determinó la curva de crecimiento con base en lo propuesto por Stepan-Sarkisian (1990), por lo que se registró el peso fresco (PF) cada 3 días, hasta la pérdida de peso.

6.5.- Evaluación del polivinilo pirrolidona (PVP)

Se realizó la evaluación del PVP como captador de polifenoles, por lo que, se formularon cinco tratamientos diferentes (Cuadro 6).

Cuadro 6. Aditivos utilizados en la valoración de PVP como captador de polifenoles

Tratamiento	Stock (MS)	PVP (1 g•L ⁻¹)	Callo	Acido gálico (16 mg•L ⁻¹)
CP-0 (M/C)	X	X	X	
CP-1 (M/C)	X	X	X	X
CP-2 (M/C)	X		X	X
CP-3 (M/C)	X	X		X
CP-4 (M/C)	X	X		
CP-5 (M/C)	x		x	

'CP' captación de polifenoles, seguido del número del tratamiento, la letra 'M' propia para medio y 'C' para callo. El tratamiento CP-0 corresponde al control.

Se colocaron 0.5 g de callo en 20 mL de medio. Cada tratamiento estuvo compuesto por tres repeticiones, cada repetición constó por un frasco con un callo, los cuales, fueron incubados por 15 días en las condiciones antes mencionadas. Para la obtención de extractos etanólicos, el callo y los medios fueron macerados como se describe en el apartado 6.7 que corresponde a la extracción y cuantificación de polifenoles.

6.6.- Estimulación de polifenoles

La estimulación de polifenoles se realizó utilizando 18 medios diferentes formulados a base del medio para mantenimiento de callo, con diferentes concentraciones de sacarosa (15, 30 y 60 g•L⁻¹), proporciones de nitrato de

potasio (0, 1, 2) y sales minerales (50, 100 %); tal y como se describe en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Tratamientos formulados con diferentes concentraciones de sacarosa, nitrato y dilución de sales minerales

Stock (minerales)	50%			100%		
KNO₃	0	1	2	0	1	2
Sacarosa						
15 g•L⁻¹	M-1	M-2	M-3	M-11	M-12	M-13
30 g•L⁻¹	M-4	M-5	M-6	M-14	M-15	M-16
60 g•L⁻¹	M-7	M-8	M-9	M-17	M-18	M-19

'M' formulación del medio, seguido del número del tratamiento. Se eliminó el M-10 para facilitar su comparación. El tratamiento M-15 se tomó como control.

En cada tratamiento consistió en tres repeticiones, cada uno estuvo compuesto por 0.5 g de callo friable en un frasco con 20 mL de medio. Se registró el peso fresco (PF) cada tercer día para determinar el tiempo de exposición en cada tratamiento, el tratamiento M-15 fue tomado como referencia, ya que contiene las concentraciones basales del medio MS. Esto se realizó tanto para el tejido proveniente de hoja como para tallo.

6.7.- Condiciones de cultivo

En todas las etapas los frascos con explantes (yemas axilares y callos) se incubaron a temperatura ambiente con intensidad lumínica de 800 lux y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, durante los periodos correspondientes de cada etapa.

6.8.- Extracción y cuantificación de polifenoles

Los compuestos fenólicos fueron extraídos con base en lo reportado por Simões y col., (2009) con modificación del solvente. Se tomó 1 g de peso fresco de callo en 4 mL de etanol, se incubaron por 48 h a 4 °C. Los macerados fueron centrifugados y se recuperó el sobrenadante.

La cuantificación de polifenoles se realizó mediante el análisis espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu previamente establecido, y que consistió en tomar 0.05 mL del extracto etanólico, se adicionó 0.1 ml de Folin-Ciocalteu (al 1 N), 0.550 mL de agua destilada, y 0.300 mL de carbonato de sodio 7.5 % (NaCO_3), se agitó y se dejó en incubación por 15 min en ausencia de luz. Se leyó la absorbancia a 760 nm. La curva patrón se realizó con solución de ácido gálico ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Las unidades fueron expresadas en microgramos Equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g EAG}$) $\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco (PF), basado en la derivada de ecuación de la curva de calibración con una $R^2= 0.996$.

6.9.- Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó por espectrofotómetro basándose en lo reportado por Madaan y col. (2011), se tomó una alícuota de 0.5 mL del extracto etanólico proveniente de callo, se le agregó 1.5 mL de etanol a 95 %, 0.1 mL de una solución de AlCl_3 (al 10 %), 0.1 mL de solución de acetato de potasio al 1 M y 2.8 mL de agua destilada; la mezcla se incubó por 30 min. Su absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm. La curva patrón se realizó con solución de quercetina ($0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Las unidades fueron expresadas en microgramos Equivalentes de quercetina ($\mu\text{g EQ}$) $\cdot\text{g}^{-1}$ PF basado en la derivada de ecuación de la curva de calibración con una $R^2= 0.998$.

6.10.- Actividad antioxidante

6.10.1.- Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)

Para evaluar la actividad antioxidante se midió la neutralización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), por lo que se preparó una solución en etanol al 0.1 mM. Para la lectura de los extractos fueron diluidos 1:4 en etanol. Se colocó 0.8 mL de solución de DPPH con 0.2 mL de muestra (dilución o patrón), transcurridos 30 min se leyó la absorbancia a 517 nm. La capacidad antioxidante se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición DPPH} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})/A_{\text{blanco}}] \times 100$$

Donde

A_{blanco} = Absorbancia del blanco.

A_{muestra} = Absorbancia de la muestra.

6.10.2.- Radical ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)

La actividad neutralizante del radical ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) fue medida bajo la metodología reportada por Ozturk y col. (2011). Se elaboró una solución acuosa de ABTS con persulfato de potasio, pasadas 12 h la solución se diluyó en etanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. Se colocó 0.950 mL de solución de ABTS con 0.025 mL de muestra adicionado con 0.025 mL de etanol, transcurridos 30 min se leyó la absorbancia a 734 nm. La capacidad antioxidante se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición ABTS} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})/A_{\text{blanco}}] \times 100.$$

Donde

A_{blanco} = Absorbancia del blanco.

A_{muestra} = Absorbancia de la muestra.

6.10.3.- Poder reductor de hierro (III) o FRAP

El poder reductor de ion férrico se basó en lo reportado por Lui y col., (1982). Se prepararon tres soluciones (A, B y C), las cuales fueron formuladas con los componentes siguientes:

- A- 300 mM de acetato de sodio disuelto en 0.8 ml de ácido acético y 49.2 mL de agua, seguido de un ajuste del pH a 3.6.
- B- 10 Mm de 2, 4, 6 tripiridil-s-triazina- ferroso (TPTZ), en 5 mL ácido clorhídrico al 40 mM.
- C- 20 mM de cloruro férrico en 5 mL de agua.

Se mezclaron las soluciones anteriores en una proporción 10:1:1, seguido de un baño maría a 37 °C por 10 min. Se tomaron 0.950 mL de esta mezcla y se adicionaron 0.025 mL de muestra con 0.025 mL de etanol, se incubó durante 30 min en agitación. Finalmente se midió la absorbancia a 593 nm. Como estándar se utilizó una solución de ácido gálico usando 10 puntos como referencia (0.125- 1.25 mg). Los resultados fueron expresados en $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mL}^{-1}$ de muestra basado en la derivada de ecuación de la curva de calibración con una $R^2 = 0.996$.

6.11.- Cromatografía líquida de alta eficacia

Para llevar a cabo la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAR o HPLC), se basó en lo reportado por Hernández-Abreu y col, (2011), por lo que se utilizaron extractos obtenidos por evaporación de solvente durante 24 hr en campana de flujo laminar. Los extractos recuperados fueron disueltos en metanol grado HPLC, con proporción de 1 mg de extracto por 1 mL de solvente ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los extractos fueron pasados por un filtro de nylon de 0.45 μm y almacenados en viales ámbar. Los experimentos se llevaron a cabo en un equipo CLAR (Serie de PerkinElmer Sistema 200), con un detector UV-Vis, una columna Zorbax C18 de 4,6 mm x 250

mm (marca Agilent) y el software Total Chrom para la obtención de datos. La fase móvil consistió en metanol-agua en una proporción 61:39 (v/v) a un flujo de 0.7 l/min; la inyección de la muestra se realizó con un *loop* de 20 µL y se efectuó la lectura de los picos a una longitud de onda de 260 nm. Como estándares se utilizaron acacetina y quercetina.

6.12.- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de 3 x 3 x 2. Se realizó un análisis de varianza con comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey para diferencia mínimas significativas con valores de probabilidad de $P \leq 0.01$, a menos que se indique lo contrario. Se efectuaron análisis de varianza de efectos simples para las interacciones entre factores. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software SAS versión 9.0. Por otro lado se realizó la prueba de correlación de Pearson entre las variables anteriores.

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.- Colecta y establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Rubus glaucus*

Los resultados con respecto a la pérdida de explantes indican un porcentaje de mortandad por contaminación del 20 a 73 % (Figura 7), siendo el tratamiento control (T-0) que reportó estadísticamente la mayor pérdida y el T-3 el menor porcentaje. Se observó también mortandad debida a la oxidación del tejido de 26 a 40 %, siendo el tratamiento T-1 quien presentó la pérdida estadísticamente más alta ($P \leq 0.01$) respecto a los demás tratamientos; en contraste el tratamiento T-0 y T-2 reportaron el menor valor sin mostrar diferencias estadísticamente significativas en ambos tratamientos. Por otro lado, evidenció porcentajes de explantes establecidos que van de 0-46 %, siendo T-3 quien mostró el valor estadísticamente mayor ($P \leq 0.01$) en contraste, al control que tuvo nula cantidad de establecimiento *in vitro*.

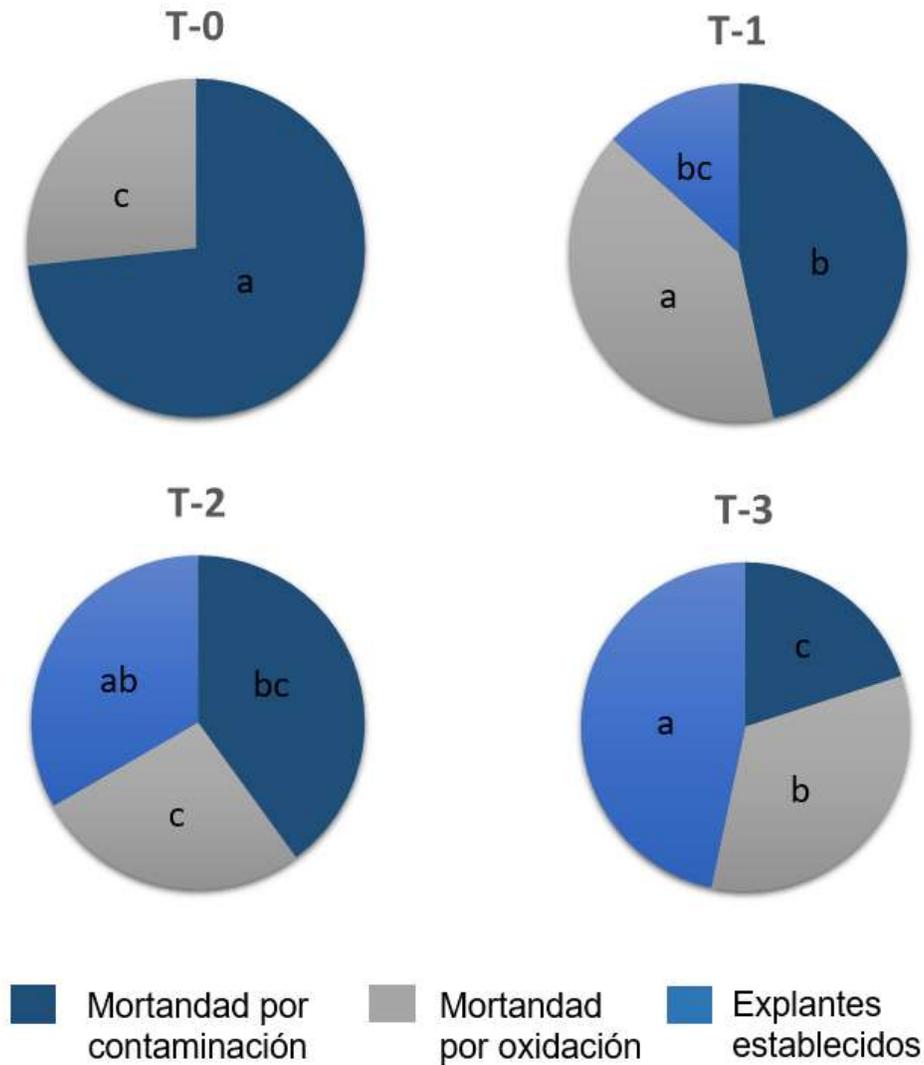


Figura 7. Porcentaje de mortandad y establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Rubus glaucus*. T-0) enjuague con agua y solución de jabón; T-1) hipoclorito de sodio al 10 % por 10 min; T-2) hipoclorito de sodio al 10 % por 10 min y solución antioxidante; T-3) hipoclorito de sodio al 10 % por 20 min y solución antioxidante. Letras iguales indica valores estadísticamente iguales entre colores a $P \leq 0.01$ de acuerdo con la prueba de Tukey.

Se apreció un efecto positivo tras la incorporación de la solución antioxidante, disminuyendo significativamente el porcentaje de mortandad por oxidación (de 40 a 26 %). Aunado a esto, la mortandad por contaminación se redujo (de 40 a 20 %),

al aumentar el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, aunque se incrementó la pérdida por oxidación.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo reportado por Flores (2007), quien mostró resultados del 45 % de explantes establecido de *Rubus ideaus* al utilizar soluciones fungicidas, bactericidas e hipoclorito de calcio (CaClO_2). Además, los resultados muestran mayor susceptibilidad de *Rubus glaucus* ante el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Esto indica que la oxidación incrementa la pérdida de explantes en el establecimiento *in vitro* de las especies de *Rubus*. Azofeifa (2009), recomienda el uso de soluciones antioxidantes previniendo pérdidas importantes durante los sistemas de asepsia. Existen pocos trabajos que reporten un sistema de establecimiento *in vitro* para las especies del género *Rubus*. Debido al diferente comportamiento entre las especies se requiere realizar pruebas posteriores.

7.2.- Inducción de callo

El inicio de la formación de tejido calloso en hoja, se observó al quinto día iniciando por el pedúnculo, para posteriormente tener una desdiferenciación completa a los 21 días (Figura 8).

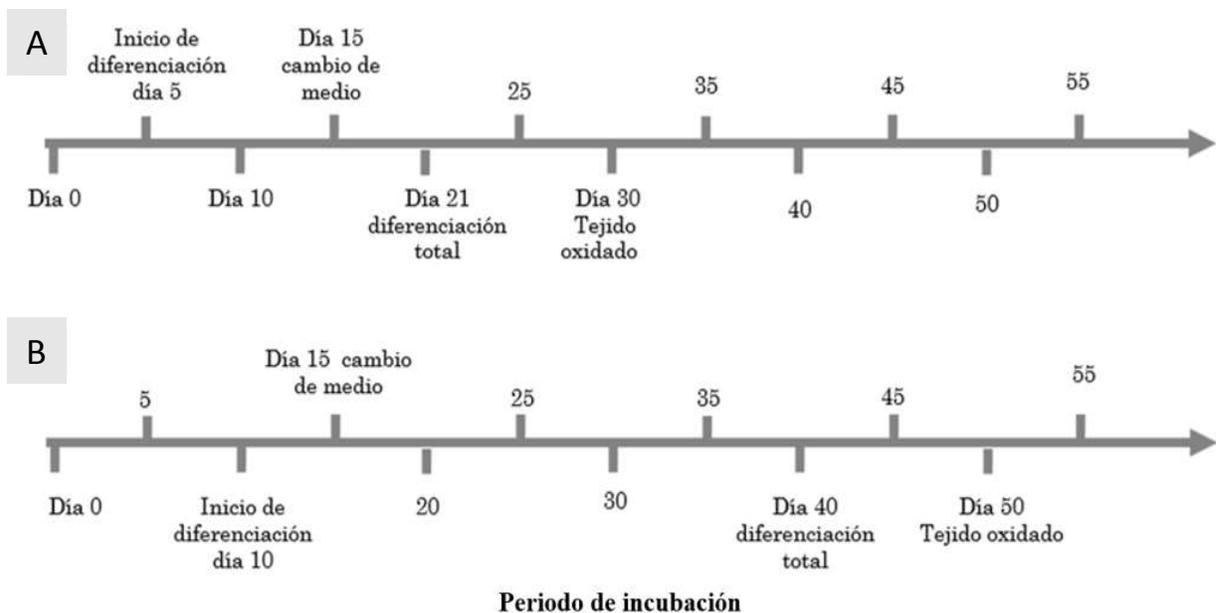


Figura 8. Evolución de la formación de callo en hoja (A) y tallo (B) de *Rubus glaucus*. En la imagen se puede observar que la desdiferenciación de tallo ocupó el doble de tiempo de la hoja.

En tallo se tuvo la callogénesis al décimo día, para tener una desdiferenciación completa hasta el día 40, en ambos tejidos se obtuvo callo con friabilidad del 100 %. Sin embargo, los explantes de hoja tuvieron mayor rapidez en la formación de callo, esto concuerda con los reportado por Devi y col., (2015), en *Leucas aspera (Willed) Linn.* donde se observó mayor capacidad de desdiferenciación celular de la hoja (79 %) en comparación con el tallo (60 %). No obstante, el uso de cotiledones como explante para la inducción de callo suele ser eficiente tal como lo evidenciaron Semiarti y col., (2017), ya que resultó más eficiente el uso de este tejido en comparación con la hoja.

Se realizaron subcultivos cada 15 días, sin embargo, tras el día 21 se observó un crecimiento lento y una pérdida considerable del tejido debido a la oxidación. La oxidación es uno de los problemas más frecuentes en los tejidos cultivados *in vitro*, esto puede generarse o incrementarse durante el proceso de escisión, limpieza, desinfección y cultivo del explante. Azofeifa (2009), recomienda la

adición de antioxidantes al medio de cultivo como ácido ascórbico y cítrico, para prevenir la pérdida importante por oxidación. Por lo que se consideró un posterior experimento para evaluar la respuesta del antioxidante por $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PVP para el mantenimiento de callo.

7.3.- Evaluación de compuestos antioxidantes en la oxidación de callo

Con el objetivo del mantenimiento de callo se realizó la evaluación de cinco tratamientos, evaluándose el porcentaje de oxidación del tejido. Dentro de los resultados se observó menor porcentaje de pérdida de tejido por oxidación tras el tratamiento con A-4 (13 %), siendo estadísticamente menor ($P \leq 0.01$) con respecto al control, que presentó una pérdida de tejido del 96 % (Figura 9).

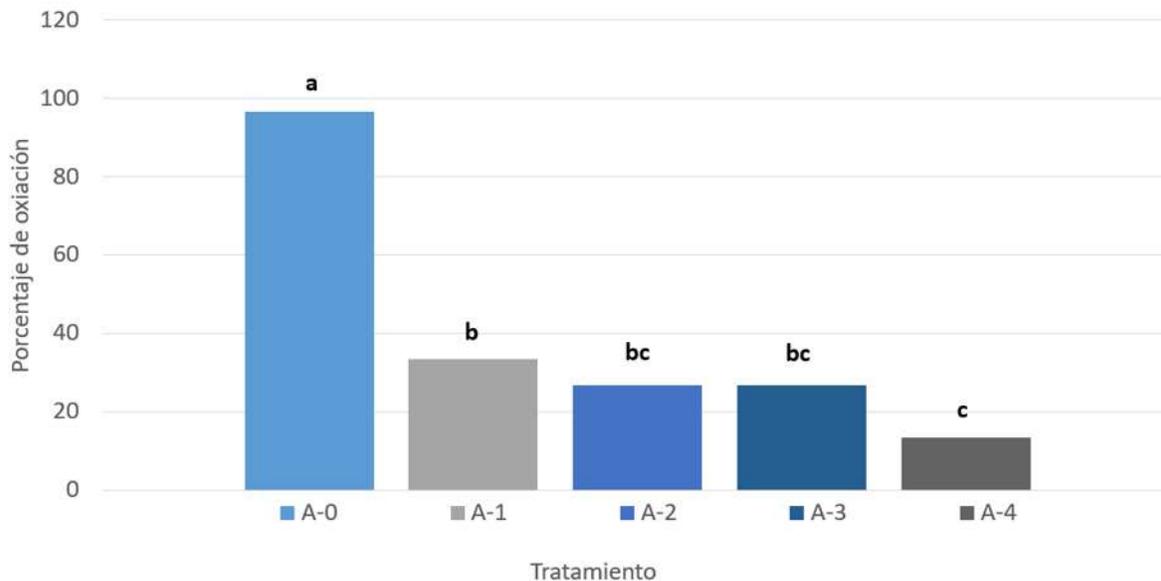


Figura 9. Porcentaje de oxidación tras la adición de diferentes antioxidantes en callo de *Rubus glaucus*. A-1) 50 mg·L⁻¹ ácido ascórbico y cítrico; A-2) 100 mg·L⁻¹ ácido ascórbico y cítrico; A-3) 50 mg·L⁻¹ ácido ascórbico y cítrico y 20 mg·L⁻¹ de cisteína; A-4) 1 g·L⁻¹ PVP. Letras iguales indica valores estadísticamente iguales entre columnas a ($P \leq 0.01$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

En contraste, el tratamiento A-4 no mostró diferencia estadística significativa ($P \leq 0.01$) con los tratamientos A-2 y A-3, sin embargo, se decidió utilizar el tratamiento A-4 (1 g·L⁻¹ de PVP) en las pruebas posteriores, ya que su efecto antioxidante se observó entre los primeros siete días de incubación, mientras A-2 y A-3 lo evidenciaron tras este tiempo. Se sabe que los tejidos indiferenciados son más susceptibles a la oxidación, ya que los procesos limpieza y de subcultivos son más frecuentes que en tejidos diferenciados; es común encontrar compuestos antioxidantes incorporados en el medio de cultivo como ácido ascórbico y cítrico, L- cisteína, PVP, al igual que AgNO₃ y en menor grado el carbón activado debido a su propiedad adsorbente (Azofeifa., 2009; Ramírez-González y col., 2015). Algunos otros factores que llegan que incrementan la oxidación de los tejidos es el tiempo de exposición al oxígeno durante las técnicas de limpieza, la posición y el

tamaño del explante, el tipo y concentración de hormonas (Singh y Patel., 2016; Lone y col., 2017).

7.4.- Proliferación de callo

Se evaluó la respuesta de la proliferación de callo ante diferentes relaciones de auxinas/citocininas con el objetivo de identificar la combinación que favorezca la acumulación de biomasa, al mismo tiempo se identificaron las fases de crecimiento celular (fase latencia, exponencial y muerte), ya que, para poder mantener la producción continua de células jóvenes, se requiere hacer subcultivos durante su fase exponencial. Con base en los resultados de crecimiento celular, se observó que las cinéticas de crecimiento del callo proveniente de hoja y tallo con relación al PF en los tratamientos P-0 y P-1 (baja concentración de auxina/citocinina) se presentó la fase de latencia entre el segundo y cuarto día, seguido de la fase exponencial hasta el día 18 para P-0 y día 14 para P-1, reportando el PF de 2.80 y 0.72 g respectivamente. En ambos tratamientos la pérdida de peso se registró posterior al día 18, lo que sugiere la muerte celular del tejido (Figura 10).

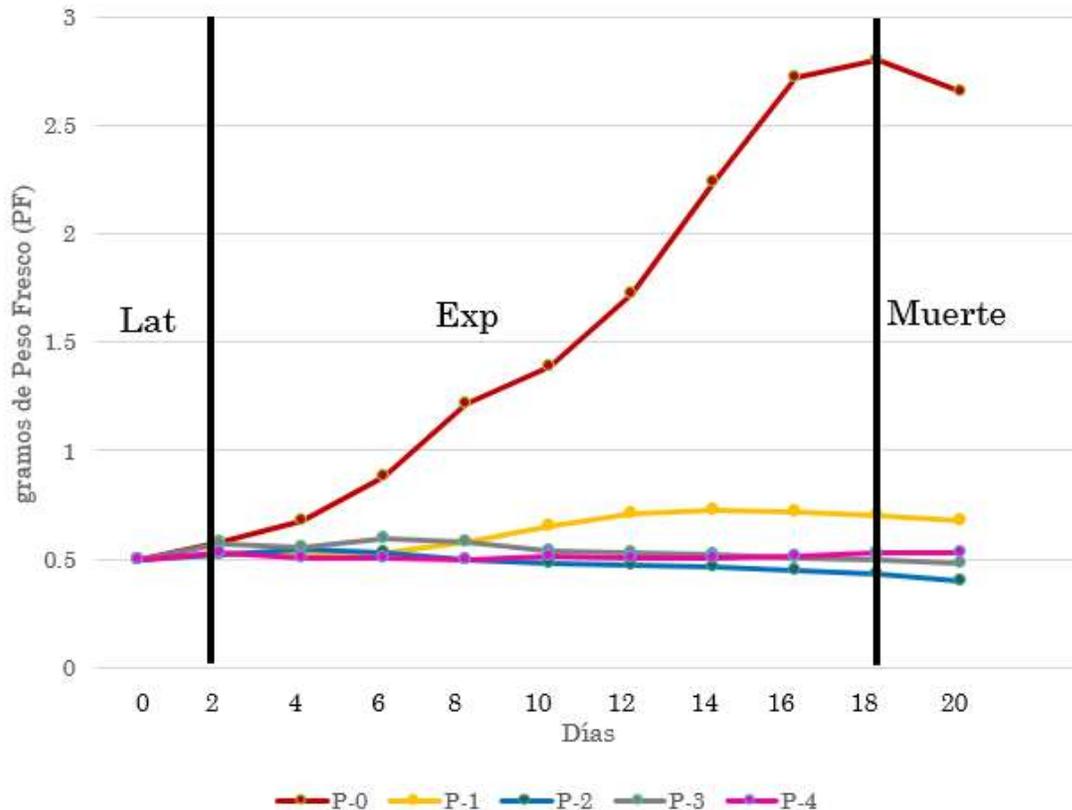


Figura 10. Cinética de crecimiento de tejido calloso proveniente de hoja de *Rubus glaucus*. P-0) 1 mg.L⁻¹ 2,4-D; P-1) 0.6 mg.L⁻¹ BA y ANA; P-2) 2 mg.L⁻¹ BA y 1 mg.L⁻¹ ANA; P-3) 2 mg.L⁻¹ BA y 1 mg.L⁻¹ 2,4 D; P-4) 1 mg.L⁻¹ BA: 0.5 mg.L⁻¹ 2,4 D.

Por otro lado, los tratamientos P-2, P-3 y P-4 mostraron un comportamiento similar, presentando la fase de latencia entre los primeros cuatro días, sin embargo, se observó la fase exponencial entre el cuarto y sexto día, obteniendo valores de PF del 0.54, 0.59, 0.53 g para P-2, P-3 y P-4, respectivamente. No obstante, se mostró una fase estacionaria que duro entre los 14 y 18 días, seguido de la pérdida de peso.

La respuesta del callo proveniente de tallo se asemejo al comportamiento del tejido obtenido de hoja, alcanzando valores de PF del 1.72, 0.68, 0.56, 0.66, 0.68 g en los tratamientos P-0, P-1, P-2, P-3 y P-4 respectivamente (Figura 11). El

tratamiento P-0, reportó mayor incremento en la masa celular, aunque la fase exponencial duró hasta el día 16, seguido de pérdida de peso.

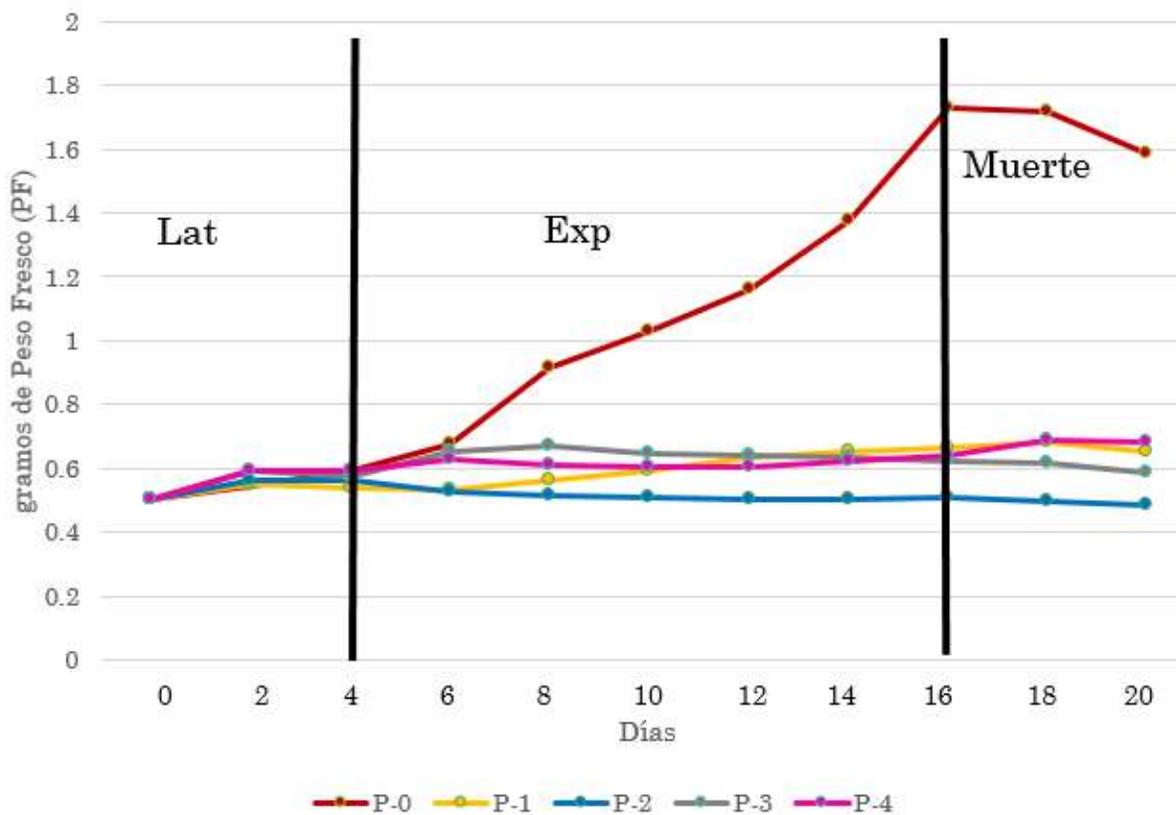


Figura 11. Cinética de crecimiento de tejido calloso proveniente de tallo de *Rubus glaucus*. P-0) 1 mg.L⁻¹ 2,4-D; P-1) 0.6 mg.L⁻¹ BA y ANA; P-2) 2 mg.L⁻¹ BA y 1 mg.L⁻¹ ANA; P-3) 2 mg.L⁻¹ BA y 1 mg.L⁻¹ 2,4 D; P-4) 1 mg.L⁻¹ BA: 0.5 mg.L⁻¹ 2,4 D.

Si bien ambos tejidos mostraron un comportamiento favorable ante el tratamiento suplementado con la auxina 2,4-D (P-0), el callo proveniente de hoja mostró incremento significativo en PF respecto al de tallo (Cuadro 8) y a los demás tratamientos.

Cuadro 8. Peso alcanzado de callo de *Rubus glaucus* en los medios para proliferación de callo

Explante	Tratamiento	Promedio de Peso Fresco (g)
Hoja	P-0	2.80 ± 0.68a
	P-1	0.72 ± 0.02 c
	P-2	0.54 ± 0.01 c
	P-3	0.59 ± 0.02 c
	P-4	0.53 ± 0.01 c
Tallo	P-0	1.72 ± 0.31 b
	P-1	0.68 ± 0.03 c
	P-2	0.56 ± 0.01 c
	P-3	0.66 ± 0.02 c
	P-4	0.68 ± 0.01 c

Letras iguales indica valores estadísticamente iguales entre columnas a $P \leq 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

La formación de tejidos indiferenciados se puede llevar a cabo a partir de varios órganos de la planta. No obstante, algunos factores pueden determinar la capacidad de un tejido específico para la formación de callo. Entre estos se encuentran el tipo, concentración y combinación de los RCV además del genotipo de la planta. Aunado a esto, los estudios reportados para la proliferación de callo en el género *Rubus* son escasos, en la inducción de callo se reportó efecto benéfico en relación auxina/citocinina alta; tal es el caso Tatjana y col. (2010) que a concentraciones de 2 mg. L⁻¹ de BA con 1 y 2 mg. L⁻¹ de 2,4 D obtuvieron callo en *Rubus fruticosus*. Al igual, Hollmann y col., (2002) mostraron en *R. strigosus* y *R. parviflorus* mejores resultados con la adición únicamente de auxinas (3 mg. L⁻¹ PIC y 1 mg. L⁻¹ de 2, 4 D, respectivamente). Del mismo modo, en células en suspensión de *R. adenotrichus* se observó mejor proliferación con 1.5 mg. L⁻¹ de

2, 4 D (Schmidt-Durán, y col., 2016), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Con base en el análisis de crecimiento de callo, se determinó que ambos tejidos responden de manera distinta, ya que los callos obtenidos de hoja tuvieron mayor aumento de masa, lo que indica una mayor velocidad de crecimiento, además requieren ser subcultivados entre el día 16 y 18, mientras que para los callos obtenidos de tallo son favorables en periodos más cortos (entre el día 14 y 16).

7.5.- Evaluación del polivinilo pirrolidona

Debido a que el PVP es un antioxidante que ha demostrado su afinidad por compuestos fenólicos, se evaluaron cinco tratamientos formulados como se describe en el apartado correspondiente de materiales y métodos (6.6); esto tuvo como objetivo verificar que el PVP no interfiriera con la acumulación de polifenoles en tejido calloso. Con base en los resultados, se observó que los medios con adición de ácido gálico presentaron un ligero oscurecimiento (Figura 12 B-E). Es importante mencionar que el tratamiento CP-5 presentó necrosis de tejido (Figura 12 F) a los primeros 7 días de incubación, tiempo limitante para su análisis, por lo que no se incluye en la Figura 13.

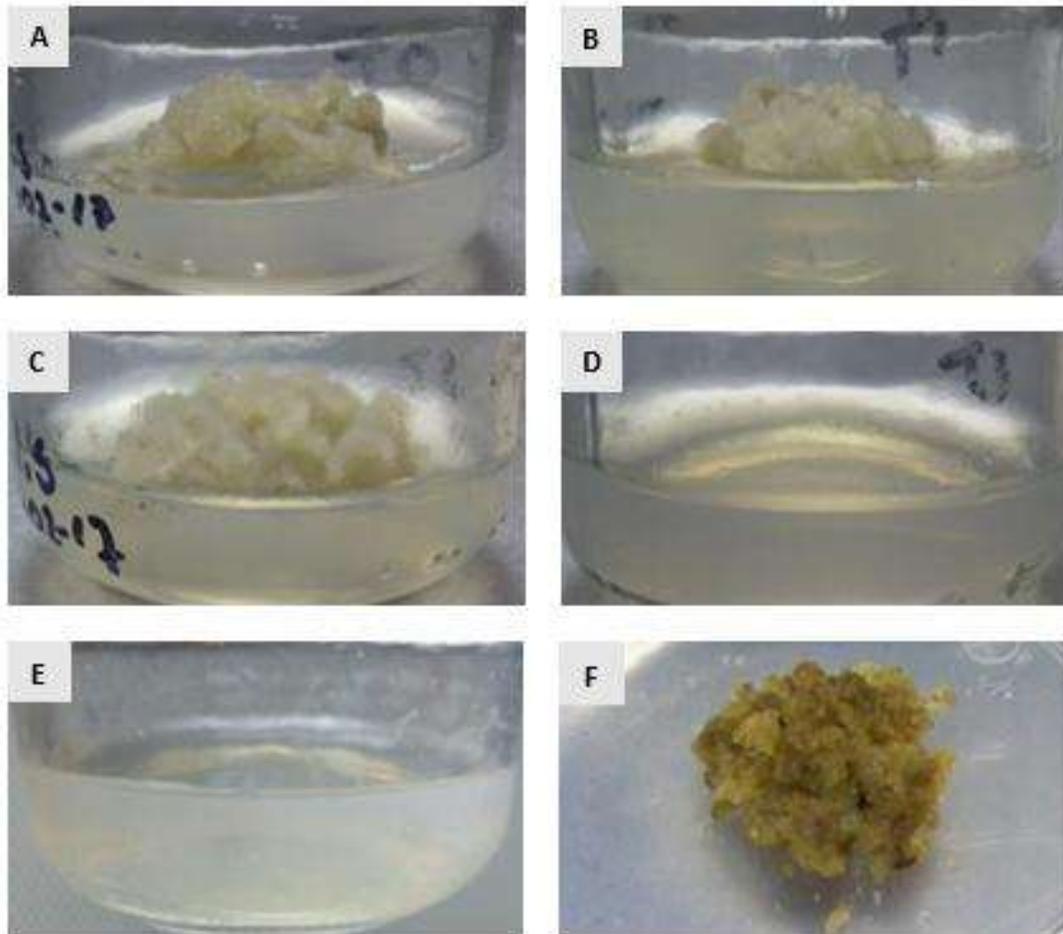


Figura 12. Medios y callos de *Rubus glaucus*, tras 15 días de incubación. A) CP-0 (control); B) CP-1 (PVP + callo + ácido gálico); C) CP-2 (callo + ácido gálico); D) CP-3 (PVP + ácido gálico); E) CP-4 (PVP); F) CP-5 (callo sin antioxidantes).

Tras los tratamientos, en los medios se detectaron niveles de compuestos fenólicos que van de 0.01 a 0.36 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto, sin mostrar diferencias significativas entre ellas (Figura 13). En contraste, el contenido de polifenoles en callos, reportó valores de 32.15, 40.65, 72.27 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto, para los tratamientos CP-2C, CP-0C (control) y CP-1C respectivamente, siendo este último quien mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos, que respecto al control (40.65 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto) incremento un 77 %.

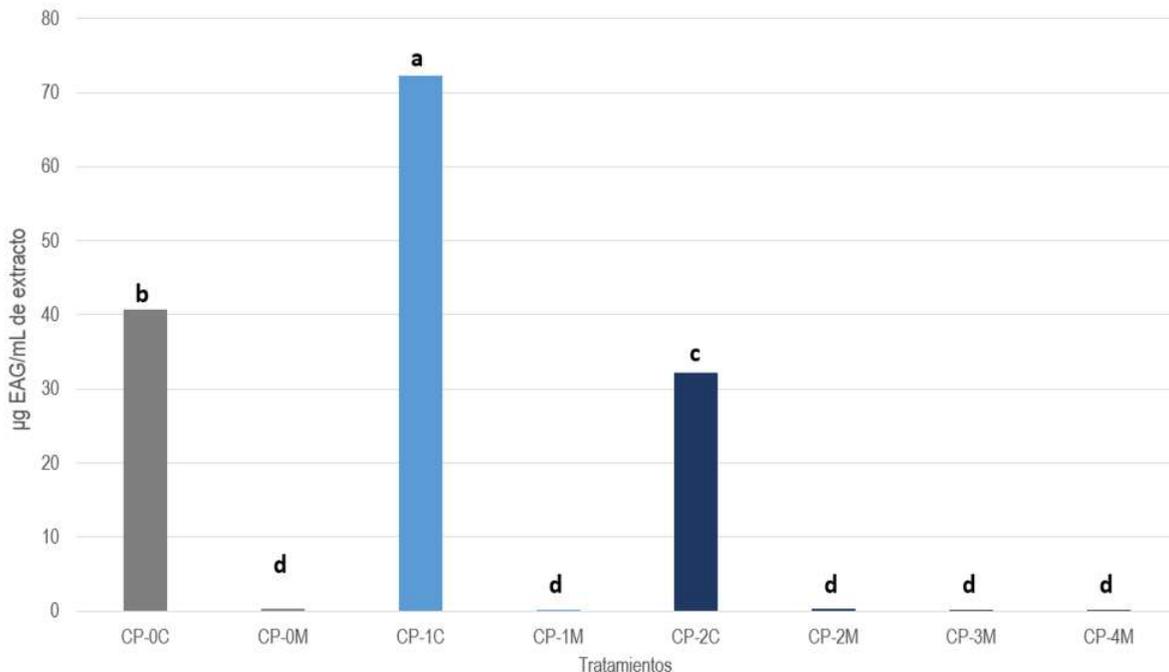


Figura 13. Cuantificación de polifenoles en medios y callos de *Rubus glaucus*, tras 15 días de incubación. CP-0 (control); CP-1 (PVP + callo + ácido gálico; CP-2 (callo + ácido gálico); CP-3 (PVP + ácido gálico); CP-4 (PVP). Letras iguales indica valores estadísticamente iguales a $P \leq 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

El tratamiento CP-1 consistió en callos colocados en medio suplementado con $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PVP y ácido gálico durante 15 días. El PVP es comúnmente utilizado en el cultivo *in vitro* para controlar la oxidación de diferentes tejidos; en medio de cultivo la concentración recomendada va de $0.05 - 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Azofeifa., 2009), y debido a su afinidad por lo compuesto fenólicos ha sido incorporado a la industria vinícola como agente clarificante (Badui, 2006).

Por otro lado, el ácido gálico es un ácido fenólico que posee la estructura básica de los taninos hidrolizables; estudios recientes han mostrado su potencial antioxidante, anticarcinogénico y bactericida (Zugasti y col., 2013). Si bien, se ha demostrado el uso de moléculas precursoras para la síntesis de compuestos más complejos, tal como es el caso de la fenilalanina en la inducción de antocianinas (Edahiro y col., 2005), por lo que los resultados de la presente investigación

sugieren que el ácido gálico podría ser incorporado a la maquinaria metabólica del tejido calloso y actuar como un precursor, hasta los alcances de la investigación, no se ningún reporte que evidencie este comportamiento.

7.6.- Estimulación de polifenoles

La estimulación de polifenoles se realizó en callos provenientes de dos tipos de tejido, hoja y tallo; ambos fueron sometidos a 18 tratamientos distintos formulados con diferentes concentraciones de sacarosa (15, 30 y 60 g•L⁻¹), nitrato de potasio (0, 1, 2) y sales minerales (50 y 100 %).

El callo proveniente de hoja mostró valores entre 180.36 – 841.82 µg EAG•g⁻¹ de PF (Figura 14). El tratamiento M-7 obtuvo la mayor acumulación de polifenoles con 841.82 ± 3.59 µg EAG•g⁻¹ de PF, con un incremento de 4 veces más respecto al control (M-15) que reportó 220.69 ± 2.24 µg EAG•g⁻¹ de PF. Por otro lado, se registraron valores estadísticamente menores con respecto al control, este es el caso del tratamiento M-2 con 180.36 ± 3.88 µg EAG•g⁻¹ de PF respectivamente, siendo el valor significativas menor, en contraste con los demás tratamientos.

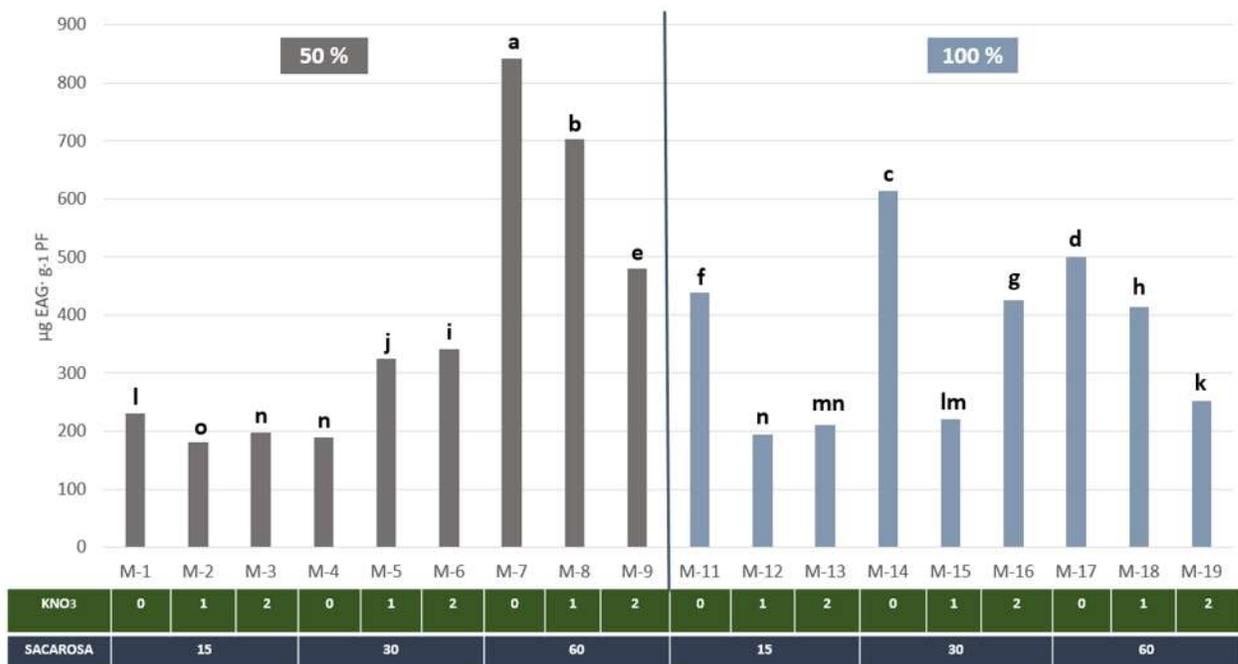


Figura 14. Comparación del contenido de polifenoles en extractos de callo estimulado proveniente de hoja de *Rubus glaucus*. Letras iguales indica valores estadísticamente iguales a $P \leq 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

Con respecto al callo proveniente de tallo se mostraron valores entre 71.25 – 788.74 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF en los distintos tratamientos (Figura 15). Sin embargo, se observó mayor acumulación de polifenoles en el tratamiento M-14 con $788.74 \pm 3.94 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF, con esos resultados se registraron incrementos entre 2 y 3 veces con respecto al control reportando $253.60 \pm 6.63 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF. Por otro lado, al igual que el callo proveniente de hoja se observaron valores significativamente menores destacando el tratamiento M-2 con $71.25 \pm 2.86 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF.

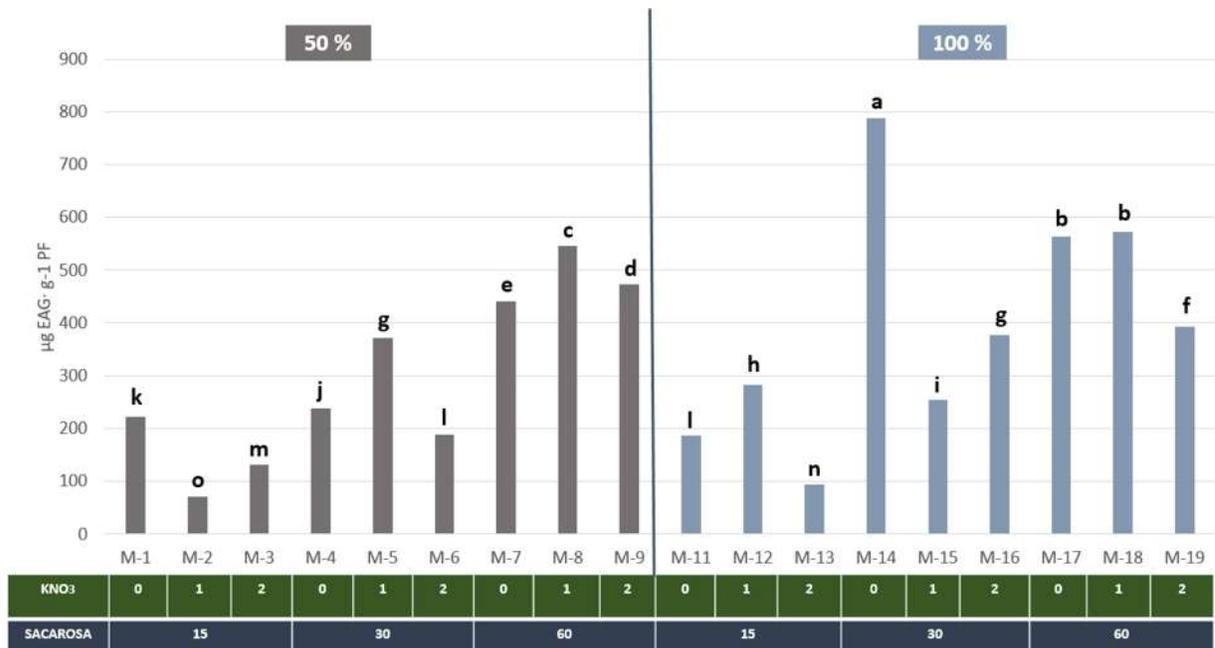


Figura 15. Comparación del contenido de polifenoles en extractos de callo estimulado proveniente de tallo de *Rubus glaucus*. Letras iguales indica valores estadísticamente iguales a $P \leq 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

En los resultados obtenidos en este trabajo se observó la influencia positiva que tiene la interacción de los factores de sacarosa, nitrato de potasio y sales minerales en la acumulación de polifenoles; fue clara la tendencia de acumulación de polifenoles tras los tratamientos con altas concentraciones de sacarosa y baja de nitrato de potasio (Anexo, apéndice uno y dos).

Los resultados obtenidos en ambos tejidos superan lo reportado por Schmidt-Durán, y col., (2016), en suspensiones celulares de *R. adenotrichus* cuya acumulación de polifenoles fue de $25.6 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF. A su vez, Silva y col., (2007) sugieren que la mecánica biosintética de los polifenoles se encuentra más acelerada en las hojas que en el tallo, esto debido a la exposición a múltiples factores ambientales, lo que concuerda con la distinta respuesta de callos provenientes de hoja y tallo ante los múltiples estímulos.

Aunado a lo anterior, el contenido de polifenoles se incrementó en ambos tejidos, con la ausencia de KNO_3 , esto difiere con lo reportado por Simões y col., (2009), ya que la proporciones de 1:4 de NH_4NO_3 : KNO_3 generó mayor acumulación de antocianinas duplicando el contenido con respecto al control ($14 \text{ cv}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) en callo de *Cleoma roseae*. Por lo que, el mecanismo de respuesta ante diversos estímulos está sujeto al género y especie con que se esté trabajando. Si bien no existen reportes de la respuesta de polifenoles ante las variaciones del nitrógeno en callo del género *Rubus*, en el caso de las plantas, el exceso de nitrógeno promueve la formación de brotes con un excesivo desarrollo vegetativo, mientras que el color del fruto disminuye y se retrasa su maduración (Sánchez, 2009). Esto concuerda con lo reportado en cultivos de *Rubus fruticosus* L, donde se encontró mayor acumulación de polifenoles ($17.71\text{-}20.77 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) tras tratamientos con bajo niveles de nitrógeno (Ali y col., 2012); este comportamiento también se ha reportado en arándano donde, mostraron mayor acumulación de antocianinas a concentraciones bajas de nitrógeno (Albert y col., 2011). En contraste, Åkerström y col., (2009) mencionaron que no existen diferencias significativas de la acumulación de antocianinas con 12.5 y $50.0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, de $\text{NH}_4 \text{ NO}_3$ en la misma especie.

Por otra parte, Simões y col. (2009) reportaron un incremento del 110 % en el contenido de antocianinas en callo de *Cleome roseae* colocados en medio MS suplementado con 70 g /L de sacarosa. De igual manera en callo *Rosa hibrida* se obtuvo un aumento de treinta y cuatro veces más con 7 % de sacarosa (Ram y col., 2011), esto concuerda con lo obtenido en el presente trabajo, ya que la mayor acumulación de polifenoles fue reportada tras la exposición a las altas concentraciones de sacarosa ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). No obstante, se encuentra por debajo de los incrementos obtenidos en este trabajo. Se sabe que en el cultivo *in vitro* la adición de una fuente de carbono es esencial e indispensable; usualmente la más implementada es la sacarosa cuyas concentraciones van del 2 al 4 % (p/v) (Trigiano y col., 2011). Sin embargo, el uso de altas concentraciones de sacarosa, ha mostrado un efecto osmótico, influyendo sobre la producción de metabolitos fenólicos en cultivos *in vitro*, tal como se muestra en el presente trabajo.

7.7.- Acumulación de peso fresco

Durante el proceso de estimulación de polifenoles se registró el peso fresco (PF) alcanzado en callos proveniente de hoja y tallo, con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos en la acumulación de biomasa y el día en que termina la fase exponencial. Para esto, ambos tejidos fueron sometidos a 18 tratamientos distintos, formulado con diferentes concentraciones de sacarosa (15, 30 y 60 g•L⁻¹) nitrato de potasio (0, 1, 2) y sales minerales (50 y 100 %).

Con base en los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento para el callo proveniente de hoja se mostró que todos los tratamientos iniciaron la fase exponencial al día 2; el término de la fase exponencial se percibió entre los días 6 y 24 (Figura 16). Los tratamientos con concentraciones basales de nitrato de potasio y sales minerales de 50 %, fueron las fases exponenciales más largas (M-2, M-5), mientras los periodos más cortos (M-13, M-19) se encontraron con altas proporciones de nitrato de potasio y sales minerales al 100 %.

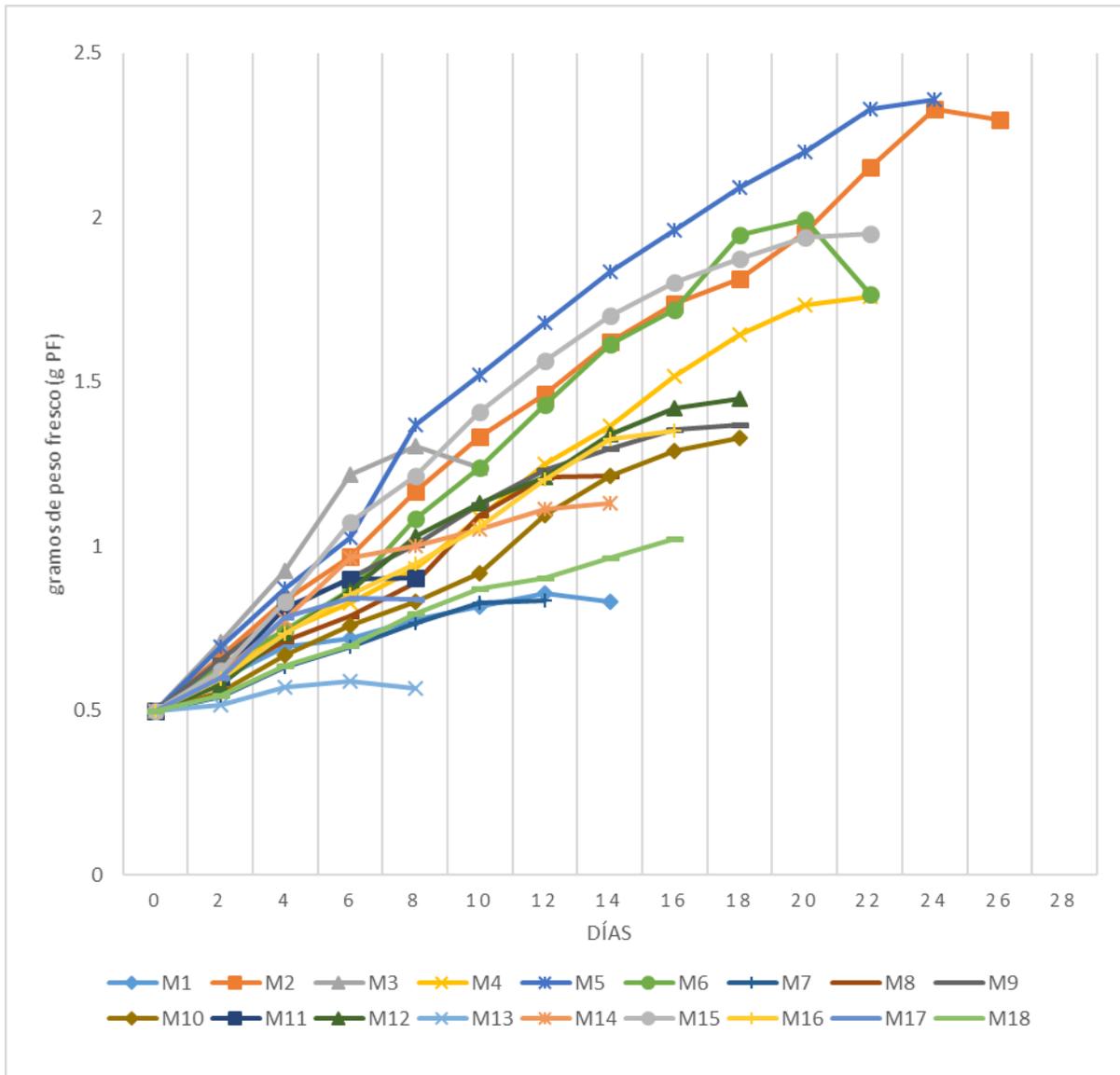


Figura 16. Cinéticas de crecimiento de callo proveniente de hoja de *Rubus glaucus* obtenidas tras los 18 tratamientos.

Respecto a los datos registrados de peso fresco, en los callos de hoja se observaron valores entre 0.58-2.35 g PF (Cuadro 9). Los tratamientos M-2 y M-5 exhibieron los valores significativamente más altos, incrementando un 25 % PF con respecto al control (1.87 ± 0.2 g), en este caso ambos tratamientos alcanzaron este peso al día 24. En contraste, el tratamiento M-13, al día 6, reportó 0.58 ± 0.03 g, el cual fue el valor estadísticamente más bajo.

Cuadro 9. Acumulación de peso fresco y día de término de la fase exponencial de callo proveniente de hoja y tallo tras los 18 tratamientos.

Tratamiento	Callo proveniente de hoja		Callo proveniente de tallo	
	Peso fresco (g)	Término de la fase exponencial (día)	Peso fresco (g)	Término de la fase exponencial (día)
M-1	0.85 ± 0.01 f	12	1.09 ± 0.03 de	12
M-2	2.32 ± 0.04 a	24	1.96 ± 0.04 ab	24
M-3	1.30 ± 0.01 dc	8	2.15 ± 0.03 ab	24
M-4	1.75 ± 0.01 b	22	1.07 ± 0.08 de	12
M-5	2.35 ± 0.13 a	24	1.71 ± 0.06 bc	20
M-6	1.94 ± 0.1 b	18	2.03 ± 0.04 ab	22
M-7	0.83 ± 0.01 f	12	0.82 ± 0.01 e	10
M-8	1.21 ± 0.02 dc	16	1.02 ± 0.6 de	16
M-9	1.36 ± 0.1 dc	18	1.08 ± 0.06 de	12
M-11	0.90 ± 0.09 ef	8	0.81 ± 0.05 e	8
M-12	1.45 ± 0.06 c	18	1.80 ± 0.13 ab	20
M-13	0.58 ± 0.03 g	6	2.28 ± 0.26 a	24
M-14	1.13 ± 0.18 de	16	1.34 ± 0.02 cd	18
M-15	1.87 ± 0.2 b	22	1.73 ± 0.15 bc	24
M-16	1.35 ± 0.24 dc	16	1.14 ± 0.02 de	12
M-17	0.84 ± 0.07 f	6	0.76 ± 0.02 e	6
M-18	1.95 ± 0.01 b	22	1.19 ± 0.07 de	16
M-19	0.71 ± 0.04 fg	6	0.94 ± 0.03 de	14

Letras iguales indica valores estadísticamente iguales entre columnas a $P \leq 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

Las cinéticas de crecimiento para los callos provenientes de tallo, mostraron mayor influencia ante las variaciones de sacarosas y nitratos. Los tratamientos con concentraciones altas de nitrato de amonio: nitrato de potasio y bajo contenido de sacarosa (15 g. L⁻¹), presentaron las fases exponenciales hasta de 24 días, (M-3, M-13, M-15), en contraste los periodos más cortos se encontraron entre el día 6 y 8 (M-11, M-17) tras nulo contenido de nitrato de potasio (Figura 17).

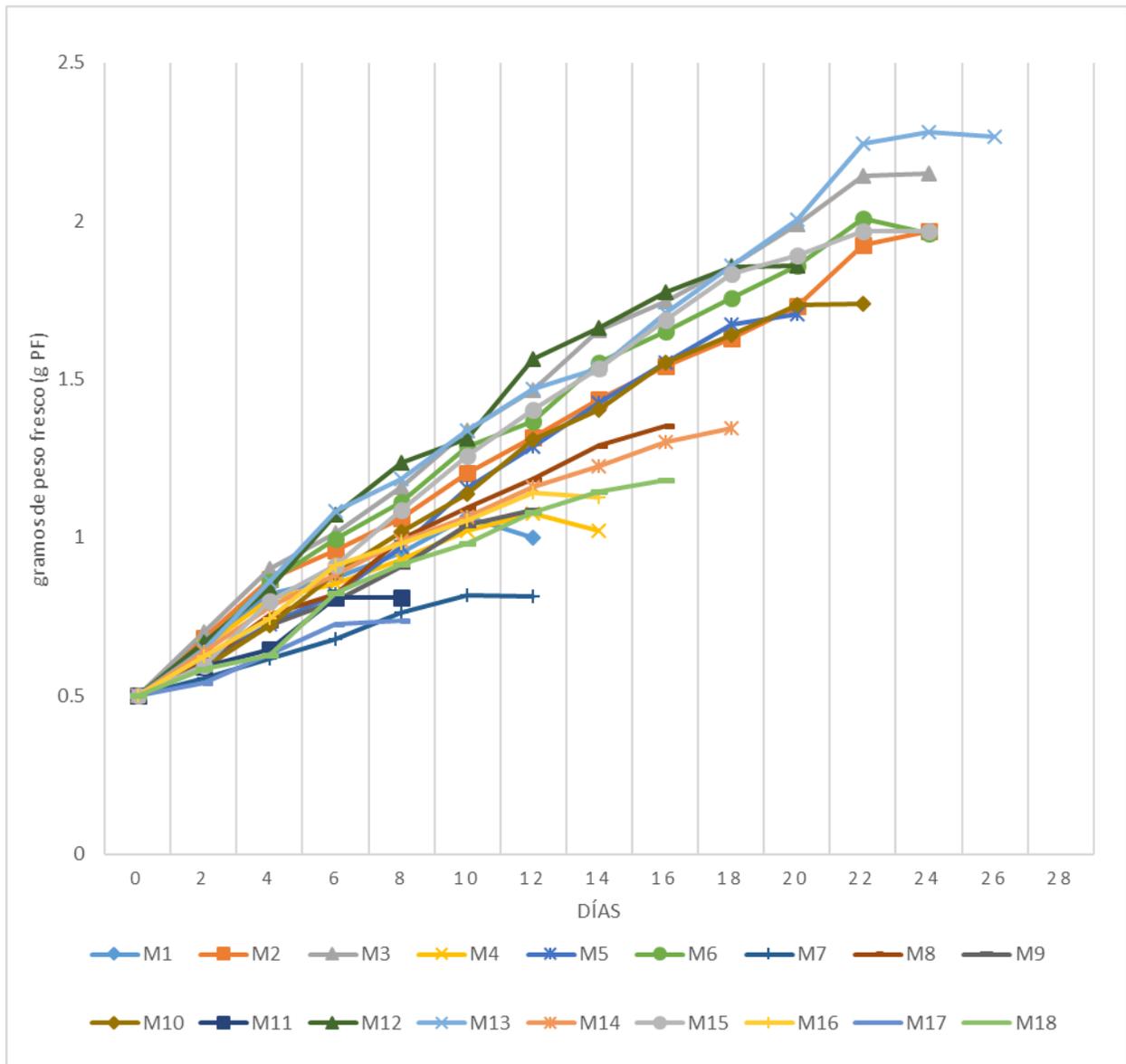


Figura 17. Cinéticas de crecimiento de callo proveniente de tallo de *Rubus glaucus* obtenidas tras los 18 tratamientos.

El peso fresco de callos de tallo, mostraron valores entre 0.76 -2.27 g PF, siendo el tratamiento M-13, quien reportó el valor estadísticamente más alto, incrementando un 23 % respecto al control, a su vez el tratamiento M-17 mostró la menor acumulación de biomasa, terminando su fase exponencial al día 6 (Cuadro 11). El uso de las variaciones de sacarosa, nitrato de potasio y sales minerales se evidenció influencia positiva sobre la acumulación de biomasa (PF).

Los resultados obtenidos de acumulación de masa concuerdan con los reportado con Fazal y col., (2016), reportaron en células en suspensión de *Prunella vulgaris* L. un incremento de biomasa del 19 % con tratamientos con 20 g·L⁻¹ de sacarosa. Por otro lado, en suspensiones celulares de *Withania somnifera* los valores óptimos para acumulación de biomasa se distinguió con 30 g·L⁻¹ (Nagella y Murthy 2010), este mismo comportamiento se vio en callo de *R. sachalinensis*, donde, también se evaluó la dilución de sales minerales y se estableció como mejor tratamiento una concentración del 100 % de medio MS (Li y col., 2016). En contraste, Martínez-Villegas y col., (2015), obtuvieron decrementos del 50 % de biomasa con sales diluidas a un 25 % de medio MS en plántulas de *Euphorbia leucocephala* Lotsy,

Los estudios de evaluación sobre la acumulación de biomasa en el género *Rubus*, son escaso, no obstante la restricción nutrimental ha resultado como un técnica eficiente sobre el control del crecimiento del cultivo celulares y la acumulación de metabolitos secundarios (Rao y Ravishankar 2002), tal y como se evidenció en esta investigación. Esto puede explicarse como una deficiencia de nutrientes y/o estrés osmótico en altas concentraciones de sales (Yin y col., 2013).

Debido a que se percibió que el callo proveniente de hoja presento mayor acumulación de biomasa, se realizó un análisis de correlación entre la respuesta de ambos tejidos y se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson R= 0.38, siendo estadísticamente significativa ($p < 0.01$); lo que indicó una relación positiva débil, entre la respuesta de la acumulación de biomasa en ambos tejidos ante los diferentes tratamientos. Por lo que, se puede deducir que la respuesta de la acumulación de masa está influencia por el origen de tejido.

Adicional a esto, se determinó correlación de Pearson para el contenido de polifenoles y la masa acumulada; para las variables obtenidas de callo de hoja de $R = -0.30$, en contraste el tallo presentó $R = -0.542$, ambas estadísticamente significativas ($P \leq 0.01$). Con base en estos resultados se encontró una correlación negativa mediana entre la acumulación de polifenoles y biomasa, es decir que la producción de polifenoles es medianamente inversa a la acumulación de peso fresco.

Por otro lado, Murthy y col., (2014) mencionaron que la acumulación de biomasa y la síntesis de metabolitos por cultivos celulares, son procesos que se basan inicialmente en células que son cultivadas, promoviendo el crecimiento, la multiplicación y la acumulación de biomasa y en segundo plano, la síntesis de metabolitos de la biomasa. Con esto, es posible mejorar la acumulación de biomasa y del metabolito (Anexo 2).

7.8.- Determinación de flavonoides totales y actividad antioxidante

Se determinó la concentración flavonoides de los extractos provenientes de hoja y tallo tras los 18 tratamientos, al igual que la capacidad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS y FRAP. Los resultados de flavonoides en extractos de callos provenientes de hoja, reportaron valores que van de 17.84 a 47.04 $\mu\text{g EQ}\cdot\text{g}^{-1}$ PF (Cuadro 14); siendo el tratamiento M-2 quien presentó la mayor acumulación de flavonoides ($47.04 \pm 0.32 \mu\text{g EQ}\cdot\text{g}^{-1}$, PF), aumentando la acumulación de flavonoides en un 165 % con respecto al control, que evidenció estadísticamente el menor contenido de flavonoides ($17.84 \pm 0.92 \mu\text{g EQ}\cdot\text{g}^{-1}$ PF).

La concentración de flavonoides en callo proveniente de tallo, mostró valores entre 6.95 a 55.48 $\mu\text{g EQ}\cdot\text{g}^{-1}$ PF (Cuadro 10), siendo el tratamiento M-7 quien tuvo el mayor contenido de flavonoides obteniendo un incremento del 265 %, respecto al control.

Cuadro 10. Cuantificación de polifenoles totales y flavonoides totales de 18 tratamientos en callo de hoja y tallo de *Rubus glaucus*

Tratamiento	Callo proveniente de hoja		Callo proveniente de tallo	
	Polifenoles totales	Flavonoides totales	Polifenoles totales	Flavonoides totales
	$\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ PF	$\mu\text{g EQ}\cdot\text{g}^{-1}$ PF	$\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ PF	$\mu\text{g EQ}\cdot\text{g}^{-1}$ PF
M-1	230.52 \pm 5.52 l	44.36 \pm 0.52 ab	222.82 \pm 7.89 k	17.46 \pm 0.76 i
M-2	180 \pm 3.88 o	47.04 \pm 0.32 a	71.25 \pm 2.88 o	10.44 \pm 0.60 l
M-3	198 \pm 8.80 n	28.84 \pm 1.88 h	130.86 \pm 3.12 m	6.95 \pm 0.96 m
M-4	190 \pm 1.84 n	40.80 \pm 1.20 cd	237.93 \pm 5.21 j	24.50 \pm 0.63 hi
M-5	324.80 \pm 3.12 j	36.24 \pm 0.32 efg	371.75 \pm 5.79 g	46.26 \pm 0.82 d
M-6	341.80 \pm 2.88 i	39.52 \pm 1.28 de	188.99 \pm 1.35 l	24.94 \pm 0.62 ghi
M-7	841.82 \pm 3.59 a	36.60 \pm 1.22 ef	440.74 \pm 1.44 e	55.48 \pm 1.27 a
M-8	702.50 \pm 3.83 b	39.64 \pm 0.90 de	545.24 \pm 3.79 c	13.81 \pm 1.29 k
M-9	480.10 \pm 1.89 e	43.24 \pm 0.33 bc	472.35 \pm 3.43 d	22.75 \pm 2.13 i
M-11	438.40 \pm 2.32 f	33.10 \pm 1.89 g	185.73 \pm 1.77 l	27.51 \pm 0.40 g
M-12	194.2 \pm 2.16 n	20.36 \pm 1.27 kl	282.98 \pm 4.73 h	35.69 \pm 0.75 e
M-13	210.32 \pm 4.47 mn	21.08 \pm 1.90 jkl	93.26 \pm 8.45 n	30.56 \pm 0.85 f
M-14	613.41 \pm 3.04 c	21.32 \pm 1.24 jk	788.74 \pm 3.94 a	50.21 \pm 0.82 bc
M-15	220.69 \pm 2.24 lm	17.84 \pm 0.92 l	253.60 \pm 6.63 i	15.18 \pm 0.60 jk
M-16	426.08 \pm 3.79 g	24.08 \pm 0.69 ij	377.43 \pm 4.27 g	45.27 \pm 0.9 d
M-17	499.51 \pm 1.35 d	20.16 \pm 1.04 kl	563.57 \pm 2.71 b	26.31 \pm 0.41 hg
M-18	413.13 \pm 2.13 h	33.84 \pm 0.45 fg	572.35 \pm 6.09 b	52.77 \pm 0.80 ab
M-19	252.16 \pm 2.23 k	24.80 \pm 1.48 i	392.85 \pm 1.29 f	47.85 \pm 1.27 cd

Letras iguales indica valores estadísticamente iguales entre columnas a $P \leq 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

En los resultados del presente trabajo se observó que el callo proveniente de tallo presentó mayor acumulación de flavonoides al tratarlos con altos contenidos de sacarosa y bajos de nitrato (M-7, M-14, M-18), mientras el proveniente de hoja, respondió mejor a tratamientos con bajo contenido de sacarosa y 50 % de dilución de sales minerales (M-1, M-2).

En contraste a los resultados obtenidos, Li y col., (2016) mostraron en callos de *R. sachalinesis*, que la productividad más alta de flavonoides se registró con 30 g•L⁻¹ de sacarosa teniendo incrementos del 20 % de flavonoides totales. Sin embargo, la mayor acumulación de polifenoles totales se encontró con 50 g•L⁻¹ sacarosa. En este mismo estudio se evaluó la concentración de sales minerales, dentro de lo que se observó, una mayor acumulación de flavonoides con 100 % MS, y de polifenoles totales con 50 % MS. Por otro lado, Fazal y col., (2016), en células en suspensión de *Prunella vulgaris* L reportaron mayor cuantificación de flavonoides con valores de 25 g•L⁻¹ de sacarosa, pero la mayor acumulación de polifenoles resultó con 20 g•L⁻¹ de sacarosa, con incrementos del 68 % de polifenoles totales y 15 % de flavonoides. No obstante, el cultivo de raíces adventicias de *Eurycoma longifolia* bajo proporciones de 45:0 de NH₄⁺: NO₃, mostró mayor acumulación de polifenoles, flavonoides e inhibición del radical DPPH en un 47 %, siendo directamente proporcional al contenido de polifenoles (Lulu y col., 2015). Por otro lado, en suspensiones celulares de *Scrophularia kakudensis* estimulados con 200 μM de jasmonato de metilo obtuvo 9 μg EQ•mg⁻¹ PF, e inhibió el 25 % del radical DPPH. Dentro de este mismo contexto, se sabe que la respuesta de acumulación de compuestos fenólicos está comprometida por la especie en estudio.

Con base en los resultados obtenidos, se realizaron diversos análisis de correlación entre la acumulación de polifenoles y flavonoides en ambos tejidos. Se obtuvo una correlación de Pearson de R=0.06, para la correlación de los parámetros evaluados de hoja; mientras para tallo R=0.55 siendo significativa ($P \leq 0.01$).

En el tejido proveniente de tallo evidenció una relación positiva media entre ambas variables, no empatando con la tendencia del callo de hoja. Con esto se muestra que la acumulación de flavonoides no está estrechamente en relación con la cantidad de polifenoles presentes en extractos de callo. Esto difiere con lo expuesto por Reyes-Carmona y col., (2006), con correlaciones significativamente altas ($R= 0.92$) entre el contenido de antocianinas y polifenoles totales en extractos de zarzamoras.

Tras estos fundamentos, se sugiere un comportamiento diferente entre ambos tejidos para la acumulación de compuestos, al igual que, los tratamientos implementados estimulan compuestos que no son de carácter flavonoide.

En el caso de la correlación entre la acumulación de polifenoles en ambos tejidos se encontró, una $R=0.70$ siendo estadísticamente significativa ($P \leq 0.01$), mientras que para flavonoides $R=0.27$. Esto demuestra que la respuesta en la producción de polifenoles en ambos tejidos esta considerablemente correlacionada, no así los flavonoides, que mostró una relación débil. Con esto, se apoya la hipótesis, donde el origen del tejido seleccionado para la inducción de callo influye sobre la acumulación de compuestos fenólicos en callo de *Rubus glaucus*, esto podría indicar que los tejidos indiferenciados guardan la memoria bioquímica de su tejido de origen.

En el caso de la AA, se observaron valores muy similares en las tres técnicas (Cuadro 11), en el caso de los extractos de callo de hoja, se observó mayor AA en la técnica DPPH, el mayor porcentaje de captación fue el tratamiento M-8 con un $75.27 \pm 0.39 \%$. En contraste, el menor efecto lo reportó el control, sin mostrar diferencias significativas con el tratamiento M-1, quien tuvo la menor inhibición del radical. Mientras para la técnica ABTS, el mayor porcentaje de captación fue el tratamiento M-7 con un $96.39 \pm 0.56 \%$, incrementado su AA 3 veces más que el control ($28.57 \pm 0.42 \%$). De igual manera, el método FRAP mostró que el tratamiento M-8 presentó mayor capacidad de reducción ($56.99 \pm 2.98 \mu\text{g EAG}\cdot\text{mL}^{-1}$), mientras que el tratamiento M-12 fue estadísticamente el más bajo ($15.96 \pm 0.52 \mu\text{g EAG}\cdot\text{mL}^{-1}$).

En contra parte, los extractos de callo proveniente de tallo para la técnica DPPH, evidenciaron al tratamiento M-5 con mayor AA ($64.08 \pm 0.26 \%$), incrementando dos veces su potencial neutralizante con respecto del control ($27.22 \pm 0.19 \%$). En cambio, en los resultados encontrados para la captación de ABTS, el tratamiento M-17 exhibió $72.13 \pm 0.37 \%$ de inhibición, mientras que el tratamiento M-13 y M-2, registraron los valores estadísticamente menores, sin mostrar diferencias significativas entre ellas. De igual manera, el tratamiento M-17 reportó el mismo comportamiento por la metodología FRAP con el valor estadísticamente mayor ($48.21 \pm 0.61 \mu\text{g EAG}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto).

Cuadro 11. Resultados obtenidos de la AA de mediante DPPH, ABTS y FRAP, en extractos de callo proveniente de hoja y tallo

Tratamiento	Callo proveniente de hoja				Callo proveniente de tallo				
	% de inhibición de DPPH	% de inhibición de ABTS	µg EAG· mL ⁻¹ de extracto FRAP	% de inhibición de DPPH	% de inhibición de ABTS	µg EAG· mL ⁻¹ de extracto FRAP	% de inhibición de DPPH	% de inhibición de ABTS	µg EAG· mL ⁻¹ de extracto FRAP
M-1	12.85 ± 0.52 l	28.47 ± 0.3 k	16.25 ± 0.61 l	13.41 ± 0.31 j	32.30 ± 0.96 l	16.03 ± 0.74 h			
M-2	42.21 ± 0.52 e	52.65 ± 0.25 e	32.25 ± 3.70 e	3.28 ± 0.22 m	15.63 ± 0.59 n	7.54 ± 0.56 k			
M-3	14.04 ± 0.41 kl	27.06 ± 0.7 k	21.59 ± 1.16 h	2.17 ± 0.50 n	19.13 ± 0.20 m	6.97 ± 0.09 k			
M-4	38.24 ± 0.44 f	44.04 ± 0.85 g	31.70 ± 3.25 ef	12.20 ± 0.59 k	31.21 ± 0.42 ij	13.02 ± 0.41 l			
M-5	34.31 ± 0.50 h	36.41 ± 0.53 l	27.02 ± 0.73 fg	64.08 ± 0.26 a	61.84 ± 0.45 b	45.65 ± 0.7 b			
M-6	25.41 ± 0.58 j	34.82 ± 0.7 ij	26.86 ± 1.33 fg	9.04 ± 0.33 l	23.05 ± 0.87 l	9.87 ± 0.25 j			
M-7	53.39 ± 0.54 b	96.39 ± 0.56 a	50.64 ± 1.47 b	33.26 ± 0.29 h	49.78 ± 0.57 f	25.67 ± 0.79 g			
M-8	75.27 ± 0.39 a	82.90 ± 0.56 b	56.99 ± 2.98 a	58.04 ± 0.22 b	58.47 ± 0.33 d	38.46 ± 0.37 d			
M-9	48.01 ± 0.89 d	55.30 ± 0.67 d	38.10 ± 0.18 cd	52.28 ± 0.11 b	52.43 ± 0.48	36.08 ± 0.45 e			
M-11	50.88 ± 0.42 c	55.04 ± 0.45 d	42.00 ± 1.75 c	11.66 ± 0.30 k	28.57 ± 0.47 k	9.73 ± 0.41 j			
M-12	10.32 ± 0.5 m	22.33 ± 0.32 l	15.96 ± 0.52 l	26.63 ± 0.16 l	29.70 ± 0.39 jk	26.99 ± 0.41 g			
M-13	15.57 ± 0.57 kl	20.66 ± 0.5 l	20.99 ± 0.27 hi	3.28 ± 0.22 m	15.27 ± 0.37 n	6.63 ± 0.43 k			
M-14	31.58 ± 0.49 l	47.99 ± 0.47 f	30.93 ± 1.58 fe	54.24 ± 0.23 c	60.23 ± 0.37 c	35.11 ± 0.54 e			
M-15	13.9 ± 0.31 l	28.57 ± 0.42 k	25.14 ± 1.77 hg	27.22 ± 0.19 l	21.69 ± 0.37 l	32.55 ± 0.93 f			
M-16	24.00 ± 0.17 j	20.76 ± 0.44 l	25.58 ± 0.66 hg	39.68 ± 0.28 g	34.79 ± 0.47 h	36.02 ± 0.87 e			
M-17	54.20 ± 0.9 b	65.15 ± 0.57 c	49.67 ± 0.18 b	57.06 ± 0.27 b	72.13 ± 0.37 a	48.21 ± 0.61 a			
M-18	36.25 ± 0.27 g	40.74 ± 0.65 h	34.76 ± 0.44 de	48.55 ± 0.30 e	45.43 ± 0.57 g	41.09 ± 0.61 cd			
M-19	24.22 ± 0.22 j	33.10 ± 0.58 j	25.14 ± 0.53 hg	47.30 ± 0.55 f	52.40 ± 0.37 e	40.09 ± 0.84 cd			

Letras iguales indica valores estadísticamente iguales entre columnas a $P \leq 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey

Los porcentajes de inhibición del radical DPPH encontrados en la presente investigación, concuerdan con lo reportado por Pandino y col., (2017) en extractos etanólicos de callos y suspensiones celulares de *Cynara scolymus*, donde demostraron porcentajes de inhibición entre el 51.6-89.8 %.

Si bien, se sabe que las especies del género *Rubus* son ricas en antioxidantes en metabolitos fenólicos, los cuales son un grupo de compuestos que actúan como antioxidantes o captadores de radicales libres, tales es el caso de los flavonoides (Lulu y col., 2015); Aunado a esto, los reportes de la AA de tejido cultivado in vitro son escasos, más aún del género *Rubus*, no obstante algunos trabajos demuestran que la correlación que existe entre el contenido de los compuestos fenólicos y la AA, es atribuida principalmente al genotipo y no al clima o la estación de colecta (Reyes-Carmona, 2006). Con base en esto, se realizaron pruebas de correlaciones entre las técnicas antioxidantes y el contenido de polifenoles y flavonoides en ambos tejidos.

En la Cuadro 16, se puede apreciar el valor de las R que se obtuvo durante la correlación de polifenoles y flavonoides con cada una de las técnicas en la evaluación de AA; en Los resultados mostraron correlaciones positivas fuertes entre la AA (por las tres técnicas) y la cantidad de polifenoles, que con el contenido de flavonoides, siendo estadísticamente significativas. Lo que nos sugiere que dentro de los extractos se encuentran compuesto que no son de carácter flavonoide y que están ejerciendo una fuerte AA.

Cuadro 12. Coeficiente de correlación de Pearson (R) entre polifenoles, flavonoides y la actividad antioxidante, producidos en callo de *Rubus glaucus*

Tejido	Compuesto	Actividad antioxidante (AA)		
		DPPH	ABTS	FRAB
Hoja	Polifenoles	0.71 **	0.76*	0.78 **
	Flavonoides	0.39 **	0.21	0.22
Tallo	Polifenoles	0.86 **	0.86 **	0.80 **
	Flavonoides	0.51 **	0.47 **	0.49 **

Valores que presentan * indican que son estadísticamente significativos a $P \leq 0.05$; ** indican que son estadísticamente significativos a $P \leq 0.01$.

Lo evidenciado en este trabajo, concuerda con lo reportado por Sellapan y col., (2002,) en frutos de arándanos y zarzamoras, donde encontraron mayor relación entre el total de polifenoles y AA ($R= 0.98$) que entre compuestos específicos como las antocianinas ($R= 0.60$). Esto difiere de lo mencionado por Reyes-Carmona y col., (2006) en especies de zarzamoras mexicanas, señalaron correlaciones más altas entre la actividad antioxidantes y antocianinas ($R= 0.88$), en comparación con polifenoles totales.

7.9. Cromatografía líquida de alta eficacia

En el caso de la metodología para cromatografía de alta resolución fueron seleccionados los extractos de callo proveniente de hoja con mayor y menor acumulación de polifenoles, así como el control (M-7; M-2; M-15 respectivamente). En la Figura 18, se muestran los cromatogramas y espectros UV- visible obtenidos para los estándares acacetina y quercetina. Para contrastar con los extractos se registró el tiempo de retención (9.2 min para acacetina y 9.9 min para quercetina, Figura 18-A y C, respectivamente), a una longitud de onda de 260 nm. Sin embargo, ambos flavonoides mostraron el mismo espectro de absorbancia (Figura 18-B y D), con bandas

características en 204.4, 256.8 y 375.4, esto se podría explicar porque ambos compuestos pertenecen al grupo de los flavonoles.

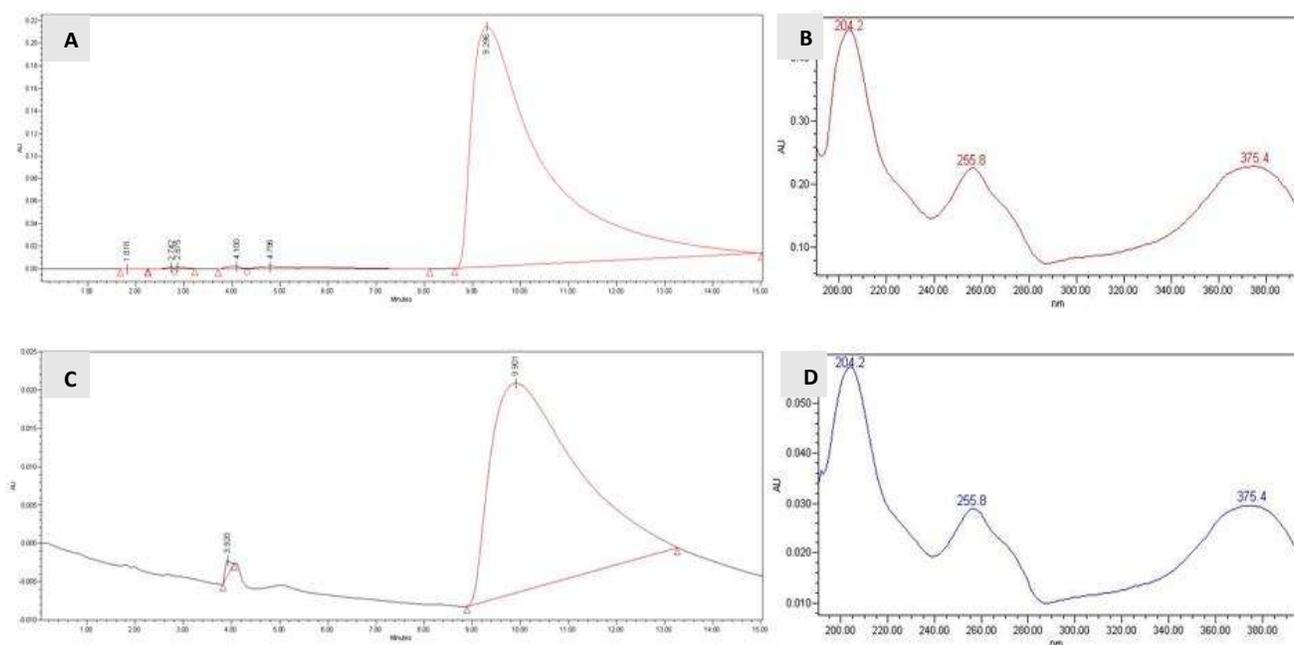


Figura 18. Cromatograma y espectros de absorción UV- visible obtenidos de acacetina (A; B) y quercetina (C- D). Nótese que no existe variabilidad entre los tiempos de retención entre ambos cromatogramas (A-C).

En contraste, en la Figura 19, se muestran los cromatogramas para los tratamientos M-7, M-2 y M-15; observando para M-15 dos picos prominentes con tiempos de retención (TR) de 3.0 y 4.0 min (pico 1 y 2, Figura 19-A). Por su parte, el tratamiento M-2 presentó un pico poco prominentes con TR en el minuto 4.0 (pico 3, 19-B). Por otro lado, el cromatograma obtenido para el tratamiento M-7 mostró lecturas poco definidas entre los tiempos de retención de 3.4 a 4.2 minutos, debido a esto no se logró obtener espectros entre ese TR; posteriormente destacaron dos picos en el TR de 5.4 y 6.8 min (pico 4 y 5, Figura19-C), siendo el único extracto en los que se presentaron.

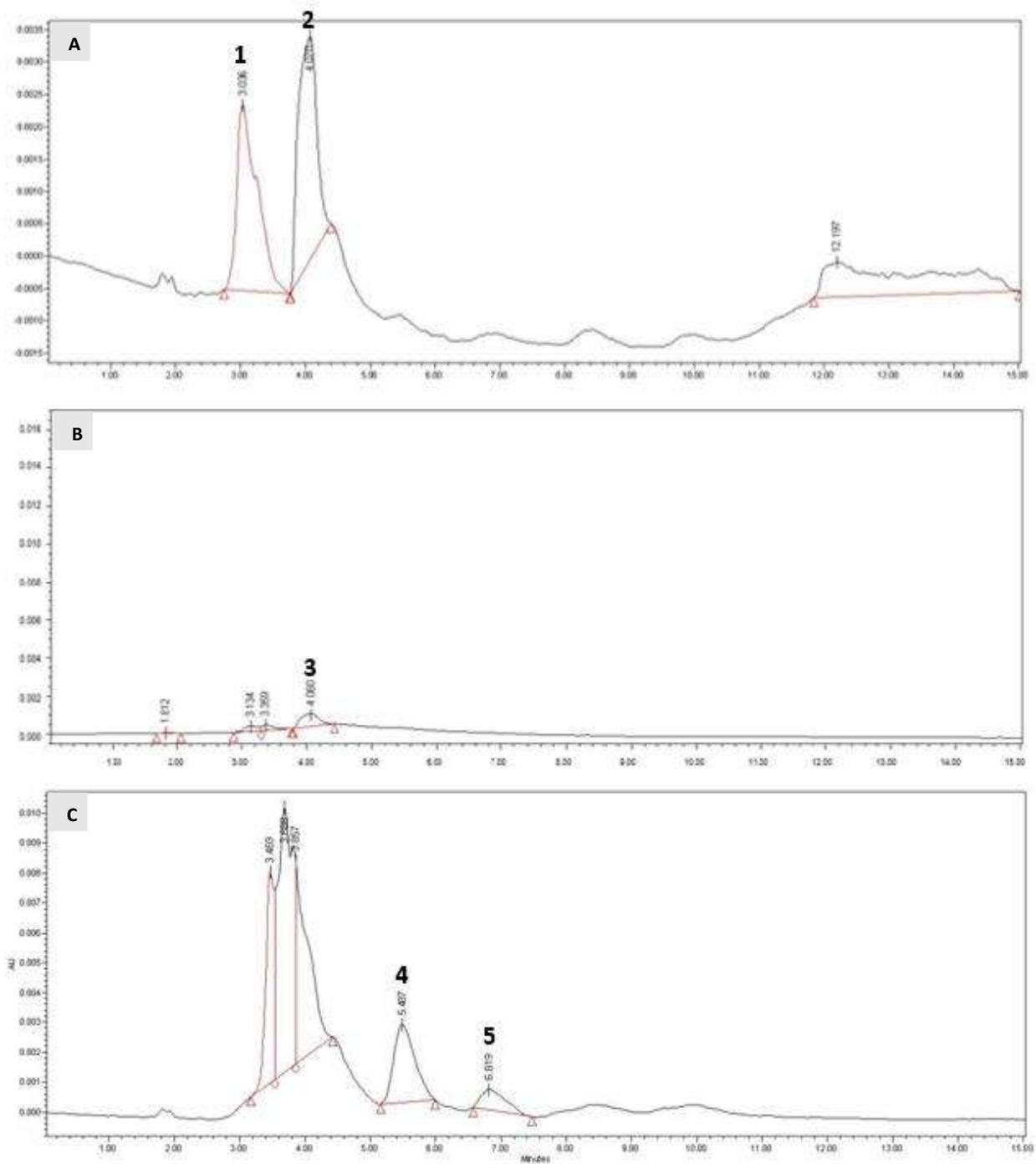


Figura 19. Cromatogramas obtenidos del extracto de callo proveniente del tratamiento M-15, M-2 y M-7. A) Tratamiento M-15; B) Tratamiento M-2; C) Tratamiento M-7. Se observa mayor acumulación de polifenoles en los tratamientos M-15 y M-7, en contraste al M-2.

No obstante, en los espectros UV- visibles resultantes de los cromatogramas, para el pico 1 se vieron dos bandas de absorción en 203.1 y 259.4 nm (Figura 20-1), mientras para el pico 2 mostró cuatro bandas entre 198.4, 274.7, 349.4 y 362.7 nm, estas bandas concuerdan con lo que se obtuvo para el picos 3 (198.4, 274.7 y 362.7 nm). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con lo reportado por Collares, (2011) con un TR 4.0 (Figura 19 A-B), cuyo espectro muestra absorbancia a 274.7 nm para ácido gálico y que del mismo modo empata con lo obtenido en los espectros del pico 2 y 3 (Figura 20). Borges y col (2010) reportaron tiempos de retención entre 3.0 y 3.3 para vitamina C en extractos de frutillas rojas, lo que sugiere la presencia de ácido gálico y vitamina C en el tratamiento M-15.

En contraste el pico 4 mostró dos bandas con absorción máxima en 194.9, 247.6 y 367.0 nm. Aunado el pico 5, se mostró bandas en 193.7, 247.6 y 362.7 nm. Collares, (2011), mostró un TR de 6-8 y longitud máxima de absorbancia de 240 - 369 nm para ácidos hidroxilbenzoicos como ácido protocatequico, lo que sugiere que en el tratamiento M-7 podría estar acumulando este tipo de compuestos.

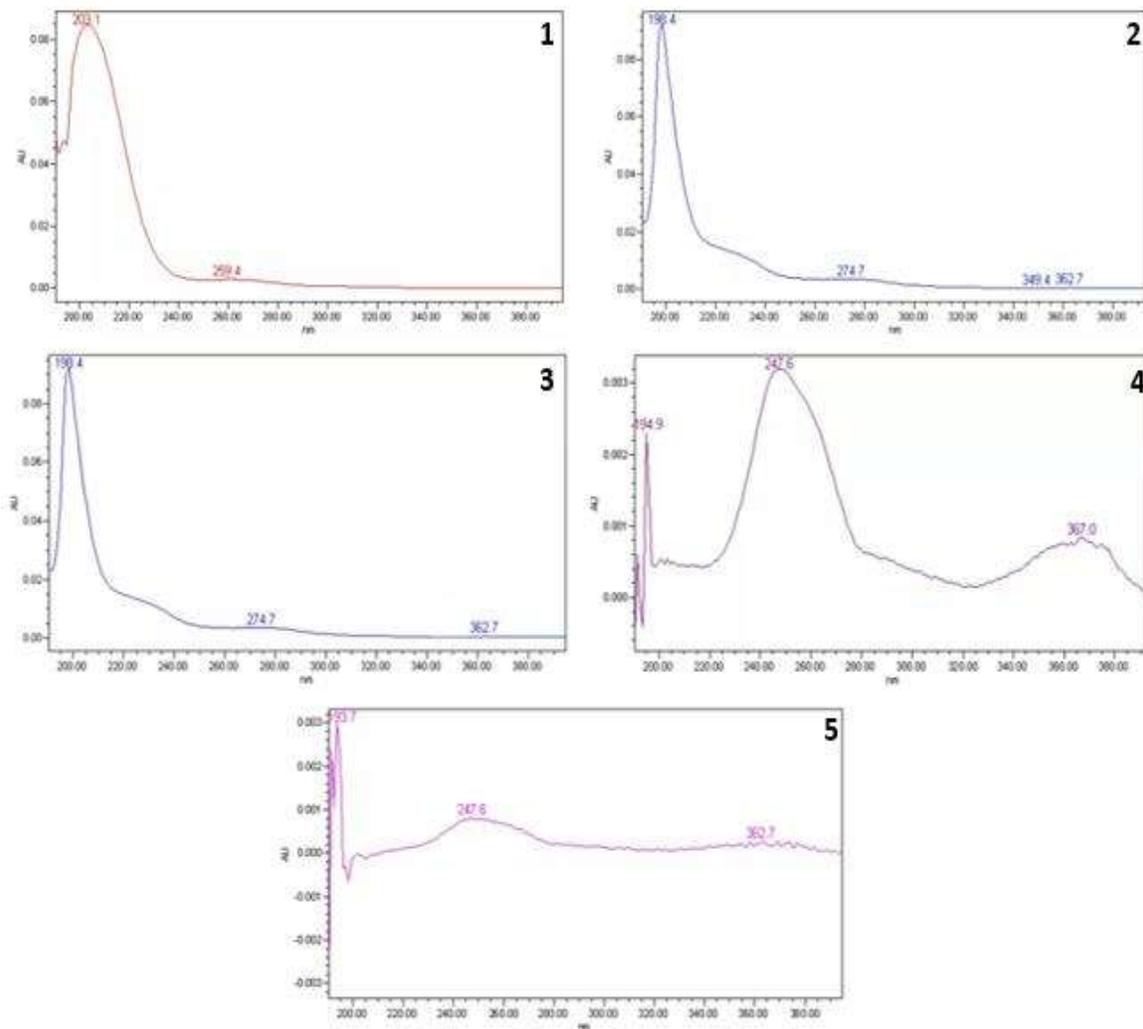


Figura 20. Espectros de UV- visible obtenidos de los cromatogramas de callo proveniente del tratamiento M-15, M-2 y M-7. 1-2) tratamiento 15; 3) tratamiento M-2; 4-5) tratamiento M-7. Nótese que las absorbancias máximas se encuentran entre 193.7-367.0 nm.

Los cromatogramas obtenidos de extractos de callos tras los diferentes tratamientos muestran picos entre los tiempos de retención a los 3 y 6 minutos, lo que no concuerda con los tiempos de retención de nuestros estándares. Sin embargo el cromatograma del tratamiento M-7 (Figura 19-C), corrobora la influencia de los tratamientos en la acumulación de polifenoles, con respecto al control (Figura 19-A). Los espectros de UV- visible mostraron bandas entre los 198-362 nm, lo que concuerda con las bandas características reportadas para los

flavonoides; comúnmente los espectros generados por las flavonas y flavonoides muestran dos bandas de absorción principales entre los 240-400 nm. La banda I es frecuentemente ubicada entre los 300-380 nm, mientras la banda II se encuentra en longitudes más cortas entre los 240–280 nm. Se considera que la banda I está asociada con la absorción del anillo B, mientras la banda II implica al anillo A de la estructura de los flavonoides. Del mismo modo, se sabe que el tipo de sustituyente (hidroxilo, metoxilo, acilos, glicosilaciones) y la posición de sustitución en los anillos muestran un efecto batocrómico e hipsocrómico. A su vez, se ha reportado que los espectros obtenidos con muestras diluidas en metanol muestran una pronunciada banda II y una banda I débil.

Sin embargo, con base en los reportado por Collado., (2011), se sugiere que los flavonoides encontrados en el presente trabajo son de carácter hidroxibenzeico o hidroxilcinamico, ya que los tiempos de retención y los espectros para ácido gálico y vitamina C, son muy parecidos (Figura 20). Por otro lado, en *Rubus fruticosus* L se ha reportado incrementos en los niveles de vitamina C tras tratamientos con altos niveles de potasio y bajos de nitrógeno (Ali y col., 2012).

Si bien, los espectros tuvieron similitudes entre ellos no se puede, determinar con certeza que son los mismo compuestos, por lo que recomienda recurrir a otro tipo de técnicas comprobatorias o ampliar el número de estándares utilizados.

8. CONCLUSIONES

Con base en los resultados alcanzados en el presente trabajo, se logró favorecer el porcentaje de explantes establecidos tras la incorporación de compuestos antioxidantes a los sistemas de asepsia en yemas axilares de *Rubus glaucus*. Además, se encontró mayor producción de tejido calloso ante la auxina 2,4 D. La acumulación de polifenoles, flavonoides y la actividad antioxidante se vio beneficiada tras las exposición de callos a estímulos químicos (sacarosa, nitratos y sales minerales), mostrando incrementos significativos, en contraste al control. Dentro de este mismo contexto, se indicó que el comportamiento de ambos tejidos indiferenciados difiere ante los mismos estímulos, con lo que se genera una nueva línea de investigación. A pesar de ello, se observó que los tejidos indiferenciados proveniente de hoja de *Rubus glaucus*, son más recomendados que los de tallo, para su incorporación a programas de producción de biomasa y polifenoles; mediante el análisis cromatográfico se corroboró el incremento de compuestos polifenólicos, así como, se sugiere que algunos de los compuestos estimulados son vitamina C y ácido gálico.

9. PERSPECTIVAS

A pesar de que las especies del género *Rubus* son conocidas por su alto contenido polifenólico, no existen reportes donde se incorporen a programas de producción de polifenoles *in vitro*. Si bien hasta el momento, se ha visto que hay mayor acumulación de polifenoles en planta que en tejidos indiferenciados, con este trabajo, se sientan las bases para el desarrollo de una metodología que permita la producción de polifenoles en cultivos indiferenciados de *Rubus glaucus* bajo condiciones controladas, facilitando así una producción continua, que no esté sujeta a factores agroclimáticos, largos periodos de cultivo y que requiere de una menor extensión para su producción.

En este trabajo se mostró la acumulación de polifenoles en callo de *Rubus glaucus*, así como los indicios observados por CLAR de la estimulación de diferentes compuestos; lo que continuaría de este trabajo, es la implementación de metodologías de separación más específicas para cada extracto, al igual que técnicas analíticas que complementen la identificación de los compuestos; dichos análisis darían la pauta para sugerir la bioactividad de los extractos.

10. LITERATURA CITADA

- Abe R., Beckett J., Abe R., Nixon A., Rochier A., Yamashita N., y Sumpio B. (2011) Olive Oil Polyphenol Oleuropein Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 41: 814-820.
- Agarwal C., Veluri R., Kaur M., Chou S.C., Thompson J.A., y Agarwal R. (2007) Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3'-di-Ogallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 28, 1478-1484.
- Aguilera M., Reza M., Chew R., y Meza A., (2011) Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de ciencias biológicas y de la salud.* 13 (2): 16-22.
- Åkerström, A., Forsum, Å., Rumpunen, K., Jäderlund, A., y Bång, U. (2009). Effects of sampling time and nitrogen fertilization on anthocyanidin levels in *Vaccinium myrtillus* fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(8), 3340-3345.
- Albert, T., Karp, K., Starast, M., Moor, U., y Paal, T. (2011). Effect of fertilization on the lowbush blueberry productivity and fruit composition in peat soil. *Journal of plant nutrition*, 34(10), 1489-1496.
- Ali, L., Alsanius, B. W., Rosberg, A. K., Svensson, B., Nielsen, T., y Olsson, M. E. (2012). Effects of nutrition strategy on the levels of nutrients and bioactive compounds in blackberries. *European Food Research and Technology*, 234(1), 33-44.

- Ali, M., y Abbasi B. H. (2014). Light-induced fluctuations in biomass accumulation, secondary metabolites production and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 223-227.
- Arias M., Aguirre A., Angarita M., Montoya M., y Restrepo J. (2009) Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*. 157: 109 -121.
- Ávila-Treviño, J. A., Arreola-Ávila, J. G., Trejo-Calzada, R., Valdez-Cepeda, D., y Borja-de la Rosa, A. (2013). Respuestas morfogénicas en la propagación *in vitro* de nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 19(3), 469-481.
- Ayala L. C., Valenzuela C. P., y Bohorquez Y. (2015). Caracterización fisicoquímica de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en seis estados de madurez. *INGRESAR A LA REVISTA*, 11(2), 10-18.
- Azofeifa G., Boudard F., Morena M, Cristol J., Pérez A. M., Vaillant F., y Michel A. (2013). Antioxidant and Anti-inflammatory *in vitro* Activities of Phenolic Compounds from Tropical Highland Blackberry (*Rubus adenotrichos*). *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 61: 5798–5804.
- Badia E., Sacanella E., Fernandez-Sola J., Nicolas J.M., Antunez E., Rotilio D., de Gaetano G., Urbano-Marquez A., y Estruch R. (2004) Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells after moderate alcohol consumption. *Am J Clin Nutr*. 80: 225-230.

- Balasundram N., Sundram K., y Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99, 191–203
- Basaga H., Tekkaya C., y Acikel F. (1997). Antioxidative and free Radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensmittle– Wissenschaft. Und technologie*, 30, 105–108.
- Blando F., Scardino A.P., De Bellis L., Nicoletti I., y Giovinazzo G. (2005) Characterization of *in vitro* anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. *Food Research International* 38: 937–942.
- Bodet C., Grenire D., Chandad F., Ofek I., Steinberg D., y Weiss E. (2008) Potential oral health benefits of cranberry. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48:672–680.
- Caleja C., Barros L., Antonio A. L., Carocho M., Oliveira M. B. P., y Ferreira, I. C. (2016). Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. *Food chemistry*, 210, 262-268.
- Cárdenas L.A., y Villegas M.A. (2002) Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex.* 25 (2): 213-217.
- Creasy L.L., y Coffe M. (1997) Phytoalexinas production potencial of grape berries. *J. Am soc hort, sci*; 113, 230-234.
- Chan L., Koay S., Boey P., y Bhatt A. (2010). Effects of abiotic stress on biomass and anthocyanin production in cell cultures of *Melastoma malabathricum*. *Biol Res* 43: 127-135.

- Chávez B.A.T., Alonso C., García P.A. (2012) Proteómica de la maduración de frutos de zarzamora (*Rubus* sp.) cultivados en México, una primera aproximación. *Ra Ximhai*. 8,143-157. ISSN: 1665-0441
- Clark J. R., y Finn C. E. (2011). Blackberry breeding and genetics. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology*, 5(1), 27-43.
- Clark J. R., y Finn C. E. (2014). Blackberry cultivation in the world. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1), 46-57.
- Collado J. (2011). Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas. Máster en Ingeniería Ambiental y de Procesos Químicos y Biotecnológicos. Universidad politécnica de Cartagena. Colombia–Cartagena.
- Conte R., Calarco A., Napoletano A., Valentino A., Margarucci S., Di Cristo F., y Peluso G. (2016). Polyphenols nanoencapsulation for therapeutic applications. *J. Biomol. Res. Ther*, 5(2).
- Cuevas E.O., D'Ávila V.P., Yousef G.G., García P.A., López M.J., Paredes L.O., González de M.E., y Lila M.A. (2010). Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of mexican blackberry (*Rubus spp.*) extracts. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 58(17), 9542-9548.
- Dai J., y Mumper R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Decendit A., y Merillon J. M.. (1996) Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*. 15: 762 – 765.

- Dedaldechamp F., Uhel C., y Macheix J. (1995) Enhancement of anthocyanin synthesis and dihydroflavonol reductase (DFR) activity in response to phosphate deprivation in grape cell suspensions. *Phytochemistry*. 40(5) : 1357-1360.
- Delgado F., Jimenez R., y Paredes O. (2000) Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 40: 173–289.
- Deroles S. (2009) Anthocyanin Biosynthesis in Plant Cell Cultures: A Potential Source of Natural Colourants Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications. *Anthocyanins as Food Colorants* (5) 283-198.
- Dios A., Montalvo E., Andrade I., y Gómez J. (2011) Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(2):77-87, 2011.
- Duthie S. J. (2007) Berry phytochemical, genomic stability and cáncer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Mol.nutr. food. Res.* 51, 655-674.
- Dos Santos K. M., de Oliveira I. C., Lopes M. A., Cruz A. P. G., Buriti F. C., y Cabral L. M. (2017). Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: the effect on phenolic content, probiotic viability and sensory acceptability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1108-1115.
- Duthie S. J. (2007) Berry phytochemical, genomic stability and cáncer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Mol.nutr. food. Res.* 51, 655-674.

Edahiro J., Nakamura M., Seki M., y Furusaki Y. (2005). Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of l-phenylalanine into the medium. *Journal of bioscience and bioengineering*. 99 (1): 43–47.

- Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., Ali, M., y Ali, S. (2016). Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(3), 573-581.
- Finn C. E., y Clark J. R. (2012). Blackberry. In *Fruit Breeding* (pp. 151-190). Springer US. DOI 10.1007/978-1-4419-0763-9_5
- Frankel E. N., Huang S.-W., Prior E., y Aeschbach R. (1996) Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol And carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oils and their Emulsions. *Journal of the science of food and agriculture*, 72, 201–208.
- Garcia-Alloza M., Borrelli L.A., Rozkalne A., Hyman B.T., y Bacskai B.J. (2007) Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J. Neurochem.*102, 1095-1104.
- Galvano F., La Fauci L., y Lazzarino G. (2004) Cyanidins: metabolism and biological properties. *J untr Biochem* 15:2–11
- Gamborg L.O. (2002) Plant tissue culture biotechnology Milestones. *In vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 38: 84–92.

- George E.F. (1987) Factors affecting growth and morphogenesis. I. Genotype and the physical environment. In: *Plant Propagation by Tissue Culture. Part I: The Technology* (E. George, ed.), 2: 183-230. 2nd Ed. Exegetics. Edington. UK.
- Gerber M., Boutron-Ruault M.C., Hercberg S., Riboli E., Scalbert A. y Siess, M.H. (2002) Food and Cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bull Cancer*, 89: 293–312.
- González-Albadalejo J., Sanz D., Claramunt R. M., Lavandera J. L., Alkorta I., y Elguero J. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *An real acad farm*, 81(4), 278-310.
- González-Jiménez F. E., Hernández-Espinosa N., Cooper-Bribiesca B. L., Núñez-Bretón L. C., y Reyes-Reyes, M. (2015). Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 18(1).
- González-Villegas N. G., Márquez-Villalobos F. A., y Ramírez-Emiliano, J. (2017). Efecto del resveratrol y la curcumina sobre parámetros antropométricos y niveles de colesterol y triglicéridos sanguíneos en ratones diabéticos db/db. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 2(1), 164-168.
- Gouedard C., Barouki R., y Morel Y. (2004) Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol. Cell Biol.* 24, 5209-5222.
- Giusti M. M., y Wrolstad R. E. (2001) Anthocyanins. Characterization and measurement of anthocyanins by UV– Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Incorporation. New York, USA. 13 p.

- Graham J., y Woodhead M. (2011) Rubus. In: Kole C. (eds) Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Han X., Shen T., y Lou H. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int.j. Mol. Sci.* 8, 950-988
- He J., y Giusti M. (2010) Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1:163-187.
- Hernández-Abreu O., Durán-Gómez L., Best-Brown R., Villalobos-Molina R., Rivera-Leyva J., y Estrada-Soto S. (2011). Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from *Agastache mexicana* and its correlation with vasorelaxant effect. *Journal of ethnopharmacology*, 138(2), 487-491.
- Hummer K. E. (2010). Rubus pharmacology: antiquity to the present. *HortScience*, 45(11), 1587-1591.
- Ikeuchi M., Sugimoto K., y Iwase A. (2013) Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*. 25: 3159–3173.
- Jankiewicz L.S. (1997) Los reguladores de crecimiento t resistencia en plantas. Cap 2; pag 21-250.
- Jiménez-González E. (1998) Generalidades del cultivo *in vitro*. In: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología* (JN Pérez

Ponce, ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. Cuba. p 13-24.

- Johnston K., Sharp P., Clifford M., y Morgan L. (2005) Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 579, 1653-1657.
- Joseph A., Denisova A., y Arendash G. (2003) Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutr Neurosci* 6:153–162.
- July A., Dávila E., Espino A., y Minchán A.I. 2015. *Perspectiva.* 2015; 16(18): 191-202. ISSN: 1996-5257.
- Karaaslan M., Ozden M., Vardin H., y Turkoglu, H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 1065-1072.
- Kostyuk V., Potapovich A., Albuhaydar A. R., Mayer W., De Luca C., y Korkina L. (2017). Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. *Rejuvenation research.*
- Kundu J.K., Chun K.S., Kim S.O., y Surh Y.J. (2004) Resveratrol inhibits phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse skin: MAPKs and AP-1 as potential molecular targets. *Biofactors.* 21, 33-39.
- Kunnumakkara A.B., Guha S., Krishnan S., Diagaradjane P., Gelovani J., y Aggarwal B.B. (2007) Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor- κ B-regulated gene products. *Cancer Res.* 67, 3853-3861.

- Li H., Piao X. C., Gao R., Jin M., Jiang J., y Lian, M. L. (2016). Effect of several physicochemical factors on callus biomass and bioactive compound accumulation of *R. sachalinensis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(3), 241-250.
- Lila M.A. (2004) Plant pigments and human health. In: K.M. Davies (Ed), *Plant Pigments and Their Manipulation*. Annual Plant Reviews. Blackwell Publishing/ CRC Press, Boca Raton, pp. 248–274.
- Litz R.E. y Jarret R.L. (1991) Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: *Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (WM Roca & LA Mroginski, eds.). p 143-152.
- Lone I. A., Misger F. A., y Banday F. A. (2017). Effect of different growth regulator combinations on the per cent media browning in walnut in vitro studies using MS medium. *Asian Journal of Soil Science*, 12(1), 135-142.
- Lulu T.P., Ibrahim R., y Kee-yoeup P. (2015) Production of biomass and bioactive compounds from adventitious roots By optimization of culturing conditions of *eurycoma longifolia* in balloon-type Bubble bioreactor system. *Journal of bioscience and bioengineering*.119 no. (6), 712-717.
- Madaan R., Bansal G., Kumar S., y Sharma A. (2011) Estimulation of total phenols anv Flavonoids in Extracts of *Actaea spicata* Roots and Antioxidant Activity Studies Ind J Pharm Sci.73(6): 666–669
- Maharik N., Elgengaihib S., y Taha H. (2009) Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* boiss. *International journal of academic research*. 1(1)

- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., y Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79:727–47.
- Manivannan A., Soundararajan P., Park Y. G., y Jeong B. R. (2016). Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 399.
- Martín S., González-Burgos E., Carretero E.M., y Gómez-Serranillos P.M. (2011) Neuroprotective properties of Spanish red wine and its isolated polyphenols on astrocytes. *Food Chem.* 128(1):40-48.
- Martínez-Cruz N. D. S., Arévalo-Niño K., Verde-Star M. J., Rivas-Morales C., Oranday-Cárdenas A., Núñez-González M. A., y Morales-Rubio M. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus Schldl* (zarzamora). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(4), 66-71.
- Martínez-Villegas Y. M., Andrade-Rodríguez M., Colinas-León M. T., Villegas-Torres Ó. G., Castillo-Gutiérrez A., y Alia-Tejacal I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista fitotecnica mexicana*, 38(4), 369-374.
- Mateus N., y Freitas V. (2009) Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications Anthocyanins as Food Colorants (9) 283-198.

- Mathur A., Kumar A., Gangwar A., Yadav S., Verma P., y Singh R. 2010. Anthocyanin production in a callus line of *Panax sikkimensis* Ban. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 46:13–21.
- Mora R. E. C., Chedraui P., Ruiz D. P. C., Colina R. H. S., Garcés J. E. G., y Enríquez Z. E. R. (2017). Efecto positivo de la suplementación con isoflavonas derivadas de la soya sobre síntomas menopáusicos. *Revista Colombiana Salud Libre*, 11(1), 33-39.
- Murthy H. N., Lee E. J., y Paek, K. Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 1-16.
- Nacz M. y Shahidi F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1523-1542.
- Nagella P., y Murthy H.N. (2010) Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. *Bioresour Technol* 101:6735–6739.
- Nair M.P., Kandaswami C., Mahajan S., Nair H.N., Chawda R., Shanahan, T., y Schwartz S.A. (2002) Grape seed extract proanthocyanidins downregulate HIV-1 entry coreceptors, CCR2b, CCR3 and CCR5 gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biol. Res.*35, 421-431.
- Neto C. C., MacLean J., Song B., Dovell A., Kwasny S., y Opperman T. (2014). Cranberry Fruit and Leaf Polyphenols Inhibit *Staphylococcus* Bacterial Biofilms.
- Quiñones Q., Miguel M., y Aleixandre A. (2012) Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 27(1):76-89.

- Paredes O., Cervantes M., Vigna M., y Hernández P. (2010) Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life—A Review. *Plant Foods Hum Nutr* 65:299–308
- Pandino G., Meneghini M., Tavazza R., Lombardo S., y Mauromicale G. (2017). Phytochemicals accumulation and antioxidant activity in callus and suspension cultures of *Cynara scolymus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(1), 223-230.
- Pandey K. B., y Rizvi S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.
- Pascual T.S., y Sanchez M.T. (2008) Anthocyanins: from plant to health. *Phytochem Rev.* 7: 281–299.
- Pasqua G., Monacelli B., Mulinacci N., Rinaldi S., Giaccherini C., Innocenti M., y Francesco F. (2005) The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *Camptotheca acuminata* cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 293–298.
- Peñarrieta J.M., Tejeda L., Mollinedo P., Vila J.L., y Bravo J.A. (2014) *Rev Boliv De Q.* 31(2): 68-81.
- Pérez M.B., Pérez R.M., Villalobos A.E., Meza R.E., Morones R.L. y Lizalde V.J. (1999) Micropropagation of 21 species of Mexican cactus by axillary proliferation in vitro cell. *Cell Dev. Biol*, 34:131-135.

- Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G.F., y Galli, C. (1995) Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb. Res.* 78, 151-160.
- Ram M., Prasad K., Charanjit S., Singh SK., Arora A., y Kumar S. (2011) Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 104:171–179.
- Ramachandra S., y Ravishankar A. (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotech. Adv.* 20: 101–153.
- Ramírez-González G., Arreola-Ávila J. G., y Álvarez-Moctezuma J. G. (2015). Morphogenic responses of three explants of *Lupinus montanus* (HBK) cultured in vitro. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 21(1).
- Ramos R. T., Bezerra I. C., Ferreira M. R., y Soares L. A. L. (2017). Spectrophotometric quantification of flavonoids in herbal material, crude extract, and fractions from leaves of *Eugenia uniflora* Linn. *Pharmacognosy research*, 9(3), 253.
- Reyes-Carmona J., Yousef G. G., Martínez-Peniche R. A., y Lila, M. A. (2005). Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *Journal of food science*, 70(7).
- Rechner A.R., y Kroner C. (2005) Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb Res.* 116: 327-334.

- Riles L.W., Sanjay J., Atten M.J., Attar B.M., y Holian O. 2006. Resveratrol engages selective apoptotic signal in gastric adenocarcinoma cell. *World j gastroent.* 5628-5634.
- Sakagami Y., Sawabe A., Komemushi S., All Z., Tanaka T., Iliya I., y linuma, M. (2007) Antibacterial activity of stilbene oligomers against vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and their synergism with antibiotics. *Biocontrol Sci.* 12, 7-14.
- Sánchez García P. (2009) Manual de nutrición de zarzamora.
- Schafer S., Podtawa M., Visioli F., Bogani P., y Muller W.E. (2007) Hydroxytyrosol-rich olive mill waste water extract protects brain cells in vitro and in vivo. *J. Agri. Food chem.* 55, 50443-5049.
- Schmidt-Durán A., Alvarado-Ulloa C., Chacón-Cerdas R., Alvarado-Marchena L. F., y Flores-Mora, D. (2016) Calllogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) and its microscopic analysis. *SpringerPlus*, 5(1), 1717.
- Seeram P.N. (2008) Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem* 56:627–629
- Segura S., Zavala D., Equihua C., Andrés J., y Yepes E. (2009) Los recursos genéticos de frutales en Michoacán. *Revista Chapingo serie agricultura.* 15 (3) : 297-305.

- Selmi C., Cocchi C.A., Lanfredini M., Keen C.L., y Gershwin M.E. (2008) Chocolate at heart: the anti-inflammatory impact of cocoa flavanols. *Mol Nutr Food Res.* 52: 1340-8.
- Serkedjieva J., y Manolova N. (1992) Plant polyphenol complex inhibits the reproduction of influenza and herpes simplex viruses. *Basic Life Sci*, 59: 705–715.
- Semiarti E., Milasari A. F., Sari D. K., Fitriana N., y Galuh S. (2017). Callus Induction from Various Organs of Dragon Fruit, Apple and Tomato on some Mediums. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 20(5), 244-252.
- Serrano C., Puupponen- Pimia R., Dauer A., Anna- Marja a., Saura- Calixto F. (2009) Tannins: current knowledge of food sources, in take bioability and biological effects. *Mol. Nutr food res.* 53, 5310-s329.
- Shahidi F., Janitha P.K., y Wanasundara P.D. (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 32: 67–103.
- Silva E. M., Souza J. N. S., Rogez H., Rees J. F., y Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101(3), 1012-1018.
- Silveira S., Lucena E.V., Pereira T.F., Garnes F., Romagnolo M., y Takemura O. (2011) Anticholinesterase activity of *Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand (Myrtaceae) fruits. *Arq Cienc Sau de Unipar.* 15(2): 127-133.
- Simões C., Brasil H., Da Silva C., Carvalho T., Machado C., Ribeiro J., Albarello N., y Mansur E. (2009). Anthocyanin production in callus cultures

of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 895–903.

- Simões C., Silva L., Tatiana T., Henriques C., Albarello N., y Mansur E. (2011) Establishment of anthocyanin-producing cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Capparaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 106:537–545.
- Simões C., Albarello N., C. de Castro T., y Mansur E. (2012) Production of anthocyanins by plant cell and tissue culture strategies. *Biotechnological production of plant secondary metabolites*, 67-86.
- Singh P., y Patel R. M. (2016). Factors affecting in vitro degree of browning and culture establishment of pomegranate. *African Journal of Plant Science*, 10(2), 43-49.
- Shishu I., y Kaur P. (2008) Antimutagenicity of curcumin and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food: the structural requirement. *Food chem.* 111, 573-579.
- Süntar İ., Akkol E. K., Şenol F. S., Keles H., y Orhan, I. E. (2011). Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using in vivo and in vitro experimental models. *Journal of ethnopharmacology*, 135(1), 71-77.
- Strik B. C., y Finn C. E. (2011, June). Blackberry production systems-a worldwide perspective. In *X International Rubus and Ribes Symposium 946* (pp. 341-347).
- Suzutani T., Ogasawara M., y Yoshida I. (2003) Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. *Phytother Res* 17:609–613.

- Szajdek A., y Borowska E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147-156.
- Sugiyama M. (1999) Organogenesis *in vitro*. *Curr Opin Plant Biol.*2 (1):61-4.
- Tapia A. (2014) Propagación *in vitro* y actividad antimicrobiana de extractos de callos obtenidos de especies del género *Rubus* spp. Tesis posgrado. Facultad de agrobiología “presidente Juárez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan Michoacán.
- Tatjana V., Đurdina R., Radosav C., y Gordana S.M. 2010. Adventitious regeneration in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) And assessment of genetic stability in regenerants. *Plant Growth Regul.* 61:265–275.
- To K.Y., y Wang C.H. (2006) Molecular Breeding of Flower Color Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume I.
- Trigiano R.N., y Gray J.D. (2011) plant tissue culture, developmet, and biotechnology. CRC press. Cap 1-4; 11-50
- Vinardell M.P., Ugartondo V., y Mitjans M. (2007) Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Industrial crops and products.* 27: 220-223.
- Vinson J.A., Teufel K., Wu N. (2001) Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis.* 156: 67-72.
- Vinterhalter B., Ninković S., Kozomara B., y Vinterhalter D. (2007) Carbohydrate nutrition and anthocyanin accumulation in light grown and

etiolated shoot cultures of carob (*Ceratonia Siliqua* L.). *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 59 (1), 51-56.

- Walden R., y Wingender R. (1995) Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *Trends Biotechnol.* 13: 324-31.
- Wan H., Zhang J., Song T., Tian T., y Yao Y. (2015) Promotion of flavonoid biosynthesis in leaves and calli of ornamental crabapple (*Malus* sp.) by high carbon to nitrogen ratios. *Frontiers in Plant Science.* 6: 673.
- Wanasundara N., y Shahidi F. (1998). Antioxidant and prooxidant Activity of green tea extracts in marine oils. *Food chemistry*, 63, 335–342.
- Werlein H.D., Küttemeyer C., y Schatton G. (2005) Influence of elderberry and blackcurrant concentrates on the growth of microorganisms. *Food Control* 16:729–733.
- Weiss E.I., Houry-Haddad Y., Greenbaum E., Hochman N., Ofek I., y Zakay-Rones Z. (2005) Cranberry juice constituents affect influenza virus adhesion and infectivity. *Antiviral Res* 66:9–12
- Wu- Yang H., y Yi- Zhong C. (2010) Natural phenolic compound from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr cancer.* 62, 1-10.
- Xu B.J., y Chang S.K. (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.* 72, S159-166.
- Yin S.S., Liang Y.Y., Gao W.Y., Wang J., Jing S.S., Zhang Y., y Liu H. (2013) Influence of medium salt strength and nitrogen source on biomass

and metabolite accumulation in adventitious root cultures of *Pseudostellaria heterophylla*. *Acta Physiol Plant* 35:2623–2628

- Zhang W., Curtin C., Kikuchi M., y Franco M. (2002) Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis _inifera* suspension cultures. *Plant Science* 162: 459–468.
- Zhang W., Seki M., y Furusaki S. (1997) Effect of temperature and its shift on growth and anthocyanin production in suspension cultures of strawberry cells. *Plant Science*. 127: 207–214.
- Zhang W., y Furusaki S. (1997) Regulation of anthocyanin synthesis in suspension cultures of strawberry cell by pH. *Biotechnology Letters*, 19 (11): 1057–1061.
- Zhong J.J. (2001) Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures. *Plant cell*. 72:2- 24.

11.- ANEXO

11.1.- APENDICE I

En el Cuadro 13, se muestra la influencia estadísticamente significativa que presentaron los diferentes factores y niveles sobre la acumulación de polifenoles, al igual para las interacciones de dos y tres factores.

Cuadro 13. Valores obtenidos del análisis ANOVA de los factores sacarosa, nitrato de potasio y sales minerales e interacciones sobre la acumulación de polifenoles en extractos etanólicos de callos de hoja de *Rubus glaucus*

Factor	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Sacarosa	2	96388.26	48194.13	74813.4	<0.0001
Nitrato	2	28645.74	14322.87	22174.4	<0.0001
Sales minerales	1	847.32	847.32	1311.81	<0.0001
Sacarosa * nitrato	4	23255.96	581.99	9001.13	<0.0001
Nitrato * Sales minerales	2	15201.11	7600.55	11767.1	<0.0001
Sacarosa * Sales minerales	2	59997.22	29998.61	46443.4	<0.0001
Sacarosa * nitrato * Sales minerales	4	19780.77	4945.1949	7656.07	<0.0001

Por lo que, se procedió a comparar las medias estimadas para cada factor en sus diferentes niveles. Con base en esto se evidenció mayor efecto del alto contenido de sacarosa, seguido de la nula cantidad de nitrato de potasio (Figura 21).

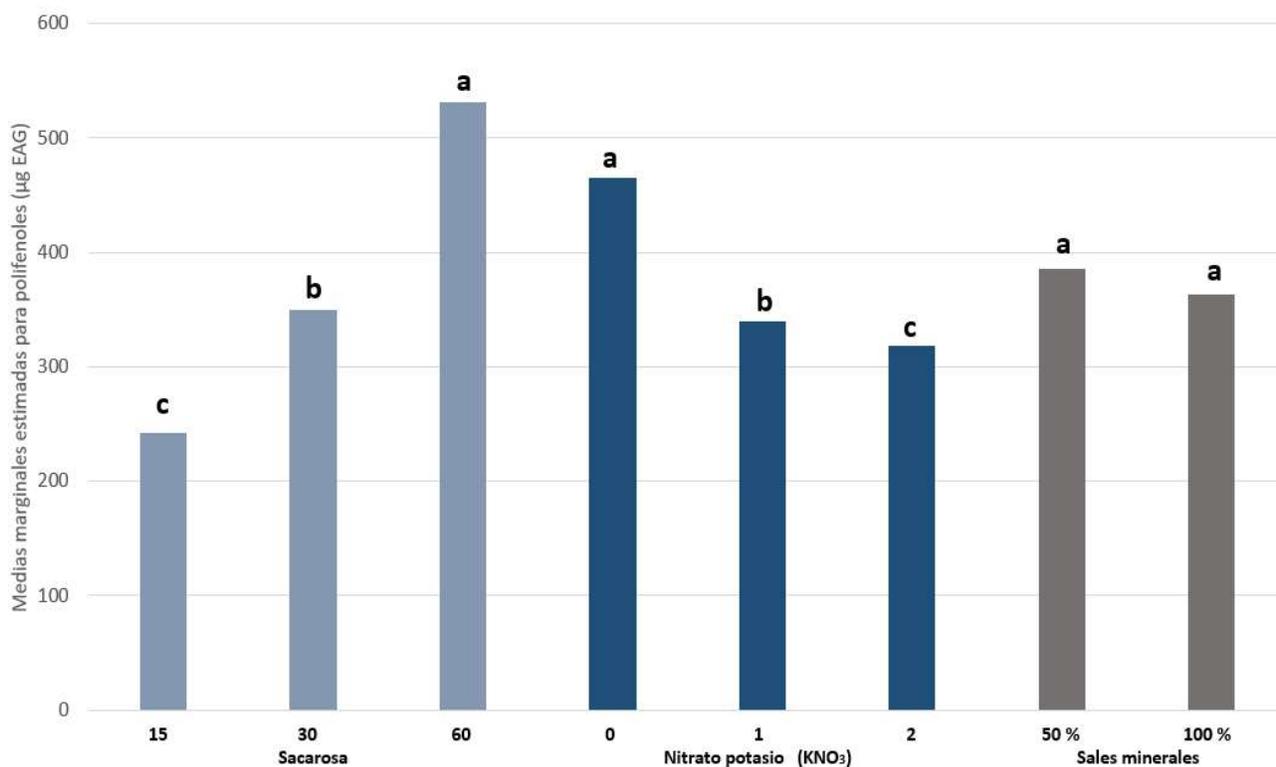


Figura 21. Medias marginales estimadas de polifenoles entre los diferentes factores y niveles en callo proveniente de hoja de *Rubus glaucus*. Letras iguales indican calores estadísticamente iguales entre barras a $P \leq 0.01$.

En los resultados reportados para hoja, se manifestó en las interacciones que el nivel 0 de nitrato de potasio produjo mayor cantidad de polifenoles en los tres niveles de sacarosa (Figura 22); esto apunta a que el contenido de polifenoles responde mejor a la aplicación de nitrato de amonio y no a la de nitrato de potasio.

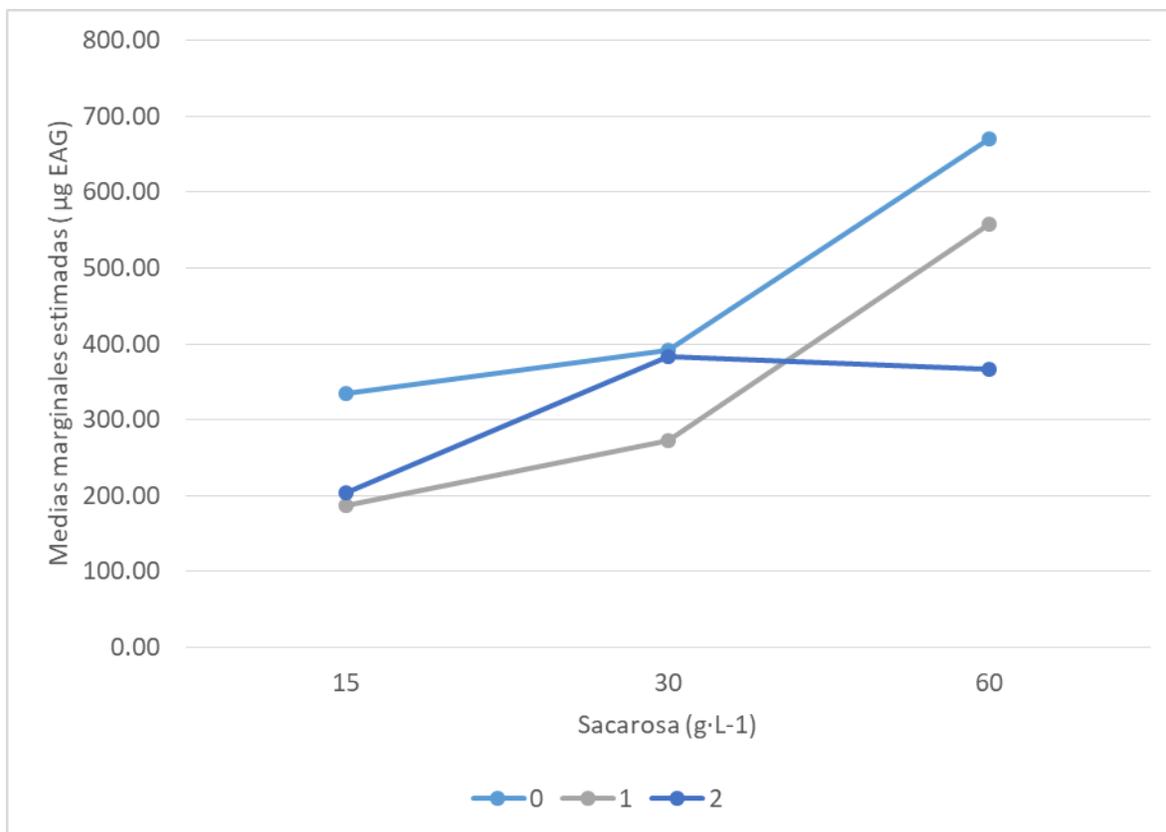


Figura 22. Medias estimadas para la interacción de sacarosa y nitratos sobre la acumulación de polifenoles en callo de hoja de *Rubus glaucus*.

A su vez, los niveles altos de minerales (100 %) respondió mejor en los niveles bajos y medios de sacarosa (30 y 15 g L⁻¹), sin embargo, en altos niveles de sacarosa (60 g L⁻¹) indicó mejor el nivel bajo de minerales (Figura 23).

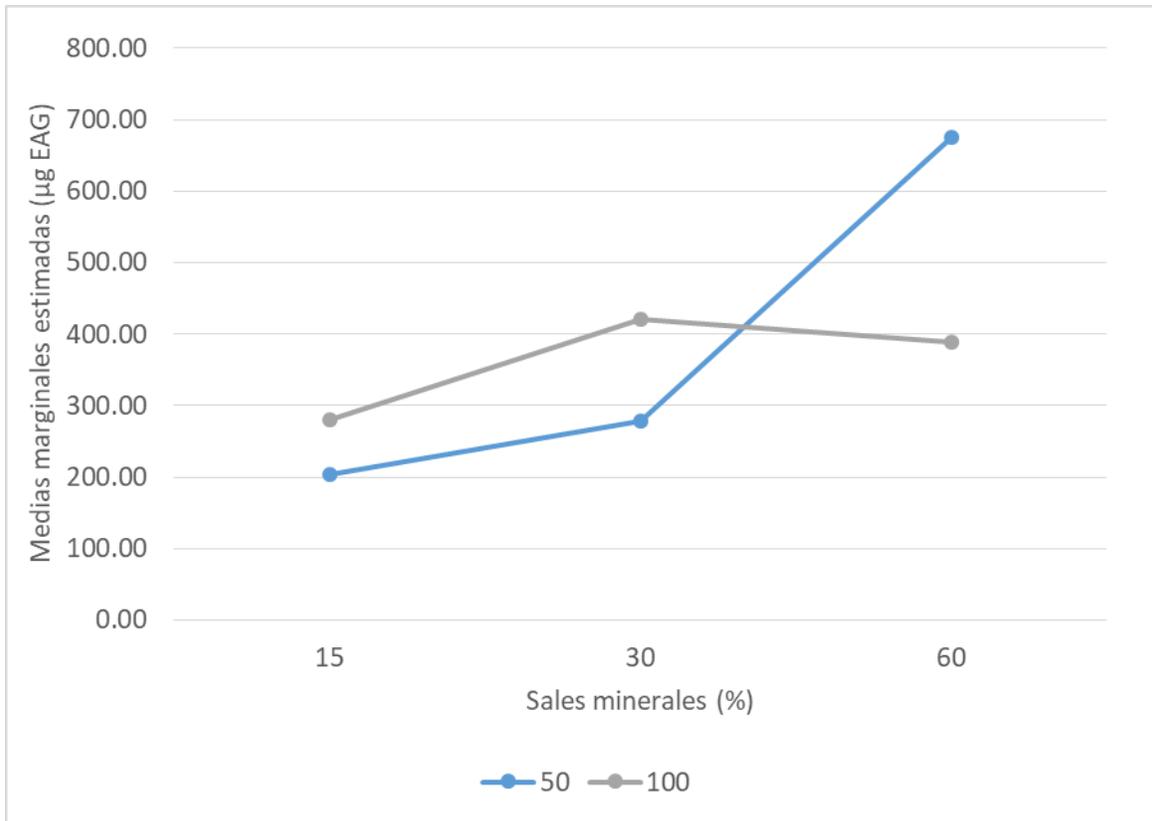


Figura 23. Medias estimadas para la interacción entre sacarosa y sales minerales MS sobre la acumulación de polifenoles en callo de hoja de *Rubus glaucus*

En contra parte la concentración de sales minerales al 100 % presentó mayores contenidos de polifenoles en el nivel más bajo de nitrato de potasio (0); los minerales al 50 % exhibió mayores contenidos de polifenoles en el nivel 1 de nitrato de potasio, pero no es superior en el nivel 1:0 que el del 100 % (Figura 24); esto sugiere que no hay necesidad de aplicar KNO_3 para obtener mayor contenido de polifenoles.

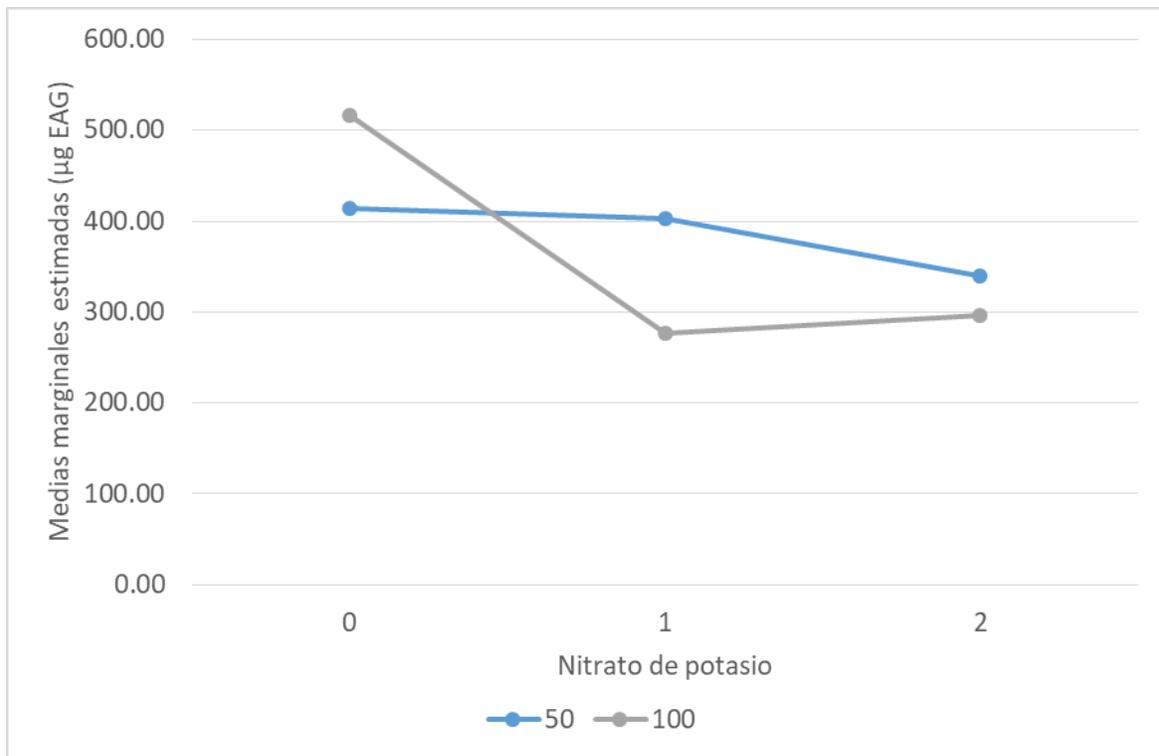


Figura 24. Medias estimadas para la interacción entre nitrato de potasio y sales minerales MS sobre la acumulación de polifenoles en callo de hoja de *Rubus glaucus*

11.2.- APÉNDICE II

Al igual que en callo proveniente de hoja, el de tallo mostró la influencia estadísticamente significativa que tuvieron los factores en sus diferentes niveles sobre la acumulación de polifenoles, esto también se vio para las interacciones de dos y tres factores (Cuadro 14).

Cuadro 14. Valores obtenidos del análisis ANOVA de los factores sacarosa, nitrato de potasio y sales minerales e interacciones sobre la acumulación de polifenoles en extractos etanólicos de callos de tallo de *Rubus glaucus*.

Factor	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Sacarosa	2	63695.20	31847.60	28529.1	<0.0001
Nitrato	2	9626.54	4813.27	4311.73	<0.0001
Sales minerales	1	7168.72	7168.72	6421.74	<0.0001
Sacarosa * nitrato	4	6800.31	1700.07	1522.93	<0.0001
Nitrato * Sales minerales	2	5636.85	2818.42	2524.75	<0.0001
Sacarosa * Sales minerales	2	6147.27	3073.63	2753.36	<0.0001
Sacarosa * nitrato * Sales minerales	4	20660.34	5165.08	4626.88	<0.0001

En la comparar las medias estimadas para cada factor en sus diferentes niveles, observó mayor efecto del alto contenido de sacarosa, seguido de la nula cantidad de nitrato de potasio, sin embargo se mostraron mejores acumulación de polifenoles con el 100 % de sales minerales (Figura 25), no así en callo proveniente de hoja.

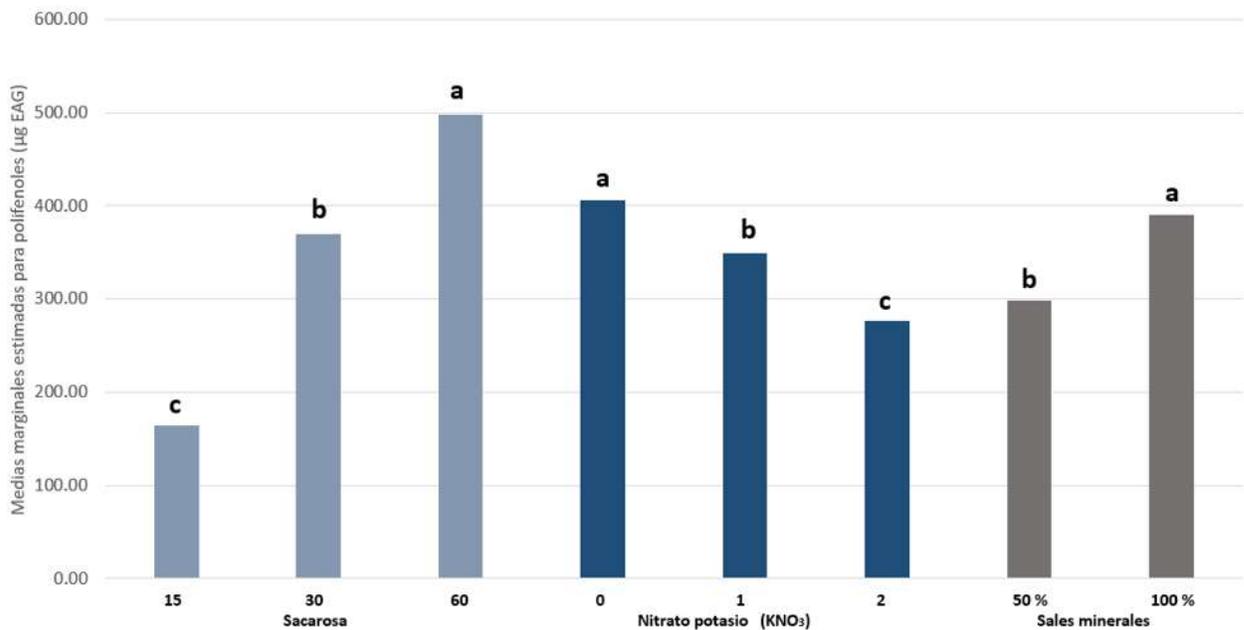


Figura 25. Medias marginales estimadas de polifenoles entre los diferentes factores y niveles en callo proveniente de tallo de *Rubus glaucus*. Letras iguales indican calores estadísticamente iguales entre barras a $P \leq 0.01$.

En los resultados reportados para tallo, se presentó en las interacciones que los niveles de nitratos 1 y 2 incrementó los polifenoles conforme aumentó el contenido de sacarosa, siendo el primero quien mostró mayor acumulación; no así para las proporciones 0 de nitratos, donde, incrementó el contenido de polifenoles en los niveles 15 y 30 g L⁻¹ de sacarosa y a partir de este último lo redujo (Figura 26).

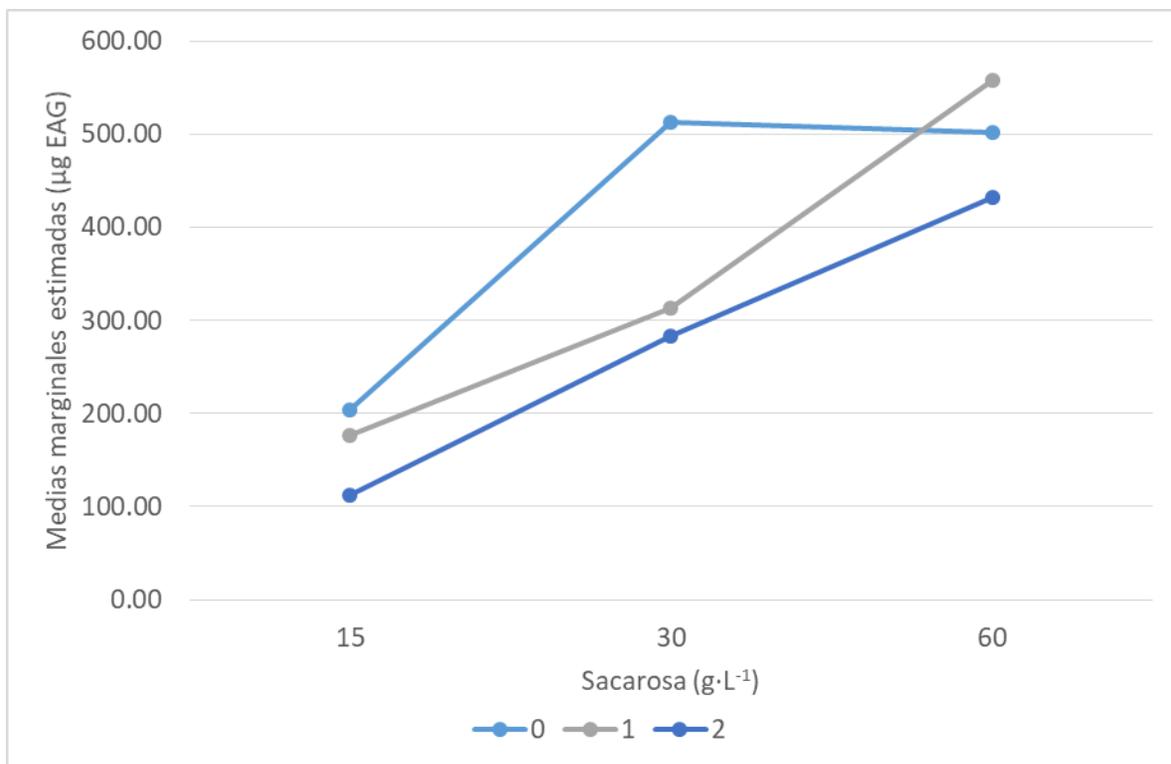


Figura 26. Medias estimadas para la interacción de sacarosa y nitratos sobre la acumulación de polifenoles en callo de tallo de *Rubus glaucus*

No obstante, la concentración de sales minerales al 100 %, evidenció incrementos de polifenoles conforme aumento el contenido de sacarosa, en contraste la dilución de sales al 50 % reportó la mayor acumulación de polifenoles en las concentración baja y alta de sacarosa (15 g·L⁻¹ y 60 g·L⁻¹), sin superar al nivel del 100%; siendo la concentración media (30 g·L⁻¹), quien tuvo el menor valor (Figura 27).

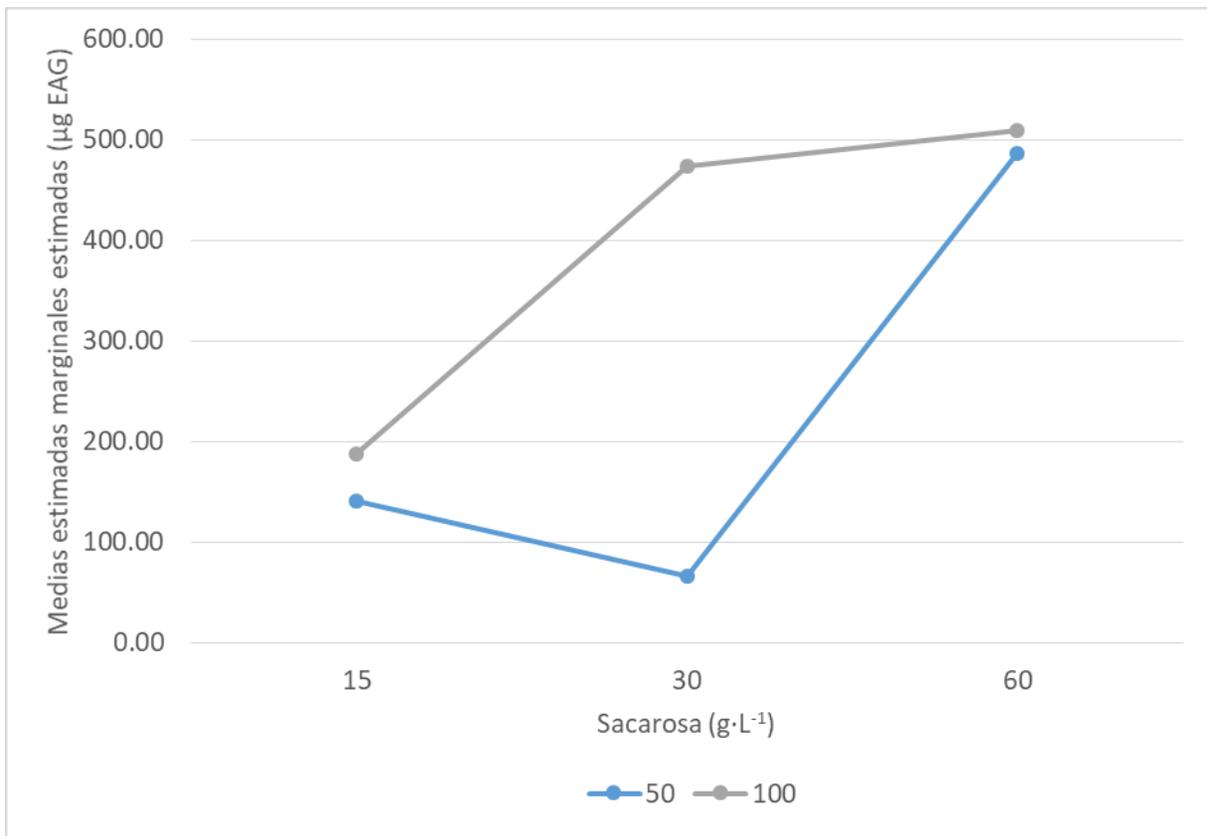


Figura 27. Medias estimadas para la interacción de sacarosa y sales minerales sobre la acumulación de polifenoles en callo de tallo de *Rubus glaucus*

Mientras el 100 % de sales minerales incrementó el contenido de polifenoles, conforme disminuye las proporciones de sales minerales, en comparación con la dilución del 50 % que reduce la acumulación de polifenoles con proporciones altas y bajas de nitrato (0, 2), siendo la proporción (1) quien mostró la mayor acumulación de polifenoles, sin superar lo encontrado en 100 % de sales minerales (Figura 28).

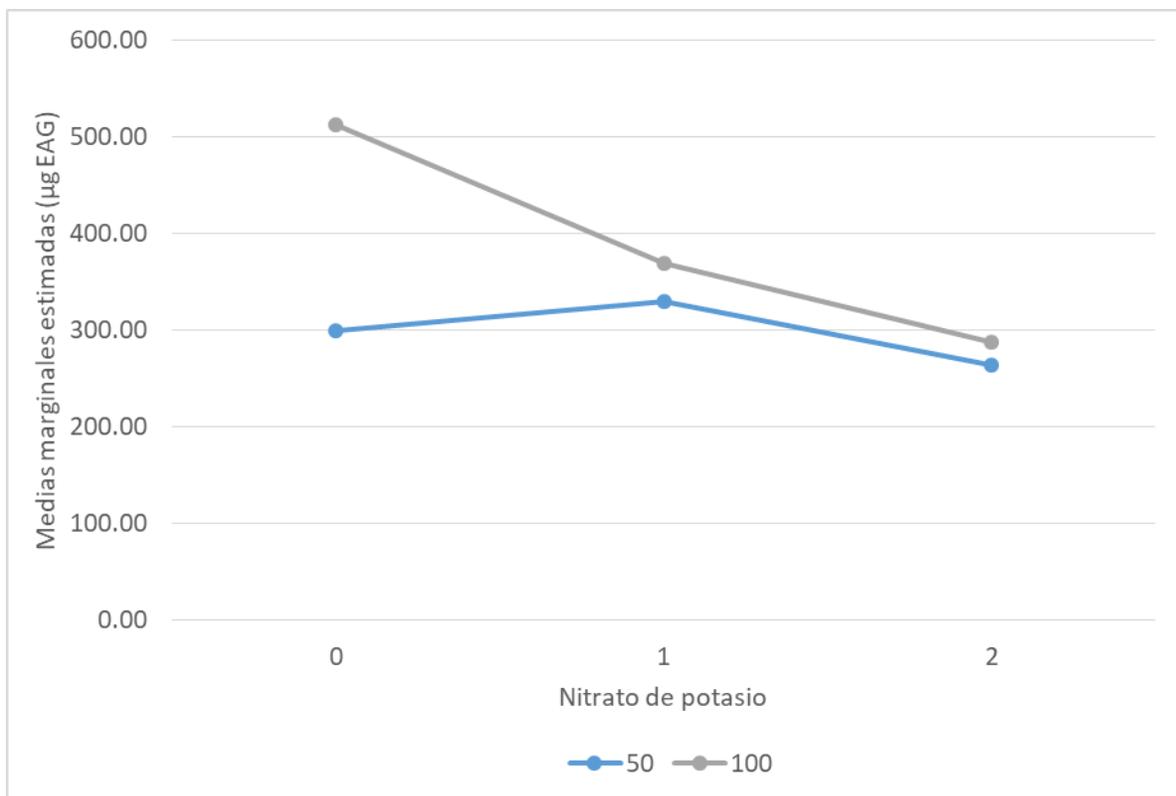


Figura 28. Medias estimadas para la interacción de nitratos y sales minerales sobre la acumulación de polifenoles en callo de tallo de *Rubus glaucus*

Cuadro 15.- Rendimiento de polifenoles por peso obtenido tras los tratamientos en callos de *Rubus glaucus*.

Tratamiento	Callo proveniente de hoja			Callo proveniente de tallo		
	Peso fresco (g)	$\mu\text{g EAG} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PF}$	Rendimiento $\mu\text{g EAG} \cdot \text{PF}$	Peso fresco (g)	$\mu\text{g EAG} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PF}$	Rendimiento $\mu\text{g EAG} \cdot \text{PF}$
M-1	0.85 ± 0.01 f	230.52 ± 5.52 l	197.55 ± 4.83 hij	1.09 ± 0.03 de	222.82 ± 7.89 k	242.03 ± 487 h
M-2	2.32 ± 0.04 a	180.00 ± 3.88 o	419.75 ± 6.78 f	1.96 ± 0.04 ab	171.25 ± 2.88 o	140.15 ± 8.04 j
M-3	1.30 ± 0.01 dc	198.00 ± 8.80 n	258.14 ± 9.38 ho	2.15 ± 0.03 ab	130.86 ± 3.12 m	281.74 ± 11.44 h
M-4	1.75 ± 0.01 b	190.00 ± 1.84 n	298.82 ± 3.55 hg	1.07 ± 0.08 de	237.93 ± 5.21 j	255.83 ± 3.86 h
M-5	2.35 ± 0.13 a	324.80 ± 3.12	765.52 ± 46.30 abc	1.71 ± 0.06 bc	371.75 ± 5.79 g	634.31 ± 8.79 c
M-6	1.94 ± 0.1 b	341.80 ± 2.88 i	664.20 ± 5.56 cde	2.03 ± 0.04 ab	188.99 ± 1.35 l	384.63 ± 6.88 efg
M-7	0.83 ± 0.01 f	841.82 ± 3.59 a	703.78 ± 11.66 bcd	0.82 ± 0.01 e	440.74 ± 1.44 e	360.96 ± 2.97 g
M-8	1.21 ± 0.02 dc	702.50 ± 3.83 b	852.34 ± 16.33 a	1.02 ± 0.6 de	545.24 ± 3.79 c	740.34 ± 25.42 b
M-9	1.36 ± 0.1 dc	480.10 ± 1.89 e	656.62 ± 1.39 ed	1.08 ± 0.06 de	472.35 ± 3.43 d	514.03 ± 27.47 bc
M-11	0.90 ± 0.09 ef	438.40 ± 2.32 f	396.45 ± 41.01 fg	0.81 ± 0.05 e	185.73 ± 1.77 l	151.79 ± 10.8 ij
M-12	1.45 ± 0.06 c	194.2 ± 2.16 n	281.02 ± 13.61 hi	1.80 ± 0.13 ab	282.98 ± 4.73 h	526.95 ± 46 d
M-13	0.58 ± 0.03 g	210.32 ± 4.47	123.77 ± 4.76 j	2.28 ± 0.26 a	93.26 ± 8.45 n	213.17 ± 25.05 hi
M-14	1.13 ± 0.18 de	613.41 ± 3.04 c	694.12 ± 67.72 cd	1.34 ± 0.02 cd	788.74 ± 3.94 a	1060.01 ± 12.66 a
M-15	1.87 ± 0.2 b	220.69 ± 2.24	413.99 ± 9.59 f	1.73 ± 0.15 bc	253.60 ± 6.63 i	440.76 ± 43.45 e
M-16	1.35 ± 0.24 dc	426.08 ± 3.79 g	576.64 ± 109.48 e	1.14 ± 0.02 de	377.43 ± 4.27 g	431.14 ± 10.77 ef
M-17	0.84 ± 0.07 f	499.51 ± 1.35 d	421.02 ± 35.33 f	0.76 ± 0.02 e	563.57 ± 2.71 b	410.64 ± 15.30 bc
M-18	1.95 ± 0.01 b	413.13 ± 2.13 h	806.16 ± 7.98 abc	1.19 ± 0.07 de	572.35 ± 6.90 b	682.63 ± 43.05 bc
M-19	0.71 ± 0.04 fg	252.16 ± 2.23 k	179.71 ± 2.30 ij	0.94 ± 0.03 de	392.85 ± 1.29 f	369.39 ± 12.81 fg