



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

PRODUCCIÓN DE ANTOCIANINAS DE *ARISTOTELIA CHILENSIS* EN  
BIORREACTORES PARA USO NUTRACÉUTICO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

PAMELA ANDREA DÍAZ ABARCA

PROFESOR GUÍA:  
ALVARO OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
VICTOR POLANCO CASTRO  
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE  
2014

# Resumen ejecutivo

*Aristotelia chilensis* (Eleoacarpáceas), comúnmente conocida como maqui, es una especie vegetal distribuida en el Centro y Sur de Chile. El fruto de esta planta es de gran interés para la industria alimenticia y farmacológica debido a que posee potentes capacidades antioxidantes. Lo anterior es producto de su elevado contenido de antocianinas, en particular de delfinidinas, metabolitos secundarios implicados en la formación de la pigmentación azul y en la protección de las plantas contra la luz ultravioleta (UV). Actualmente, la producción frutícola de maqui se basa principalmente en la recolección del fruto desde árboles en condiciones silvestres. Además, su producción se ve limitada por la estacionalidad del fruto, que sólo se da en temporada de verano. Estas limitantes impiden que la demanda creciente de maqui se vea satisfecha. Debido a lo anterior, resulta fundamental la búsqueda de nuevas estrategias biotecnológicas para la producción de extractos ricos en antocianinas de maqui.

El presente trabajo tiene por objetivo el desarrollo de una estrategia para la producción de extractos ricos en antocianinas a partir de cultivos celulares de *A. chilensis*. Para lograr lo anterior se estudió la inducción callogénica a partir de diferentes explantes (embrión, cotiledón y hoja) en diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores del crecimiento. Las condiciones de cultivo que indujeron la formación de callos de maqui fueron medio Murashige & Skoog 4,43[g/L] con 3% de sacarosa, 0,7% de agar y la adición de las hormonas kinetina y NAA 1[mg/L] cada una. Además, para el mantenimiento de los callos inducidos, el medio de cultivo Gamborg b-5 3,21[g/L] brindó una mayor velocidad de crecimiento y aumento de biomasa.

Posteriormente, se establecieron cultivos de células en suspensión en medio Murashige & Skoog 4,43[g/L] con 3% de sacarosa, 1[mg/L] de kinetina y NAA y exposición a luz (16 h luz; 8 h oscuridad). Los cultivos en suspensión fueron elicitados por medio de metil jasmonato (MJ) 100  $\mu$ M y ácido abscísico (ABA) 100  $\mu$ M, los cuales no entregaron resultados positivos en la producción de antocianinas. Además, se estableció un cultivo en suspensión con medio Gamborg b-5 3,21[g/L] con 3% de sacarosa, 2[mg/L] de 2,4-D y exposición a luz (16 h luz; 8 h oscuridad); el cual presentó características de crecimiento positivas, alcanzado una concentración de biomasa final de más de 5 veces la concentración inicial del cultivo.

Asimismo, se estableció una línea de callos iniciados a partir de embriones y mantenidos en medio Gamborg b-5 3,21[g/L] con 3% de sacarosa, 0,7% de agar, 2[mg/L] de auxina 2,4-D y exposición a fotoperiodo (16 h luz; 8 h oscuridad). Esta línea presentó una pigmentación color violeta oscuro producto de la síntesis de antocianinas por parte de sus células. Análisis de los callos por medio de HPLC-PAD-MS revelaron la presencia de los mismos tipos de antocianinas presentes en el fruto de *A. chilensis*. Sin embargo, los perfiles de antocianinas fueron diferentes a los del fruto, conteniendo principalmente cianidinas.

Finalmente, en el presente trabajo de tesis fue posible el establecimiento de cultivos celulares productores de antocianinas. Sin embargo, es necesaria la identificación de las variables críticas del proceso de producción de estos metabolitos, con el objetivo de maximizar su síntesis, particularmente la síntesis de delfinidinas glicosiladas.

*A mis padres... por su amor incondicional*

*Los amo*

# Agradecimientos

Primero que todo agradezco a Dios, fiel compañero, fuerza y protector. Gracias por todas las virtudes que me has entregado, las personas que has puesto en mi camino y por haberme permitido finalizar esta etapa de mi vida.

Agradezco a mi familia, en particular a mis padres Emilio y Nina. Gracias por darme la vida y por cada segundo de amor, paciencia, esfuerzo y dedicación. Gracias por estar siempre junto a mí, apoyándome en todo momento y procurando entregarme siempre lo mejor de ustedes. Los amo con toda mi alma y espero no desilusionarlos jamás.

Agradezco también a mis amigas, porque aunque en ocasiones hemos estado distanciadas, nunca he sentido su ausencia en mi corazón. Gracias por los buenos momentos vividos, las risas y las conversaciones interminables.

A Ricardo, gracias por tu fiel presencia durante la realización de este trabajo. Gracias por tu sonrisa, tu apoyo y los consejos constantes.

A mis profesores guías, Álvaro y Víctor, les agradezco por el tiempo entregado, las sugerencias y consejos; y por haber depositado en mí una enorme confianza.

# Tabla de Contenido

Índice de Tablas .....	vi
Índice de Figuras .....	vi
Abreviaturas y simbología.....	ix
1. Introducción.....	11
1.1 Antecedentes generales .....	11
1.2 Industria nutracéutica.....	11
1.3 Polifenoles: Antocianinas.....	13
1.3.1 Biosíntesis general de Antocianinas.....	16
1.3.2 Beneficios para la salud humana.....	18
1.3.3 Biodisponibilidad y metabolismo.....	20
1.4 Delfinidinas y sus propiedades farmacológicas.....	21
1.4.1 Actividad anticarcinogénica .....	22
1.4.2 Actividad neuroprotectora.....	22
1.4.3 Efecto antiinflamatorio.....	22
1.5 <i>Aristotelia chilensis</i> .....	22
1.5.1 Estudios asociados a los beneficios del maqui.....	25
1.6 Técnicas de cultivo de plantas <i>in-vitro</i> .....	25
1.6.1 Micropropagación.....	26
1.6.2 Cultivo de callos vegetales .....	28
1.6.3 Cultivos de células vegetales en suspensión.....	30
1.6.4 Producción de antocianinas por medio de cultivos <i>in vitro</i> .....	31
1.7 Descripción del proyecto y motivación .....	35
2. Objetivos .....	37
2.1 Objetivo General.....	37
2.2 Objetivos Específicos.....	37
2.3 Alcances del estudio .....	37
3. Metodología .....	39
3.1 Materiales y Equipos .....	40
3.2 Diseño Experimental.....	41
3.2.1 Establecimientos de cultivos <i>in vitro</i> de plantas de maqui .....	41
3.2.2 Callogénesis a partir de explantes de maqui.....	44

3.2.3 Cultivos de células en suspensión .....	47
3.2.4 Inducción de la producción de antocianinas.....	49
3.3 Análisis para el estudio del contenido de antocianinas.....	51
4. Resultados y discusiones .....	52
4.1 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de plantas de maqui.....	52
4.1.1 Establecimiento de cultivos a partir de explantes de plantas silvestres .....	52
4.1.2 Establecimiento de cultivos a partir de embriones cigóticos.....	54
4.2 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de callos de <i>A. chilensis</i> .....	56
4.2.1 Identificación de las condiciones para la inducción de callogénesis .....	56
4.2.2 Identificación de las condiciones de subcultivo y mantenimiento de los callos	59
4.2.3 Curvas de crecimiento de callos .....	65
4.3 Cultivo de células en suspensión.....	73
4.3.1 Análisis del crecimiento celular en cultivos en suspensión .....	76
4.4 Elicitación de la producción de antocianinas .....	79
4.4.1 Elicitación con metil jasmonato .....	79
4.4.2 Elicitación con ácido abscísico .....	80
4.5 Estudio cualitativo del contenido de antocianinas .....	81
5. Conclusiones .....	85
5.1 Recomendaciones para el trabajo futuro .....	86
6. Bibliografía.....	87
7. Anexos .....	99
A. Composición de medios de cultivo.....	99
B. Perfil de antocianinas en Maqui .....	101

## Índice de Tablas

Tabla 1: Tratamientos de desinfección para explantes de <i>A. chilensis</i> . .....	42
Tabla 2: Medios de cultivo y dosis de reguladores de crecimiento utilizados para la inducción callogénica a partir de explantes de <i>A. chilensis</i> . 3MS corresponde a medio Murashige & Skoog con 3% de sacarosa y 3B5 a medio Gamborg B-5 con 3% de sacarosa. ....	46
Tabla 3: Concentración de elicitores utilizados para promover la inducción de la producción de antocianinas en los cultivo de células en suspensión de <i>A. chilensis</i> .....	50
Tabla 4: Número de explantes no contaminados para los diferentes tratamientos de limpieza implementados (L1 y L2), en los diferentes medios de cultivo empleados y según la ausencia (S/Y) o presencia (C/Y) de yemas apicales o axilares en las estacas.....	53
Tabla 5: Número de embriones no contaminados y viables para el establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. chilensis</i> . .....	55
Tabla 6: Eficiencia en la inducción callogénica en luz y oscuridad en los tratamientos hormonales aplicados para las diferentes fuentes de explante de <i>A. chilensis</i> . Una velocidad de crecimiento lenta significa que la inducción callogénica surtió efecto luego de aproximadamente 5 a 6 semanas, una velocidad de crecimiento regular significa que los indicios de callogénesis se presentaron entre 3 a 4 semanas, y una velocidad de crecimiento rápida significa que la inducción callogénica se evidenció entre 1 y 2 semanas de iniciado el cultivo. ....	57
Tabla 7: Cinética de crecimiento para los distintos cultivos de callos de <i>A. chilensis</i> estudiados.....	66
Tabla 8: Identidad de las diferentes antocianinas identificadas en muestras de callos y cultivos en suspensión de <i>Aristotelia chilensis</i> por medio de HPLC-PAD-MS. Los números de los picos son los mostrados en la Figura 32. TR: Tiempo de retención. ....	84
Tabla 9: Formulación del medio de cultivo modificado Murashige & Skoog con vitaminas distribuido comercialmente por PhytoTechnology Laboratory® [138]. ....	99
Tabla 10: Formulación del medio de cultivo Gamborg B-5 distribuido comercialmente por PhytoTechnology Laboratory® [139]. ....	100
Tabla 11: Identidad de las diferentes antocianinas identificadas en un extracto de fruto de <i>A. chilensis</i> . Los números de los picos son los mostrados en la Figura 34. ....	101

## Índice de Figuras

Figura 1: Áreas terapéuticas cubiertas por producto nutracéuticos.....	12
Figura 2: Estructura básica general e individual de algunas antocianinas glicosiladas. ....	14
Figura 3: Esquema de la conversión estructural dependiente de pH entre formas dominantes de antocianinas monóxidos en fase acuosa. [14].....	15
Figura 4: Ruta de biosíntesis general de flavonoides y antocianinas [20].....	17
Figura 5: Estructura química de las delfinidinas [50].....	21
Figura 6: Fotografías de <i>A. chilensis</i> (a) Flores de maqui (b) Fruto de maqui. ....	23
Figura 7: Índice ORAC de diferentes Bayas del mercado. ....	23
Figura 8: Estructura de la antocianina delfinidina 3-sambubiósido-5-glucósido. ....	24
Figura 9: Ilustraciones esquemáticos de: (a) Una planta (b) Una semilla dicotiledónea. ..	27

Figura 10: Ilustraciones esquemáticas de diferentes tipos de callos de plantas (a) Callos sin regeneración de órganos (b) Callos con regeneración parcial de órganos [77].....	29
Figura 11: Curva de crecimiento característica de los tejidos callosos: (1) Etapa lag en donde la células se adaptan al medio; (2) Periodo de crecimiento exponencial en donde la división celular es máxima; (3) Etapa de crecimiento lineal en donde la división celular se vuelve más lenta y las células crecen; (4) Periodo de desaceleración del crecimiento; (5) Etapa estacionaria en donde el número de células es constante. ....	30
Figura 12: Esquema del procedimiento llevado a cabo para la iniciación, mantenimiento e inducción de la síntesis de antocianinas en cultivos celulares de <i>A. chilensis</i> . Las cajas coloreadas corresponden a las etapas claves en el estudio.....	39
Figura 13: Embriones de <i>A. chilensis</i> luego de su extracción, en placa con tratamiento H4. ....	45
Figura 14: Fragmentos de cotiledón de <i>A. chilensis</i> , en placas con Tratamiento H5. ....	45
Figura 15: Fragmentos de hoja de <i>A. chilensis</i> , en placas con Tratamiento H4. ....	46
Figura 16: Matraz Erlenmeyer de 250 ml con 3 deflectores utilizado para los cultivos de células en suspensión de <i>A. chilensis</i> . ....	48
Figura 17: Fotografías de dos cultivos <i>in vitro</i> de plantas de <i>A. chilensis</i> establecidos por medio de explantes obtenidos a partir de plantas silvestres. Ambos cultivos se encuentran en medio M3. (a) Fotografía de un cultivo a los 16 días de su plantación, se observa el florecimiento de la planta (b) Fotografía de un cultivo a los 40 días de su plantación. ....	54
Figura 18: Fotografías de la evolución de una planta de maqui <i>in vitro</i> establecida a partir de embriones cigóticos. (a) Embrión a los 9 días de su siembra. (b) Plántula de <i>A. chilensis</i> a los 16 días de la siembra del embrión. (c) Planta de maqui <i>in vitro</i> a los 30 días de la siembra del embrión. ....	55
Figura 19: Callogénesis a partir de diferentes explantes de <i>A. chilensis</i> en los tratamientos hormonales que brindaron resultados positivos: (a) Embrión en luz en tratamiento H2 (b) Cotiledón en luz en tratamiento H4 (c) Hoja en luz en tratamiento H4 (d) Cotiledón en luz en tratamiento H5 (e) Hoja en oscuridad en tratamiento H6.....	58
Figura 20: Líneas de callos obtenidas a partir de (a) Embriones, (b) Cotiledones y (c) Hojas. Los colores del borde de los cuadrantes indican el medio de cultivo utilizado (3MS o 3B5) y los colores dentro de los cuadrantes indican las hormonas utilizadas y su concentración dependiendo de la intensidad del color. Además, en la esquina inferior derecha de cada cuadrante se indica el tratamiento hormonal utilizado que se detalló previamente en la Tabla 6. ....	60
Figura 21: Callos inducidos mediante tratamiento hormonal H4 en medio de cultivo 3MS. Todos los callos corresponden a callos de 30 días de cultivo (a) Callo EM.a en medio 3MS tomada utilizando una lupa (Olympus SZ651) (b) Callo EM.a en medio 3MS. (c) Callo EM.b en medio 3MS.....	62
Figura 22: Cultivos <i>in vitro</i> de callos de <i>A. chilensis</i> bajo diferentes condiciones de cultivo. (a) Callo en medio 3B5 de la línea EM.a a 25 días de cultivo (b) Callo en medio 3B5 de la línea EM.b a 25 días de cultivo (c) Callo en medio 3B5 de la línea EM2.a a los 7 días de cultivo (d) Callo en medio 3B5 de la línea EM2.a a los 25 días de cultivo (e) Callo en medio 3B5 de la línea EM2.b a los 25 días de cultivo. ....	63
Figura 23: Curvas de crecimiento de callos EM.a cultivados en medio 3MS y mantenidos en luz (16 h luz; 8 h oscuridad). (a) Curva de crecimiento de callos en peso fresco. (b) Curva de crecimiento de callos en peso fresco normalizado. (c) Curva de crecimiento de callos en peso seco. ....	67



Figura 24: Curvas de crecimiento de callos EM.b cultivados en medio 3MS y mantenidos en oscuridad. (a) Curva de crecimiento de callos en peso fresco. (b) Curva de crecimiento de callos en peso fresco normalizado. (c) Curva de crecimiento de callos en peso seco. ..	69
Figura 25: Curvas de crecimiento de callos EM.a cultivados en medio 3B5 y mantenidos en luz (16 h luz; 8 h oscuridad). (a) Curva de crecimiento de callos en peso fresco. (b) Curva de crecimiento de callos en peso fresco normalizado. (c) Curva de crecimiento de callos en peso seco.....	70
Figura 26: Curvas de crecimiento de callos EM.b cultivados en medio 3B5 y mantenidos en oscuridad. (a) Curva de crecimiento de callos en peso fresco. (b) Curva de crecimiento de callos en peso fresco normalizado. (c) Curva de crecimiento de callos en peso seco. ....	71
Figura 27: Cultivos en suspensión en medio 3MS de la línea EM.a. (a) Cultivo oxidado a los 14 días de cultivo (b) Cultivo viable a los 14 días de cultivo (c) Cultivo viable a los 14 días de cultivo donde se aprecian los agregados celulares. ....	74
Figura 28: Cultivos de células en suspensión de <i>A. chilensis</i> en medio 3B5 de la línea EM2.a. Ambas fotografías fueron tomadas a los 30 días de cultivo líquido.....	75
Figura 29: Fotografía microscópica de un cultivo de células en suspensión de <i>A. chilensis</i> en medio 3B5 con hormona 2,4-D 2[mg/L]. Todas las fotografías son a los 30 días de cultivo líquido.....	76
Figura 30: Curvas de crecimiento en peso fresco para cultivos de células en suspensión de <i>A. chilensis</i> (a) Cultivo en medio 3MS de la línea EM.a (b) Cultivo en medio 3MS de la línea EM.b (c) Cultivo en medio 3B5 con hormona 2,4-D 2[mg/L]. ....	77
Figura 31: Cultivos de células en suspensión de <i>Aristotelia chilensis</i> en medio 3MS de la línea EM.a elicitados con (a) Metil Jasmonato (MJ) y (b) Ácido abscísico (ABA). ....	80
Figura 32: Fotografía de un cultivo de células en suspensión de <i>A. chilensis</i> en medio 3B5 de la línea EM2.a a los 9 días de cultivo y a 5 días de elicitado con ABA 100 $\mu$ M. ....	81
Figura 33: Cromatograma HPLC registrado a 520 nm en donde se muestra el perfil de antocianinas individuales de una muestra de callos (muestra número 2) de <i>Aristotelia chilensis</i> . ....	82
Figura 34: Cromatograma HPLC registrado a 520 nm en donde se muestra el perfil de antocianinas individuales de una muestra de cultivos en suspensión de <i>Aristotelia chilensis</i> elicitado mediante MJ (muestra número 7). ....	83
Figura 35: Cromatograma HPLC registrado a 520 nm en donde se muestra el perfil de antocianinas de un extracto de fruto de <i>A. chilensis</i> . ....	101

# Abreviaturas y simbología

3MS: Medio Murashige & Skoog con 3% de Sacarosa.

3B5: Medio Gamborg b-5 con 3% de Sacarosa.

BAP: Citoquinina 6-Bencilaminopurina.

AIA: Auxina ácido indolacético.

KIN: Citoquinina kinetina.

NAA: Auxina ácido naftalenacético.

2,4-D: Auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

CA: Carbón Activado.

Ac: Ácido Cítrico.

MJ: Metil Jasmonato.

ABA: Ácido abscísico.

EM.a: Cultivo de callos o suspensiones iniciados a partir de embriones extraídos de semillas de *A. chilensis*. Los cultivos son mantenidos en medio 3MS o 3B5, con hormonas KIN 1[mg/L] y NAA 1[mg/L], y expuestos a luz (16 h luz; 8 h oscuridad).

EM.b: Cultivo de callos o suspensiones iniciados a partir de embriones extraídos de semillas de *A. chilensis*. Los cultivos son mantenidos en medio 3MS o 3B5, con hormonas KIN 1[mg/L] y NAA 1[mg/L], y conservados en completa oscuridad.

EM2.a: Cultivo de callos o suspensiones iniciados a partir de embriones extraídos de semillas de *A. chilensis*. Los cultivos son mantenidos en medio 3MS o 3B5, con hormona 2,4-D 2[mg/L], y expuestos a luz (16 h luz; 8 h oscuridad).

EM2.b: Cultivo de callos o suspensiones iniciados a partir de embriones extraídos de semillas de *A. chilensis*. Los cultivos son mantenidos en medio 3MS o 3B5, con hormona 2,4-D 2[mg/L], y conservados en completa oscuridad.

CT.a: Cultivo de callos iniciados a partir de cotiledones de *A. chilensis*. Los cultivos son mantenidos en medio 3MS o 3B5, con hormonas KIN 1[mg/L] y NAA 1[mg/L], y expuestos a luz (16 h luz; 8 h oscuridad).

CT.b: Cultivo de callos iniciados a partir de cotiledones de *A. chilensis*. Los cultivos son mantenidos en medio 3MS o 3B5, con hormonas KIN 1[mg/L] y NAA 1[mg/L], y conservados en completa oscuridad.

HJ.a: Cultivo de callos iniciados a partir de hojas de *A. chilensis*. Los cultivos son mantenidos en medio 3MS o 3B5, con reguladores del crecimiento KIN 1[mg/L] y NAA 1[mg/L], y expuestos a luz (16 h luz; 8 h oscuridad).

HJ.b: Cultivo de callos iniciados a partir de hojas de *A. chilensis*. Los cultivos son mantenidos en medio 3MS o 3B5, con reguladores del crecimiento KIN 1[mg/L] y NAA 1[mg/L], y conservados en completa oscuridad.

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity): Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno. Es un método para la medición de la capacidad antioxidante de muestras biológicas *in-vitro* [1].

# 1. Introducción

## 1.1 Antecedentes generales

El alimento ha sido un pilar fundamental dentro de la evolución de las civilizaciones. La fisiología y morfología básica del *Homo sapiens* establece límites sobre nuestros hábitos alimenticios, pero dentro de estos límites las preferencias alimentarias de los humanos varían notablemente, tanto dentro como entre poblaciones. Lo anterior no puede ser clasificado netamente como cambio cultural, ya que genes y cultura pueden coevolucionar para determinar cambios en los hábitos alimenticios. [2]

La dieta de nuestros ancestros era incuestionablemente superior a la dieta moderna [3]. Hoy en día, sin embargo, no es posible realizar generalizaciones en cuanto a hábitos alimenticios debido a que en algunos países o regiones del planeta la alimentación es mucho mejor que en otras. La comida tradicional Japonesa y la dieta Mediterránea son ejemplos a seguir dado su alto consumo y variedad de vegetales. Diversos experimentos han demostrado que mientras más variada es la alimentación, mejor es la salud debido a que la ingesta de nutrientes esenciales y fitoquímicos es mayor. [4]

Durante los últimos años se ha impuesto un nuevo paradigma alimenticio, en donde llevar una dieta balanceada ha cobrado mayor importancia. Por otro lado, hoy en día, las enfermedades cardíacas continúan siendo la primera causa de muerte en los países en desarrollo, seguidas del cáncer, osteoporosis, artritis, entre otras. Debido a lo anterior, muchas personas están buscando productos alternativos que resulten beneficiosos para la salud humana y que ayuden a prevenir dichas enfermedades, como por ejemplo los alimentos nutraceuticos.

## 1.2 Industria nutraceutica

La palabra nutraceutico es un acrónimo de las palabras “nutrición” y “farmaceutica”. Estos compuestos son una clase emergente de productos bioactivos de origen natural que bordean la línea entre los alimentos y los medicamentos, y que proveen beneficios a la salud humana, incluyendo la prevención o tratamiento de enfermedades [5]. Aunque el consumo de estos compuestos tiene una larga historia, sólo recientemente existe evidencia científica de sus beneficios nutricionales y médicos. Los nutraceuticos de origen animal y vegetal han originado oportunidades para la creación de nuevos productos por parte de la industria alimenticia.

Los nutraceuticos se encuentran en una amplia variedad de productos nuevos provenientes de la industria alimenticia, el mercado de los suplementos a base de hierbas y la industria farmaceutica. Además, estos bioactivos cubren una amplia gama de áreas terapéuticas tales como anti-artríticos, tratamiento de trastornos del sueño, prevención de ciertos tipos de cáncer, osteoporosis, presión arterial, control del colesterol, analgésicos, diabetes, entre muchos otros. (Figura 1) [6]

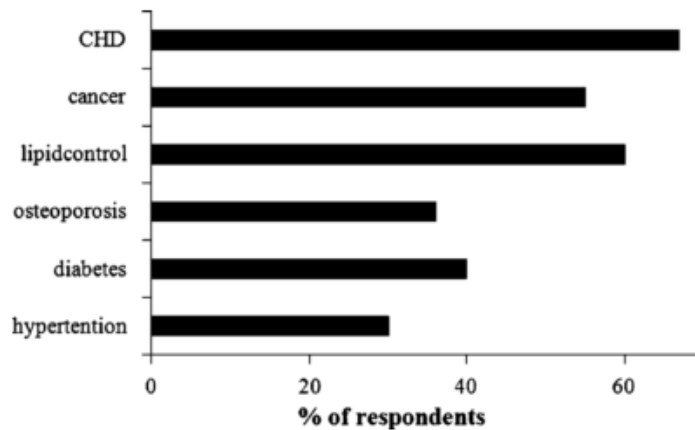


Figura 1: Áreas terapéuticas cubiertas por producto nutracéuticos.

Los nutracéuticos pueden ser clasificados dependiendo de su origen como:

### **Fibra dietética**

Corresponde a los compuestos de alimentos de origen vegetal que no son hidrolizados por las enzimas secretadas en el tracto digestivo, sino que son digeridas por la microflora presente en el intestino. Incluye los polisacáridos no almidonados, como celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina y otros. Dentro de los beneficios de la fibra que se han podido comprobar, se encuentra la disminución del colesterol LDL, la disminución del riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, hipertensión, diabetes, obesidad y ciertos trastornos gastrointestinales. Además, mejora los valores de concentraciones de lipoproteínas en la sangre, reduce la presión arterial y mejora los niveles de glucosa en la sangre. [7]

### **Probióticos**

Son aquellos microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidades adecuadas afectan beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal. El consumo de probióticos disminuye el riesgo de alergias, asma, cáncer e infección en los oídos y tracto urinario. [7]

### **Prebióticos**

Son compuestos que afectan beneficiosamente al huésped mediante la alteración selectiva de la composición o metabolismo de la microbiota intestinal. Sus beneficios a la salud incluyen aumento de la tolerancia a la lactosa, propiedades antitumorales, neutralización de toxinas, estimulación del sistema inmune, reducción de los niveles de colesterol y lípidos en la sangre, etc. [8]

### **Ácidos grasos poliinsaturados**

También llamados ácidos grasos esenciales, son aquellos introducidos externamente a través de la dieta, como por ejemplo, los omega 3. Estudios sugieren que estos compuestos previenen enfermedades cardiovasculares y trombosis, además de presentar beneficios en otras áreas de la salud como el asma, desordenes bipolares y depresivos, dismenorrea y diabetes. [9]

## **Vitaminas antioxidantes**

Son las vitamina C, vitamina E y carotenoides. Actúan principalmente en la prevención de enfermedades degenerativas, cáncer, enfermedades cardiovasculares y cataratas, entre otros. [10]

## **Polifenoles**

Estos compuestos forman un gran grupo de fitoquímicos, que son producidos por las plantas como metabolitos secundarios para protegerlas del estrés fotosintético. Existen alrededor de 8.000 clases diferentes de polifenoles, siendo los más importantes los flavonoles, flavonas, flavononas y las antocianinas. Incluir estos fitoquímicos en la dieta podría resultar muy beneficioso, ya que existe evidencia *in vitro* que sugiere que pueden afectar en numerosos procesos celulares como la expresión genética, apoptosis, agregación plaquetaria y señales intercelulares, que pueden implicar efectos anticancerígenos y antiaterogénicos. [11]

Por otro lado, estos compuestos también tienen propiedades antioxidante, antiinflamatorias, antimicrobianas, cardioprotectoras y también juegan un rol en la prevención de enfermedades neurodegenerativas y la diabetes mellitus. [12]

## **Espicias**

Son complementos alimenticios utilizados desde hace miles de años para mejorar la calidad sensorial de los alimentos. Estos imparten sabor, aroma y color a los alimentos. Investigaciones recientes han revelado que la ingesta de estos compuestos trae beneficios a la salud humana debido a su efecto antioxidante, quimiopreventivo, antimutagénico y antiinflamatorio, entre otros. [13]

## **1.3 Polifenoles: Antocianinas**

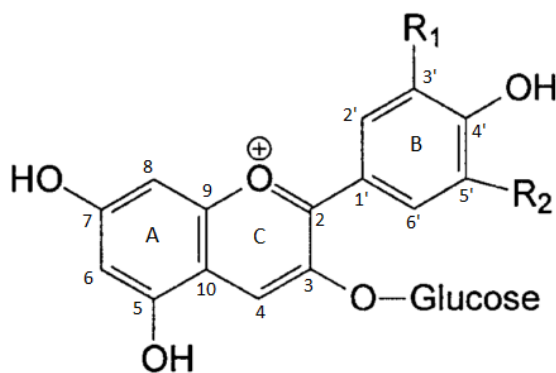
Las antocianinas (Figura 2) son pigmentos hidrosolubles, pertenecientes a la familia de los polifenoles llamados flavonoides. Son metabolitos secundarios sintetizados por plantas superiores y almacenadas en vacuolas dentro de sus células. Hasta la fecha existen aproximadamente 635 tipos de antocianinas identificadas en la naturaleza, y son responsables de los colores azul, violeta y rojo de muchas frutas, vegetales y flores. Las antocianinas son importantes para las plantas debido a que sus colores atraen a los animales ayudando a dispersar las semillas y a polinizar. Además, debido a su poderosa absorción de luz, se cree que cumplen un rol fundamental en la protección de las plantas en contra de los daños inducidos por la luz ultravioleta (UV). [14]

Actualmente, las antocianinas son utilizadas como colorantes principalmente en la industria de las bebidas. En la medida que el público toma mayor conciencia sobre los efectos dañinos de los colorantes sintéticos, los consumidores y fabricantes demandan colorantes de fuentes naturales.

Desde el punto de vista de su estructura química, las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, conocida como aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico (glicona). A su vez, la aglicona está formada por un esqueleto que consiste de dos anillos bencénicos unidos mediante un anillo heterocíclico con oxígeno (núcleo flavilio). Todas

las antocianidinas se encuentran hidroxiladas en las posiciones 3, 5 y 7, pero difieren en la sustitución del anillo B. Debido a la deslocalización electrónica, en la medida que aumenta el número de sustituyentes de la antocianidina, el catión flavilio absorbe a longitudes de onda mayores, desde 520 nm la pelargonidina hasta 546 nm la delfinidina. Así mismo, la metilación de los grupos hidroxilo provoca el desplazamiento de la absorción máxima (efecto batocrómico), por lo tanto la malvidina y petunidina absorben a 542 y 543 nm, en lugar de 546 nm en la delfinidina. [15]

Se han identificado cerca de 25 agliconas (antocianidinas), los cuales difieren en sus patrones de hidroxilación y metilación en diferentes posiciones de los anillos. Sin embargo, solo seis de ellos se encuentran comúnmente en la naturaleza y cerca del 95% de las antocianinas derivan a partir de estas seis antocianidinas: pelargonidina (Pg), cianidina (Cy), delfinidina (Dp), peonidina (Pn), petunidina (Pt) y malvidina (Mv) [14]. Cabe destacar, que las antocianidinas raramente se encuentran libres en la naturaleza debido a su baja estabilidad y posible reactividad.



Antocianina	R1	R2
Pelargonidina-3-O-monoglucósido	H	H
Cianidina-3-O-monoglucósido	OH	H
Delfinidina-3-O-monoglucósido	OH	OH
Peonidina-3-O-monoglucósido	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina-3-O-monoglucósido	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina-3-O-monoglucósido	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Figura 2: Estructura básica general e individual de algunas antocianinas glicosiladas.

Se han encontrado cinco monosacáridos que forman parte de las antocianinas, los cuales se presentan en el siguiente orden de abundancia: glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa y arabinosa. Estos azúcares se unen a la antocianidina primeramente por medio del hidroxilo de la posición 3, y en segundo lugar, en las posiciones 5 o 7. De acuerdo al número de azúcares que presente la molécula, se denominan monóxidos (posición 3), bióxidos (posición 3 y 5) y trióxidos (dos en la posición 3 y una en posición 5). La glicosilación también tiene un efecto batocrómico y además, aumenta la solubilidad y estabilidad de las moléculas, debido a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. [15] [16]

Las antocianinas son moléculas muy sensibles a los cambios de pH debido a que el núcleo flavilio es deficiente en electrones y, por ende, muy reactivo. Cuando las frutas

maduran cambian de pH, y como consecuencia cambia su coloración. Estos cambios en la coloración de las antocianinas se deben a modificaciones en su estructura que muchas veces son reversibles, lo que hace que estas moléculas sean excelentes indicadores de pH. A pH ácidos (pH < 2) adquieren una estructura estable de catión flavilio de color rojo. A valores de pH entre 3 y 6 ocurre una rápida hidratación del catión flavilio en la posición C-2 de la molécula, lo que genera un equilibrio entre la pseudobase carbinol y la estructura chalcona de cadena abierta, ambas incoloras. A pH 7 y superiores, debido a la desprotonación continua, predominan las formas quinoidales de colores púrpura en donde el efecto batocrómico es considerable. Lo anteriormente descrito se esquematiza en la Figura 3. [14] [15]

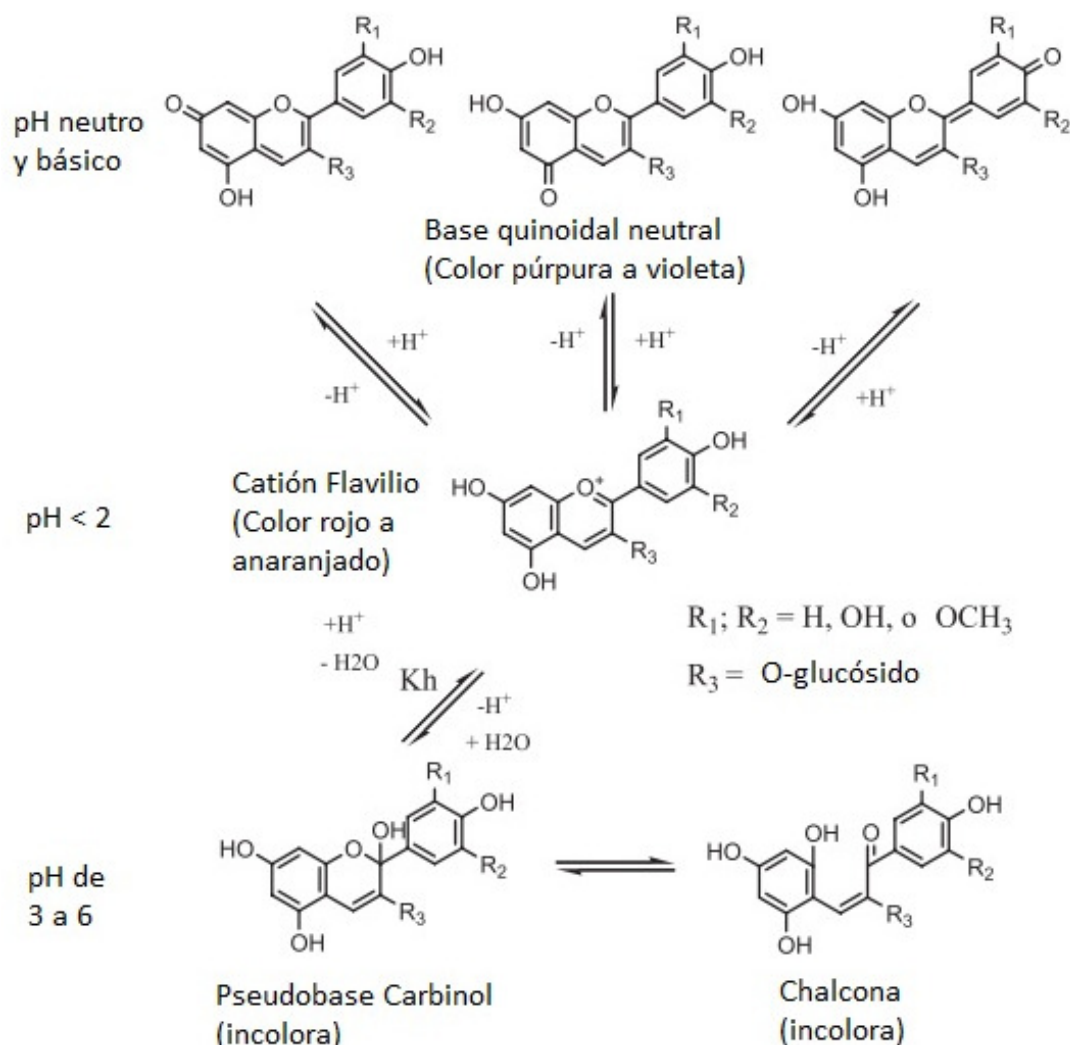


Figura 3: Esquema de la conversión estructural dependiente de pH entre formas dominantes de antocianinas monóxidos en fase acuosa. [14]

Fuentes de antocianinas comestibles presentes en la naturaleza incluyen frutas, como por ejemplo arándano, maqui, cereza, uva, granada y ciruela; y también, en muchos vegetales de color oscuro, como la cebolla morada, rábano rojo, berenjena, maíz morado, repollo morado, entre otras. Si bien las antocianinas comúnmente se acumulan en las



flores y frutos, también se encuentran presentes en tallos, hojas y órganos de almacenamiento. El contenido total de antocianinas varía sustancialmente entre las diferentes especies de plantas e incluso de cultivares. La información disponible muestra que las plantas poseen un amplio rango de contenido de antocianinas, en donde las bayas proveen la mayor cantidad por porción. Además, los factores medioambientales como la luz, temperatura y altitud también afectan la concentración de antocianinas de manera considerable.

En cuanto a la toxicidad de las antocianinas, ningún impacto adverso en la salud de animales ni humanos ha sido reportado en relación a la administración oral de antocianinas en la comida. El uso de antocianinas a partir de fuentes naturales en alimentos es ampliamente permitido en Europa (E163), Japón, Estados Unidos, entre otros países [17] [14]. En el año 1982, se estimó que el consumo diario de antocianinas aceptado para seres humanos (ADI) es de aproximadamente 2,5 mg·kg<sup>-1</sup> de peso corporal [18].

### 1.3.1 Biosíntesis general de Antocianinas

La ruta de biosíntesis de las antocianinas (Figura 4) es una ruta ya descrita tanto a nivel genético como enzimático. Estas moléculas son sintetizadas a través de la ruta de los flavonoides y su biosíntesis puede ser dividida en dos secciones, la ruta río arriba básica de los flavonoides y la ruta río abajo específica de cada antocianina. Existen diversos estudios que han revelado que la ruta río arriba básica de los flavonoides está restringida en muchas plantas y que una vasta familia de genes codifica las enzimas que actúan en esta ruta, mientras que las enzimas que actúan en la ruta específica de las antocianinas son codificadas por un solo gen activo [19] [20]. La ruta de los flavonoides comienza con la fenilalanina, producido vía la ruta del shikimato y es transformado a 4-Cumaril-CoA. Luego, la enzima clave, chalcona sintasa (CHS) produce una naringenina-chalcona por medio de la condensación de una molécula de 4-Cumaril-CoA y tres moléculas de malonil-CoA (derivada del citrato producido en el ciclo de Krebs). En este caso los anillos A y C de la molécula derivan de la ruta del acetato, mientras el anillo B deriva de la ruta del shikimato. Posteriormente, una chalcona isomerasa (CHI) convierte estereoespecíficamente la naringenina-chalcona en su isómero naringenina. Después, el anillo B de la naringenina sufre de hidroxilaciones por medio de las enzimas flavanona 3'-hidroxilasa (F3'H), flavanona 3'5'-hidroxilasa (F3'5'H) o flavanona 3β-hidroxilasa (F3H). Posteriormente, los dihidroflavonoles obtenidos son reducidos por medio de la enzima dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) a la leucoantocianidina correspondiente. Luego de esta reducción, la antocianidina sintasa (ANS) oxida las leucoantocianidinas a su antocianidina correspondiente. Dado que las antocianidinas son inestables bajo las condiciones fisiológicas, estas son inmediatamente glicosiladas a antocianinas por medio de la enzima UDP glucosa: flavonoide-3-glicosil transferasa (UFGT). Las antocianinas que contienen antocianidinas metiladas (peonidina, petunidina y malvidina) como aglicona, pueden ser obtenidas mediante la metilación del grupo hidroxilo en el anillo B de las cianidina-3-O-glucósido, delfinidina-3-O-glucósido y petunidina-3-O-gluósido por medio de la enzima O-metiltransferasa (OMT). Además, las antocianinas pueden sufrir futuras acilaciones por medio de la acción de enzimas antocianina aciltransferasas (ACT) [20] [21].

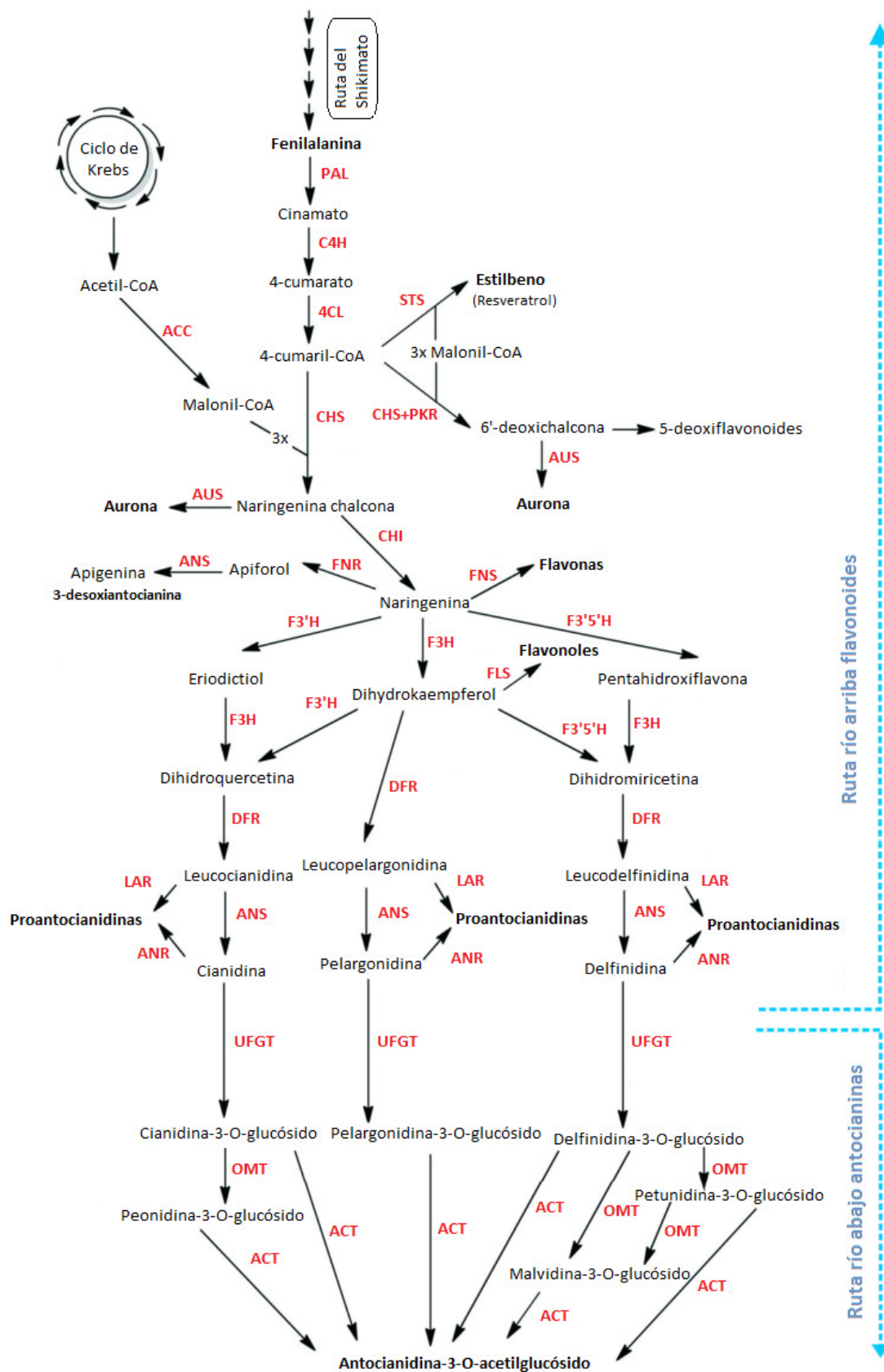


Figura 4: Ruta de biosíntesis general de flavonoides y antocianinas [20].

Otro aspecto importante a mencionar con respecto a las antocianinas, es que luego de su síntesis, éstas son transportadas y guardadas en vacuolas dentro de la célula. Dentro de la vacuola, las antocianinas pueden unirse a proteínas específicas formando cuerpos intravacuolares, denominados inclusiones vacuolares antociánicas (anthocyanic vacuolar inclusions, AVI) [20].

### 1.3.2 Beneficios para la salud humana

Un vasto número de estudios se ha llevado a cabo para demostrar los efectos en la salud humana de los polifenoles, utilizando modelos tanto *in vivo* como *in vitro*. Las antocianinas son uno de los polifenoles más abundantes en frutas y verduras y son conocidos por poseer una fuerte actividad antioxidante.

Cabe destacar que las concentraciones de polifenoles varían considerablemente entre las frutas. Por ejemplo, los arándanos contienen principalmente proantocianidinas, mientras las moras, frambuesas negras, frambuesas y fresas contienen principalmente elagitaninos. La estructura química de los compuestos presentes en una fruta puede contribuir significativamente en sus propiedades biológicas [22].

A continuación se describen los principales beneficios asociados al consumo de antocianinas.

#### 1.3.2.1 Disminución del estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen radicales libres, iones de oxígeno y peróxidos, se generan normalmente en el organismo y son importantes para el sistema inmune, las señales celulares y otras funciones normales del cuerpo. Sin embargo, si estas moléculas se producen en exceso pueden provocar daño celular, desencadenando enfermedades degenerativas, inflamación (aguda o crónica), enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento. [14]

Se ha demostrado mediante experimentos *in vitro* que las antocianinas son potentes antioxidantes que capturan los radicales libres y terminan la cadena de reacciones responsable del daño oxidativo. Por medio de ensayos de la capacidad de absorción de radicales libres, por ejemplo el ensayo ORAC, se ha determinado la actividad antioxidante de diversas antocianinas a pH neutro, en donde se ha demostrado que todas ellas tienen igual o hasta 3,5 veces la capacidad antioxidante que el antioxidante más vendido Trolox ® (análogo de la vitamina E) [23].

#### 1.3.2.2 Prevención de enfermedades cardiovasculares.

La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) gatilla la acumulación de macrófagos de leucocitos en las paredes arteriales. La ruptura de la placa de ateroma<sup>1</sup> de las paredes arteriales gatilla la aterosclerosis y eventualmente enfermedades

---

<sup>1</sup> Degeneración de las paredes arteriales debido al depósito de placas lipídicas, principalmente colesterol, que posteriormente pueden ulcerarse y calcificarse. [143]

cardiovasculares. Una dieta rica en antocianinas tiene el potencial de incrementar la capacidad antioxidante del suero sanguíneo y por ende proteger contra la oxidación de las LDL y prevenir enfermedades cardiovasculares. [14]

En un modelo en donde se utilizó radiación UV para inducir la peroxidación de lípidos, tres antocianinas purificadas (Pg-3-glu, Cy-3-glu y Dp-3-glu) demostraron una fuerte inhibición de la peroxidación de éstos, además de actuar como agentes eliminadores de radicales de oxígeno. [24]

### 1.3.2.3 Actividad antiinflamatoria.

La inflamación se define como una reacción defensiva local de los tejidos frente a estímulos nocivos de naturaleza muy diversa (físicos, químicos y microorganismos como bacterias, hongos y parásitos) [25]. Este proceso está mediado por muchas enzimas y la ruta más común en la respuesta inflamatoria incluye a las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX1, COX2) y 5-lipoxigenasa (5-LOX). Está comprobado que la inhibición de estas enzimas utilizando diferentes drogas alivia los síntomas de la inflamación [26].

Existen diferentes estudios asociados a los efectos anti-inflamatorios de las antocianinas, particularmente de las delfinidinas, en la inhibición de las enzimas COX y LOX.

Por ejemplo, se ha reportado que utilizando una concentración de delfinidinas de 40  $\mu\text{M}$  se inhibe hasta un 12% las enzimas COX-1 y COX-2, en comparación a los anti-inflamatorios comunes como el ibuprofeno que alcanza una inhibición del 40% cuando se aplica una concentración de 10  $\mu\text{M}$  [27]. Un estudio similar, reportó un 49% de inhibición de COX-1 y COX2, empleando una concentración de delfinidinas de 100  $\mu\text{M}$  [28].

También, existen estudios que reportan que las delfinidinas inhiben la expresión de COX-2 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) [29], mientras otros estudios muestran que las delfinidinas bloquean la activación por radiación ultravioleta UVB del factor de transcripción NF- $\kappa$ -B, y que por lo tanto, inhiben la expresión de COX-2 inducida por NF- $\kappa$ -B [30] [26].

### 1.3.2.4 Actividad anticarcinogénica.

La actividad anticarcinogénica de las antocianinas ha sido vastamente comprobada en sistemas *in vitro*. Por ejemplo, en un estudio se aislaron cuatro antocianinas a partir de frutillas y todas ellas demostraron una reducción en la viabilidad de células de cáncer oral (CAL-27, KB), de colon (HT29, HCT-116) y de próstata (LNCaP, DU145) a una dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  [31]. Además, el resultado de diversos estudios muestra que los efectos antiproliferativos de las diferentes antocianinas en el cáncer de colon, son altamente dependientes de la estructura de los pigmentos, incluyendo el tipo de aglicona y los patrones de glicosilación y acilación [32].

La actividad anticarcinogénica de las antocianinas puede atribuirse a efectos aditivos de múltiples mecanismos, en los diferentes estados del proceso carcinogénico [33]. Algunos mecanismos que se han estudiado son la actividad antimutagénica [34], la inhibición del daño oxidativo del ADN [35], la detención del ciclo celular [36], la

inhibición de las enzimas COX-2, la inducción de la apoptosis [37] [38] y la antiangiogénesis [39].

#### 1.3.2.5 **Prevención de la obesidad.**

El consumo de antocianinas puede aminorar la función de los adipocitos y, por ende, prevenir la obesidad [40]. En un estudio, 24 ratones machos fueron alimentados durante 12 semanas con extracto de maíz morado, alimento alto en grasas y alimento alto en grasas más maíz morado. La suplementación con maíz morado suprimió la ganancia de peso corporal y de tejido adiposo marrón y blanco, inducida por la dieta alta en grasas [41]. En otro estudio, se demostró que las antocianinas presentes en los granos de soja negra revierten la ganancia de peso de un grupo de ratas con una dieta alta en grasas [42]. Asimismo, se observó una reducción en los niveles de triglicéridos y colesterol LDL, mientras el colesterol HDL aumentó su concentración.

#### 1.3.3 **Biodisponibilidad y metabolismo**

La biodisponibilidad puede definirse como la proporción de nutrientes que se digiere, absorbe y metaboliza a través de una ruta normal [43]. Este concepto es relevante, dado que los nutrientes más abundantes no siempre son los más activos en el organismo, ya sea debido a que poseen una menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente. Asimismo, los metabolitos encontrados en la sangre u órganos, que son resultado de la actividad digestiva o hepática, pueden diferir del compuesto nativo en términos de su actividad biológica [44].

Generalmente, los polifenoles se metabolizan a través de una secuencia de reacciones común para todos ellos. Las agliconas pueden ser absorbidas en el intestino delgado. Sin embargo, la mayoría de los polifenoles se encuentran en los alimentos en la forma de ésteres, glucósidos u otros polímeros que no pueden ser absorbidos en su forma nativa. Estas moléculas son hidrolizadas por las enzimas intestinales o por la microflora del colon antes de que puedan ser absorbidas. Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren reacciones de conjugación en las células del intestino delgado y posteriormente en las células hepáticas; este proceso incluye metilación, sulfatación y glucuronidación [44]. Diversos estudios *in vivo* han sugerido que solo el 5% del total de polifenoles ingeridos diariamente son absorbidos en el duodeno [45], y de ese porcentaje, solo el 5% alcanza el torrente sanguíneo sin cambios en su estructura [46]. Los polifenoles no ingeridos llegan al colon, donde son fermentados por la microflora y dan lugar a metabolitos que se absorben y aparecen como derivados conjugados en el plasma. Una vez absorbidos y metabolizados, los polifenoles pueden volver al duodeno a través de la circulación enterohepática, prolongando su presencia en el organismo. [44] [46]

El estado de glicosilación de los polifenoles influye sobre su nivel de absorción en el intestino, ya que deben de ser hidrolizados por las enzimas intestinales como por ejemplo la lactasa-floridzina hidrolasa (hidrólisis extracelular) o la  $\beta$ -glucosidasa (hidrólisis intracelular). En consecuencia, los polifenoles glucosilados se absorben con mayor facilidad que los que poseen otro tipo de glicosilación, como aquellos conjugados con moléculas de ramnosa, que son hidrolizados por las enzimas de la microflora del colon [46] [47].

Para validar los efectos positivos en la salud de las antocianinas, que han sido revelados en los diversos estudios que se han llevado a cabo en modelos *in vitro*, es importante considerar la biodisponibilidad de las moléculas *in vivo*. En general, los niveles de antocianinas detectados en el plasma y la orina luego de su ingesta son bastante bajos [14].

Por ejemplo, en cuanto a la absorción gástrica de las antocianinas, existe un estudio en donde se inyectaron antocianinas de uvas en el estómago de 19 ratas macho cuyo cardias<sup>2</sup> había sido bloqueado quirúrgicamente. Luego, se recolectaron muestras de sangre de la vena porta y del corazón en un intervalo de 6 min. La cuantificación de estos pigmentos, reveló la presencia de Mv-3-glu en ambas muestras de sangre a partir de los 6 min, presentando evidencia de absorción a nivel estomacal [48] [14].

## 1.4 Delfinidinas y sus propiedades farmacológicas

Las delfinidinas (Figura 5) son una clase de antocianidinas presentes en las vacuolas de los tejidos epidermales de flores y frutos. Estas moléculas se encuentran en muchas frutas, vegetales y suplementos alimenticios y se ha demostrado que poseen importantes efectos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro*, como por ejemplo, propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anti-inflamatorias, anticarcinogénicas, neuroprotectoras, etc. [49].

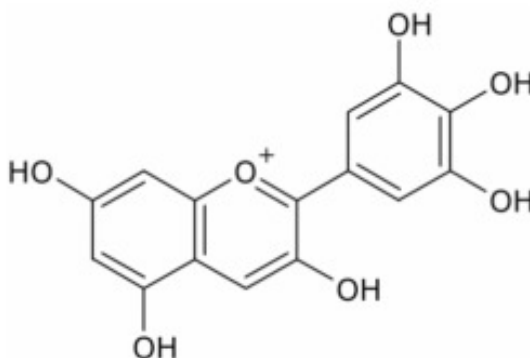


Figura 5: Estructura química de las delfinidinas [50]

Actualmente, las delfinidinas son consideradas agentes potenciales para el consumo humano, de especial interés para la industria de nutraceuticos para ser aplicadas como estrategia de prevención contra desórdenes metabólicos, cáncer, enfermedades oculares, entre otras.

A continuación se describen las propiedades farmacológicas más relevantes de las delfinidinas.

---

<sup>2</sup> «En los vertebrados terrestres, orificio que sirve de comunicación entre el estómago y el esófago.»

### 1.4.1 Actividad anticarcinogénica

Existen diversos estudios que sugieren que las delfinidinas poseen una función supresora de tumores, que pueden inducir la apoptosis y que pueden tener un rol potencial en la inhibición de la angiogénesis<sup>3</sup> en diferentes tipos de cáncer [26]. Además, se ha comprobado que las propiedades antioxidantes de las delfinidinas suprimen el crecimiento tumoral [50].

Por ejemplo, variados reportes evidencian que las delfinidinas presentes en “berries” inducen apoptosis en células de leucemia HL60 [26] [51], carcinoma uterino, adenocarcinoma de colon [52], hepatoma [53] y células HCT116 de cáncer al colon [54].

Asimismo, existen estudios que muestran que las delfinidinas poseen efecto citotóxico en células metastásicas de cáncer colorrectal [49] [55].

### 1.4.2 Actividad neuroprotectora

Se ha investigado el efecto neuroprotector de las delfinidinas contra la toxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide. Los resultados de este estudio mostraron que las delfinidinas rescataron células PC12 por medio de la atenuación de la elevación de los niveles de calcio intracelular [56]. Además, en otro estudio se evaluó el efecto de delfinidinas extraídas de *Vaccinium myrtillus* contra el daño de células ganglionares de la retina (RGCs). Los resultados de este estudio demostraron que las delfinidinas inhiben significativamente la neurotoxicidad en las células de un modo dependiente de su concentración [49].

### 1.4.3 Efecto antiinflamatorio

Se ha comprobado que las delfinidinas, particularmente las aisladas de *Punica granatum*, inhiben específicamente la actividad de la Histona acetiltransferasa (HAT) de la familia del coactivador P300/CBP. Además, las delfinidinas inhiben la acetilación en células MH7A, una línea celular humana de artritis reumatoide sinovial [49].

## 1.5 *Aristotelia chilensis*

*Aristotelia chilensis* (Mol) STUNZ, comúnmente conocido como maqui, corresponde a una especie vegetal perenne, del grupo de las dicotiledóneas y de la familia de las Eleoocarpáceas endémica de Chile, que crece en el Centro y Sur del país y que también ha sido encontrado en el Archipiélago Juan Fernández y en Argentina. Es un árbol dioico pequeño, que alcanza una altura aproximada de entre 4-5 [m] y que crece en suelos húmedos ricos en materia orgánica. Sus ramas son abundantes, delgadas y flexibles de color pardo rojizo, su corteza es lisa y sus hojas son de forma ovalada, con bordes

---

<sup>3</sup> «Proceso fisiológico de formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes; es normal en el proceso embrionario, crecimiento, cicatrización, etc., pero es patológico en la formación de tumores malignos.» [142]

aserrados y de 3 a 7 [cm] de longitud. Sus flores florecen entre los meses de Septiembre y Diciembre, son pequeñas y amarillas, y se presentan en racimos cortos (Figura 6 (a)). Su fruto es una baya carnosa comestible de aproximadamente 4 [mm] de diámetro, verde cuando es inmadura y negro violáceo cuando madura en verano, entre los meses de Diciembre y Febrero (Figura 6 (b)). [57] [58]

Este fruto ha comenzado a tomar notoriedad en el mundo de los alimentos debido a sus interesantes propiedades beneficiosas para la salud humana, siendo catalogada por la industria de los nutraceuticos norteamericanos como una “Súper Baya”. Dicha nominación se debe a sus potentes capacidades antioxidantes, presentando los mayores índices de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (valor ORAC) entre las frutas y verduras presentes en el mercado. Esto se presenta en el gráfico de la Figura 7. [26]



Figura 6: Fotografías de *A. chilensis* (a) Flores de maqui (b) Fruto de maqui.

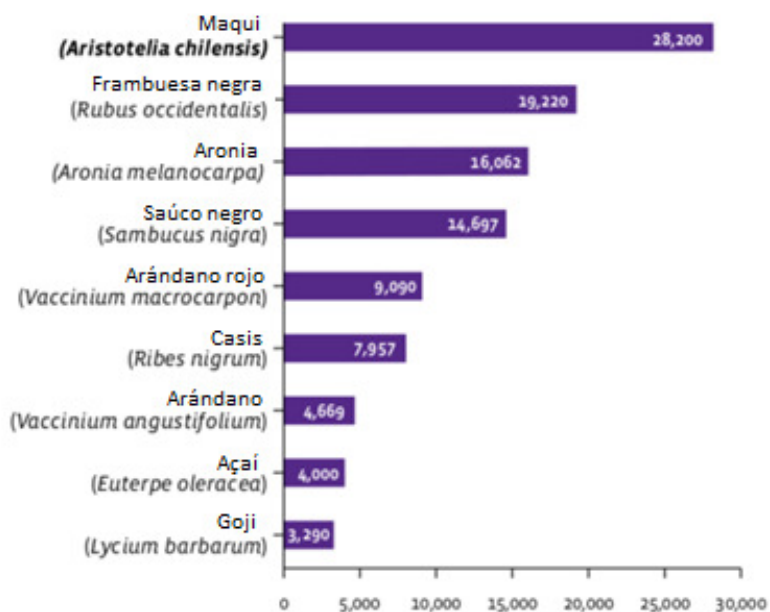


Figura 7: Índice ORAC de diferentes Bayas del mercado.



Análisis fotoquímicos del maqui han revelado que este fruto presenta elevadas concentraciones de delfinidinas, una antocianina implicada en la formación de la pigmentación azul y protección de las plantas contra la luz ultravioleta (UV). Recientemente, se ha demostrado que las delfinidinas glicosiladas son los principales responsables de la capacidad antioxidante del maqui, presentando el doble de capacidad antioxidante que el principal antioxidante sintético comercial (Trolox) por unidad de masa. [59]

El maqui contiene un 0,2% de antocianinas, que se subdividen en ocho pigmentos dependiendo de su grado de glicosilación:

1. Delfinidina 3-sambubiósido-5-glucósido;
2. Delfinidina 3,5-diglucósido;
3. Cianidina 3-sambubiósido-5-glucósido;
4. Cianidina 3,5-diglucósido;
5. Delfinidina 3-sambubiósido;
6. Delfinidina 3-glucósido;
7. Cianidina 3-sambubiósido;
8. Cianidina 3-glucósido.

El 73% de las antocianinas previamente mencionadas corresponden a delfinidinas, y el 37% restante a cianidinas, siendo la principal delfinidina 3-sambubiósido-5-glucósido (34% de las antocianinas totales) (Figura 8). El promedio total de contenido de antocianinas es de  $137,6 \pm 0,4$  mg/100g de fruta fresca ( $211,9 \pm 0,6$  mg/100g de fruta seca) [60]. Adicionalmente, la fruta contiene un elevado contenido de minerales ya que 100 gr de maqui proveen el 27% de la dosis recomendada de calcio por día, 70% del hierro y 28% del potasio. [61]

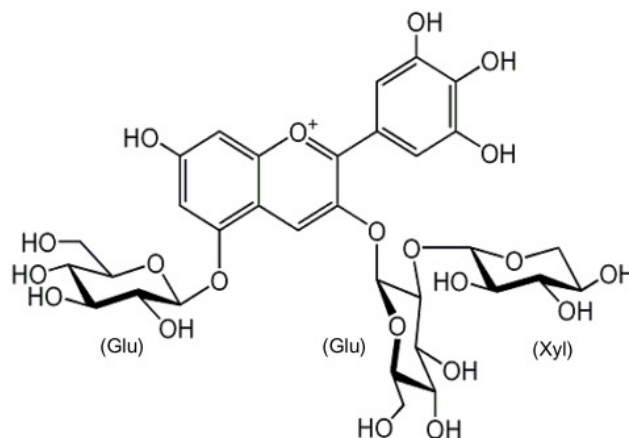


Figura 8: Estructura de la antocianina delfinidina 3-sambubiósido-5-glucósido.

### 1.5.1 Estudios asociados a los beneficios del maqui

A lo largo de la historia, el maqui ha sido ampliamente utilizado en la medicina natural indígena como antidiarreico, desinflamante, cicatrizante, diaforético, expectorante, diurético y purgante [62]. Hoy en día, sus propiedades conocidas popularmente han sido estudiadas y validadas en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*.

En cuanto a su actividad analgésica y antiinflamatoria, los frutos de *A. chilensis* han confirmado poseer efectos antiinflamatorios muy importantes, demostrados por medio de un modelo de inflamación en roedores por inducción con TPA (12-deoxiforbol-13-decanoato) [63].

En relación a su actividad antioxidante, el fruto de maqui demostró, mediante un modelo *in vitro*, que es capaz de evitar la peroxidación lipídica inducida por cobre sobre células endoteliales humanas [64]. Además, los polifenoles del fruto actúan en la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, lo cual resulta benéfico para los paciente diabéticos [65]. Asimismo, existe evidencia de que el tratamiento con extracto de maqui rico en delfinidinas produce una reducción significativa de la concentración basal de glucosa en el suero de ratas diabéticas, después de 4 meses de tratamiento [66].

También, se han analizado los efectos anticancerígenos de un concentrado del fruto. Para esto, se evaluó los efectos sobre la expresión de ciclooxigenasa (COX)-2, vías de señalización y viabilidad en células de cáncer de colon. El tratamiento de células Caco-2 con *A. chilensis* por 24 h redujo la expresión de COX-2 y disminuyó la actividad luciferasa regulada por NF- $\kappa$ B. Además, el extracto no afectó la viabilidad celular [67].

En cuanto a la biodisponibilidad de las antocianinas de maqui, si bien aún no existen estudios *in vivo*, la forma no acetilada y no conjugada de sus antocianinas pueden significar una mayor biodisponibilidad, debido al aumento en la estabilidad estructural y solubilidad de las moléculas. Sin embargo, se requieren más estudios en esta área para asegurar su absorción en el organismo y, por ende, sus efectos beneficiosos en el ser humano.

## 1.6 Técnicas de cultivo de plantas *in-vitro*

Los cultivos de tejidos o células vegetales, también conocidos como cultivos *in vitro* o cultivos estériles, son una importante herramienta para el estudio tanto básico como aplicado, así como también en las aplicaciones comerciales que se le pueden dar a las plantas. El término cultivo de tejido vegetal, se refiere al conjunto heterogéneo de técnicas en los que un explante, es decir, una parte separada del vegetal como células, tejidos u órganos, es cultivado asépticamente en un medio artificial de composición química determinada y es incubado en condiciones ambientales controladas [68].

El cultivo de tejidos vegetales se originó a partir de la investigación sobre las hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo vegetal. Este conocimiento, combinado con las técnicas básicas de microbiología, dio origen a la tecnología por la cual las plantas u órganos de plantas se pueden multiplicar en gran número y de modo controlado [69].

El punto de partida para el cultivo de tejidos vegetales es el proceso por el cual se traspasa material vegetal *in vivo* a un medio de cultivo estéril. Este procedimiento requiere la disección de la planta bajo condiciones estrictamente asépticas con la finalidad de transferir el material dentro de un recipiente estéril sin introducir microorganismos contaminantes. Las células y tejidos que crecerán y se desarrollarán dependerán de los objetivos del cultivo, en algunas ocasiones las células conformarán una masa aparentemente desorganizada, conocida como callo, y en otras ocasiones estarán presentes estructuras definidas como tallos, órganos, raíces, bulbos, etc. [69]

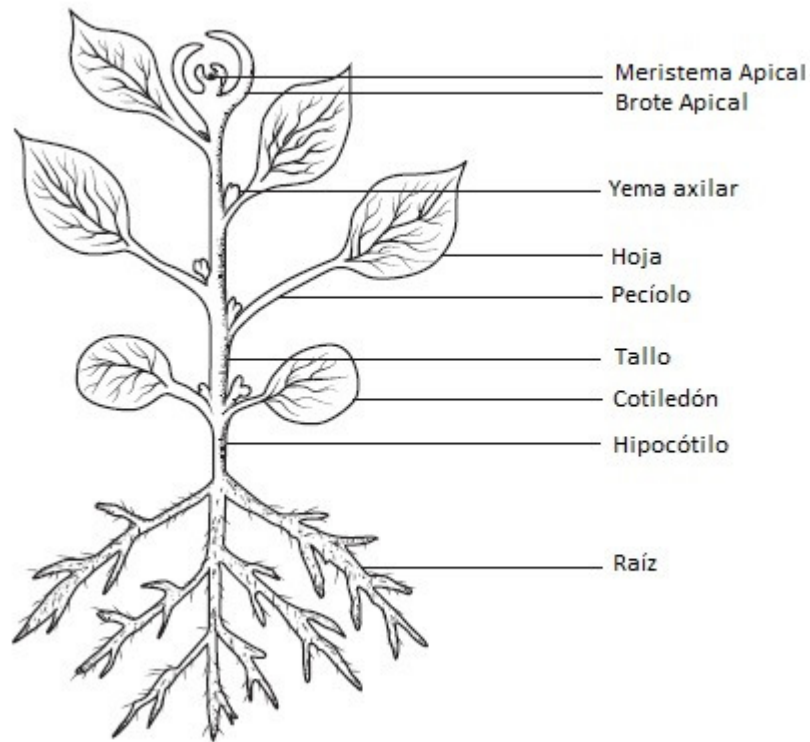
Resulta esencial mantener la esterilidad del medio ambiente confinado en el recipiente, debido a que cualquier microorganismo que ingrese crecerá a una velocidad mucho más rápida que los tejidos vegetales y eventualmente colonizarán y matarán a los tejidos.

### 1.6.1 Micropropagación

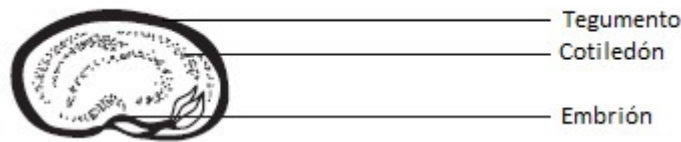
La micropropagación, o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*. Es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente de forma rápida, eficiente y en grandes cantidades. A través de la micropropagación, a partir de un explante de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas. El explante más utilizado para el proceso de propagación clonal son las yemas vegetativas de las plantas (ver Figura 9 (a)). Los frascos que contienen las plantas *in vitro* se ubican en estanterías con luz artificial dentro de una cámara de crecimiento, en donde la temperatura varía entre los 21 y 23°C, además de controlar las horas de luz, generalmente con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Por otra parte, el medio de cultivo consiste en una mezcla de vitaminas, sales minerales, reguladores de crecimiento, agua, azúcar y agar. La composición específica del medio dependerá de la especie vegetal y del objetivo de la micropropagación [70] [71].

Otra técnica utilizada para la introducción de plantas *in vitro* consiste en el cultivo de embriones cigóticos. En el caso de las plantas, el embrión cigótico es una estructura multicelular que se ubica dentro de la semilla (ver estructura de semilla en Figura 9 (b)), dotado con la potencialidad de formar una nueva planta. La técnica de cultivo de embriones cigóticos se utiliza cuando las semillas presentan un estado denominado dormancia, en donde no son capaces de germinar aun cuando se encuentran en condiciones favorables. Este fenómeno se debe a diferentes factores como por ejemplo, la inmadurez del embrión (dormancia interna) o la presencia de una cubierta dura (tegumento) que protege a la semilla y no permite la entrada del agua o el oxígeno hasta el embrión (dormancia externa). Cuando la dormancia es externa, es posible superar este estado por medio de la escarificación o mediante la remoción completa del tegumento o cubierta seminal [72] [73].

En el caso de *Aristotelia chilensis*, su semilla se disemina por medio de la ingesta del fruto por parte de las aves, lo que origina cambios en la semilla debido al efecto mecánico y químico provocado por su sistema digestivo, y por lo tanto para su germinación necesitaría un tratamiento especial que modifique o remueva la cubierta de la semilla [74].



(a)



(b)

Figura 9: Ilustraciones esquemáticas de: (a) Una planta (b) Una semilla dicotiledónea.

### 1.6.1.1 Establecimiento de explantes asépticos

Los tejidos de plantas o explantes colectados desde condiciones silvestres o de invernaderos, usualmente se encuentran contaminados con microorganismos y otros contaminantes. Estos microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos; deben ser removidos durante la preparación de los explantes asépticos, ya que de otro modo podrían llegar a matar los explantes, ya sea debido a su sobre-crecimiento, o por la liberación de sustancias tóxicas al medio. Las fuentes potenciales de contaminación de los cultivos de plantas *in vitro* son el tejido vegetal, los instrumentos, el medio de cultivo, el medioambiente del área de transferencia, los técnicos y la sala de incubación. [75]

El proceso de esterilización puede variar entre temporadas debido a que las poblaciones microbianas dependen de éstas. Los agentes más comúnmente usados en la higienización de explantes son hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio. El hipoclorito de sodio se encuentra disponible como un desinfectante comercial, Clorox® [75]. Por

ejemplo, para la desinfección superficial de brotes apicales de *Vaccinium meridionale* [76], estos se sumergen en agua destilada más Tween 20 (0,2% v/v) durante 5 minutos con agitación continua, seguido de una inmersión en CaOCl<sub>2</sub> al 7% (p/v) durante 20 minutos para finalizar con tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril durante 5 minutos cada uno.

### 1.6.2 Cultivo de callos vegetales

Teóricamente todas las células vegetales son capaces de regenerar una planta completa, este fenómeno se denomina totipotencialidad. Asimismo, una de las principales características de las células de plantas es su gran plasticidad frente a la diferenciación celular. De modo natural las plantas son capaces de generar masas de células desorganizadas, llamados callos o tumores, en respuesta a factores de estrés, como heridas o infecciones por patógenos. Los callos pueden producirse a partir de sólo una célula diferenciada y muchas de sus células son totipotentes. Sin embargo, se sabe que estas estructuras son muy diversas y pueden ser clasificados en subgrupos dependiendo de sus características macroscópicas. Por ejemplo, los callos que no presentan regeneración de ningún órgano típicamente se clasifican en friables (se desmenuzan fácilmente) o compactos (Figura 10 (a)), en cambio, aquellos callos que presentan regeneración de algún órgano son llamados “*rooty*”, “*shooty*” o embriogénicos (Figura 10 (b)), dependiendo del órgano que regeneren. Por lo tanto, el término callo abarca células con diferentes grados de diferenciación [77].

Luego del descubrimiento de que los callos se pueden generar artificialmente de manera *in vitro* y que la razón entre dos fitohormonas, auxina y citoquinina, determina su estado de diferenciación o dediferenciación, estas estructuras han sido ampliamente utilizadas tanto en investigación como en aplicaciones industriales [77].

La aplicación exógena de auxina y citoquinina induce callogénesis en varias especies de plantas. A modo general, una razón intermedia de auxina y citoquinina promueve la inducción callogénica, mientras que una elevada proporción auxina-citoquinina o citoquinina-auxina induce la formación de raíces y hojas, respectivamente [75].

La edad y estado fisiológico de la planta madre puede afectar la formación de los callos, siendo esencial que el material del explante sea saludable y de crecimiento vigoroso. Debido a lo anterior, usualmente se utilizan explantes provenientes de plantas jóvenes germinadas de manera *in vitro* para llevar a cabo la inducción callogénica. Además, los callos pueden ser inducidos a partir de diferentes explantes, como hojas, raíces, tallos o embriones; sin embargo, los explantes más apropiados son aquéllos que contengan células mitóticamente activas. El tamaño y forma del explante inicial no es un factor crítico, sin embargo la proliferación puede que no ocurra con explantes por debajo de un tamaño crítico. En general, fragmentos más grandes de tejido son apropiados debido al mayor número de células presentes, que incrementan la posibilidad de obtener un cultivo viable [75].

Diferentes plantas requieren diferentes nutrientes, por lo tanto, los callos derivados de ellas también demandan diferentes requerimientos nutricionales. Generalmente, los

medios de cultivos se componen de elementos orgánicos e inorgánicos junto con una fuente de carbono y reguladores del crecimiento apropiados. Los reguladores del crecimiento son cruciales en la inducción y mantenimiento de los callos, sin embargo, algunos callos se habitúan a ellos y no requieren de su adición constante para su mantenimiento y crecimiento. Normalmente, los callos iniciados a partir de un mismo explante pueden crecer en el mismo medio de cultivo. El medio de cultivo y fitohormonas adecuadas para la iniciación y mantenimiento de los callos sólo puede ser obtenido a través de prueba y error [75].

En el caso del cultivo de callos de *Aristotelia chilensis*, existen escasos estudios al respecto. En un estudio de Céspedes et al. (1995) se indica que la combinación adecuada para la inducción callogénica a partir de explantes foliares y yemas apicales de maqui es de AIA a 0,5 [mg/L] y BAP a 0,1 [mg/L] [78].

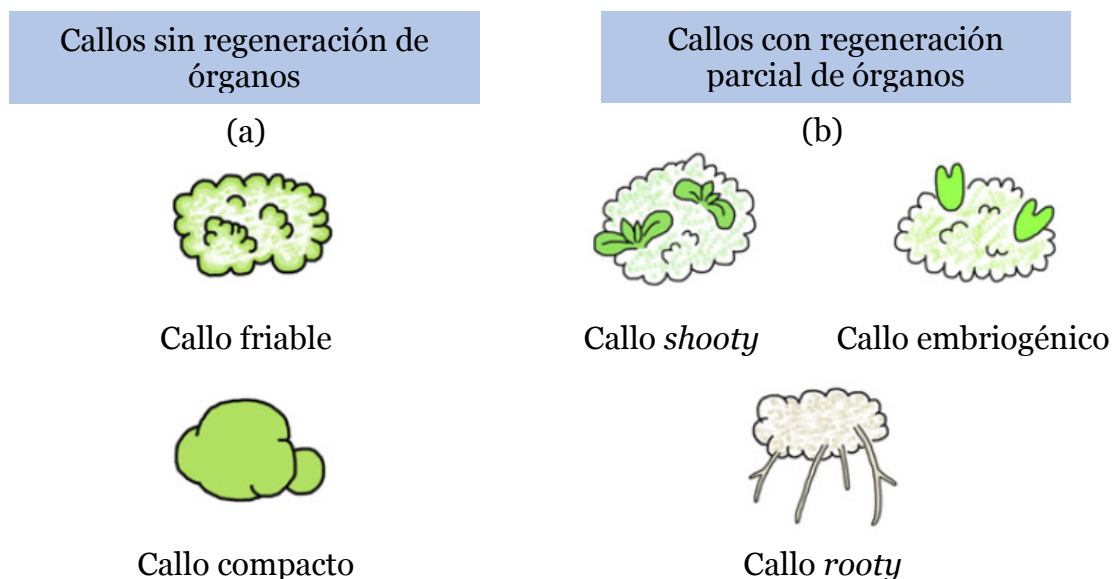


Figura 10: Ilustraciones esquemáticas de diferentes tipos de callos de plantas (a) Callos sin regeneración de órganos (b) Callos con regeneración parcial de órganos [77].

### 1.6.2.1 Curva de crecimiento callogénico

La tasa de crecimiento de los tejidos callosos se asemeja en muchos aspectos a la curva sigmoidea que presentan muchos organismos unicelulares. Usualmente la curva de crecimiento presenta cinco etapas, como se muestra en la Figura 11. El comportamiento de las células de los callos es diferente durante cada etapa del crecimiento. El medio de cultivo también influye en el tiempo en el que el callo permanece en una etapa particular [79].

La mayor cantidad de células en mitosis se observa durante la fase exponencial de crecimiento (etapa 2). En cambio, el desarrollo y crecimiento celular es mayor durante la etapa lineal (etapa 3). Una vez que el cultivo se adentra en la etapa 4, de desaceleración del crecimiento, debe ser subcultivado a medio fresco. Además, si se desea examinar la

producción de metabolitos secundarios, es necesario determinar la etapa del crecimiento en donde la producción del metabolito deseado es mayor [79].

Cabe destacar, que la desaceleración del crecimiento se debe a diferentes factores, como el agotamiento de los nutrientes, secado del agar, síntesis de productos tóxicos y el agotamiento del oxígeno en el interior de los callos. Generalmente, solo se subcultivan los fragmentos de tejido visiblemente saludables [79].

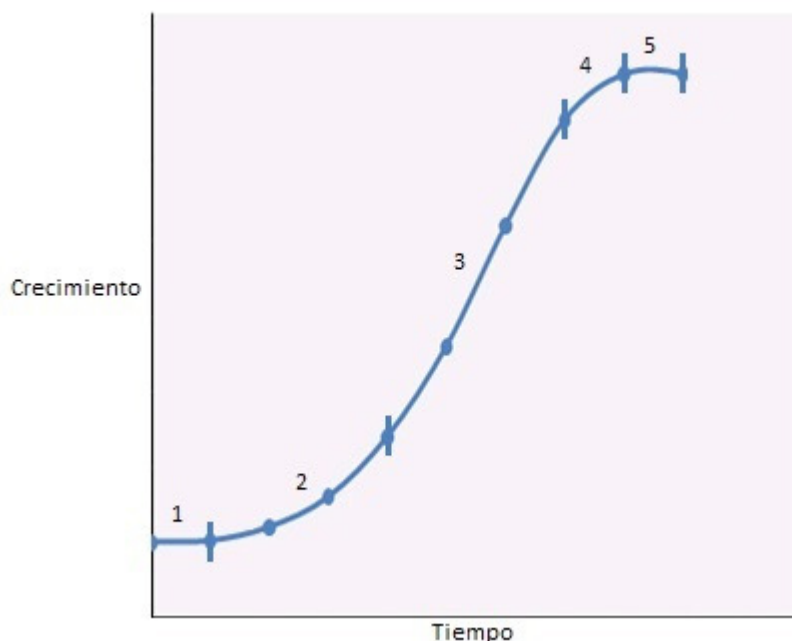


Figura 11: Curva de crecimiento característica de los tejidos callosos: (1) Etapa lag en donde la células se adaptan al medio; (2) Período de crecimiento exponencial en donde la división celular es máxima; (3) Etapa de crecimiento lineal en donde la división celular se vuelve más lenta y las células crecen; (4) Período de desaceleración del crecimiento; (5) Etapa estacionaria en donde el número de células es constante.

### 1.6.3 Cultivos de células vegetales en suspensión

Un cultivo de células vegetales en suspensión está compuesto de células individuales y agregados celulares de menor y mayor tamaño, dispersos en un medio de cultivo líquido que crecen bajo condiciones de agitación y aireación [80]. Los cultivos en suspensión se originan a partir de un “evento crítico y azaroso”, que ocurre durante la exposición temprana de las células al medio líquido. Estas células que atraviesan una transición en su metabolismo y en su tasa de crecimiento generan una línea celular. Algunas de las características de estas líneas celulares son: un elevado nivel de disgregación celular, morfología celular homogénea, tiempos de duplicación entre 24-72 hr, pérdida de la totipotencialidad y habituación hormonal. [81].

Los cultivos celulares en suspensión se inician transfiriendo fragmentos de callos friables indiferenciados a un medio líquido de la misma composición que el medio sólido utilizado para el crecimiento del tejido calloso. El cultivo debe ser agitado en un agitador orbital entre un rango de 90 y 150 rpm con el objetivo de airear el cultivo y dispersar sus células. Además, el volumen del medio líquido en relación al tamaño del matraz utilizado

es importante para una adecuada aireación. Es por eso que el medio debe ocupar cerca de un 20% del volumen total del matraz [75] [81].

Cabe destacar que no existe ningún cultivo en suspensión compuesto sólo de células individuales y que la formación de una buena suspensión, es decir, un cultivo compuesto de un elevado porcentaje de células individuales y pequeños agregados celulares, es mucho más complejo que encontrar las condiciones ambientales óptimas para la disgregación de las células. No existe un procedimiento estándar que pueda ser recomendado para iniciar un cultivo de células en suspensión a partir de callos, por lo que las condiciones apropiadas son en gran medida determinadas mediante prueba y error [81] [75].

La iniciación de un cultivo en suspensión requiere de una gran masa de callo que sirva como inóculo, aproximadamente 2-3 g para 100 ml de medio. La curva de crecimiento de los cultivos en suspensión es similar a la descrita anteriormente para el crecimiento de los tejidos callosos (ver Figura 11). Asimismo, para mantener la viabilidad de las células, éstas deben ser subcultivadas durante el comienzo de la etapa estacionaria, preferentemente en la etapa de desaceleración del crecimiento [81].

#### **1.6.4 Producción de antocianinas por medio de cultivos *in vitro***

Las plantas son una fuente importante de metabolitos secundarios, muchos de los cuales han sido utilizados a lo largo de la historia como drogas, pesticidas, pigmentos, saborizantes y fragancias. Sin embargo, una de las principales limitantes en la utilización de cultivos de plantas como fuente de estos metabolitos, es la capacidad de asegurar el suministro constante y eficiente de éstos. Lo anterior se debe a que los rendimientos de estos cultivos se ven afectados por diferentes factores, como el trasfondo genético, la localización geográfica, las condiciones edáficas y climáticas de la zona de cultivo, combinadas con los potenciales efectos de los métodos de cosecha y transporte. La utilización de cultivos de tejidos o células vegetales para la producción de metabolitos secundarios ha sido propuesta como una alternativa a la agricultura convencional, debido a la posibilidad de controlar la calidad y cantidad del compuesto de interés que se produce, por medio del control de los factores que afectan su síntesis o acumulación. Recientes avances en el campo de la biotecnología vuelven más posible la utilización a gran escala de los cultivos de células o tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios de elevado valor económico [82].

Un candidato de gran interés para su producción por medio del cultivo de células o tejidos vegetales son las antocianinas. Actualmente, a pesar de su gran utilidad económica, la utilización comercial de estos compuestos se ve impedida debido al gran número de factores que afectan su estabilidad, en adición a la escasez en la disponibilidad de materias primas que produzcan estos metabolitos en cantidad y calidad adecuada [83].

Un requerimiento importante para la producción a gran escala de metabolitos secundarios en condiciones *in vitro*, es el entendimiento de sus rutas metabólicas. En este aspecto las antocianinas son destacadas, dado que su vía metabólica es una de las más estudiadas. Diversos estudios señalan que la producción de antocianinas en cultivos de callos se caracteriza en una primera instancia por la aparición de manchas de color rojo o rosado en la superficie del callo. La aislación y subcultivo repetido de las células que



producen el pigmento puede generar un incremento progresivo en la inducción de la pigmentación [84].

En la mayoría de los sistemas de cultivo *in vitro*, la acumulación de biomasa y la síntesis de metabolitos secundarios requieren de diferentes condiciones tanto físicas como químicas, lo que limita la eficiencia de estos sistemas para su uso comercial. Sin embargo, se han desarrollado sistemas *in vitro* de callos y de suspensiones celulares que proveen una elevada acumulación de biomasa y de producción de metabolitos en un solo régimen de cultivo, como por ejemplo los callos y suspensiones celulares de *Cleome rosea* [84]. En general, diversos estudios biotecnológicos han explorado la influencia de diversos factores en la producción de antocianinas y muchas metodologías han sido aplicadas con el objetivo de incrementar su productividad. [83]

#### 1.6.4.1 Factores que afectan la producción *in-vitro* de antocianinas.

##### Condiciones físicas

En general, la acumulación de antocianinas ocurre como respuesta a la exposición prolongada a la luz. La luz activa diferentes enzimas envueltas en la biosíntesis de estos pigmentos, especialmente la fenilalanina amonio-liasa (PAL) y la chalcona sintasa [85] [86]. Además, diversos estudios han demostrado que la irradiación con luz también influencia la producción de antocianinas en sistemas de cultivo *in vitro* [83].

Si bien la luz es considerada un agente de control importante en la biosíntesis de antocianinas, existen líneas celulares establecidas a partir de especies vegetales que producen antocianinas en condiciones de oscuridad [87] [88] [89] [90], lo cual es económicamente beneficioso. Sin embargo, cabe destacar que los cultivos establecidos bajo condiciones de oscuridad pueden resultar muy inestables y susceptibles a necrosis [83].

Otro factor que afecta la producción *in vitro* de estos pigmentos es la temperatura. Cabe destacar que este factor depende de la especie vegetal, por ejemplo, en cultivos de callos de *Cleome rosea* la máxima producción de antocianinas se obtuvo a una temperatura de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  [84], mientras que en cultivos de callos de *Daucus carota* la máxima producción de antocianinas se logró a los  $30^{\circ}\text{C}$  [91].

La acumulación de antocianinas en los cultivos celulares también se ve influenciada por el pH del medio. Elevados niveles de pH en el medio de cultivo pueden incrementar la actividad de la enzima PAL y, por ende, la acumulación de antocianinas [92] [93].

##### Factores químicos

La modificación de los nutrientes en el medio de los cultivos de células vegetales es una estrategia eficiente para la inducción de metabolitos secundarios en condiciones *in vitro*. Por ejemplo, la naturaleza y concentración del azúcar agregado al medio de cultivo tiene grandes efectos en la acumulación de los pigmentos. A pesar de que los azúcares son utilizados solo como fuente de carbono, ellos también actúan como agentes osmóticos cuando se presentan en concentraciones elevadas. La sacarosa es el azúcar más frecuentemente utilizado en los cultivos *in vitro* y su influencia en la síntesis de

antocianinas está muy estudiada [84] [87] [94] [95] [96]. Sin embargo, también se ha estudiado la influencia de otros azúcares, como por ejemplo, en cultivos de callos de *Aralia cordata*, la fructosa resultó ser el azúcar más eficiente en la acumulación de antocianinas en los tejidos [97].

Otra estrategia utilizada para suscitar la síntesis de antocianinas en cultivos *in vitro* es la restricción nutricional. En general, la reducción de algún nutriente promueve la síntesis de metabolitos secundarios, pero con limitaciones en el crecimiento del cultivo [98]. Este fenómeno se debe a que frente al déficit de nutrientes, principalmente nitrógeno, fósforo y azufre, las plantas producen antocianinas para evitar la sobreacumulación de carbohidratos en los tejidos con el objetivo de prevenir desórdenes fisiológicos [99].

En el caso de los reguladores del crecimiento, su efecto es variable según la especie vegetal. Por ejemplo, en cultivos de callos de *Glehnia littoralis* mantenidos con la hormona auxina NAA, se logró un aumento de hasta el doble en la producción de antocianinas en comparación con los resultados obtenidos con la auxina 2,4-D o IAA [97]. En cambio, en cultivos de callos de *Oxalis linearis*, la presencia de NAA reprimió la síntesis de antocianinas [100]. Por otro lado, en callos de *Camptotheca acuminata*, el contenido de antocianinas fue mucho mayor en la presencia de kinetina (KIN), en comparación a la hormona BAP [101]. En contraste, la máxima productividad de antocianinas en callos de *Daucus carota* fue observada en la presencia de NAA y KIN [91].

En el caso de la hormona 2,4-D, algunos autores mantienen que la presencia de esta auxina inhibe la producción de variados metabolitos secundarios, incluyendo antocianinas [98] [102]. Sin embargo, la suplementación con este regulador del crecimiento parece ser esencial para el crecimiento de la biomasa de los tejidos callosos así como también en la producción de antocianinas en callos de diversas especies, como *Fragaria ananassa* [103], *Ipomoea batatas* [104], *Daucus carota* [105] y *Cleome rosea* [84]. La regulación en la síntesis de antocianinas por medio de 2,4-D fue estudiada en suspensiones celulares de zanahoria, indicando que existen dos genes de PAL, uno de los cuales es inducido específicamente en la presencia de 2,4-D, mientras que el otro es activado rápidamente por condiciones de stress [106].

Si bien la manipulación de estímulos individuales ha sido efectiva para la inducción de antocianinas, una de las estrategias más eficientes para el incremento en sus niveles de biosíntesis es el desarrollo de un proceso integrado que combine el efecto de varios sistemas y estrategias de mejora [83].

Otro aspecto importante a considerar en el uso de tecnologías *in vitro* es la producción de antocianinas que usualmente no se encuentran en las plantas cultivadas de modo convencional. Por ejemplo, cultivos de callos de *Vitis sp.* producen cianidina y peonidina, mientras que su pericarpio intacto contiene malvidina y peonidina [107]. Además, en callos derivados de hojas de *Cleome rosea* obtenidos en medio suplementado con 2,4-D, se identificaron dos peonidinas, mientras en las hojas solo se detectaron cianidinas; esto se puede deber a una posible bioconversión de la cianidina a peonidina por medio de la metilación del anillo B de la aglicona [84]. En adición al análisis cualitativo, se ha evaluado la estabilidad de la composición de antocianinas bajo condiciones *in vitro* en cultivos de callos y suspensiones celulares de *Ajuga reptans* durante un lapso de 5 años. Si bien ninguna clase nueva de antocianinas fue detectada, se

encontraron diferencias cuantitativas entre los pigmentos producidos, con una disminución de las delphinidinas a lo largo del tiempo [108].

## **Elicitación**

Una herramienta biotecnológica útil para aumentar la producción de metabolitos secundarios bajo condiciones *in vitro* es la elicitación. Los elicitores son productos químicos o biofactores de variadas fuentes, que pueden desencadenar una respuesta en organismos vivos que puede resultar en la acumulación de metabolitos secundarios. Los elicitores pueden ser abióticos, como iones metálicos, compuestos inorgánicos y radiación UV, o bióticos, obtenidos a partir de hongos, bacterias o virus [109] [110].

En particular, la elicitación ha sido aplicada eficientemente en la producción de antocianinas. Los elicitores más utilizados son metil jasmonato [111] [112], ácido jasmónico [113], ácido abscísico [114], ácido salicílico [115] e iones inorgánicos [116]. El realce en la síntesis de antocianinas también ha sido reportado en la presencia de ficocianina, fluridona, etileno,  $\beta$ -glucano, quitosano, riboflavina (vitamina B2) y exposición a la luz UV [83].

La eficiencia del proceso de elicitación depende del tipo de planta, de la fuente de explante, del tiempo de contacto y la concentración del elicitor. Existen estudios que indican que el uso simultáneo de ácido jasmónico y luz en cultivos en suspensión de *Vitis vinífera* resulta en un significativo realce sinérgico en la acumulación de antocianinas, que es notoriamente mayor que la suma de los incrementos en la producción de antocianinas en ambos tratamientos por separado [113]. Sin embargo, se ha identificado que la utilización de ácido jasmónico en cultivos de callos de *Vitis vinífera* puede limitar la proliferación celular [117], así como la utilización de metil jasmonato en cultivos en suspensión de *Ipomoea batatas* induce cambios significativos en la composición de las antocianinas, promoviendo la síntesis de antocianinas con estructuras moleculares más complejas, como compuestos di-acetilados [118].

## **Precursores**

La adición de precursores al medio de cultivo también se considera una estrategia eficiente para aumentar la producción de metabolitos secundarios en los cultivos de células vegetales, debido a que la suplementación del medio de cultivo con un intermediario de una ruta biosintética presenta una buena oportunidad de aumentar el rendimiento del producto final [119]. Esta estrategia ha sido utilizada para aumentar la producción de antocianinas en cultivos celulares de diversas especies [120] [121]. Los precursores más utilizados para la síntesis de antocianinas son derivados del ácido cinámico, tal como ácido sinápico y L-fenilalanina (Phe), siendo este último más económico y efectivo para la acumulación de antocianinas [83].

## **Fases de crecimiento del cultivo y agregación celular**

Un aspecto a considerar cuando los cultivos celulares se utilizan como productores de antocianinas es la influencia de las fases de crecimiento del cultivo así como el grado

de agregación celular en la producción del pigmento. En variados cultivos celulares, la producción de metabolitos secundarios comienza cuando el cultivo se traslada desde la fase exponencial a la fase estacionaria [83].

En cuanto a la agregación celular, esta se relaciona con diversos parámetros y usualmente determina el perfil de la producción de metabolitos. Diversos estudios han demostrado que el nivel de agregación celular de cultivos de células en suspensión influencia la producción de metabolitos secundarios [122]. En suspensiones celulares de *Daucus carota*, el contenido de antocianinas evidenció un aumento en tamaños de agregados celulares entre 500-850  $\mu\text{m}$ , disminuyendo significativamente cuando los agregados alcanzaron mayores diámetros [123]. El aumento del tamaño de los agregados puede causar falta de luz en el centro del agregado, restricción del suministro de oxígeno, exposición diferencial a factores microambientales y gradientes de concentración locales que pueden alterar el crecimiento celular y la producción de pigmentos [124].

## 1.7 Descripción del proyecto y motivación

Hoy en día, se ofrecen productos basados en extractos concentrados de maqui en mercados nacionales e internacionales, lo cual ha comenzado a generar una mayor demanda por materia prima para abastecer la gran industria. Sin embargo, la producción sustentable de frutos de maqui se encuentra limitada por su escasa producción frutícola, basada principalmente, hasta el día de hoy, en la recolección del fruto desde árboles en condiciones silvestres, actividad que resulta dañina para el bosque nativo ya que disminuye la disponibilidad de semillas para la regeneración del bosque.

Según información otorgada por la empresa Maqui New Life, actualmente en Chile se recolectan aproximadamente 170 toneladas de maqui al año, con un potencial de biomasa máximo de 400 toneladas para temporadas donde el clima es favorable. Se espera que para el 2020 la demanda aumente a 600-800 toneladas por año, lo cual representa un gran desafío y una oportunidad para desarrollar nuevas estrategias tecnológicas que permitan producir mayor cantidad de delfinidinas de maqui, con el objetivo de abastecer la gran industria nutracéutica.

Actualmente, en un trabajo del Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor, se ha logrado describir los genes involucrados en la biosíntesis y regulación de la producción de delfinidinas en la planta, y además, se han identificado los promotores que regulan dicha síntesis. Estos resultados han ayudado a comprender la producción de delfinidinas por parte de *A. chilensis*, lo cual permitiría ayudar a generar una estrategia para potenciar la síntesis de dichas moléculas a través de herramientas biotecnológicas.

El cultivo de células vegetales ha surgido como una alternativa para la obtención de metabolitos de alto valor agregado, producidos en las plantas en bajas concentraciones, y para los cuales no existen procesos de síntesis química conocidos. En el presente caso, las delfinidinas de maqui son metabolitos de gran interés económico debido a sus potenciales beneficios en la salud humana. Cabe destacar que las delfinidinas no son posibles de sintetizar químicamente debido a su variabilidad de estructuras y niveles de glicosilación.

El presente trabajo de titulación consiste en la generación de una estrategia factible para la producción a escala de laboratorio de extractos ricos en delfinidinas de *Aristotelia chilensis* por medio del cultivo de tejidos callosos y de células vegetales en suspensión.

En particular, la estrategia empleada en el presente estudio para la producción de delfinidinas de maqui, tiene ventajas comparativas en relación a otras tecnologías existentes. Una de estas ventajas es que se potencian las cualidades naturales de la planta sin modificarla genéticamente, lo cual permite abarcar el segmento de mercado en donde las personas presentan interés por los alimentos nutraceuticos pero al mismo tiempo muestran aversión a los alimentos transgénicos.

El desarrollo del trabajo espera contribuir en un futuro a la superación de la escasez de materia prima, y con ello suplir la demanda creciente de extractos ricos en delfinidinas de *A. chilensis* de la industria de alimentos nutraceuticos y, posiblemente, la industria farmacéutica, entregando un producto de calidad y cuya concentración de antocianinas se encuentre estandarizada.

Cabe destacar que el trabajo de título se enmarca dentro de una iniciativa CORFO I+D línea 2 del Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor en conjunto con la empresa Maqui New Life.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo de título es desarrollar una estrategia para la producción de extractos ricos en antocianinas a partir de cultivos celulares de *Aristotelia chilensis* (maqui), para su uso en la industria nutracéutica.

### 2.2 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos del presente trabajo de título se describen a continuación:

- Establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de *Aristotelia chilensis* para su posterior micropropagación.
- Inducción de callogénesis a partir de diferentes explantes de *Aristotelia chilensis* y caracterización de su crecimiento y mantenimiento.
- Estandarización del crecimiento de cultivos de células en suspensión a partir de callos de *Aristotelia chilensis*, y caracterización de su crecimiento y mantenimiento.
- Inducción de la producción de antocianinas en cultivos de tejidos o células *in vitro* de *Aristotelia chilensis* por medio de elicitación con luz y fitohormonas.
- Comparación de las condiciones estudiadas de producción de antocianinas a partir de cultivos celulares de *Aristotelia chilensis*.

### 2.3 Alcances del estudio

Con el desarrollo del presente trabajo de título, se espera establecer cultivos *in vitro* de callos y de células en suspensión de *Aristotelia chilensis*, inducir la síntesis de antocianinas por medio de diferentes elicitores, y finalmente, comparar las condiciones de producción de estos pigmentos bajo las diferentes condiciones de elicitación implementadas.

Para conseguir lo anterior, en una primera etapa se introducirán plantas de maqui *in vitro*, para su posterior micropropagación. La finalidad de esto, es contar con material inicial estéril para realizar inducción callogénica a partir de hojas y otros explantes de la planta.

Una vez que se cuente con plantas de maqui *in vitro*, se procederá a inducir callogénesis a partir de diferentes explantes por medio de la utilización de diversos

reguladores del crecimiento, o fitohormonas. Una vez se haya encontrado una combinación y concentración hormonal que induzca callogénesis, se procederá a subcultivar y mantener los callos, así como también a medir su curva de crecimiento.

Luego de obtener una línea callogénica relativamente estable, se procederá a generar cultivos de células vegetales en suspensión utilizando las mismas concentraciones, razones y combinaciones hormonales que el medio de cultivo utilizado para los callos. Asimismo, se espera medir la curva de crecimiento de los cultivos con la finalidad de identificar el punto adecuado en donde añadir el inductor de la producción de antocianinas.

Posteriormente, se pretende inducir la síntesis de antocianinas a través de la adición de diferentes elicitores al medio de cultivo, como por ejemplo, metil jasmonato, ácido abscísico, luz o alguna combinación hormonal adecuada. Luego, las diferentes muestras obtenidas serán enviadas a un laboratorio externo (Glu Chile) para el estudio de su contenido de antocianinas.

El presente estudio pretende entregar una alternativa factible para la futura producción a gran escala de concentrados de *Aristotelia chilensis* ricos en delfinidinas, y cuya concentración de esta clase de pigmentos se encuentre estandarizada. De este modo, se espera suplir la demanda creciente de extractos de maqui por parte de la industria de alimentos nutraceuticos.

Finalmente, resulta necesario destacar que el estudio se realizará a escala de laboratorio, por lo que la optimización de las condiciones de cultivo y elicitación, y su posible escalamiento a nivel industrial, quedan propuestos para trabajos posteriores.

### 3. Metodología

Para el estudio de la producción de antocianinas de *Aristotelia chilensis* en biorreactores, se ejecutó una serie de pasos cuya finalidad fue la de obtener cultivos de células de maqui en suspensión, para posteriormente inducir la producción de antocianinas. En un comienzo se introdujo plantas de maqui *in vitro*, para luego inducir callogénesis a partir de hojas, cotiledones y semillas de la planta. Una vez obtenida la masa callogénica suficiente, se traspasó a medio de cultivo líquido, en donde las células vegetales fueron disgregadas por medio de agitación para la formación del cultivo en suspensión. Luego, por medio de diversos elicitores, se procedió a inducir en los cultivos la producción de antocianinas. Por último, diversas muestras fueron enviadas al Laboratorio Glu Chile para llevar a cabo el análisis y cuantificación de su contenido de antocianinas. En la Figura 12 se presenta un resumen de la metodología utilizada.

Los distintos ensayos se llevaron a cabo entre los meses de Enero y Agosto del año 2014, en el Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor.

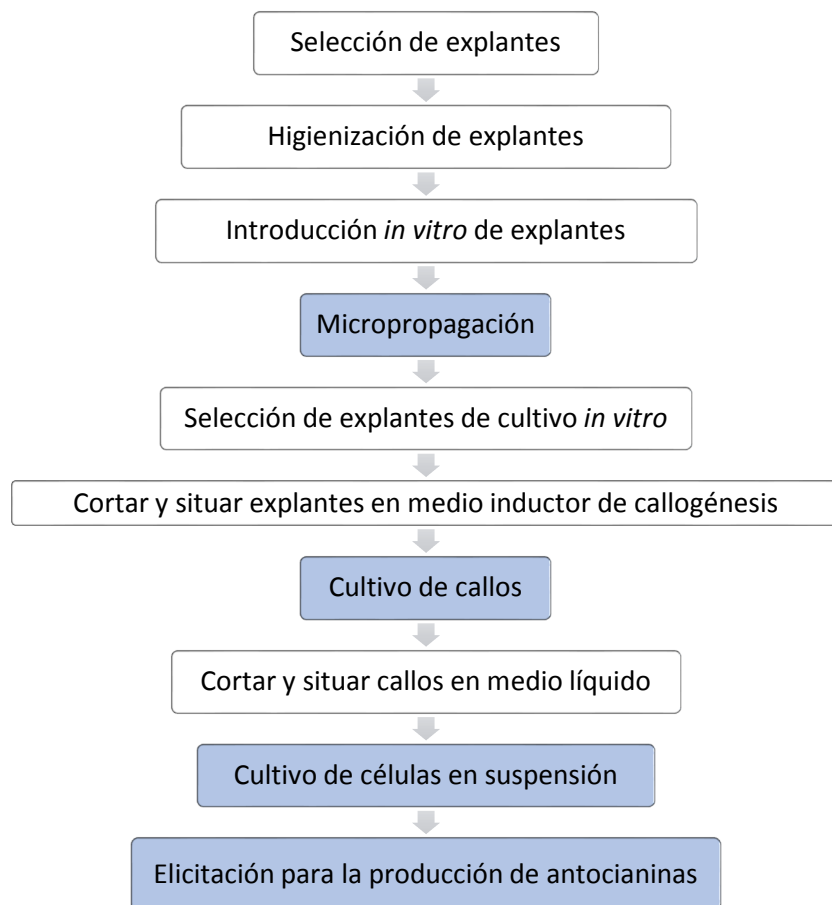


Figura 12: Esquema del procedimiento llevado a cabo para la iniciación, mantenimiento e inducción de la síntesis de antocianinas en cultivos celulares de *A. chilensis*. Las cajas coloreadas corresponden a las etapas claves en el estudio.



### 3.1 Materiales y Equipos

Los explantes de maqui utilizados inicialmente durante esta investigación fueron proporcionados por la empresa Maqui New Life, provenientes de diferentes plantaciones ubicadas a lo largo del Sur del País, principalmente la Región de Los Lagos, Chile. En adición, se recolectaron muestras de ramas y frutos personalmente en la ciudad de Valdivia, Región de Los Ríos. Todas las muestras fueron recolectadas entre los meses de Enero y Febrero del 2014.

Las semillas utilizadas fueron extraídas a partir de los frutos recolectados, se limpiaron con agua potable, se secaron y se almacenaron en un lugar seco para servir de material inicial en los experimentos.

A continuación se indican los reactivos necesarios para la realización de los diversos experimentos llevados a cabo a lo largo del estudio:

- Para la higienización de semillas y explantes: Detergente Tween® 20, etanol 70% e Hipoclorito de Sodio.
- Medios de cultivo para plantas
  - Murashige & Skoog con vitaminas de PhytoTechnology Laboratory ®
  - Gamborg B-5 de PhytoTechnology Laboratory ®
- Sacarosa de PhytoTechnology Laboratory ®
- Agar para micropropagación de PhytoTechnology Laboratory ®
- Carbón activado granulado de PhytoTechnology Laboratory ®
- Ácido cítrico de Merck ®
- Fitohormonas de PhytoTechnology Laboratory ®
  - Auxinas: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido 1-Naftalenacético (ANA), Ácido 3-Indolacético (AIA).
  - Citoquininas: Kinetina, 6-Bencilaminopurina (6-BAP).
- Elicitores
  - Metil Jasmonato de Sigma Aldrich ®
  - Ácido Abscísico de Sigma Aldrich ®

Los equipos requeridos para los experimentos realizados fueron los siguientes:

- Centrífuga marca Eppendorf, modelo 5804-R.
- Estufa a 45°C marca Binder, modelo redline.
- pHímetro marca Hanna instruments, modelo pH211.
- Cámara de cultivo con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.
- Agitador marca Lab companion, modelo SI-300.

Además, fue necesario contar con materiales de laboratorio tales como pinzas para manejo vegetal, porta bisturíes, bisturíes, papel filtro autoclavado, micropipetas, puntas con y sin filtro, frascos para micropropagación, matraces de vidrio de 250 [ml] con tres deflectores en su base, placas Petri desechables, etc.

## 3.2 Diseño Experimental

A continuación se detalla la metodología de los experimentos llevados a cabo para el desarrollo del trabajo de título.

### 3.2.1 Establecimientos de cultivos *in vitro* de plantas de maqui

Para el establecimiento de cultivos de plantas de maqui *in vitro* se llevó a cabo dos rutas experimentales. Una de ellas utilizó estacas de plantas silvestres de maqui y la otra utilizó embriones cigóticos extraídos a partir de semillas de la planta.

A partir de las ramas de maqui recolectadas, se seleccionó aquéllas que presentaron las mejores características fenotípicas, es decir, aquellas ramas jóvenes con menor daño, sin señales de infección por ningún tipo de microorganismo o virus, que contaran con la mayor cantidad de brotes o yemas axiales y apicales y que estuviesen verdes para una menor cantidad de fenoles (los fenoles le otorgan una coloración rojiza a hojas, peciolo y tallos). Luego, las hojas fueron escindidas y las ramas fueron cortadas de modo diagonal en la base en segmentos de 2 cm de largo aproximadamente (estacas). Se cortaron 38 estacas que contuvieran yemas apicales y/o axiales y 16 estacas sin ellas.

Posteriormente, las estacas fueron sometidas a una serie de etapas que se describen a continuación:

#### 3.2.1.1 Higienización de Explantes

Las estacas fueron higienizadas mediante dos métodos de limpieza de mayor o menor intensidad (Tabla 1). El primer método puesto en práctica se describe a continuación:

1. Se depositó alrededor de cinco explantes en un tubo Falcon de 50 ml.
2. Se sumergieron en etanol al 70% durante 30 s.
3. Se eliminó el alcohol y se añadió hipoclorito de sodio al 7% (v/v) durante 10 min.
4. Se realizó 3 lavados en agua MilliQ estéril de 5 min cada uno.

El segundo método de higienización puesto en marcha fue obtenido a partir de literatura [76], cabe destacar que el protocolo fue levemente modificado añadiendo una etapa de lavado en etanol 70%:

1. En primera instancia se realizó un enjuague en agua destilada más detergente Tween® 20 (0,1% v/v) durante 5 [min] manteniendo agitación constante.
2. Luego, se realizó una inmersión en etanol 70% durante 30 [s].
3. Se eliminó el alcohol y se añadió una solución de hipoclorito de sodio 7% (v/v) durante 20 [min].
4. Finalmente, se realizó tres lavados en agua MilliQ estéril durante 5 [min] cada uno.

Cabe mencionar que todos los pasos mencionados anteriormente se realizaron en campana de flujo laminar, la cual fue previamente esterilizada por medio de la aplicación de radiación ultravioleta (UV) durante 15 min.

Tabla 1: Tratamientos de desinfección para explantes de *A. chilensis*.

Ensayo	Tween® 20		Etanol		Hipoclorito de Sodio (NaClO)	
	(v/v) %	Tiempo [min]	(v/v) %	Tiempo [s]	(v/v) %	Tiempo [min]
L1	0	0	70	30	7	10
L2	0,1	5	70	30	7	20

### 3.2.1.2 Preparación de medios de cultivo sólidos para micropropagación

Para establecer un protocolo para la síntesis del medio de cultivo adecuado para el crecimiento de maqui *in vitro*, se realizó una investigación bibliográfica destinada a la búsqueda de protocolos para la micropropagación tanto de maqui como de otras plantas leñosas, como vitis, arándanos y otras berries. Se identificó, que el medio más utilizado para el crecimiento de plantas *in vitro* corresponde al medio Murashige & Skoog (MS).

De acuerdo a lo anterior, se estableció tres medios de cultivo a experimentar para el crecimiento de maqui: uno sólo con MS, otro con MS y carbón activado y otro con MS, carbón activado y ácido cítrico. El protocolo para la síntesis del medio MS basal fue el siguiente:

1. Para 1 L de medio de cultivo se pesaron 4,43 g de Medio MS.
2. Se añadieron 30 g de sacarosa, como fuente de carbono.
3. Se agregó agua MilliQ hasta completar 1 L.
4. Se agitó y ajustó pH en un rango de 5,6 – 5,8 con KOH 1 M.
5. Se pesó 7 g de agar para plantas y se agregó a la mezcla anterior.
6. Se colocó dentro del microondas a máxima potencia hasta que el agar se derritiera completamente y obtuviera una consistencia más o menos translúcida (aproximadamente 8 [min])
7. La mezcla anterior se distribuyó en frascos de micropropagación, depositando 50 [ml] en cada uno y cubriéndolos con papel de polipropileno transparente para facilitar la iluminación directa sobre el material vegetal.
8. Los frascos con medio fueron autoclavados durante 20 [min] a 120 °C.

Para los medios de cultivo adicionados con carbón activado se pesaron 2 [g] para 1 litro de medio y se añadió mezclado con el Agar en el paso número 6. Para el caso de los medios con ácido cítrico se pesó 50 [mg] para 1 litro de medio y se añadió antes de ajustar pH.

Para la siembra de los embriones de maqui, se prepararon placas Petri con medio de cultivo MS sin antioxidantes. Para esto, se llevó a cabo los pasos 1-5 descritos anteriormente. Luego, el medio fue autoclavado y estando aun líquido se depositaron 25 ml en cada placa, trabajando en campana de flujo laminar. Posteriormente las placas se dejaron secar durante 15 min aproximadamente.

### 3.2.1.3 Introducción y establecimiento de los explantes.

Una vez que los explantes de maqui fueron higienizados, se procedió a introducir las estacas. Este trabajo se llevó a cabo bajo campana de flujo laminar previamente esterilizada mediante la aplicación de radiación UV. Previamente todo el material instrumental fue envuelto en papel kraft y esterilizado en autoclave. Luego, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Los explantes fueron depositados sobre un papel filtro estéril y se dejaron secar durante unos minutos.
2. Con una pinza estéril se tomó un explante y su extremo cortado diagonalmente fue enterrado en el medio MS en un frasco para micropropagación. Se repitió este paso con el resto de las estacas, introduciendo un total de 54 explantes, 18 en medio MS puro, 18 en medio MS adicionado con carbón activado y 18 en medio MS adicionado con carbón activado y ácido cítrico.
3. El frasco se incubó en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a 21°C hasta que la planta alcanzó un tamaño adecuado para ser micropropagada.

#### **3.2.1.4 Extracción de embriones cigóticos a partir de semillas**

Las semillas de maqui fueron higienizadas por medio del proceso de desinfección 2 descrito anteriormente en la Tabla 1 de la sección 3.2.1.1. Trabajando siempre en campana de flujo laminar previamente esterilizada con radiación UV, se procedió a extraer el embrión cortando la cubierta seminal cuidadosamente con un bisturí. Luego, se depositó el embrión en una placa Petri con medio MS. Finalmente, la placa con el embrión se incubó en la cámara de cultivo con fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad a 21 °C. Se extrajo un total de aproximadamente 30 embriones destinados a la regeneración de plantas en condiciones *in vitro*.

Una vez que los embriones germinaron, luego de aproximadamente 15 días, aquellas plántulas que no se contaminaron fueron trasplantadas a frascos de cultivo más grandes con el objetivo de regenerar la planta completa. Este procedimiento se llevó a cabo trabajando en campana de flujo laminar previamente desinfectada mediante exposición a radiación UV durante 15 minutos. La planta se tomó cuidadosamente utilizando una pinza estéril y sus raíces fueron enterradas en el medio de cultivo del frasco. Posteriormente, la planta se incubó en la cámara de cultivo hasta que alcanzó un tamaño apropiado para ser micropropagada.

#### **3.2.1.5 Micropropagación de cultivos *in vitro***

Para llevar a cabo el mantenimiento y micropropagación de las plantas *in vitro* iniciadas a partir de estacas o de embriones, se procedió con el siguiente protocolo:

1. Trabajando en campana de flujo laminar previamente desinfectada mediante radiación UV por 15 min, la planta se extrajo del frasco y luego se depositó sobre un papel filtro estéril.
2. Con la ayuda de una pinza y bisturí estériles, se escindieron las hojas y se cortaron segmentos de aproximadamente 1,5 cm que contuvieran 1 o 2 segmentos nodales.
3. Los segmentos nodales se colocaron en nuevos frascos con medio de multiplicación y se incubaron en la cámara de cultivo hasta que nuevamente alcanzaran un tamaño adecuado para ser micropropagados, aproximadamente cada 5 semanas.

### **3.2.2 Callogénesis a partir de explantes de maqui**

Luego de seleccionar el método de desinfección más efectivo y haber introducido las estacas y embriones de maqui, se procedió a experimentar diferentes medios de cultivo con diversas dosis y combinación de fitohormonas para la inducción callogénica. Para llevar a cabo la inducción se utilizaron explantes de embrión, cotiledón y hoja. En la Tabla 2 se detallan los medios de cultivo y dosis de fitohormonas utilizadas para los diferentes tratamientos y las referencias de donde se obtuvieron dichas combinaciones. Posteriormente, una vez establecidas las líneas callogénicas, se procedió a evaluar la proliferación celular de éstas, subcultivándolas en medios de cultivo con combinaciones hormonales diferentes a las originales.

#### **3.2.2.1 Preparación de medios de cultivo sólidos para la inducción callogénica**

Para la elaboración de los medios de cultivo se siguió el siguiente procedimiento:

1. En el caso del medio de cultivo MS, para 1 L se pesaron 4,43 g del medio en polvo.
2. En el caso del medio de cultivo Gamborg B-5, para 1 L se pesaron 3,21 g de medio.
3. Para ambos casos se añadió como fuente de carbono 30 g de sacarosa.
4. Se agregó agua MilliQ hasta completar 1 L o el volumen necesario a preparar.
5. Se agitó y ajustó pH en un rango de 5,6 – 5,8 con KOH 1 M.
6. Se pesó 7 g de agar para plantas y se agregó a la mezcla anterior.
7. La mezcla fue autoclavada durante 20 min a 120 °C.
8. Luego de ser autoclavada, aún estando líquida, se procedió a suplementar mediante micropipeta el volumen necesario de las diferentes fitohormonas que se detallan en la Tabla 2. Además, las soluciones stock de los reguladores de crecimiento fueron preparadas previamente en relación 1:1 (1 mg/ml) y almacenadas en refrigeración a 4 °C.

#### **3.2.2.2 Inducción callogénica**

Para la siembra de los explantes se procedió con los pasos descritos a continuación. Cabe mencionar que siempre se trabajó en campana de flujo laminar previamente desinfectada mediante exposición a radiación UV durante 15 minutos.

1. Embriones: Inicialmente, las semillas de maqui se desinfectaron mediante el proceso L2 detallado en la Tabla 1. Luego, se realizó la extracción del embrión siguiendo el protocolo detallado en la sección 3.2.1.4 y se depositó sobre placas con tratamiento H1, H2 y H7 (ver Tabla 2). Un ejemplo de lo anterior se puede ver en la Figura 13. En total se depositaron 10 embriones para cada tratamiento y se incubaron en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. También, se extrajo un total de 50 embriones destinados a la obtención de cotiledones para inducir callogénesis a partir de ellos. Estos embriones se depositaron en placas con medio 3MS sin tratamiento hormonal.

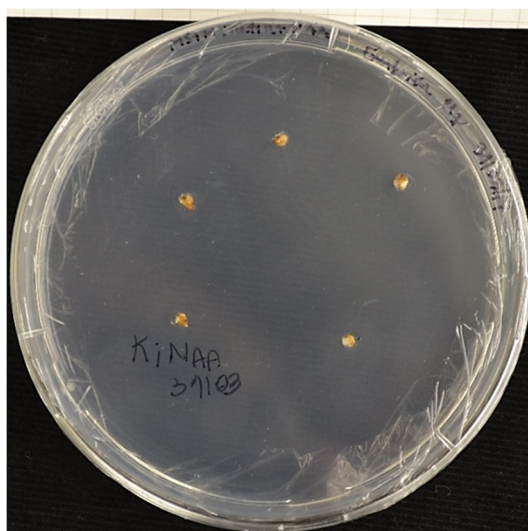


Figura 13: Embriones de *A. chilensis* luego de su extracción, en placa con tratamiento H4.

2. Cotiledones: Una vez que los embriones sembrados en medio MS sin adición de fitohormonas germinaron, los cotiledones fueron cortados transversalmente mediante un bisturí estéril y los fragmentos fueron depositados sobre placas con tratamiento H3, H4 y H5, un ejemplo de esto se muestra en la Figura 14. Se depositó un total de 10 fragmentos de cotiledones para cada tratamiento. La mitad de las placas de cada tratamiento se incubaron en una cámara de cultivo con fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad a una temperatura de 21°C y la otra mitad fue incubada en completa oscuridad.

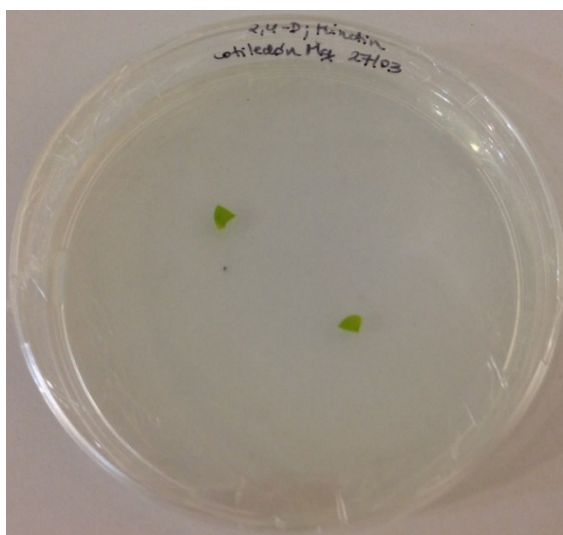


Figura 14: Fragmentos de cotiledón de *A. chilensis*, en placas con Tratamiento H5.

3. Hojas: Una vez que las estacas y embriones introducidos regeneraron una planta de maqui *in vitro*, se escindieron hojas en condiciones asépticas y se cortaron mediante un bisturí estéril en segmentos pequeños de 5 mm por lado aproximadamente. Los fragmentos fueron depositados en placas con tratamiento H1-H7, depositando un total de 6 trozos de hojas para cada tratamiento, excepto

para el tratamiento H4 en donde se depositaron 10 trozos de hoja en total. La mitad de las placas de cada tratamiento se incubaron en una cámara de cultivo con fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de 21°C y el resto fue incubado en completa oscuridad (Ver Figura 15).

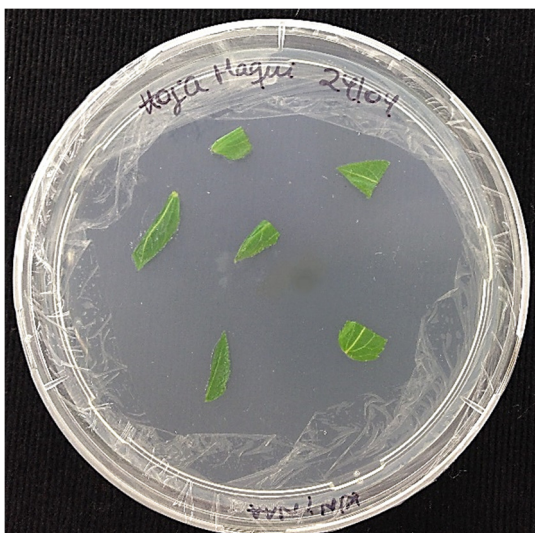


Figura 15: Fragmentos de hoja de *A. chilensis*, en placas con Tratamiento H4.

Cuando la inducción callogénica fue fructífera (ver sección de resultados 4.2.1), algunos callos fueron subcultivados (ver protocolo de subcultivo en sección 3.2.2.3) en medios de cultivo con diferentes dosis y combinaciones de fitohormonas que las originales, específicamente en los tratamientos H4, H8 y H9. Esto se realizó con el objetivo de estudiar la proliferación celular de los callos ya establecidos. Todos los callos que fueron cambiados de condiciones de crecimiento provenían de callos inducidos mediante los tratamientos H2 y H4.

Tabla 2: Medios de cultivo y dosis de reguladores de crecimiento utilizados para la inducción callogénica a partir de explantes de *A. chilensis*. 3MS corresponde a medio Murashige & Skoog con 3% de sacarosa y 3B5 a medio Gamborg B-5 con 3% de sacarosa.

Tratamiento	Medio de cultivo	Reguladores evaluados [mg/L]					Sacarosa [g/L]	Referencia
		BAP	AIA	KIN	NAA	2,4-D		
H1	3MS	0,1	0,5	0	0	0	30	[78]
H2	3MS	0	0	0,2	0,1	0	30	[125]
H3	3MS	5	0	0	1	0	30	[126]
H4	3MS	0	0	1	1	0	30	[126]
H5	3MS	0	0	0,2	0	1	30	[126]
H6	3MS	0	0	0	0	2	30	[127]
H7	3MS	1	0	0	0	0	30	[127]
H8	3B5	0	0	1	1	0	30	[127]
H9	3B5	0	0	0	0	2	30	[127]

### 3.2.2.3 Subcultivo y mantenimiento de callos

Para efectuar el mantenimiento y subcultivo de las líneas de callos obtenidas, se procedió con el siguiente protocolo:

1. Trabajando en campana de flujo laminar previamente desinfectada con radiación UV durante 15 min, las placas con tejido calloso fueron destapadas y se cortaron trozos de aproximadamente 0,5 g sobre un papel filtro estéril con la ayuda de pinzas y bisturí asépticos.
2. Los trozos de masa callosa fueron depositados sobre nuevas placas con medio de multiplicación adicionado con los reguladores del crecimiento correspondientes. Las placas fueron incubadas en la cámara de cultivo.
3. El subcultivo se llevó a cabo cada 4 a 5 semanas.

#### **3.2.2.4 Construcción de curvas de crecimiento de callos**

Para la construcción de las curvas de crecimiento de callos, se evaluó el desarrollo de los cuatro tipos de callos que presentaron mejores resultados en cuanto a su velocidad de crecimiento (Ver sección de resultados 4.2.2). Para esto, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Callos de la misma línea celular y con la misma edad de cultivo fueron divididos en 18 porciones iguales de aproximadamente 0,1-0,2 g en peso fresco.
2. El peso exacto de las porciones fue tabulado.
3. Los callos fueron depositados en placas con medio de cultivo correspondiente.
4. Cada una semana de cultivo, partiendo desde el día cero, tres callos fueron removidos del medio de cultivo y se registró su peso fresco y seco.
5. Para la medición del peso seco, los callos fueron depositados en una estufa a 45°C y su peso fue registrado dos días después de depositados en la estufa.
6. Se promedió el peso de los tres callos y se calculó su desviación estándar, tanto para los valores de peso fresco como los de peso seco.
7. Los datos fueron registrados para la elaboración de la curva de crecimiento en peso fresco y seco.

#### **3.2.3 Cultivos de células en suspensión**

Luego de obtener una línea celular de tejido calloso estable, cuyas características morfológicas no variasen de gran manera entre subcultivos y que fueran relativamente friables, se procedió a seleccionar aquellas condiciones hormonales que brindaron mejores resultados en el crecimiento de los callos (Ver sección de resultados 4.2.2). Luego, se elaboraron los medios de cultivos líquidos necesarios y posteriormente se iniciaron los cultivos de células en suspensión.

##### **3.2.3.1 Preparación de medios de cultivo líquidos**

Para la elaboración de los medios líquidos para los cultivos de células de *A. chilensis* en suspensión, se procedió con el siguiente protocolo:

1. Para el caso del medio de cultivo MS, para 1 L se pesaron 4,43 g del medio en polvo.
2. Para el caso del medio de cultivo Gamborg B-5, para 1 L se pesaron 3,21 g de medio.
3. Para ambos casos se añadieron 30 g de sacarosa, como fuente de carbono.
4. Se agregó agua MilliQ hasta completar 1 L o el volumen necesario a preparar.
5. Se agitó y ajustó pH en un rango de 5,6 – 5,8 con KOH 1 M.



6. La mezcla anterior fue autoclavada durante 20 min a 120 °C.
7. Al momento de utilizar los medios de cultivo se añadió el volumen hormonal necesario.

### 3.2.3.2 Iniciación de los cultivos de células en suspensión a partir de cultivos de callos

Para la iniciación de los cultivos de células en suspensión de *A. chilensis* se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Trabajando bajo campana de flujo laminar previamente desinfectada con radiación UV durante 15 min, se removió los callos crecidos en medio sólido con pinzas estériles, y se depositaron sobre un papel filtro autoclavado en una placa de Petri de vidrio.
2. Utilizando un bisturí estéril, se cortó 2 g de masa callosa en peso fresco en fragmentos más pequeños (2-3 mm de largo) y se lo transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 3 deflectores (como el que se muestra en la Figura 16) que contenía 50 ml de medio de cultivo adicionado con las hormonas respectivas.
3. El matraz fue incubado en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz dentro de un Shaker a 21°C y a 100 rpm hasta que el cultivo en suspensión se formase, es decir, hasta que la turbiedad del medio aumentara debido a la liberación de células independientes. Aquellos cultivos que fueron incubados en condiciones de oscuridad fueron envueltos en papel aluminio.



Figura 16: Matraz Erlenmeyer de 250 ml con 3 deflectores utilizado para los cultivos de células en suspensión de *A. chilensis*.

### **3.2.3.3 Subcultivo y mantenimiento de las suspensiones celulares**

Una vez que el cultivo celular se tornó denso, con agregados celulares de diversos tamaños, se preparó una suspensión celular más fina mediante el protocolo que se describe a continuación:

1. Se inclinó el matraz durante unos segundos para permitir que los agregados celulares de mayor tamaño se asentaran.
2. Cuidadosamente se decantó o pipeteó solamente el medio que contenía agregados celulares finos (sobrenadante) en un frasco Erlenmeyer de 250 ml con 3 deflectores, que contenía igual volumen de medio de cultivo que el inóculo agregado.
3. El nuevo cultivo en suspensión se incubó nuevamente en la cámara de cultivo en agitación a 100 rpm a 21 °C.

El protocolo descrito anteriormente también se utilizó para llevar a cabo el mantenimiento y subcultivo de las suspensiones celulares, el cual fue ejecutado cada 3 a 6 semanas, dependiendo de la densidad del cultivo.

### **3.2.3.4 Construcción de curvas de crecimiento de cultivos en suspensión**

Para la construcción de las curvas de crecimiento de los cultivos celulares, se evaluó el desarrollo de tres condiciones de crecimiento que presentaron buenos resultados (Ver sección de resultados 4.3.1). Para esto, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se inició tres cultivos en suspensión mediante el protocolo descrito en la sección anterior para cada condición a evaluar.
2. Cada seis días de cultivo, partiendo desde el día cero, se extrajo tres alícuotas de 1 [ml] de cada uno de los tres cultivos paralelos. Este paso se realizó agitando el matraz previo a la extracción de la alícuota para evitar variaciones en las muestras debido a la sedimentación de las células.
3. Las alícuotas de cada medición fueron depositadas en tubos de micro-centrífuga de 1,5 ml cuyo peso había sido previamente registrado.
4. Los tubos con las alícuotas fueron centrifugados durante 5 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente.
5. El sobrenadante de los tubos fue cuidadosamente eliminado, procurando no eliminar parte del pellet de células.
6. El peso de los tubos con el pellet fue registrado y el peso del pellet fue calculado mediante la diferencia entre el peso del tubo y el peso del tubo más pellet.
7. Las tres mediciones fueron promediadas obteniendo de este modo la concentración del cultivo con su respectiva variación estándar.
8. Los datos fueron registrados para la elaboración de la curva de crecimiento en peso fresco de los cultivos en suspensión.

### **3.2.4 Inducción de la producción de antocianinas**

Luego de haber subcultivado los cultivos en suspensión 4 veces o más, se procedió a realizar la segunda etapa del cultivo correspondiente a la inducción de la producción de

antocianinas. La inducción se realizó con los elicitores MJ (metil jasmonato) y ABA (ácido abscísico). Se agregó el inductor al cultivo al comienzo de la etapa estacionaria, entre la cuarta y quinta semana de cultivo. Para esto, primero se midió la concentración del cultivo a inducir por medio del siguiente protocolo:

1. Se extrajo 3 alícuotas de 1 ml cada una y se las depositó en tubos de microcentrífuga cuyo peso fue previamente registrado.
2. Los tubos fueron centrifugados durante 5 min a 12.000 rpm a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante.
3. Se registró el peso del tubo más el pellet y se calculó el peso del pellet mediante la diferencia del peso del tubo con y sin pellet.

Luego, se procedió a realizar la inducción con los diferentes elicitores en ensayos independientes, ejecutando el siguiente protocolo:

1. Se calculó el volumen que contenía 1 g de células.
2. Se extrajo 1 g de células a partir del cultivo originario y se depositó en un tubo falcon de 50 ml. Esta operación se llevó a cabo en duplicado.
3. Los 2 tubos fueron centrifugados a 1.500 rpm durante 10 minutos aproximadamente.
4. El sobrenadante fue eliminado y se añadió 10 ml de medio fresco adicionado con el inductor correspondiente. Las concentraciones utilizadas de los inductores se detallan en la Tabla 3.
5. Los cultivos fueron depositados en matraces de 250 ml y se los mantuvo en agitación a 90 rpm a 20 °C durante el tiempo de incubación detallado en la Tabla 3.

Tabla 3: Concentración de elicitores utilizados para promover la inducción de la producción de antocianinas en los cultivo de células en suspensión de *A. chilensis*.

<b>Elicitor</b>	<b>Concentración [<math>\mu</math>M]</b>	<b>Tiempo de incubación [días]</b>
Metil Jasmonato	100	7
Ácido Abscísico	100	9

Luego de transcurrido el tiempo de incubación con los diferentes elicitores, las muestras fueron depositadas en tubos Falcon de 15 ml y fueron congeladas con nitrógeno líquido y mantenidas a -80 °C. Posteriormente, las muestras fueron enviadas al laboratorio Glu Chile para realizar el estudio del contenido de antocianinas.

### 3.3 Análisis para el estudio del contenido de antocianinas

A continuación se presenta el protocolo facilitado por el laboratorio Glu Chile para el estudio del contenido de antocianinas de las muestras enviadas.

Para la cuantificación de antocianinas totales, aproximadamente 2 g de callos o muestras de cultivos de células en suspensión fueron utilizados. Las muestras que previamente fueron mantenidas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  fueron enviadas en un cooler ( $5^{\circ}\text{C}$ ) al laboratorio Glu Chile. Las muestras fueron depositadas en un matraz de Erlenmeyer con 50 ml de metanol:HCl 37% (98:2) y mantenidas por 2 h a temperatura ambiente en oscuridad, luego fueron disgregadas utilizando un sistema Ultraturrax (T 25 Digital IKA) y posteriormente agitadas magnéticamente durante 60 min.

Antes de la inyección en HPLC las muestras fueron centrifugadas a 5.400 rpm y filtradas con un filtro de jeringa desechable de PTFE y  $0,45\ \mu\text{m}$ .

Los estándares de delfinidinas y cianidinas fueron adquiridos de ExtraSynthese. La cuantificación de antocianinas se llevó a cabo directamente a partir de las áreas de los picos obtenidos a 520 nm, mediante referenciación directa a las curvas de calibración obtenidas con cada una de las diferentes cianidinas y delfinidinas glicosiladas, excepto la delfinidina-3-sambubiosido-5-glucósido, cuya concentración fue determinada mediante la diferencia entre las áreas de los picos.

**Análisis HPLC-PAD-MS:** Las antocianinas fueron analizadas por HPLC (Pump and Autosampler System, Waters Corp., USA) equipada con una columna C18 (EMauer C18, 4,6mm id x 250mm; con precolumna, Eurospher 100-5 C18). La columna fue eluída con una fase móvil compuesta de 0,3% de ácido trifluoroacético (solvente A) y acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (solvente B) v/v. La elución isocrática inicial fue a 95:5 (A:B) por 4 min; incrementada a 90:10 (A:B) durante 4,5 min; incrementada a 85:15 (A:B) durante 27 min; 47 min a 45:55 (A:B); 48 min a 10:90 (A:B); 50 min a 10:90 (A:B); 52 min a 95:5 (A:B); y finalmente incrementada a 95:5 (A:B) durante 60 min. El volumen de la inyección fue de 20  $\mu\text{l}$ . La velocidad de flujo se estableció a 0,7 ml/min. La longitud de onda para la detección fue de 520 nm y la columna fue mantenida a  $30^{\circ}\text{C}$ . La detección se realizó mediante un Detector PDA 2996 (Waters Corp., USA) y analizadas mediante el software Empower 3 Pro Chromatography Management.

## 4. Resultados y discusiones

### 4.1 Establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de maqui

La primera etapa del estudio consistió en el establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de *A. chilensis* y en la identificación de sus condiciones de cultivo. En base a las condiciones ambientales existentes en la cámara de cultivo vegetal del laboratorio, se decidió fijar ciertos parámetros como la temperatura (21°C) y la iluminación. Además, en base a la literatura se decidió utilizar únicamente medio Murashige & Skoog (MS) con un pH final entre 5,6-5,8, con una concentración de sacarosa del 3% (p/v) y una concentración de agar del 0,7% (p/v) [128].

En cuanto a la composición del medio basal MS, este se compone de micronutrientes, macronutrientes y vitaminas. Para mayor detalle ver composición en la Tabla 9 de la sección Anexos A.

Uno de los problemas identificado en el cultivo *in vitro* de plantas de maqui es su elevada producción de fenoles, lo que se refleja en la fuerte coloración rojiza que se observa comúnmente en ramas y hojas de la planta. Estos compuestos fenólicos se liberan cuando los tejidos son dañados, y se manifiestan con un ennegrecimiento del medio de cultivo alrededor del explante, lo que se puede extender a todo el medio. Este problema puede ocasionar serias dificultades en el establecimiento y supervivencia de los explantes de la mayoría de las especies, provocando daños al crecimiento y hasta la muerte del explante [129] [130]. Para superar la barrera anteriormente mencionada, una de las prácticas más comunes es añadir antioxidantes al medio de cultivo, los que son inhibidores de la polifenoloxidasas, o adsorbentes de los compuestos fenólicos liberados al medio. [131]. En el presente estudio se optó por la utilización de carbón activado y ácido cítrico, compuestos utilizados también en el establecimiento de diversas plantas *in vitro*, como por ejemplo de *Laelia lundii* (Orquidáceas) [129].

Para el establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de maqui se implementaron dos rutas, las que se explicaron previamente en la sección de Metodología; una de ellas corresponde al establecimiento por medio de estacas y la otra al establecimiento por medio de embriones. Los resultados de ambas rutas se explican a continuación.

#### 4.1.1 Establecimiento de cultivos a partir de explantes de plantas silvestres

En cuanto a los resultados obtenidos del establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de maqui, desde explantes de plantas silvestres, de un total de 54 estacas plantadas, sólo un 15% (8 explantes) no presentó ningún tipo de contaminación. Asimismo, todos los explantes que no presentaron signos de contaminación fueron higienizados mediante el tratamiento L2, por lo tanto, para la especie vegetal en estudio resulta necesario un proceso de limpieza de mayor intensidad, como por ejemplo el uso de un detergente de polisorbato 20 (comercialmente conocido como Tween® 20). De

aquellos cultivos que alcanzaron asepsia, 5 no poseían yemas apicales ni axilares y 3 sí los contenían, representando cerca del 69% y 92% de contaminación de los cultivos, respectivamente. Estos resultados se detallan en la Tabla 4.

La contaminación de mayor frecuencia en las muestras fue a causa de hongos, registrándose también en algunos casos la presencia de levaduras. En particular, la elevada tasa de contaminación que afectó a los explantes con yemas apicales o axilares, guarda relación con la mayor dificultad en lograr la eliminación de cualquier microorganismo de ese tipo de explante, debido al mayor número de pliegues que presentan.

Tabla 4: Número de explantes no contaminados para los diferentes tratamientos de limpieza implementados (L1 y L2), en los diferentes medios de cultivo empleados y según la ausencia (S/Y) o presencia (C/Y) de yemas apicales o axilares en las estacas.

Medio de cultivo		N° Estacas plantadas		Tratamiento L1		Tratamiento L2		N° explantes no contaminados			
		S/Y	C/Y	S/Y	C/Y	S/Y	C/Y	L1		L2	
								S/Y	C/Y	S/Y	C/Y
M1	3MS	5	13	2	3	3	10	0	0	2	1
M2	3MS+CA	5	13	2	3	3	10	0	0	1	0
M3	3MS+CA+Ac	6	12	2	3	3	10	0	0	2	2

El proceso de higienización de los explantes de maqui es una etapa cuyo rendimiento puede ser mejorado, por ejemplo, añadiendo un tratamiento con algún antimicótico y/o antibiótico, o cepillando los explantes con una brocha estéril. Sin embargo, durante el curso del estudio no se continuó perfeccionando esta etapa, debido a que el establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de maqui se realizó únicamente con el objetivo de contar con una fuente de hojas estériles para su posterior inducción callogénica, y no se realizó con afán de optimizar el protocolo de limpieza de los explantes.

En relación a la viabilidad de aquellos explantes que superaron el proceso de higienización, aquéllos que no contenían yemas apicales o axilares no resultaron viables y murieron, sobreviviendo solo aquéllos que sí presentaban brotes (Figura 17). Asimismo, de aquellos explantes que resultaron viables, aquéllos que contenían brotes apicales presentaron un crecimiento más acelerado en comparación a aquéllos que solo contenían brotes axilares, fenómeno que puede ser explicado debido al mayor desarrollo del brote apical producto de la dominancia apical<sup>4</sup> que puede haber ejercido esta yema sobre las yemas axilares, cuando la planta se encontraba completa en estado silvestre. Del mismo modo, el número de brotes es una variable importante en la fase de establecimiento de los cultivos y en la micropropagación de éstos, ya que a mayor número de brotes se tendrá una mayor tasa de multiplicación [132].

La única planta *in vitro* cultivada inicialmente en medio M1 (ver Tabla 4) que no se contaminó y que resultó viable, creció lentamente y sus hojas y tallo adquirieron una pigmentación rojiza parcial, producto de la síntesis de fenoles. Lo anterior es un indicio de que la planta estaba sufriendo algún tipo de estrés [133]. En cambio, como se observa

<sup>4</sup> Término utilizado para definir el fenómeno en donde la yema apical controla o inhibe el crecimiento de los brotes axilares [145].

en la Figura 17, los cultivos en medio M3 no presentan señales de producción de fenoles, es por esto que se decidió micropropagar la planta *in vitro* en medio M1 a medio M3.

Un aspecto importante observado en los cultivos de plantas *in vitro* establecidos por medio de estacas de plantas silvestres, es que una vez que se llevó a cabo su micropropagación, los nuevos cultivos no presentaron un buen crecimiento, registrándose en algunos casos atrofia en su desarrollo. Lo anterior puede deberse a que la planta no logró adaptarse correctamente a las nuevas condiciones de cultivo, así como también puede ser producto de que la planta madre de donde se obtuvieron los explantes no haya estado en condiciones óptimas de crecimiento, como por ejemplo, por vejez de la planta, algún tipo de infección por virus u otro microorganismo, o que haya estado sometida a algún tipo de estrés ambiental. Esta característica no se observó en el caso del establecimiento de cultivos *in vitro* por medio de embriones cigóticos, lo cual es explicado en la siguiente sección.

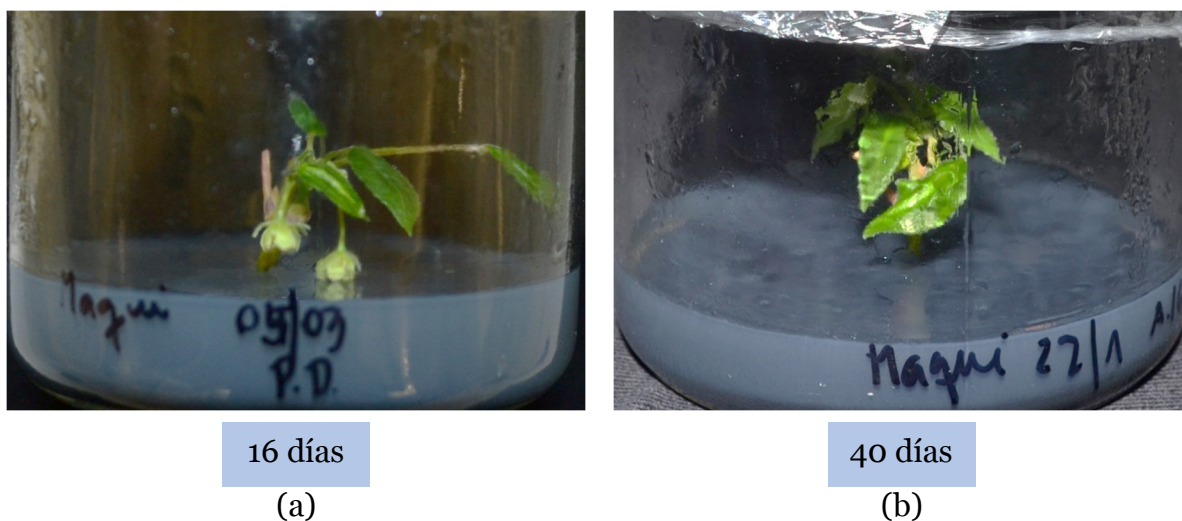


Figura 17: Fotografías de dos cultivos *in vitro* de plantas de *A. chilensis* establecidos por medio de explantes obtenidos a partir de plantas silvestres. Ambos cultivos se encuentran en medio M3. (a) Fotografía de un cultivo a los 16 días de su plantación, se observa el florecimiento de la planta (b) Fotografía de un cultivo a los 40 días de su plantación.

#### 4.1.2 Establecimiento de cultivos a partir de embriones cigóticos

El establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de maqui por medio de la extracción y posterior siembra de embriones cigóticos, resultó ser más rápida y efectiva que el uso de explantes de plantas silvestres.

Cabe mencionar que se optó por la utilización de embriones cigóticos y no se implementó una metodología de escarificación de las semillas, debido a que los procesos de escarificación usualmente requieren de varias etapas que involucran una gran inversión de tiempo. En cambio, la extracción de embriones resulta tener una mayor rapidez una vez que se logra extraer los embriones con éxito.

Utilizando el protocolo de limpieza L2 en la higienización de semillas, la contaminación de los embriones resultó ser muy baja (ver Tabla 5). Lo anterior se debe al pequeño tamaño y a la superficie lisa de las semillas, características que facilitan su esterilización. Además, el número de embriones no contaminados y viables luego de su extracción (ver Tabla 5) ascendió a 15, lo que representa el 50% de los embriones extraídos inicialmente. La inviabilidad de los embriones puede deberse a que la semilla utilizada era inviable o a una mala manipulación al momento de la extracción.

Tabla 5: Número de embriones no contaminados y viables para el establecimiento de cultivos *in vitro* de *A. chilensis*.

Nº de embriones extraídos	Embriones no contaminados	Embriones no contaminados viables
30	83% (25/30)	60% (15/25)

En la Figura 18 se muestra la evolución de una planta *in vitro* de maqui establecida a partir de un embrión cigótico. En la primera imagen (Figura 18 (a)) se muestra el embrión a 9 días de su siembra, en el cual se evidencia su germinación. A 16 días de la siembra del embrión (Figura 18 (b)), es posible evidenciar el desarrollo de una plántula de maqui que consta de la raíz embrionaria, el hipocótilo y las hojas embrionarias (cotiledones). Posteriormente, una vez que la plántula se subcultivó al frasco de micropropagación con el medio de cultivo utilizado, aproximadamente a los 30 días de su siembra fue posible evidenciar el crecimiento de una planta *in vitro* de maqui de tamaño mediano de aproximadamente 5 cm de altura (Figura 18 (c)).

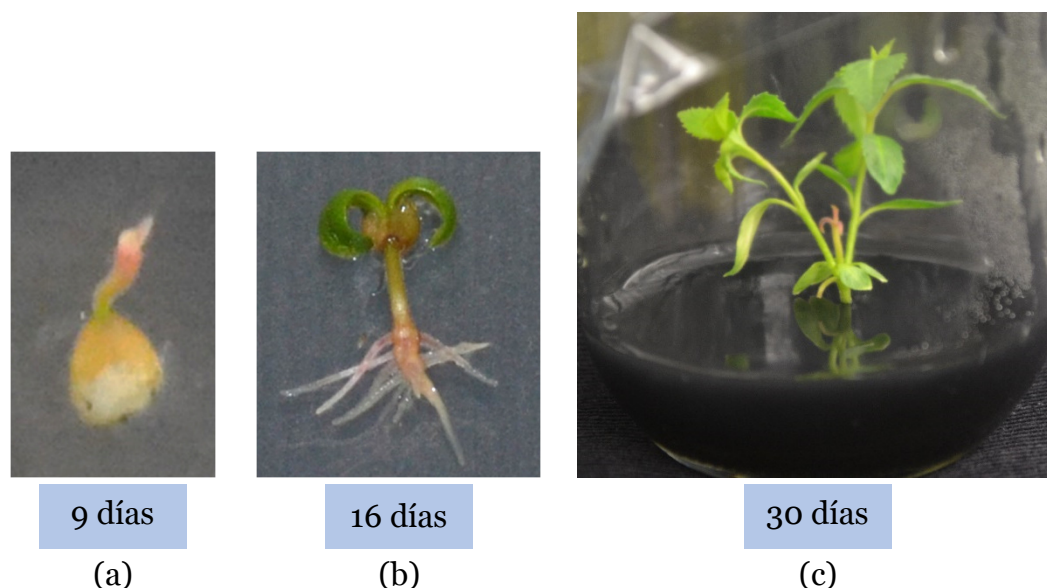


Figura 18: Fotografías de la evolución de una planta de maqui *in vitro* establecida a partir de embriones cigóticos. (a) Embrión a los 9 días de su siembra. (b) Plántula de *A. chilensis* a los 16 días de la siembra del embrión. (c) Planta de maqui *in vitro* a los 30 días de la siembra del embrión.



El empleo de embriones cigóticos para establecer cultivos de plantas *in vitro* tiene ventajas en relación a la utilización de estacas de plantas silvestres, debido a que el proceso de esterilización es más efectivo, y a que el desarrollo y crecimiento de la planta es de mayor rapidez. Esto último se debe a que la planta no debe pasar por un período de adaptación a las condiciones de cultivo *in vitro*, como sucede en el caso del establecimiento por medio de estacas. En contraste, una desventaja en la utilización de embriones cigóticos es que las características fenotípicas particulares que puedan resultar de interés de la planta madre, no necesariamente serán traspasadas a la descendencia, por lo tanto, no es posible asegurar que la planta que se desarrolle *in vitro* a partir de una semilla tenga las mismas características que su planta madre. Esto resulta de particular interés en el caso de anomalías de la planta, como por ejemplo, en el caso de la variante albina de *A. chilensis*.

Por otro lado, la micropropagación de las plantas *in vitro* establecidas a partir de embriones cigóticos resultó exitosa, en contraste a lo ocurrido con los cultivos establecidos por medio de estacas. Las plantas micropropagadas presentaron un crecimiento vigoroso en un tiempo relativamente corto, aproximadamente 3 a 4 semanas. Lo anterior puede deberse al mayor vigor del embrión en comparación a las células no embrionarias, así como también a que las plantas establecidas a partir de embriones se encontraban mejor adaptadas a las condiciones de cultivo *in vitro*.

## **4.2 Establecimiento de cultivos *in vitro* de callos de *A. chilensis***

La segunda etapa crucial en el estudio, fue el establecimiento de cultivos *in vitro* de callos de *A. chilensis*. Con este fin se estudió la inducción callogénica por medio de distintas fuentes de explante, en diferentes condiciones de cultivo. Una vez que la inducción callogénica fue exitosa, se estudió el crecimiento de los callos, su proliferación y el mantenimiento en distintos medios de cultivo con diferentes reguladores del crecimiento. A continuación se detallan y analizan los resultados obtenidos.

### **4.2.1 Identificación de las condiciones para la inducción de callogénesis**

La inducción callogénica se llevó a cabo a partir de tres explantes: embriones cigóticos extraídos de semillas, cotiledones y hojas de cultivo de plantas *in vitro*. Los resultados de esta etapa se presentan en la Tabla 6. De los tratamientos hormonales aplicados, aquellos que brindaron mejores resultados fueron H2 y H4, que contenían Kinetina y NAA en diferentes concentraciones. El uso de estas hormonas en mezcla, resultó en la inducción de callos estables en *A. chilensis*.

Inicialmente, se aplicó los tratamientos hormonales H1 y H2 a embriones y hojas. Luego de 4 semanas de cultivo, el tratamiento H1 no indujo la producción de callos en ningún tipo de explante, por lo que no se continuó realizando ensayos con dicha combinación hormonal. En cambio, con el tratamiento H2, se observó indicios de callogénesis a 15 días de iniciado el cultivo desde embriones. El crecimiento de los callos

incipientes fue lento, presentando a los 40 días una estructura como la observada en la Figura 19 (a), en donde el tejido caloso es escaso. En un comienzo, el embrión germinó dando paso a la formación de cotiledones. Transcurrido el tiempo de cultivo, los cotiledones adquirieron una pigmentación púrpura, punto en el cual su crecimiento se atrofió y comenzó la desdiferenciación a callo, el cual inicialmente poseía la misma pigmentación que los cotiledones. Luego, el tejido caloso continuó lentamente su proliferación hasta adquirir un color verde, tal como se observa en dicha figura.

En cuanto a la inducción de callos con el tratamiento H2 a partir de hojas, la exposición de los cultivos a luz causó una fuerte oxidación de los explantes, que con el tiempo generó el ennegrecimiento del medio de cultivo y culminó en la muerte de los explantes. El nivel de oxidación de los cultivos disminuyó levemente cuando las placas se incubaron en completa oscuridad, sin embargo, la proliferación del tejido caloso fue muy lenta. Debido a lo anterior, se decidió ensayar con una concentración más elevada de kinetina y NAA, como en el tratamiento hormonal H4.

El tratamiento hormonal H3 no brindó resultados positivos, registrándose una leve inducción calogénica en un cotiledón dispuesto en oscuridad y en otro dispuesto en luz. El crecimiento de los callos incipientes se vio atrofiado luego de 4 semanas de cultivo, conllevando a la muerte del explante.

Tabla 6: Eficiencia en la inducción calogénica en luz y oscuridad en los tratamientos hormonales aplicados para las diferentes fuentes de explante de *A. chilensis*. Una velocidad de crecimiento lenta significa que la inducción calogénica surtió efecto luego de aproximadamente 5 a 6 semanas, una velocidad de crecimiento regular significa que los indicios de calogénesis se presentaron entre 3 a 4 semanas, y una velocidad de crecimiento rápida significa que la inducción calogénica se evidenció entre 1 y 2 semanas de iniciado el cultivo.

Tratamiento hormonal [mg/L]			Fuente de explante	N° réplicas		Eficiencia en calogénesis		Observación velocidad de crecimiento
				Luz	Osc.	Luz	Osc.	
H1	BAP	0,1	Embrión	10	0	0	0	-
	AIA	0,5	Hoja	3	3	0	0	-
H2	KIN	0,2	Embrión	10	0	50%	0	Regular
	NAA	0,1	Hoja	3	3	0	33%	Lento
H3	BAP	5	Hoja	3	3	0	0	-
	NAA	1	Cotiledón	5	5	20%	20%	Muy Lento
H4	KIN	1	Hoja	5	5	40%	100%	Rápida
	NAA	1	Cotiledón	5	5	80%	100%	Rápida
H5	KIN	0,1	Hoja	3	3	0	20%	Lento
	2,4-D	1	Cotiledón	5	5	40%	60%	Lento
H6	2,4-D	2	Hoja	3	3	0	66%	Lento
H7	BAP	1	Embrión	10	0	0	0	-
			Hoja	3	3	0	0	-

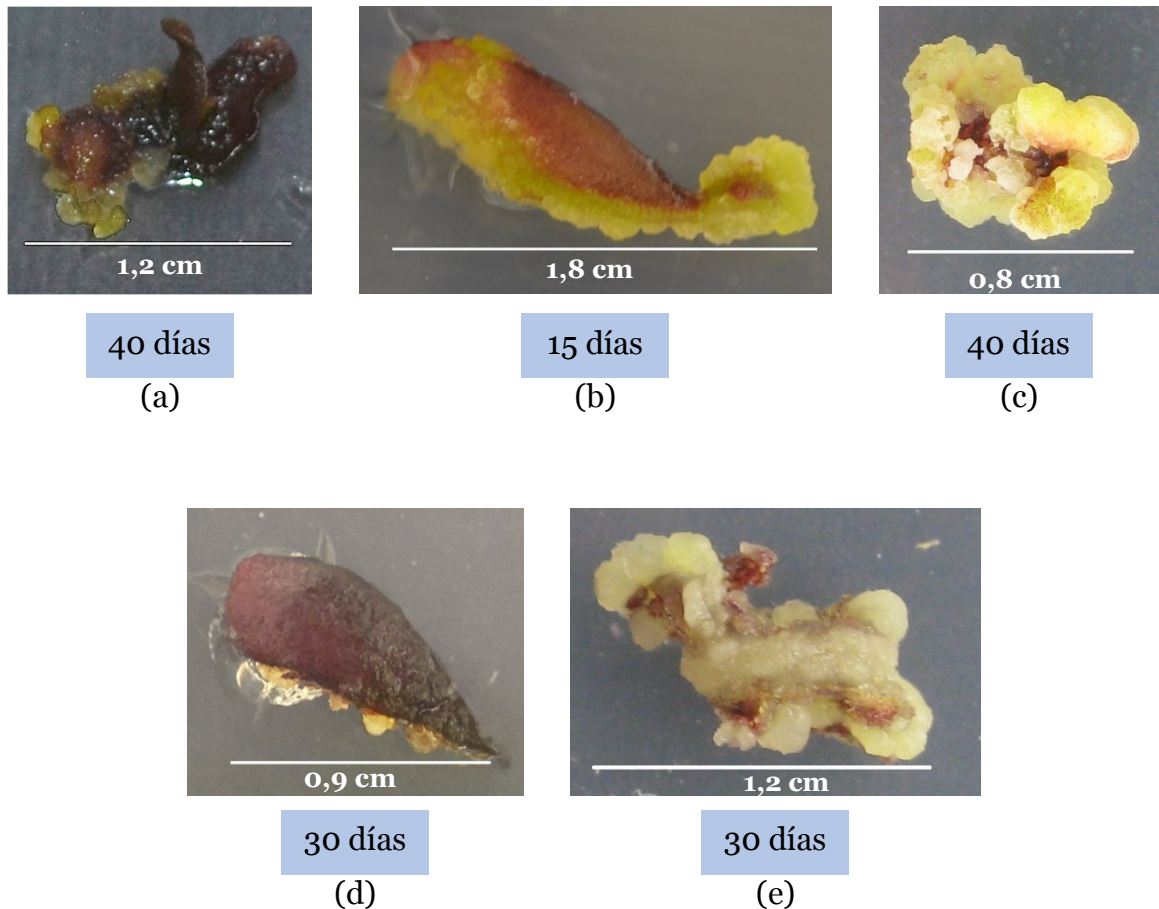


Figura 19: Calogénesis a partir de diferentes explantes de *A. chilensis* en los tratamientos hormonales que brindaron resultados positivos: (a) Embrión en luz en tratamiento H2 (b) Cotiledón en luz en tratamiento H4 (c) Hoja en luz en tratamiento H4 (d) Cotiledón en luz en tratamiento H5 (e) Hoja en oscuridad en tratamiento H6.

En relación al tratamiento hormonal H4, este fue el que entregó mejores resultados tanto en la velocidad de la inducción calogénica, como en la supervivencia y proliferación de los callos luego de ser subcultivados. En la Figura 19 (b) y (c) se muestran explantes de cotiledón y hojas, respectivamente, inducidos con el tratamiento H4. En ambos casos, la inducción calogénica se evidenció a pocos días de iniciado el cultivo, aproximadamente una semana para cotiledones y 2 semanas para hojas, y se caracterizó por la previa pigmentación púrpura del explante. La inducción calogénica fue de mayor rapidez en el caso de la utilización de cotiledones, probablemente debido al menor estado de diferenciación celular, en comparación con células de hojas. Sin embargo, la concentración hormonal del tratamiento H4 incluso permitió que el desarrollo del tejido caloso fuera mayor en el caso de hojas, en comparación con la inducción calogénica llevada a cabo a partir de embriones cigóticos con el tratamiento H2. Lo anterior es visible comparando la Figura 19 (a) y (c), en donde a los 40 días de iniciados ambos cultivos, la proliferación de la masa calosa es evidentemente mayor en el caso de hojas con tratamiento H4. Por otra parte, al igual que lo descrito en los tratamientos anteriores, la oxidación de los explantes de hojas expuestos a fotoperiodo fue elevada.

La aplicación del tratamiento hormonal H5 no entregó resultados positivos ya que la proliferación celular del tejido calloso fue muy lenta. Como se observa en la Figura 19 (d), a los 40 días de iniciado un cultivo a partir de cotiledón, se evidencia la presencia de tejido calloso a un nivel muy bajo. Posteriormente, debido a un agotamiento del medio de cultivo, el explante fue subcultivado, pero no se observó la proliferación de masa callosa en el medio de cultivo fresco. En este caso, también se evidenció la pigmentación púrpura de los explantes, además de la elevada oxidación y necrosis de los cultivos de hojas expuestos a luz, la cual ascendió al 60% de los cultivos.

En el caso de los cultivos con tratamiento hormonal H6, los resultados frente a la inducción callogénica fueron buenos. Como se muestra en la Figura 19 (e), a los 30 días de iniciado el cultivo con la auxina 2,4-D 2 [mg/L] se observó plena inducción y proliferación de tejido calloso, el cual presentó una coloración menos verde que en los casos descritos anteriormente, lo cual es producto de la ausencia de clorofila. Lo anterior guarda relación con el efecto herbicida que tiene esta auxina a grandes concentraciones, ya que es un inhibidor de la síntesis de clorofila, y por lo tanto de la fotosíntesis [134]. La inducción callogénica se evidenció aproximadamente a las 2 semanas de iniciado el cultivo y al igual que los casos descritos anteriormente, se vio precedida por la pigmentación púrpura del explante. Además, la callogénesis fue fructífera solo en aquellas hojas mantenidas en oscuridad debido a la fuerte oxidación de los explantes expuestos a luz. Sin embargo, resulta llamativo que aun estando en oscuridad, los explantes desarrollaron pigmentación púrpura. La consistencia del tejido calloso fue muy friable, siendo innecesaria la utilización de pinzas y bisturí para cortarlo cuando fue subcultivado. Lo anterior resulta sumamente positivo para el posterior establecimiento de cultivos de células en suspensión.

Finalmente, el tratamiento H7 no presentó signos inducción callogénica tanto a partir de embriones como de hojas. Luego de tres semanas de cultivo, el tejido de los explantes se oxidó y necrosó.

En todos los casos estudiados, fue usual la pigmentación púrpura de los explantes durante la fase previa a la desdiferenciación a callo. Esta pigmentación, se debe en parte a la producción de antocianinas, que se generan como respuesta al estrés al cual están sometidas las células del explante.

En relación a la presencia o ausencia de clorofila en las diferentes líneas de callos inducidos, aquellos callos cultivados con tratamientos hormonales que contenían citoquininas, como kinetina en el tratamiento H4, evidenciaron una mayor pigmentación de color verde. Lo anterior se debe a que las citoquininas son agentes importantes en la formación de los cloroplastos, por lo tanto su aplicación en los cultivos mejora la fotosíntesis [135]. En cambio, el tratamiento H6 que sólo contenía auxinas, produjo callos sin pigmentación. Lo anterior es producto de la ausencia de citoquininas y del efecto inhibidor de la fotosíntesis de la hormona 2,4-D.

#### **4.2.2 Identificación de las condiciones de subcultivo y mantenimiento de los callos**

Los callos inducidos a partir de hojas mediante el tratamiento hormonal H6 fueron subcultivados en el mismo tratamiento hormonal. Luego de unos días de haber sido

subcultivos, el tejido se necrosó y los callos murieron. Esto puede deberse a: 1) una mala manipulación al momento de llevar a cabo el traspaso del callo al medio fresco, 2) a vejez del tejido calloso que impidió que las células se multiplicaran o 3) a que los callos de *A. chilensis* inducidos con la hormona 2,4-D no son estables o viables.

En la Figura 20 se presentan las principales líneas de callos obtenidas a partir de embriones, cotiledones y hojas. En este esquema se resumen los diferentes cambios de medios y tratamientos hormonales que fueron realizados en los diferentes callos estudiados, y que resultaron fructíferos. Los callos indicados en la última fila del esquema para cada explante inicial, son aquellos que fueron mantenidos a lo largo del tiempo y cuyo comportamiento y crecimiento fueron estudiados.

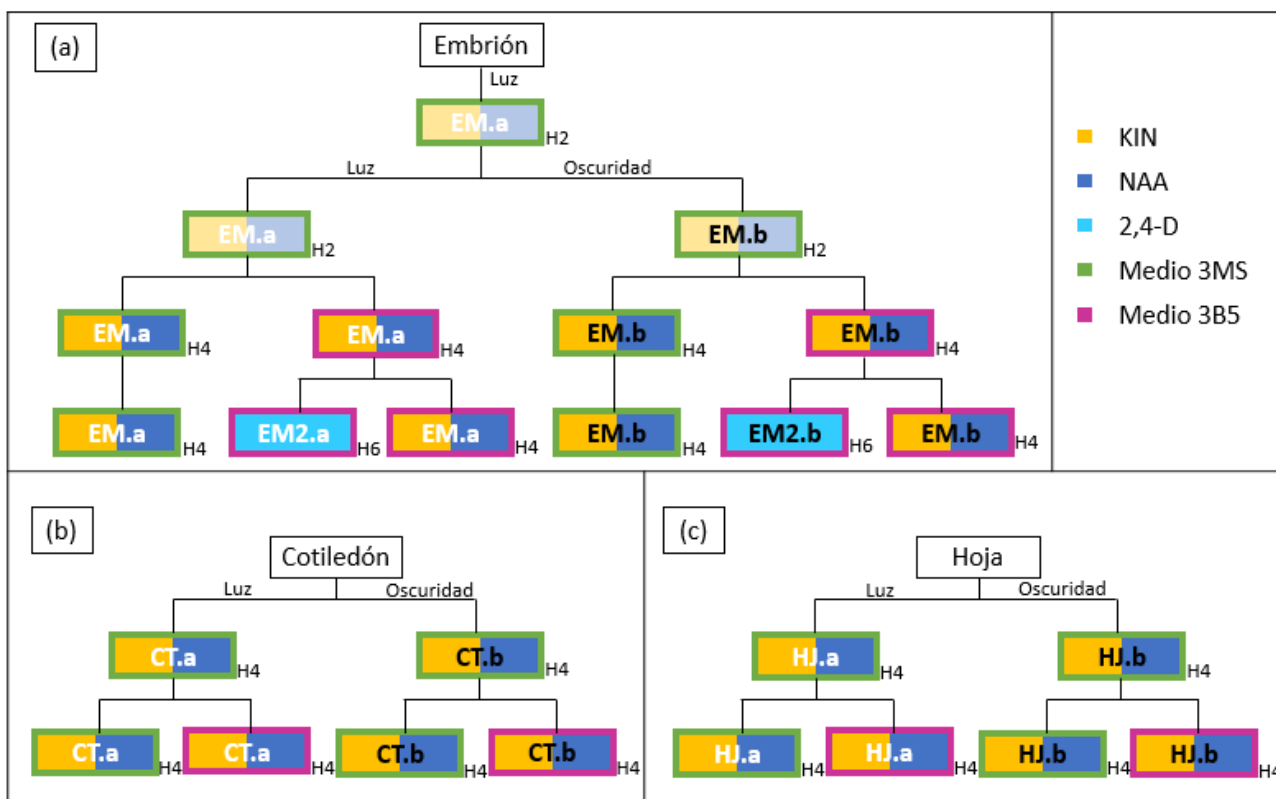


Figura 20: Líneas de callos obtenidas a partir de (a) Embriones, (b) Cotiledones y (c) Hojas. Los colores del borde de los cuadrantes indican el medio de cultivo utilizado (3MS o 3B5) y los colores dentro de los cuadrantes indican las hormonas utilizadas y su concentración dependiendo de la intensidad del color. Además, en la esquina inferior derecha de cada cuadrante se indica el tratamiento hormonal utilizado que se detalló previamente en la Tabla 6.

Los callos inducidos a partir de embrión mediante el tratamiento H2 fueron removidos de la placa inicial y subcultivos en placas con tratamiento H4. Este aumento en la concentración de hormonas generó callos de mayor estabilidad y mayor velocidad de crecimiento. Asimismo, la mitad de los callos inducidos mediante tratamiento H2 a partir de embrión y sometidos al tratamiento H4 se mantuvieron en oscuridad y el resto en luz (16 h luz; 8 h oscuridad). Esta línea generada fue identificada con las siglas EM.a y EM.b para el caso de exposición a luz (16 h luz; 8 h oscuridad) y oscuridad, respectivamente.

Los callos inducidos desde fragmentos de hojas con tratamiento H2, al igual que los callos inducidos a partir de embriones, fueron subcultivados en placas con tratamiento hormonal H4. Luego de unos días, las placas se contaminaron por lo que debieron ser desechadas. La contaminación generada fue producto de la mala manipulación de los instrumentos durante el procedimiento.

Todos los cultivos inducidos mediante tratamiento hormonal H4 fueron inicialmente subcultivados en placas con el mismo tratamiento hormonal inductor. En el caso de callos iniciados a partir de hojas, éstos fueron identificados con las siglas HJ.a y HJ.b para los cultivos mantenidos en luz y oscuridad, respectivamente; mientras que para el caso de los callos inducidos desde cotiledones, éstos fueron identificados con las siglas CT.a y CT.b para aquellos mantenidos en luz y oscuridad, respectivamente. El crecimiento de todos los callos cultivados en dicho tratamiento hormonal fue positivo ya que el 100% proliferó luego de ser subcultivados. Fue usual que durante los primeros dos días luego del subcultivo, los callos expuestos a luz se oxidaran y una pequeña porción del medio de cultivo alrededor del tejido se ennegreciera. Este efecto no fue permanente y no confluó en la muerte del tejido, ya que se detuvo después de unos días y los callos continuaron creciendo correctamente. El fenómeno descrito anteriormente se debe al estrés al cual son sometidas las células al momento de subcultivarlas, ya que muchas células del tejido calloso son dañadas por la acción de la pinza y el bisturí. Cabe destacar que, al momento de subcultivar los callos, se evitó depositar cualquier fragmento de tejido necrosado en el medio de cultivo fresco, para prevenir posibles daños de las células por los compuestos tóxicos que puede haber tenido el tejido dañado.

En cuanto a la morfología de los cultivos de callos inducidos a partir de los diferentes explantes (embrión, cotiledón y hoja) en tratamiento H2 y H4, todos ellos eran de consistencia muy compacta y dura (Figura 21 (a)), siendo necesaria la utilización de bisturí para cortarlos. Asimismo, los callos expuestos a luz eran de color verde y aquellos mantenidos en oscuridad incoloros, lo que se observa en la Figura 21 (b) y (c), respectivamente. Lo anterior es producto de la ausencia de clorofila, y por ende de fotosíntesis en los callos mantenidos en oscuridad, lo cual sitúa a estas células en un estado de mayor indiferenciación en relación a aquellos callos que sí producen clorofila debido a la exposición a luz. Por otro lado, como se muestra en la Figura 21, fue común que luego de aproximadamente dos semanas de cultivo la superficie de los callos se tornara blanquecina y de un aspecto vitrificado, efecto que se debe a la baja difusión de nutrientes y oxígeno desde el medio hacia dichas células una vez que el callo alcanza cierto tamaño.

Luego de aproximadamente 3 ciclos de subcultivo desde su inducción, algunos callos de la línea EM.a y EM.b fueron cambiados de medio 3MS a medio Gamborg b-5 (3% sacarosa) utilizando la misma concentración de hormonas del tratamiento H4. En la Figura 22 (a) y (b) se muestran fotografías de callos cultivados con medio 3B5 en luz y oscuridad respectivamente. Las características morfológicas de los callos cultivados en el nuevo medio no difirieron en forma significativa en relación a aquellos cultivados en el medio original 3MS, excepto en la menor oxidación inicial del fragmento de tejido calloso subcultivado, lo cual puede deberse a la menor concentración de nitratos que posee el medio Gamborg b-5 en comparación con el medio Murashige & Skoog [136].

Para comparar la velocidad de crecimiento de los callos en ambos medios de cultivo, 3MS y 3B5, se construyeron las curvas de crecimiento para 4 líneas de callos, aquellos cultivados en medio 3MS con tratamiento hormonal H4 expuestos a luz y



oscuridad; y aquellos cultivados en medio 3B5 con la misma concentración de hormonas del tratamiento H4 expuestos a luz y oscuridad. Los resultados se discuten en la próxima sección.

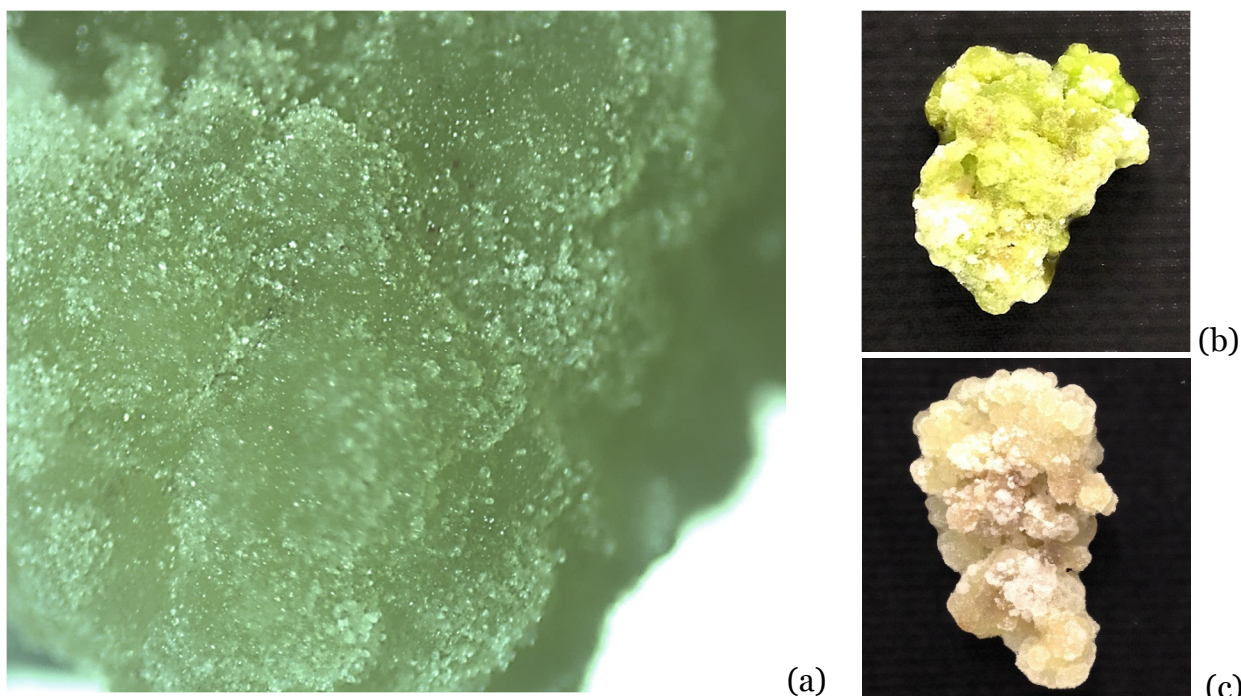


Figura 21: Callos inducidos mediante tratamiento hormonal H4 en medio de cultivo 3MS. Todos los callos corresponden a callos de 30 días de cultivo (a) Callo EM.a en medio 3MS tomada utilizando una lupa (Olympus SZ651) (b) Callo EM.a en medio 3MS. (c) Callo EM.b en medio 3MS.

Los callos de la línea EM.a y EM.b, cultivados en medio 3MS y 3B5, fueron subcultivados a medios con tratamiento hormonal H6 (2,4-D 2[mg/L]). Esta nueva línea de callos se denominó EM2.a y EM2.b para los que fueron expuestos a luz o mantenidos en oscuridad, respectivamente. Todos los callos subcultivados experimentaron un notorio mayor crecimiento en comparación a los cultivados con tratamiento H4. Al mismo tiempo, la morfología de los callos presentó una consistencia muy friable, siendo innecesaria la utilización de bisturí para cortarlos ya que se disgregaban fácilmente. Además, tanto los callos expuestos a luz como los mantenidos en oscuridad comenzaron inmediatamente a presentar un cambio de pigmentación que se tornó más intenso a medida que la edad del cultivo aumentaba. En el caso de los cultivos expuestos a luz, como se observa en la Figura 22 (c), durante la primera semana de cultivo los callos comenzaron a adquirir una pigmentación color rosa intenso, que fue tornándose en una coloración violeta oscuro conforme los días de cultivo transcurrían, alcanzando un máximo de coloración a los 20 días aproximadamente.

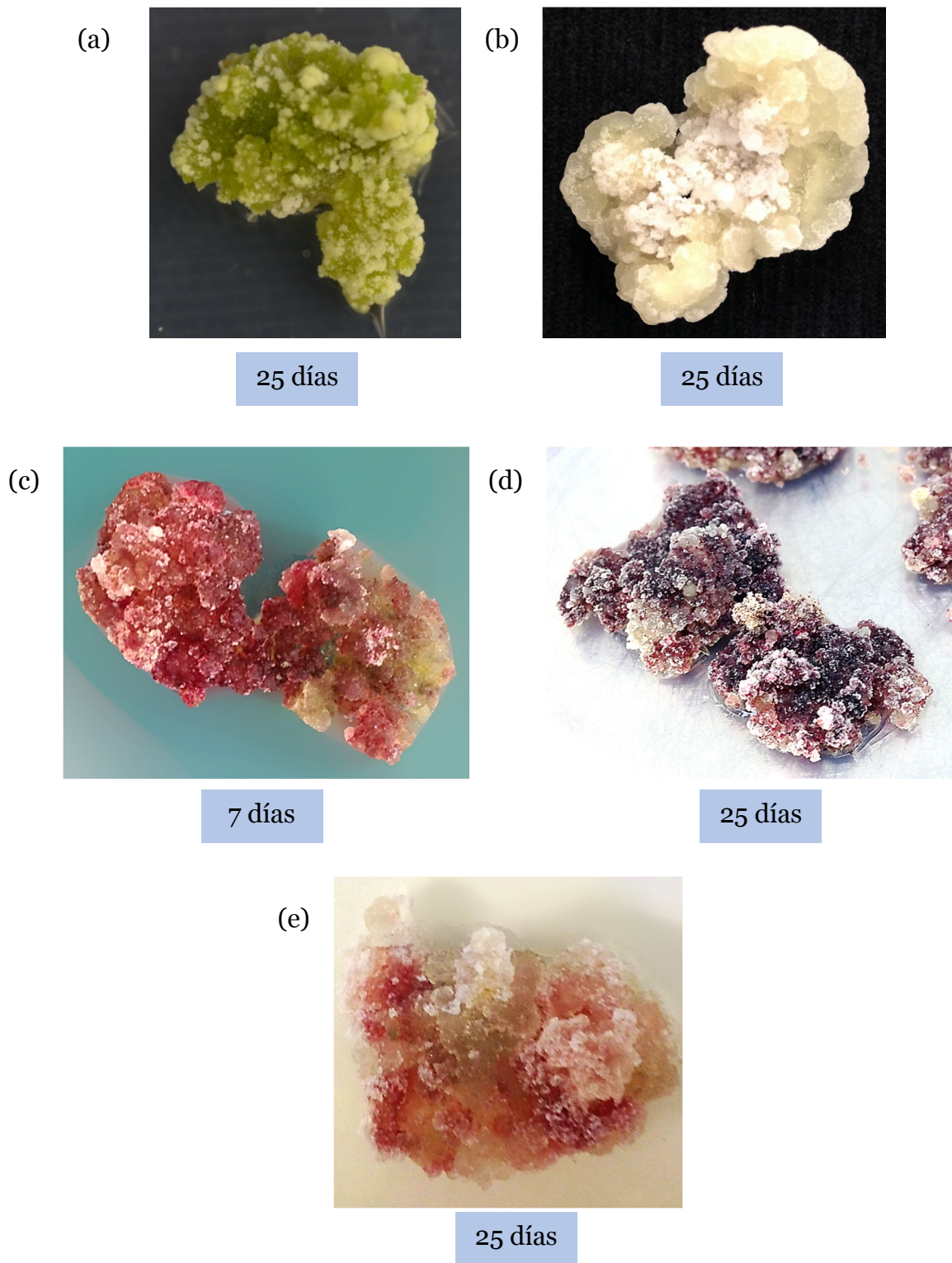


Figura 22: Cultivos *in vitro* de callos de *A. chilensis* bajo diferentes condiciones de cultivo. (a) Callo en medio 3B5 de la línea EM.a a 25 días de cultivo (b) Callo en medio 3B5 de la línea EM.b a 25 días de cultivo (c) Callo en medio 3B5 de la línea EM2.a a los 7 días de cultivo (d) Callo en medio 3B5 de la línea EM2.a a los 25 días de cultivo (e) Callo en medio 3B5 de la línea EM2.b a los 25 días de cultivo.



En la Figura 22 (d) se muestra un cultivo de callos expuestos a luz, cultivados con medio 3B5 y tratamiento hormonal H6 a 25 días de cultivo, en donde se observa una fuerte pigmentación en una vasta área del tejido. Sin embargo, es posible distinguir ciertas áreas del tejido en donde se evidencia una decoloración o falta de clorofila en las células. En general, estas áreas decoloradas se encontraban en la superficie de los callos, por lo que la decoloración puede ser producto de la baja difusión de nutrientes, pero en otros casos las áreas se encontraban dispersas a lo largo de todo el callo, por lo que no es posible asegurar una correlación certera entre la pigmentación y los factores del cultivo. Por otro lado, en la Figura 22 (e) se presenta la fotografía de un callo mantenido en oscuridad y cultivado en medio 3B5 con tratamiento hormonal H6, en donde se observa una pigmentación color rosa en un área del callo menor que aquellos expuestos a luz. Cabe mencionar que una vez que los callos con hormonas del tratamiento H6 fueron subcultivados en el mismo medio de cultivo y durante el nuevo crecimiento, el nivel de pigmentación no varió, manteniendo la coloración violeta oscura y difiriendo en algunos casos en el área del tejido cubierta por la pigmentación.

La pigmentación generada por los cultivos de callos anteriormente mencionados, es una evidencia de la posible producción de antocianinas por parte de las células del tejido. De esta manera, la transición en la pigmentación a lo largo de los días de cultivo puede explicarse en diferentes etapas en la producción de los distintos tipos de antocianinas. Por ende, la coloración rosa fuerte observada en los primeros días de cultivo puede ser producto de la síntesis en primera instancia de cianidinas, mientras el cambio de coloración posterior puede deberse a la ulterior producción de delfinidinas por parte de las células. Para confirmar la presencia de antocianinas en estos cultivos se llevó a cabo un análisis cualitativo para los diferentes tipos de antocianinas encontradas en el maqui, estos resultados se exponen y discuten en la sección de resultados 4.5.

El rendimiento de la biomasa celular y la producción de pigmentos en un cultivo de callos puede verse afectado por diferentes factores, como la intensidad lumínica y el tipo y concentración de reguladores del crecimiento utilizados. Como se mencionó en la sección de Introducción 1.6.4, en algunas especies vegetales la presencia de la auxina sintética 2,4-D inhibe la producción de antocianinas, mientras en otros casos el suplemento de esta hormona resulta fundamental para la síntesis de estos metabolitos secundarios. La producción de antocianinas por parte de estos callos puede ser producto de una respuesta a condiciones de estrés abiótico, generada por la presencia de esta hormona en particular. En cultivos *in vitro* de células indiferenciadas de otras especies vegetales se ha observado que las auxinas inducen la diferenciación de las células, promoviendo la síntesis de fenoles [137].

Es sabido que los cultivos de células vegetales indiferenciadas, como los callos, son de crecimiento lento y existe una gran heterogeneidad de tamaños y formas en sus células, lo cual es producto fundamentalmente de la disponibilidad vectorial de los nutrientes [138]. La presencia de áreas incoloras en los tejidos callosos mantenidos en auxina 2,4-D puede ser producto de los microambientes dentro del cultivo, en donde hay escasez de ciertos nutrientes, como por ejemplo, una baja difusión de auxina a esa área del tejido. Otra explicación para lo anterior, puede ser el acostumbamiento de las células a la hormona utilizada o a los diferentes mecanismos de regulación de la síntesis de antocianinas por parte de las células, que impiden la producción de estos metabolitos secundarios con el objetivo de priorizar el gasto energético al aumento de la biomasa.

Por otro lado, la luz parece ser un factor fundamental en el aumento de la producción de antocianinas por parte de callos de *A. chilensis*, ya que aquellos mantenidos en oscuridad presentaron una pigmentación notoriamente menor y más heterogénea en comparación a aquellos cultivos mantenidos en luz. Lo anterior es corroborado en un estudio bioinformático no publicado del Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor, en donde se identificó la presencia de elementos *cis*-reguladores de respuesta a luz en la ruta de biosíntesis de antocianinas en *A. chilensis*. Hasta el momento se han identificado dos condiciones que son fundamentales para la generación de callos productores de antocianinas en cultivos de callos de maqui; estas son la combinación y concentración de hormonas adecuada (en el presente caso 2,4-D 2[mg/L]), y la presencia de luz (16 h luz; 8 h oscuridad) a lo largo del período de cultivo.

### 4.2.3 Curvas de crecimiento de callos

Para la comparación del rendimiento de biomasa bajo las diferentes condiciones de cultivo, se llevó a cabo la medición de la cinética de crecimiento para cuatro líneas de callo durante 35 días de cultivo: aquellos cultivados en medio 3MS con tratamiento hormonal H4 expuestos a luz (3MS EM.a) y oscuridad (3MS EM.b); y aquellos cultivados en medio 3B5 con la misma concentración de hormonas del tratamiento H4 expuestos a luz (3B5 EM.a) y oscuridad (3B5 EM.b). El crecimiento se evaluó en base a tres variables: peso fresco, peso fresco normalizado y peso seco de los callos.

El peso fresco normalizado es el cociente entre el peso fresco del callo utilizado para la medición, y el peso fresco del inóculo usado para dicho cultivo. Esta operación se hizo para cada una de las mediciones llevadas a cabo a lo largo del ensayo. Lo anterior se realizó debido a que la alta variabilidad en la morfología de los callos, impidió la utilización de inóculos de igual tamaño y forma al inicio de los cultivos en estudio. Sin embargo, se procuró que el tamaño de los inóculos estuviera dentro de un rango entre 0,1 y 0,25 g. Se espera que si existiese una relación de dependencia entre la eficiencia de biomasa y el tamaño del inóculo, la normalización de las mediciones de peso fresco debería disminuir el error o desviación estándar de cada medición de la curva de crecimiento.

La forma de las curvas obtenidas se asemeja a grandes rasgos con las curvas típicas de este tipo de cultivos (Figura 11). Cabe destacar que en algunos casos la cantidad de mediciones fue insuficiente para detectar todas las fases de la curva de crecimiento, sin embargo, resultan suficientes para detectar la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación. También fue posible identificar el punto ideal para llevar a cabo el subcultivo de los callos, que debe realizarse al comienzo de la etapa estacionaria.

La fase exponencial de crecimiento de los cultivos vegetales se puede modelar mediante la siguiente ecuación:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t}$$

$X$  = Biomasa (g células frescas o secas)

$X_0$  = Biomasa en el tiempo cero (g células frescas o secas)

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento (día<sup>-1</sup>)

$t$  = Tiempo (día)

Además, el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de las células del cultivo se obtiene mediante la ecuación:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Cabe destacar que la fase de crecimiento exponencial de todos los cultivos estudiados se definió como aquel intervalo de puntos que se ajustara de mejor manera a la curva exponencial y que entregara el mayor  $R^2$ , uniendo un mínimo de dos puntos.

Las curvas de crecimiento para el cultivo de callos 3MS de la línea EM.a se presentan en la Figura 23. Para la curva de crecimiento en peso fresco (Figura 23 (a)) se observa una fase de latencia o de adaptación de 7 días y una fase de crecimiento de 28 días. No fue posible detectar las fases estacionaria y de muerte celular mediante la curva medida, pero se sabe de manera empírica que esta etapa comienza entre los 35 y 40 días debido al agotamiento y evaporación del medio de cultivo. La curva en peso fresco normalizado (Figura 23 (b)) exhibe una leve diferencia en su forma en comparación con la curva en peso fresco, que presenta una etapa de adaptación de 14 días y una fase de crecimiento también de 14 días, para luego iniciar la etapa estacionaria. Sin embargo, no es posible asegurar que la diferencia entre ambas curvas sea significativa, debido a la mayor desviación estándar que presenta la curva en peso fresco normalizado y a la poca cantidad de puntos. La curva de peso seco (Figura 23 (c)) presenta un comportamiento similar a la de peso fresco, la cual experimenta una fase de acostumbamiento de 7 días y una fase de crecimiento de 28 días. Asimismo, el tiempo de duplicación para este cultivo es de 11,7 días y una velocidad de crecimiento de  $0,059 \text{ día}^{-1}$  para el caso de la curva en peso seco (ver Tabla 7). Además, la humedad promedio del cultivo es de  $89,6 \pm 1,4\%$ , y la máxima biomasa alcanzada a lo largo del ensayo fue al día 35, con 1,8 g y 0,15 g en peso fresco y seco, respectivamente.

Tabla 7: Cinética de crecimiento para los distintos cultivos de callos de *A. chilensis* estudiados.

Cultivo	Curva de crecimiento	Ecuación del cultivo	$R^2$	Velocidad de crecimiento $\mu$ [ $\text{día}^{-1}$ ]	Tiempo de duplicación $t_d$ [día]
EM.a 3MS	P.F.	$x=0,162 \cdot e^{0,070 \cdot t}$	0,985	0,070	9,9
	P.F. nor.	$x=0,719 \cdot e^{0,079 \cdot t}$	0,988	0,079	8,8
	P.S.	$x=0,020 \cdot e^{0,059 \cdot t}$	0,991	0,059	11,7
EM.b 3MS	P.F.	$x=0,170 \cdot e^{0,042 \cdot t}$	0,939	0,042	16,6
	P.F. nor.	$x=0,975 \cdot e^{0,045 \cdot t}$	0,934	0,045	15,3
	P.S.	$x=0,017 \cdot e^{0,042 \cdot t}$	0,948	0,042	16,4
EM.a 3B5	P.F.	$x=0,099 \cdot e^{0,114 \cdot t}$	0,996	0,114	6,1
	P.F. nor.	$x=1,372 \cdot e^{0,070 \cdot t}$	0,999	0,070	9,9
	P.S.	$x=0,010 \cdot e^{0,104 \cdot t}$	0,995	0,104	6,7
EM.b 3B5	P.F.	$x=0,113 \cdot e^{0,094 \cdot t}$	0,997	0,094	7,4
	P.F. nor.	$x=0,991 \cdot e^{0,082 \cdot t}$	0,998	0,082	8,5
	P.S.	$x=0,014 \cdot e^{0,056 \cdot t}$	0,949	0,056	12,5

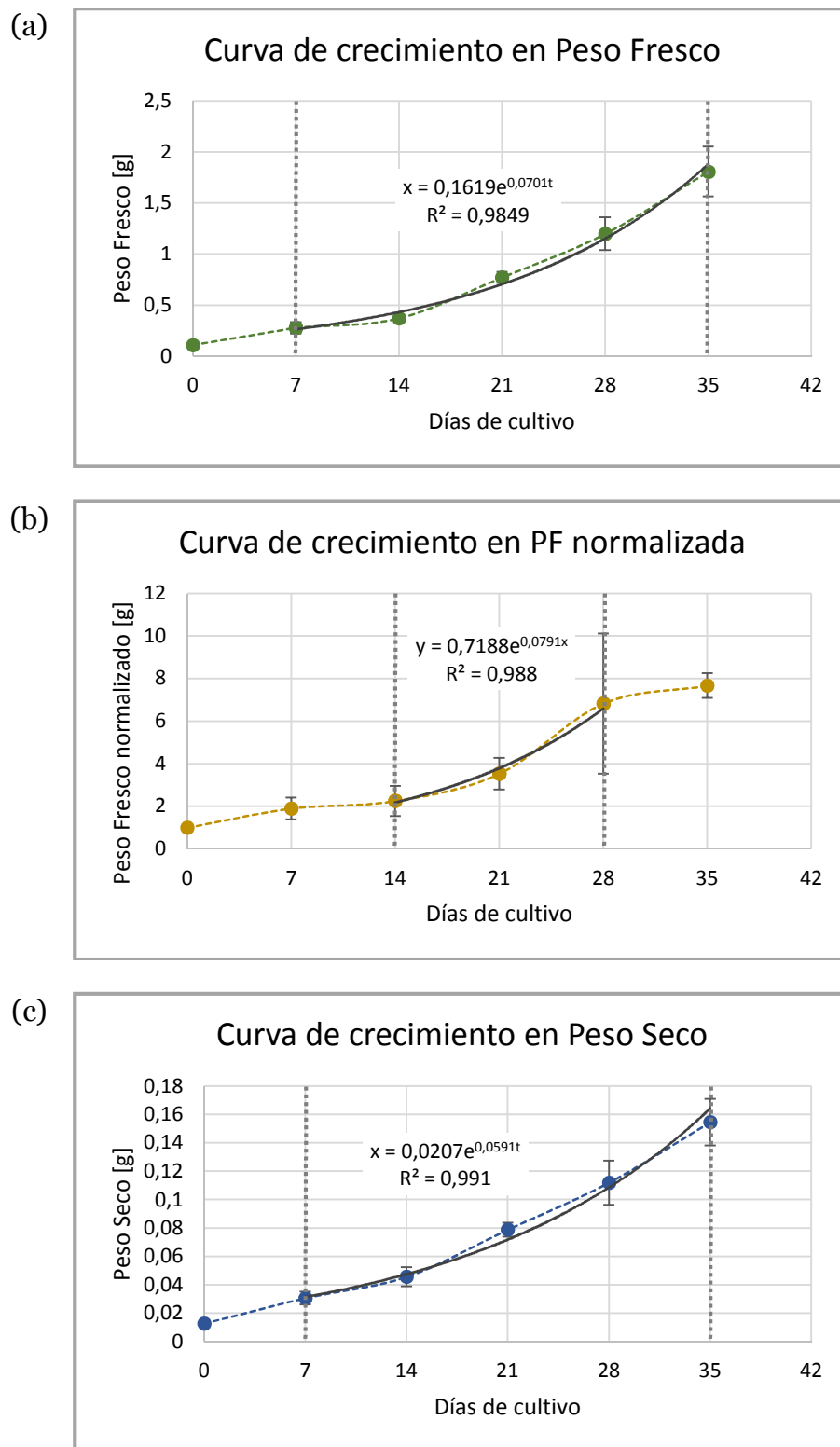


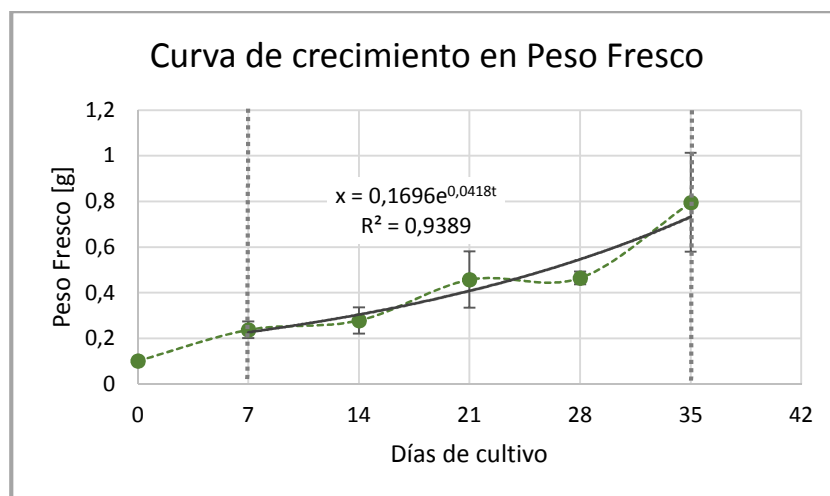
Figura 23: Curvas de crecimiento de callos EM.a cultivados en medio 3MS y mantenidos en luz (16 h luz; 8 h oscuridad). (a) Curva de crecimiento de callos en peso fresco. (b) Curva de crecimiento de callos en peso fresco normalizado. (c) Curva de crecimiento de callos en peso seco.

Las curvas de crecimiento del cultivo de callos 3MS de la línea EM.b se presentan en la Figura 24. En la curva en peso fresco (Figura 24 (a)) se observa una fase de adaptación de 7 días, seguida de un periodo de crecimiento exponencial de 28 días. En cambio, para la curva en peso fresco normalizado (Figura 24 (b)) la etapa de latencia tiene una duración de 14 días y una fase de crecimiento de 21 días. La curva en peso seco (Figura 24 (c)) exhibe las mismas características que la de peso fresco. Los parámetros de la cinética de crecimiento del cultivo no varían sustancialmente entre las diferentes curvas medidas, alcanzando un tiempo de duplicación de 16,4 días y una velocidad de crecimiento de  $0,042 \text{ día}^{-1}$  en el caso de la curva en peso seco (Tabla 7). Asimismo, la humedad promedio del cultivo es de  $90 \pm 0,6\%$  y la máxima biomasa alcanzada a lo largo del ensayo fue al día 35, con 0,8 g y 0,08 g en peso fresco y seco, respectivamente.

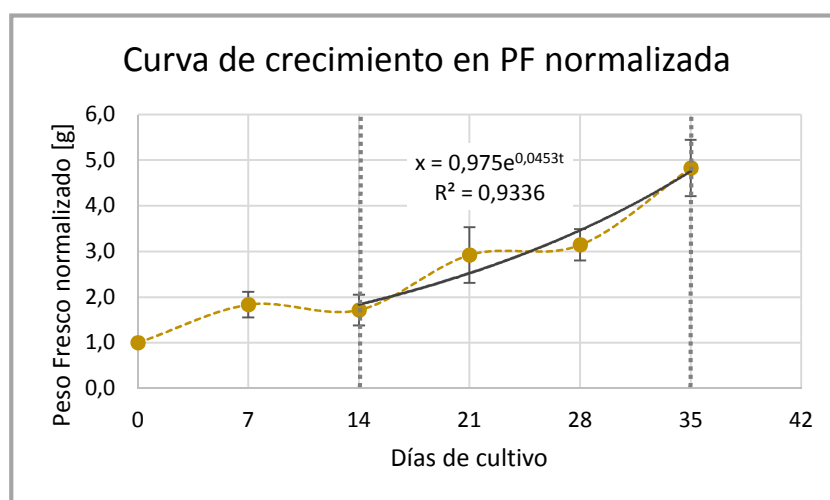
Las curvas de crecimiento del cultivo de callos 3B5 de la línea EM.a se muestran en la Figura 25. No se logró identificar la duración de la fase de adaptación celular en la curva en peso fresco (Figura 25 (a)), pero se infiere por la forma de la curva que debe ser menor a 7 días. La fase de crecimiento exponencial se estima en 14 días y la fase de desaceleración dura aproximadamente 14 días. Luego, el cultivo ingresa a la fase estacionaria y de posterior muerte celular. La curva en peso fresco normalizado (Figura 25 (b)) presenta una forma similar a la descrita anteriormente, con una fase de crecimiento exponencial entre los 7 y 21 días de cultivo, y una fase de desaceleración del crecimiento con una duración de 7 días. La curva en peso seco (Figura 25 (c)) presenta una variación con respecto a las otras curvas, ya que evidencia una etapa de crecimiento exponencial de aproximadamente 20 días, una etapa de desaceleración de una duración de 7 días y una etapa estacionaria y de muerte celular desde el día 28 en adelante. Por otro lado, los parámetros de la cinética de crecimiento no varían sustancialmente entre las curvas en peso fresco y seco (Tabla 7), alcanzándose un tiempo de duplicación de 6,7 días y una velocidad de crecimiento de  $0,104 \text{ día}^{-1}$  en el caso de la curva en peso seco. La humedad promedio del cultivo es de  $89,3 \pm 1,2\%$  y la máxima biomasa alcanzada fue de 1,1 g al día 35 en peso fresco, y de 0,13 g a los 28 días en peso seco.

Finalmente, las curvas de crecimiento del cultivo de callos 3B5 de la línea EM.b se presentan en la Figura 26. No fue posible distinguir con claridad la duración de la fase de adaptación en la curva en peso fresco (Figura 26 (a)), debido al rápido crecimiento del callo. La fase de crecimiento exponencial tiene una duración aproximada de 14 días, la fase de desaceleración una duración de 14 días y finalmente la etapa estacionaria y de muerte celular comienza a partir del día 35 de cultivo. La curva en peso fresco normalizado (Figura 26 (b)) presenta una fase de crecimiento de 21 días, una etapa de desaceleración de 7 días y una fase estacionaria y de muerte celular que parte desde el día 28 de cultivo. En cuanto a la curva en peso seco (Figura 26 (c)), fue de gran dificultad distinguir las diferentes etapas de crecimiento, dado que todos los puntos parecen ser parte de la fase de crecimiento exponencial. Debido a lo anterior, se consideró una duración de la fase exponencial de 35 días, ya que esta curva fue la que arrojó un mayor  $R^2$ . Además, los parámetros cinéticos variaron notoriamente entre la curva en peso fresco y seco, alcanzando un tiempo de duplicación de 12,5 días y una velocidad de crecimiento de  $0,056 \text{ día}^{-1}$  en el caso de la curva en peso seco. La humedad promedio del cultivo es de  $91,4 \pm 1,9\%$  y la máxima biomasa producida a lo largo del ensayo fue al día 35, con 1,1 g y 0,09 g en peso fresco y seco, respectivamente.

(a)



(b)



(c)

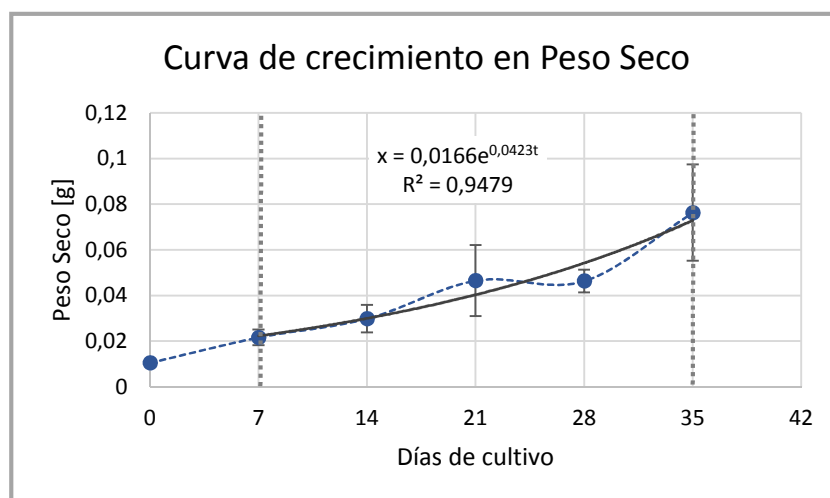
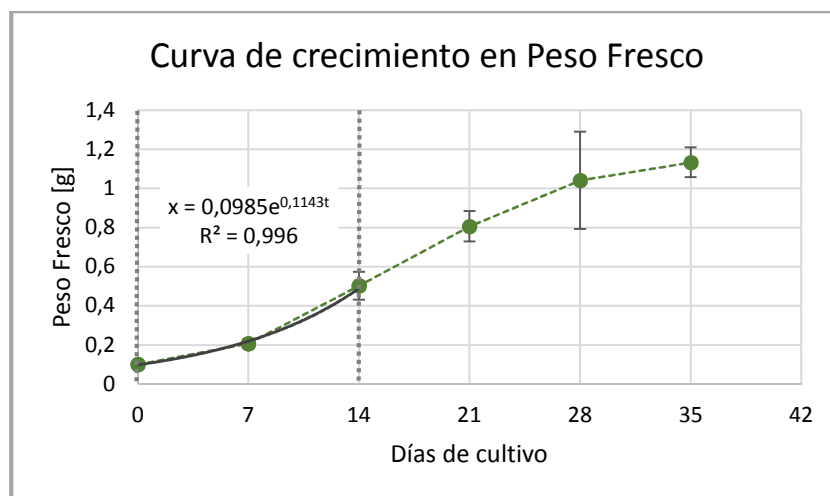
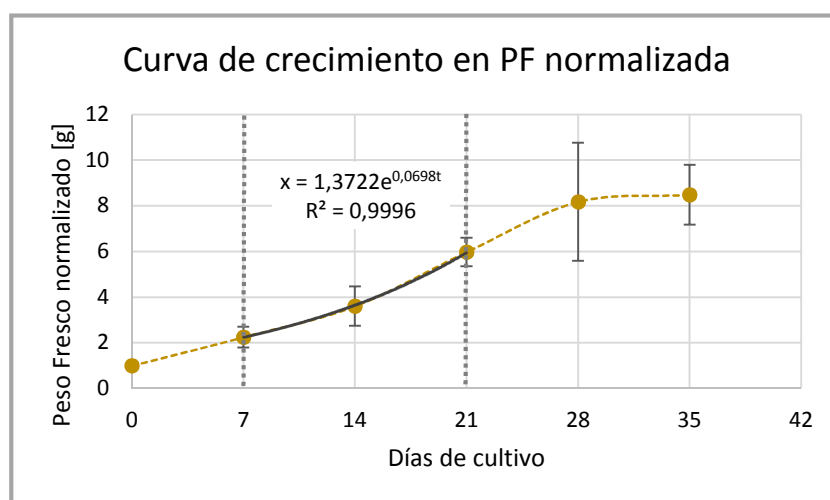


Figura 24: Curvas de crecimiento de callos EM.b cultivados en medio 3MS y mantenidos en oscuridad. (a) Curva de crecimiento de callos en peso fresco. (b) Curva de crecimiento de callos en peso fresco normalizado. (c) Curva de crecimiento de callos en peso seco.

(a)



(b)



(c)

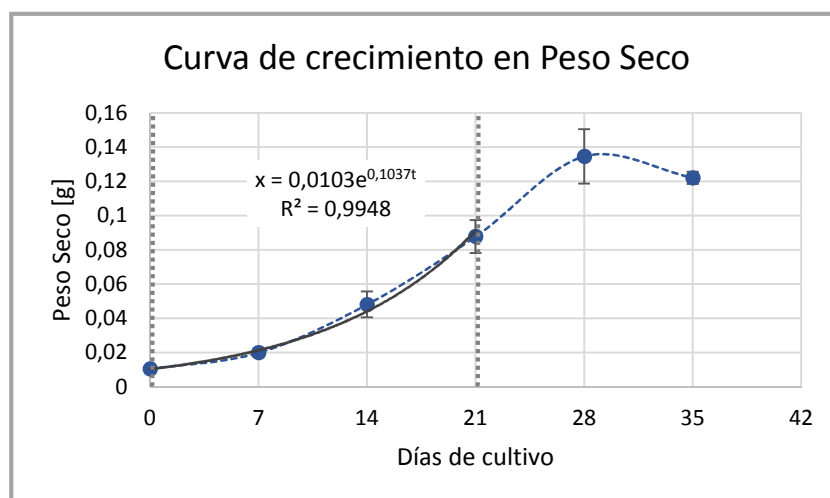
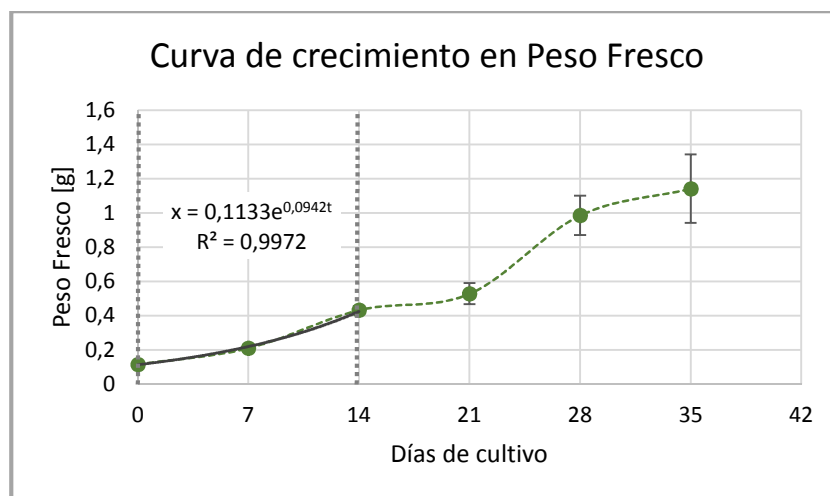
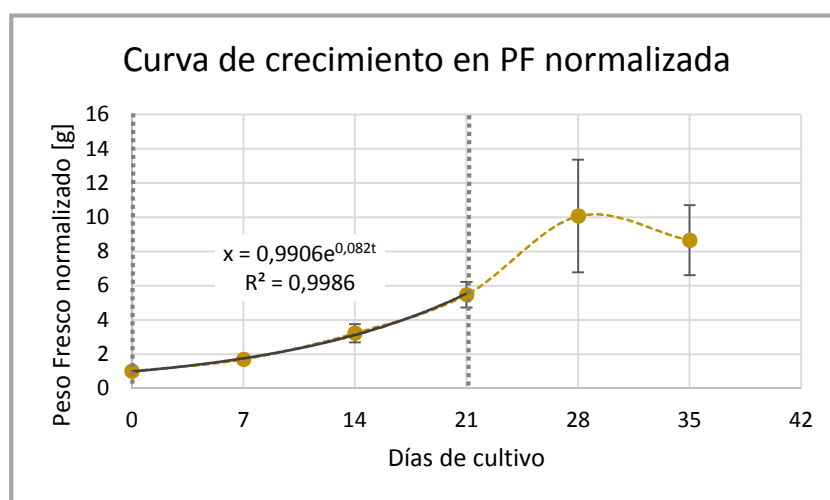


Figura 25: Curvas de crecimiento de callos EM.a cultivados en medio 3B5 y mantenidos en luz (16 h luz; 8 h oscuridad). (a) Curva de crecimiento de callos en peso fresco. (b) Curva de crecimiento de callos en peso fresco normalizado. (c) Curva de crecimiento de callos en peso seco.

(a)



(b)



(c)

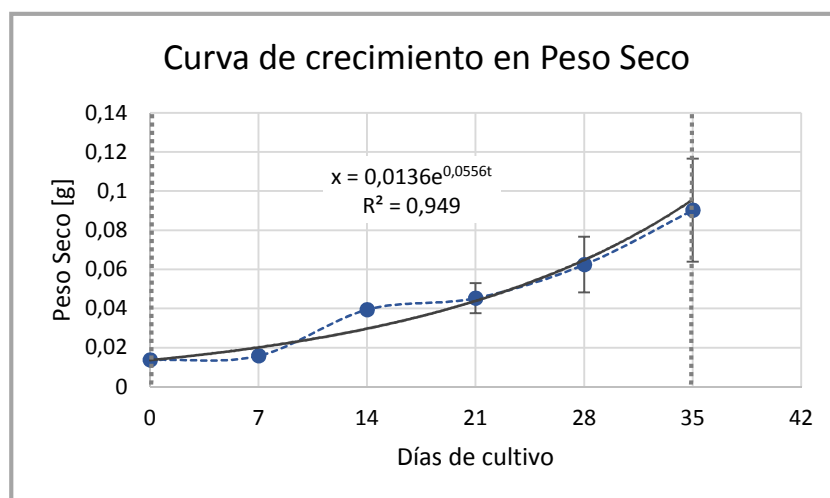


Figura 26: Curvas de crecimiento de callos EM.b cultivados en medio 3B5 y mantenidos en oscuridad. (a) Curva de crecimiento de callos en peso fresco. (b) Curva de crecimiento de callos en peso fresco normalizado. (c) Curva de crecimiento de callos en peso seco.



En términos generales, en relación a las curvas de crecimiento en peso fresco normalizado, no se observó una fuerte dependencia entre el tamaño del inóculo y la eficiencia de producción de biomasa, al menos en el rango de tamaños utilizados (0,1-0,25 g). En algunas de las mediciones tomadas, existían callos de mayores dimensiones que el resto, cuyo inóculo había sido de menor tamaño que los demás callos medidos, esto ocasionó que los errores o desviaciones estándar en cada medición aumentaran más en relación a la medición de peso fresco o seco. Asimismo, existían casos en que los callos con mayor tamaño de inóculo resultaron ser los que menos biomasa generaron. Estos fenómenos tienen relación con la multiplicidad de factores que afectan a los cultivos de células indiferenciadas, ya que existen diversas variables que muchas veces son difíciles de controlar. Por ejemplo, la tasa de crecimiento de un cultivo específico no sólo depende del tamaño del inóculo, sino que también de factores tales como la cantidad de células viables en el inóculo, es decir, aquellas células que aún son capaces de multiplicarse; o también la superficie disponible de contacto directo con el medio de cultivo. Por ende, no solo importa el peso del inóculo, sino que también la forma y estado celular de éste.

Para la medición de las curvas de crecimiento de callos comúnmente se mide la variable peso seco, debido a que permite eliminar el efecto de la diferente captación de agua por parte de las células de los tejidos callosos. Además, en algunos casos el peso fresco de los callos continúa aumentando aunque el peso seco haya alcanzado su máximo, lo que es producto de la continua captación de agua por parte del tejido. Sin embargo, adicionalmente es útil la medición del peso fresco de los callos para evaluar el porcentaje de humedad promedio de los cultivos y su evolución a lo largo del tiempo. De todos modos, para la identificación de los parámetros cinéticos de crecimiento, como el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento, la utilización de curvas en peso seco sigue siendo más cercana a la realidad.

Si se compara las curvas de crecimiento en los dos medios de cultivo utilizados, Murashige & Skoog y Gamborg b-5, se observa que aquel que muestra mejores resultados en relación al crecimiento de los callos es el medio Gamborg b-5. Las distintas curvas en peso seco de los cultivos estudiados muestran que tanto aquellos callos expuestos a luz como los mantenidos en oscuridad en medio 3B5, presentaron un menor tiempo de duplicación y mayor velocidad de crecimiento en comparación a los cultivados en medio 3MS. Además, los callos cultivados en medio 3B5 experimentaron un menor tiempo de adaptación, alcanzaron una mayor biomasa y su llegada al estado estacionario fue más rápida.

La luz parece ser un factor fundamental a la hora de la generación de biomasa en los cultivos, ya que en todos los casos estudiados aquellos callos mantenidos en oscuridad presentaron un tiempo de duplicación mayor, y como se observa en las curvas en peso seco (Figura 24 (c) y Figura 26 (c)), alcanzaron un menor tamaño máximo, su llegada al estado estacionario fue más lenta y presentaron mayor variabilidad en las curvas de crecimiento, por lo tanto, son líneas celulares de mayor inestabilidad.

### 4.3 Cultivo de células en suspensión

Para la iniciación de los cultivos en suspensión a partir de callos de *A. chilensis* se utilizó tres líneas de cultivo: callos cultivados en medio 3MS de la línea EM.a, callos cultivados en medio 3MS de la línea EM.b y callos productores de antocianinas cultivados en medio 3B5 de la línea EM2.a. Si bien según los resultados expuestos previamente, el medio de cultivo que entregó mejores resultados es 3B5, esos resultados fueron obtenidos cuando los cultivos en suspensión ya estaban iniciados, por lo que se propone para estudios futuros el análisis del comportamiento de los cultivos en suspensión en medio 3B5 de la línea EM.a y EM.b.

En el caso de los cultivos 3MS EM.a y EM.b, el proceso de formación y estabilización de los cultivos celulares fue muy lento, algunos de los cuales se oxidaron fuertemente al comienzo de la formación del cultivo, como se muestra en la Figura 27 (a). Lo anterior se debería a la condición compacta del tejido calloso utilizado como inóculo, además del proceso de adaptación de las células a las nuevas condiciones de cultivo, como son la agitación y el medio líquido.

Visualmente los cultivos exhibieron un crecimiento lento e inestable, fácilmente oxidables. Además, después de un tiempo de subcultivos, aquellas suspensiones viables formaban grandes agregados celulares, tornando dificultosa la toma de alícuotas que fueran representativas del cultivo total para la construcción de la curva de crecimiento. En la Figura 27 (b) y (c) se muestra una suspensión viable de la línea EM.a, en donde es posible apreciar los agregados celulares que se forman a lo largo del tiempo de cultivo.

En el caso de los cultivos en suspensión iniciados a partir de la línea de callos EM2.a en medio 3B5, las características de los cultivos formados fueron notoriamente mejores a las de los otros cultivos. De este modo, los cultivos no se oxidaron y en la medida en que se subcultivaban, el número de agregados celulares que se formaron fue cada vez menor y el aumento de la biomasa se tornaba más evidente. Lo anterior se debe a la mayor friabilidad de los callos utilizados en el inóculo, característica que facilita el período de acostumbramiento de las células, ya que con el proceso de agitación estas se liberan con mayor facilidad de los agregados celulares. Además, el medio de cultivo Gamborg b-5 también puede ser un factor positivo en el establecimiento de los cultivos, como se discutió anteriormente.

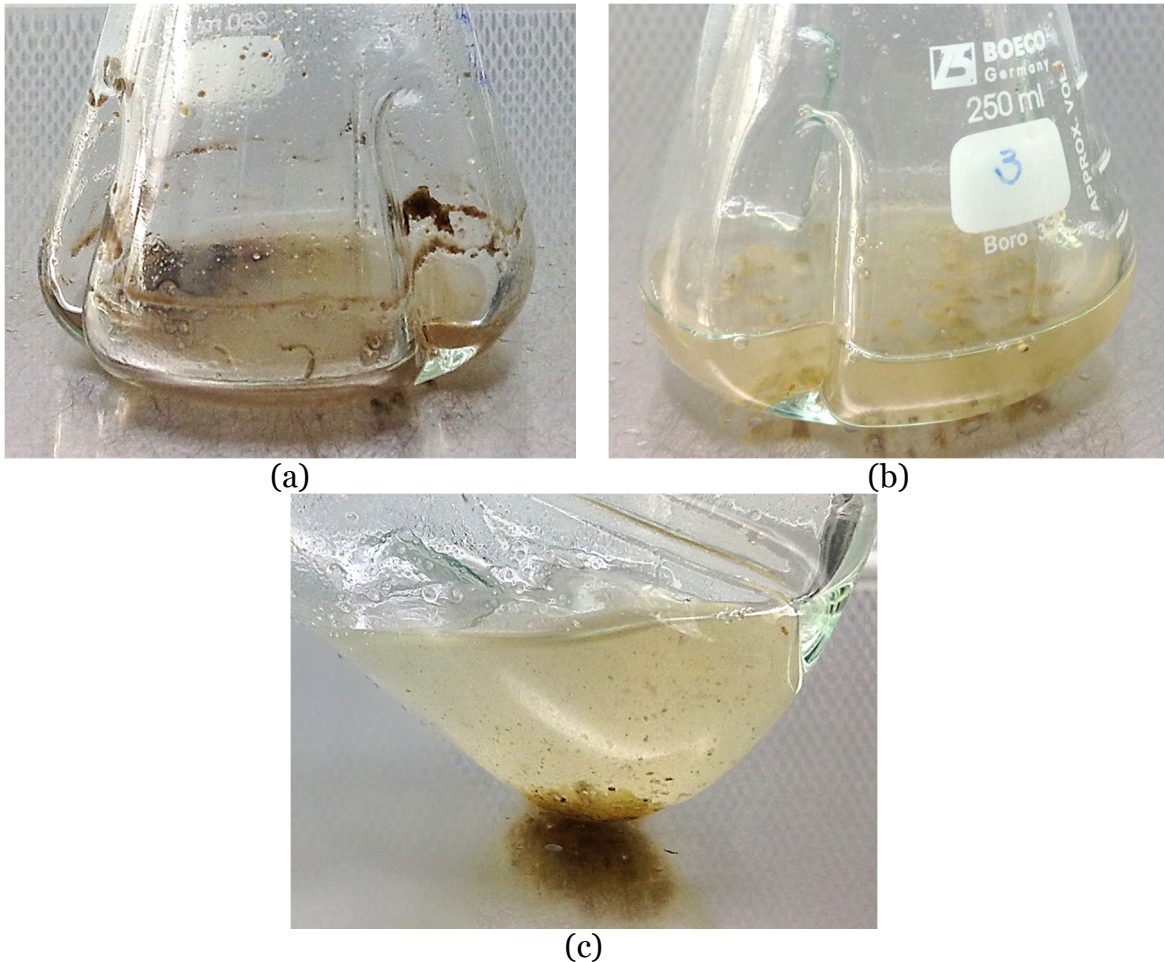
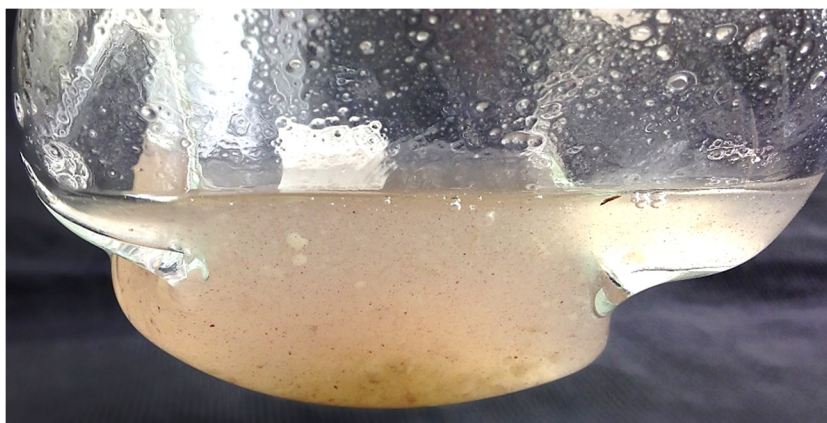


Figura 27: Cultivos en suspensión en medio 3MS de la línea EM.a. (a) Cultivo oxidado a los 14 días de cultivo (b) Cultivo viable a los 14 días de cultivo (c) Cultivo viable a los 14 días de cultivo donde se aprecian los agregados celulares.

En la Figura 28 se muestran dos fotografías de un cultivo de células en suspensión en medio 3B5 y hormona 2,4-D 2[mg/L]. En ellas se puede observar la leve pigmentación color rosa del medio, fruto de la producción de antocianinas por parte de algunas células. Cabe mencionar que, al igual que los callos con las mismas condiciones de crecimiento, estas suspensiones son bastante heterogéneas visualmente ya que presentan células pigmentadas y otras que no. Además, en la medida que los cultivos ganaban biomasa, la concentración de células no pigmentadas aumentaba a una tasa mayor que la concentración de células pigmentadas. Asimismo, como se puede ver en las fotografías, también hay presencia de agregados celulares, pero la razón entre el número de células en suspensión con el número de agregados es mayor que para los cultivos en suspensión en medio 3MS de las líneas EM.a y EM.b.



(a)



(b)

Figura 28: Cultivos de células en suspensión de *A. chilensis* en medio 3B5 de la línea EM2.a. Ambas fotografías fueron tomadas a los 30 días de cultivo líquido.

La presencia de células no pigmentadas puede ser producto de un mecanismo de regulación que impide la producción de un metabolito que probablemente no sea requerido. Asimismo, el considerable aumento del número de estas células en relación a aquellas pigmentadas puede ser motivo de un acostumbamiento de aquéllas mejor adaptadas a las condiciones de estrés abiótico a las que están sometidas, pudiendo focalizar todos sus recursos en la multiplicación y aumento de biomasa. Cabe mencionar que a medida que los cultivos envejecían no se observó un aumento en la pigmentación de las células, ni tampoco que células no productoras empezaran a producir el pigmento. Por lo tanto, es posible concluir que las células no pigmentadas no generan pigmentación en ninguna etapa de su desarrollo y que las células pigmentadas generan este metabolito en etapas tempranas.

En la Figura 29 se presentan fotografías microscópicas de un cultivo de células en suspensión en medio 3B5 de la línea EM2.a. En ellas se observan diferentes niveles de agregación celular y también la presencia de grandes vacuolas que contienen el metabolito responsable de la pigmentación. La presencia de estas vacuolas y la coloración respectiva, permite confirmar la síntesis de antocianinas por parte de las células. Además, se evidencia la heterogeneidad del cultivo, en donde hay células de diversos tamaños y formas, y en donde generalmente las células productoras de antocianinas son de mayor tamaño que aquéllas que no producen este metabolito. Lo anterior puede ser producto de la mayor lentitud con la que reproducen las células pigmentadas en relación a las no-pigmentadas.



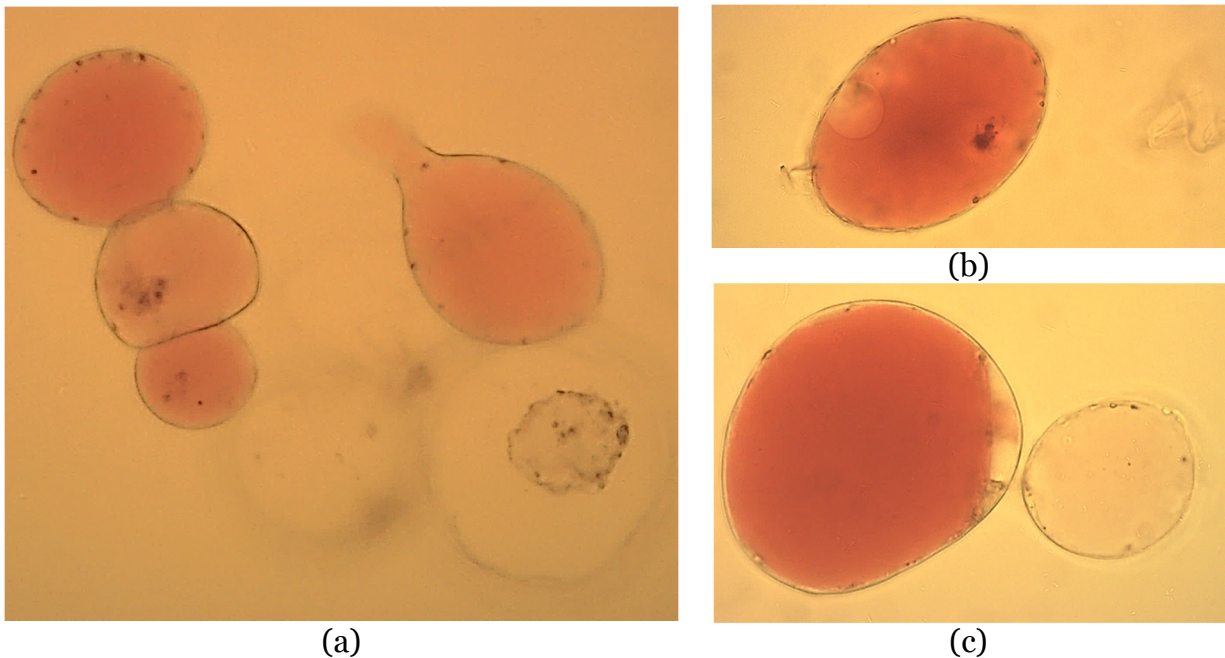


Figura 29: Fotografía microscópica de un cultivo de células en suspensión de *A. chilensis* en medio 3B5 con hormona 2,4-D 2[mg/L]. Todas las fotografías son a los 30 días de cultivo líquido.

#### 4.3.1 Análisis del crecimiento celular en cultivos en suspensión

Para el estudio del comportamiento de los cultivos en suspensión en relación a la generación de biomasa, se llevó a cabo la medición de la curva de crecimiento en peso fresco para las tres líneas de suspensiones establecidas. La medición de la curva de crecimiento para un mismo tipo de cultivo se realizó en triplicado con el objetivo de estudiar la reproducibilidad de las condiciones de crecimiento alcanzadas. La medición en peso seco no fue posible debido a que las condiciones de trabajo y la existencia de sólo un agitador no permitieron el establecimiento de cultivos en suspensión de grandes volúmenes, ni de varios cultivos en paralelo.

La curva de crecimiento en peso fresco del cultivo en suspensión en medio 3MS de la línea EM.a se presenta en la Figura 30 (a). Estas curvas presentan muchas variaciones debido a la dificultad experimentada en la toma de alícuotas representativas de los cultivos, producto de los grandes agregados celulares que se formaban en éste. Debido a lo anterior, las mediciones presentan elevada desviación estándar, y por ende no fue posible detectar con claridad las diferentes etapas a lo largo de la curva. A pesar de esto, se pudo observar una leve tendencia al aumento de la biomasa, valor que sin embargo es muy pequeño considerando el tiempo de cultivo.

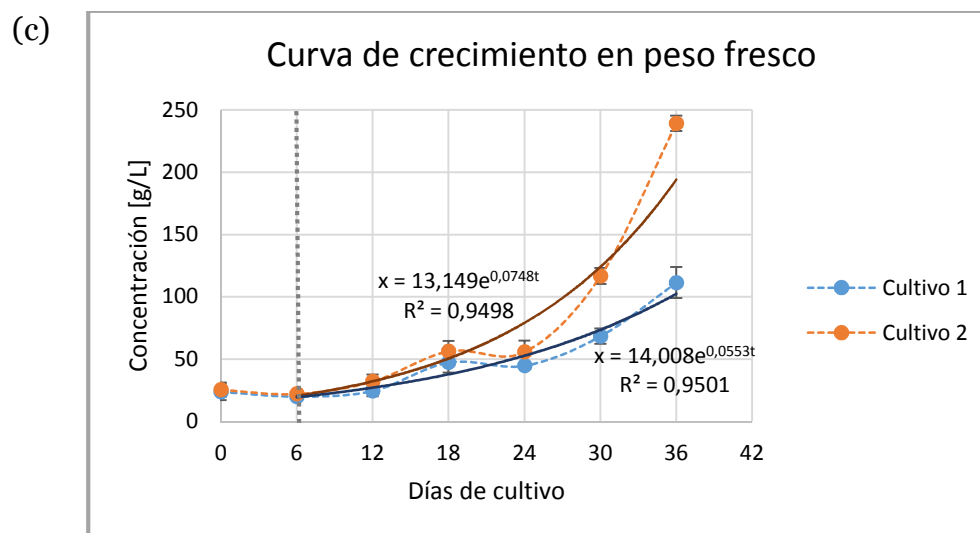
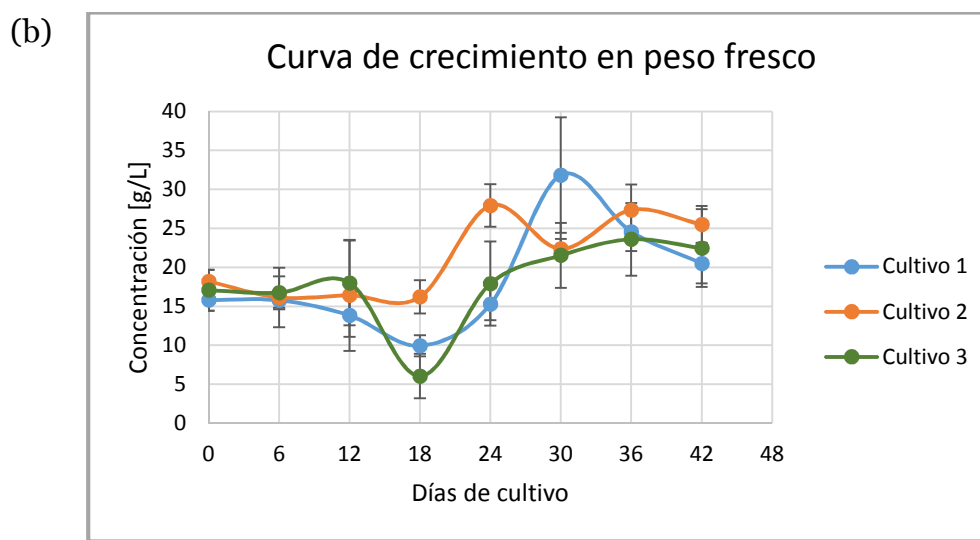
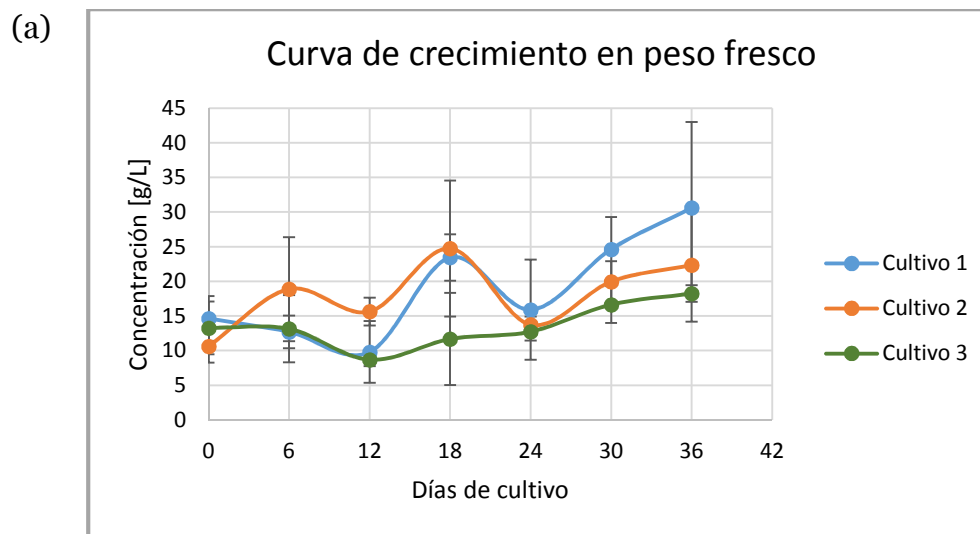


Figura 30: Curvas de crecimiento en peso fresco para cultivos de células en suspensión de *A. chilensis* (a) Cultivo en medio 3MS de la línea EM.a (b) Cultivo en medio 3MS de la línea EM.b (c) Cultivo en medio 3B5 con hormona 2,4-D 2[mg/L].

Debido a que los tres cultivos procesados bajo condiciones idénticas presentaron tanto similitudes como diferencias, se concluye que la reproducibilidad de las condiciones de crecimiento alcanzadas es baja. Los cultivos 1 y 2 son los que más se asemejan en la forma de sus curvas, en cambio el cultivo 3 es el que menores errores sistemáticos presenta y donde se puede observar con mayor claridad la tendencia al alza de la biomasa. Sin embargo, dicho aumento no es significativo ya que la concentración de biomasa en ningún punto de la curva alcanza a duplicar su concentración inicial y las desviaciones estándar son altas. Los errores sistemáticos en las diferentes mediciones se deben a la dificultad en la toma de alícuotas representativas del cultivo, producto de las grandes diferencias de tamaño en los agregados celulares.

En la Figura 30 (b) se presenta la curva de crecimiento para tres cultivos en suspensión en medio 3MS de la línea EM.b. Al igual que para la línea EM.a, estas curvas presentan mucho error sistemático y elevadas desviaciones estándar producto de la dificultad en la toma de alícuotas representativas del cultivo, por lo que no fue posible la identificación de las diferentes etapas de crecimiento a lo largo de la curva.

Según lo discutido anteriormente, se infiere que las condiciones de crecimiento de los cultivos en suspensión en medio 3MS y con hormonas KIN y NAA no son las más adecuadas para el establecimiento de una línea de suspensiones celulares de *Aristotelia chilensis* estables y de bajo nivel de agregación, lo cual puede ser producto de una incorrecta combinación y concentración hormonal o a la utilización de un medio de cultivo inadecuado. El constante crecimiento de agregados celulares es un indicador de que las hormonas utilizadas no son apropiadas para el establecimiento de reales cultivos en suspensión, en donde las células presenten un bajo grado de agregación.

En la Figura 30 (c) se presenta la curva de crecimiento para dos cultivos en suspensión en medio 3B5 de la línea EM2.a (con hormona 2,4-D 2[mg/L]). Inicialmente se estudiaron 3 cultivos, pero luego de dos mediciones el tercer cultivo se contaminó con un hongo.

Como se observa en el gráfico, estas curvas presentan menores oscilaciones y desviaciones estándar que las descritas anteriormente para las otras líneas de suspensiones celulares. Esto se debe principalmente al menor grado de agregación celular que facilitaba la toma de alícuotas representativas del cultivo total. Además, la concentración de biomasa aumentó exponencialmente a partir de aproximadamente el día 6 de cultivo y se volvió más notoria a partir del día 24, alcanzando al día 36 de cultivo una concentración de biomasa de  $115,5 \pm 12,5$  [g/L] para el cultivo 1 y  $239,2 \pm 6,2$  [g/L] para el cultivo 2, lo que representa un aumento de aproximadamente 5 y 9 veces la concentración inicial de ambos cultivos, respectivamente.

En cuanto a los parámetros cinéticos del cultivo 1, su velocidad de crecimiento  $\mu$  fue de  $0,055$  [día<sup>-1</sup>] y su tiempo de duplicación fue de 12,5 días. Igualmente, la velocidad de crecimiento del cultivo 2 fue de  $0,075$  [día<sup>-1</sup>] y su tiempo de duplicación fue de 9,3 días. De ambos cultivos, el cultivo 2 es el que alcanza una mayor concentración de biomasa final, correspondiente a más del doble que la alcanzada por el cultivo 1.

Dada la contaminación de uno de los cultivos destinados para la medición de su curva de crecimiento, no es posible asegurar estadísticamente que las condiciones alcanzadas en el cultivo sean replicables. Sin embargo, las curvas de ambos cultivos estudiados son muy similares entre sí, lo cual es demostrativo de un posible

establecimiento de una buena línea de suspensiones celulares de *A. chilensis*. Asimismo, los resultados obtenidos en relación al aumento de la biomasa no se habían experimentado con anterioridad en cultivos de la misma línea de suspensión (medio 3B5 de la línea EM2.a). Por lo tanto es necesario realizar un mayor número de subcultivos y mediciones con el objetivo de identificar claramente las distintas etapas de la curva de crecimiento de la línea establecida, y así poder asegurar la reproducibilidad de las condiciones de crecimiento alcanzadas.

## 4.4 Elicitación de la producción de antocianinas

Los ensayos de elicitación de la producción de antocianinas se llevaron a cabo a partir de los cultivos en suspensión en medio 3MS de la línea EM.a y se realizaron con los elicitors metil jasmonato (MJ) y ácido abscísico (ABA). Adicionalmente, se realizó una prueba de elicitación con ABA en cultivos en suspensión en medio 3B5 de la línea EM2.a. Ambos compuestos (MJ y ABA) se escogieron debido a que son los elicitors más utilizados para la inducción de la producción de antocianinas en variados cultivos de células vegetales (para mayor detalle ver sección 1.6.4). Si bien, según los resultados expuestos con anterioridad, las suspensiones en medio 3B5 de la línea EM2.a son más adecuadas para la inducción de la producción de antocianinas debido a la menor agregación celular y al mayor aumento de la biomasa, los ensayos de elicitación se realizaron en paralelo con la medición de las curvas de crecimiento de los cultivos, por lo que no fue posible prever con antelación que la línea de suspensiones en medio 3MS de la línea EM.a no fuera adecuada para la inducción. Una vez que se identificó que las suspensiones utilizadas en la inducción no fueron las apropiadas, se realizó un ensayo adicional con ABA en suspensiones celulares en medio 3B5 de la línea EM2.a, pero no fue posible enviar esta muestra para el análisis de su contenido de antocianinas.

A continuación se exponen los resultados de los ensayos de inducción con ambos elicitors.

### 4.4.1 Elicitación con metil jasmonato

Los cultivos utilizados para la elicitación con MJ tenían 4 semanas de antigüedad. Visualmente los cultivos inducidos mediante MJ no presentaron ningún tipo de pigmentación, salvo la coloración debida a oxidación (Figura 31 (a)), por lo que se deduce que no se produjeron antocianinas. Esto puede ser producto de variados factores, como por ejemplo, 1) que la edad del cultivo haya sido inapropiada para inducir la producción de antocianinas, 2) que el cultivo utilizado haya sido inadecuado para realizar el ensayo, o 3) que el MJ o las condiciones usadas no sean apropiadas para inducir la producción de este metabolito. Se ha reportado que elevadas concentraciones de MJ pueden resultar tóxicas para las células [139], por ende la oxidación de los cultivos puede ser una manifestación de dicha toxicidad. Otro factor a considerar es el estrés que puede haber causado el proceso llevado a cabo para elicitar los cultivos, lo cual también puede haber originado su oxidación.



#### 4.4.2 Elicitación con ácido abscísico

En el caso de las muestras elicidadas mediante ABA, los cultivos utilizados para la inducción tenían 4 semanas de antigüedad. En cuanto a los resultados de la elicitación, estos fueron similares a los obtenidos con MJ, salvo por la presencia de escasos y pequeños agregados celulares pigmentados de color rosa. Como se observa en la Figura 31 (b), los cultivos inducidos también sufrieron de oxidación, que puede explicarse por la edad del cultivo utilizado para realizar la elicitación, por el estrés causado en el proceso de inducción o por el uso de un cultivo en suspensión inadecuado.

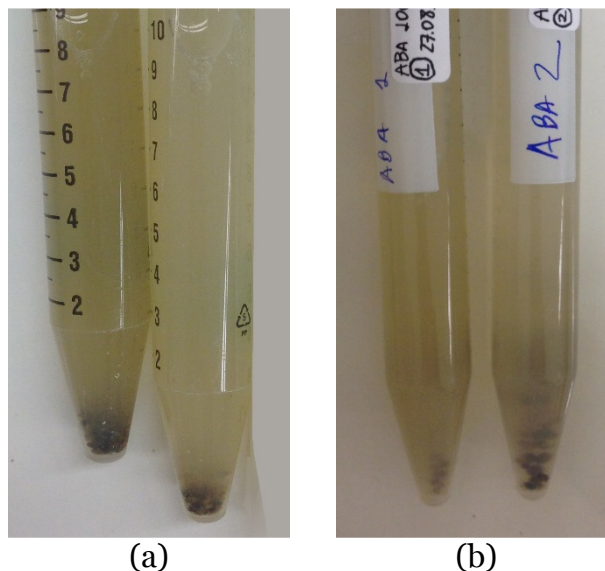


Figura 31: Cultivos de células en suspensión de *Aristotelia chilensis* en medio 3MS de la línea EM.a elicitados con (a) Metil Jasmonato (MJ) y (b) Ácido abscísico (ABA).

Dado que ninguno de los ensayos de elicitación entregó resultados positivos visibles para los cultivos en suspensión en medio 3MS de la línea EM.a, se realizó un ensayo meramente descriptivo en un cultivo en medio 3B5 de la línea EM2.a con ABA como elicitor. Esta vez el elicitor simplemente se agregó al cultivo a 4 días de su iniciación. Luego de transcurridos 5 días de agregado el elicitor, se observó la aparición de agregados celulares pigmentados color rosa (Figura 32), lo cual es un indicio de la probable producción de antocianinas por parte de las células. Para asegurar la posible inducción de la producción de antocianinas por ABA en esta línea de cultivos celulares, es necesario realizar un mayor número de experimentos con diferentes concentraciones del elicitor y posteriormente realizar una cuantificación del contenido de este metabolito.

Resulta llamativo que ante la adición de ABA sólo algunos agregados celulares produjeron pigmentación. Si bien no fue posible realizar un estudio acabado de esta muestra, se logró observar que luego de aproximadamente una semana de añadido el inductor no se evidenció un aumento en la cantidad de agregados pigmentados, mientras que la cantidad de células no pigmentadas sí aumentó. Lo anterior puede ser producto de la menor tasa de reproducción de las células pigmentadas en relación a las no pigmentadas. Para estudios futuros se propone el análisis del comportamiento del crecimiento celular y la producción de antocianinas en subcultivos de células o agregados celulares pigmentados obtenidos mediante la inducción con ABA.

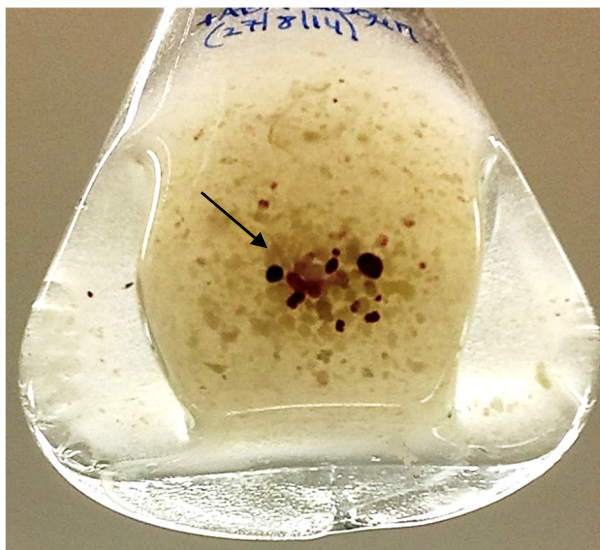


Figura 32: Fotografía de un cultivo de células en suspensión de *A. chilensis* en medio 3B5 de la línea EM2.a a los 9 días de cultivo y a 5 días de elicitado con ABA 100  $\mu$ M.

## 4.5 Estudio cualitativo del contenido de antocianinas

Se envió 10 muestras al laboratorio Glu Chile para llevar a cabo el estudio de su contenido de antocianinas. La descripción de dichas muestras se presenta a continuación:

- Muestras 1-4: Callos de *Aristotelia chilensis* cultivados en medio 3B5 de la línea EM2.a (con auxina 2,4-D 2[mg/L]). Todos los callos presentaban una fuerte pigmentación color violeta y tenían 30 días de cultivo. El peso de cada muestra era de aproximadamente 2 g.
- Muestras 5 y 6: Muestras de dos cultivos de células en suspensión de *Aristotelia chilensis* cultivados en medio 3B5 de la línea EM2.a (con auxina 2,4-D 2[mg/L]). Ambas suspensiones tenían 40 días de cultivo y presentaban una elevada concentración de biomasa, cuya última medición había entregado un valor de  $111,5 \pm 12,5$  [g/L] y  $239 \pm 6,2$  [g/L] al día 36 de cultivo, para las muestras 5 y 6, respectivamente. Además, se observaba una baja presencia de células pigmentadas y una elevada concentración de células no pigmentadas.
- Muestras 7 y 8: Cultivos de células en suspensión de *Aristotelia chilensis* cultivados en medio 3MS de la línea EM.a (con hormonas NAA y KIN 1[mg/L]) e inducidos mediante MJ durante 7 días. Los cultivos con los que se realizó la inducción tenían 4 semanas de antigüedad.
- Muestras 9 y 10: Cultivos de células en suspensión de *Aristotelia chilensis* cultivados en medio 3MS de la línea EM.a e inducidos mediante ABA durante 9 días. Los cultivos con los que se realizó la inducción tenían 4 semanas de antigüedad.

Los resultados de los ensayos de medición de antocianinas se presentan en la Figura 33, Figura 34 y Tabla 8. Estos resultados son cualitativos y nos indican a grandes rasgos el perfil de la presencia de diversas antocianinas en las muestras. Los porcentajes

obtenidos (Tabla 8) no pueden considerarse representativos, ya que las diferentes muestras enviadas a analizar fueron estudiadas en su peso fresco y no en su peso seco, por lo tanto, los resultados finales de la cuantificación de antocianinas se encuentran muy diluidos.

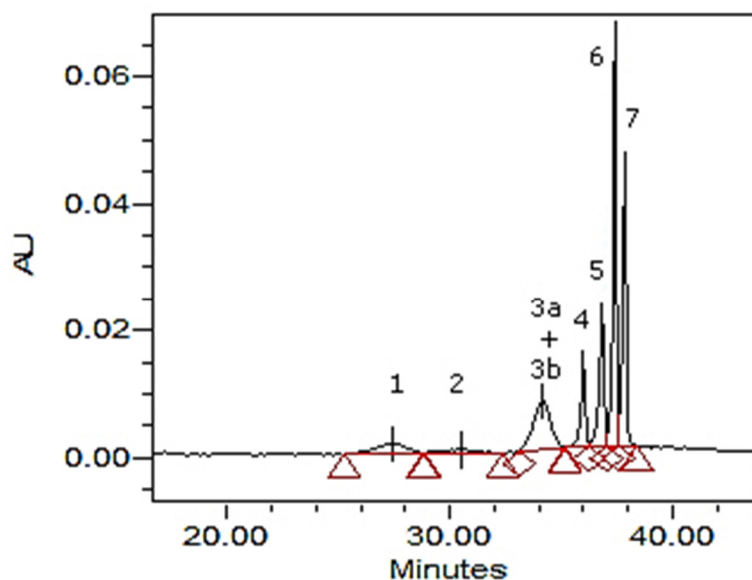


Figura 33: Cromatograma HPLC registrado a 520 nm en donde se muestra el perfil de antocianinas individuales de una muestra de callos (muestra número 2) de *Aristotelia chilensis*.

El análisis realizado a las muestras 1-4 arrojó resultados positivos para la presencia de antocianinas (Figura 33 para la muestra 2), principalmente cianidinas. Cabe destacar, que todas las antocianinas detectadas en los callos en medio 3B5 de la línea EM2.a de *Aristotelia chilensis* corresponden a antocianinas habitualmente encontradas en el fruto de la planta. El perfil de antocianinas de un extracto de frutos de *A. chilensis* puede ser visto en la Figura 35 de la sección de Anexos B. Como se mencionó previamente los resultados obtenidos son cualitativos y no cuantitativos, es decir, no son útiles para saber la cantidad de antocianinas presentes en los cultivos, pero si permiten identificar las antocianinas presentes. Si bien la presencia de delfinidinas en las muestras es casi nula, la coloración de los callos estudiados (Figura 22 (d)) pareciera indicar que la presencia de este tipo de antocianinas es mayor, debido a la semejanza con la coloración del fruto de maqui maduro. Sin embargo, también es posible que el pH de los callos sea básico, ya que en ese pH las cianidinas adquieren una coloración violeta. La baja presencia de delfinidinas detectadas puede ser producto del umbral de detección del equipo utilizado. Para futuros ensayos de cuantificación de antocianinas, se sugiere realizar el análisis de las muestras considerando la humedad de éstas o liofilizándolas antes de su inyección en el equipo HPLC.

Comparando el perfil de antocianinas obtenido en HPLC, de un extracto de fruta de maqui (Figura 35 de anexos) con el perfil obtenido para la muestra 2 de callos de *A. chilensis* (Figura 33), se observa una inversión en los picos de antocianinas. La antocianina de mayor presencia en los callos es Cianidina-3-sambubiósido, mientras que en el fruto esta antocianina es la segunda en menor concentración. En general, las antocianinas de mayor concentración en los frutos de maqui son las delfinidinas (73% de

las antocianinas totales), en cambio en los callos analizados las cianidinas son las que parecen encontrarse en mayor concentración, representando más del 60% de las antocianinas totales en todas las muestras estudiadas. Como se explicó en la sección de introducción 1.6.4, es normal que en cultivos de callos o de células en suspensión la producción de antocianinas difiera de la concentración encontrada en las diferentes partes de la planta en estado natural. Lo anterior se debe a que las condiciones a las que están expuestas las células de los cultivos *in vitro* son completamente diferentes a las condiciones de cultivo de las plantas, por lo tanto existen diversos factores que pueden estimular una ruta u otra en la etapa río abajo de la biosíntesis de antocianinas, induciendo la producción de cianidinas, pelargonidinas o delfinidinas y sus derivadas. Debido a lo anterior, para lograr la producción de un tipo en particular de antocianinas, resulta fundamental estudiar las diferentes variables que afectan la producción de cada uno de estos metabolitos, con el objetivo de crear una estrategia de producción que integre todas las variables que participan en la síntesis de la antocianina de interés, Entre estas variables se encuentran intensidad lumínica, temperatura, pH del medio, concentración y tipo de azúcar utilizado, micro y macronutrientes del medio de cultivo, concentración y tipo de reguladores del crecimiento, utilización de elicitores y precursores de la ruta de antocianinas, entre otras.

En contraste, en el estudio del contenido de antocianinas en las muestras 5-10, no se detectó la presencia de estos metabolitos. En la Figura 34 se presenta el perfil HPLC obtenido para la muestra 7 inducida mediante MJ. Estos resultados corroboran lo observado visualmente en los cultivos elicitados mediante MJ (muestras 7 y 8) y ABA (muestras 9 y 10). Sin embargo, las muestras 5 y 6 visualmente contenían células con pigmentación color violeta producto de la presencia de antocianinas, lo cual fue corroborado microscópicamente como se muestra en la Figura 29. Esta presencia de antocianinas no pudo ser identificada por medio del ensayo en HPLC, probablemente debido a su baja concentración, a la utilización de las muestras húmedas y al umbral de detección del equipo utilizado. Como se sugirió anteriormente, en futuros estudios de la concentración de antocianinas en las diversas muestras de callos y cultivos en suspensión, se recomienda la utilización de las muestras liofilizadas con el objetivo del eliminar la variable humedad de los resultados.

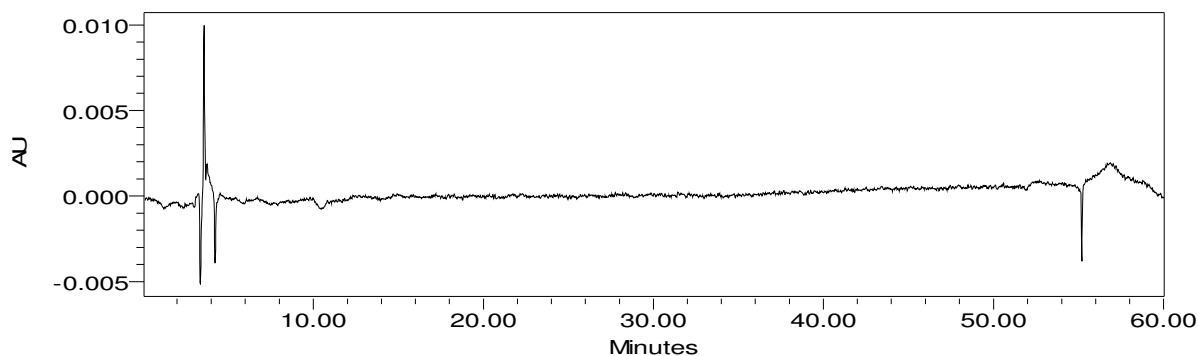


Figura 34: Cromatograma HPLC registrado a 520 nm en donde se muestra el perfil de antocianinas individuales de una muestra de cultivos en suspensión de *Aristotelia chilensis* elicitado mediante MJ (muestra número 7).

Tabla 8: Identidad de las diferentes antocianinas identificadas en muestras de callos y cultivos en suspensión de *Aristotelia chilensis* por medio de HPLC-PAD-MS. Los números de los picos son los mostrados en la Figura 33. TR: Tiempo de retención.

N° pico	TR	Tipo de antocianina	1	2	3	4	5-10
1	27,44	Delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido	0,0011%	0,0038%	0,0003%	0,0010%	-
2	30,51	Delfinidina-3,5-diglucósido	0,0006%	0,0014%	0,0002%	0,0004%	-
3a	34,19	Cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido	0,0029%	0,0045%	0,0005%	0,0013%	-
3b	34,19	Cianidina-3,5-diglucósido	0,0024%	0,0037%	0,0004%	0,0010%	-
4	35,99	Delfinidina-3-sambubiósido	0,0009%	0,0029%	0,0003%	0,0010%	-
5	36,82	Delfinidina-3-glucósido	0,0012%	0,0030%	0,0004%	0,0013%	-
6	37,45	Cianidina-3-sambubiósido	0,0054%	0,0082%	0,0013%	0,0032%	-
7	37,88	Cianidina-3-glucósido	0,0020%	0,0034%	0,0007%	0,0019%	-
		SUMA	0,0166%	0,0309%	0,0040%	0,0110%	-

## 5. Conclusiones

El presente trabajo de título se enmarca dentro de la búsqueda de una estrategia biotecnológica que permita la producción a gran escala de concentrados ricos en antocianinas, en particular delfinidinas, de *Aristotelia chilensis*.

Se concluye que el establecimiento de cultivos de plantas *in vitro* de *Aristotelia chilensis* fue fructífero. De las dos rutas implementadas para el establecimiento de los cultivos, la más efectiva fue aquélla que utilizó la siembra de embriones cigóticos extraídos a partir de semillas de la planta. Esta metodología fue la que entregó el menor porcentaje de contaminación y una mayor viabilidad y tasa de crecimiento. Asimismo, la micropropagación de aquellas plantas introducidas por embriones cigóticos fue exitosa, en contraste a la de las plantas introducidas por estacas, cuyo crecimiento se atrofió y no fueron capaces de desarrollarse.

En cuanto a la inducción callogénica a partir de explantes de *Aristotelia chilensis*, fue posible de llevar a cabo por medio de explantes en diferentes niveles de diferenciación celular, como son embrión cigótico, cotiledón y hoja. Las condiciones de cultivo apropiadas para la inducción callogénica en todos los explantes utilizados fue medio de cultivo Murashige & Skoog 4,43[g/L] con 30[g/L] de sacarosa, 7[g/L] de agar y la adición de los reguladores del crecimiento kinetina 1[mg/L] y NAA 1[mg/L]. Además, para la mantención de los callos se identificó que el cultivo con medio Gamborg b-5 confiere a los callos un menor tiempo de adaptación luego de su subcultivo, una mayor velocidad de crecimiento y por ende un menor tiempo de duplicación, y una mayor generación de biomasa final. Asimismo, se determinó que la exposición a luz (16 h luz; 8 h oscuridad) es un factor importante en el crecimiento de los cultivos. Considerando el análisis de las velocidades de crecimiento para los dos medios de cultivo estudiados, se concluyen que las mejores condiciones de mantenimiento de los cultivos y generación de biomasa son medio Gamborg b-5 3,21[g/L] con 30[g/L] de sacarosa, 7[g/L] de agar, fitohormonas kinetina 1[mg/L] y NAA 1[mg/L] y exposición a fotoperiodo (16 h luz; 8 h oscuridad). Las características morfológicas de los callos cultivados con las condiciones mencionadas anteriormente son un elevado nivel de compactación de las células y una fuerte pigmentación color verde, producto de la presencia de clorofila. Los parámetros cinéticos medidos para los cultivos de la línea descrita anteriormente, son una velocidad de crecimiento  $\mu$  de 0,104 [día<sup>-1</sup>] y un tiempo de duplicación de 6,7 días, siendo adecuado el subcultivo de los callos aproximadamente a los 20 días de cultivo, ya que es ahí donde los callos se encuentran en la etapa de desaceleración de su crecimiento.

Respecto al establecimiento de cultivos de células en suspensión, se puede concluir que fue posible la generación de estos cultivos a partir de callos inducidos por medio de embriones cigóticos de *Aristotelia chilensis* cultivados en medio Gamborg b-5 3,21[g/L] con 30[g/L] de sacarosa, 7[g/L] de agar, 2[mg/L] de auxina 2,4-D y exposición a fotoperiodo (16 h luz; 8 h oscuridad). Las mejores condiciones identificadas para el establecimiento y posterior mantenimiento de las suspensiones son las mismas condiciones mencionadas anteriormente para el cultivo de los callos con los cuales fueron iniciados los cultivos en suspensión, a excepción del agar. La auxina 2,4-D confiere una mayor friabilidad a los cultivos, característica que impide hasta cierto punto la formación de agregados celulares. A pesar de las condiciones consideradas como aceptables para el cultivo de suspensiones con baja agregación celular y elevado rendimiento de biomasa,

resulta necesario realizar un mayor número de subcultivos con el objetivo de estabilizar la línea de suspensiones, para posteriormente identificar sus parámetros cinéticos de crecimiento.

En cuanto a la elicitación de la producción de antocianinas en los cultivos de células *in vitro* de *A. chilensis*, fue posible la inducción de la producción de estos metabolitos a partir de tejido calloso, por medio de la adición al medio de cultivo de la fitohormona 2,4-D 2[mg/L] y de la exposición de los callos a luz (16 h luz; 8 h oscuridad). Los resultados del estudio del contenido de antocianinas en los callos deben ser considerados cualitativamente ya que en el ensayo no se consideró la humedad de las muestras. Sin embargo, en las muestras de callos analizadas se identificó la presencia de todas las antocianinas que están presentes en el fruto de *A. chilensis* pero en diferentes razones a las encontradas en dicho fruto. Mientras el fruto de maqui presenta un 73% de delfinidinas, los callos estudiados presentaron una mayor razón de cianidinas, las cuales representan más del 60% de las antocianinas totales del cultivo.

En relación a los cultivos en suspensión elicitados por medio de metil jasmonato y ácido abscísico, los resultados de los estudios no indicaron la presencia de ningún tipo de antocianinas. Lo anterior puede ser causa de la utilización de un cultivo de células en suspensión inadecuado, por lo tanto, se recomienda continuar realizando ensayos con diferentes líneas de suspensiones celulares, como por ejemplo la línea cultivada con medio Gamborg b-5 con 3% de sacarosa y con hormona 2,4-D 2[mg/L].

Al cabo de la investigación es posible constatar la factibilidad del establecimiento de cultivos celulares de *Aristotelia chilensis* productores de antocianinas, ya que fue posible la generación de una estrategia para la producción de estos metabolitos secundarios a partir de callos iniciados por medio de embriones cigóticos de maqui, y cultivados con medio Gamborg b-5 3,21[g/L] con 30[g/L] de sacarosa, 7[g/L] de agar y elicitados por medio de la exposición a fotoperiodo (16 h luz; 8 h oscuridad) y la adición de la fitohormona 2,4-D 2[mg/L] al medio de cultivo.

## 5.1 Recomendaciones para el trabajo futuro

Para la futura optimización de la producción de antocianinas por parte de cultivos celulares de *Aristotelia chilensis*, en particular de delfinidinas glicosiladas, resulta fundamental determinar en primera instancia los diferentes factores abióticos que juegan un rol fundamental en el rendimiento de la biomasa y la síntesis de estos metabolitos secundarios en cultivos de células *in vitro*, como por ejemplo, intensidad lumínica, temperatura, pH del medio, concentración y tipo de azúcar utilizado, micro y macronutrientes del medio de cultivo, concentración y tipo de reguladores del crecimiento, utilización de elicitores y precursores de la ruta de antocianinas, entre otras. Una vez que se hayan identificado las variables críticas del proceso y se determinen sus valores óptimos, esta información guiará a los investigadores hacia el establecimiento e implementación de una estrategia de producción integrada, que combine las diferentes condiciones de cultivo en donde se maximice la síntesis de los compuestos de interés, en este caso delfinidinas de *Aristotelia chilensis*.

## 6. Bibliografía

- [1] G. Cao, H. Alessio y R. Cutler, «Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants,» *Free Radic Biol Med*, vol. 14, n° 3, p. 303–311, 1993.
- [2] J. Krebs, «Evolution and human food preferences,» *The gourmet ape*, vol. 90, 2009.
- [3] B. Eaton, M. Konner y L. Cordain, «Diet-dependent acid load, Paleolithic nutrition, and evolutionary,» *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 91, p. 295–297, 2010.
- [4] F. Zucoloto, «Evolution of the human feeding behavior,» *Psychology & Neuroscience*, vol. 4, n° 1, pp. 131-141, 2011.
- [5] A. Malik, «The Potencial of Nutraceuticals: Pharmainfo,» [En línea]. Available: <http://www.pharmainfo.net/reviews/potential-nutraceuticals>. [Último acceso: 6 Diciembre 2013].
- [6] L. Das, E. Bhaumik, U. Raychaudhuri y R. Chakraborty, «Role of nutraceuticals in human health,» *Journal of food science and technology*, vol. 49, n° 2, pp. 173-183, 2012.
- [7] I. Lenoir-wijnkoop, M. E. Sanders y M. Cabana, «Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract,» *Nutrition Reviews*, vol. 65, n° 11, pp. 469-489, 2007.
- [8] M. E. Sanders, «Lactic acid bacteria as promoters of human health,» de *Goldberg I. Functional foods: designer foods, pharma-foods and nutraceuticals.*, London, Chapman & Hall, 1994, pp. 294-322.
- [9] L. Petruzzello, F. Iacopini, M. Bulajic, S. Shah y G. Costamagna, «Review article: uncomplicated diverticular disease of the colon,» *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 23, n° 10, pp. 1379-1391, 2006.
- [10] J. G. Elliot, «Application of antioxidant vitamins in foods and beverages,» *Food Technology*, vol. 53, pp. 46-48, 1999.
- [11] G. Duthie, P. Gardner y J. Kyle, «Plant polyphenols: are they the new magic bullet?,» *The Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 62, n° 3, pp. 599-603, 2003.
- [12] A. Scalbert, I. Johnson y M. Saltmarsh, «Polyphenols: antioxidants and beyond,» *The American journal of clinical nutrition*, vol. 81, n° 1, pp. 215-217, 2005.
- [13] K. P. Kochhar, «Dietary spices in health and diseases (II),» *Indian journal of physiology and pharmacology*, vol. 52, n° 4, pp. 327-354, 2008.
- [14] J. He y M. M. Giusti, «Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties,» *Annual review of food science and technology*, vol. 1, pp. 163-187, 2010.



- [15] I. Guerrero Legarreta, E. López Hernández y R. E. Armenta López, «Pigmentos,» de *Química de los alimentos*, Atlacomulco, Addison Wesley, 2006, pp. 401-444.
- [16] T. Borkowski, H. Szymusiak, A. Gliszczyńska-Swigło y B. Tyrakowska, «The effect of 3-O- $\beta$ -glucosylation on structural transformations of anthocyanidins,» *Food Research International*, vol. 38, pp. 1031-1037, 2005.
- [17] N. Mateus y V. de Freitas, «Anthocyanins as Food Colorants,» de *Anthocyanins*, New York, Springer Science, 2009, pp. 283-304.
- [18] M. Clifford, «Review Anthocyanins – nature , occurrence and dietary burden,» *Journal of the science of food and agriculture*, vol. 80, pp. 1063-1072, 2000.
- [19] F. Sparvoli, C. Martin, A. Scienza, G. Gavazzi y C. Tonelli, «Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.),» *Plant Molecular Biology*, vol. 24, n<sup>o</sup> 5, pp. 743-755, 1994.
- [20] A. Ananga, V. Georgiev, J. Ochieng, B. Phills y V. Tsoleva, «Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures : A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical , Food , and Cosmetic Industries,» de *The Mediterranean Genetic Code—Grapevine and Olive*, Rijeka, Croatia, InTech, 2012, p. 247–287.
- [21] K. Davies y K. Schwinn, «Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis,» de *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, Boca Raton, CRC Press LLC, 2012, pp. 143-219.
- [22] A. Howell, «Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections,» *Mol. Nutr. Food Res*, vol. 51, p. 732 – 737, 2007.
- [23] H. Wang, G. Cao y R. L. Prior, «Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins,» *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, pp. 304-309, 1997.
- [24] T. Tsuda, K. Shiga, K. Ohshima, S. Kawakishi y T. Osawa, «Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L.,» *Biochemical Pharmacology*, vol. 52, pp. 1033-1039, 1996.
- [25] Universidad Católica de Chile, «Manual de Patología General,» [En línea]. Available: [http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/Patol\\_055.html](http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/Patol_055.html). [Último acceso: 27 Mayo 2014].
- [26] Life, Maqui New, «Scientific / Technical Report,» 2012.
- [27] N. Seeram, R. Schutzki, A. Chandra y M. Nair, «Characterization, Quantification, and Bioactivities of Anthocyanins in *Cornus* Species,» *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, pp. 2519-2523, 2002.
- [28] S. Vareed, M. Reddy, R. Schutzki y M. Nair, «Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits.,» *Life sciences*, vol. 78, n<sup>o</sup> 7, pp. 777-784, 2006.

- [29] M. K. Hwang, N. J. Kang, Y.-S. Heo, K. W. Lee y H. J. Lee, «Fyn kinase is a direct molecular target of delphinidin for the inhibition of cyclooxygenase-2 expression induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ .», *Biochemical pharmacology*, vol. 77, n<sup>o</sup> 7, pp. 1213-1222, 2009.
- [30] A. Seong, J. Yoo, M. Lee, L. Y, J. Lee, W. Jun, S. Kim y H. Yoon, «Delphinidin, a specific inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses inflammatory signaling via prevention of NF- $\kappa$ B acetylation in fibroblast-like synoviocyte MH7A cells.,» *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 410, n<sup>o</sup> 3, pp. 581-586, 2011.
- [31] Y. Zhang, N. P. Seeram, R. Lee, L. Feng y D. Heber, «Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties.,» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 56, pp. 670-675, 2008.
- [32] P. Jing, J. a. Bomser, S. J. Schwartz, J. He, B. a. Magnuson y M. M. Giusti, «Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth.,» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 56, n<sup>o</sup> 20, pp. 9391-9398, 2008.
- [33] S. J. Duthie, «Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process.,» *Molecular nutrition & food research*, vol. 51, pp. 665-674, 2007.
- [34] K. Gasiorowski, K. Szyba, B. Brokos, B. Kołaczyńska, M. Jankowiak-Włodarczyk y J. Oszmiański, «Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from Aronia melanocarpa fruits.,» *Cancer letters*, vol. 119, pp. 37-46, 1997.
- [35] K. W. Singletary, K.-J. Jung y M. Giusti, «Anthocyanin-rich grape extract blocks breast cell DNA damage.,» *Journal of Medicinal Food*, vol. 10, n<sup>o</sup> 2, pp. 244-251, 2007.
- [36] M. Renis, L. Calandra, C. Scifo, B. Tomasello, V. Cardile, L. Vanella, R. Bei, L. La Fauci y F. Galvano, «Response of cell cycle/stress-related protein expression and DNA damage upon treatment of CaCo2 cells with anthocyanins.,» *The British journal of nutrition*, vol. 100, pp. 27-35, 2008.
- [37] W. Yi, J. Fischer y C. C. Akoh, «Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro.,» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, pp. 8804-8812, 2005.
- [38] W. Yi, J. Fischer, G. Krewer y C. C. Akoh, «Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis.,» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, pp. 7320-7329, 2005.
- [39] M. Bagchi, S. Zafra-Stone, J. N. Losso, C. K. Sen, S. Roy, S. Hazra y D. Bagchi, «Role of Edible Berry Anthocyanins in Angiogenesis.,» de *Anti-angiogenic functional and medicinal foods*, Nutraceutical Science and technology, 2007, pp. 527-548.

- [40] T. Tsuda, «Regulation of Adipocyte Function by Anthocyanins; Possibility of Preventing the Metabolic Syndrome,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, pp. 642-646, 2008.
- [41] T. Tsuda, F. Horio, K. Uchida, H. Aoki y T. Osawa, «Dietary Cyanidin 3-O-  $\beta$ -D - Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice,» *Journal of Nutrition*, vol. 133, n<sup>o</sup> 7, pp. 2125-2130, 2003.
- [42] S.-H. Kwon, I.-S. Ahn, S.-O. Kim, C.-S. Kong, H.-Y. Chung, M.-S. Do y K.-Y. Park, «Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins.,» *Journal of medicinal food*, vol. 110, n<sup>o</sup> 3, pp. 552-556, 2007.
- [43] V. S. Srinivasan, «Bioavailability of Nutrients and Other Bioactive Components from Dietary Supplements Bioavailability of Nutrients : A Practical Approach to In Vitro Demonstration of the Availability of Nutrients in Multivitamin-Mineral Combination,» *Journal of Nutrition*, vol. 131, pp. 1349-1350, 2001.
- [44] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy y L. Jiménez, «Polyphenols: food sources and bioavailability.,» *The American journal of clinical nutrition*, vol. 79, n<sup>o</sup> 5, pp. 727-747, 2004.
- [45] M. N. Clifford, «Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health.,» *Planta medica*, vol. 70, n<sup>o</sup> 12, pp. 1103-1114, 2004.
- [46] A. B. Granado Serrano, «Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación,» *Tesis (Grado de Doctor). Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid*, p. 178, 2010.
- [47] C. Manach, C. Morand, O. Texier, M.-I. Favier, G. Agullo, C. Demigné, F. Régéat y C. Rémésy, «Quercetin Metabolites In Plasma of Rats Fed Diets Containing Rutin or Quercetin,» *Journal of Nutrition*, vol. 125, pp. 1911-1922, 1995.
- [48] S. Passamonti, U. Vrhovsek, A. Vanzo y F. Mattivi, «The stomach as a site for anthocyanins absorption from food,» *FEBS Lett*, vol. 544, pp. 210-213, 2003.
- [49] K. Patel, A. Jain y D. K. Patel, «Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of anthocyanidins 'delphinidin': A concise report,» *Journal of Acute Disease*, vol. 2, n<sup>o</sup> 3, pp. 169-178, 2013.
- [50] N. Clere, S. Faure, M. C. Martinez y R. Andriantsitohaina, «Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis.,» *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*, vol. 9, n<sup>o</sup> 2, pp. 62-77, 2011.
- [51] D.-X. Hou, X. Tong, N. Terahara, D. Luo y M. Fujii, «Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway.,» *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 440, n<sup>o</sup> 1, pp. 101-109, 2005.

- [52] M. C. Lazzè, M. Savio, R. Pizzala, O. Cazzalini, P. Perucca, A. I. Scovassi, L. A. Stivala y L. Bianchi, «Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines.,» *Carcinogenesis*, vol. 25, n° 8, pp. 1427-1433, 2004.
- [53] C.-T. Yeh y G.-C. Yen, «Induction of Apoptosis by the Anthocyanidins through Regulation of Bcl-2 Gene and Activation of c-Jun N-Terminal Kinase Cascade in Hepatoma Cells,» *J Agric Food Chem*, vol. 53, n° 5, p. 1740-1749, 2005.
- [54] J.-M. Yun, F. Afaq, N. Khan y H. Mukhtar, «Delphinidin, an Anthocyanidin in Pigmented Fruits and Vegetables, Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Colon Cancer HCT116 Cells,» *Mol Carcinog*, vol. 48, n° 3, pp. 260-270, 2010.
- [55] J. Cvorovic, F. Tramer, M. Granzotto, L. Candussio, G. Decorti y S. Passamonti, «Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells.,» *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 501, n° 1, pp. 151-157, 2010.
- [56] H. Kim, D. Sul, J. Lim, D. Lee, S. Joo y K. Hwang, «Delphinidin ameliorates beta-amyloid-induced neurotoxicity by inhibiting calcium influx and tau hyperphosphorylation,» *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 73, pp. 1685-1689, 2009.
- [57] E. Misle, E. Garrido, H. Contardo y W. González, «Maqui [ *Aristotelia chilensis* ( Mol .) Stuntz ] -the Amazing Chilean Tree : A Review,» *Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 1, pp. 473-482, 2011.
- [58] C. Juri Massaro, «www.odepa.gob.cl,» Octubre 2010. [En línea]. Available: <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2442.pdf>. [Último acceso: 11 Junio 2014].
- [59] J.-M. Kong, L.-S. Chia, N.-K. Goh, T.-F. Chia y R. Brouillard, «Analysis and biological activities of anthocyanins,» *Phytochemistry*, vol. 64, pp. 923-933, 2003.
- [60] M. T. Escribano-bailón, C. Alcalde-eon, O. Muñoz, J. C. Rivas-gonzalo y C. Santos-buelga, «Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz),» *Phytochemical Analysis*, vol. 17, p. 8-14, 2006.
- [61] P. Pacheco, J. Sierra y G. Schmeda-Hirschmann, «Antiviral Activity of Chilean Medicinal Plant Extracts,» *Phytotherapy research*, vol. 7, pp. 415-418, 1993.
- [62] J. Alonso, «Maqui (*Aristotelia chilensis*): Un Nutracéutico chileno de relevancia mundial,» *Rev. Farmacol. Chile*, vol. 5, n° 2, pp. 95-100, 2012.
- [63] O. Muñoz, P. Christen, S. Cretton, N. Backhouse, V. Torres, O. Correa, E. Costa, H. Miranda y C. Delporte, «Chemical study and anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of the leaves of *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz, Elaeocarpaceae,» *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 63, p. 849-859, 2011.
- [64] S. Miranda-Rottmann, A. Aspillaga, D. Pérez, L. Vasquez, A. Martinez y F. Leighton, «Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL

oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress.,» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 50, pp. 7542-7547, 2002.

- [65] M. Rubilar, C. Jara, Y. Poo, F. Acevedo, C. Gutierrez, J. Sineiro y C. Shene, «Extracts of Maqui ( *Aristotelia chilensis* ) and Murta ( *Ugni molinae* Turcz .): Sources of Antioxidant Compounds and  $\alpha$ -Glucosidase /  $\alpha$ -Amylase Inhibitors,» *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, pp. 1630-1637, 2011.
- [66] E. Jara, J. Hidalgo, C. Flores, M. Pérez, A. Hidalgo, L. Quiñones, J. Hancke y R. Burgos, «Estudio de un extracto estandarizado de maqui rico en delfinidinas en el mantenimiento del balance de glucosa.,» *Rev. Farmacol. Chile*, vol. 5, n° 2, pp. 27-34, 2012.
- [67] J. Ojeda, E. Jara, J. Molina, F. Parada, R. Burgos, M. Hidalgo y J. Hancke, «Effects of *Aristotelia chilensis* berry juice on cyclooxygenase 2 expression, NF- $\kappa$ B, NFAT, ERK1/2 and PI3K/Akt activation in colon cancer cells,» *Blacpma*, vol. 10, n° 6, p. 543 – 552, 2011.
- [68] T. A. Thorpe, «History of Plant Cell Culture,» de *Plant Tissue Culture, Techniques and Experiments*, Elsevier, 2013, pp. 1-22.
- [69] Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, «Cátedra de Fisiología Vegetal,» [En línea]. Available: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/CultivoTejidos.pdf>. [Último acceso: 16 Agosto 2014].
- [70] A. Castillo, «Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay,» 2004. [En línea]. Available: [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf). [Último acceso: 18 Agosto 2014].
- [71] R. H. Smith, «Explant Preparation,» de *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*, Elsevier, 2013, pp. 44-51.
- [72] Universidad Nacional de Colombia, «Biología Virtual: Dormancia,» [En línea]. Available: [http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/lecciones/cap02/02\\_04\\_15.htm](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/lecciones/cap02/02_04_15.htm). [Último acceso: 19 Agosto 2014].
- [73] D. .. Sharma, R. Kaur y K. Kumar, «Embryo rescue in plants - a review,» *Euphytica*, vol. 89, pp. 325-337, 1996.
- [74] Productos forestales no madereros, «Paquete tecnológico Maqui: Germinación de Maqui,» [En línea]. Available: <http://www.pfnm.cl/pactecmaqui/pacmaqui.htm>. [Último acceso: 19 Agosto 2014].
- [75] O. Poh Liang, «Micropropagation And Callus Culture Of *Phyllanthus Niruri* L., *Phyllanthus Urinaria* L. And *Phyllanthus Myrtifolius* Moon (Euphorbiaceae) With The Establishment Of Cell Suspension Culture Of *Phyllantus Niruri* L.,» *Tesis (Magíster en Ciencias)*. Penang, Malaysia. *Universidad Sains Malaysia*, 2007.

- [76] L. Y. Rache y J. C. Pacheco, «Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae),» *Acta Botanica Brasilica*, vol. 24, n° 4, pp. 1086-1095, 2010.
- [77] M. Ikeuchi, K. Sugimoto y A. Iwase, «Plant callus: mechanisms of induction and repression.,» *The Plant cell*, vol. 25, pp. 3159-3173, 2013.
- [78] C. Céspedes, P. Mancinelli, B. Orellana y M. Silva, «In vitro culture of *Aristotelia Chilensis* ( Mol .) Stuntz Elaeocarpaceae,» *Gayana Bot.*, vol. 52, n° 2, pp. 77-82, 1995.
- [79] R. H. Smith, «Callus Induction,» de *Plant Tissue Culture*, Elsevier, 2013, pp. 63-76.
- [80] K L University, «e-learning,» [En línea]. Available: <http://www.kluniversity.in/elearn/materials/iydqpcrlrsf39917IYDQPCLRSF.pdf>. [Último acceso: 22 Agosto 2014].
- [81] J. H. Dodds y L. W. Roberts, «Cell suspension cultures,» de *Experiments in Plant Tissue Culture*, USA, Cambridge University Press, 1990, pp. 104-112.
- [82] A. Rodríguez-Sahagún, C. Del Toro-Sánchez, M. Gutierrez-Lomelí y O. Castellanos-Hernández, «Plant Cell and Tissue Culture as a Source of Secondary Metabolites,» de *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*, 2012, pp. 3-20.
- [83] C. Simões, N. Albarello, T. de Castro y E. Mansur, «Production of Anthocyanins by Plant Cell and Tissue Culture Strategies,» de *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*, 2012, pp. 67-86.
- [84] C. Simões, C. Bizarri y L. Cordeiro, «Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS,» *Plant Physiol Biochem*, vol. 47, n° 10, pp. 895-903, 2009.
- [85] T. Toguri, N. Umemoto, O. Kobayashi y T. Ohtani, «Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA,» *Plant Mol Biol*, vol. 23, n° 5, pp. 933-946, 1993.
- [86] M. Galbiati, A. Chiusi, P. Peterlongo, A. Mancinelli y G. Gavazzi, «Photoinduction of anthocyanin in maize: A genetic approach.,» *Maydica*, vol. 39, n° 2, pp. 89-95, 1994.
- [87] T. Yamakawa, S. Kato, K. Ishida, T. Kodama y Y. Minoda, «Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension cultures.,» *Agri Biol Chem* , vol. 47, pp. 2185-2191, 1983.
- [88] J. Chory, C. Peto, R. Feinbaum, L. Pratt y F. Ausubel, «*Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light,» *Cell*, vol. 58, n° 5, pp. 991-999, 1989.

- [89] Y. Kobayashi, M. Akita y K. Sakamoto, «Large-scale production of anthocyanin by *Aralia cordata* cell suspension cultures.,» *Appl Microbiol Biotechnol* , vol. 40, pp. 215-218, 1993.
- [90] M. Nakamura, Y. Takeuchi, K. Miyanaga, M. Seki y S. Furusaki, «High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus.,» *Biotechnol Lett*, vol. 21, pp. 695-699, 1999.
- [91] T. R. B. B. Narayan MS, «Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*.,» *Process Biochem*, vol. 40, pp. 351-358, 2005.
- [92] H. Seitz y W. Hinderer, «Anthocyanins,» de *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, NY, Academic Press, 1988, pp. 49-76.
- [93] M. Hagendoorn, A. Wagner, G. Segers, L. van der Plas, A. Oostdam y H. van Walraven, «Cytoplasmic acidification and secondary metabolite production in different plant cell suspensions,» *Plant Physiol*, vol. 106, pp. 723-730, 1994.
- [94] K. Sato, M. Nakayama y J.-I. Shigeta, «Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry,» *Plant Sci*, vol. 113, pp. 91-98, 1996.
- [95] T. Mori y M. Sakurai, «Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures. Effect of sugar and nitrogen.,» *J Food Sci*, vol. 59, n° 3, pp. 588-590, 1994.
- [96] M. Narayan y L. Venkataraman, «Effect of sugar and nitrogen on the production of anthocyanin in cultured carrot (*Daucus carota*) cells,» *Food Chem Toxicol*, vol. 67, n° 1, pp. 84-86, 2002.
- [97] H. Miura, Y. Kitamura y T. Ikenaga, « Anthocyanin production of *Glehnia littoralis* callus culture,» *Phytochemistry*, vol. 48, n° 2, pp. 279-283, 1998.
- [98] A. Schiozer y L. Barata, «Stability of natural pigments and dyes,» *Rev Fitos*, vol. 3, n° 2, pp. 6-23, 2007.
- [99] A. Barker y D. Pilbeam, *Handbook of Plant Nutrition*, Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.
- [100] H. Meyer y J. Van Staden, «The in vitro production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*,» *Plant Cell Tiss Org Cult*, vol. 40, pp. 55-58, 1995.
- [101] G. Pasqua, B. Monacelli y N. Mulinacci, «The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *Camptotheca acuminata* cell cultures,» *Plant Physiol Biochem*, vol. 43, pp. 293-298, 2005.
- [102] Y. Ozeki y A. Komamine, «Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture: correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation,» *Plant Physiol*, vol. 53, pp. 570-577, 1981.

- [103] M. Nakamura, M. Seki y S. Furusaki, «Enhanced anthocyanin methylation by growth limitation in strawberry suspension culture,» *Enzyme Microb Technol*, vol. 22, pp. 404-408, 1998.
- [104] I. Konczak-Islam, M. Yoshinaga, M. Nakatami, N. Terahara y O. Yamakawa, «Establishment and characteristic of an anthocyanin-producing cell line from sweet potato storage root,» *Plant Cell Rep*, vol. 19, pp. 472-477, 2000.
- [105] S. Ceoldo, M. Levi, A. Marconi, G. Baldan, M. Giarola y F. Guzzo, «Image analysis and in vivo imaging as tools for investigation of productivity dynamics in anthocyanin-producing cell cultures of *Daucus carota*,» *New Phytol*, vol. 166, pp. 339-352, 2005.
- [106] Y. Ozeki, «Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultured cells,» *J Plant Res*, vol. 109, n° 3, pp. 343-351, 1996.
- [107] T. Yamakawa, K. Ishida, S. Kato, T. Kodama y Y. Minoda, «Formation and identification of anthocyanins cultured cells of *Vitis* sp,» *Agric Biol Chem*, vol. 47, pp. 997-1001, 1983.
- [108] A. Callebaut, N. Terahara, M. de Haan y M. Decleire, «Stability of anthocyanin composition in *Ajuga reptans* callus and cell suspension cultures,» *Plant Cell Tiss Org Cult*, vol. 50, p. 195-201, 1997.
- [109] J. Zhao, T. Lawrence, C. Davis y R. Verpoorte, «Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites,» *Biotechnol Adv*, vol. 23, pp. 283-333, 2005.
- [110] A. Vasconsuelo y R. Boland, «Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants,» *Plant Sci*, vol. 172, p. 861-875, 2007.
- [111] V. Franceschi y H. Grimes, «Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate,» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 88, n° 15, pp. 6745-6749, 1991.
- [112] G. Sudha y G. Ravishankar, «Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and the involvement of methyl jasmonate and salicylic acid,» *Acta Physiol Plant*, vol. 25, n° 3, pp. 249-256, 2003.
- [113] W. Zhang, C. Curtin, M. Kikuchi y C. Franco, «Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis Vinifera* suspension cultures,» *Plant Science*, vol. 162, pp. 459-468, 2002.
- [114] S. Gagné, S. Cluzet, J. Mérillon y L. Génay, «ABA Initiates Anthocyanin Production in Grape Cell Cultures,» *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 30, n° 1, pp. 1-10, 2010.
- [115] J.-Y. Chen, P.-F. Wen, W.-F. Kong, Q.-H. Pan, J.-C. Zhan y J.-M. Li, «Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries,» *Postharvest Biol Tec*, vol. 40, pp. 64-72, 2006.



- [116] G. Suvarnalatha, L. Rajendran, G. Ravishankar y L. Venkataraman, «Elicitation of anthocyanin production in cell cultures of carrot (*Daucus carota* L.) by using elicitors and abiotic stress,» *Biotechnol Lett*, vol. 16, n° 12, pp. 1275-1280, 1994.
- [117] R. Mihai, A. Brezeanu y G. Cogalniceanu, «Aspects of some elicitors influence on non-morphogenic callus of *Vitis vinifera* var. Isabelle,» *Rom Biotechnol Lett*, vol. 14, n° 4, pp. 4511-4518, 2009.
- [118] N. Plata, I. Konczak-Islam, S. Jayram, K. McClelland, T. Woolford y P. Franks, «Effect of methyl jasmonate and p-coumaric acid on anthocyanin composition in a sweet potato cell suspension culture,» *Biochem Eng J*, vol. 14, pp. 171-177, 2003.
- [119] S. Ramachandra Rao y G. Ravishankar, «Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites,» *Biotechnol Adv*, vol. 20, pp. 101-153, 2002.
- [120] D. Dougall, «Sinapic acid stimulation of anthocyanin accumulation in carrot cell cultures,» *Plant Sci*, vol. 60, pp. 259-262, 1989.
- [121] J. Edahiro, M. Nakamura, M. Seki y S. Furusaki, «Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into the medium,» *J Biosci Bioeng*, vol. 99, n° 1, pp. 43-47, 2005.
- [122] D. Zhao, Y. Huang, Z. Jin, W. Qu y D. Lu, «Effect of aggregate size in cell cultures of *Saussurea medusa* on cell growth and jaceosidin production,» *Plant Cell Rep*, vol. 21, n° 11, pp. 1129-1133, 2003.
- [123] R. Madhusudhan y G. Ravishankar, «Gradient of anthocyanin in cell aggregates of *Daucus carota* in suspension cultures,» *Biotechnol Lett*, vol. 18, n° 11, pp. 1253-1256, 1996.
- [124] J. Meyer, M. Pépin y M. Smith, «Anthocyanin production from *Vaccinium pahalae*: limitations of the physical microenvironment,» *J Biotechnol*, vol. 93, pp. 45-57, 2002.
- [125] R. Bru Martinez y M. d. I. A. Pedreno Garcia, «Method for the production of resveratrol in cell cultures.». San Vicente del Raspeig Patente US 20060205049 A1, 27 10 2004.
- [126] J. Brown, «The Initiation and Maintenance o Callus Cultures,» de *Plant cell and tissue culture*, Clifton, New Jersey, The Humana Press Inc., 1990, pp. 57-64.
- [127] V. Polanco, I. Ramirez, S. Undurraga y C. Sánchez, Interviewees, *Consultoría respecto a dosis y combinaciones de reguladores del crecimiento en inducción de callogénesis..* [Entrevista]. 19 Marzo 2014.
- [128] A. Hine y A. Abdelnour, «In vitro establishment of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.),» *Tecnología en Marcha*, vol. 26, n° 4, pp. 64-71, 2013.
- [129] P. Diaz, J. Namur y S. Bollati, «Efecto del ácido cítrico y del carbón activado en la regeneración de plantas de orquídeas [*Laelia lundii*] por cultivo in vitro de

semillas.» de *3er. Congreso Argentino de Floricultura, 8a Jornadas Nacionales de Floricultura.*, La Plata, Argentina, 2006.

- [130] E. A. Jiménez González, «Cultivo de ápices y meristemos,» de *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*, Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998, pp. 45-56.
- [131] H. I. y. K. P. Thorpe TA, « Application of micropropagation to forestry,» de *Micropropagation, technology and applications.*, Michigan, Kluwer Academic Press., 1991, pp. 311-316.
- [132] E. Quiala, G. Montalvo y J. Matos, «Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas,» *Biotecnología vegetal*, vol. 4, n° 4, pp. 195-199, 2004.
- [133] A. Bhattacharya, P. Sood y V. Citovsky, «The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection,» *Molecular plant pathology*, vol. 11, n° 5, pp. 705-719, 2010.
- [134] L. Gómez-torres, B. Moreno-gómez, M. Velásquez-lozano, C. Aguado-santacruz y A.-m. G, «Cultivos fotoautotróficos de células vegetales en suspensión. Establecimiento y perspectivas de aplicación.,» *Rev. Fitotec. Mex.*, vol. 2, n° 165-179, p. 37, 2014.
- [135] L. Taiz y E. Zeiger, «Capítulo 21. Citoquininas: Reguladores de la división celular,» de *Fisiología vegetal*, Publicacions de la Universitat Jaume I, 2006, pp. 943-990.
- [136] A. Blanco, *Laboratorio 4: Cultivo in vitro. Preparación Medios de Cultivo*, Santiago de Chile: Duoc UC Escuela de Recursos Naturales. Fisiología Hortícola.
- [137] A. Dios-López, E. Montalvo-González, I. Andrade-González y J. Gómez-Leyva, «Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) in vitro,» *Rev. Chapingo Ser.Hortic*, vol. 17, n° 2, pp. 77-87, 2011.
- [138] Universidad Nacional de la Plata, «Repositorio Institucional de la UNLP,» [En línea]. Available: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4\\_-\\_Cultivo\\_in\\_vitro.pdf?sequence=6](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6). [Último acceso: Septiembre 9 2014].
- [139] J. Hejjari, A. Nerg, P. Kainulainen, H. Viiri, M. Vuorinen y J. Holopainen, «Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings,» *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 115, pp. 117-124, 2005.
- [140] PhytoTechnology Laboratory, «MS Basal Medium: w/ Vitamins,» Abril 2013. [En línea]. Available: <http://www.phytotechlab.com/TechInfo/M530-Info.pdf>. [Último acceso: 3 Septiembre 2014].

- [141] PhytoTechnology Laboratory, «GAMBORG B-5 BASAL MEDIUM,» Marzo 2013. [En línea]. Available: <http://www.phytotechlab.com/TechInfo/G398-info.pdf>. [Último acceso: 3 Septiembre 2014].
- [142] Universidad de Salamanca, «Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico,» [En línea]. Available: <http://dicciomed.eusal.es/palabra/angiogenesis>. [Último acceso: 24 Mayo 2014].
- [143] «Ateroma: Doctissimo,» [En línea]. Available: <http://salud.doctissimo.es/diccionario-medico/ateroma.html>. [Último acceso: 12 Julio 2014].
- [144] RAE, «Cardias,» [En línea]. Available: <http://lema.rae.es/drae/srv/search?id=LNqO6bAEDDXX2MPEgvtL>. [Último acceso: 26 Agosto 2014].
- [145] E. Dun, B. Ferguson y C. Beveridge, «Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms?,» *Plant physiology*, vol. 142, n<sup>o</sup> 3, pp. 812-819, 2006.

## 7. Anexos

### A. Composición de medios de cultivo

A continuación se detallan las composiciones de los medios de cultivo basales utilizados en los diferentes cultivos *in vitro* de *A. chilensis*: medio modificado Murashige & Skoog con vitaminas y medio Gamborg-b5, ambos distribuidos comercialmente por PhytoTechnology Laboratory®.

Tabla 9: Formulación del medio de cultivo modificado Murashige & Skoog con vitaminas distribuido comercialmente por PhytoTechnology Laboratory® [140].

<b>Constituyente</b>	<b>Concentración [mg/L]</b>
<b>Micronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650
CaCl <sub>2</sub>	332,2
MgSO <sub>4</sub>	180,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
EMO <sub>3</sub>	1.900
<b>Macronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16,9
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37,26
<b>Vitaminas</b>	
Inositol	100
Nicotínico	0,5
HCl-Piridoxina	0,5
Glicina	2
HCl-Tiamina	0,1
<b>Buffer</b>	
MES	500

Tabla 10: Formulación del medio de cultivo Gamborg B-5 distribuido comercialmente por PhytoTechnology Laboratory® [141].

<b>Constituyente</b>	<b>Concentración [mg/L]</b>
<b><i>Micronutrientes</i></b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	134
CaCl <sub>2</sub>	113,24
MgSO <sub>4</sub>	122,09
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
EMO <sub>3</sub>	2.500
<b><i>Macronutrientes</i></b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10
KI	0,75
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37,26
<b><i>Vitaminas</i></b>	
Inositol	100
Nicotínico	1
HCl-Piridoxina	1
HCl-Tiamina	10
<b><i>Buffer</i></b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150

## B. Perfil de antocianinas en maqui

A continuación se presenta el perfil de antocianinas obtenidos a partir de un extracto de fruto de *A. chilensis*. Las identidades de los compuestos asociados a los picos del cromatograma se presentan en la Tabla 11. [60]

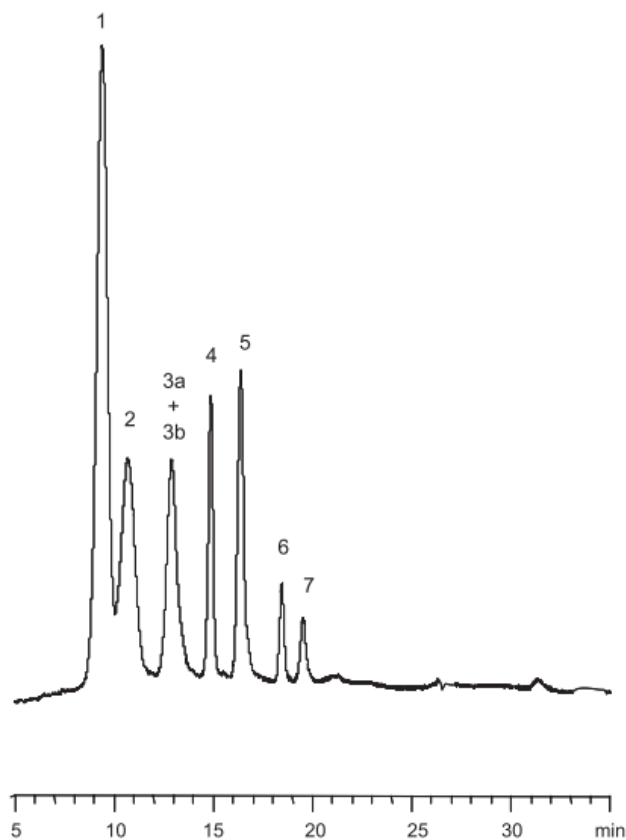


Figura 35: Cromatograma HPLC registrado a 520 nm en donde se muestra el perfil de antocianinas de un extracto de fruto de *A. chilensis*.

Tabla 11: Identidad de las diferentes antocianinas identificadas en un extracto de fruto de *A. chilensis*. Los números de los picos son los mostrados en la Figura 35.

Nº pico	Antocianina
1	Delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido
2	Delfinidina-3,5-diglucósido
3 <sup>a</sup>	Cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido
3 <sup>b</sup>	Cianidina-3,5-diglucósido
4	Delfinidina-3-sambubiósido
5	Delfinidina-3-glucósido
6	Cianidina-3-sambubiósido
7	Cianidina-3-glucósido