



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

**ESTRATEGIAS DE CULTIVO E INDUCCIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS DE
Aristotelia chilensis (MAQUI) PARA LA OBTENCIÓN DE ANTOCIANINAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL
EN BIOTECNOLOGÍA

MARÍA CONSTANZA SADINO RIQUELME

PROFESOR GUÍA:
ÁLVARO OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
VÍCTOR POLANCO CASTRO
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por una iniciativa CORFO I+D Línea 2

SANTIAGO DE CHILE
2015

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE:** Ingeniera Civil en Biotecnología
POR: María Constanza Sadino Riquelme
FECHA: 25/08/2015
PROFESOR GUÍA: Álvaro Olivera Nappa

ESTRATEGIAS DE CULTIVO E INDUCCIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS DE *Aristotelia chilensis* (MAQUI) PARA LA OBTENCIÓN DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas del maqui son una materia prima de gran interés para la industria alimenticia y nutracéutica, debido al valor agregado que le confieren sus distintas propiedades farmacológicas y a la condición de endemismo de la especie vegetal. Por ello, en el presente trabajo se estudian diversas estrategias de producción *in vitro* de las antocianinas de *Aristotelia chilensis* y se concibe un proceso con alcances a escala comercial, buscando satisfacer parte de la creciente demanda por estos compuestos, prescindiendo de la recolección de los frutos del maqui.

En cultivos de callo, se evaluaron cinco factores de crecimiento: concentración de sacarosa (3 y 6%), medio basal (MS y B5), luminosidad (L y O), fuente de explante (C, E y H) y hormonas (mezclas a, b, c y d); determinándose que, entre las condiciones de cultivo estudiadas, los tratamientos 3B5.E.L.a, 6MS.C.L.b, 3MS.E.O.b y 6B5.C.O.a presentaron la mayor velocidad de crecimiento celular; mientras que 3B5.C.L.d y 3MS.C.L.d destacaron por su alto contenido de antocianinas. Además, se observó que los callos morados podían seguir produciendo estos compuestos, aún en ausencia de las hormonas que inducían su síntesis, alcanzando aún una acumulación más alta que en presencia de estos químicos.

En función de lo anterior, fue posible diseñar e implementar una estrategia de producción de antocianinas en suspensiones celulares de maqui. Este proceso contempló tres fases de cultivo: para aumentar la biomasa (Fase A), para inducir la acumulación de los metabolitos secundarios (Fase B) y para eliminar los residuos de la hormona 2,4-D (Fase C). En consecuencia, se evaluaron dos condiciones de cultivo para la Fase A, en luz (6MS.C.L.b) y oscuridad (6B5.C.O.a); mientras que para las Fase B y C se utilizaron los mismos factores que en 3MS.C.L.d, con y sin hormonas, respectivamente. Sin embargo, la acumulación de antocianinas en los cultivos en suspensión fue deficiente en comparación a la obtenida en callos. Adicionalmente, en la estrategia de cultivo con Fase A en luz, se estudió el efecto de dos elicitores (peróxido de hidrógeno y ácido clorhídrico) y un precursor (fenilalanina); no obstante, ninguno de estos factores favoreció una mayor acumulación de los metabolitos de interés.

Finalmente, se concibió un proceso de producción *in vitro* de antocianinas, con alcances a escala comercial, basado en la implementación de un sistema de inmersión temporal para el cultivo de callos de maqui, el cual incluye el desarrollo de las tres fases de cultivo (A, B y C), anteriormente explicadas, en un periodo total de 40 semanas. De acuerdo a una evaluación técnico-económica, no se puede descartar que esta estrategia sea rentable, sin embargo no es técnicamente factible para altos niveles de producción y por lo tanto, no sería atractiva comercialmente; ya que únicamente es posible generar cantidades de antocianinas del orden de 100 mg por *batch*, equivalente al contenido en 12 g de fruto de maqui.

A mi mamá, María Gloria, por enseñarme que las mayores limitaciones en la vida son las que nos imponemos nosotros mismos.

Agradecimientos

Con la finalización de este trabajo, se cierra una importante etapa en mi vida y quisiera aprovechar esta oportunidad para agradecerles a todas aquellas personas que me han acompañado en el largo camino que me ha traído a esta instancia.

Quisiera agradecerle a mi mamá por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, por su amor y confianza. A mi hermano, por aguantarme durante todos estos años. A mis tíos y primos, por su preocupación y ayuda.

A Francisco, que me ha acompañado estos últimos años, por enseñarme a valorar lo positivo incluso en los momentos más difíciles y animarme a seguir. Gracias por estar ahí. A sus papás, por su preocupación y cariño.

A mi mejor amigo, compañero de puesto y trabajo, el Nacho, por sus consejos y todas las anécdotas compartidas. A Felipe D., por confiar en mí la labor de la docencia. Al Gus y la Carmen, por su amistad.

A mis compañeros de generación y amigos del IQBT, quienes hicieron de la especialidad años inolvidables: Angelo, Caro, Chico, Fabi, Joaquín, Juan (Porno), Juanra, Oso, Paula, Pili, Pancho Martínez, Pancho Díaz, Richi, Roberto y Seba. En general, a los integrantes del DIQBT, por hacer del departamento una gran familia.

A mis amigos de Plan Común, Bego, Yanxi y Javier, por las experiencias y sueños compartidos.

Un agradecimiento a Dani, Liz y Ma. José, quienes hicieron de la oficina de la EdV un grato lugar de trabajo y un refugio donde acudir cuando lo necesitaba. A los amigos que conocí en EdV y que hicieron de mis veranos unas vacaciones inolvidables.

A los profesores de la comisión, Oriana, Álvaro y Víctor, que con su conocimiento y consejos me han permitido guiar y dar forma a este trabajo. Y a todos quienes me ayudaron para que esta investigación rindiera buenos frutos, en especial a Allison, Gabriela y los profesores Soledad U. y Roberto A.

A Ma. Trinidad Mondaca, ex directora del Colegio Centenario, por apoyar a mí y mi familia durante mi enseñanza básica y media.

Probablemente me falte nombrar a muchas personas que han formado parte de este largo procesos. A todos ellos, espero que sepan que les estoy sinceramente agradecida.

Tabla de contenido

Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
1 Introducción	1
1.1 Antecedentes generales	1
1.2 Descripción del proyecto y justificación.....	10
1.3 Objetivos	11
1.4 Marco teórico	12
2 Materiales y métodos.....	20
2.1 Material vegetal	20
2.2 Reactivos y solventes.....	21
2.3 Estudio de condiciones de cultivo de callos de células de maqui para la producción de biomasa y antocianinas	21
2.4 Evaluación de estrategias de producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares	28
2.5 Evaluación del efecto de elicitores y precursores en la producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares.....	30
2.6 Concepción de una estrategia de producción de antocianinas de maqui con alcances a escala comercial	31
2.7 Análisis estadístico.....	31
3 Resultados y discusión.....	32
3.1 Estudio de condiciones de cultivo de callos de células de maqui para la producción de biomasa y antocianinas	32

3.2 Evaluación de estrategias de producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares	42
3.3 Evaluación del efecto de elicitores y precursores en la producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares.....	47
3.4 Concepción de una estrategia de producción de antocianinas de maqui con alcances a escala comercial	56
4 Conclusiones.....	60
5 Proyecciones y recomendaciones.....	62
Nomenclatura.....	63
Bibliografía.....	64
Anexos.....	69
Anexo A. Descripción de la metodología de investigación	69
Anexo B. Producción de biomasa en los cultivos de callo	70
Anexo C. Acumulación de antocianinas en los cultivos de callo	82
Anexo D. Producción de biomasa en suspensiones celulares	93
Anexo E. Acumulación de antocianinas en suspensiones celulares	95
Anexo F. Producción de biomasa en suspensiones celulares con adición de un factor elicitador o precursor	98
Anexo G. Acumulación de antocianinas en suspensiones celulares con adición de un factor elicitador o precursor.....	100
Anexo H. Evaluación técnico-económica de la implementación de un SIT para la producción de antocianinas del maqui	104

Índice de tablas

Tabla 1.1.1: Contenido de polifenoles y antocianinas totales en <i>berries</i>	7
Tabla 2.1.1: Condiciones de cultivo del material vegetal inicial	20
Tabla 2.3.1: Descripción y nomenclatura de los factores del diseño experimental.	21
Tabla 2.3.2: Tratamientos establecidos en función del diseño experimental	22
Tabla 2.3.3: Secuencia de adaptación del material vegetal inicial.	23
Tabla 3.1.1: Prueba estadística de los efectos	38
Tabla 3.3.1: Diseño de la estrategia de inducción/elicitación de las suspensiones celulares de <i>A. chilensis</i> para la producción de antocianinas.	49
Tabla 3.3.2: Diseño de la alimentación <i>fed batch</i> de medio de cultivo para la producción de antocianinas en suspensiones celulares de maqui.	51
Tabla 3.4.1: Parámetros de los principales cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. chilensis</i> para las distintas estrategias implementadas.	56

Índice de figuras

Figura 1.1.1: Clasificación de los compuestos fenólicos	3
Figura 1.1.2: Estructura y sustituyentes de las antocianinas	3
Figura 1.1.3: Ruta de biosíntesis de las antocianinas	4
Figura 1.1.4: El maqui.....	5
Figura 3.1.1: Cultivos de callo de <i>Aristotelia chilensis</i> con crecimiento deficiente	33
Figura 3.1.2: Pigmentación de los cultivos de callo de <i>Aristotelia chilensis</i>	33
Figura 3.1.3: Inicio de la producción de antocianinas en callos de maqui.....	34
Figura 3.1.4: Aislamiento mecánico de células de maqui productoras de antocianinas	34
Figura 3.1.5: Habitación de los tratamientos de callo de maqui	35
Figura 3.1.6: Efecto de las condiciones de cultivo en el crecimiento de callos de maqui	37
Figura 3.1.7: Tratamientos de callos de maqui con mayor velocidad de crecimiento	38
Figura 3.1.8: Tratamientos de callos de maqui con pigmentación morada en toda su estructura..	39
Figura 3.1.9: Evaluación de los extractos de antocianinas de los tratamientos con callos morados de maqui.....	40
Figura 3.2.1: Descripción de las fases de cultivo de las estrategias de producción de antocianinas en células de <i>Aristotelia chilensis</i> cultivadas en suspensión.	42
Figura 3.2.2: Diseño de las Estrategias 1 y 2 para la producción de antocianinas en células de <i>A. chilensis</i> cultivadas en suspensión.	43
Figura 3.2.3: Cultivos en suspensión de las Estrategias 1 y 2 para la producción de antocianinas en células de maqui.....	44
Figura 3.2.4: Índice de crecimiento final de las Estrategias 1 y 2.....	45
Figura 3.2.5: Evaluación de los extractos de antocianinas de las Estrategias 1 y 2.....	46

Figura 3.3.1: Estrategia de inducción/elicitación de las suspensiones celulares de maqui para la producción de antocianinas.....	49
Figura 3.3.2: Sistema de iluminación para la producción de antocianinas del maqui en suspensiones celulares.	50
Figura 3.3.3: Estrategia de alimentación <i>fed batch</i> de medio de cultivo para la producción de antocianinas en suspensiones celulares de maqui.....	50
Figura 3.3.4: Suspensiones celulares de maqui de los tratamientos Control Luz y Control Luz + Volumen.....	51
Figura 3.3.5: Suspensiones celulares de maqui de los tratamientos Elicitor Peróxido, Elicitor pH Medio y Precursor Fenilalanina.....	53
Figura 3.3.6: Índice de crecimiento final de las estrategias de inducción/elicitación de suspensiones celulares de maqui.....	54
Figura 3.3.7: Evaluación de los extractos de antocianinas de las estrategias de inducción/elicitación de suspensiones celulares de maqui	55
Figura 3.4.1: Diseño de la estrategia de producción de antocianinas en callos de maqui con alcances a escala comercial.....	56
Figura 3.4.2: Sistema de inmersión temporal.....	57

1 Introducción

1.1 Antecedentes generales

En la actualidad, se conoce que la ingesta de frutas y verduras tiene un impacto positivo sobre la salud humana, ayudando a la prevención de algunas patologías [1]. Las propiedades biológicas de estos alimentos se atribuyen principalmente a su alto contenido de fitoquímicos, los cuales se definen como componentes químicos naturales, de origen vegetal, con actividades biológicas discretas. Diversos estudios, realizados en cultivos celulares *in vitro*, avalan las actividades benéficas de estos compuestos contra el cáncer, algunas enfermedades cardíacas coronarias, diabetes, hipertensión, inflamación, infecciones microbianas, virales y parasitarias, enfermedades neurodegenerativas y úlceras, entre otras afecciones. Estos resultados han motivado el uso de diversos fitoquímicos en la elaboración de alimentos, nutracéuticos y fármacos [2].

El término nutracéutico fue acuñado en 1989 por el Dr. Stephen De Felice, Presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina de Estados Unidos, y hace referencia a un grupo heterogéneo de alimentos cuyo consumo genera beneficios para la salud, tanto en la prevención como en el tratamiento de enfermedades [2, 3]. Estos se diferencian de los alimentos funcionales principalmente en su presentación y forma de suministro. Los primeros se encuentran en un formato farmacéutico, es decir, como cápsulas y/o comprimidos; mientras que los segundos conservan su ‘forma de alimento’ y son enriquecidos o adicionados con sustancias con propiedades biológicas [3]. Cabe destacar que, en ambos casos, el componente funcional puede ser un nutriente esencial (macro o micronutriente), un nutriente no esencial o un componente no nutritivo [2].

Los fitoquímicos pueden clasificarse principalmente en tres clases: terpenoides, compuestos fenólicos, y alcaloides y otros compuestos nitrogenados. Entre los compuestos fenólicos destacan los polifenoles que representan el grupo de compuestos químicos vegetales más grande y de mayor atractivo para la industria nutracéutica, debido a su reconocida actividad antioxidante [2]. Si bien el uso de plantas con propósitos medicinales ha sido una práctica histórica entre las poblaciones originarias de distintas partes del mundo, sólo en los últimos años se ha encontrado evidencia científica que sugiera una correlación positiva entre el consumo de alimentos ricos en fenoles y la prevención de enfermedades, aumentando el interés por el uso de plantas como fuente de estos compuestos [4].

Dentro de los polifenoles, las antocianinas han demostrado tener una poderosa capacidad antioxidante, además de otros efectos benéficos para la salud [5]. En este contexto, el maqui, denominado científicamente como *Aristotelia chilensis*, adquiere una gran importancia a nivel agrícola, comercial y de la industria nutracéutica, ya que su fruto destaca significativamente por su alto contenido de polifenoles y antocianinas, al compararlo con los de otros *berries* y plantas en general [6].

1.1.1 Antocianinas

Usos y propiedades

Los polifenoles son metabolitos secundarios, cuya síntesis ocurre en todos los órganos de las plantas superiores. Este tipo de compuesto no tiene un rol conocido en el crecimiento y desarrollo de los organismos vegetales, pero tiene funciones importantes en la defensa y adaptación de estos al medio ambiente [7].

Las antocianinas son moléculas polifenólicas y se caracterizan por ser pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el humano. Estos compuestos se encuentran acumulados en las vacuolas de las células vegetales, principalmente en la epidermis de flores y frutos, siendo responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul [8].

El color de algunas antocianinas puede variar en función del pH. Ante un pH menor a 3 pueden exhibir un color rojo intenso, mientras que a valores entre 4 y 5 se vuelven no coloreadas y a pH mayores a 7 se observan azules, debido a modificaciones estructurales que ocurren en la molécula. Adicionalmente, la interacción con otras sustancias, como aminoácidos, alcaloides y flavonoides puede generar un efecto de copigmentación. La existencia de esta variedad de colores ha motivado el uso de estos compuestos como pigmentos naturales, tanto en alimentos como en cosméticos y productos farmacéuticos, reemplazando el uso de algunos colorantes sintéticos sindicados como tóxicos para la salud humana [7, 8].

En la naturaleza, las antocianinas permiten la atracción de polinizadores y actúan como un filtro de la radiación ultravioleta en las hojas de las plantas. También están asociadas con la resistencia a la acción de patógenos y herbívoros, y al aumento de la respuesta antioxidante en tejidos afectados por diversos factores de estrés, con la finalidad de mantener la estabilidad fisiológica del organismo vegetal [7].

Diversos estudios han demostrado que las antocianinas tienen la capacidad de atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas; siendo responsables de efectos terapéuticos y farmacológicos en los mamíferos que las consumen. Así, por ejemplo, se les atribuyen propiedades anticancerígenas, antitumorales, antiinflamatorias y antidiabéticas; además de la reducción de enfermedades coronarias, y el mejoramiento de la agudeza visual y de las funciones neuronales [8].

La capacidad antioxidante de las antocianinas se puede medir tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, las mediciones *in vitro* pueden diferir significativamente de los resultados *in vivo*, debido a que la absorción de los polifenoles en el organismo está determinada por la estructura química y el microambiente en el que se encuentren estos compuestos, afectando su biodisponibilidad [6].

Clasificación y estructura química

Los compuestos fenólicos se caracterizan por la presencia de uno o más anillos aromáticos y, al menos, un sustituyente hidroxilo [7]. Su clasificación se puede realizar de acuerdo al número

de anillos aromáticos que poseen en su estructura química y la forma en que estos anillos se unen entre sí, dividiéndose en: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (Figura 1.1.1) [6].

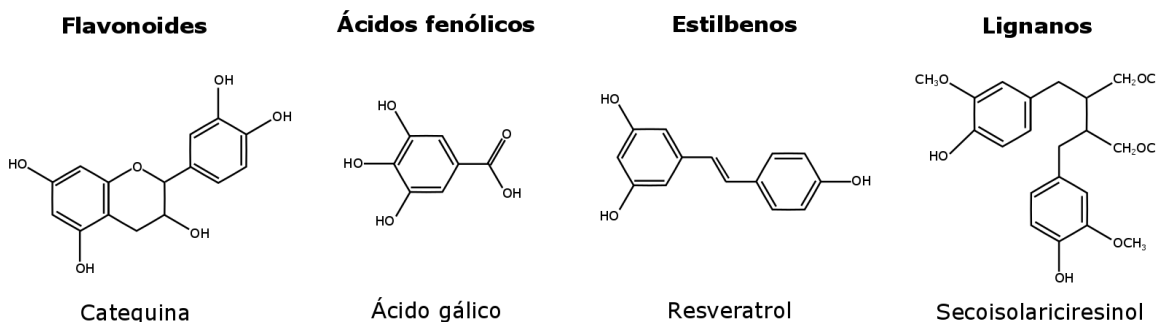
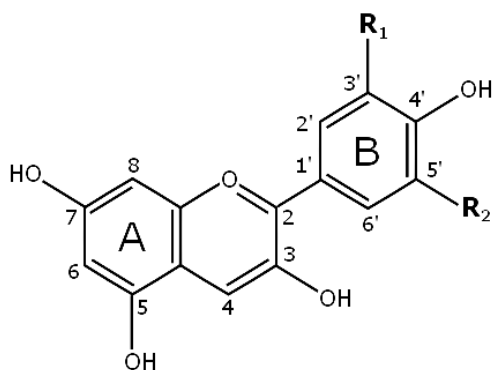


Figura 1.1.1: Clasificación de los compuestos fenólicos [6].

Los flavonoides tienen una estructura definida por dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos, formando un heterociclo oxigenado, y se pueden subclasificar en flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles, de acuerdo al estado de oxidación del anillo pirano central [6, 7].

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas. Sus anillos aromáticos (A y B en la Figura 1.1.2) son sintetizados por la ruta de los ácidos malónico y shikímico, respectivamente. El anillo B presenta variaciones estructurales, que radican en los diferentes grupos sustituyentes que puede poseer, determinando la existencia de seis tipos de antocianinas comunes entre las plantas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina (Figura 1.1.2). A su vez, estas moléculas pueden ser glicosiladas o aciladas en distintos sitios, generándose una gran diversidad de antocianinas [8, 9].



Antocianina	Substitución		λ_{max} [nm] (espectro visible)
	R ₁	R ₂	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delphinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

Figura 1.1.2: Estructura y sustituyentes de las antocianinas [8].

El color característico de una antocianina depende del número de grupos hidroxilo y metoxilo que posea y de la orientación de estos. Una mayor hidroxilación produce desplazamientos hacia tonalidades azules, mientras que al incrementar las metoxilaciones se producen coloraciones rojas [8]. Los sustituyentes hidroxilos también se relacionan con la actividad antioxidante de estos compuestos, ya que esta actividad es mayor mientras más grupos OH estén presentes en la

estructura [10]. Adicionalmente, las antocianinas presentan sustituciones glicosídicas en los carbonos 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos y pueden mostrar acilaciones en los residuos de azúcares con ácidos orgánicos. Estas modificaciones igualmente generan cambios en el tono de las antocianinas; así, por ejemplo, cuando ocurren en la posición 5 se producen desplazamientos hacia las tonalidades púrpuras [8].

Biosíntesis

Experimentalmente, se ha determinado que el anillo A de las antocianinas se sintetiza por la ruta del ácido malónico, con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA; mientras que el anillo B proviene de la ruta del ácido shikímico, que da origen a la fenilalanina (Figura 1.1.3) [8].

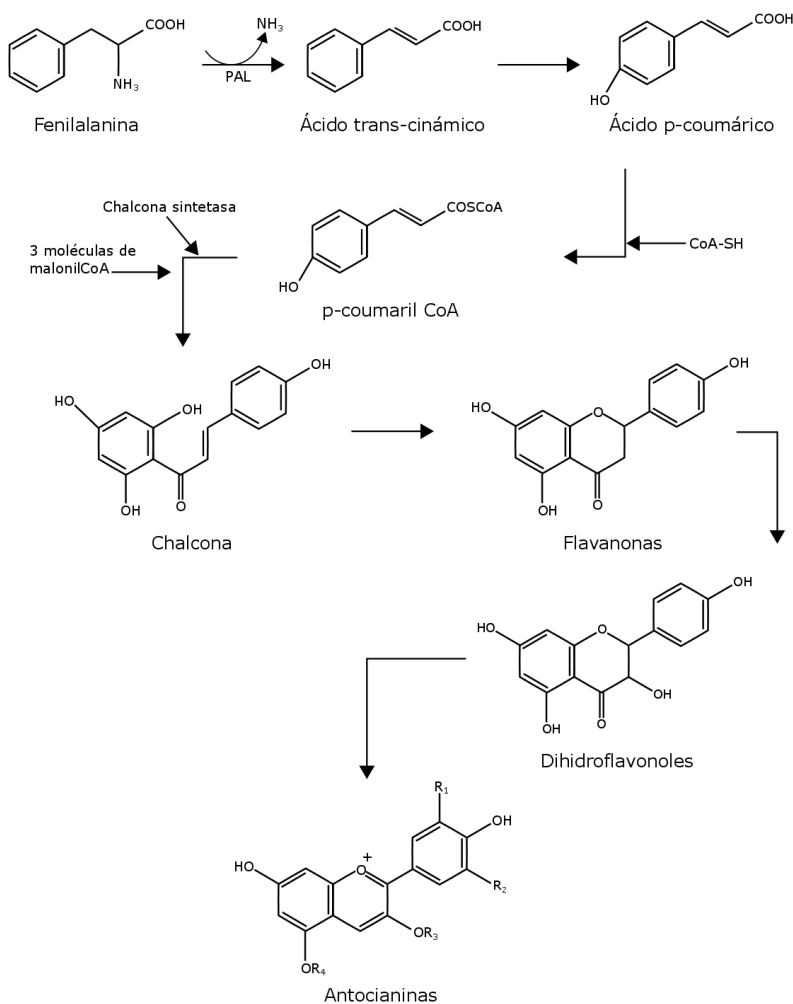


Figura 1.1.3: Ruta de biosíntesis de las antocianinas [8].

Durante la biosíntesis de las antocianinas, la fenilalanina es desaminada por acción de la enzima fenilalanina amonía liasa (PAL), obteniéndose ácido trans-cinámico, que es hidroxilado por cinamato-4 hidroxilasa a ácido p-cumárico. Posteriormente, éste es activado a p-coumaroil-CoA por la enzima 4-cumarato-CoA ligasa (4CL). Luego, el p-coumaroil-CoA es

condensado con tres moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona de 15 átomos de carbono, por acción de una chalcona sintetasa. Este compuesto intermedio es transformado en una flavanona, producto de una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3, seguida por una deshidratación. La molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación del heterociclo, mediante la acción de una glicosil transferasa, y después sufre posibles reacciones de metilación de los hidroxilos, seguidas de acilaciones [7, 8].

1.1.2 El maqui

Descripción botánica

El maqui, denominado científicamente como *Aristotelia chilensis*, es una planta nativa de Chile que se encuentra desde la Región de Coquimbo (IV Región) hasta la Región del General Carlos Ibáñez del Campo (XI Región), tanto en el valle central como en los faldeos cordilleranos, desde cerca del nivel del mar hasta los 2.500 m de altitud. Además, también habita en el Archipiélago de Juan Fernández y en Argentina [4, 6].

Esta especie es considerada pionera ya que es de las primeras en colonizar ambientes alterados, quemados o abandonados, cumpliendo un rol importante en el control de la erosión. Generalmente, se desarrolla como especie secundaria, preferentemente en suelos húmedos, quebradas, faldeos o márgenes de bosques, donde las poblaciones de quillay, litre y peumo son predominantes [3, 10].

A. chilensis, perteneciente a la familia *Elaeocarpaceae*, posee una gran plasticidad morfológica, presentándose como arbusto en la zona septentrional de su distribución y como árbol en la zona meridional. Normalmente, se encuentra formando comunidades puras, llamadas macales. Ambas denominaciones, maqui y macal, provienen del Mapudungun, lenguaje de la cultura mapuche [6].

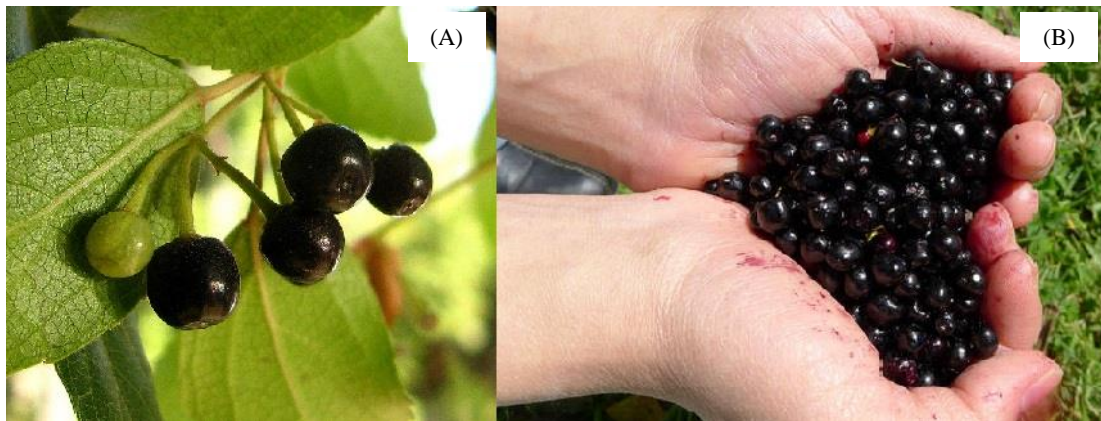


Figura 1.1.4: El maqui. (A) La planta del maqui y (B) sus frutos [11, 12].

El maqui es una especie perennifolia (siempreverde) con tallos rojizos, ramas delgadas y flexibles, y hojas aovadas o lanceoladas con bordes dentados. Los individuos de esta especie

pueden alcanzar hasta 5 m de altura y sus hojas miden entre 4 y 9 cm. Sus flores son pequeñas, de color blanquecino o amarillo pálido, de cinco pétalos y se encuentran reunidas en inflorescencias axilares; mientras que sus frutos son bayas pequeñas de 5 mm, de color negro brillante o azuladas, que contienen de 2 a 4 semillas (Figura 1.1.4) [3, 4].

A. chilensis es una planta dioica, es decir que machos y hembras están localizados en diferentes individuos, por lo que su reproducción ocurre mediante polinización cruzada. Sin embargo, también se ha observado la existencia de flores con morfología hermafrodita pero funcionalmente unisexuales [4]. Su florecimiento ocurre entre octubre y diciembre, según su ubicación geográfica y el fruto alcanza la madurez en el verano, siendo recolectados desde diciembre hasta febrero desde los bosques silvestres [4, 6, 10].

Agrotecnología de cultivo

Los frutos del maqui son recolectados desde individuos silvestres debido a que no se han establecido plantaciones comerciales para esta especie [10, 13]. Aun así, existen dos métodos de propagación para esta planta, mediante semillas y reproducción vegetativa [4, 14].

La multiplicación mediante semillas requiere de la recolección de frutos maduros, los cuales son remojados para separar la pulpa de la semilla, que luego es secada en un lugar sombreado. La mejor temporada para sembrar las semillas es iniciando el invierno, siendo posible obtener desde 34% hasta 63% de semillas germinadas, las cuales emergen luego de 28 a 30 días, posteriores a la siembra. Luego de 25 días, las plántulas pueden alcanzar una altura entre 3 a 4 cm, considerándose listas para ser trasplantadas [4]. El porcentaje de germinación puede variar de acuerdo al pretratamiento que se le otorgue a las semillas; así, por ejemplo, se ha reportado una germinación del 90% en base a un pretratamiento en agua y subsiguiente aplicación de ácido giberélico [4, 14].

Para la propagación vegetativa se utilizan estacas de la planta. Las estacas se colectan preferentemente en otoño y primavera, siendo cortadas desde el segmento apical de las ramas, con una longitud menor a 20 cm y con cuatro a cinco hojas. Regularmente, se agrega una hormona de enraizamiento a la base de la estaca. Luego de seis a ocho semanas, hasta el 100% de los individuos puede presentar la aparición de raíces, variando según las condiciones de cultivo [4, 14].

Antocianinas del maqui

Entre los componentes químicos de *A. chilensis* se presentan altos niveles de polifenoles, de los cuales destacan las antocianinas debido a sus potenciales efectos benéficos en la salud humana [15]. En particular, el fruto del maqui posee el más alto contenido de estos compuestos entre distintas frutas y verduras, especialmente entre los *berries* (reconocidas por su alto contenido de antocianinas), siendo denominado *superberry* por la gran capacidad antioxidante que le confieren estas moléculas (Tabla 1.1.1) [3, 4].

De acuerdo a un estudio, el contenido total promedio de antocianinas en el fruto del maqui es de $211,9 \pm 0,4$ mg por cada 100 g de fruto seco, expresado en equivalentes de delfinidina-3-glucósido. Mediante la metodología de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por su nombre en inglés), se determinó la composición de estas antocianinas, identificando ocho

pigmentos correspondientes a mono y di-glucósidos de cianidina, malvidina, petunidina y delfinidina. Siendo esta última la más abundante, abarcando un 73% del contenido total [15].

Tabla 1.1.1: Contenido de polifenoles y antocianinas totales en *berries* [16]

Especie	Polifenoles totales*	Antocianinas totales**
Maqui	21,0	21,7
Murtilla (roja)	7,8	6,4
Frutilla chilena (rosada)	4,1	0,0
Mora	3,4	2,3
Murtilla (variegada)	3,2	1,8
Arándano	3,1	2,8
Frutilla chilena (blanca)	2,9	0,0
Frambuesa	2,4	7,1
Frutilla cultivada	1,9	3,1
Zarzaparrilla	1,8	0,5

* gramos equivalentes de ácido gálico por kilogramo de peso fresco de fruto

** gramos equivalentes de malvidina-3-glucosido por kilogramo de peso fresco de fruto

Algunos autores han indicado que el perfil de antocianinas varía entre distintas poblaciones de maqui, influenciado principalmente por el factor genético [10]. Asimismo, el contenido de estos metabolitos secundarios puede variar en los distintos estados de desarrollo del fruto. Según una investigación, el contenido total de fenoles disminuiría mientras el de antocianinas aumentaría desde el estado verde (inmaduro) al rojo claro del fruto. Luego, ambos parámetros crecerían a partir del estado rojo claro al morado oscuro (maduro) del fruto. Durante este proceso, el mayor contenido de antocianinas se alcanzaría en frutos maduros con altos niveles de azúcar, en torno a 18-19 °Bx [13].

Uso y propiedades del maqui

Al maqui se le consignan distintos usos, los cuales se pueden reunir en tres categorías principales: tintóreo, preparación de comestibles y medicinal [3].

Las altas concentraciones de antocianinas en los frutos de *Aristotelia chilensis* son responsables de la pigmentación púrpura de estos, siendo usados tradicionalmente como fuente de colorantes naturales para tejidos mapuches y para el tinte de los vinos. Adicionalmente, hoy en día, también se utilizan como materia prima para la elaboración de pigmentos orgánicos para alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, los cuales son muy demandados por el mercado europeo, reemplazando a sus variantes sintéticos que tendrían efectos colaterales tóxicos [3, 4].

El fruto del maqui es comestible y se caracteriza por ser astringente, algo ácido y refrescante. Puede ser ingerido directamente o utilizado en la preparación de helados, mermeladas, jaleas, jugos, confites y bebidas alcohólicas, como la chicha preparada por el pueblo Mapuche conocida como *Tecu* [4]. Además, con las semillas se prepara un tipo de harina artesanal [3].

Tradicionalmente, el maqui ha sido utilizado como planta medicinal. Sus hojas secas y/o molidas como polvos se añaden en ungüentos que se aplican para curar heridas y como

cicatrizantes. Las hojas frescas se preparan en infusiones para tratar enfermedades como amigdalitis, faringitis, tumores intestinales y úlceras orales, y para disminuir los ardores de la fiebre. Las hojas también tienen una acción relajante sobre las fibras musculares, siendo efectivas como antiinflamatorio, antiespasmódico y analgésico. El fruto se hierva en agua, junto a otras hierbas o solo, para preparar bebidas medicinales que se utilizan en el tratamiento de diarreas crónicas, enteritis simple y disenterías, entre otras afecciones [4, 17].

Las propiedades medicinales de *A. chilensis* han sido estudiadas científicamente, corroborándose las siguientes actividades farmacológicas *in vitro*: analgésica, antiinflamatoria, antioxidante, cardioprotectora, anticancerígena, antibacteriana, astringente y antidiarreica. También se ha comprobado su efecto gastroprotector, neuroprotector y antihemolítico. Adicionalmente, se han encontrado evidencias de que podría ocuparse en la elaboración de productos reductores de peso [3]. De acuerdo a un estudio, el jugo del maqui puede inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LHDL) y proteger a las células endoteliales contra el estrés oxidativo intracelular, siendo considerado también como antiaterogénico [5].

Algunas propiedades del maqui han sido comprobadas *in vivo*. Por ejemplo, se probó en un modelo de ratas diabéticas que un extracto estandarizado de maqui, rico en delfinidinas, disminuye los niveles basales de glucosa sanguínea, después de 4 meses de tratamiento. Además, en un estudio piloto fase I realizado en pacientes con tolerancia a la glucosa alterada, el mismo extracto disminuyó la glucosa postprandial y la insulina, sugiriendo un uso potencial en pacientes prediabéticos, así como en el tratamiento de enfermedades asociadas al metabolismo de carbohidratos [5]. Por otra parte, el extracto metanólico de frutos de maqui ha presentado actividad antioxidante y cardioprotectora sobre la isquemia/reperfusión aguda de corazón de ratas, la cual se explicaría por la disminución de la oxidación lipídica y del estrés oxidativo [6].

1.1.3 Industria nutracéutica

Descripción general

La industria nutracéutica incluye tanto la elaboración y comercialización de suplementos dietéticos, alimentos y bebidas funcionales, como de sus ingredientes [18]. Desde hace algunos años, la ingesta de estos productos ha experimentado un gran aumento, impulsado principalmente por el interés de los consumidores que cada vez están más conscientes de su autocuidado y buscan en el mercado productos que contribuyan a su salud y bienestar. Este fenómeno ha llevado a una expansión mundial de las empresas que elaboran nutracéuticos y también de aquellas que proveen la materia prima con sus principios activos [16].

En el año 1999, la industria de los productos naturales generó ingresos de USD\$65 billones a nivel mundial, de los cuales el 60% correspondía a suplementos alimenticios y fármacos [4]. En el presente, de acuerdo a un estudio publicado en abril de 2014, se proyecta que el mercado nutracéutico estadounidense crecerá un 5% anual, entre los años 2013 y 2018, alcanzando los USD\$75 billones en 2018 [18].

En la actualidad, el consumo de nutracéuticos se concentra en Europa y Norteamérica, y los ingredientes se importan principalmente desde Asia y América Latina (Brasil).

Comercialización del maqui

Hoy en día, en la industria nutracéutica existe un creciente interés en torno a productos con propiedades antioxidantes, entre los cuales destaca el maqui debido a su alto contenido de antocianinas en comparación a otros *berries* [4, 17].

Catalogado como un producto *premium* y de *delicatessen*, el maqui es reconocido como un alimento exótico y atractivo, siendo posible encontrarlo en diferentes formatos: jugos concentrados, mermeladas, licores, deshidratados, pulpas congeladas y extractos en líquido y polvo [19]. Debido esto, los frutos de *A. chilensis* son altamente requeridos por los mercados extranjeros, reflejándose en un alza de su demanda a nivel mundial, que en cinco años creció casi 7.000%, aumentando de 733 kg en el año 2006 a más de 50 ton en 2011 [19].

De acuerdo a la empresa Maqui New Life, en Chile se recolectan aproximadamente 170 toneladas de maqui al año, con un máximo de 400 ton/año en temporadas con un clima favorable, lo cual está muy lejos de las 600-800 ton/año que se proyectan como demanda del producto para el año 2020 [20].

Actualmente, el valor del maqui oscila entre USD\$0,65 y USD\$1,5 por 100 g de fruto fresco [21]. Según la Fundación Chile, el mercado potencial del maqui ascendería a USD\$600 billones a nivel de nutracéuticos y convencionales [22].

Producción *in vitro* de antocianinas

En la literatura es posible encontrar un vasto número de patentes que describen estrategias biotecnológicas aplicadas a la generación *in vitro* de antocianinas, lo cual refleja el creciente interés que existe en establecer una producción a gran escala de estos compuestos [7].

La producción de antocianinas ha sido reportada en cultivos celulares de materiales comestibles como uva, papa dulce, zanahoria, fresa y arándano, principalmente para su uso como pigmentos [7, 23]. Pero el establecimiento de estos sistemas utilizando *A. chilensis*, para la obtención de estas moléculas con fines nutracéuticos, sólo ha sido recientemente estudiado a escala de laboratorio [20].

En la actualidad, las antocianinas del maqui se obtienen a partir de los frutos frescos de esta planta, los cuales son recolectados desde los bosques nativos y luego, son macerados y sometidos a un proceso de extracción de las moléculas de interés. De esta manera, a partir de 50 ton de materia prima, es posible obtener tan sólo 2 ton de un extracto estandarizado del fruto [24].

Utilizando la estrategia anteriormente descrita, en el año 2010 el Consorcio de Tecnología e Innovación en Salud (CTI Salud), conformado por la Universidad Austral de Chile, la Universidad de Concepción, la Universidad de la Frontera, Farminindustria S.A., Instituto Leloir, Southern Technology Group S.A. y Vitrogen S.A., junto con el laboratorio italiano Indena, dio a conocer el primer extracto estandarizado de fruto de maqui a nivel mundial, Maqui Select, para su incorporación en distintas preparaciones farmacéuticas y alimenticias. Sin embargo, ante la escasez

de la planta, se requirió el inicio de un cultivo piloto de esta especie vegetal, abarcando una superficie de media hectárea en Lanco y proponiéndose su expansión gradual [24].

1.2 Descripción del proyecto y justificación

El escenario actual de la industria nutracéutica ofrece grandes oportunidades de crecimiento para los diversos actores que participan de ella [18]. En particular, representa una gran instancia para la comercialización del maqui, debido al valor agregado que le confieren sus distintas propiedades farmacológicas y su condición de endemismo [6]. Sin embargo, la producción comercial de esta planta, para uso medicinal o nutracéutico, se encuentra en una etapa temprana de desarrollo en Chile, enfrentando problemas relacionados con la falta de disponibilidad de la tecnología apropiada para desarrollar un proceso productivo como una especie cultivada, así como para recolectar el fruto desde áreas silvestres y procesarlo industrialmente. De esta forma, la falta de cultivos comerciales y la irracional explotación de los nativos, frente al auge comercial del maqui, podría poner a esta especie y sus bosques en una situación vulnerable [4].

Ante este contexto, se propone generar una estrategia para potenciar la síntesis de antocianinas de *A. chilensis* a partir de cultivos *in vitro* de células vegetales provenientes de esta planta. De esta manera, se busca prescindir de la explotación de los cultivos de maqui y favorecer la producción de estos fitoquímicos en un ambiente controlado e inducible, obteniéndose un producto estandarizado para satisfacer la creciente demanda por estos compuestos.

En comparación al proceso tradicional de tratamiento del maqui, el uso de cultivos celulares en suspensión a gran escala tiene el potencial de disminuir los costos significativamente y prescindir del material vegetal y la estacionalidad de su fructificación [7].

Considerando el precio de venta, el número limitado de fuentes efectivas para la obtención de antocianinas del maqui y el interés económico que tiene este producto, el desarrollo de nuevas tecnologías que faciliten la explotación comercial de estas moléculas, utilizando cultivos celulares vegetales *in vitro*, es una alternativa atractiva frente al procedimiento de extracción convencional. Además, esta metodología podría permitir la producción de antocianinas con las propiedades de aplicación deseadas [7].

El proyecto presentado en este informe es una instancia de colaboración entre el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor y el Departamento de Ingeniería Civil Química y Biotecnología de la Universidad de Chile, enmarcado en una iniciativa CORFO I+D Línea 2. A través de él, se busca estudiar distintas estrategias de producción *in vitro* de antocianinas del maqui en cultivos celulares de esta especie, con miras a concebir un proceso con alcances a escala comercial.

Para iniciar la investigación, se ensayaron distintas combinaciones hormonales, medios basales y otros factores de cultivo para el mantenimiento de callos de células de maqui, con el objetivo de identificar y seleccionar las condiciones de crecimiento adecuadas para la generación de biomasa y, de manera independiente, la acumulación de antocianinas.

Posteriormente, se estudió el crecimiento de células de maqui en cultivos en suspensión, inoculados con callos escogidos desde la etapa de experimentación previa, y se evaluó el efecto de elementos precursores y elicitores en la producción de antocianinas en estas suspensiones celulares.

Finalmente, se concibió una estrategia de producción *in vitro* de antocianinas en cultivos celulares a escala comercial, definiendo las mejores condiciones de cultivo e inducción de las células de *Aristotelia chilensis* para este fin, en base a los diversos factores estudiados. Este proceso se evaluó técnica y económicamente para determinar la factibilidad de su implementación.

1.2.1 Alcances y limitaciones

La investigación desarrollada pretende entregar una estrategia factible para la producción a escala comercial de preparados ricos en antocianinas, a partir de cultivos celulares *in vitro* de *Aristotelia chilensis*.

Cabe destacar que éste es un estudio de optimización a nivel de laboratorio, teniendo en cuenta variables y posibles equipos para un escalamiento del proceso, pero en ningún caso se busca, por ejemplo, diseñar u optimizar equipos, o hacer un pilotaje del proceso.

En definitiva, se espera contribuir a la producción de preparados estandarizados ricos en antocianinas para la producción de fármacos, nutraceuticos y alimentos funcionales, satisfaciendo parte de la creciente demanda por estos compuestos y contribuyendo a la conservación de los especímenes naturales de maqui.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar estrategias de producción masiva de antocianinas en células de *Aristotelia chilensis* con miras a un escalamiento de producción comercial.

1.3.2 Objetivos específicos

- Estudiar el crecimiento y multiplicación de células de *Aristotelia chilensis* cultivadas en callos y en suspensión.
- Estudiar el efecto de diversos métodos de inducción en la producción de antocianinas en cultivos celulares de *Aristotelia chilensis*.
- Evaluar comparativamente los distintos sistemas de cultivo e inducción para la producción de antocianinas en células de *Aristotelia chilensis*.
- Concebir una estrategia de producción *in vitro* de antocianinas de *Aristotelia chilensis* a escala comercial.

1.4 Marco teórico

A continuación, se abordan distintos conceptos relacionados con el establecimiento y proliferación de cultivos vegetales y la producción de antocianinas *in vitro*, además de describir los factores que influyen en estos procesos.

1.4.1 Cultivo de tejidos vegetales

Para lograr sintetizar un metabolito vegetal secundario *in vitro*, primero se debe generar una estrategia que permita multiplicar, de manera óptima, un gran número de células capaces de producir el compuesto de interés. Al respecto, dos conceptos son centrales al momento de iniciar un cultivo celular vegetal: plasticidad y totipotencialidad [25, 26].

La plasticidad hace referencia a la capacidad que tienen las células vegetales de alterar su metabolismo, crecimiento y desarrollo para adaptarse de la mejor forma posible al medio en donde se encuentran. En particular, esto se refleja en la habilidad que tienen para iniciar la división celular a partir de cualquier tejido de la planta y de regenerar órganos perdidos como respuesta a estímulos específicos. Cuando células y tejidos vegetales son cultivados *in vitro*, exhiben un alto grado de plasticidad, lo que permite que un tipo de tejido u órgano sea iniciado a partir otro, siendo posible incluso regenerar una planta completa. La regeneración de un organismo se puede lograr bajo los estímulos correctos, gracias a que las células vegetales son capaces de expresar la totalidad del potencial genético de una célula madre. Esto se denomina totipotencialidad [25].

Condiciones de cultivo

Al momento de desarrollar un cultivo *in vitro* se deben asegurar que tanto las necesidades químicas como físicas de las células vegetales sean satisfechas. El medio basal de crecimiento debe suministrar lo esencial para su adecuado crecimiento y desarrollo, como iones minerales y agua. También, de acuerdo a las características del cultivo, se deben adicionar algunos suplementos orgánicos, como vitaminas y aminoácidos; algún agente gelificante, si se trata de un medio sólido; y una fuente de carbono, en el caso de células no fotosintéticas, que se agrega en forma de azúcar, generalmente sacarosa. Además, los factores físicos como temperatura, pH, presión osmótica, luz y gases, deben ser controlados y mantenidos en límites aceptables, los cuales son específicos para cada cultivo [25].

Los medios basales que se utilizan comúnmente para cultivos vegetales son Murashige y Skoog (MS), Gamborg (B5) y Schenk y Hildebrandt (SH). Estos tres medios tienen una composición similar, que se caracteriza por tener un alto contenido de sal [25].

Debido a que los cultivos vegetales son plásticos y totipotentes, su desarrollo y crecimiento se puede dirigir directamente manipulando la composición de su medio de cultivo. Para este fin, generalmente se utilizan fitohormonas o algún análogo sintético. En este sentido, la adición o ausencia de reguladores de crecimiento es crítica [25].

Los reguladores de crecimiento utilizados en los cultivos celulares vegetales se clasifican en cinco grupos principales: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno [25]. A continuación, se describen brevemente:

- Las auxinas promueven tanto la división como el crecimiento celular. La auxina más abundante en la naturaleza es el ácido indolacético (IAA); sin embargo, no se utiliza frecuentemente en los cultivos celulares vegetales debido a que es inestable tanto a la exposición al calor como a la luz. En su lugar, se utilizan auxinas sintéticas como el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) [25].
- Las citoquininas inducen la división celular y controlan la morfogénesis [25, 27]. Su efecto es aún más notorio en los cultivos celulares cuando se añade junto con alguna auxina [27]. Debido a que sus variantes naturales más abundantes son caras e inestables, se prefiere el uso de sus análogas sintéticas, kinetina (KIN) y benziladenina (BAP) [25].
- Las giberelinas están involucradas en la regulación de la elongación celular [25]. Además, participan en la promoción de la germinación de las semillas y el desarrollo de los frutos [28]. Pocas de estas fitohormonas son utilizadas en los medios de cultivo, debido a que no se encuentran disponibles comercialmente [25, 28].
- El ácido abscísico (ABA) inhibe la división celular, por lo que es comúnmente utilizado en el cultivo de tejidos vegetales para promover ciertas vías de desarrollo, como la embriogénesis somática [25, 28].
- El etileno se encuentra de forma gaseosa en la naturaleza y se asocia principalmente con la regulación del crecimiento de las plantas [25, 28]. De acuerdo a la especie, este compuesto puede tener distintos efectos sobre su desarrollo [28]. No se utiliza comúnmente en medios de cultivo, sin embargo, algunas células vegetales producen etileno, el cual puede inhibir el crecimiento y desarrollo del cultivo si alcanza niveles suficientes [25].

Cabe destacar que, si bien el efecto de estos compuestos es generalizable, también es posible obtener diferentes respuestas en distintas especies vegetales, ante la acción de algún regulador de crecimiento, e incluso en una misma especie bajo distintas condiciones de cultivo [25].

Entre las distintas fitohormonas, las auxinas y citoquininas son las más utilizadas como reguladores de crecimiento en cultivos de tejidos vegetales. Normalmente, se aplican de manera conjunta y la razón entre estos compuestos determina el tipo de cultivo que se va a establecer. Una concentración alta de auxina, en comparación a citoquinina, favorece la formación de raíces; mientras que al revés, prevalece la formación de hojas. Una concentración similar de ambas hormonas induce la formación de callos [25, 26]. Aun así, existe evidencia que lo anterior no se cumpliría para todas las especies vegetales. Por ejemplo, cultivos de callos, iniciados con material proveniente del arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon Ait*), se establecieron efectivamente en medio Gamborg al cual se le añadieron tres fitohormonas en distintas concentraciones (NAA; 2,4-D y KIN) [23].

Tipos de cultivos: callos y cultivos en suspensión

Algunos de los cultivos más utilizados al momento de querer proliferar células vegetales son los callos y las suspensiones celulares. Estos sistemas pueden ser iniciados desde piezas estériles provenientes de una planta entera, denominados explantes, o a partir de células provenientes de otro cultivo. Como explantes se pueden utilizar hojas, embriones y cotiledones, entre otros órganos o parte de ellos. Es sabido que muchos aspectos del explante pueden afectar la eficacia de la iniciación del cultivo, como por ejemplo la edad de éste [25].

La palabra ‘callo’ hace referencia a una masa celular vegetal desorganizada y mayormente totipotente, la cual puede ser generada a partir de una célula diferenciada. Bajo ciertas condiciones, que se describen más adelante, las células de callo pueden ser sometidas a embriogénesis somática, proceso mediante el cual se obtienen embriones a partir de células somáticas adultas. Debido a esto, se considera que algunos procesos de formación de callos involucran la desdiferenciación celular, ya sea a nivel morfológico como metabólico [25, 26].

El término callo puede incluir células con diferentes grados de desdiferenciación, siendo posible clasificarlos en distintos grupos de acuerdo a sus características macroscópicas. Aquellos sin regeneración de órganos aparente son llamados callos friables o compactos. Los primeros son suaves, se quiebran fácilmente y sus células se encuentran débilmente asociadas, mientras que los segundos se encuentran densamente agregados [25, 26]. Otros callos, que muestran algún grado de regeneración de órganos, son denominados de acuerdo al órgano que presentan, ya sean hojas (*shooty callus*), raíces (*rooty callus*) o embriones (*embryonic callus*) [26].

Una de las principales consecuencias de la desdiferenciación celular que ocurre en los callos es que la mayoría de estos pierden la capacidad de realizar fotosíntesis. Por ende, se vuelve fundamental añadir otros componentes a su medio de cultivo, como vitaminas y una fuente de carbono, junto con los nutrientes minerales que se utilizan usualmente. Aun así, la pérdida de esta habilidad, tan propia de los vegetales, permite desarrollar el cultivo de callos en oscuridad, lo que ayuda a evitar la inducción de la diferenciación celular por acción de la luz [25].

Los callos han sido ampliamente utilizados tanto en el desarrollo de investigaciones básicas como en aplicaciones industriales [26]. Como se describió anteriormente, estas estructuras se obtienen cuando el explante o el inóculo celular se cultiva en un medio apropiado, con alguna hormona citoquinina y otra auxina, en la razón 1:1, dando origen a una masa de células no diferenciadas que crecen y se dividen. Una vez que el cultivo se encuentra establecido, se puede mantener la proliferación celular transfiriendo el callo a medio fresco periódicamente [25, 26]. Sin embargo, en cultivos de largo plazo se ha observado que las células pierden la necesidad de ser suplementadas con auxinas o citoquinas. A este fenómeno se le denomina ‘habitación’ y es común en el cultivo de callos de algunas especies vegetales [25].

Los callos muchas veces se utilizan para iniciar cultivos en suspensión. Debido a la agitación, células individuales o agrupadas son liberadas al medio, las que bajo las condiciones apropiadas, continúan creciendo y dividiéndose, siendo necesario transferirlas a un cultivo fresco cada cierto tiempo. En estos casos, al establecer la suspensión celular usualmente se utiliza la misma composición que la aplicada en el cultivo sólido [25].

Para establecer un cultivo en suspensión, idealmente se prefieren los callos friables en lugar de los compactos, ya que sus características facilitan el desprendimiento de las células al medio líquido. Además, usualmente se utiliza un inóculo relativamente grande, de manera que el número de células liberadas aumente rápidamente. Sin embargo, un inóculo excesivo puede llegar a ser letal, ya que las células pueden secretar productos tóxicos en respuesta al daño o estrés celular ocasionado por el cambio de cultivo [25].

Los cultivos en suspensión se pueden mantener en matraces cónicos como cultivos *batch*, los cuales deben ser subcultivados de manera periódica en medio fresco. Esto resulta en la dilución de la suspensión y la iniciación de otro ciclo de crecimiento *batch*. El grado de dilución para subcultivar debe ser determinado empíricamente para cada cultivo, una dilución excesiva puede resultar en un periodo *lag* muy extenso o en la muerte de las células transferidas, en casos muy extremos. Durante el subcultivo de una suspensión celular pueden retirarse grandes agregados celulares [25].

Después de ser subcultivadas, las células comienzan a dividirse, aumentando la biomasa del cultivo hasta que los nutrientes en el medio se agotan y/o la concentración de subproductos tóxicos inhibe el crecimiento celular, alcanzando la fase estacionaria del sistema. En esta etapa, las células deben ser transferidas a medio fresco, ya que si se dejan durante mucho tiempo el cultivo morirá. Debido a esto, es muy importante conocer los parámetros del ciclo de crecimiento *batch* para la especie en cuestión [25].

1.4.2 Producción de antocianinas

La producción *in vitro* de antocianinas, para su uso como pigmentos, se ha logrado a partir de distintas especies vegetales. La mayoría de los sistemas desarrollados se basan en el uso de callos y cultivos en suspensión. Los estudios realizados en torno a este proceso evidencian que la biosíntesis de antocianinas se ve fuertemente influenciada tanto por factores físicos, ej. luz y temperatura, como por otros parámetros, entre ellos: la presión osmótica, la presencia de hormonas, la composición del medio basal y el estrés de nutrientes [7, 23].

La estabilidad de las antocianinas depende de numerosos factores, dificultando la producción comercial de estos compuestos en organismos vegetales. Por esta razón, la utilización de cultivos celulares es una alternativa atractiva que permite controlar tanto las condiciones químicas como físicas en que ocurre la síntesis de estos metabolitos secundarios, aumentando la productividad de este proceso [7, 29].

Para producir estos compuestos a gran escala y en condiciones *in vitro*, es importante entender su vía de biosíntesis. Diversos estudios han reportado que la producción de antocianinas en callos se caracteriza, inicialmente, por la aparición de puntos o manchas de color rojizo-rosado en la superficie de estas estructuras. El aislamiento mecánico y el repetitivo subcultivo de las células que generan este pigmento puede conducir a un aumento progresivo de la pigmentación, como se ha observado en cultivos de callo de *Cleome rosea* [7].

En la mayoría de los sistemas de cultivo *in vitro*, la acumulación de biomasa y la producción del metabolito secundario requieren de diferentes condiciones de cultivo, siendo necesario inducir

un cambio entre el estado de crecimiento al estado de producción del compuesto, limitándose así la eficiencia de estos sistemas para uso comercial [7]. A continuación, se revisan los distintos factores que permitirían modular la producción de antocianinas *in vitro*.

Factores físicos

La biosíntesis de antocianinas en tejidos vegetales se realiza en presencia de luz, ya sea porque se requiere o porque ésta mejora la producción. Esto se debe a que, en general, la acumulación de antocianinas ocurre como respuesta a una exposición prolongada a la luz roja, azul y UV. El efecto de la luz se expresa en la activación de diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis de estos compuestos, especialmente las enzimas fenilalanina amonía liasa (PAL) y chalcona sintetasa [7, 23]. Así, por ejemplo, se logró un aumento significativo en la acumulación de estas moléculas en cultivos de zanahoria mediante un tratamiento continuo con luz UV-A [7]. En el caso de la producción de pigmentos en callos de arándano, las antocianinas sólo se acumularon en los cultivos expuestos a la luz [23].

Si bien la luz es considerada un agente de control importante en la biosíntesis de antocianinas, se han establecido células productoras de antocianinas aclimatadas a ambientes oscuros a partir de algunas especies vegetales. El desarrollo de estas líneas celulares es económicamente rentable, aunque los cultivos establecidos en oscuridad pueden ser muy inestables y propensos a necrosarse y morir [7].

La temperatura es otro factor relevante para la producción *in vitro* de antocianinas, incluso ha sido indicado como el más influyente en la síntesis de antocianinas en especies como las uvas [7, 10]. Se ha observado que su valor óptimo varía para cada especie. En cultivos de callo de *Cleome rosea*, la máxima producción de pigmentos se obtuvo a 24 ± 2 °C, mientras que a temperaturas mayores ocurre el pardeamiento de los callos. Sin embargo, en callos de *Daucus carota* la producción óptima se alcanzó a 30 °C [7].

En un estudio, se observó que la temperatura también afecta de manera significativa la razón cianidina:peonidina en suspensiones celulares de *Ipomoea batatas*, causando la total supresión de la acumulación de compuestos derivados de peonidina a bajas temperaturas [7].

En otra investigación, realizada en Chile el 2013, se analizó el perfil de antocianinas de poblaciones de maqui de diferentes regiones geográficas del país. Los resultados revelaron que, en el centro de Chile, los frutos con mayor concentración de estos compuestos eran los que habían estado expuestos a mayores oscilaciones de temperatura durante su maduración. Un comportamiento similar se ha observado en uvas, donde la exposición a noches con bajas temperaturas (15 °C) resultó en una mayor concentración de antocianinas que en las uvas desarrolladas a una temperatura constante de 30 °C [10].

A pesar de que las temperaturas bajas parecen ser adecuadas para la producción de antocianinas en algunos casos, éstas pueden reducir el crecimiento celular. Para mejorar tanto el rendimiento de antocianinas como la acumulación de biomasa en cultivos en suspensión de células de fresa, Zhang y Furusaki proponen un cambio de temperatura de dos etapas, donde en la primera

etapa prevalece el crecimiento celular a alta temperatura y en la segunda, se induce la producción de antocianinas a baja temperatura [7].

La acumulación de antocianinas en cultivos celulares también es influenciada por el pH del medio. Los cultivos de fresa sometidos a un amplio rango de pH (entre 3,7 y 8,7), presentaron la mayor acumulación de estas moléculas a pH 8,7 después de nueve días de cultivo. Esto podría deberse a la actividad de la enzima PAL, la cual aumentaría a mayores valores de pH [7].

Otro aspecto importante a considerar es la agregación celular en los cultivos en suspensión, que se encuentra fuertemente influenciada por numerosos parámetros y, a menudo, determina el perfil de los metabolitos que se generan. El aumento de tamaño de los agregados puede causar la falta de luz en el centro de estos, además de restringir el suministro de oxígeno, generar una exposición diferenciada a los factores del microambiente y un gradiente de concentración local que podría alterar el crecimiento celular y la producción de antocianinas [7].

Factores químicos

La modificación de los nutrientes que componen el medio de cultivo es otra estrategia eficiente para inducir la producción de metabolitos secundarios en condiciones *in vitro* [7, 29].

El tipo y la concentración del azúcar que se agregue al medio de cultivo tienen fuertes efectos en la acumulación de antocianinas, ya que además de ser una fuente de carbono, en altas concentraciones actúa como un agente osmótico. La sacarosa es el azúcar más frecuentemente utilizado en cultivos *in vitro* y en la literatura se encuentran numerosas evidencias que ésta tiene una marcada influencia en la producción de antocianinas [7, 29].

Estudios realizados en cultivos de callo de arándano mostraron que la sacarosa en altas concentraciones era necesaria para inducir la concentración de antocianinas [23]. Sin embargo, la fructosa ha sido más eficiente para este fin en el cultivo celular de algunas especies vegetales, como por ejemplo de fresa y uva [7, 29].

En un estudio reciente, se reportó que para inducir la acumulación de antocianinas es esencial la presencia simultánea de sacarosa y ácido abscísico (ABA). En un cultivo celular de uvas, se observó que la síntesis de antocianinas en un medio con una alta concentración de sacarosa (10% en lugar de 2%) sólo ocurría con la adición de ABA. También, se concluyó que además de afectar la concentración de antocianinas, una alta concentración de esta azúcar aumenta la razón entre la concentración de delfinidinas y cianidinas [29].

Otra estrategia eficiente para la producción de antocianinas es la depleción de nutrientes. En los vegetales, la deficiencia de nitrógeno, fósforo y sulfuro, genera la síntesis de estos pigmentos en las células. Esto se debe a un mecanismo que tienen los organismos vegetales para evitar la sobreacumulación de carbohidratos en sus tejidos, previniendo desórdenes fisiológicos [7].

El efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la inducción de la síntesis de antocianinas es variable. Los cultivos de callo de *Glehnia littoralis* mantenidos en la presencia de NAA alcanzan casi el doble de contenido de estos compuestos en comparación a aquellos obtenidos

en la presencia de 2,4-D o IAA. De manera opuesta, NAA reprime la producción de antocianinas en callos de *Oxalis linearis*. En cultivos celulares de *Camptotheca acuminata*, el contenido de estas moléculas fue significativamente mayor en la presencia de KIN en comparación a BAP; mientras que la máxima productividad de antocianinas en callos de *Daucus carota* se observó en la presencia de NAA y KIN [7].

Se ha probado que la administración de la fitohormona 2,4-D en los medios de cultivo es esencial para favorecer el aumento de biomasa así como también la producción de antocianinas en cultivos de callo de diversas especies. Una investigación, desarrollada en cultivos en suspensión de células de zanahoria, reveló que existen dos genes que codifican para la enzima PAL. Uno de estos genes es inducido específicamente en la presencia de 2,4-D, mientras que el otro es activado de manera transiente y rápida ante condiciones de estrés [7].

En algunas especies vegetales también se ha demostrado que el aumento de la producción de antocianinas puede ser inducido por la interacción entre ciertos reguladores de crecimiento y la luz. Mientras algunos cultivos celulares sometidos a la presencia de luz alcanzan una alta producción de pigmentos en medios suplementados con 2,4-D; el uso de NAA fue más eficiente en cultivos mantenidos en oscuridad [7].

Cabe destacar que muchas veces las antocianinas generadas mediante tecnologías *in vitro* no son las mismas que se encuentran en las plantas cultivadas en el campo, aunque se utilicen células de la misma especie vegetal. Por ejemplo, los cultivos de callo de *Vitis* producen cianidina y peonidina, mientras que el pericarpio intacto del fruto contiene malvidina y peonidina. Diferencias en la composición de antocianinas bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* también han sido reportadas en fresa [7].

Factores elicitors

La elicitación es una herramienta biotecnológica que se aplica para mejorar la producción *in vitro* de metabolitos secundarios. Los elicitors son factores químicos y/o biológicos que pueden desencadenar una respuesta en organismos vivos, resultando en la acumulación de metabolitos secundarios. La eficiencia de este proceso depende del material vegetal, el tiempo de contacto y la concentración del elicitor. Estos factores pueden ser abióticos, como iones metálicos, compuestos inorgánicos e irradiación UV; o bióticos, provenientes de hongos, bacterias o virus [7].

Esta herramienta ha sido utilizada satisfactoriamente en la producción de antocianinas. Los elicitors frecuentemente utilizados para este fin son: filtrados de cultivo, metil jasmonato, ácido jasmónico, ácido salicílico, iones inorgánicos y exposición a luz UV [7].

La elicitación simultánea con ácido jasmónico e irradiación UV en cultivos en suspensión de *Vitis vinifera* resultó en un significativo aumento sinérgico de la acumulación de antocianinas, este hecho evidencia el potencial que conlleva integrar factores en este proceso [7].

Factores precursores

El uso de precursores es una alternativa eficiente para aumentar la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares vegetales. Esto se debe a que al suplementar al medio de cultivo con un intermediario de la ruta biosintética del compuesto de interés, la posibilidad de aumentar la síntesis del producto final es mayor. Esta metodología ha sido aplicada en la producción de antocianinas en cultivos celulares de distintas especies [7].

Entre los precursores más utilizados para la síntesis de antocianinas se encuentran los derivados del ácido cinámico, entre los cuales destaca L-fenilalanina, ya que es relativamente barato y más efectivo para la acumulación de estos pigmentos. En cultivos en suspensión de células de fresa se logró un aumento de un 81% en la productividad de antocianinas mediante la alimentación repetitiva de este compuesto [7].

2 Materiales y métodos

El trabajo desarrollado se conforma por cuatro etapas: 1) estudio de condiciones de cultivo de callos de células de maqui para la producción de biomasa y antocianinas; 2) evaluación de estrategias de producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares; 3) evaluación del efecto de factores elicitors y precursor en la producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares; y 4) concepción de una estrategia de producción de antocianinas del maqui con alcances a escala comercial. En el Anexo A se puede encontrar un diagrama de bloques con un resumen de las actividades desarrolladas en cada etapa señalada.

2.1 Material vegetal

Los callos iniciales de *Aristotelia chilensis* se obtuvieron desde el Núcleo de Plantas del Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor, donde su establecimiento y proliferación se realizó bajo distintas condiciones de cultivo, las que se detallan en la Tabla 2.1.1. En todos los casos, se utilizó sacarosa 3% y temperatura de incubación de 21 °C [20].

Tabla 2.1.1: Condiciones de cultivo del material vegetal inicial. Las componentes de cada tratamiento se indican con celdas grises.

Tratamiento	Medio		Fuente de explantes			Luminosidad		Hormonas [mg/L]	
	MS	B5	Embrión	Hoja	Cotiledón	L	O	2,4-D 2	KIN 1 NAA 1
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									

2.2 Reactivos y solventes

Los reactivos y solventes utilizados eran de grado analítico, excepto el peróxido de hidrógeno, de grado farmacéutico.

Los medios basales MS y B5 fueron adquiridos en PhytoTechnology Laboratories, al igual que las hormonas 2,4-D, KIN y NAA, la sacarosa, L-fenilalanina y el agar para plantas (grado de micropropagación). Los reactivos Trolox y DPPH se obtuvieron desde Sigma-Aldrich; los solventes metanol y etanol, desde Merck; y el cloruro de potasio y el acetato de sodio fueron adquiridos en Winkler. El peróxido de hidrógeno fue comprado en una farmacia local.

2.3 Estudio de condiciones de cultivo de callos de células de maqui para la producción de biomasa y antocianinas

2.3.1 Diseño Experimental

Se determinó el efecto de cinco factores sobre la producción de biomasa en callos de células de *Aristotelia chilensis* y la acumulación de antocianinas en los mismos. Las variables independientes que se consideraron son componentes de las condiciones de crecimiento de los cultivos *in vitro* de maqui: medio basal, luminosidad, concentración de sacarosa, fuente del explante y hormonas. En la Tabla 2.3.1 se identifican los niveles investigados para cada factor.

Tabla 2.3.1: Descripción y nomenclatura de los factores del diseño experimental.

Factor	Niveles	Nomenclatura
Concentración de sacarosa	30 g/L de sacarosa	3 / 3%
	60 g/L de sacarosa	6 / 6%
Medio basal	Medio Murashige y Skoog	MS
	Medio Gamborg	B5
Fuente del explante	Hoja	H
	Embrión	E
	Cotiledón	C
Luminosidad	En presencia de luz fluorescente blanca con fotoperiodo de 16/8 h	L
	En ausencia de luz.	O
Mezcla de hormonas	KIN 0,2 mg/L; NAA 0,1 mg/L	a / KIN 0,2 NAA 0,1
	KIN 1 mg/L; NAA 1 mg/L	b / KIN 1 NAA 1
	2,4-D 2 mg/L	c / 2,4-D 2
	2,4-D 3 mg/L; KIN 1 mg/L	d / 2,4-D 3 KIN 1

Para estudiar cómo repercuten estos factores en la generación de biomasa en callos de maqui, se establecieron 30 tratamientos, en duplicado, para los cuales se obtuvieron y estudiaron las curvas

de crecimiento celular (Tabla 2.3.2). El diseño experimental utilizado se construyó con el *software* de análisis estadístico JMP.

La producción de antocianinas se evaluó en un número mayor de tratamientos, que incluyó tanto las condiciones de cultivo de la Tabla 2.3.2 como aquellas establecidas durante el proceso de adaptación de los mismos. La acumulación de estos compuestos se determinó, a priori, mediante la observación de la pigmentación de los callos y posteriormente, con la medición de su contenido de antocianinas totales.

Tabla 2.3.2: Tratamientos establecidos en función del diseño experimental. Las condiciones de cultivo se indican con celdas grises. Ej.: 3MS.C.L.c indica sacarosa 3%, medio basal MS, explante de cotiledón, en presencia de luz y mezcla c de hormonas.

Tratamiento	Concentración de sacarosa		Medio basal		Fuente del explante			Luminosidad		Mezcla de hormonas			
	3%	6%	MS	B5	E	H	C	L	O	a	b	c	d
3MS.C.L.c	■		■					■				■	
3MS.C.L.a	■		■					■		■			
6B5.C.L.d		■		■				■					■
6MS.C.L.b		■	■					■			■		
3MS.C.O.d	■		■						■				■
3B5.C.O.b	■			■				■			■		
6B5.C.O.c		■		■				■				■	
6MS.CO.c		■	■					■				■	
6B5.C.O.a		■		■				■		■			
3MS.E.L.d	■		■		■			■					■
3B5.E.L.a	■			■				■		■			
3B5.E.L.b	■			■				■			■		
6B5.E.L.c		■		■				■				■	
6B5.E.L.b		■		■				■			■		
3MS.E.O.c	■		■						■			■	
3MS.E.O.b	■		■						■		■		
6B5.E.O.d		■		■					■				■
6MS.E.O.a		■	■						■	■			
6MS.E.O.b		■	■						■		■		
3MS.H.L.b	■		■					■				■	
6MS.H.L.c		■	■					■				■	
6MS.H.L.d		■	■					■					■
6B5.H.L.a		■		■				■		■			
6MS.H.L.a		■	■					■					
3B5.H.O.c	■			■					■			■	
3B5.H.O.d	■			■					■				■
3B5.H.O.a	■			■					■	■			
3MS.H.O.a	■		■						■				
6MS.H.O.d		■	■						■				■
6B5.H.O.b		■		■					■		■		

2.3.2 Adaptación y mantenimiento de los cultivos

A partir del material vegetal inicial, fue necesario adaptar callos que proliferaran bajo las condiciones de cultivo requeridas por el diseño experimental. Este proceso se realizó de manera discreta, modificando un factor de crecimiento cada 6 semanas. En la Tabla 2.3.3 se ilustra la secuencia de subcultivo que se utilizó para este fin. Cabe destacar que la fuente de explante es el único factor que no se puede intercambiar de nivel.

Tabla 2.3.3: Secuencia de adaptación del material vegetal inicial.

Secuencia de adaptación	Factor a modificar	Nivel inicial	Nivel final	Factores constantes
1°	Medio basal	MS (B5)	B5 (MS)	Sacarosa 3% Mezcla de hormonas Luminosidad
2°	Mezcla de hormonas	KIN 1 NAA 1	2,4-D 2	Sacarosa 3% Medio basal Luminosidad
3°	Luminosidad	Luz (Oscuridad)	Oscuridad (Luz)	Sacarosa 3% Mezcla de hormonas Medio basal
4°	Mezcla de hormonas	KIN 1 NAA 1 (2,4-D 2)	KIN 0,2 NAA 0,1 (2,4-D 3 KIN 1)	Sacarosa 3% Medio basal Luminosidad
5°	Concentración de sacarosa	3%	6%	Mezcla de hormonas Medio basal Luminosidad

Preparación de los medios de cultivo sólidos

Para elaborar 1 L de medio de cultivo sólido se pesaban 4,43 g de medio MS o 3,21 g de medio B5, según los requerimientos del tratamiento. El polvo se vertía en una botella de 1 L y se añadían 30 o 60 g de sacarosa, de acuerdo a la concentración final deseada, 3% o 6% respectivamente. Se agregaba agua destilada hasta completar el volumen final de 1 L y se ajustaba el pH del medio entre 5,6 y 5,8 con KOH 1 M. Luego, se añadían 7 g de agar para plantas a la solución, la que finalmente se autoclavaba durante 20 min a 120 °C.

Preparación de placas de cultivo con medio fresco

La preparación de placas Petri con medio de cultivo sólido fresco se realizaba en una campana de flujo laminar, previamente esterilizada con alcohol técnico y luz UV durante 15 min.

Primero, se esperaba que el medio de cultivo recién autoclavado, o derretido, disminuyera su temperatura hasta ser tolerable al tacto. Se vertían 50 mL de medio fresco en un tubo Falcon estéril, al que se le agregaba el volumen de hormonas necesario para lograr la concentración final deseada (el stock de las distintas hormonas utilizadas era de 1 mg/mL). Se mezclaba esta solución volteando el tubo Falcon de un lado a otro, unas cinco veces, y se añadían 25 mL del medio con hormonas por cada placa de Petri estéril. Por último, se dejaba gelificar el medio bajo el flujo de la campana, con la tapa de las placas parcialmente abiertas.

Las placas se conservaban selladas y refrigeradas a 4 °C, durante máximo 4 semanas.

Subcultivo de los cultivos de callos

Para iniciar un tratamiento con nuevas condiciones de crecimiento o mantener uno ya establecido, se utilizaba el siguiente protocolo de subcultivo de callos, el cual se desarrollaba en una campana de flujo laminar, previamente esterilizada con alcohol técnico y luz UV durante 15 min.

Se removía un callo crecido desde la placa de cultivo, utilizando pinzas estériles, y se depositaba en el interior de una placa de Petri de vidrio estéril. Se cortaba el callo en dos o más partes, de acuerdo al tamaño de la masa celular, utilizando un bisturí estéril, eliminando zonas oxidadas en caso de que existieran.

Los nuevos callos se disponían sobre el medio sólido fresco y eran aplastados levemente, abriendo parcialmente la placa hacia el interior de la campana. Se colocaban 3 a 4 unidades por placa y luego, ésta se sellaba con una lámina de Parafilm. El bisturí y las pinzas se esterilizaban con alcohol y fuego después de cada uso.

Las placas se incubaban volteadas, es decir, con la tapa en contacto con la superficie de reposo, en las condiciones de luminosidad deseadas y a 21 °C.

Para el mantenimiento de los cultivos, los callos se subcultivaban cada 4 - 6 semanas.

2.3.3 Evaluación de la producción de biomasa

Con el propósito de evaluar la producción de biomasa, se obtuvo la curva de crecimiento de los 30 tratamientos de la Tabla 2.3.2.

Inicio de la curva de crecimiento

Una vez adaptados los cultivos, se prepararon 3 placas Petri con medio sólido fresco para cada tratamiento, de acuerdo a los requerimientos de medio basal y hormonas de cada uno.

Cada curva se inició con el subcultivo de 6 callos, en duplicado, cuyos pesos iniciales (día 0) estaban entre 0,2 y 0,3 g; con una diferencia máxima de 0,05 g entre el más pesado y el más liviano, idealmente.

Este procedimiento requirió la instalación de una balanza al interior de la campana de flujo laminar. La zona de trabajo se esterilizó con alcohol técnico y luz UV durante 15 min.

Para cada tratamiento, se taró una placa con medio fresco en la balanza y se subcultivo un callo a ésta. Se pesó la placa con el callo para verificar si se cumplía con las restricciones de peso anteriormente descritas, reduciendo el tamaño del callo en caso de ser necesario. Esto se repitió hasta tener cuatro callos por placa con medio fresco, los que se identificaron con un número del 1

al 12, para facilitar el registro del peso inicial y final de cada masa celular. Luego, las placas se incubaron de acuerdo a las condiciones requeridas por el tratamiento.

Para registrar el día 0 de la curva de crecimiento, se tomaron dos callos adicionales desde el cultivo adaptado, se pesaron y fotografiaron. Su peso también debía cumplir con las restricciones mencionadas.

Los protocolos para adaptar callos a nuevos tratamientos, preparar placas Petri con medio fresco y subcultivar se detallan en la Sección 2.3.2.

Registro de los puntos de la curva de crecimiento

Cada 7 días, durante 5 semanas, se retiraron dos callos desde las placas de cultivo establecidas para cada tratamiento, con el protocolo de inicio de la curva de crecimiento. Para ello, en la campana de flujo laminar estéril, se seleccionaron y retiraron los callos desde la placa, utilizando pinzas y bisturí estériles. Los callos se dispusieron en una placa Petri tapada (no estéril) y se rotularon con su número y el nombre del tratamiento. El cultivo, con los callos restantes, se selló para continuar su incubación.

Los callos seleccionados se pesaron y fotografiaron. En el caso de la última semana de la curva de crecimiento (día 35), los callos se guardaron por separado en tubos Falcon, se congelaron con nitrógeno líquido y conservaron a -80 °C.

Es importante mencionar que los callos se mantuvieron en una placa tapada para impedir que se secaran por efecto del flujo de la campana, mientras se seguía el protocolo con otros tratamientos. De esta manera, el peso registrado no estaba afecto a errores por la disminución en el contenido de agua de la masa celular.

A partir de los datos de peso fresco de cada semana, se calculó el índice de crecimiento de los tratamientos como el promedio de los índices de los correspondientes callos recolectados (Ecuación 1), el cual se expresó en gramos de peso fresco por gramo de peso fresco inicial (g/g).

$$\text{Índice de crecimiento} = \frac{\text{Peso fresco día de recolección}}{\text{Peso fresco día 0}} \quad (1)$$

Finalmente, para cada tratamiento, se generó un gráfico semilogarítmico del índice de crecimiento respecto al tiempo y se determinó la velocidad de crecimiento celular diario (d^{-1}), a partir de la pendiente de la recta que ajusta a la curva obtenida.

2.3.4 Evaluación de la acumulación de antocianinas

La evaluación de la acumulación de antocianinas, en cultivos de callos de *Aristotelia chilensis*, se realizó en una secuencia de dos metodologías. Primero, se desarrolló un *screening* para determinar comparativamente los tratamientos que producían más de estos compuestos, mediante una valorización cualitativa de la pigmentación morada de las masas celulares; y luego,

se cuantificó el contenido de antocianinas totales de aquellos tratamientos seleccionados por su color, utilizando el método del pH diferencial.

Screening de la pigmentación de los callos

El *screening* se realizó sobre los tratamientos detallados en la Tabla 2.3.2 y aquellos establecidos durante el proceso de adaptación de los cultivos. En esta estrategia se utilizó como criterio de discriminación el porcentaje de coloración azul-morada de los callos, seleccionando los que poseen masas celulares completamente pigmentadas ya que se asocian a una mayor producción de antocianinas.

Extracción de antocianinas desde cultivos de callos

Se realizó la extracción de antocianinas de los tratamientos seleccionados, en duplicado. Para ello, los respectivos callos congelados se liofilizaron durante 72 h. La masa celular seca se cortó en trozos pequeños con un bisturí y se pesó.

En un tubo Falcon de 15 mL, se mezcló la masa seca con 5 mL de metanol acidificado (0,1% HCl) y se agitó vigorosamente durante 1 h en oscuridad. Posteriormente, se centrifugó el tubo por 15 min a 3.000 rpm y se recolectó el sobrenadante en otro tubo Falcon. Se agregaron 5 mL adicionales de metanol acidificado al residuo de la extracción y se agitó durante otra hora en oscuridad. Nuevamente se centrifugó el tubo por 15 min a 3.000 rpm y se juntó el sobrenadante con el separado anteriormente [13].

Los extractos de antocianinas se conservaron en tubos Falcon bien sellados a 4 °C en oscuridad.

Medición de antocianinas totales

La medición del contenido de antocianinas totales de los distintos tratamientos se realizó mediante el método del pH diferencial. Esta evaluación se realizó en triplicado para cada extracto de antocianinas. Además, se incluyeron dos controles positivos: fruto de maqui y estándar de cianidina-3-glucósido.

Para cada medición, se agregaron 360 µL del extracto de antocianinas en un tubo Eppendorf de 2 mL y 1.440 µL de la solución *buffer* pH 1,0 (cloruro de potasio 0,025 M). Análogamente, se agregaron 360 µL del extracto en un tubo Eppendorf de 2 mL y 1.440 µL de la solución *buffer* pH 4,5 (acetato de sodio 0,4 M). Se mezclaron las soluciones volteando dos veces los tubos y se dejaron reaccionar en reposo y oscuridad, durante 30 min. Posteriormente, se tomaron 100 µL de cada solución, los que se depositaron en una placa de espectrofotometría de 96 pocillos. Adicionalmente, se agregaron 100 µL de agua destilada para el blanco. Utilizando un espectrofotómetro, se midió la absorbancia del extracto a 515 nm y 700 nm en ambos *buffers* [13, 30].

El contenido de antocianinas totales (AT), expresado en miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido por litro (mg cia-3-glu/L), se calculó con las Ecuaciones 2 y 3 [30]. Los

resultados finales se expresaron como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido por gramo de peso seco (mg cia-3-glu/g PS).

$$A_{\text{final}} = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad (2)$$

$$AT = \frac{A_{\text{final}} \cdot PM \cdot DF \cdot 1000}{\epsilon \cdot l} \quad (3)$$

PM es el peso molecular de cia-3-glu; DF, el factor de dilución del extracto; ϵ , el coeficiente de extinción molar de cianidina-3-glucósido; y l es el *pathlength* de la placa de lectura.

Determinación de la capacidad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante de los tratamientos seleccionados mediante el método de captura del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de Von Gadow et al. (1997) con algunas modificaciones. Al igual que en la evaluación de AT, la medición se realizó en triplicado para cada extracto de antocianinas. Además, se incluyó el fruto de maqui como control positivo.

Primero, se preparó un stock de Trolox 500 mg/L en metanol acidificado (0,1% HCl) y una solución de DPPH 30 mg/L en etanol. Ambos se conservaron en oscuridad. A partir del stock de Trolox, se generaron 6 diluciones, en metanol acidificado, con las siguientes concentraciones: 50, 100, 200, 300 y 400 mg/L. Estas soluciones se utilizaron como patrones para obtener la curva de calibración de Trolox.

Para cada medición, se agregaron 1,9 mL de DPPH y 50 μ L de algún extracto de antocianinas o patrón de Trolox, en un tubo Eppendorf de 2 mL. Análogamente, se mezclaron 1,9 mL de etanol y 50 μ L de metanol acidificado para obtener el blanco; y 1,9 mL de DPPH y 50 μ L de metanol acidificado para medir la absorbancia del DPPH, que también equivale a medir el patrón 0 mg/L de Trolox. Las soluciones se mezclaron utilizando la micropipeta y se dejaron reposar 30 min en oscuridad. Posteriormente, se transfirieron 100 μ L de cada reacción a una placa de espectrofotometría de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 520 nm.

La capacidad antioxidante de las muestras y patrones de Trolox se determinó como el porcentaje de inhibición del radical DPPH, según la Ecuación 4.

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia Muestra}}{\text{Absorbancia DPPH}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

Finalmente, se construyó la curva de calibración como concentración de Trolox versus porcentaje de degradación de DPPH. Utilizando esta curva, se interpoló la capacidad antioxidante de los extractos evaluados, que se expresó en gramos equivalentes de Trolox por gramo de peso seco (g Trolox/g PS).

2.4 Evaluación de estrategias de producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares

2.4.1 Cultivos celulares en suspensión

Se diseñaron protocolos para el establecimiento, mantención y recolección de cultivos de células en suspensión generados a partir de callos provenientes de explantes de *Aristotelia chilensis*.

Preparación de los medios de cultivo líquidos

Para elaborar 1 L de medio de cultivo líquido se pesaban 4,43 g de medio MS o 3,21 g de medio B5, según los requerimientos de la suspensión celular. El polvo se vertía en una botella de 1 L y se añadían 30 o 60 g de sacarosa, de acuerdo a la concentración final deseada, 3% o 6% respectivamente. Se agregaba agua destilada hasta completar el volumen final de 1 L y se ajustaba el pH del medio entre 5,6 y 5,8 con KOH 1 M. Finalmente, la solución se autoclavaba durante 20 min a 120 °C.

Establecimiento de cultivos celulares en suspensión

Antes de iniciar las suspensiones celulares, se preparó el medio de cultivo líquido, con el mismo medio basal utilizado para crecer los callos seleccionados como inóculo, y se esterilizó matraces Erlenmeyer de 250 mL con deflectores, sellados con una lámina de polipropileno en su abertura.

Se instaló una balanza al interior de la campana de flujo laminar y se esterilizó la zona de trabajo con alcohol técnico y luz UV durante 15 min.

Se preparó, en un tubo Falcon de 50 mL estéril, 25 mL del medio de cultivo líquido con las hormonas correspondientes, de acuerdo al tratamiento del callo, y se vertió en un matraz estéril, el cual se flameó antes y después de agregar el medio.

Luego, se pesaron una placa de Petri de vidrio estéril y el matraz con el medio y se registraron ambos datos. Se removieron los callos a utilizar como inóculo, desde la placa de cultivo, utilizando pinzas estériles, y fueron depositados en el interior de la placa de Petri de vidrio estéril. Las pinzas y el bisturí se esterilizaron con alcohol y fuego, después de cada uso.

La placa con los callos se pesó en la balanza y se agregó o retiró masa celular hasta tener 3 g de ésta. Finalmente, utilizando un bisturí estéril, se disgregó la masa celular de los callos reservados en la placa y añadió el material al matraz, el cual se flameó antes y después de agregar el inóculo. El matraz se pesó y fotografió.

Cada tratamiento de cultivo celular en suspensión se generó en triplicado. Los matraces se incubaron en un *shaker* a 21 °C y 100 rpm, en las condiciones de luminosidad deseadas (el matraz se cubrió con papel aluminio en caso de requerir oscuridad).

Si bien se pesaron 3 g de callo en la placa de vidrio, el total inoculado se determinó como la diferencia del peso del matraz, antes y después de agregar la masa celular, ya que en el proceso ocurre la pérdida de material por adherencia a la placa de vidrio.

Subcultivo de células en suspensión

Antes de realizar la mantención de las suspensiones celulares, se preparaban los medios de cultivo líquido a utilizar y se esterilizaban matraces Erlenmeyer de 250 mL con deflectores, sellados con una lámina de polipropileno en su abertura.

El siguiente procedimiento se realizaba cada dos semanas, en una campana de flujo laminar, previamente esterilizada con alcohol técnico y luz UV durante 15 min.

Para cada suspensión celular, se preparaban y reservaban 25 mL de medio líquido fresco con las hormonas correspondientes, en un tubo Falcon estéril. Luego, se agitaba suavemente el matraz con el cultivo para desprender las células adheridas a la pared y se vertía su contenido en un tubo Falcon de 50 mL estéril, el cual se centrifugaba a 1.200 g durante 3 min a 21 °C. Posteriormente, se eliminaba el sobrenadante del tubo y las células se resuspendían con el medio de cultivo fresco reservado. Finalmente, el cultivo resuspendido se vertía en un matraz estéril, flameando su abertura antes y después de esto.

Los cultivos se incubaron en un *shaker* a 21 °C y 100 rpm, en las condiciones de luminosidad deseadas.

Recolección de biomasa desde las suspensiones celulares

Para recolectar la biomasa, generada en cada cultivo celular en suspensión, primero se rotularon tubos Falcon de 50 mL y se registraron sus pesos. El contenido de cada matraz con suspensión celular se vertió en uno o más tubos rotulados, de acuerdo al volumen del cultivo. Luego, los tubos se centrifugaron a 7.830 rpm durante 8 min a 21 °C y se eliminó el sobrenadante. Esto se repitió dos veces más, centrifugando 3 min y 1 min, respectivamente. Finalmente, se pesaron los tubos con el pellet. A este valor se le restó el peso registrado inicialmente, para obtener el peso fresco de la biomasa.

Los pellet se congelaron utilizando nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C.

2.4.2 Evaluación de la producción de biomasa

Con el propósito de evaluar la producción de biomasa, se calculó el rendimiento de cada cultivo celular en suspensión utilizando el índice de crecimiento de la Ecuación 1, para los pesos frescos iniciales y finales del cultivo.

2.4.3 Evaluación de la acumulación de antocianinas

La acumulación de antocianinas, obtenidas de cada suspensión celular, se comparó utilizando el valor de AT de cada cultivo, medido en triplicado mediante el método del pH diferencial como se explica en la Sección 2.3.4.

Para este tipo de cultivo celular, se ajustó un nuevo protocolo de extracción de antocianinas.

Extracción de antocianinas desde suspensiones celulares

Se realizó la extracción de antocianinas de los tratamientos evaluados en suspensiones celulares, en triplicado. Para ello, la respectiva biomasa recolectada y congelada se liofilizó durante 72 h.

La masa seca se pesó y se mezcló con 15 mL de metanol acidificado (0,1% HCl) en un tubo Falcon de 50 mL, el cual se agitó vigorosamente durante 1 h en oscuridad. Posteriormente, se centrifugó el tubo por 15 min a 3.000 rpm y se recolectó el sobrenadante en otro tubo Falcon. Se agregaron 5 mL adicionales de metanol acidificado al residuo de la extracción y se agitó durante otra hora en oscuridad. Nuevamente se centrifugó el tubo por 15 min a 3.000 rpm y se juntó el sobrenadante con el separado anteriormente.

Los extractos de antocianinas se conservaron en tubos Falcon bien sellados a 4 °C, en oscuridad.

2.5 Evaluación del efecto de elicitores y precursores en la producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares

2.5.1 Factores elicitores y precursores

Se evaluaron tres factores para aumentar la acumulación de antocianinas, dos elicitores, ácido clorhídrico y peróxido de hidrógeno, y un precursor, fenilalanina. El efecto de cada elemento se estudió por separado y en duplicado. Además, se generó un control negativo que consistió en el desarrollo de un cultivo celular en suspensión, sin la adición de estos elementos, en duplicado.

En función de lo anterior, se añadió HCl 1 M al cultivo durante su fase de acumulación de antocianinas, cada 3 días o en fecha de subcultivo, para disminuir progresivamente el pH y mantenerlo en torno a 3,7. En el caso de fenilalanina y peróxido de hidrógeno, el compuesto también se agregó al cultivo de manera intermitente, con la misma frecuencia antes señalada, en una concentración final de 1 mM y 4 mM, respectivamente.

Para este efecto, las suspensiones celulares se establecieron según la Sección 2.4.1.

2.5.2 Evaluación de la producción de biomasa

Con el propósito de evaluar la producción de biomasa, se calculó el rendimiento de cada cultivo celular en suspensión utilizando el índice de crecimiento de la Ecuación 1, para los pesos frescos iniciales y finales del cultivo.

2.5.3 Evaluación de la acumulación de antocianinas

La acumulación de antocianinas, obtenida en cada suspensión celular, se comparó utilizando el valor de AT de cada cultivo, medido en triplicado mediante el método del pH diferencial como se explica en la Sección 2.3.4. En este caso, se utilizó el protocolo de extracción de antocianinas detallado en la Sección 2.4.3.

2.6 Concepción de una estrategia de producción de antocianinas de maqui con alcances a escala comercial

A partir del análisis comparativo de los resultados obtenidos en las etapas anteriores, se propuso una estrategia de producción *in vitro* de antocianinas del maqui, con miras a una aplicación industrial.

Para evaluar técnicamente la estrategia, se estudió el proceso para un caso base equivalente a la obtención de las antocianinas contenidas en 1 kg de fruto de maqui, haciendo énfasis en los niveles y tiempos de producción.

Adicionalmente, se realizó una evaluación económica del proyecto, estimando los parámetros de economía potencial (Ecuación 5) e inversión inicial de capital.

$$\text{Economía potencial [\$]} = \text{Beneficios del producto} - \text{Costos de los insumos} \quad (5)$$

2.7 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizaron en el *software* Microsoft Excel, considerando un p-valor $< 0,05$ para indicar significancia estadística.

Se usó el test no paramétrico U de Mann Whitney para comparar las medias de las distintas pruebas realizadas. En general, el contraste se realizó respecto al tratamiento con mayor promedio entre los escenarios evaluados, para cada etapa de la presente investigación

En el caso de la comparación de las velocidades de crecimiento, obtenidas desde los distintos tratamientos aplicados al crecimiento de callos, se construyó un test de hipótesis apropiado para este fin.

3 Resultados y discusión

3.1 Estudio de condiciones de cultivo de callos de células de maqui para la producción de biomasa y antocianinas

3.1.1 Adaptación y mantención de los cultivos

Para generar el diseño experimental de la Tabla 2.3.2, se consideraron nuevas variables en las condiciones de cultivo de los callos de *Aristotelia chilensis*, respecto de las utilizadas en los tratamientos del material vegetal inicial [20]. Se añadió el nivel ‘concentración de sacarosa’, para evaluar su efecto sobre la producción de antocianinas del maqui, ya que en literatura se ha reportado que sería necesaria una alta concentración de azúcar para inducir la acumulación de estos compuestos en otros *berries* [23, 29]. En particular, se optó por sacarosa porque es comúnmente utilizada en cultivos vegetales [7]. Por otra parte, en el nivel ‘mezcla de hormonas’ se incluyeron la mezcla a (KIN 0,2 NAA 0,1) y la mezcla d (2,4-D 3 KIN 1). El primero porque se ha identificado como viable para la propagación de callos y tendría un menor costo asociado que la mezcla b; y el segundo debido a que ha sido efectivo para el establecimiento y multiplicación de callos a partir de hojas de *A. chilensis* [20, 31].

La adaptación de los callos se realizó de manera secuencial, modificando un factor a la vez, hasta obtener los tratamientos requeridos por el diseño experimental de la Tabla 2.3.2. Este proceso demandó de aproximadamente cuatro meses de incubación y subcultivo sucesivo del material vegetal inicial.

La mayor dificultad en el proceso de mantención de los callos de maqui fue el crecimiento de hongos al interior de las placas Petri. Sin embargo, la proliferación de estos microorganismos contaminantes se controló, principalmente mediante dos acciones: eliminando todo cultivo que evidenciara el crecimiento de hongos y disminuyendo el contenido de agua condensada en las placas. Para lograr esto último, se realizaba un breve procedimiento, en la campana de flujo laminar, que consistía en voltear la placa Petri cerrada, con la tapa hacia abajo, para acumular el exceso de agua en su superficie; luego, se abría la placa moviendo verticalmente la tapa y se eliminaba el agua; finalmente, se volvía a sellar. De esta manera, se logró disminuir progresivamente la aparición de hongos.

De los 30 tratamientos establecidos, según el diseño experimental, únicamente dos no proliferaron: 6MS.H.L.c y 6MS.H.L.d. En estos casos, la fuente del explante utilizado fue hoja y las condiciones de cultivo eran similares entre sí, con un alto contenido de sacarosa, presencia de luz, medio basal MS y hormona 2,4-D. Los callos, mantenidos bajo estas condiciones de crecimiento, se observaron de color café ennegrecido de manera permanente (Figura 3.1.1-A) y no aumentaron su biomasa durante el periodo de adaptación, por lo que su velocidad de crecimiento

se consideró nula. Se encontraron colores similares en los callos provenientes de hoja de otros tratamientos cultivados en oscuridad y utilizando la misma hormona (Figura 3.1.1-B), por lo que se deduce que 2,4-D no sería adecuada para la multiplicación de callos de maqui originados desde esa fuente de explante, en contraste con la información encontrada en bibliografía [31]. También se encontró evidencia de que esta hormona tampoco sería efectiva para la proliferación de callos generados desde otros explantes, cultivados en oscuridad (Figura 3.1.1-C). Lo descrito coincide con antecedentes que indican que los cultivos establecidos en sin luz tienden a necrosarse [7].

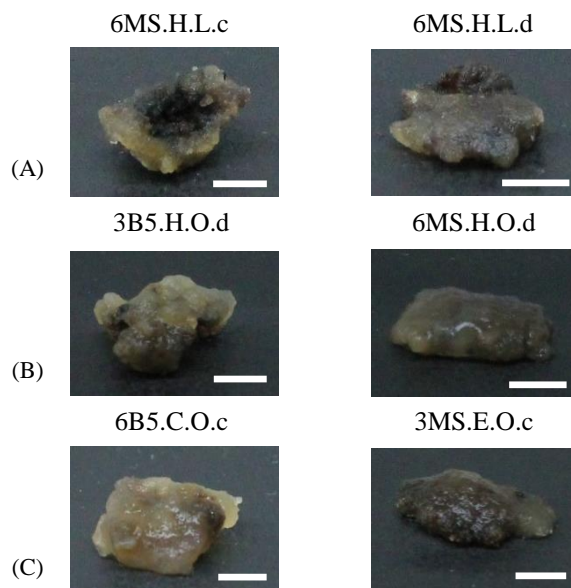


Figura 3.1.1: Cultivos de callo de *Aristotelia chilensis* con crecimiento deficiente. Tratamientos provenientes de hoja mantenidos con hormona 2,4-D en condiciones de (A) luminosidad y (B) oscuridad; (C) Tratamientos originados desde otras fuentes de explantes, conservados en presencia de 2,4-D en oscuridad. Barra 5 mm.

Se observó que los callos de *Aristotelia chilensis* incubados en oscuridad, utilizando KIN y NAA, tenían una pigmentación clara, variando entre los colores blanco y amarillo, independiente de los restantes factores de crecimiento. Mientras que los cultivos conservados en presencia de luz, con las mismas hormonas, eran mayormente verdes. Esto se puede explicar por la producción de clorofila en los callos expuestos a la luz, ya que este pigmento verde se encarga de absorber los cuantos lumínicos que se requieren en la fotosíntesis [32]. Sin embargo, en los tratamientos que consideraban la incubación con luz y hormona 2,4-D, se identificaron callos completamente pigmentados de morado, acorde a bibliografía, donde se describe que estos dos factores de crecimiento, y la interacción entre ellos, favorecen la acumulación de antocianinas, y por ende, la coloración morada de las células [7, 23]. En la Figura 3.1.2 se ejemplifican los tres escenarios.



Figura 3.1.2: Pigmentación de los cultivos de callo de *Aristotelia chilensis*. Ejemplo de tratamientos con callos de color (A) blanco: 3B5.H.O.a, (B) verde: 3B5.E.L.a y (C) morado: 3MS.E.L.d. Barra 5 mm.

En los callos de maqui de la mayoría de los tratamientos, se observaron pequeñas zonas coloreadas de rosado, burdeos o morado (Figura 3.1.3). Este fenómeno es característico del inicio de la producción de antocianinas en cultivos *in vitro* [7]. Sin embargo, en algunos casos esas pintas aparecieron y se expandieron tempranamente, mientras que en otros lo hicieron de manera más tardía. Así, por ejemplo, callos provenientes de cotiledón (3B5.C.L.c), que eran principalmente amarillentos con algunas células rosadas, se tornaron completamente de color morado en dos semanas, luego de cambiar las hormonas de la mezcla c (2,4-D 2) a la d (2,4-D 3 KIN 1). Mientras que otros callos, establecidos a partir de la misma fuente de explante y cultivados en condiciones similares al caso anterior pero con la mezcla b (KIN 1 NAA1), después de un mes bajo el efecto de la mezcla a (KIN 0,2 NAA 0,1) permanecieron del mismo color verde inicial y tan sólo unas pequeñas zonas café cambiaron a burdeos claro, las que recién al tercer mes se observaron más oscuras. Esto confirmaría la importancia del rol de la hormona 2,4-D en el proceso de inducción de la acumulación de antocianinas en las células de *A. chilensis*.



Figura 3.1.3: Inicio de la producción de antocianinas en callos de maqui. Tratamientos, con distintas fuentes de explantes y condiciones de crecimiento, mostrando pintas rosadas o burdeos: (A) 3MS.H.L.b; (B) 6B5.C.O.a; (C) 3B5.E.L.a. Barra 5 mm.

Profundizando respecto de la coloración de los callos, se observó que el tratamiento 3MS.E.L.d generaba algunos callos pigmentados parcialmente de morado y amarillo (Figura 3.1.4-A). Entonces, surgió la inquietud por saber si era posible generar un callo completamente morado a partir de un fragmento de la estructura del respectivo color. Para resolver esta pregunta, se cortaron dos trozos de uno de los callos descritos, cada uno de un color, los cuales se cultivaron utilizando las mismas condiciones de crecimiento que en la placa de origen, y se observó la evolución de su pigmentación (Figura 3.1.4-B). Se puede concluir que los dos callos subcultivados conservaron el color del inóculo inicial por, al menos, cuatro semanas, lo que indicaría que la diferenciación de las células productoras de antocianinas es estable. El registro de este efecto puede ser de gran utilidad para el desarrollo de una estrategia de producción de antocianinas de maqui, ya que permitiría realizar una selección de las células productoras de estos compuesto mediante aislamiento mecánico, de manera similar a como se ha reportado para callos de otras especies [7].

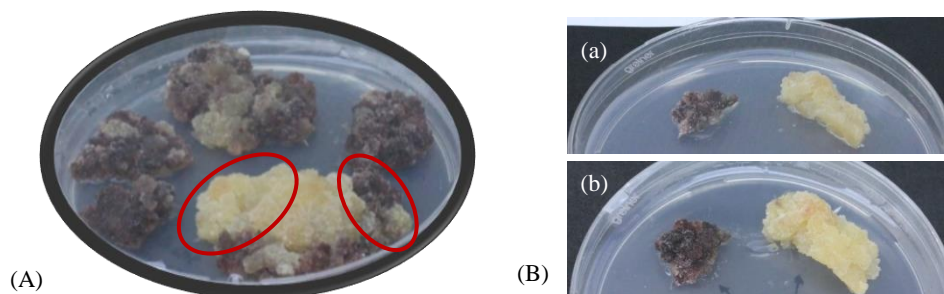


Figura 3.1.4: Aislamiento mecánico de células de maqui productoras de antocianinas. (A) Callo de 3MS.E.L.d parcialmente pigmentado de morado y amarillo (zonas señaladas con contorno rojo); (B) Proliferación de ambas zonas al (a) día 0 y (b) día 29.

Adicionalmente, se identificó que los cultivos de callo de maqui están sujetos al fenómeno de ‘habitación’ a las hormonas, cuando se han conservado durante un tiempo prolongado bajo un mismo tratamiento, como ocurre en otras especies [25]. Lo interesante es que no sólo el crecimiento de la estructura celular puede prescindir de la presencia de estos químicos, sino que también la capacidad de producción de antocianinas, confirmando que la diferenciación de estas células es estable. Esto se observó en dos tratamientos distintos, para los que se seleccionaron algunos callos, los cuales se subcultivaron bajo condiciones de crecimiento iguales a las del cultivo de origen pero en ausencia de hormonas. Uno de los tratamientos presentaba callos verdes y el otro, morados por acción de 2,4-D. La evolución de la pigmentación de estos se registró durante más de 10 semanas, observándose casi nulas variaciones respecto a la coloración inicial (Figura 3.1.5). Este hecho, al igual que el descrito anteriormente, podría favorecer una eventual estrategia de producción de antocianinas en cultivos *in vitro* de maqui, ya que la acumulación de estos metabolitos se mantiene aún en ausencia de las hormonas que indujeron su síntesis, siendo posible disminuir los costos del proceso. Desde el punto de vista molecular, lo observado indicaría que la acción de la hormona 2,4-D, sobre la producción de antocianinas, no es transitoria, a diferencia de lo que se ha registrado para otros reguladores de crecimiento, como ABA [9].

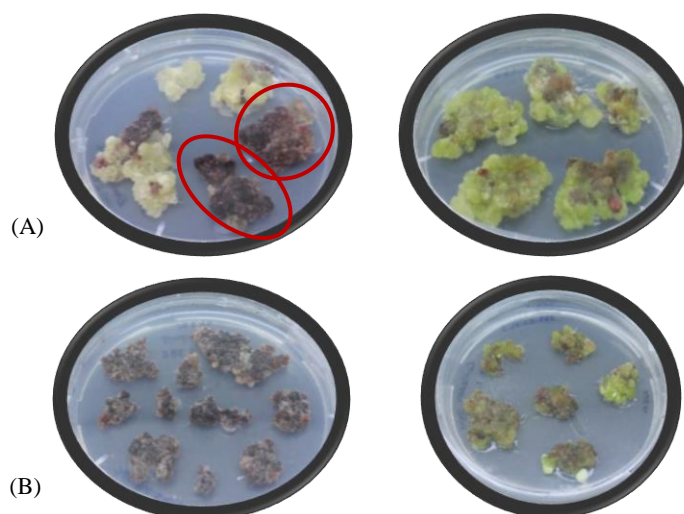


Figura 3.1.5: Habitación de los tratamientos de callo de maqui (A) Cultivos con hormonas; (B) Cultivos después de 12 y 16 semanas mantenidos sin hormonas, respectivamente. Para el cultivo morado se utilizaron los callos señalados con rojo.

Otro aspecto de interés para evaluar, relacionado con la producción de antocianinas en callos de células de maqui, o el posterior uso de estos en el establecimiento de suspensiones celulares, es la friabilidad de los cultivos. Al respecto, se identificaron algunas generalidades: los tratamientos que consideran el uso de la hormona 2,4-D junto con medio basal MS y sacarosa 3%, tanto para explantes provenientes de cotiledón como de embrión, determinan callos friables; mientras que para las mismas condiciones pero usando medio B5, se identificaron callos compactos. Lo cual es un indicio de que la hormona 2,4-D no es determinante al momento de generar un cultivo friable en *A. chilensis*, en contraste con lo establecido para otras especies vegetales [33]. Cabe destacar que el medio basal tampoco es un factor definitivo para manipular esta característica morfológica en maqui, ya que tanto en MS como en B5 se observaron callos compactos y friables.

Es importante mencionar que los callos compactos y friables tienen un comportamiento de crecimiento distinto, según lo registrado en la presente investigación. Se identificó que las estructuras compactas crecen de manera vertical, es decir aumentando su altura; a diferencia de las friables que lo hacen horizontalmente, aumentando su radio. Ambos crecimientos presentan distintas dificultades en la mantención de los tratamientos, ya que el primero requiere de placas más altas para no inhibir la proliferación por efecto del choque con la tapa y/o la reducción del callo mediante un corte transversal en el proceso de subcultivo; mientras que el segundo requiere de menos callos cultivados por placa, para que puedan expandirse sobre la superficie de ésta, y su división en dos o más estructuras en cada subcultivo, si fuera necesario.

3.1.2 Evaluación de la producción de biomasa

Para cada uno de los tratamientos establecidos, de acuerdo al diseño experimental de la Tabla 2.3.2, se determinó el índice de crecimiento semanal de los cultivos hasta el día 35 (Figura 3.1.6-A y Anexo B.1). Este valor muestra que, al aumentar el tiempo de incubación de los callos, ocurrió un incremento gradual en la biomasa de estos. Sin embargo, se registraron algunas excepciones. Entre ellas, se encuentran los tratamientos 6MS.H.L.c y 6MS.H.L.d que, como se mencionó en la Sección 3.1.1, no proliferaron durante su periodo de adaptación. Otros tratamientos mostraron una reducción de su biomasa inicial, como se puede observar en los casos de 3B5.H.O.d, 3MS.C.O.d y 3MS.E.O.c. Este fenómeno puede explicarse por la disminución del agua contenida en las estructuras celulares, ya que los tratamientos mencionados presentaban callos muy friables, cuyo contenido líquido es susceptible a las variaciones de la humedad y temperatura en la cámara de cultivo. A esto se sumó una baja proliferación celular porque, como se detalló anteriormente, los cultivos realizados en ausencia de luz y con la hormona 2,4-D se necrosaron.

Se obtuvo la curva de crecimiento semilogarítmica de los 30 tratamientos, la cual se ajustó a una recta, mediante el método de mínimos cuadrados en Excel (Curvas de crecimiento en Anexo B.2 y Figura 3.1.6-B). En general, en los gráficos generados se puede observar que el crecimiento de los callos de maqui no presentaría fase *lag* y, dentro de las 5 semanas evaluadas, no alcanzaría el estado estacionario; presentando únicamente una proliferación exponencial. El coeficiente de ajuste (R^2) de la mayoría de las regresiones realizadas es mayor a 0,90. Esto indicaría que no se puede descartar una relación lineal entre el logaritmo del aumento de la biomasa y el tiempo de cultivo (Anexo B.3), siendo posible afirmar que existe un crecimiento exponencial de las células de *A. chilensis* en los distintos tratamientos evaluados.

Inicialmente, la regresión lineal de las curvas de crecimiento se realizó permitiendo que la función de estimación determinara libremente el valor del intercepto de la recta. Teóricamente estos valores deberían ser iguales a cero, ya que el aumento de la biomasa es nulo en el tiempo inicial del registro. Si bien en la práctica esto no ocurrió, este parámetro en todas las rectas ajustadas era menor a 1, siendo la mayoría de las veces del orden de 10^{-2} . Por este motivo, se realizó un test de hipótesis para determinar si los interceptos calculados eran significativamente iguales a cero, llegando a la conclusión de que no es posible rechazar esta hipótesis nula, según un análisis estadístico. En función de ello, se reajustaron las curvas a rectas con intercepto en el origen. Las pendientes calculadas de este modo corresponden a la velocidad de crecimiento de los distintos tratamientos de callos de *A. chilensis* (Figura 3.1.6-C). Los resultados de las regresiones lineales y el test de hipótesis se encuentran en el Anexo B.3.

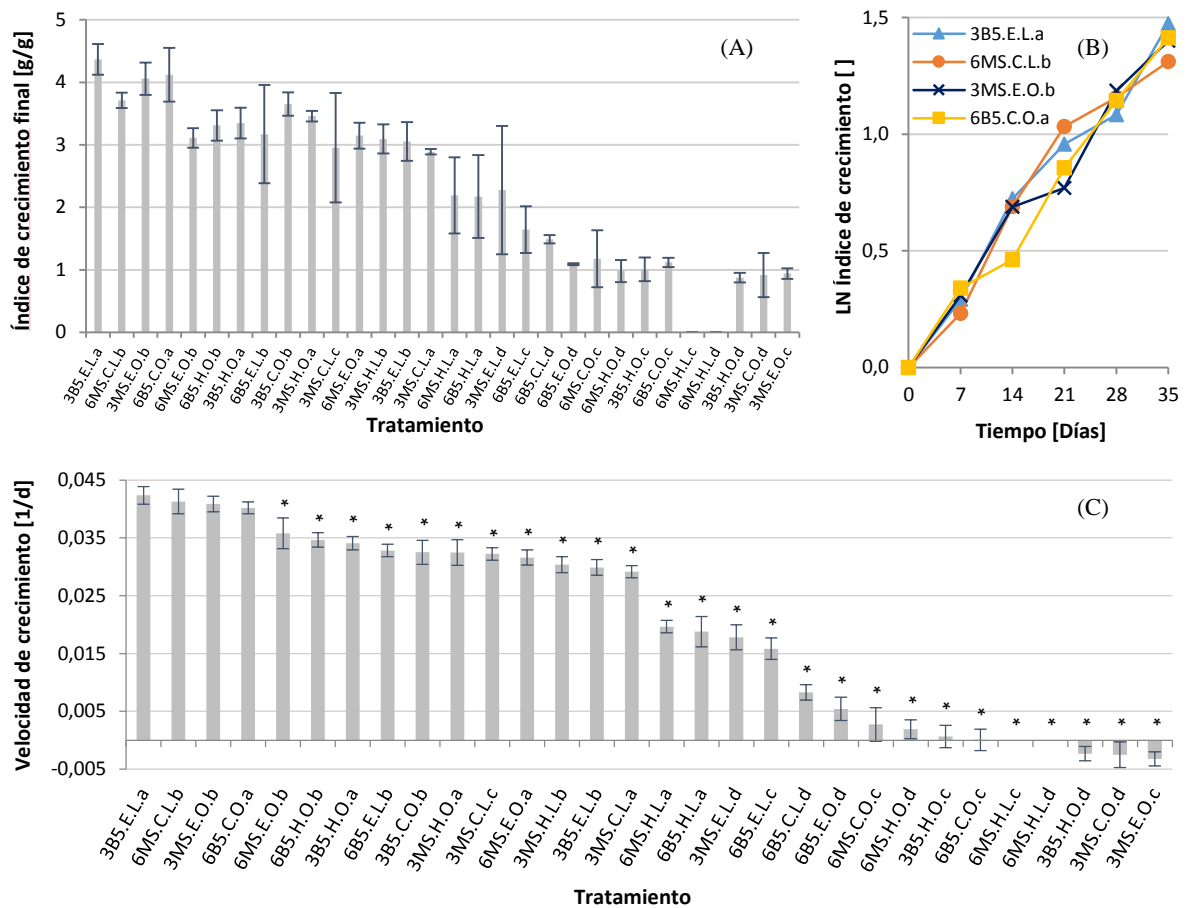


Figura 3.1.6: Efecto de las condiciones de cultivo en el crecimiento de callos de maqui. (A) Índice de crecimiento final; (B) curva de crecimiento (de los tratamientos con mayor proliferación); (C) velocidad de crecimiento de los tratamientos del diseño experimental. (*) indica una diferencia significativa respecto al tratamiento con mayor velocidad de crecimiento.

Para poder comparar estadísticamente las velocidades de crecimiento obtenidas, se diseñó un test de hipótesis que permitió determinar si, dentro de un conjunto de tratamientos, existía al menos uno cuya velocidad de proliferación fuera significativamente distinta a la del grupo analizado (Anexo B.4). De este modo, se logró concluir que no existe evidencia estadística que permita afirmar que las velocidades de crecimiento de 3B5.E.L.a, 6MS.C.L.b, 3MS.E.O.b y 6B5.C.O.a sean significativamente distintas entre sí, mientras que si lo son respecto de los restantes tratamientos (Anexo B.4). Por lo tanto, los cuatro tratamientos mencionados serían los más efectivos para la proliferación *in vitro* de maqui, ya que generan callos que crecen más rápido.

En la Figura 3.1.7 se puede apreciar el color y la estructura de los callos de *A. chilensis* pertenecientes a los cultivos con mayor velocidad de crecimiento. Es posible observar que su coloración muestra un inicio de producción de antocianinas pero en bajos niveles, ya que las estructuras son mayormente verdes o blancas.

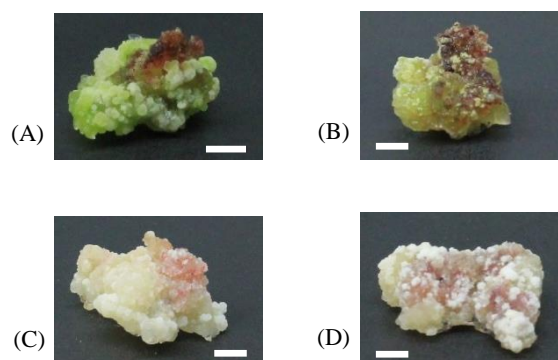


Figura 3.1.7: Tratamientos de callos de maqui con mayor velocidad de crecimiento. (A) 3B5.E.L.a; (B) 6MS.C.L.b; (C) 3MS.E.O.b; (D) 6B5.C.O.a. Barra 5 mm.

Se analizó estadísticamente el efecto de las distintas condiciones de cultivo de los callos de maqui sobre la proliferación de estos mismos. Para ello, en el *software* JMP se ajustó un modelo lineal con los resultados obtenidos para el diseño experimental de la Tabla 2.3.2, mediante una regresión de mínimos cuadrados. Las variables independientes, ajustadas en el modelo, son los factores de la Tabla 2.3.1, además de sus interacciones de segundo grado; mientras que la variable independiente es la velocidad de crecimiento de los distintos tratamientos establecidos. Los parámetros de evaluación del modelo indican que sus resultados son aceptables (Anexo B.5). El coeficiente de ajuste (R^2) obtenido es igual a 0,96 y, de acuerdo al análisis de la varianza, el modelo implementado es significativo, es decir, que los tratamientos estudiados si tienen un efecto sobre la velocidad de crecimiento de los callos de maqui. Además, el test de falta de ajuste indicaría que no es posible rechazar que este efecto sea lineal.

Tabla 3.1.1: Prueba estadística de los efectos. Las fuentes con efectos estadísticamente significativos se señalan con (*).

Fuente de efectos	Número de parámetros	Razón F	p-valor
Hormonas	3	212,7	< 0,0001*
Explante	2	30,16	< 0,0001*
Luminosidad	1	28,90	< 0,0001*
Medio basal	1	3,151	0,0848
Sacarosa	1	2,589	0,1169
Hormonas*Sacarosa	3	15,15	< 0,0001*
Hormonas*Medio basal	3	6,069	0,0020*
Hormonas*Explante	6	5,209	0,0007*
Hormonas*Luminosidad	3	38,05	< 0,0001*
Sacarosa*Explante	2	11,21	0,0002*

Según una prueba estadística de efectos, los siguientes factores serían significativos en la respuesta del modelo: hormonas, fuente de explante y luminosidad (Tabla 3.1.1). Si bien el medio basal y la concentración de sacarosa no afectarían directamente la velocidad de crecimiento, si participarían en interacciones de segundo grado que serían significativas sobre ésta. Cabe destacar que las interacciones de segundo grado explicativas del modelo involucran, en la mayoría de los

casos, al factor hormonas, confirmando las observaciones realizadas que señalan que estos químicos serían esenciales en el crecimiento celular de los callos de *A. chilensis*.

Los resultados obtenidos, del análisis de los parámetros del modelo (Anexo B.5), son consecuentes con el comportamiento observado en la curva de crecimiento de los distintos tratamientos, establecidos para la proliferación de callos de células de maqui. En general, las estructuras celulares provenientes de hoja registraron menores velocidades de crecimiento que aquellas procedentes de cotiledón y embrión; mientras que las mezclas a y b de hormonas destacan por estar presentes en todas las curvas con mayor crecimiento, esto es evidente en la Figura 3.1.6-C.

Los parámetros estimados para los términos del modelo permiten distinguir si el efecto de cada nivel del diseño experimental es positivo o negativo sobre el objetivo de maximizar la velocidad de crecimiento de los callos (Anexo B.5). Adicionalmente, permiten concluir cuáles son los factores e interacciones que tendrían una mayor repercusión sobre la proliferación de estos. Así, por ejemplo, la mezcla a de hormonas sería preferible, antes que las otras mezclas, para aumentar la biomasa; y la fuente de explante más favorable sería cotiledón, mientras la menos propicia podría ser hoja. Sin embargo, estos factores, considerados de manera aislada, no serían determinantes, ya que los parámetros de las interacciones evaluadas son un orden de magnitud mayor. Esto indica que la selección del conjunto total de condiciones de cultivo es fundamental, ya que las interacciones entre ellas pueden, en algunos casos, generar respuestas sinérgicas.

3.1.3 Evaluación de la acumulación de antocianinas

Para evaluar la acumulación de antocianinas en los cultivos de callos de maqui, primero se realizó un *screening*, identificando 8 tratamientos responsables de la proliferación de masas celulares completamente pigmentadas de color morado (Figura 3.1.8): 6B5.E.L.c, 3MS.E.L.d, 3MS.E.L.c, 3B5.E.L.d, 3MS.C.L.c, 6B5.C.L.d, 3B5.C.L.d y 3MS.C.L.d. Cuatro de estos tratamientos pertenecían al grupo establecido por el diseño experimental, mientras que los restantes se generaron en el proceso de adaptación de estos últimos. Es importante mencionar que este estudio se realizó de manera independiente a los resultados obtenidos de la producción de biomasa.

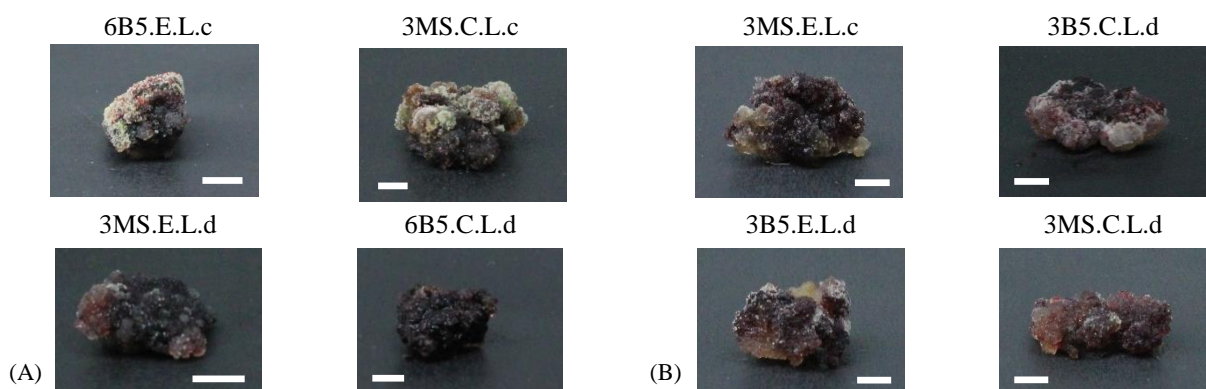


Figura 3.1.8: Tratamientos de callos de maqui con pigmentación morada en toda su estructura. Cultivos (A) pertenecientes al diseño experimental y (B) generados durante el proceso de adaptación de estos. Barra 5 mm.

Todos los tratamientos identificados incluían el uso de luz y hormona 2,4-D como condiciones de cultivo. Este resultado permite corroborar, una vez más, que estos factores serían efectivos e importantes para inducir la acumulación de antocianinas en las células de *A. chilensis*. Sin embargo, a diferencia de lo esperado, la alta concentración de sacarosa no sería determinante en la acumulación de estos compuestos, ya que se presenta un 6% de azúcar únicamente en dos de los seis tratamientos mencionados [7, 23, 29].

Se determinó el contenido de antocianinas totales (AT) de los tratamientos seleccionados en el *screening*, mediante el método del pH diferencial (Anexo C.1). En la Figura 3.1.9-A se puede apreciar que los callos de 3B5.C.L.d tiene el mayor contenido de AT, expresado en equivalentes de cianidina-3-glucosido por gramo de biomasa seca. Sin embargo, este valor no es significativamente distinto al de 3MS.C.L.d, 3MS.C.L.c, 3B5.E.L.d y 6B5.E.L.c, de acuerdo al análisis estadístico realizado.

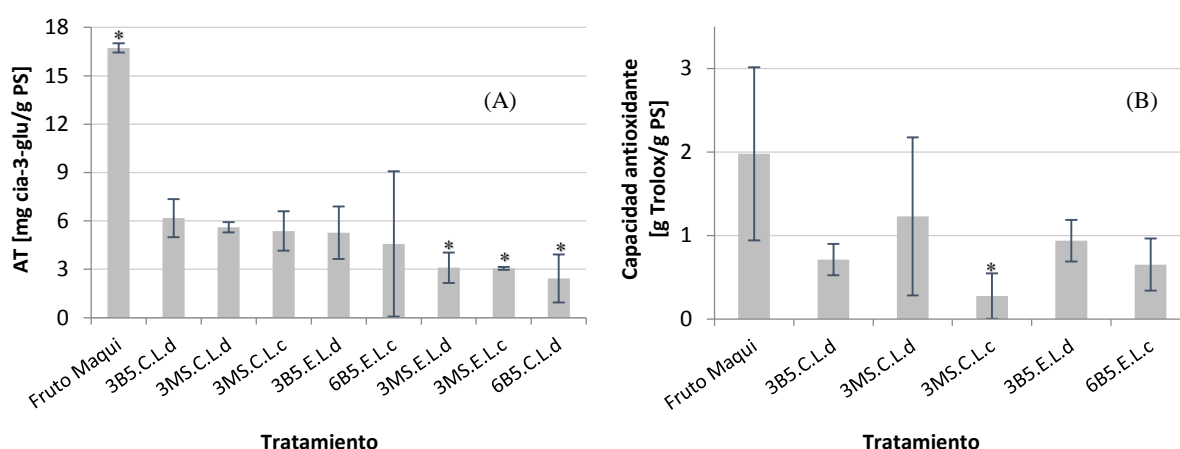


Figura 3.1.9: Evaluación de los extractos de antocianinas de los tratamientos con callos morados de maqui. (A) Contenido de Antocianinas Totales y (B) capacidad antioxidante. (*) indica una diferencia significativa respecto al tratamiento con mayor contenido de AT o capacidad antioxidante, según corresponda.

Para los cinco tratamientos con mayor contenido de AT, identificados desde la Figura 3.1.9-A, se evaluó la capacidad antioxidante de los respectivos extractos de antocianinas, mediante el método de DPPH (Anexo C.2). Si bien el fruto de maqui posee la mayor capacidad antioxidante al igual que de AT; para los cultivos de callos estudiados no existe una relación directa entre ambas variables (Figura 3.1.9-B). En otras investigaciones, ya se han reportado casos similares, observándose que en general la capacidad antioxidante tiene mayor correlación con el contenido de polifenoles totales que de antocianinas [13].

Para corroborar que era correcto utilizar el criterio de selección del *screening* y que no se estaba descartando estructuras celulares productoras de antocianinas, debido a una coloración distinta de la esperada, se midió el contenido de AT de cuatro callos no pigmentados de morado. Para ello, se seleccionaron un callo verde, uno color crema y dos callos, verde y crema, con pintas rosadas a burdeos. En general, los valores de AT medidos, en las estructuras menos pigmentadas, son de un orden de magnitud menor que el de los callos completamente morados, concluyendo que la metodología de *screening* es adecuada para el objetivo que se plantea (Anexo C.3).

Adicionalmente, se realizó el análisis de AT de un estándar de cloruro de cianidina, en distintas concentraciones, para evaluar la certidumbre de las mediciones (Anexo C.4). A partir de esto, se pudo concluir que el método es confiable, ya que permitiría estimar con un alto nivel de precisión el contenido de antocianinas presente en los extractos, sobre todo para soluciones con más de 5g/L de estos compuestos, registrándose errores de 3 a 13%. Es importante mencionar que en la evaluación de estos controles positivos, se registraron errores de sobre y subestimación, descartando un error sistemático en la aplicación del método.

Al contrastar el contenido promedio de AT que se midió para el fruto de maqui, con los registrados en literatura, se encontró una gran diferencia, de un orden de magnitud, ya que el valor del primero es 16,7 mg cia-3-glu/g PS mientras que el del segundo es 212 mg del-3-glu/100 g PS [15]. Algunos factores responsables de esta discrepancia podrían ser el ecotipo de las plantas de maqui desde donde provenían los frutos y el estado de madurez de estos últimos [10, 13]. Además, también puede afectar la eficiencia del protocolo de extracción utilizado en cada investigación.

Cabe destacar que el contenido de AT de los tratamientos de callos es menor a la del maqui (Figura 3.1.9-A). Sin embargo, los cinco cultivos con mayor acumulación de antocianinas alcanzaron casi un tercio de la contenida en el fruto. Esto es positivo desde el punto de vista del alcance de la estrategia que se desea proponer, ya que si bien se tiene una acumulación menor, ésta es del mismo orden de magnitud aún en ausencia de otros factores que podrían mejorar la producción de estos compuestos, como el uso de elicitores y/o precursores. Además, la producción *in vitro* de estos pigmentos se podría realizar durante todo el año, es decir, durante un periodo cuatro a cinco veces más extenso que el de recolección del fruto.

Por otra parte, como se había observado que los callos morados de *A. chilensis* están afectados al fenómeno de habituación hormonal, se quiso comparar cuantitativamente la acumulación de antocianinas en dos cultivos análogos, uno mantenido en presencia de hormonas y el otro sin ellas. Para este efecto, se utilizó el tratamiento 3B5.E.L.d que se caracteriza por la proliferación de callos morados, algunos de los cuales se subcultivaron y mantuvieron sin hormonas y otros, se conservaron en las condiciones originales del tratamiento. Luego de 15 semanas, periodo durante el cual se realizaron tres subcultivos, se evaluó el efecto de esta modificación. Mediante una mediación del contenido de AT, se encontró que los callos conservados sin hormonas habían logrado una mayor acumulación de antocianinas (en un 70%), lo cual no se había reportado previamente en literatura, siendo posible concluir que esta estrategia no sólo sería positiva desde el punto de vista económico sino que también desde el productivo (Anexo C.5). Una posible explicación de este hecho yace en el rol del regulador de crecimiento 2,4-D, ya que si bien es conocido por inducir la síntesis de antocianinas, también tiene algún efecto inhibitorio sobre el proceso de maduración de los *berries*, impidiendo que se alcance el estado morado oscuro en los frutos de maqui, el cual se caracteriza por la mayor acumulación de antocianinas [9, 13].

Sobre los resultados de habituación hormonal, adicionalmente se determinó que ambos tratamientos estudiados tenían un contenido de AT mayor al del fruto de maqui, siendo que en la Figura 3.1.9-A el mismo cultivo (3B5.E.L.d) consigna una producción un tercio menor que la *superberry*. Al respecto, es importante comentar que los callos utilizados para este efecto se recolectaron casi cuatro meses después que los restantes tratamientos analizados. Durante este periodo de tiempo, las estructuras celulares, cultivadas con y sin hormonas, estuvieron expuestas a

un shock térmico que alcanzó temperaturas sobre los 45°C, durante dos días. Es posible que este suceso haya afectado la acumulación de antocianinas, aumentado en ambos casos, pero principalmente en el cultivo sin hormonas. En particular, en literatura se reporta que el factor temperatura es relevante en la síntesis de estos compuestos en algunas especies [7, 10]. Sin embargo, para efectos de la presente investigación no se profundizó el análisis de estos resultados, debido a que no se cuenta con un registro de las variaciones de temperatura ocurridas durante el shock térmico en la cámara de cultivo. Sólo es posible mencionar que este hecho afectó de distinta manera a callos friables y compactos; debido al alto contenido de agua de los primeros, estas estructuras celulares fueron las más dañadas, ocurriendo su pardeamiento; mientras que muchos de los callos compactos no sufrieron deterioros notorios.

3.2 Evaluación de estrategias de producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares

3.2.1 Estrategia de producción de antocianinas en suspensiones celulares

En base a los resultados de la Sección 3.1, se propusieron dos estrategias de producción de antocianinas en células de *A. chilensis* en suspensión, constituidas por tres fases de cultivo consecutivas: A, B y C. Según se concibió, la Fase A tiene por objetivo aumentar la biomasa del cultivo celular, la Fase B es para inducir la producción de antocianinas y la Fase C, para lograr la acumulación de estos compuestos en condiciones de inocuidad, para el posterior consumo humano. La duración de las Fases A y B es de dos semanas, cada una, y de una semana para la Fase C; de esta manera el proceso completo contempla una extensión de 5 semanas, al igual que los tratamientos de callos evaluados (Figura 3.2.1).

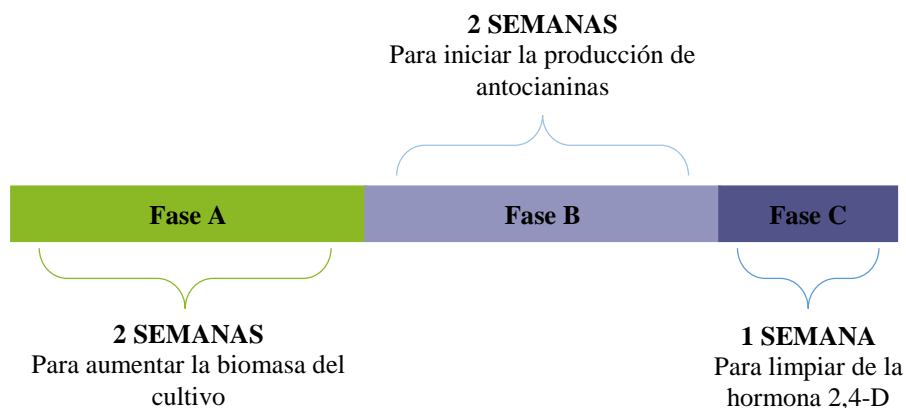


Figura 3.2.1: Descripción de las fases de cultivo de las estrategias de producción de antocianinas en células de *Aristotelia chilensis* cultivadas en suspensión.

Se generó este diseño en etapas porque el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios requieren de distintas condiciones de cultivo, siendo posible inducir cambios en los procesos metabólicos mediante la manipulación de la composición y concentración de los

nutrientes [7, 34]. A continuación se describen y discuten las características del medio de proliferación para cada fase propuesta, las cuales se resumen en la Figura 3.2.2.

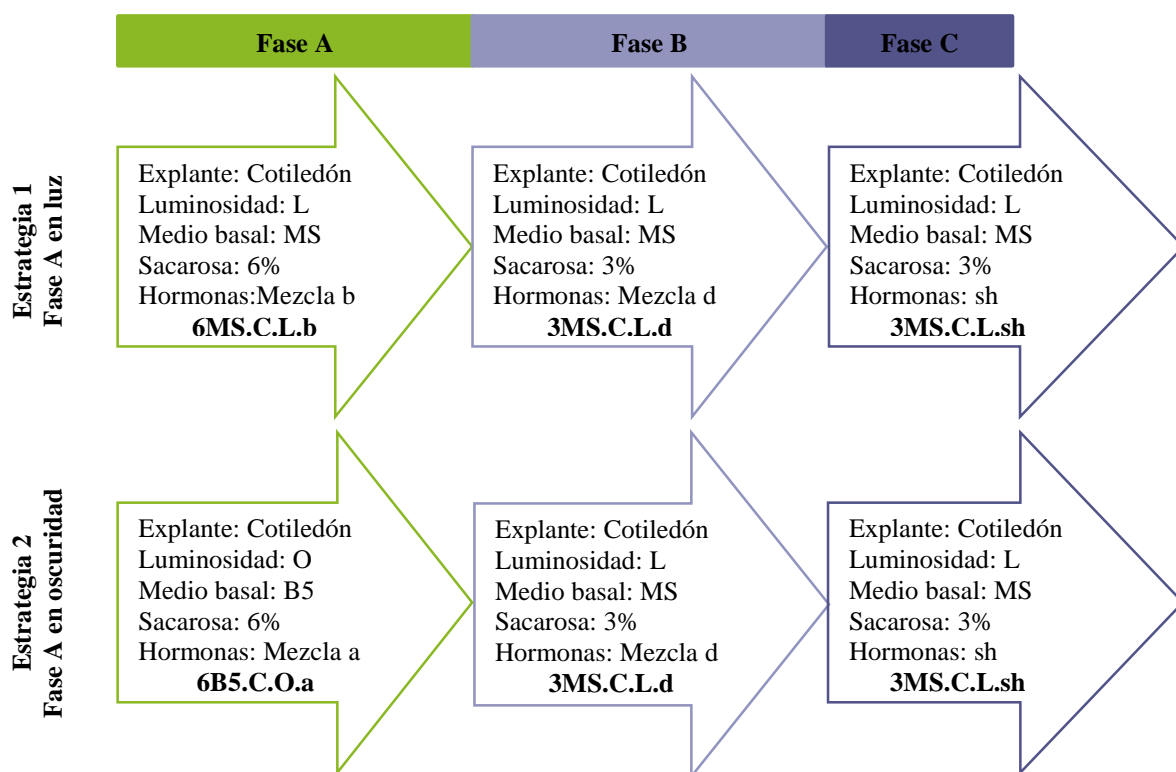


Figura 3.2.2: Diseño de las Estrategias 1 y 2 para la producción de antocianinas en células de *A. chilensis* cultivadas en suspensión.

Debido a que en la Fase A se busca aumentar la biomasa, se consideró asemejar las condiciones de cultivo de alguno de los tratamientos de callos de maqui que se caracterizaron por obtener la mayor velocidad de crecimiento (Figura 3.1.6-C): 3B5.E.L.a, 6MS.C.L.b, 3MS.E.O.b o 6B5.C.O.a. No obstante, el explante a utilizar también está sujeto a los requisitos de la Fase B, por lo que no se puede definir hasta este punto cuál de las opciones consideradas sería la óptima.

Considerando que la Fase B requiere inducir la producción de antocianinas, inicialmente se planteó utilizar los factores de cultivo del tratamiento 3B5.C.L.d, identificado por el mayor contenido de AT promedio en callos. Sin embargo, las masas celulares de este tratamiento se caracterizaron por ser compactas y esta cualidad no es deseable en un cultivo celular en suspensión, ya que favorece la formación de agregados celulares [25, 35]. Por ello, finalmente se optó por asimilar las condiciones de cultivo de 3MS.C.L.d, ya que éste permite la proliferación de callos friables con un contenido de AT que no es significativamente distinto al de 3B5.C.L.d.

La Fase C se concibió porque se ha reportado que el compuesto 2,4-D podría tener efectos nocivos en la salud humana [36]. Como, además, se tiene evidencia de que las células de maqui se habitúan al efecto de las hormonas y que la depleción de estos químicos podría aumentar la acumulación de antocianinas, se determinó que las condiciones óptimas de cultivo serían similares a las de la Fase B pero sin hormonas (abreviado como sh).

Finalmente, se decidió utilizar células de *A. chilensis* establecidas a partir de cotiledones de la planta. Dado que para la Fase A se plantearon dos tratamientos de callo que utilizan este explante, pero en presencia y ausencia de luz, respectivamente, se decidió evaluar dos estrategias de producción. La Estrategia 1 consideró el desarrollo de la Fase A en presencia de luz, mientras que la Estrategia 2 contempló la Fase A en oscuridad.

Desde el punto de vista económico, la Estrategia 2 tendría menos costos asociados al proceso de producción del metabolito que se desea, ya que no se requeriría luz para el cultivo en la Fase A, a diferencia de la Estrategia 1. Sin embargo, esta ventaja comparativa se debe sumar a un análisis del rendimiento de la producción de biomasa y acumulación de antocianinas en ambas estrategias, para determinar cuál es la mejor a nivel global. Para evaluar estos procesos, se establecieron los respectivos cultivos en suspensión de *A. chilensis*, utilizando callos de los tratamientos 6B5.C.O.a y 6MS.C.L.b como inóculos, según correspondiera. Inicialmente, las células se mantuvieron en un volumen de medio de cultivo igual a 25 mL, el cual se duplicó en el inicio de la Fase C debido a un notorio aumento de la densidad celular (Figura 3.2.3).

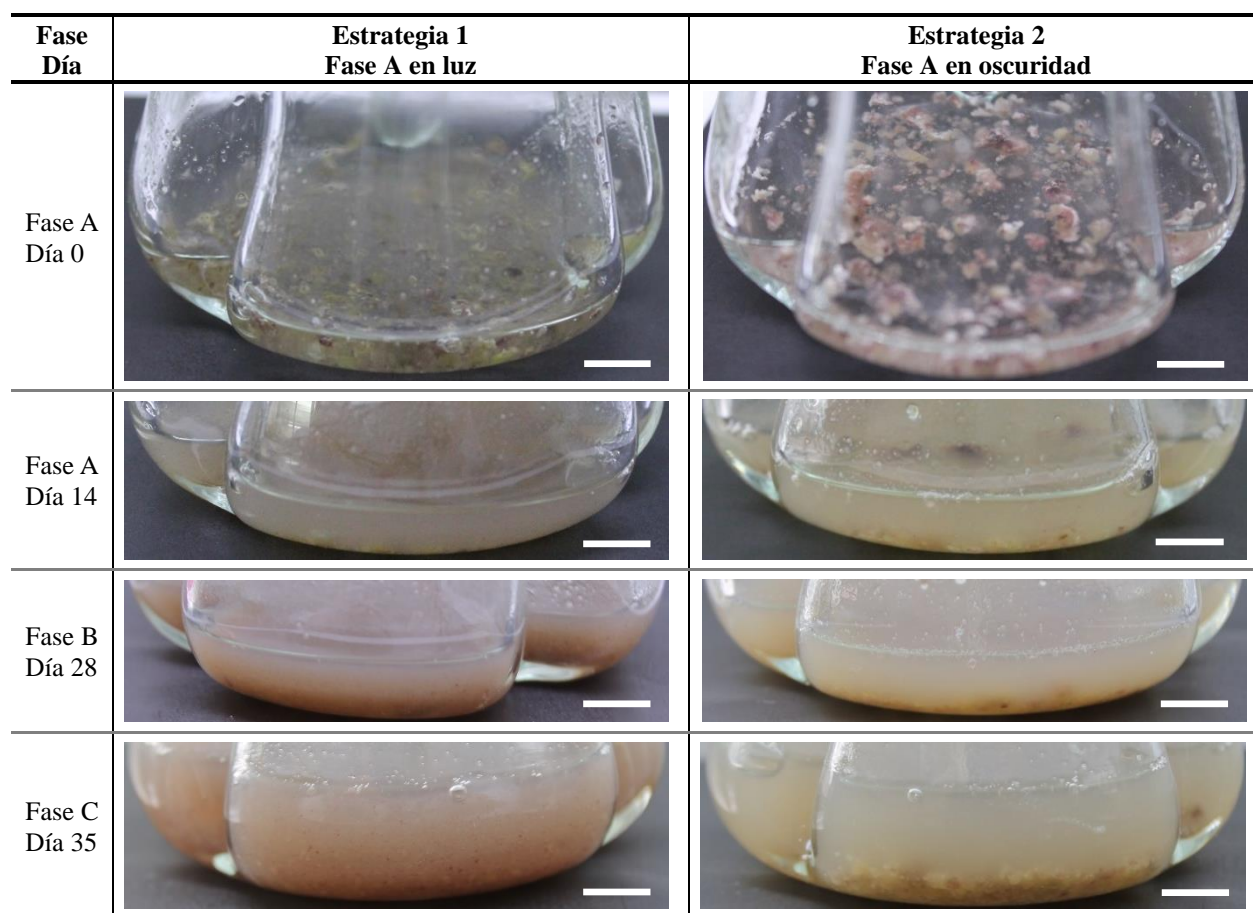


Figura 3.2.3: Cultivos en suspensión de las Estrategias 1 y 2 para la producción de antocianinas en células de maqui. Barra 1 cm.

En la Figura 3.2.3 se puede apreciar la evolución de los cultivos *in vitro* de maqui, establecidos según las estrategias de producción de antocianinas en células en suspensión. En las fotografías de la Fase C se distingue que únicamente la Estrategia 1 presentó tonalidades rojizas,

lo que motiva a pensar que existe una acumulación de antocianinas en las células proliferadas bajo este tratamiento, lo cual no estaría ocurriendo en la Estrategia 2. Además, se observó que la Estrategia 2 presenta un mayor número y tamaño de agregados celulares en los cultivos en suspensión, en particular en la Fase C (Figura 3.2.3 y Anexo D.1). Esto sería un aspecto negativo del crecimiento celular con Fase A en oscuridad, porque la agregación dificulta la difusión homogénea de nutrientes y gases, como ya se mencionó anteriormente.

3.2.2 Evaluación de la producción de biomasa

Para cada una de las estrategias de producción de antocianinas en células de *A. chilensis* en suspensión, implementadas de acuerdo al diseño de la Figura 3.2.2, se determinó el índice de crecimiento final (Figura 3.2.4 y Anexo D.2). Para este tipo de cultivos no se determinó la velocidad de proliferación celular debido a que técnicamente esto requiere del establecimiento de numerosos matraces con cultivos para cada tratamiento, lo cual no era factible para el tiempo y capacidad de trabajo que se disponía en la presente investigación.

Los índices de crecimiento se contrastaron con el mismo parámetro obtenido para los tratamientos de callo 6MS.CL.b y 6B5.C.O.a, que se consideran la base del diseño de la fase de crecimiento de las células en suspensión y dieron origen a los inóculos utilizados para establecer estos nuevos cultivos *in vitro* de maqui. Estos valores permiten concluir que la Estrategia 1, con la Fase A en luz, tiene un índice de crecimiento significativamente distinto al de los casos en comparación. En particular, este tratamiento presentó un crecimiento celular 20% mayor que la Estrategia 2, al finalizar los 35 días de cultivo. Además, al contrastar la Estrategia 1 con el tratamiento 6MS.C.L.b, se concluye que el diseño de la suspensión celular con Fase A en luz, permitió aumentar en un 51% el índice de crecimiento celular que presenta el cultivo de callos, para un mismo periodo de proliferación.

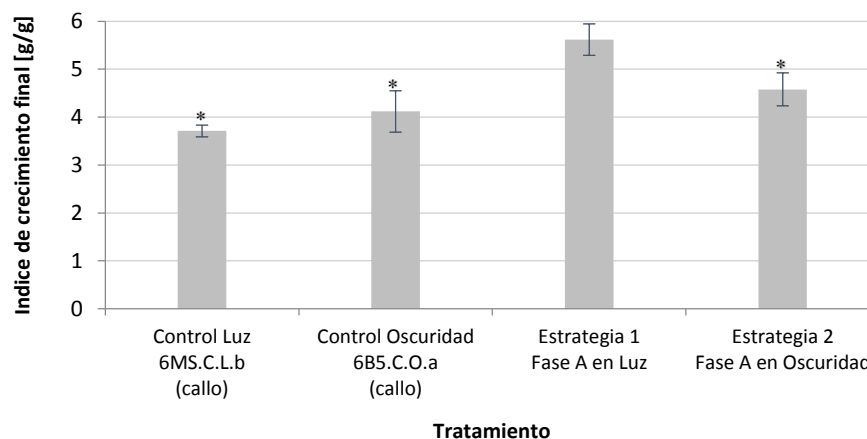


Figura 3.2.4: Índice de crecimiento final de las Estrategias 1 y 2. (*) indica una diferencia significativa respecto a la estrategia con mayor índice de crecimiento.

En general, es posible observar que las estrategias de cultivo en suspensiones celulares de maqui presentan una mayor producción de biomasa que los tratamientos de callo con mayor velocidad de crecimiento, en un mismo periodo de proliferación (Figura 3.2.4), lo que estaría

indicando que posiblemente el crecimiento celular ocurre durante todo el proceso de cultivo, y no únicamente en la fase que está diseñada para ello. Esto sería positivo desde el punto de vista de la generación de biomasa, sin embargo podría estar perjudicando la síntesis de los metabolitos secundarios de interés [7].

Cabe señalar que no se registró que los cultivos en suspensión de maqui presentaran una fase *lag* extensa, ya que se observó un aumento progresivo de la densidad celular (Figura 3.2.3). Anteriormente, se reportó en literatura el desarrollo de una fase *lag* del orden de un mes en cultivos de células en suspensión de *A. chilensis* [20]. Esta diferencia podría explicarse por la concentración del inóculo inicial, ya que una dilución excesiva de éste puede resultar en un periodo *lag* prologando [25]. En particular, en el caso reportado se utilizó un inóculo equivalente a 1 g de biomasa por 25 mL de medio de cultivo; mientras que en las estrategias diseñadas se añadió 3 g de callo para el mismo volumen de líquido.

3.2.3 Evaluación de la acumulación de antocianinas

Mediante el método del pH diferencial, se determinó el contenido de antocianinas totales en las suspensiones celulares de maqui, desarrolladas según las estrategias de producción detalladas en la Figura 3.2.2 (Anexo E.1). A partir de los valores de AT, es posible concluir que la acumulación de estos compuestos alcanza promedios similares en ambas estrategias de cultivo, con Fase A en luz y en oscuridad (Figura 3.2.5-A). No obstante, la producción de antocianinas en los cultivos en suspensión es tan baja que alcanza valores 8 veces menor que los obtenidos en los callos de 3MS.C.L.d, marcando una diferencia significativa entre la acumulación de pigmentos obtenida en suspensiones celulares y callos de *A. chilensis*. Por lo tanto, se podría considerar que las células de maqui crecidas en suspensión si tendrían el potencial para producir un mayor contenido de antocianinas que el obtenido con las estrategias implementadas. Cabe explicar que se utiliza como control el tratamiento 3MS.C.L.d porque el diseño de la Fase B se basa en las condiciones de crecimiento de este cultivo, que se destaca por tener uno de los mayores valores de AT entre los restantes tratamientos con callos morados (Figura 3.1.9-A).

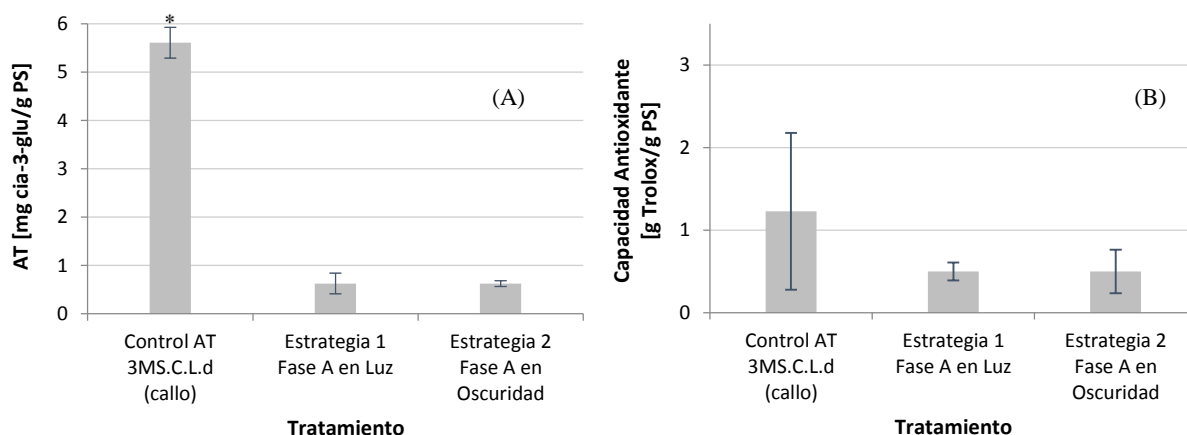


Figura 3.2.5: Evaluación de los extractos de antocianinas de las Estrategias 1 y 2. (A) Contenido de Antocianinas Totales y (B) capacidad antioxidante. (*) indica una diferencia significativa respecto al tratamiento con mayor contenido de AT o capacidad antioxidante, según corresponda.

La menor acumulación de antocianinas, obtenida en las suspensiones celulares de maqui en comparación con el cultivo de callo 3MS.C.L.d, podría deberse a que las primeras estuvieron expuestas a una menor intensidad de luz. Para corroborar esto, utilizando un equipo especializado (Quantum Meter Photosynthetic Photon Flux), se midió la radiación fotosintéticamente activa presente en ambos tipos de cultivos, determinándose que las células crecidas en suspensión recibían un *flux* aproximado de 6-12 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ mientras que los callos estaban expuestos a 59-61 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$. De manera análoga, con un UV-metro, se comprobó la ausencia de radiación UV en ambas zonas de cultivo. Esto sería consistente con la información encontrada en literatura, que indica que la biosíntesis de antocianinas en tejidos vegetales se realiza en presencia de luz, ya sea porque se requiere o porque ésta mejora la producción, dado que su efecto se expresa en la activación de diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis de estos compuestos, especialmente las enzimas fenilalanina amonía liasa (PAL) y chalcona sintetasa [7, 23].

A diferencia de lo ocurrido en el análisis de los tratamientos de callos de maqui, la capacidad antioxidante de los extractos de antocianinas de las Estrategias 1 y 2 es similar, acorde al hecho de que sus contenidos de antocianinas totales son prácticamente iguales. Sin embargo, en contraste a lo esperado, estos valores no son significativamente distintos a la capacidad antioxidante del tratamiento 3MS.C.L.d (Figura 3.2.5-B y Anexo E.2).

Los extractos de antocianinas, obtenidos desde la biomasa generada con las Estrategias 1 y 2, presentaron colores acordes a los observados en los respectivos cultivos en su Fase C. En el caso de las suspensiones celulares con Fase A en luz, los extractos se veían rosados; mientras que para el caso de Fase A en oscuridad, amarillentos a incoloros (Anexo E.3). Esta evidencia, que apunta a que la Estrategia 1 permite una mayor acumulación de antocianinas, contrasta con el hecho de que para ambos casos se obtuvo un contenido de AT similar. Una explicación a esto se fundamentaría en el pH de ambos extractos, ya que los de la Estrategia 2 (pH 4,0 a 4,5) son más alcalinos que los de la Estrategia 1 (pH 3,6 a 3,7), y se ha reportado que a valores de pH mayores a 4, las moléculas de antocianinas sufren un ataque nucleofílico por parte del agua, produciéndose la pseudobase carbinol y posteriormente, la chalcona, ambas incoloras e inestables. En cambio, en medios más ácidos las antocianinas serían más estables, conservando como forma predominante la del ión flavilo, característico por su color rojo [8]. Debido a esto, se postula que la Estrategia 1, con Fase A en luz, sería más adecuada para una producción *in vitro* de antocianinas de maqui en cultivos celulares.

3.3 Evaluación del efecto de elicitors y precursores en la producción de antocianinas de maqui en suspensiones celulares

3.3.1 Estrategia de producción de antocianinas en suspensiones celulares con adición de elicitors y precursores

En base a los resultados de la Sección 3.2, se propuso añadir el efecto de un factor elicitor o precursor en la estrategia de producción de antocianinas en suspensiones celulares, con el objetivo de lograr aumentar la acumulación de estos compuestos en las células de *A. chilensis*, considerando que el potencial de producción de éstas sería similar al registrado para el tratamiento de callos

morados 3MS.C.L.d. Para este efecto, se decidió continuar con la Estrategia 1 para el desarrollo de los cultivos en suspensión (Figura 3.2.2), ya que presenta ventajas comparativas respecto a la otra estrategia estudiada; en particular, destaca por una mayor proliferación de biomasa y por la estabilidad estructural de las antocianinas sintetizadas. Los nuevos factores a evaluar en esta estrategia serían tres, dos elicitors y un precursor de la acumulación de antocianinas: peróxido de hidrógeno, pH del medio (ácido clorhídrico) y fenilalanina, respectivamente. Los motivos considerados para seleccionar estos compuestos se detallan a continuación.

El peróxido de hidrógeno es conocido por generar estrés oxidativo en las células, ocasionando un alto porcentaje de muerte celular en bajas concentraciones [37, 38]. Sin embargo, bajo el efecto de este compuesto, se ha logrado aumentar la concentración de antocianinas en hojas de plántulas de arroz [39]. Esto ocurriría porque las antocianinas son sintetizadas naturalmente por las células vegetales como una respuesta antioxidante en los tejidos afectados por algún factor de estrés, para mantener la estabilidad fisiológica de la planta [7]. En base a esta evidencia, se propuso la elicitación de la acumulación de antocianinas mediante la adición de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo de las suspensiones celulares de *A. chilensis*. Dado que el objetivo es aumentar el contenido de AT sin afectar en demasía la biomasa del cultivo, es que se considera una concentración 4 mM para el reactivo, la cual podría generar aproximadamente un 5% de muerte celular [37, 38].

Por otra parte, se ha determinado experimentalmente que el pH del medio de cultivo es un factor que afecta en la acumulación de antocianinas [7]. Para el crecimiento, tanto de callos como de células en suspensión de maqui, se ha considerado, hasta este punto de la presente investigación, el uso de medios de cultivo con valores de pH ajustados entre 5,6 y 5,8. No obstante, se conoce que el pH fisiológico del fruto de maqui es 3,7 [16]. Por este motivo, se propuso estudiar el efecto de la acidificación del medio donde proliferan las suspensiones celulares, modificando su pH hasta 3,7 añadiendo HCl.

Fenilalanina es frecuentemente utilizada como precursor para la síntesis de antocianinas, ya que es un compuesto relativamente barato y más efectivo para la acumulación de estos pigmentos [7, 34]. En particular, se ha reportado que una alimentación periódica 1 mM de este aminoácido, permitiría aumentar la producción de estos metabolitos en cultivos celulares de fresa [40]. Debido a que tanto maqui como fresa son *berries*, se planteó evaluar el efecto de fenilalanina en las suspensiones celulares de *A. chilensis*, utilizando la misma concentración final encontrada en literatura.

Se ha identificado que, en el caso de fenilalanina (Phe), una alimentación periódica del precursor tendría un mejor resultado en la acumulación de antocianinas, en comparación a la adición de una única dosis en el inicio del proceso [34, 40]. Asimismo, se requeriría una dosificación periódica de peróxido de hidrógeno en los cultivos, debido a su alta volatilidad y a la rápida degradación del compuesto por acción de la actividad celular [38]. De manera similar, para elicitar la síntesis de pigmentos mediante la modificación del pH del medio se necesita agregar ácido clorhídrico repetidamente durante el desarrollo del proceso, ya que en el presente trabajo se determinó que las células de maqui regulan rápidamente el pH del medio de cultivo, retornando a valores cercanos a 6 luego de dos a tres días desde su acidificación. Cabe destacar que para definir

la concentración de ácido clorhídrico necesaria para el objetivo descrito, se realizó una tabla de titulación del medio de cultivo (Anexo F.1).

En función de toda la información anterior, se modificó la Estrategia 1 para la acumulación de antocianinas en suspensiones celulares de *A. chilensis*, añadiendo el efecto de un factor elicitor o precursor desde la mitad de la Fase B, es decir una vez inducida la producción de pigmentos del maqui, hacia la finalización de la Fase C, mediante la adición periódica de los reactivos correspondientes, cada 3 o 4 días. Los tratamientos se nombraron como Elicitor Peróxido, Elicitor pH Medio y Precursor Fenilalanina, de acuerdo al factor estudiado en cada uno (Figura 3.3.1 y Tabla 3.3.1).

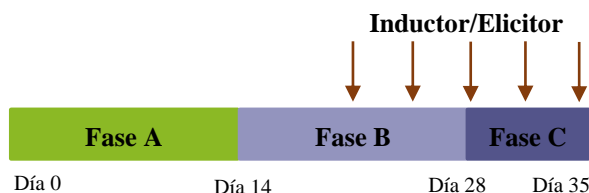


Figura 3.3.1: Estrategia de inducción/elicitación de las suspensiones celulares de maqui para la producción de antocianinas.

Tabla 3.3.1: Diseño de la estrategia de inducción/elicitación de las suspensiones celulares de *A. chilensis* para la producción de antocianinas.

Tratamiento	Fase B Días 21 y 24	Fase C Días 28, 31 y 34
Elicitor Peróxido	179 μL de H_2O_2 10 vol	224 μL de H_2O_2 10 vol
Elicitor pH Medio	10 μL de HCl 1M	Día 28: Subcultivo a medio con pH 3,7 Día 31 y 34: 35 μL de HCl 1 M
Precursor Fenilalanina	0,8 mL de Phe 50 mM	1 mL de Phe 50 mM

Adicionalmente, se consideraron algunas mejoras para el desarrollo de la Estrategia 1, debido principalmente a dos motivos. El primero corresponde a la baja acumulación de antocianinas que se registró para las suspensiones celulares de maqui cultivadas con la Fase A en luz. Frente a esto, se propuso modificar el tratamiento, agregando una fuente adicional de luz para equiparar la intensidad fotosintéticamente activa a la que están expuestas las células de maqui en suspensión respecto de las que crecen en callos (Figura 3.3.2).



Figura 3.3.2: Sistema de iluminación para la producción de antocianinas del maqui en suspensiones celulares.

La segunda modificación aplicada a la Estrategia 1 concierne a la necesidad de aumentar el volumen de medio de cultivo debido a la alta densidad celular observada en estos. Para ello se planteó realizar un aumento periódico del volumen de medio de cultivo, a modo de proceso *fed batch*, hasta alcanzar un valor final de 50 mL, para evaluar si este tipo de alimentación tiene un efecto favorable en la producción de biomasa y/o la acumulación de antocianinas de *Aristotelia chilensis* (Figura 3.3.3 y Tabla 3.3.2).

Debido a los cambios realizados en la Estrategia 1, se diseñaron dos tratamientos tipo control, uno para determinar el efecto de la mayor intensidad de luz y el otro, para comprobar el resultado de la alimentación *fed batch* de medio de cultivo, siendo denominados como Control Luz y Control Luz + Volumen, respectivamente.

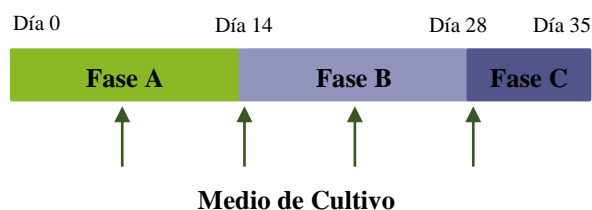


Figura 3.3.3: Estrategia de alimentación *fed batch* de medio de cultivo para la producción de antocianinas en suspensiones celulares de maqui.

Tabla 3.3.2: Diseño de la alimentación *fed batch* de medio de cultivo para la producción de antocianinas en suspensiones celulares de maqui.

Tratamiento	Fase A Día 7	Fase B Días 14 y 21	Fase C Día 28
Control Luz	-	-	Subcultivo a 50 mL de medio 3MS.
Control Luz + Volumen	Adición de 5 mL de medio líquido 6MS, con mezcla b de hormonas.	Día 14: Subcultivo a 35 mL de medio líquido 3MS	Subcultivo a 50 mL de medio líquido 3MS.
Elicitor Peróxido		Día 21: Adición de 5 mL de medio líquido 3MS, con mezcla d de hormonas.	
Elicitor pH Medio			
Precursor Fenilalanina			

En la Figura 3.3.4 se puede apreciar la evolución de las suspensiones celulares de *A. chilensis* en los tratamientos de control. Si bien el medio del Control Luz se observó más rosado hacia el inicio de la Fase A, probablemente porque el inóculo utilizado poseía más células pigmentadas, es el Control Luz + Volumen el más coloreado hacia el final del proceso, destacando por la presencia de numerosas células burdeos entre la biomasa que reposa en el fondo del matraz de la Fase C.

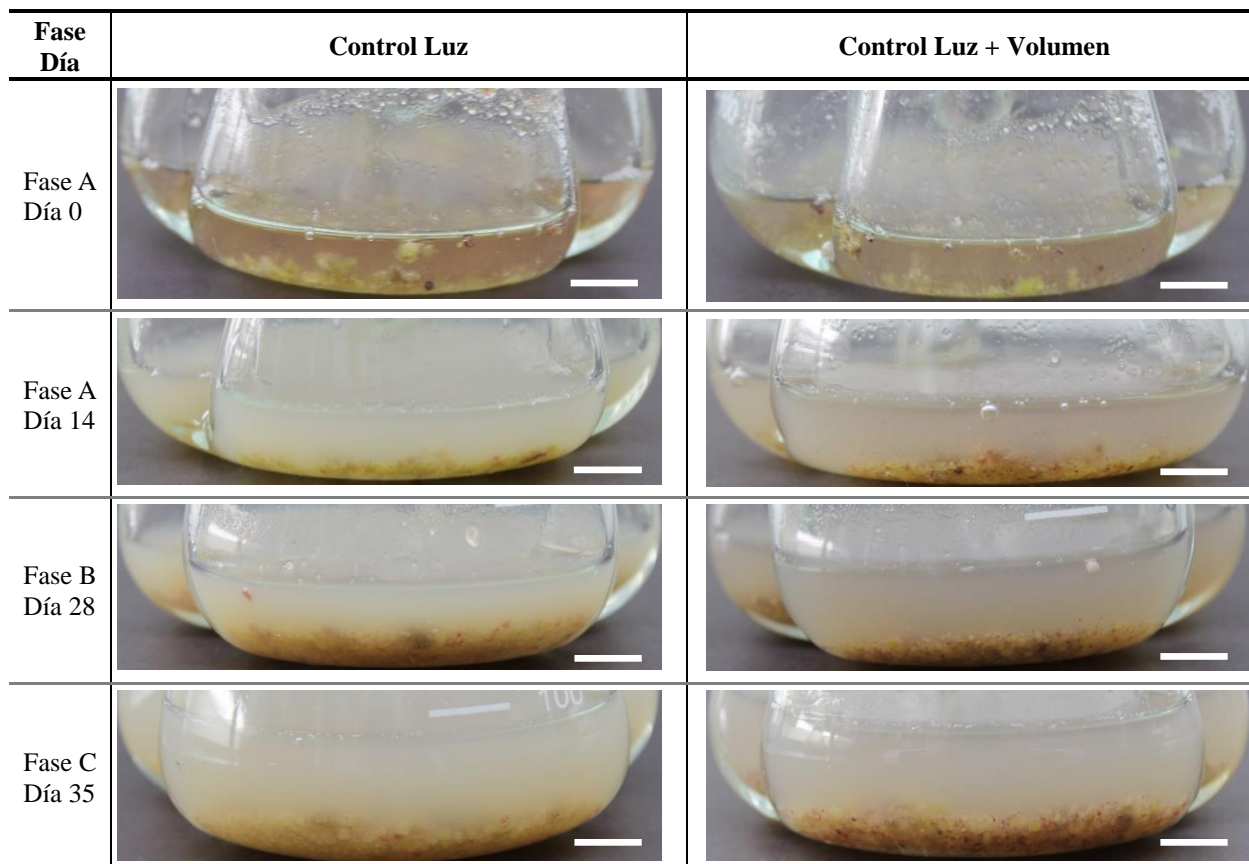


Figura 3.3.4: Suspensiones celulares de maqui de los tratamientos Control Luz y Control Luz + Volumen. Barra 1 cm.

De manera similar, en la Figura 3.3.5 se puede evaluar cualitativamente el desarrollo de las suspensiones celulares de maqui tratadas con algún factor elicitor o precursor. Cabe destacar que estos tratamientos eran idénticos hasta el día 21, momento en que se inició la adición del reactivo correspondiente. Por lo tanto, las fotos de los días 0, 7 y 14 deberían reflejar escenarios similares en todos los casos. Sin embargo, esto no ocurre, ya que Elicitor pH Medio presentó una tonalidad rosada que no exhibieron los demás tratamientos. Una explicación posible sería que el callo utilizado para inocular este cultivo tendría alguna característica distinta, podría ser una mayor acumulación de antocianinas y/o friabilidad, según las imágenes del día 0, las cuales habrían favorecido la multiplicación de células productoras del pigmento. No obstante, esta característica se fue perdiendo con el tiempo como se observa en la foto del día 35.

En general, se observaron pocas diferencias cualitativas entre los tratamientos desarrollados, incluyendo los controles. Una de ellas es la coloración de Elicitor Peróxido y Precursor Fenilalanina que se fue tornando amarillenta-café hacia el final de la Fase C, siendo más evidente la tonalidad café para el segundo cultivo. En el primer caso, se presume que esto habría sido provocado por un proceso de oxidación celular; mientras que en el segundo, podría explicarse por una alta concentración de lignanos y ligninas en el medio de cultivo, característicos por su color amarillo a café oscuro. Esto último hace suponer que la adición de Phe en los cultivos *in vitro* de maqui habría favorecido la vía de síntesis de lignanos en lugar de las antocianinas, dado que fenilalanina es precursora de ambas vías [37, 41].

Otra diferencia entre los distintos cultivos en suspensión de *A. chilensis*, radica en la presencia de células y agregados celulares de color rojo a burdeos, los cuales se ve que van aumentando en el tiempo hasta la Fase C de todos los tratamientos, excepto en Control Luz. Esto podría estar indicando que la alimentación *fed batch* de medio de cultivo favorece la acumulación de antocianinas.

Es importante mencionar que en Control Luz es más evidente la formación de agregados celulares. Pareciera ser que existe una relación entre la formación de agregados celulares y la baja acumulación de antocianinas, ya que para la Estrategia 1 se observaba la presencia de estos pigmentos y la ausencia de grandes agregados celulares; mientras que en la estrategia 2 habría ausencia del pigmento (en su tono rosado) y grandes agregados celulares. Se observó algo similar en los callos de maqui, donde un mismo tratamiento que aumentó su pigmentación en el tiempo, también mejoró su friabilidad, sobre todo en las zonas pigmentadas.

A partir de los resultados cualitativos, no es posible inferir qué tratamiento de células de maqui en suspensión permitiría una mayor acumulación de antocianinas, dado que la presencia del pigmento sería similar en todos ellos. Asimismo, tampoco es evidente cuál cultivo sería responsable de una mayor proliferación de biomasa, siendo necesario un análisis cuantitativo de estos parámetros.

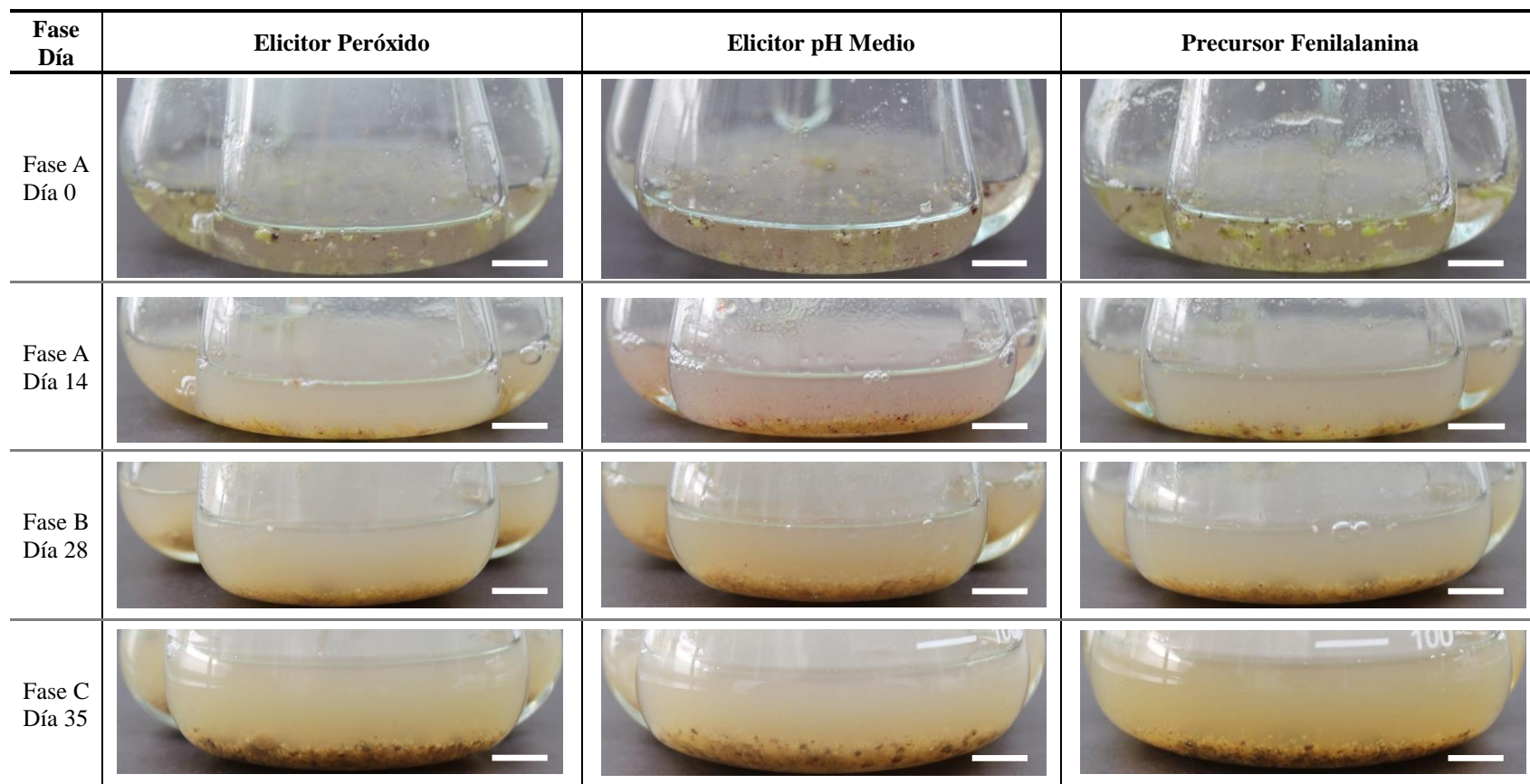


Figura 3.3.5: Suspensiones celulares de maqui de los tratamientos Elicitor Peróxido, Elicitor pH Medio y Precursor Fenilalanina. Barra 1 cm.

3.3.2 Evaluación de la producción de biomasa

Para cada una de las estrategias de producción de antocianinas en suspensiones celulares de *A. chilensis*, implementadas de acuerdo al diseño de la Sección 3.3.1, se determinó el índice de crecimiento final (Figura 3.3.6 y Anexo F.2). El índice de Control Luz se comparó con el mismo parámetro obtenido para la Estrategia 1, que es la base del diseño de los nuevos tratamientos, determinándose que el incremento de la radiación lumínica sobre los cultivos habría permitido un aumento de 14% del crecimiento celular. Mientras que, al comparar Control Luz con Control Luz + Volumen, se consideró que la alimentación *fed batch* de medio de cultivo podría inducir a una menor proliferación celular; aunque no es posible concluir al respecto, dado que no se observa una diferencia significativa entre ambos promedios.

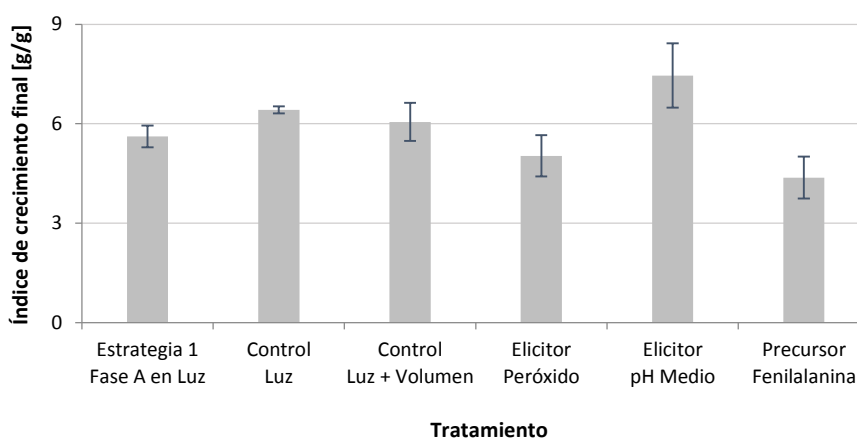


Figura 3.3.6: Índice de crecimiento final de las estrategias de inducción/elicitación de suspensiones celulares de maqui.

Al evaluar el efecto de los factores elicitors y precursor, se puede concluir que la adición de HCl para la acidificación del medio de cultivo permitió lograr un mayor índice de crecimiento, superando en un 50% y 70% a los valores obtenidos con peróxido de hidrógeno y fenilalanina, respectivamente. De acuerdo a la desviación estándar de cada tratamiento, estas diferencias se podrían considerar como significativas. Es posible que esta respuesta favorable, ante la elicitación con HCl, se deba a la similitud de las condiciones de cultivo con las características fisiológicas del fruto de maqui, en particular de su pH [16].

Como se esperaba, el elicitor peróxido de hidrógeno provocó una disminución del índice de crecimiento final en los cultivos de maqui, sin embargo esta reducción, que se valora en un 17%, fue mayor a la estimada inicialmente por bibliografía [37, 38]. Es posible que esto se deba a que las células de *A. chilensis* son muy sensibles ante este compuesto, cuyo efecto varía de acuerdo al tipo y especie de células [38]. En el caso de fenilalanina, es posible que el crecimiento celular fuera menor porque el metabolismo de las células estaría enfocado en funciones relacionadas con la producción de metabolitos secundarios, como las ligninas, en lugar de su proliferación.

Debido a que los tratamientos estudiados sólo se establecieron en duplicado, no fue posible realizar un análisis estadístico para determinar si los promedios determinados son significativamente distintos o no. Por ello, se optó por un análisis gráfico de la desviación estándar.

3.3.3 Evaluación de la acumulación de antocianinas

Mediante el método del pH diferencial, se determinó el contenido de antocianinas totales de las suspensiones celulares de maqui, desarrolladas según las estrategias de producción detalladas en la Sección 3.3.1 (Figura 3.3.7-A y Anexo G.1). A partir de los valores de AT, se podría deducir que el aumento de la radiación lumínica sobre los cultivos no resultó en un aumento significativo del contenido de los compuestos de interés, presentando una disminución del 35% en el valor de AT obtenido en Control Luz en comparación con la Estrategia 1; aunque esta diferencia no es significativa estadísticamente. Adicionalmente, se puede concluir que la alimentación *fed batch* de medio de cultivo en las suspensiones celulares no favorecería de forma significativa a la acumulación de antocianinas en las células de *A. chilensis*, en relación al Control Luz.

El extracto de antocianinas del Control Luz + Volumen también presentó la mayor capacidad antioxidante, entre los nuevos tratamientos evaluados (Figura 3.3.7-B y Anexo G.2). Este valor es significativamente distinto al de Control Luz, Elicitor pH Medio y Precursor Fenilalanina. Pero, en general, nuevamente no se observa una relación directa entre el contenido de AT y la capacidad antioxidante de las antocianinas de maqui.

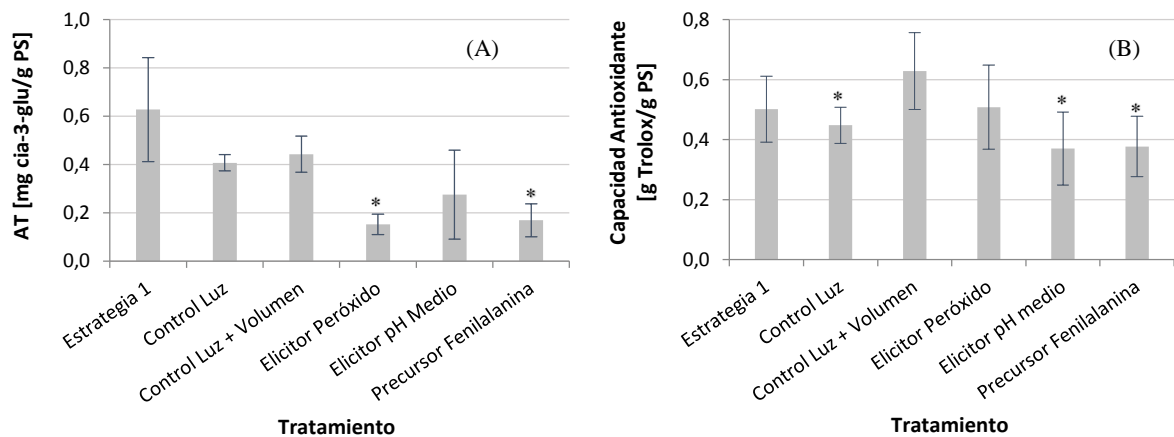


Figura 3.3.7: Evaluación de los extractos de antocianinas de las estrategias de inducción/elicitación de suspensiones celulares de maqui. (A) Contenido de Antocianinas Totales y (B) capacidad antioxidante. (*) indica una diferencia significativa respecto al tratamiento con mayor contenido de AT o capacidad antioxidante, según corresponda.

De las Figura 3.3.6 y Figura 3.3.7-A, se puede apreciar que existiría una correlación positiva entre el índice de crecimiento y el contenido de AT de los tratamientos que consideran el uso de un factor precursor o elicitor. En particular, la elicitación mediante la adición de HCl sería la mejor alternativa. Sin embargo, en contraste con lo esperado, el efecto de los elicitores y precursor evaluados no provocó un aumento en la acumulación de AT, en comparación a los cultivos de control. Al contrario, la adición de peróxido de hidrógeno y de fenilalanina provocó una disminución significativa de estos compuestos en las células en suspensión. Esto corroboraría la hipótesis de que los cultivos tratados con H₂O₂ sufrieron un fuerte estrés oxidativo y que fenilalanina habría causado la activación de la vía de síntesis de los lignanos, disminuyendo tanto el crecimiento de las células de maqui como la producción de antocianinas.

3.4 Concepción de una estrategia de producción de antocianinas de maqui con alcances a escala comercial

3.4.1 Producción de antocianinas en callos de maqui: Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

En la Tabla 3.4.1 se resumen los principales parámetros de los tratamientos con mayor producción de biomasa y acumulación antocianinas, tanto en callos como en cultivos en suspensión de *Aristotelia chilensis*. A partir de estos valores y de la discusión desarrollada en las secciones anteriores, se puede concluir que la mejor estrategia para la obtención del pigmento del maqui yace en el desarrollo de los cultivos de callo 6MS.C.L.b y 3MS.C.L.d.

Tabla 3.4.1: Parámetros de los principales cultivos *in vitro* de *A. chilensis* para las distintas estrategias implementadas.

Tipo de cultivo	Tratamiento	Índice de crecimiento final [g/g]	Contenido de AT [mg cia-3-glu/g PS]
Callo	6MS.C.L.b	3,71 ± 0,12	-
Callo	3MS.C.L.d	-	5,61 ± 0,32
En suspensión	Estrategia 1 Fase A en luz	5,62 ± 0,33	0,63 ± 0,21
En suspensión	Control Luz + Volumen	6,06 ± 0,58	0,44 ± 0,07
En suspensión	Elicitor pH Medio	7,46 ± 0,97	0,28 ± 0,18

Para el diseño de una estrategia de producción de antocianinas con alcances a escala comercial, se propone un proceso de cultivo de callos de maqui con tres fases consecutivas, similar al descrito en la Sección 3.2. Específicamente, se plantea realizar la proliferación de biomasa bajo las condiciones del tratamiento 6MS.C.L.b, inducir la síntesis de antocianinas en cultivos 3MS.C.L.d y aumentar el contenido de estos pigmentos implementando el tratamiento 3MS.C.L.sh, equivalente a 3MS.C.L.d pero sin hormonas (Figura 3.4.1). La Fase C permite, además, eliminar la presencia de la hormona 2,4-D, sindicada como tóxica para la salud humana [36].

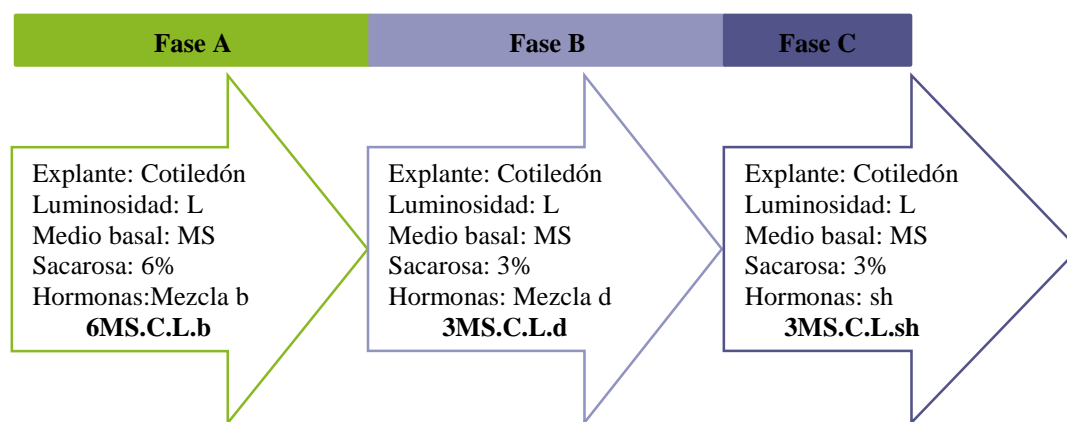


Figura 3.4.1: Diseño de la estrategia de producción de antocianinas en callos de maqui con alcances a escala comercial.

No obstante, para lograr una producción con alcances a escala comercial, se necesita una tecnología de cultivo *in vitro* equivalente al cultivo de callos en placa, pero a nivel industrial, que permita el manejo de grandes volúmenes de masa celular. Por ello, se plantea implementar un sistema de inmersión temporal (SIT), el cual es ampliamente utilizado para la propagación masiva de plantas *in vitro*. Éste es un sistema semi-automatizado que se basa en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes, por un corto período de tiempo [42, 43].

Para los fines de la estrategia concebida, el SIT se compondría de dos frascos de cultivo, uno para el crecimiento de los callos y el otro como reservorio de medio de cultivo. De acuerdo al diseño del sistema, estos frascos se unen entre sí por una manguera de silicona de unos 6 mm de diámetro, mediante conectores que atraviesan sus tapas. En la parte interna de las mismas se coloca una manguera menos flexible, la cual desciende hasta el fondo en ambos recipientes. El medio de cultivo circula de un frasco a otro según ocurra la apertura o cierre de unas electroválvulas, las cuales están conectadas a un temporizador programable para la determinación de la frecuencia y la duración de la inmersión. A la entrada de los frascos se colocan filtros hidrofóbicos para garantizar la esterilidad y la presión de aire, la cual es regulada por un manómetro (Figura 3.4.2-A) [42]. Alternativamente, el sistema puede componerse de un único reactor con dos niveles interconectados. En el nivel alto ocurriría el crecimiento de los callos, mientras abajo se reservaría el medio líquido, el cual se desplaza hacia la parte alta por efecto de la presión que ejerce el ingreso de aire estéril hacia el nivel inferior. Al detener el suministro de aire, la presión se equilibra y el medio baja (Figura 3.4.2-B) [44].

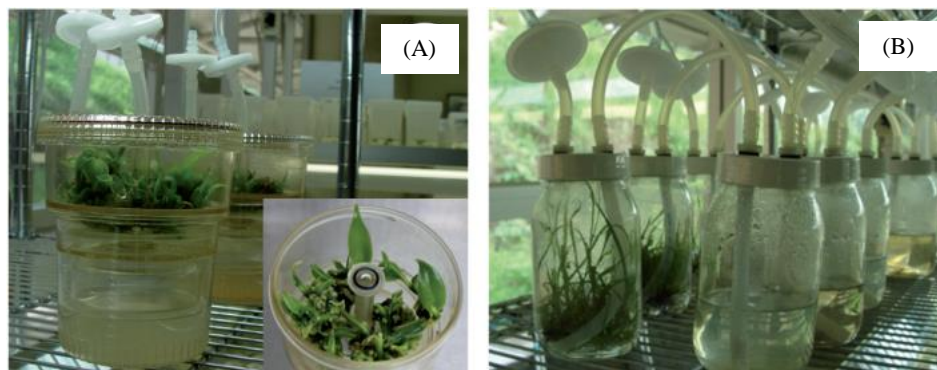


Figura 3.4.2: Sistema de inmersión temporal. Sistema de cultivo con (A) un reactor y (B) con dos reactores [45].

En bibliografía sólo se reporta el uso de estos sistemas para la micropropagación de plantas o procesos de embriogénesis y no se encontró información que indicara su factibilidad para el cultivo de callos. Sin embargo, observando las imágenes de los reactores que se utilizan en los SIT, se considera que sería necesario el rediseño de estos equipos, ya que tienen una forma alargada, la cual es conveniente para el crecimiento de explantes pero no es óptima para la proliferación de callos, los que se verían favorecidos con frascos con un mayor diámetro y una menor altura, ya que estas estructuras celulares crecen diametralmente y alcanzan alturas menores a 2 cm.

Los sistemas de inmersión temporal, en general, posibilitan reducir los costos de mano de obra y la manipulación de los cultivos mediante la semi-automatización de los procesos de propagación *in vitro* y ofrecen mayores facilidades para el escalamiento de la producción de

grandes volúmenes de plantas. También, permiten una mejor aireación de los tejidos, lo que facilita una mayor incorporación y asimilación de los nutrientes y, en consecuencia, aumenta el coeficiente de multiplicación y la calidad de los explantes [41, 45]. Por lo que sería esperado que, implementando este sistema, aumentara el índice de crecimiento de los distintos tratamientos de la estrategia de producción de antocianinas de *A. chilensis*.

Para el caso del cultivo de callos de maqui, el SIT presentaría algunas ventajas adicionales. El uso de medios líquidos reduce los costos asociados al uso de agar para la gelificación de los medios de cultivo y elimina todas las dificultades que presenta usar medios sólidos en placas como, por ejemplo, el desprendimiento de callos a causa de la gravedad, debido a que la placa se debe conservar volteada para evitar la acumulación de agua condensada sobre las estructuras celulares. Además, gracias a la utilización de medios líquidos, sería posible evaluar las ventajas de ajustar el pH del medio, de algunas o todas las fases, a un valor ácido (en torno a 3,7), lo cual no es factible usando medios sólidos porque no es compatible con las condiciones de uso del agar.

Considerando los requerimientos de la estrategia de producción de antocianinas de *A. chilensis*, el establecimiento de los callos se realizaría en placas Petri y luego, estos serían transferidos a los reactores del sistema de inmersión, donde se desarrollarían las tres fases de cultivo. Debido al aumento progresivo de la masa celular, sería recomendable realizar procesos de subcultivo con alguna frecuencia, dada por el crecimiento de ésta, para segmentar los callos y distribuirlos hacia nuevos reactores de inmersión. Como, dentro de este plazo, es posible que se necesite hacer algún recambio de medio, ya sea porque coincida algún cambio de fase o porque se requiera medio fresco, se plantea que el tipo de SIT más adecuado sería el de dos frascos, ya que de esta manera el cambio de una fase a otra se basaría simplemente en el reemplazo del contenedor que funciona como reservorio del medio líquido.

3.4.2 Evaluación técnico-económica de la producción de antocianinas en SIT

Utilizando los parámetros de producción de biomasa y acumulación de antocianinas obtenidos experimentalmente, se estimó que es posible sustituir los pigmentos provenientes de 1 kg de maqui, que equivalen aproximadamente a 8,2 g de estos compuestos, a través del cultivo sucesivo de 2,3 g iniciales de callo 6MS.C.L.b durante 40 semanas; con una duración de 10, 20 y 10 semanas para las Fases A, B y C, respectivamente. Además, se contemplaron 40 días para el establecimiento de los callos iniciales (Ver Anexos H.1 y H.2).

El escenario descrito podría ser inclusive mejor si el tratamiento sin hormonas tuviera una mayor acumulación de antocianinas que 3MS.C.L.d, disminuyendo la masa de callo requerida para la extracción de los metabolitos de interés, ya que para la estimación anterior se consideró que 3MS.C.L.sh producía sólo un 50% más de que el tratamiento con hormonas. En caso de que no ocurriera esta diferencia, entonces no se justificaría una Fase C de 10 semanas, siendo suficiente la mitad de este tiempo para eliminar los residuos de la hormona 2,4 D desde las células. Por otra parte, si el SIT influyera positivamente sobre la velocidad de crecimiento de los cultivos, podría reducirse la duración de cada fase, disminuyendo el tiempo total de cada *batch*.

Realizando un estudio de la economía potencial de la estrategia propuesta, para el caso base descrito, se obtuvo una diferencia positiva entre los costos y los ingresos monetarios asociados a

la producción de un *batch*, por lo que no se descarta la rentabilidad del proyecto. Inclusive, como los beneficios calculados serían 100 veces mayores a los costos, se podría pensar que la estrategia de producción propuesta es altamente rentable (Ver Anexo H.2).

Evaluando la inversión inicial requerida para la adquisición de los reactores de inmersión temporal, se estimó que este valor sería del orden de mil millones de pesos chilenos, los que podrían recuperarse en un plazo de 3 años, de acuerdo a los precios asociados al producto y considerando el desarrollo de 2 *batch* por año. Sin embargo, existen grandes limitaciones técnicas para la implementación de este proceso, ya que se necesitarían más de 2.000 equipos de cultivo para lograr el nivel de producción descrito (Ver Anexo H.2).

Especulando sobre un número de equipos técnicamente factible de monitorear y manipular, se estimaron los parámetros económicos para la implementación de 32 reactores de inmersión temporal, en los cuales se podría producir unos 100 mg de antocianinas. En este escenario, se obtuvo nuevamente una economía potencial positiva, por lo que no sería posible descartar que el proyecto sea rentable. Además, la inversión inicial se estimó en unos CLP\$12 millones, recuperable en un plazo de 3 años aproximadamente (Ver Anexo H.3).

Es importante mencionar que, dado el bajo nivel de producción de antocianinas que se alcanzaría en el segundo caso base de la estrategia propuesta, no sería posible abastecer la demanda de la industria nutracéutica, ya que ésta altas cantidades de esta materia prima para generar concentrados de compuestos antioxidantes. No obstante, estos compuestos podrían comercializarse como colorantes naturales para la industria alimenticia, donde se requiere en bajas concentraciones para lograr la pigmentación rosada, o para la elaboración de estándares de antocianinas, como se asumió en los escenarios evaluados.

Se tomaron algunos supuestos importantes para realizar la evaluación técnico-económica del proyecto. Los índices de crecimiento final de los tratamientos 3MS.C.L.d y 3MS.C.L.sh, se consideraron iguales entre ellos y al de 3MS.C.L.c; y el contenido de AT característico del tratamiento 3MS.C.L.sh se estimó mayor al de 3MS.C.L.d en un 50%, de acuerdo a la evidencia recogida en la Sección 3.1. Otros supuesto se detallan en el Anexo H.1.

4 Conclusiones

Se estudiaron distintas estrategias de producción *in vitro* de antocianinas de *Aristotelia chilensis*, tanto en cultivos de callos y como en suspensiones celulares de esta especie vegetal, a escala de laboratorio.

En los callos de maqui, se estudiaron 30 tratamientos diferentes, variando cinco factores de crecimiento: concentración de sacarosa (3 y 6%), medio basal (MS y B5), luminosidad (L y O), fuente de explante (C, E y H) y hormonas (mezclas a, b, c y d). Se determinó que, entre las condiciones de cultivo estudiadas, los tratamientos 3B5.E.L.a, 6MS.C.L.b, 3MS.E.O.b y 6B5.C.O.a presentaron la mayor velocidad de crecimiento celular, de aproximadamente $0,040\text{ d}^{-1}$; mientras que los tratamientos 3B5.C.L.d y 3MS.C.L.d destacaron por un alto contenido de antocianinas, en torno a $6\text{ mg cia-3-glu/g PS}$, equivalente a un tercio de lo medido para los frutos de maqui.

De acuerdo a un análisis del efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de los callos de *A. chilensis*, se estableció que las variables más significativas son las hormonas y la fuente de explante. En particular, el uso de KIN y NAA favorece una mayor proliferación celular en callos establecidos a partir de embrión o cotiledón. Análogamente, se concluyó que la aplicación de 2,4-D en presencia de luz resulta en una mayor concentración de antocianinas en los cultivos *in vitro* de maqui.

Adicionalmente, se determinó que es posible separar mecánicamente las células de maqui productoras de antocianinas, de aquellas que no lo son; y que los cultivos celulares *in vitro* de esta especie, luego de un periodo prolongado de mantención en presencia de hormonas, se habitúan al efecto de estos químicos, pudiendo prescindir de ellos, sin perder su capacidad de sintetizar los pigmentos de interés.

En función de los resultados anteriores, fue posible diseñar e implementar una estrategia de producción de antocianinas en suspensiones celulares de *A. chilensis*. Este proceso contempló tres fases de cultivo, cada una con distintos objetivos: para aumentar la biomasa (Fase A), para inducir la acumulación de los metabolitos secundarios (Fase B) y para eliminar los residuos de la hormona 2,4-D (Fase C). En consecuencia, se evaluaron dos condiciones de cultivo para la Fase A, en luz (6MS.C.L.b) y oscuridad (6B5.C.O.a); mientras que para las Fase B y C se utilizaron los mismos factores que en 3MS.C.L.d, con y sin hormonas, respectivamente.

Entre las estrategias implementadas para el desarrollo de suspensiones celulares de maqui, aquella con Fase A en luz presentó un mejor índice de crecimiento final, inclusive mayor que el obtenido en callos para un mismo periodo de tiempo. Sin embargo, la acumulación de antocianinas en los cultivos en suspensión es deficiente, siendo diez veces menor a la alcanzada en 3MS.C.L.

Esto indicaría que los cultivos de callos son una mejor alternativa que las suspensiones celulares para la producción *in vitro* de antocianinas de *A. chilensis*.

En la estrategia de cultivo con Fase A en luz, se estudió el efecto de dos elicitores, peróxido de hidrógeno y ácido clorhídrico, y un precursor, fenilalanina; sin embargo, ninguno de estos factores favoreció una mayor acumulación de antocianinas en las suspensiones celulares de *A. chilensis*. Asimismo, la implementación de una fuente de radiación más intensa y la alimentación *fed batch* de medio de cultivo, tampoco dieron resultados positivos, respecto de la síntesis de estos compuestos, bajo esta estrategia. Con estas evidencias, finalmente se concluyó que el cultivo de células de maqui en callos es el modo más apropiado para la producción *in vitro* de antocianinas, en comparación a la implementación de suspensiones celulares.

En base a los ensayos realizados en el laboratorio, se concibió un proceso de producción *in vitro* de antocianinas, con alcances a escala comercial, basado en la implementación de un sistema de inmersión temporal para el cultivo de callos de maqui, el cual incluye el desarrollo de las tres fases de cultivo (A, B y C), anteriormente explicadas, en un periodo total de 40 semanas.

De acuerdo a una evaluación técnico-económica, no se puede descartar que la estrategia de producción de antocianinas propuesta sea rentable, sin embargo no es técnicamente factible para altos niveles de producción, siendo posible únicamente generar cantidades de antocianinas del orden de 100 mg por *batch*. Por lo tanto, la implementación de este proceso para abastecer la industria nutracéutica no sería atractivo comercialmente.

Se observó que un significativo aumento de temperatura, durante un breve periodo del cultivo, podría tener un efecto positivo sobre la acumulación de antocianinas en callos de maqui. Dado que no se profundizó en este aspecto durante la presente investigación, se propone evaluar el efecto de las variaciones de temperatura en callos de *A. chilensis* proliferados en reactores de inmersión temporal.

5 Proyecciones y recomendaciones

Sería relevante hacer un estudio de mercado para identificar cuáles empresas utilizan las antocianinas, del maqui u otras especies, como materia prima en sus procesos y en qué cantidades lo hacen, para lograr estimar cuál sería la producción mínima que debería alcanzar una estrategia de producción *in vitro* de antocianinas para ser atractiva a nivel comercial.

De acuerdo al estudio de pre-factibilidad realizado, no se puede descartar la rentabilidad de la producción de antocianinas en cultivos *in vitro* de maqui y, por lo tanto, sería recomendable continuar con la obtención de los parámetros característicos de un sistema de inmersión temporal para el tipo de proceso y cultivo a implementar. En particular, sería necesario determinar empíricamente el tiempo y la frecuencia de inmersión óptimas para la producción de biomasa y la acumulación de los pigmentos de interés. Además, se requeriría ajustar el volumen y tiempo de cultivo, de acuerdo al nuevo sistema de propagación celular. Todos estos parámetros se deben estimar empíricamente dado que son específicos para la especie y el tejido vegetal a propagar [46].

Adicionalmente, una vez establecidos los cultivos de maqui en los reactores de inmersión temporal, sería recomendable evaluar, y estudiar con mayor detalle, el efecto de la acidificación del medio de cultivo y las variaciones de temperatura, y el fenómeno de habituación a las hormonas, en base a la evidencia recogida en la presente investigación.

Una vez determinados los parámetros del SIT, se puede proceder a realizar una nueva evaluación técnica de la estrategia de producción de antocianinas en cultivos *in vitro* de *A. chilensis*, para determinar, si bajo estas nuevas condiciones, se alcanza un mayor contenido de estos metabolitos. En caso de que este nuevo escenario sea atractivo comercialmente, se puede continuar con el desarrollo de la etapa de ingeniería conceptual del proyecto, para el dimensionamiento de los equipos e insumos requeridos. Con esta información es posible realizar una nueva evaluación económica del proceso, determinando su rentabilidad con una menor incertidumbre.

Nomenclatura

Abs	Absorbancia	<i>l</i>	<i>Pathlength</i>
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Mezcla a	KIN 0,2 mg/L; NAA 0,1 mg/L
ABA	Ácido abscísico	Mezcla b	KIN 1 mg/L; NAA 1 mg/L
AT	Antocianinas totales	Mezcla c	2,4-D 2 mg/L
B5	Medio basal Gamborg B-5	Mezcla d	2,4-D 3 mg/L; KIN 1 mg/L
C	Cotiledón	MS	Medio basal Murashige y Skoog
cia-3-glu	Cianidina-3-glucosido	NAA	Ácido naftalenacético
CLP\$	Moneda en pesos chilenos	O	Oscuridad
del-3-glu	Delfinifina-3-glucósido	Phe	Fenilalanina
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil	PF	Peso fresco
DF	Factor de dilución	pH	Potencial de hidrógeno
E	Embrión	PM	Peso molecular
ϵ	Coefficiente de extinción molecular	PS	Peso seco
H	Hoja	sh	Sin hormonas
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	SIT	Sistema de inmersión temporal
HCl	Ácido clorhídrico	USD\$	Moneda en dólares americanos
KIN	Kinetina	V_{extracto}	Volumen de extracción
KOH	Hidróxido de potasio		
L	Luz		

Bibliografía

- [1] ARAYA, H., CLAVIJO, C., HERRERA, C. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 56(4): 361-365, 2006.
- [2] DILLARD, C., GERMAN, J. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(12): 1744-1756, 2000.
- [3] ALONSO, J. Maqui (*Aristotelia chilensis*): un nutracéutico chileno de relevancia medicinal. Revista de Farmacología de Chile, 5(2): 95-100, 2012.
- [4] MISLE, E., GARRIDO, E., CONTARDO, H., GONZÁLEZ, W. Maqui [*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz]-the amazing chilean tree: a review. Journal of Agricultural Science and Technology B, 1(4b): 473-482, 2011.
- [5] JARA, E., HIDALGO, J., FLORES, C., PÉREZ, M., YAÑÉZ, A., HIDALGO, A., QUIÑONES, L., HANCKE, J., BURGOS, R. Estudio de un extracto estandarizado de maqui rico en delfinidinas en el mantenimiento del balance de glucosa. Revista de Farmacología de Chile, 5(2): 27-39, 2012.
- [6] FREDES, C. Antioxidantes en *berries* nativos chilenos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8(6): 469-478, 2009.
- [7] SIMÕES, C., ALBARELLO, N., C. DE CASTRO, T., MANSUR, E. Production of Anthocyanins by Plant Cell and Tissue Culture Strategies. En: ERDOGAN, I. (Ed). Biotechnological production of plant secondary metabolites. Bentham Science Publishers, 2012. pp. 67-86.
- [8] GARZON, G. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta Biológica Colombiana, 13(3): 27-36, 2008.
- [9] BOSS, P., DAVIES, C. Molecular biology of anthocyanin accumulation in grape berries. En: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. (Ed). Grapevine molecular physiology and biotechnology. 2^{da} ed. Springer Science+Business Media B.V., 2009. pp. 263-292.
- [10] FREDES, C., YOUSEF, G., ROBERT, P., GRACE, M., LILA, M., GÓMEZ, M., GEBAUER, M., MONTENEGRO, G. Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) from different geographical regions in Chile. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(13): 2639-2648, feb. 2014.

- [11] ARAUCANIAFOODS. Imagen de maqui. [en línea] <<http://www.araucaniafoods.cl/wp-content/uploads/2013/02/maqui-300x253.jpg>> [consulta: 25 octubre 2014]
- [12] COLBUN. El maqui: la super fruta. [en línea] <https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRyaM0XDF_gAysRFbtxnntyDPJ04UCy4jQ_XCrY06UzRAUgzulSgnHTsQ> [consulta: 25 octubre 2014]
- [13] FREDES, C., MONTENEGRO, G., ZOFFOLI, J.P., GÓMEZ, M., ROBERT, P. Polyphenol content and antioxidant activity of maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stuntz). Chilean Journal of Agricultural Research, 72(4): 582-589, 2012.
- [14] INSTITUTO FORESTAL CHILENO. Monografía de maqui *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz. Plataforma de sistematización y difusión de información tecnológica de productos forestales no madereros PFNM del bosque nativo. Proyecto CONAF- INFOR, Santiago, dic. 2012. 56 p.
- [15] ESCRIBANO-BAILÓN, M., ALCALDE-EON, C., MUÑOZ, O., RIVAS-GONZALO, J., SANTOS-BUELGA, C. Anthocyanins in berries of maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). Phytochemical Analysis, 17(1): 8-14, 2006.
- [16] FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA. Resultados y lecciones en productos agroindustriales ricos en antioxidantes, a base de *berries* nativos. Serie Experiencias de innovación para el emprendimiento agrario N° 51, sept. 2009. 34 p.
- [17] VALDEBENITO, G. Existencia, uso y valor de los productos forestales no madereros (PFNM) del bosque nativo en Chile. En: Tercer Congreso Latinoamericano de IUFRO: 12 al 15 de junio de 2013, Costa Rica. Santiago, Chile, Instituto Forestal de Chile, 2013. 16 p.
- [18] RESEARCH AND MARKETS. US nutraceuticals market outlook 2018. [en línea] <<http://www.researchandmarkets.com/reports/2814285/us-nutraceuticals-market-outlook-2018>> [consulta: 17 diciembre 2014]
- [19] AGRIMUNDO. Perspectivas para los *berries* nativos en el mercado internacional. *Berries*: Reporte N°1, ODEPA, dic. 2013. 6 p.
- [20] DÍAZ, P. Producción de antocianinas de *Aristotelia chilensis* en biorreactores para uso nutracéutico. Memoria para optar al título de Ingeniera Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2014. 102 p.
- [21] MAQUI NEW LIFE. Agriculture Process. [en línea] <<http://www.maquinewlife.com/agriculture.php?op=62>> [consulta: 17 diciembre 2014]
- [22] FUNDACIÓN CHILE. Comunicado: demanda de Maqui Crece en forma Exponencial. [en línea] <www.fundacionchile.com/.../Comunicado_Maquis_RevVL_FAM.docx> [consulta: 17 diciembre 2014]

- [23] MADHAVI, D., SMITH, M., BERBER-JIMÉNEZ, M. Expression of anthocyanins in callus cultures of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait). Journal of Food Science, 60(2): 351-355, 1995.
- [24] GÓMEZ, J. Insuperables propiedades antioxidantes posee un extracto estandarizado de maqui desarrollado en UACh. [en línea] Noticias UACh. 27 de Septiembre, 2010. <<http://noticias.uach.cl/principal.php?pag=noticia-externo&cod=24232>> [consulta: 4 junio 2014]
- [25] SLATER, A., SCOTT, N., FOWLER, M. Plant Biotechnology. Oxford University Press, 2003. 346 p.
- [26] IKEUCHI, M., SUGIMOTO, K., IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. The Plant Cell, 25(9): 3159-3173, sep. 2013.
- [27] VAN STADEN, J., ZAZIMALOVA, E., GEORGE, E. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. En: GEORGE, E., HALL, M., DE CLERCK, G. (Eds). Plant Propagation by Tissue Culture (Vol I). 3^{ra} ed. Países Bajos, Springer, 2008. pp. 205-226.
- [28] MOSHKOV, I., NOVIKOVA, G., HALL, M., GEORGE, E. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. En: GEORGE, E., HALL, M., DE CLERCK, G. (Eds). Plant Propagation by Tissue Culture (Vol I). 3^{ra} ed. Países Bajos, Springer, 2008. pp. 227-281.
- [29] DAI, Z., MEDDAR, M., RENAUD, C., MERLIN, I., HILBERT, G., DELROT, S., GOMÈS, E. Long-term *in vitro* culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation. Journal of Experimental Botany, 65(16): 4665–77, ago. 2014.
- [30] GIUSTI, M., WROLSTAD, R. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En: WROLSTAD, R. (Ed). Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Son, 2001. pp. F1.2.1-F1.2.13.
- [31] ALBORNOZ, V. Calogénesis y cuantificación de trans-resveratrol en *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz y *Fragaria x ananassa* *duc* cv. *camarosa*. Memoria para optar al título de Ingeniera en Biotecnología Vegetal. Concepción, Chile. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, 2012.
- [32] LÜTTGE, U., KLUGE, M., BAUER, G. Botánica. 1^{ra} ed. Madrid, McGraw-Hill, 1993. 573 p.
- [33] LEE, J., SEO, S., KIM, B., WOO, S., KOO, B., PARK, K., LIM, Y., KIM, S. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the reed grass (*Phragmites communis* Trin.). African Journal of Biotechnology, 11(8):1904-1911. 2012.

[34] ZABALA, M., JULIANA, M., VELÁSQUEZ, A., MARIA, A., CARDONA, A., MANUEL, J., FLÓREZ, R., VALLEJO, M. Strategies for the improvement of secondary metabolites production in plan cell. Revista Facultad Nacional de Agronomía, 62(1): 4881-4895. 2009.

[35] ARIAS, M., AGUIRRE, A., ANGARITA, M., MONTOYA, C., RESTREPO, J. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. Dyna, 76(157): 109-121, mar. 2009.

[36] SIGMA-ALDRICH. Ficha de datos de seguridad. [en línea]
<<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CL&language=es&productNumber=47896&brand=SUPELCO&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D2%252C4-D%26interface%3DAI%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Des%26region%3DCL%26focus%3Dproduct>> [consulta: 22 julio 2015]

[37] MAY, M., LEAVER, C. Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. Plant Physiology. 103: 621-627. 1993

[38] NEILL, S., DESIKAN, R., CLARKE, A., HURST, R., HANCOCK, J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of Experimental Botany, 53(372): 1237-1247, may. 2002.

[39] HUNG K., CHENG D., HSU Y., KAO C. Abscisic acid-induced hydrogen peroxide is required for anthocyanin accumulation in leaves of rice seedlings. Journal of Plant Physiology, 165(12): 1280-1287, ago. 2008.

[40] EDAHIRO, J., NAKAMURA, M., SEKI, M., FURUSAKI, S. Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-Phenylalanine into the médium. Journal of Bioscience and Bioengineering, 99(1): 43-47, ene. 2005.

[41] GUTIÉRREZ, M., DEL TORO, C., RODRÍGUEZ, A., CASTELLANOS, O. Natural products extracts: terpenes and phenolics. En: ERDOGAN, I. (Ed). Biotechnological production of plant secondary metabolites. Bentham Science Publishers, 2012. pp. 21-35.

[42] ECURED. Sistema de inmersión temporal. [en línea]
<http://www.ecured.cu/index.php/Sistema_de_Inmersi%C3%B3n_Temporal> [consulta: 7 julio 2015]

[43] PREIL, W. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En: HVOSLEF-EIDE, A., PREIL, W. (Eds.). Liquid culture systems for *in vitro* plan propagation. Países Bajos, Springer, 2005. 1-21 pp.

[44] ESPE. Sistema de inmersión temporal: RITA. [en línea]
<http://images.slideplayer.es/8/2273593/slides/slide_8.jpg> [consulta: 7 julio 2015]

- [45] BELLO, J., IGLESIS, L. Desarrolla el INBIOTECA sistema de biorreactores para la micropropagación de especies vegetales de importancia para el estado de Veracruz. AGROENTORNO. pp.7-8, jun. 2012.
- [46] SANTOS, A., CABRERA, M., GÓMEZ, R., LÓPEZ, J., RAYAS, A., BASAIL, M., MEDERO, V., BEOVIDES, Y. Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga “Viequera” (*Xanthosoma* spp.). Revista Colombiana de Biotecnología, 13(2): 97-106, dic. 2011.
- [47] LEMA, FERNANDO. Regresión lineal. [apuntes] Clases de Probabilidades y Estadística, FCFM, Universidad de Chile, 2011.
- [48] ZAIONTZ, C. Mann-Whitney Test for independent samples. [en línea] <<http://www.real-statistics.com/non-parametric-tests/mann-whitney-test/>> [consulta: 31 marzo 2015]
- [49] ZAIONTZ, C. Mann-Whitney Test Table. [en línea] <<http://www.real-statistics.com/statistics-tables/mann-whitney-table/>> [consulta: 15 julio 2015]
- [50] UNAM. Práctica 4: evaluación de capacidad antioxidante y determinación de fenoles totales para frutos. [en línea] <<http://www.actiweb.es/postcosecha/archivo9.pdf>> [consulta: 31 marzo 2015]
- [51] ZAIONTZ, C. Homogeneity of Variances. [en línea] <<http://www.real-statistics.com/one-way-analysis-of-variance-anova/homogeneity-variances/>> [consulta: 31 marzo 2015]
- [52] PHYTOTECHNOLOGY LABORATORIES. Plant Media. [en línea] <<http://phytotechlab.com/index.php/plant-cell-media.html>> [consulta: 7 julio 2015]
- [53] DIGMANN, D. Cotización GYT 1914. [en línea] En: <ddigmann@genytec.cl> lunes 6 abril 2015 <msadinor@ing.uchile.cl> [consulta: 7 julio 2015]
- [54] ULRICH, G., VASUDEVAN, P. Capital Costs Quickly Calculated. Chemical Engineering, 116(4): 46-52, abr. 2009.
- [55] SIGMA-ALDRICH. Plant tissue culture system temporary immersion. [en línea] <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z373206?lang=es®ion=CL>> [consulta: 7 julio 2015]

Anexo A. Descripción de la metodología de investigación

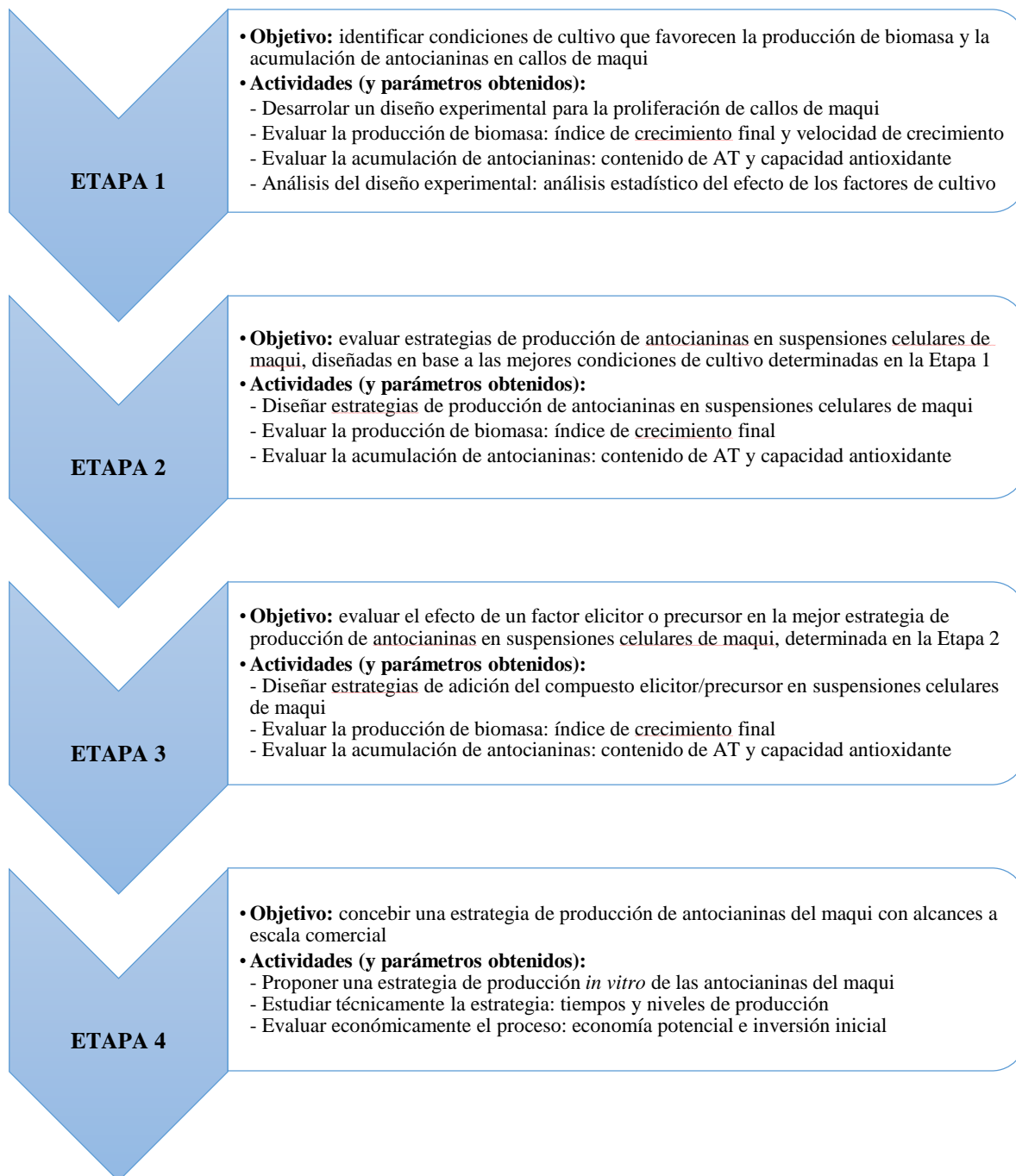


Figura A.1: Objetivos y actividades de la metodología de investigación.

Anexo B. Producción de biomasa en los cultivos de callo

B.1 Índice de crecimiento de los tratamientos

En las siguientes tablas se muestran los índices de crecimiento, semana a semana, de los cultivos de callo de *Aristotelia chilensis* establecidos de acuerdo al diseño experimental de la Tabla 2.3.2. Estos valores se calcularon según la Ecuación 1, a partir del peso de las estructuras celulares, los cuales también se tabulan a continuación.

Tabla B.1: Índice de crecimiento de los cultivos de callo al día 7.

Tratamiento	Peso fresco día 0 [g]		Peso fresco día 7 [g]		Índice de crecimiento [g/g]			
	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Promedio	Desviación estándar
3MS.C.L.c	0,26	0,23	0,31	0,27	1,19	1,17	1,18	0,01
3MS.C.L.a	0,24	0,24	0,26	0,31	1,08	1,29	1,19	0,15
6B5.C.L.d	0,24	0,26	0,25	0,29	1,04	1,12	1,08	0,05
6MS.C.L.b	0,21	0,21	0,28	0,25	1,33	1,19	1,26	0,10
3MS.C.O.d	0,20	0,21	0,21	0,20	1,05	0,95	1,00	0,07
3B5.C.O.b	0,25	0,25	0,27	0,30	1,08	1,20	1,14	0,08
6B5.C.O.c	0,25	0,23	0,30	0,25	1,20	1,09	1,14	0,08
6MS.CO.c	0,11	0,18	0,14	0,20	1,27	1,11	1,19	0,11
6B5.C.O.a	0,24	0,23	0,32	0,34	1,33	1,48	1,41	0,10
3MS.E.L.d	0,24	0,24	0,22	0,24	0,92	1,00	0,96	0,06
3B5.E.L.a	0,23	0,24	0,30	0,33	1,30	1,38	1,34	0,05
3B5.E.L.b	0,20	0,21	0,24	0,22	1,20	1,10	1,15	0,07
6B5.E.L.c	0,20	0,21	0,23	0,21	1,15	1,00	1,08	0,11
6B5.E.L.b	0,24	0,23	0,33	0,24	1,38	1,04	1,21	0,23
3MS.E.O.c	0,22	0,21	0,20	0,20	0,91	0,95	0,93	0,03
3MS.E.O.b	0,24	0,23	0,31	0,33	1,29	1,43	1,36	0,10
6B5.E.O.d	0,25	0,29	0,33	0,33	1,32	1,14	1,23	0,13
6MS.E.O.a	0,24	0,24	0,27	0,29	1,13	1,21	1,17	0,06
6MS.E.O.b	0,28	0,28	0,41	0,31	1,46	1,11	1,29	0,25
3MS.H.L.b	0,26	0,26	0,37	0,28	1,42	1,08	1,25	0,24
6MS.H.L.c	-	-	-	-	-	-	-	-
6MS.H.L.d	-	-	-	-	-	-	-	-
6B5.H.L.a	0,23	0,23	0,23	0,26	1,00	1,13	1,07	0,09
6MS.H.L.a	0,24	0,25	0,28	0,26	1,17	1,04	1,10	0,09
3B5.H.O.c	0,11	0,09	0,11	0,09	1,00	1,00	1,00	0,00
3B5.H.O.d	0,23	0,23	0,23	0,19	1,00	0,83	0,91	0,12
3B5.H.O.a	0,21	0,21	0,24	0,27	1,14	1,29	1,21	0,10
3MS.H.O.a	0,22	0,25	0,32	0,30	1,45	1,20	1,33	0,18
6MS.H.O.d	0,27	0,23	0,25	0,22	0,93	0,96	0,94	0,02
6B5.H.O.b	0,26	0,24	0,34	0,27	1,31	1,13	1,22	0,13

Tabla B.2: Índice de crecimiento de los cultivos de callo al día 14.

Tratamiento	Peso fresco día 0 [g]		Peso fresco día 14 [g]		Índice de crecimiento [g/g]			
	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Promedio	Desviación estándar
3MS.C.L.c	0,25	0,27	0,42	0,40	1,68	1,48	1,58	0,14
3MS.C.L.a	0,25	0,26	0,38	0,44	1,52	1,69	0,61	0,12
6B5.C.L.d	0,26	0,27	0,27	0,30	1,04	1,11	1,07	0,05
6MS.C.L.b	0,24	0,23	0,51	0,43	2,13	1,87	2,00	0,18
3MS.C.O.d	0,24	0,21	0,21	0,22	0,88	1,05	0,96	0,12
3B5.C.O.b	0,26	0,26	0,40	0,42	1,54	1,62	1,58	0,05
6B5.C.O.c	0,27	0,27	0,27	0,26	1,00	0,96	0,98	0,03
6MS.CO.c	0,18	0,16	0,19	0,16	1,06	0,75	0,90	0,22
6B5.C.O.a	0,28	0,25	0,43	0,41	1,54	1,64	1,59	0,07
3MS.E.L.d	0,26	0,26	0,38	0,26	1,46	1,00	1,23	0,33
3B5.E.L.a	0,25	0,25	0,50	0,53	2,00	2,12	2,06	0,08
3B5.E.L.b	0,23	0,21	0,33	0,27	1,43	1,29	1,36	0,11
6B5.E.L.c	0,24	0,21	0,34	0,25	1,42	1,19	1,30	0,16
6B5.E.L.b	0,27	0,26	0,47	0,40	1,74	1,54	1,64	0,14
3MS.E.O.c	0,24	0,22	0,25	0,23	1,04	1,05	1,04	0,00
3MS.E.O.b	0,25	0,20	0,45	0,44	1,80	2,20	2,00	0,28
6B5.E.O.d	0,30	0,30	0,35	0,33	1,17	1,10	1,13	0,05
6MS.E.O.a	0,29	0,28	0,40	0,42	1,38	1,50	1,44	0,09
6MS.E.O.b	0,27	0,27	0,48	0,44	1,78	1,63	1,70	0,10
3MS.H.L.b	0,29	0,27	0,49	0,43	1,69	1,59	1,64	0,07
6MS.H.L.c	-	-	-	-	-	-	-	-
6MS.H.L.d	-	-	-	-	-	-	-	-
6B5.H.L.a	0,24	0,28	0,41	0,43	1,71	1,54	1,62	0,12
6MS.H.L.a	0,29	0,26	0,37	0,30	1,28	1,15	1,21	0,09
3B5.H.O.c	0,10	0,11	0,07	0,11	0,70	1,00	0,85	0,21
3B5.H.O.d	0,27	0,24	0,26	0,20	0,96	0,92	0,94	0,03
3B5.H.O.a	0,20	0,25	0,27	0,40	1,35	1,60	1,48	0,18
3MS.H.O.a	0,27	0,23	0,52	0,40	1,93	1,74	1,83	0,13
6MS.H.O.d	0,27	0,26	0,25	0,37	0,93	1,42	1,17	0,35
6B5.H.O.b	0,27	0,29	0,41	0,42	1,52	1,45	1,48	0,05

Tabla B.3: Índice de crecimiento de los cultivos de callo al día 21.

Tratamiento	Peso fresco día 0 [g]		Peso fresco día 21 [g]		Índice de crecimiento [g/g]			
	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Promedio	Desviación estándar
3MS.C.L.c	0,26	0,28	0,56	0,52	2,15	1,86	2,01	0,21
3MS.C.L.a	0,26	0,28	0,45	0,46	1,73	1,64	1,69	0,06
6B5.C.L.d	0,27	0,26	0,30	0,31	1,11	1,19	1,15	0,06
6MS.C.L.b	0,24	0,24	0,72	0,63	3,00	2,63	2,81	0,27
3MS.C.O.d	0,20	0,25	0,26	0,27	1,30	1,08	1,19	0,16
3B5.C.O.b	0,30	0,29	0,45	0,71	1,50	2,45	1,97	0,67
6B5.C.O.c	0,29	0,21	0,31	0,17	1,07	0,81	0,94	0,18
6MS.CO.c	0,17	0,11	0,17	0,12	1,00	1,09	1,05	0,06
6B5.C.O.a	0,25	0,23	0,54	0,59	2,16	2,57	2,36	0,29
3MS.E.L.d	0,27	0,24	0,50	0,26	1,85	1,08	1,47	0,54
3B5.E.L.a	0,27	0,26	0,69	0,69	2,56	2,65	2,60	0,07
3B5.E.L.b	0,24	0,23	0,47	0,38	1,96	1,65	1,81	0,22
6B5.E.L.c	0,21	0,21	0,43	0,29	2,05	1,38	1,71	0,47
6B5.E.L.b	0,24	0,26	0,55	0,54	2,29	2,08	2,18	0,15
3MS.E.O.c	0,23	0,23	0,24	0,19	1,04	0,83	0,93	0,15
3MS.E.O.b	0,24	0,25	0,49	0,57	2,04	2,28	2,16	0,17
6B5.E.O.d	0,27	0,30	0,37	0,35	1,37	1,17	1,27	0,14
6MS.E.O.a	0,28	0,29	0,47	0,55	1,68	1,90	1,79	0,15
6MS.E.O.b	0,26	0,27	0,77	0,71	2,96	2,63	2,80	0,23
3MS.H.L.b	0,30	0,30	0,52	0,48	1,73	1,60	1,67	0,09
6MS.H.L.c	-	-	-	-	-	-	-	-
6MS.H.L.d	-	-	-	-	-	-	-	-
6B5.H.L.a	0,25	0,26	0,33	0,32	1,32	1,23	1,28	0,06
6MS.H.L.a	0,25	0,29	0,39	0,40	1,56	1,38	1,47	0,13
3B5.H.O.c	0,12	0,09	0,14	0,08	1,17	0,89	1,03	0,20
3B5.H.O.d	0,25	0,24	0,27	0,20	1,08	0,83	0,96	0,17
3B5.H.O.a	0,24	0,21	0,52	0,48	2,17	2,29	2,23	0,08
3MS.H.O.a	0,27	0,26	0,52	0,45	1,93	1,73	1,83	0,14
6MS.H.O.d	0,27	0,27	0,27	0,28	1,00	1,04	1,02	0,03
6B5.H.O.b	0,27	0,28	0,66	0,60	2,44	2,14	2,29	0,21

Tabla B.4: Índice de crecimiento de los cultivos de callo al día 28.

Tratamiento	Peso fresco día 0 [g]		Peso fresco día 28 [g]		Índice de crecimiento [g/g]			
	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Promedio	Desviación estándar
3MS.C.L.c	0,24	0,26	0,67	0,67	2,79	2,58	2,68	0,15
3MS.C.L.a	0,27	0,27	0,72	0,51	2,67	1,89	2,28	0,55
6B5.C.L.d	0,28	0,25	0,28	0,33	1,00	1,32	1,16	0,23
6MS.C.L.b	0,25	0,24	0,82	0,74	3,28	3,08	3,18	0,14
3MS.C.O.d	0,24	0,22	0,19	0,19	0,79	0,86	0,83	0,05
3B5.C.O.b	0,28	0,28	0,60	0,60	2,14	2,14	2,14	0,00
6B5.C.O.c	0,28	0,27	0,22	0,28	0,79	1,04	0,91	0,18
6MS.CO.c	0,14	0,12	0,12	0,18	0,86	1,50	1,18	0,45
6B5.C.O.a	0,26	0,25	0,80	0,80	3,08	3,20	3,14	0,09
3MS.E.L.d	0,29	0,29	0,44	0,43	1,52	1,48	1,50	0,02
3B5.E.L.a	0,27	0,27	0,74	0,86	2,74	3,19	2,96	0,31
3B5.E.L.b	0,25	0,20	0,59	0,47	2,36	2,35	2,36	0,01
6B5.E.L.c	0,25	0,22	0,49	0,24	1,96	1,09	1,53	0,61
6B5.E.L.b	0,26	0,26	0,53	0,71	2,04	2,73	2,38	0,49
3MS.E.O.c	0,24	0,25	0,21	0,20	0,88	0,80	0,84	0,05
3MS.E.O.b	0,23	0,24	0,74	0,80	3,22	3,33	3,28	0,08
6B5.E.O.d	0,27	0,25	0,27	0,32	1,00	1,28	1,14	0,20
6MS.E.O.a	0,27	0,29	0,67	0,79	2,48	2,72	2,60	0,17
6MS.E.O.b	0,30	0,29	0,81	0,69	2,70	2,38	2,54	0,23
3MS.H.L.b	0,30	0,25	0,76	0,52	2,53	2,08	2,31	0,32
6MS.H.L.c	-	-	-	-	-	-	-	-
6MS.H.L.d	-	-	-	-	-	-	-	-
6B5.H.L.a	0,28	0,23	0,40	0,38	1,43	1,65	1,54	0,16
6MS.H.L.a	0,29	0,29	0,55	0,44	1,90	1,52	1,71	0,27
3B5.H.O.c	0,14	0,13	0,16	0,15	1,14	1,15	1,15	0,01
3B5.H.O.d	0,26	0,24	0,25	0,27	0,96	1,13	1,04	0,12
3B5.H.O.a	0,23	0,22	0,50	0,65	2,17	2,95	2,56	0,55
3MS.H.O.a	0,25	0,25	0,55	0,51	2,20	2,04	2,12	0,11
6MS.H.O.d	0,28	0,28	0,34	0,31	1,21	1,11	1,16	0,08
6B5.H.O.b	0,26	0,28	0,73	0,70	2,81	2,50	2,65	0,22

Tabla B.5: Índice de crecimiento de los cultivos de callo al día 35.

Tratamiento	Peso fresco día 0 [g]		Peso fresco día 35 [g]		Índice de crecimiento final [g/g]			
	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Callo 1	Callo 2	Promedio	Desviación estándar
3MS.C.L.c	0,28	0,24	1,00	0,56	3,57	2,33	2,95	0,88
3MS.C.L.a	0,25	0,28	0,73	0,80	2,92	2,86	2,89	0,04
6B5.C.L.d	0,27	0,28	0,39	0,43	1,44	1,54	1,49	0,06
6MS.C.L.b	0,25	0,24	0,95	0,87	3,80	3,63	3,71	0,12
3MS.C.O.d	0,24	0,24	0,28	0,16	1,17	0,67	0,92	0,35
3B5.C.O.b	0,27	0,28	0,95	1,06	3,52	3,79	3,65	0,19
6B5.C.O.c	0,29	0,30	0,34	0,32	1,17	1,07	1,12	0,07
6MS.CO.c	-	-	-	-	-	-	-	-
6B5.C.O.a	0,27	0,26	1,03	1,15	3,81	4,42	4,12	0,43
3MS.E.L.d	0,26	0,29	0,78	0,45	3,00	1,55	2,28	1,02
3B5.E.L.a	0,26	0,26	1,09	1,18	4,19	4,54	4,37	0,24
3B5.E.L.b	0,22	0,24	0,72	0,68	3,27	2,83	3,05	0,31
6B5.E.L.c	0,22	0,21	0,42	0,29	1,91	1,38	1,65	0,37
6B5.E.L.b	0,22	0,26	0,82	0,68	3,73	2,62	3,17	0,79
3MS.E.O.c	0,20	0,25	0,20	0,22	1,00	0,88	0,94	0,08
3MS.E.O.b	0,24	0,25	0,93	1,06	3,88	4,24	4,06	0,26
6B5.E.O.d	0,29	0,25	0,32	0,27	1,10	1,08	1,09	0,02
6MS.E.O.a	0,28	0,24	0,84	0,79	3,00	3,29	3,15	0,21
6MS.E.O.b	0,27	0,28	0,87	0,84	3,22	3,00	3,11	0,16
3MS.H.L.b	0,27	0,28	0,88	0,82	3,26	2,93	3,09	0,23
6MS.H.L.c	-	-	-	-	-	-	-	-
6MS.H.L.d	-	-	-	-	-	-	-	-
6B5.H.L.a	0,25	0,27	0,66	0,46	2,64	1,70	2,17	0,66
6MS.H.L.a	0,29	0,29	0,76	0,51	2,62	1,76	2,19	0,61
3B5.H.O.c	0,14	0,08	0,16	0,07	1,14	0,88	1,01	0,19
3B5.H.O.d	0,28	0,28	0,23	0,26	0,82	0,93	0,88	0,08
3B5.H.O.a	0,23	0,23	0,73	0,81	3,17	3,52	3,35	0,25
3MS.H.O.a	0,27	0,25	0,95	0,85	3,52	3,40	3,46	0,08
6MS.H.O.d	0,28	0,28	0,31	0,24	1,11	0,86	0,98	0,18
6B5.H.O.b	0,29	0,29	1,01	0,91	3,48	3,14	3,31	0,24

B.2 Curva de crecimiento de los tratamientos

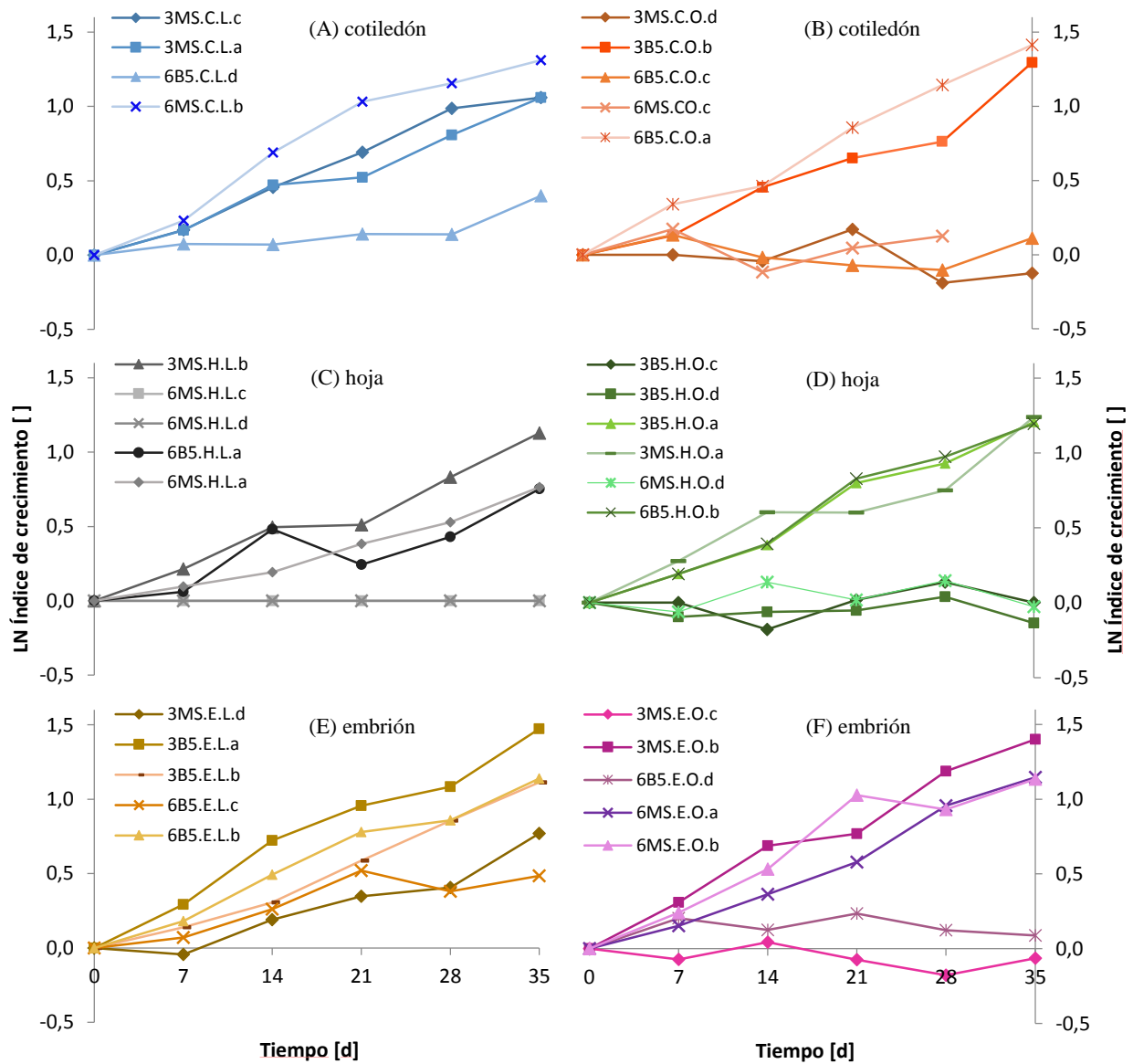


Figura B.1: Curva semilogarítmica de crecimiento de los tratamiento de callo. Los gráficos se encuentran ordenados según las distintas fuentes de explante y las condiciones de luminosidad, luz: (A), (C), (E) y oscuridad: (B), (D), (F).

B.3 Velocidad de crecimiento de los tratamientos

En la Tabla B.6 se muestran los resultados obtenidos a partir de la regresión lineal de las curvas graficadas en el Anexo B.2. Para este efecto, se realizaron dos ajustes, en el primero se consideró al intercepto como un parámetro a determinar y luego, se impuso su valor como cero, ya que estadísticamente no se puede rechazar este escenario, según el test de hipótesis aplicado. La pendiente estimada corresponde a la velocidad de crecimiento de los tratamientos de callo.

Test de hipótesis

A partir de una regresión lineal, es posible estimar la pendiente ($\hat{m} \pm \varepsilon_m$) y el intercepto ($\hat{b} \pm \varepsilon_b$) de la recta que se ajusta a la curva de crecimiento, obteniéndose para cada tratamiento una función de la siguiente forma:

$$y = \hat{m} \cdot x + \hat{b} \quad (6)$$

donde 'y' es el logaritmo del índice de crecimiento en el día 'x', para $x \in \{0, 7, 14, 21, 28, 35\}$.

Para determinar si el valor b estimado es significativamente distinto de cero, se planteó la siguiente hipótesis:

$$H_0: b = 0 \quad (7)$$

$$H_1: b \neq 0 \quad (8)$$

Luego, se calculó el siguiente estadístico, que se distribuye como una t de Student [47]:

$$t = \frac{\hat{b} - 0}{\sqrt{\widehat{\text{Var}}(\hat{b})}} \sim t_{n-2} \quad (9)$$

donde:

$$\widehat{\text{Var}}(\hat{b}) = \hat{\sigma}^2 \cdot \left(\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_x^2} \right) \quad (10)$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{S_y^2 - \hat{m}^2 \cdot S_x^2}{n - 2} \quad (11)$$

$$S_x^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (12)$$

$$S_y^2 = \sum (y_i - \bar{y})^2 \quad (13)$$

$$i = 1, \dots, n \quad n = 6 \quad (14)$$

Estimación de la velocidad de crecimiento

Tabla B.6: Velocidad de crecimiento de los tratamientos de callo. Resultados de la regresión lineal de las curvas de crecimiento y el test estadístico para el intercepto.

Tratamiento	1 ^{ra} Regresión lineal: determinación libre del valor del intercepto						2 ^{da} Regresión lineal: intercepto en el origen			
	Pendiente		Intercepto		R ²	Test estadístico		Pendiente		R ²
	\hat{m}	ϵ_m	\hat{b}	ϵ_b		Razón t	p-valor	\hat{m}	ϵ_m	
3MS.C.L.c	0,033	0,002	-0,010	0,044	0,98	-0,232	0,83	0,032	0,001	0,99
3MS.C.L.a	0,030	0,002	-0,014	0,044	0,98	-0,325	0,76	0,029	0,001	0,99
6B5.C.L.d	0,009	0,003	-0,023	0,055	0,76	-0,430	0,69	0,008	0,001	0,89
6MS.C.L.b	0,039	0,004	0,046	0,086	0,96	0,528	0,63	0,041	0,002	0,99
3MS.C.O.d	-0,004	0,004	0,039	0,091	0,18	0,428	0,69	-0,003	0,002	0,21
3B5.C.O.b	0,035	0,004	-0,063	0,081	0,95	-0,784	0,48	0,033	0,002	0,98
6B5.C.O.c	-0,001	0,004	0,023	0,077	0,01	0,296	0,78	0,000	0,002	0,00
6MS.CO.c	0,002	0,006	0,021	0,100	0,03	0,209	0,85	0,003	0,003	0,18
6B5.C.O.a	0,040	0,002	-0,003	0,043	0,99	-0,066	0,95	0,040	0,001	1,0
3MS.E.L.d	0,022	0,003	-0,104	0,074	0,91	-1,41	0,23	0,018	0,002	0,93
3B5.E.L.a	0,041	0,003	0,042	0,061	0,98	0,691	0,53	0,042	0,002	0,99
3B5.E.L.b	0,033	0,002	-0,071	0,044	0,98	-1,64	0,18	0,030	0,001	0,99
6B5.E.L.c	0,015	0,004	0,028	0,077	0,80	0,361	0,74	0,016	0,002	0,93
6B5.E.L.b	0,033	0,002	0,003	0,045	0,98	0,057	0,96	0,033	0,001	0,99
3MS.E.O.c	-0,003	0,002	-0,004	0,052	0,29	-0,072	0,95	-0,003	0,001	0,58
3MS.E.O.b	0,040	0,003	0,032	0,055	0,98	0,578	0,59	0,041	0,001	0,99
6B5.E.O.d	0,001	0,003	0,107	0,066	0,04	1,61	0,18	0,005	0,002	0,59
6MS.E.O.a	0,034	0,002	-0,063	0,047	0,98	-1,35	0,25	0,032	0,001	0,99
6MS.E.O.b	0,034	0,005	0,056	0,108	0,92	0,517	0,63	0,036	0,003	0,97
3MS.H.L.b	0,031	0,003	-0,007	0,058	0,97	-0,115	0,91	0,030	0,001	0,99
6MS.H.L.c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6MS.H.L.d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6B5.H.L.a	0,019	0,005	-0,002	0,111	0,76	-0,021	0,98	0,019	0,003	0,91
6MS.H.L.a	0,022	0,002	-0,051	0,037	0,97	-1,39	0,24	0,019	0,003	0,91
3B5.H.O.c	0,002	0,004	-0,047	0,077	0,10	-0,611	0,57	0,001	0,002	0,02
3B5.H.O.d	-0,001	0,002	-0,032	0,050	0,05	-0,648	0,55	-0,002	0,001	0,41
3B5.H.O.a	0,035	0,002	-0,033	0,046	0,98	-0,712	0,52	0,034	0,001	0,99
3MS.H.O.a	0,031	0,004	0,035	0,092	0,93	0,381	0,72	0,032	0,002	0,98
6MS.H.O.d	0,002	0,003	0,009	0,068	0,05	0,137	0,90	0,002	0,002	0,21
6B5.H.O.b	0,036	0,002	-0,028	0,051	0,98	-0,551	0,61	0,035	0,001	0,99

B.4 Comparación estadística de las velocidades de crecimiento

Test de hipótesis

Para lograr distinguir si las velocidades de crecimiento estimadas son significativamente distintas entre sí, se diseñó un test de estadístico que plantea la siguiente hipótesis¹:

$$H_0: m_1 = m_2 = \dots = m_i \quad (14)$$

$$H_1: \text{existe al menos un } j \text{ tal que } m_j \text{ es distinta del conjunto} \quad (15)$$

donde $i, j \in \{1, \dots, 30\}$ para indexar cada uno de los tratamientos del diseño experimental y, por lo tanto, m_i corresponde a la velocidad de crecimiento del tratamiento i .

Si se considera $k \in \{1, \dots, 5\}$, se puede reescribir la Ecuación 6 de la siguiente forma:

$$y_{ik} = \widehat{m}_1 \cdot x_k + \widehat{b}_1 + \widehat{\varepsilon}_{ik} \quad (16)$$

La Ecuación 16 considera que el modelo de ajuste de la velocidad de crecimiento, obtenido para cada tratamiento, tiene un residuo cuya distribución es normal y en torno a cero, dado que se asume que los errores son aleatorios y no sistemáticos.

$$\varepsilon_{ik} \sim N(0, \sigma^2) \quad (17)$$

En base a este criterio, si dos o más tratamientos tuvieran velocidades de crecimiento similares, sus residuos deberían conservar la distribución de la Ecuación 17. Considerando esta observación, se planteó el siguiente desarrollo para el test de hipótesis:

Primero, para el conjunto de tratamientos que se desea comparar, se debe determinar \widehat{m} , mediante una regresión lineal sobre los datos del grupo completo, ya que se asume que la hipótesis nula es cierta. Luego, se estiman los residuos, como se muestra a continuación:

$$\widehat{\varepsilon}_{ik} = y_{ik} - \widehat{m} \cdot x_k \quad (18)$$

Finalmente, se calcula el siguiente estadístico, que se distribuye como una Chi cuadrado:

$$V = \frac{\sum(\widehat{\varepsilon}_{ik} - 0)}{\sigma^2} \sim X_{n-2}^2 \quad (19)$$

donde σ^2 se estima como la mediana de las varianzas (de los residuos) de los tratamientos a comparar, utilizando sus respectivos \widehat{m}_i .

¹ El diseño del test estadístico se realizó con la colaboración de Sr. Roberto Amaru Cortez, ingeniero civil matemático, y profesor de Probabilidades y Estadística de la FCFM.

Comparación estadística de las velocidades

Se realizó la comparación estadística de las velocidades de crecimiento de dos subconjuntos de tratamientos, para determinar el conjunto más grande de cultivos de callos con la más alta proliferación celular.

Considerando los cinco tratamientos de callos con mayor crecimiento: 6MS.C.L.b; 3B5.E.L.a; 3MS.E.O.b; 6B5.C.O.a; 6MS.E.O.b; se obtuvo que la velocidad característica del conjunto (\hat{m}) es $0,040 \text{ d}^{-1}$. A partir de este valor, se determinaron los residuos de la Tabla B.7, según la Ecuación 18.

Tabla B.7: Residuos estimados para los cinco tratamientos con mayor velocidad de crecimiento.

Tratamiento	Residuo estimado para cada día de cultivo				
	7	14	21	28	35
6MS.C.L.b	-0,05	0,13	0,19	0,03	-0,09
3B5.E.L.a	0,01	0,16	0,12	-0,04	0,07
3MS.E.O.b	0,03	0,13	-0,07	0,06	0,00
6B5.C.O.a	0,06	-0,10	0,01	0,02	0,01
6MS.E.O.b	-0,04	-0,03	0,18	-0,19	-0,27

También se estimó la varianza de los residuos en cada tratamiento (Tabla B.8), utilizando la velocidad de crecimiento de cada uno de ellos (\hat{m}_i).

Tabla B.8: Varianza de los residuos de los cinco tratamientos con mayor velocidad de crecimiento.

Tratamiento	Residuo estimado para cada día de cultivo					Varianza de los residuos
	7	14	21	28	35	
6MS.C.L.b	-0,06	0,11	0,17	0,00	-0,13	0,01
3B5.E.L.a	0,00	0,13	0,07	-0,10	-0,01	0,01
3MS.E.O.b	0,02	0,12	-0,09	0,04	-0,03	0,01
6B5.C.O.a	0,06	-0,10	0,01	0,02	0,01	0,00
6MS.E.O.b	-0,01	0,03	0,27	-0,07	-0,12	0,02

Se calculó la mediana de las varianzas de la Tabla B.8, imponiendo σ^2 igual a $0,01 \text{ d}^{-1}$.

Finalmente, según la Ecuación 19, el valor del estadístico V es 38,7. De acuerdo a la distribución Chi cuadrado, se obtiene $p\text{-valor} = 0,021 < 0,05$. Dado esto, se rechaza la hipótesis nula de que los cinco tratamientos, antes mencionados, tienen velocidades de crecimiento iguales.

En función del resultado anterior, se continuó con la evaluación de los cuatro tratamientos más rápidos: 6MS.C.L.b; 3B5.E.L.a; 3MS.E.O.b; 6B5.C.O.a, ya que se consideró que si hubiera un tratamiento con una velocidad distinta, entonces ese sería el de menor crecimiento. Para este conjunto, se estimó $\hat{m} = 0,041$ y se obtuvieron los residuos de la Tabla B.9.

Tabla B.9: Residuos estimados para los cuatro tratamientos con mayor velocidad de crecimiento.

Tratamiento	Residuo estimado para cada día de cultivo				
	7	14	21	28	35
6MS.C.L.b	-0,06	0,11	0,17	0,00	-0,13
3B5.E.L.a	0,00	0,15	0,09	-0,07	0,03
3MS.E.O.b	0,02	0,11	-0,10	0,03	-0,04
6B5.C.O.a	0,05	-0,11	-0,01	-0,01	-0,03

De acuerdo a la varianza interna de estos tratamientos (Tabla B.8), se tiene que $\sigma^2 = 0,01$. Por lo tanto, según la Ecuación 19: $V = 20,3$; lo que determina que p-valor = 0,32. Esto indica que no se puede rechazar que las velocidades de crecimiento de 6MS.C.L.b; 3B5.E.L.a; 3MS.E.O.b; 6B5.C.O.a sean iguales.

B.5 Modelo del efecto de los factores de cultivo sobre el crecimiento celular

Evaluación del modelo

Tabla B.10: Resumen del ajuste del modelo lineal.

R²	0,965
R² ajustado	0,939
Raíz del error cuadrático medio	0,004
Media de respuesta	0,020
Observaciones	60

Tabla B.11: Análisis de la varianza del modelo. Los parámetros estadísticamente significativos se señalan con (*).

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	25	0,01519	0,00061	37,2
Error	34	0,00055	0,00002	p-valor
C. Total	59	0,01574		< 0,0001*

Tabla B.12: Análisis de la falta de ajuste del modelo.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Falta de ajuste	4	0,00006	0,00002	0,925
Error puro	30	0,00049	0,00002	p-valor
Error total	34	0,00055		0,46

Parámetros del modelo

Tabla B.13: Parámetros del modelo. Los parámetros estadísticamente significativos se señalan con (*).

Término	Estimación	Razón t	p-valor
Constante del modelo	0,02296	11,37	< 0,0001*
Hormonas [Mezcla a]	0,01265	13,49	< 0,0001*
Hormonas [Mezcla c]	-0,01255	-12,84	< 0,0001*
Hormonas [Mezcla d]	-0,01524	-15,74	< 0,0001*
Explante [C]	0,00373	4,61	< 0,0001*
Explante [E]	0,00242	3,09	0,0040*
Luminosidad [L]	0,00376	5,38	< 0,0001*
Medio basal [B5]	-0,00152	-1,78	0,0848
Sacarosa	-0,06658	-1,61	0,1169
Hormonas [Mezcla a]*(Sacarosa - 0,046)	-0,00968	-0,15	0,8854
Hormonas [Mezcla c]*(Sacarosa - 0,046)	-0,47850	-5,87	< 0,0001*
Hormonas [Mezcla d]*(Sacarosa - 0,046)	0,29758	3,83	0,0005*
Hormonas [Mezcla a]*Medio [B5]	0,00095	0,92	0,3656
Hormonas [Mezcla c]*Medio [B5]	0,00161	1,40	0,1710
Hormonas [Mezcla d]*Medio [B5]	-0,00715	-3,62	0,0009*
Hormonas [Mezcla a]*Explante [C]	-0,00083	-0,60	0,5504
Hormonas [Mezcla a]*Explante [E]	0,00184	1,35	0,1854
Hormonas [Mezcla c]*Explante [C]	0,00608	4,37	0,0001*
Hormonas [Mezcla c]*Explante [E]	-0,00393	-2,82	0,0080*
Hormonas [Mezcla d]*Explante [C]	-0,00438	-3,11	0,0038*
Hormonas [Mezcla d]*Explante [E]	0,00454	3,26	0,0025*
Hormonas [Mezcla a]*Luminosidad [L]	0,00018	0,09	0,9270
Hormonas [Mezcla c]*Luminosidad [L]	0,01485	8,63	< 0,0001*
Hormonas [Mezcla d]*Luminosidad [L]	-0,00470	-2,92	0,0062*
(Sacarosa - 0,046)*Explante [C]	0,77437	4,38	0,0001*
(Sacarosa - 0,046)*Explante [E]	-0,11272	-1,53	0,1364

Anexo C. Acumulación de antocianinas en los cultivos de callo

C.1 Contenido de AT de los tratamientos con callos morados

En las siguientes tablas se muestran las absorbancias medidas y corregidas, según el blanco correspondiente, para los extractos de antocianinas de los cultivos de callo morados de *Aristotelia chilensis*, de acuerdo al método del pH diferencial. También se analiza el fruto de maqui, como control positivo.

Tabla C.1: Absorbancia a 515 nm de los extractos de antocianinas de los callos morados de maqui (en triplicado).

	Maqui Frutos 1		Maqui Frutos 2		6B5.E.L.c Callo 1		6B5.E.L.c Callo 2		6B5.C.L.d Callo 1		6B5.C.L.d Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	3,769	0,270	3,820	0,281	0,131	0,024	0,008	0,008	0,069	0,016	0,027	0,012
Abs 2	3,728	0,269	3,668	0,281	0,140	0,025	0,012	0,009	0,070	0,016	0,029	0,013
Abs 3	3,701	0,270	3,676	0,286	0,134	0,023	0,005	0,007	0,071	0,016	0,028	0,013

	3B5.C.L.d Callo 1		3B5.C.L.d Callo 2		3MS.E.L.d Callo 1		3MS.E.L.d Callo 2		3MS.C.L.d Callo 1		3MS.C.L.d Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,128	0,029	0,130	0,032	0,040	0,017	0,032	0,010	0,053	0,012	0,045	0,009
Abs 2	0,131	0,026	0,131	0,032	0,038	0,016	0,033	0,011	0,056	0,011	0,045	0,010
Abs 3	0,131	0,028	0,129	0,034	0,042	0,015	0,032	0,009	0,056	0,011	0,043	0,011

	3MS.E.L.c Callo 1		3MS.E.L.c Callo 2		3MS.C.L.c Callo 1		3MS.C.L.c Callo 2		3B5.E.L.d Callo 1		3B5.E.L.d Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,030	0,010	0,036	0,012	0,073	0,016	0,093	0,024	0,048	0,015	0,091	0,018
Abs 2	0,033	0,009	0,036	0,011	0,076	0,015	0,099	0,024	0,053	0,014	0,098	0,018
Abs 3	0,031	0,009	0,034	0,012	0,076	0,014	0,096	0,022	0,056	0,014	0,100	0,019

Tabla C.2: Absorbancia a 700 nm de los extractos de antocianinas de los callos morados de maqui (en triplicado).

	Maqui Frutos 1		Maqui Frutos 2		6B5.E.L.c Callo 1		6B5.E.L.c Callo 2		6B5.C.L.d Callo 1		6B5.C.L.d Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,014	0,013	0,011	0,012	0,007	0,008	0,004	0,005	0,007	0,006	0,006	0,007
Abs 2	0,014	0,012	0,011	0,012	0,009	0,008	0,008	0,006	0,007	0,005	0,007	0,007
Abs 3	0,011	0,012	0,011	0,014	0,005	0,008	0,003	0,005	0,007	0,006	0,006	0,007

	3B5.C.L.d Callo 1		3B5.C.L.d Callo 2		3MS.E.L.d Callo 1		3MS.E.L.d Callo 2		3MS.C.L.d Callo 1		3MS.C.L.d Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,010	0,014	0,014	0,014	0,005	0,008	0,004	0,004	0,001	0,006	0,003	0,004
Abs 2	0,007	0,011	0,012	0,013	0,003	0,006	0,003	0,004	0,001	0,004	0,001	0,005
Abs 3	0,007	0,011	0,011	0,014	0,006	0,006	0,003	0,004	0,002	0,005	0,000	0,006

	3MS.E.L.c Callo 1		3MS.E.L.c Callo 2		3MS.C.L.c Callo 1		3MS.C.L.c Callo 2		3B5.E.L.d Callo 1		3B5.E.L.d Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,001	0,005	0,002	0,007	0,002	0,008	0,008	0,011	0,002	0,007	0,007	0,007
Abs 2	0,002	0,004	0,001	0,005	0,006	0,007	0,005	0,011	0,002	0,007	0,009	0,007
Abs 3	0,002	0,005	0,001	0,007	0,005	0,006	0,006	0,009	0,007	0,007	0,007	0,007

Utilizando los datos de la Tabla C.3, se calculó la concentración de antocianinas totales presente en cada extracto de estos compuestos, de acuerdo a las Ecuaciones 2 y 3.

Tabla C.3: Parámetros requeridos para el cálculo de AT según Ecuación 3.

PM	449
DF	5
ϵ	26.900
l	0,27

Posteriormente, se calculó el contenido de AT por peso seco de biomasa (Tabla C.5), según la siguiente ecuación:

$$AT \text{ por peso seco} = \frac{AT \cdot V_{\text{extracto}}}{PS \cdot 0,001 \frac{\text{g}}{\text{mg}}} \quad (20)$$

donde $V_{\text{extracto}} = 0,01$ L porque todas las extracciones se hicieron en un volumen final de 10 mL y PS corresponde a los valores de la biomasa seca en miligramos, tabulados en la Tabla C.4.

Tabla C.4: Peso seco de la biomasa utilizada para la extracción de antocianinas desde callos morados.

Tratamiento	Biomasa seca [mg]	
	Duplicado 1	Duplicado 2
Fruto Maqui	648	640
6B5.E.L.c	38,4	24,6
6B5.C.L.d	43,4	45,5
3B5.C.L.d	45,8	60,1
3MS.E.L.d	36,4	18,1
3MS.C.L.d	25,2	21,8
3MS.E.L.c	25,8	28,3
3MS.C.L.c	30,2	55,6
3B5.E.L.d	33,8	35,5

Tabla C.5: Contenido de AT por biomasa seca de los tratamientos con callos morados.

Tratamiento	Contenido de AT [mg cia-3-glu/g PS]			
	Duplicado 1	Duplicado 2	Promedio	Desviación estándar
Fruto Maqui	17	17	17	0,29
6B5.E.L.c	9,1	0,072	4,6	4,5
6B5.C.L.d	3,8	1,1	2,4	1,5
3B5.C.L.d	7,2	5,1	6,2	1,2
3MS.E.L.d	2,3	4,0	3,1	0,94
3MS.C.L.d	5,9	5,3	5,6	0,32
3MS.E.L.c	3,0	3,1	3,1	0,090
3MS.C.L.c	6,5	4,3	5,4	1,2
3B5.E.L.d	3,8	6,7	5,3	1,6

Se comparó estadísticamente el contenido de AT del cultivo con mayor promedio de estos compuestos, 3B5.C.L.d, con respecto a los demás tratamientos de callo de maqui. Para este efecto, se utilizó el test no paramétrico U de Mann Whitney para corroborar la hipótesis nula de que los tratamientos en cuestión tienen igual promedio [48, 49]. Los resultados se tabulan en la Tabla C.6.

Tabla C.6: Análisis estadístico del contenido de antocianinas totales de los tratamiento con callos morados.

Tratamiento	U	U _{crit}	¿Promedio igual al de 3B5.C.L.d?
Fruto maqui	0	5	No
6B5.E.L.c	18	5	No se puede rechazar
6B5.C.L.d	0	5	No
3MS.E.L.d	0	5	No
3MS.C.L.d	17	5	No se puede rechazar
3MS.E.L.c	0	5	No
3MS.C.L.c	9	5	No se puede rechazar
3B5.E.L.d	10	5	No se puede rechazar

C.2 Capacidad antioxidante de los tratamientos con callos morados

Curva de calibración de Trolox

Se midió la absorbancia de los patrones de Trolox, a distintas concentraciones, de acuerdo al protocolo de DPPH y luego se calculó el porcentaje de inhibición de la reacción de oxidación de acuerdo a la Ecuación 4. Estos valores se muestran en las Tabla C.7 y Tabla C.8

Tabla C.7: Valores de absorbancia medidos para los patrones de Trolox según el protocolo de DPPH.

	Concentración de Trolox [g/L]						
	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Abs 1	0,178	0,162	0,115	0,094	0,027	0,055	0,000
Abs 2	0,182	0,172	0,116	0,106	0,028	0,025	0,001
Abs 3	0,194	0,168	0,123	0,100	0,037	0,032	0,006
Absorbancia Promedio	0,185	0,168	0,118	0,100	0,031	0,038	0,003
Desviación estándar	0,008	0,005	0,004	0,006	0,006	0,016	0,003

Tabla C.8: Inhibición de la oxidación calculada para los patrones de Trolox según el protocolo de DPPH.

	Concentración de Trolox [g/L]						
	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Inhibición de la oxidación	0%	9%	36%	46%	83%	80%	99%

Con los valores de la Tabla C.8 se graficó la curva de calibración de Trolox (Figura C.1)

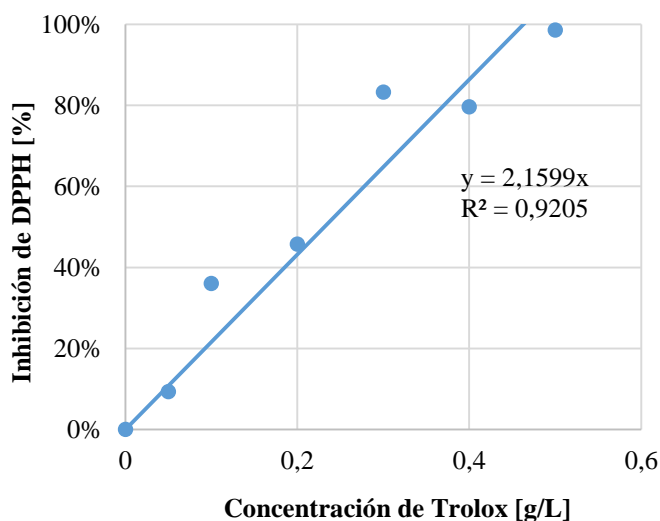


Figura C.1: Curva de calibración de Trolox

En la Figura C.1, se ajustó una relación lineal entre la concentración de Trolox y el porcentaje de inhibición de la actividad oxidante del DPPH, dada por la Ecuación 21.

$$\text{Inhibición de DPPH [\%]} = 2,16 \cdot \text{Trolox [g/L]} \quad (21)$$

Capacidad antioxidante de los callos morados

En la siguiente tabla se muestran las absorbancias medidas y corregidas, según el blanco correspondiente, para los extractos de antocianinas de los cultivos de callo morados de *Aristotelia chilensis*, de acuerdo al método de DPPH. También se analiza el fruto de maqui, como control positivo.

Tabla C.9: Absorbancia a 520 nm de los extractos de antocianinas de callos morados (en triplicado), según protocolo de DPPH.

	Maqui* Frutos 1	Maqui* Frutos 2	6B5.E.L.c Callo 1	6B5.E.L.c Callo 2	3B5.C.L.d Callo 1	3B5.C.L.d Callo 2
Abs 1	0,156	0,126	0,150	0,180	0,140	0,144
Abs 2	0,160	0,130	0,167	0,171	0,145	0,142
Abs 3	0,175	0,144	0,150	0,160	0,166	0,140

	3MS.C.L.d Callo 1	3MS.C.L.d Callo 2	3MS.C.L.c Callo 1	3MS.C.L.c Callo 2	3B5.E.L.d Callo 1	3B5.E.L.d Callo 2
Abs 1	0,172	0,121	0,166	0,175	0,168	0,144
Abs 2	0,165	0,151	0,184	0,180	0,145	0,154
Abs 3	0,178	0,151	0,165	0,177	0,151	0,146

* Los extractos evaluados de maqui se encontraban diluidos 36 veces.

Para cada extracto de antocianinas, se calculó el porcentaje de inhibición de DPPH según la Ecuación 4 y, posteriormente, se interpoló la concentración equivalente de Trolox presente en la reacción de oxidación, utilizando la Ecuación 21. Finalmente, se calculó la capacidad antioxidante como el contenido equivalente de Trolox por peso seco de biomasa (Tabla C.10), de acuerdo a la Ecuación 22 [50].

$$\text{Contenido de Trolox por peso seco} = \frac{\text{Trolox [g/L]} \cdot V_{\text{extracto}} \cdot \text{DF}}{\text{PS} \cdot 0,001 \frac{\text{g}}{\text{mg}}} \quad (22)$$

donde $V_{\text{extracto}} = 0,01$ L porque todas las extracciones se hicieron en un volumen final de 10 mL, PS corresponde a los valores de la biomasa seca en miligramos, tabulados en la Tabla C.4, y DF corresponde al factor de dilución de la solución de reacción, que corresponde a 39 para todos los casos, excepto los frutos de maqui cuyo extracto tenía una dilución adicional de 36 veces.

Tabla C.10: Capacidad antioxidante por biomasa seca de los tratamientos con callos morados

Tratamiento	Capacidad antioxidante [g Trolox/g PS]			
	Duplicado 1	Duplicado 2	Promedio	Desviación estándar
Fruto Maqui	1,1	2,8	2,0	1,0
6B5.E.L.c	0,74	0,57	0,65	0,31
3B5.C.L.d	0,73	0,69	0,71	0,19
3MS.C.L.d	0,50	2,0	1,2	0,95
3MS.C.L.c	0,42	0,13	0,27	0,27
3B5.E.L.d	0,87	1,0	0,94	0,25

Se comparó estadísticamente la capacidad antioxidante del cultivo con mayor contenido equivalente de Trolox, 3MS.C.L.d, con respecto a los demás tratamientos. Para este efecto, se utilizó el test no paramétrico U de Mann Whitney para corroborar la hipótesis nula de que los tratamientos en cuestión tienen igual promedio [48, 49].

Tabla C.11: Análisis estadístico de la capacidad antioxidante de los tratamiento con callos morados

Tratamiento	U	U _{crit}	¿Promedio igual al de 3MS.C.L.d?
Fruto Maqui	9	5	No se puede rechazar
6B5.E.L.c	12	5	No se puede rechazar
3B5.C.L.d	18	5	No se puede rechazar
3MS.C.L.c	4	5	No
3B5.E.L.d	16	5	No se puede rechazar

C.3 Estudio del criterio de selección de la metodología de *screening*

Para corroborar que es correcto considerar que la coloración morada de los callos es un indicador certero respecto de una mayor acumulación de antocianinas, en comparación a las estructuras celulares de otros colores, se seleccionaron cuatro tratamientos cuya pigmentación característica es verde o blanca, con más o menos pintas rosadas. En la Figura C.2 se muestran callos de los cultivos escogidos. Para estos tratamientos, se midió la absorbancia de sus extractos de antocianinas, de acuerdo al método del pH diferencial (Tabla C.12 y Tabla C.13).

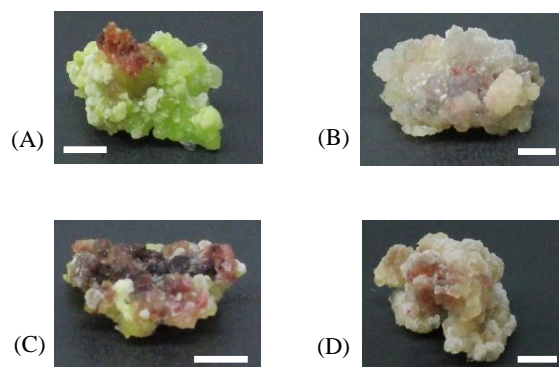


Figura C.2: Tratamientos de callos seleccionados para la evaluación del *screening*. (A) 3B5.E.L.a: callo verde con una pinta burdeos; (B) 6MS.E.O.a: callo blanco con pequeña pinta rosada; (C) 6B5.H.L.a: callo verde con gran zona rosada y morada; (D) 3B5.C.O.b: callo blanco con pinta y tonalidad rosada. Barra 5 mm.

Tabla C.12: Absorbancia a 515 nm de los extractos de antocianinas seleccionados para la evaluación del *screening* (en triplicado).

	6MS.E.O.a Callo 1		6MS.E.O.a Callo 2		3B5.E.L.a Callo 1		3B5.E.L.a Callo 2		3B5.C.O.b Callo 1		3B5.C.O.b Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,030	0,031	0,031	0,027	0,052	0,043	0,057	0,050	0,040	0,038	0,060	0,048
Abs 2	0,033	0,035	0,031	0,027	0,054	0,045	0,058	0,052	0,042	0,037	0,069	0,047
Abs 3	0,036	0,037	0,031	0,029	0,053	0,045	0,058	0,050	0,043	0,038	0,062	0,050

	6B5.H.L.a Callo 1		6B5.H.L.a Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,060	0,026	0,073	0,022
Abs 2	0,062	0,026	0,079	0,022
Abs 3	0,062	0,025	0,075	0,022

Tabla C.13: Absorbancia a 700 nm de los extractos de antocianinas seleccionados para la evaluación del *screening* (en triplicado).

	6MS.E.O.a Callo 1		6MS.E.O.a Callo 2		3B5.E.L.a Callo 1		3B5.E.L.a Callo 2		3B5.C.O.b Callo 1		3B5.C.O.b Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,016	0,019	0,017	0,018	0,028	0,026	0,031	0,030	0,023	0,024	0,034	0,033
Abs 2	0,019	0,026	0,016	0,017	0,029	0,028	0,033	0,032	0,023	0,022	0,042	0,031
Abs 3	0,018	0,025	0,017	0,018	0,030	0,029	0,032	0,031	0,025	0,024	0,035	0,034

	6B5.H.L.a Callo 1		6B5.H.L.a Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,012	0,013	0,008	0,009
Abs 2	0,014	0,014	0,010	0,007
Abs 3	0,015	0,013	0,010	0,010

Utilizando los datos de la Tabla C.3, se calculó la concentración de antocianinas totales presente en cada extracto de estos compuestos, de acuerdo a las Ecuaciones 2 y 3. Posteriormente, se calculó el contenido de AT por peso seco de biomasa (Tabla C.15), según la Ecuación 20, para un V_{extracto} de 0,01 L y considerando la biomasa seca tabulada en la Tabla C.14.

Tabla C.14: Peso seco de la biomasa utilizada para la evaluación del *screening*.

Tratamiento	Biomasa seca [mg]	
	Callo 1	Callo 2
6MS.E.O.a	89,1	79,9
3B5.E.L.a	116	132
3B5.C.O.b	97,0	115
6B5.H.L.a	58,0	77,2

Tabla C.15: Contenido de AT por biomasa seca de los tratamientos seleccionados para la evaluación del *screening*.

Tratamiento	Contenido de AT [mg cia-3-glu/g PS]			
	Callo 1	Callo 2	Promedio	Desviación estándar
6MS.E.O.a	0,13	0,17	0,15	0,045
3B5.E.L.a	0,20	0,13	0,16	0,039
3B5.C.O.b	0,11	0,30	0,21	0,10
6B5.H.L.a	1,9	2,1	2,0	0,14

C.4 Análisis de AT de un estándar de cloruro de cianidina

Para evaluar la precisión de las mediciones realizadas mediante el método del pH diferencial, se realizó el análisis de un estándar de cloruro de cianidina, en cuatro concentraciones distintas: 35 mg/L; 20 mg/L; 5 mg/L; y 1 mg/L. Para estas soluciones, se midió la absorbancia de sus extractos de antocianinas, de acuerdo al método del pH diferencial (Tabla C.16 y Tabla C.17).

Tabla C.16: Absorbancia a 515 nm de los estándares de cloruro de cianidina (en triplicado).

	Estándar 1 35 mg/L		Estándar 2 20 mg/L		Estándar 3 5 mg/L		Estándar 4 1 mg/L	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
	Abs 1	0,20	0,049	0,18	0,056	0,065	0,066	0,13
Abs 2	0,13	0,067	0,11	0,056	0,074	0,068	0,17	0,14
Abs 3	0,16	0,060	0,11	0,14	0,085	0,074	0,11	0,094

Tabla C.17: Absorbancia a 700 nm de los estándares de cloruro de cianidina (en triplicado).

	Estándar 1 35 mg/L		Estándar 2 20 mg/L		Estándar 3 5 mg/L		Estándar 4 1 mg/L	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
	Abs 1	0,057	0,040	0,061	0,039	0,031	0,046	0,083
Abs 2	0,049	0,063	0,043	0,035	0,036	0,045	0,069	0,064
Abs 3	0,057	0,031	0,050	0,118	0,048	0,054	0,045	0,051

Utilizando los datos de la Tabla C.3, se calculó la concentración de antocianinas totales presente en cada extracto de estos compuestos (Tabla C.18), de acuerdo a las Ecuaciones 2 y 3.

Tabla C.18: Concentración de AT en los estándares de cloruro de cianidina.

Cloruro de cianidina	Contenido de AT [mg cia-3-glu/g PS]	
	Promedio	Desviación estándar
Estándar 1	29	11
Estándar 2	20	9,0
Estándar 3	4,8	0,39
Estándar 4	4,7	4,2

Los valores de la Tabla C.18 se graficaron en función de la concentración del respectivo estándar (Figura C.3) y se ajustaron los puntos a una recta con intercepto en el origen, cuya pendiente es $0,87 \pm 0,07$.

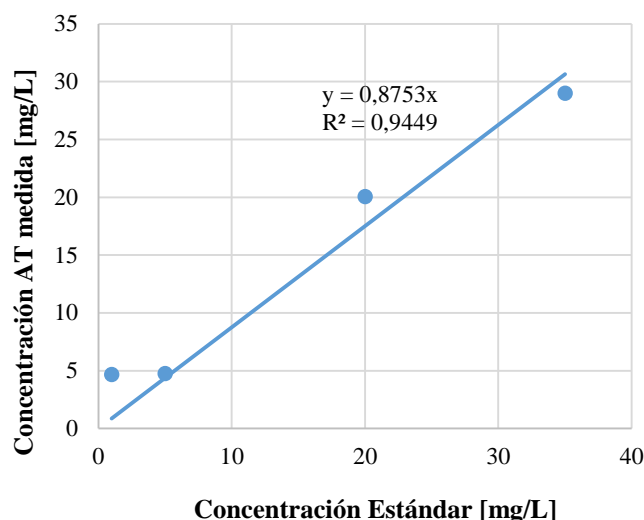


Figura C.3: Curva de concentración de AT de los estándares de cianidina.

C.5 Análisis de AT en el fenómeno de habituación a las hormonas

Para analizar cuantitativamente el efecto de la ausencia de hormonas en la acumulación de antocianinas en los callos de maqui, se mantuvieron callos de un mismo tratamiento en presencia y ausencia de la correspondiente mezcla de hormonas. Estos se recolectaron luego de 15 semanas de cultivo, presentándose en ambos casos una pigmentación rosada a morada (Figura C.4).

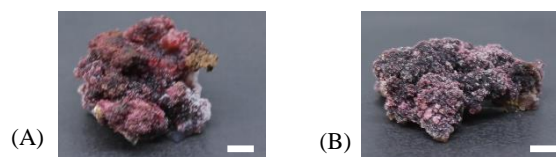


Figura C.4: Pigmentación de los cultivos utilizados para estudiar la habituación hormonal. Callo mantenido (A) con hormonas (3B5.E.L.d) y (B) sin hormonas (3B5.E.L.sh) durante 15 semanas. Barra 5 mm.

Para ambos tratamientos, se midió la absorbancia de sus extractos de antocianinas, de acuerdo al método del pH diferencial (Tabla C.19 y Tabla C.20).

Tabla C.19: Absorbancia a 515 nm de los tratamientos evaluados para estudiar el fenómeno de habituación (en triplicado).

	3B5.E.L.d Callo 1		3B5.E.L.d Callo 2		3B5.E.L.sh Callo 1		3B5.E.L.sh Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
	Abs 1	0,710	0,157	0,274	0,104	0,821	0,160	0,387
Abs 2	0,719	0,163	0,299	0,099	0,888	0,161	0,406	0,100
Abs 3	0,728	0,165	0,294	0,100	0,904	0,162	0,395	0,097

Tabla C.20: Absorbancia a 700 nm de los tratamientos evaluados para estudiar el fenómeno de habituación (en triplicado).

	3B5.E.L.d Callo 1		3B5.E.L.d Callo 2		3B5.E.L.sh Callo 1		3B5.E.L.sh Callo 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
	Abs 1	0,066	0,076	0,054	0,057	0,071	0,076	0,042
Abs 2	0,069	0,082	0,056	0,051	0,077	0,074	0,042	0,049
Abs 3	0,073	0,085	0,058	0,052	0,085	0,075	0,041	0,045

Utilizando los datos de la Tabla C.3, se calculó la concentración de antocianinas totales presente en cada extracto de estos compuestos, de acuerdo a las Ecuaciones 2 y 3. Posteriormente, se calculó el contenido de AT por peso seco de biomasa (Tabla C.22 y Figura C.5), según la Ecuación 20, para un V_{extracto} de 0,01 L y considerando la biomasa seca tabulada en la Tabla C.21.

Tabla C.21: Peso seco de la biomasa utilizada para estudiar el fenómeno de habituación.

Tratamiento	Biomasa seca [mg]	
	Callo 1	Callo 2
3B5.E.L.d	134	62,0
3B5.E.L.sh	100	52,8

Tabla C.22 Contenido de AT por biomasa seca de los tratamientos evaluados para estudiar el fenómeno de habituación.

Tratamiento	Contenido de AT [mg cia-3-glu/g PS]			
	Callo 1	Callo 2	Promedio	Desviación estándar
3B5.E.L.d	13	9,3	11	2,2
3B5.E.L.sh	22	18	20	2,4

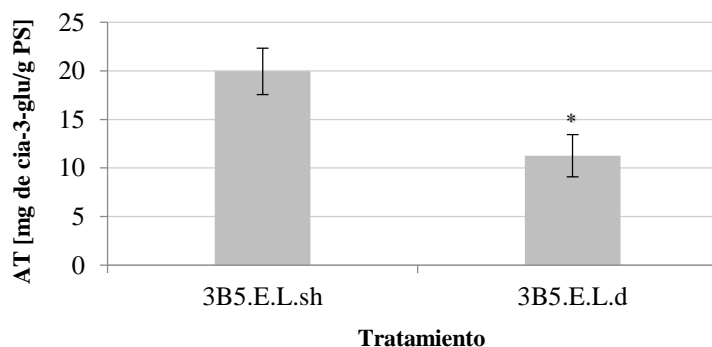


Figura C.5: Contenido de antocianinas totales y el fenómeno de habituación. (*) indica una diferencia significativa respecto al tratamiento con mayor contenido de AT.

Se comparó estadísticamente el contenido de AT, mediante el test no paramétrico U de Mann Whitney, obteniéndose $U = 0 < U_{\text{crit}} = 15$ [48, 49]. Por lo tanto, ambos tratamientos serían significativamente distintos.

Anexo D. Producción de biomasa en suspensiones celulares

D.1 Evidencia de formación de agregados celulares

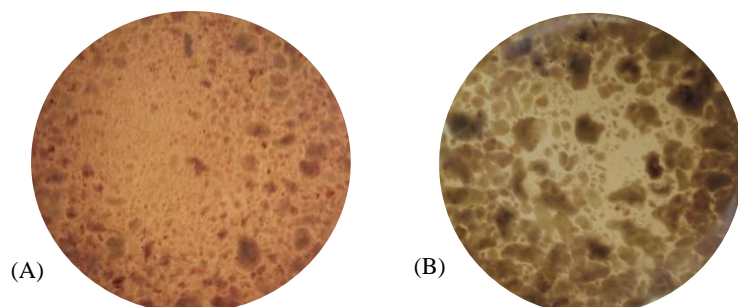


Figura D.1: Vista del cultivo en suspensión desde la superficie inferior del matraz, a contra luz. (A) Estrategia 1: Fase A en luz; (B) Estrategia 2: Fase A en oscuridad

D.2 Índice de crecimiento final de las estrategias

En la Tabla D.2 se muestra el índice de crecimiento final de las estrategias de cultivo de células de *Aristotelia chilensis* en suspensiones celulares, de acuerdo al diseño experimental de la Figura 3.2.2. Estos valores se calcularon según la Ecuación 1, a partir del peso de las estructuras celulares, los cuales se tabulan en la Tabla D.1.

Tabla D.1: Peso inicial y final de la biomasa en las suspensiones celulares de las Estrategias 1 y 2.

Tratamiento	Peso fresco día 0 [g]			Peso fresco día 35 [g]		
	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
Estrategia 1 Fase A en luz	2,71	2,87	2,72	15,2	15,2	16,2
Estrategia 2 Fase A en oscuridad	3,13	2,63	3,21	13,7	13,1	14,1

Tabla D.2: Índice de crecimiento final de las suspensiones celulares de las Estrategias 1 y 2.

Tratamiento	Índice de crecimiento final [g/g]				
	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Promedio	Desviación estándar
Estrategia 1 Fase A en luz	5,62	5,29	5,94	5,62	0,33
Estrategia 2 Fase A en oscuridad	4,38	4,97	4,38	4,58	0,34

La Estrategia 1 con mayor índice de crecimiento final, se comparó estadísticamente con el cultivo en suspensión desarrollado con Fase A en oscuridad y con los dos tratamientos de callo que se utilizaron como control de la producción de biomasa, 6MS.C.L.b y 6B5.C.O.a. Para este efecto, se utilizó el test t-Student para corroborar la hipótesis nula de que los tratamientos en cuestión tienen igual promedio (Tabla D.4), por lo que previamente se aplicó el test de Levene para estudiar la varianza de los datos (Tabla D.3) [51].

Tabla D.3: Resultados del test de Levene.

Tratamiento	p-valor	¿Varianza similar a la de la Estrategia 1?
Estrategia 2	0,75	No se puede rechazar
6MS.C.L.b	0,41	No se puede rechazar
6B5.C.O.a	0,58	No se puede rechazar

Tabla D.4: Resultados del test t-Student.

Tratamiento	p-valor	¿Promedio igual al de la Estrategia 1?
Estrategia 2	0,02	No
6MS.C.L.b	0,02	No
6B5.C.O.a	0,004	No

Anexo E. Acumulación de antocianinas en suspensiones celulares

E.1 Contenido de AT en las estrategias 1 y 2

En las siguientes tablas se muestran las absorbancias medidas y corregidas, según el blanco correspondiente, para los extractos de antocianinas de los cultivos en suspensión de *Aristotelia chilensis* desarrollados bajo las estrategias de la Sección 3.2, de acuerdo al método del pH diferencial.

Tabla E.1: Absorbancia a 515 nm de los extractos de antocianinas de las Estrategias 1 y 2.

	Estrategia 1 Matraz 1		Estrategia 1 Matraz 2		Estrategia 1 Matraz 3		Estrategia 2 Matraz 1		Estrategia 2 Matraz 2		Estrategia 2 Matraz 3	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,194	0,136	0,190	0,135	0,179	0,146	0,164	0,154	0,165	0,146	0,189	0,152
Abs 2	0,194	0,142	0,194	0,143	0,180	0,144	0,163	0,155	0,162	0,147	0,199	0,157
Abs 3	0,202	0,143	0,192	0,138	0,182	0,145	0,169	0,157	0,165	0,154	0,190	0,151

Tabla E.2: Absorbancia a 700 nm de los extractos de antocianinas de las Estrategias 1 y 2.

	Estrategia 1 Matraz 1		Estrategia 1 Matraz 2		Estrategia 1 Matraz 3		Estrategia 2 Matraz 1		Estrategia 2 Matraz 2		Estrategia 2 Matraz 3	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,115	0,092	0,109	0,093	0,116	0,100	0,088	0,108	0,090	0,103	0,118	0,111
Abs 2	0,116	0,099	0,108	0,099	0,117	0,099	0,087	0,110	0,088	0,102	0,125	0,115
Abs 3	0,118	0,099	0,107	0,091	0,118	0,100	0,091	0,113	0,090	0,107	0,115	0,117

Utilizando los datos de la Tabla C.3, se calculó la concentración de antocianinas totales presente en cada extracto de estos compuestos, de acuerdo a las Ecuaciones 2 y 3. Posteriormente, se calculó el contenido de AT por peso seco de biomasa (Tabla E.4) según la Ecuación 20, para un V_{extracto} de 0,05 L y considerando la biomasa seca tabulada en la Tabla E.3.

Tabla E.3: Peso seco de la biomasa utilizada para estudiar el fenómeno de habituación.

Tratamiento	Biomasa seca [mg]		
	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
Estrategia 1	772	767	803
Estrategia 2	771	758	819

Tabla E.4: Contenido de AT por biomasa seca de los tratamientos evaluados para estudiar el fenómeno de habituación.

Tratamiento	Contenido de AT [mg cia-3-glu/g PS]				
	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Promedio	Desviación estándar
Estrategia 1	0,74	0,79	0,35	0,63	0,21
Estrategia 2	0,63	0,60	0,64	0,63	0,06

La Estrategia 1 se comparó estadísticamente con el cultivo en suspensión desarrollado con Fase A en oscuridad y con el tratamientos de callo que se utilizó como control de la producción de antocianinas, 3MS.C.L.d. Para este efecto, se utilizó el test no paramétrico U de Mann Whitney para corroborar la hipótesis nula de que los tratamientos en cuestión tienen igual promedio [48, 49]. Los resultados se tabulan en la Tabla E.5.

Tabla E.5: Análisis estadístico del contenido de antocianinas totales de los tratamiento con callos morados

Tratamiento	U	U _{crit}	¿Promedio igual al de la Estrategia 1?
Estrategia 2	29	17	No se puede rechazar
3MS.C.L.d	0	10	No

E.2 Capacidad antioxidante de las estrategias 1 y 2

En la siguiente tabla se muestran las absorbancias medidas y corregidas, según el blanco correspondiente, para los extractos de antocianinas de los cultivos en suspensión desarrollados bajo las estrategias de la Sección 3.2, de acuerdo al método de DPPH.

Tabla E.6: Absorbancia a 520 nm de los extractos de antocianinas de las estrategias 1 y 2, según protocolo de DPPH.

	Estrategia 1 Matraz 1	Estrategia 1 Matraz 2	Estrategia 1 Matraz 3	Estrategia 2 Matraz 1	Estrategia 2 Matraz 2	Estrategia 2 Matraz 3
Abs 1	0,123	0,102	0,093	0,165	0,065	0,163
Abs 2	0,107	0,105	0,078	0,098	0,058	0,121
Abs 3	0,127	0,126	0,077	0,103	0,063	0,111

Para cada extracto de antocianinas, se calculó la capacidad antioxidante utilizando las Ecuaciones 4, 21 y 22. Para ello, se consideró $V_{\text{extracto}} = 0,05$ L y $DF = 39$; el PS corresponde a los valores de la biomasa seca en miligramos, tabulados en la Tabla E.3. Los resultados se muestran en la Tabla E.7.

Tabla E.7: Capacidad antioxidante por biomasa seca de las estrategias 1 y 2.

Tratamiento	Capacidad antioxidante [g Trolox/g PS]				
	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Promedio	Desviación estándar
Estrategia 1	0,42	0,47	0,62	0,50	0,11
Estrategia 2	0,40	0,79	0,32	0,50	0,26

Se comparó estadísticamente la capacidad antioxidante de la Estrategia 1 con el cultivo en suspensión desarrollado con Fase A en oscuridad y con el tratamientos de callo que se utilizó como control de la producción de antocianinas, 3MS.C.L.d. Para este efecto, se utilizó el test no paramétrico U de Mann Whitney para corroborar la hipótesis nula de que los tratamientos en cuestión tienen igual promedio [48, 49]. Los resultados se tabulan en la Tabla E.8.

Tabla E.8: Análisis estadístico de la capacidad antioxidante de las estrategias 1 y 2.

Tratamiento	U	U _{crit}	¿Promedio igual al de la Estrategia 1?
Estrategia 2	38	17	No se puede rechazar
3MS.C.L.d	15	10	No se puede rechazar

E.3 Color de los extractos de antocianinas

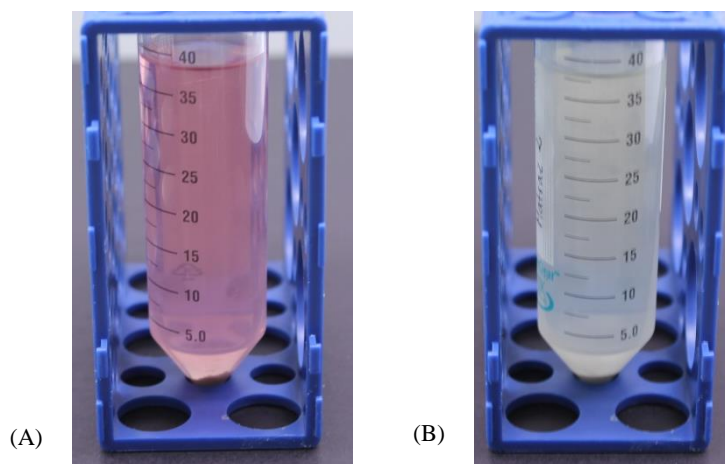


Figura E.1: Ejemplo del color de los extractos de antocianinas. (A) Estrategia 1: Fase A en luz; (B) Estrategia 2: Fase A en oscuridad.

Anexo F. Producción de biomasa en suspensiones celulares con adición de un factor elicitor o precursor

F.1 Tabla de titulación del medio de cultivo

Para modificar el pH de las suspensiones celulares del tratamiento Elicitor pH Medio, se construyeron las siguientes tablas de titulación.

Tabla F.1: Tabla de titulación para 40 mL de medio de cultivo.

Volumen adicional de HCl 1 M	pH
-	5,64
5 μ L	5,30
5 μ L	4,89
5 μ L	4,53
5 μ L	4,23
5 μ L	4,02
5 μ L	3,87
5 μ L	3,71

Tabla F.2: Tabla de titulación para 50 mL de medio de cultivo.

Volumen adicional de HCl 1 M	pH
-	5,61
30 μ L	4,05
5 μ L	3,90
5 μ L	3,79
5 μ L	3,69

F.2 Índice de crecimiento final de las estrategias

En la Tabla F.4 se muestra el índice de crecimiento final de las estrategias de cultivo de células de *Aristotelia chilensis* en suspensiones celulares, de acuerdo al diseño experimental de la Sección 3.3. Estos valores se calcularon según la Ecuación 1, a partir del peso de las estructuras celulares, los cuales se tabulan en la Tabla F.3.

Tabla F.3: Peso inicial y final de la biomasa en las suspensiones celulares de la Sección 3.3.

Tratamiento	Peso fresco día 0 [g]		Peso fresco día 35 [g]	
	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 1	Matraz 2
Control Luz	3,34	2,93	21,7	18,6
Control Luz + Volumen	3,14	2,85	17,7	18,4
Elicitor Peróxido	2,85	3,01	13,1	16,5
Elicitor pH Medio	2,73	2,81	22,2	19,0
Precursor Fenilalanina	2,78	2,91	13,4	11,4

Tabla F.4: Índice de crecimiento final de las suspensiones celulares de la Sección 3.3.

Tratamiento	Índice de crecimiento final [g/g]			
	Matraz 1	Matraz 2	Promedio	Desviación estándar
Control Luz	6,50	6,34	6,42	0,11
Control Luz + Volumen	5,65	6,46	6,06	0,58
Elicitor Peróxido	4,59	5,47	5,03	0,62
Elicitor pH Medio	8,14	6,77	7,46	0,97
Precursor Fenilalanina	4,82	3,93	4,37	0,63

Anexo G. Acumulación de antocianinas en suspensiones celulares con adición de un factor elicitor o precursor

G.1 Contenido de AT en las suspensiones celulares

En las siguientes tablas se muestran las absorbancias medidas y corregidas, según el blanco correspondiente, para los extractos de antocianinas de los cultivos en suspensión de *Aristotelia chilensis* desarrollados bajo las estrategias de la Sección 3.3, de acuerdo al método del pH diferencial.

Tabla G.1: Absorbancia a 515 nm de los extractos de antocianinas de las suspensiones celulares de la Sección 3.3 (en triplicado).

	Control Luz Matraz 1		Control Luz Matraz 1		Control L + V Matraz 1		Control L + V Matraz 2		E. Peróxido Matraz 1		E. Peróxido Matraz 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,211	0,183	0,143	0,136	0,231	0,182	0,143	0,171	0,163	0,139	0,146	0,128
Abs 2	0,238	0,180	0,170	0,152	0,242	0,180	0,160	0,160	0,164	0,137	0,158	0,131
Abs 3	0,230	0,181	0,166	0,156	0,244	0,178	0,142	0,168	0,162	0,137	0,151	0,124

	P. Fenilalan. Matraz 1		P. Fenilalan. Matraz 2		E. pH Medio Matraz 1		E. pH Medio Matraz 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,154	0,128	0,132	0,116	0,204	0,147	0,124	0,118
Abs 2	0,164	0,129	0,141	0,127	0,220	0,162	0,111	0,117
Abs 3	0,160	0,126	0,127	0,118	0,218	0,164	0,123	0,123

Tabla G.2: Absorbancia a 700 nm de los extractos de antocianinas de las suspensiones celulares de la Sección 3.3 (en triplicado).

	Control Luz Matraz 1		Control Luz Matraz 1		Control L + V Matraz 1		Control L + V Matraz 2		E. Peróxido Matraz 1		E. Peróxido Matraz 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,136	0,138	0,081	0,098	0,150	0,130	0,065	0,124	0,114	0,100	0,100	0,089
Abs 2	0,159	0,136	0,106	0,111	0,156	0,129	0,073	0,112	0,115	0,097	0,114	0,096
Abs 3	0,151	0,136	0,102	0,120	0,161	0,129	0,069	0,118	0,112	0,099	0,106	0,086

	P. Fenilalan. Matraz 1		P. Fenilalan. Matraz 2		E. pH Medio Matraz 1		E. pH Medio Matraz 2	
	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5	pH 1,0	pH 4,5
Abs 1	0,109	0,093	0,091	0,082	0,125	0,107	0,082	0,083
Abs 2	0,117	0,093	0,104	0,093	0,137	0,115	0,068	0,079
Abs 3	0,112	0,092	0,086	0,085	0,135	0,117	0,083	0,086

Utilizando los datos de la Tabla C.3, se calculó la concentración de antocianinas totales presente en cada extracto de estos compuestos, de acuerdo a las Ecuaciones 2 y 3. Posteriormente, se calculó el contenido de AT por peso seco de biomasa (Tabla G.4), según la Ecuación 20, para un V_{extracto} de 0,05 L y considerando la biomasa seca tabulada en la Tabla G.3.

Tabla G.3: Peso seco de la biomasa de las suspensiones celulares de la Sección 3.3.

Tratamiento	Biomasa seca [mg]	
	Matraz 1	Matraz 2
Control Luz	1.255	986
Control Luz + Volumen	1.100	1.159
Elicitor Peróxido	850	1.081
Elicitor pH Medio	1.267	812
Precursor Fenilalanina	789	787

Tabla G.4 Contenido de AT por biomasa seca de las suspensiones celulares de la Sección 3.3.

Tratamiento	Contenido de AT [mg cia-3-glu/g PS]			
	Matraz 1	Matraz 2	Promedio	Desviación estándar
Control Luz	0,41	0,40	0,41	0,03
Control Luz + Volumen	0,47	0,42	0,44	0,07
Elicitor Peróxido	0,19	0,12	0,15	0,04
Elicitor pH Medio	0,22	0,12	0,17	0,07
Precursor Fenilalanina	0,46	0,09	0,28	0,18

El tratamiento Control Luz + Volumen se comparó estadísticamente con los restantes cultivos y con la Estrategia 1, la cual se utilizó como control. Para este efecto, se utilizó el test no paramétrico U de Mann Whitney para corroborar la hipótesis nula de que los tratamientos en cuestión tienen igual promedio [48, 49]. Los resultados se tabulan en la Tabla G.5.

Tabla G.5: Análisis estadístico del contenido de antocianinas totales de las suspensiones celulares de la Sección 3.3.

Tratamiento	U	U_{crit}	¿Promedio igual al de Control L + V?
Estrategia 1	15	10	No se puede rechazar
Control Luz	12	5	No se puede rechazar
Elicitor Peróxido	0	5	No
Elicitor pH Medio	9	5	No se puede rechazar
Precursor Fenilalanina	0	5	No

G.2 Capacidad antioxidante de las suspensiones celulares

En la siguiente tabla se muestran las absorbancias medidas y corregidas, según el blanco correspondiente, para los extractos de antocianinas de los cultivos en suspensión desarrollados bajo las estrategias de la Sección 3.3, de acuerdo al método de DPPH.

Tabla G.6: Absorbancia a 520 nm de los extractos de antocianinas de los cultivos de la Sección 3.3 (en triplicado).

	Control Luz Matraz 1	Control Luz Matraz 1	Control L + V Matraz 1	Control L + V Matraz 2	E. Peróxido Matraz 1	E. Peróxido Matraz 2
Abs 1	0,047	0,102	0,012	0,059	0,076	0,094
Abs 2	0,065	0,103	0,013	0,041	0,071	0,078
Abs 3	0,058	0,108	0,035	0,079	0,082	0,120

	P. Fenilalan. Matraz 1	P. Fenilalan. Matraz 2	E. pH Medio Matraz 1	E. pH Medio Matraz 2
Abs 1	0,125	0,142	0,081	0,145
Abs 2	0,106	0,133	0,052	0,138
Abs 3	0,102	0,135	0,052	0,138

Para cada extracto de antocianinas, se calculó la capacidad antioxidante utilizando las Ecuaciones 4, 21 y 22. Para ello, se consideró $V_{\text{extracto}} = 0,05 \text{ L}$ y $DF = 39$; el PS corresponde a los valores de la biomasa seca en miligramos, tabulados en la Tabla G.3. Los resultados se muestran en la Tabla G.7.

Tabla G.7: Capacidad antioxidante por biomasa seca de las suspensiones celulares de la Sección 3.3.

Tratamiento	Capacidad antioxidante [g Trolox/g PS]			
	Matraz 1	Matraz 2	Promedio	Desviación estándar
Control Luz	0,50	0,40	0,45	0,06
Control Luz + Volumen	0,73	0,53	0,63	0,13
Elicitor Peróxido	0,62	0,39	0,51	0,14
Elicitor pH Medio	0,47	0,27	0,37	0,12
Precursor Fenilalanina	0,46	0,30	0,38	0,10

Se comparó estadísticamente la capacidad antioxidante del Control Luz + Volumen con los restantes cultivos y con la Estrategia 1, la cual se utilizó como control. Para este efecto, se utilizó el test no paramétrico U de Mann Whitney para corroborar la hipótesis nula de que los tratamientos en cuestión tienen igual promedio [48, 49]. Los resultados se tabulan en la Tabla G.8.

Tabla G.8: Análisis estadístico de la capacidad antioxidante de los tratamiento con callos morados

Tratamiento	U	U_{crit}	¿Promedio igual al de Control L + V?
Estrategia 1	11	10	No se puede rechazar
Control Luz	4	5	No
Elicitor Peróxido	9	5	No se puede rechazar
Elicitor pH Medio	2	5	No
Precursor Fenilalanina	2	5	No

Anexo H. Evaluación técnico-económica de la implementación de un SIT para la producción de antocianinas del maqui

H.1 Datos y supuestos utilizados

Evaluación técnica

Para evaluar técnicamente la producción de antocianinas del maqui en reactores de inmersión temporal, se consideró que la velocidad de crecimiento de las células en un SIT sería igual a la reportada en los cultivos de callo mantenidos en placas Petri. De manera análoga, se estimó la acumulación de antocianinas. Adicionalmente, se supuso que la proliferación de los tratamientos 3MS.C.L.d y 3MS.C.L.sh es similar a la de 3MS.C.L.c; y que la producción de pigmentos en 3MS.C.L.sh es un 50% mayor a la de 3MS.C.L.d. Los parámetros correspondientes a estas consideraciones se resumen en la Tabla H.1.

Tabla H.1: Parámetros utilizados para la evaluación técnica del SIT

Tratamiento	Índice de crecimiento final [g/g]	Contenido AT [mg cia-3-glu/g PF]
6MS.C.L.b	3,7	-
3MS.C.L.d	3,0	0,26
3MS.C.L.sh	3,0	0,40

Cabe destacar que, en la Tabla H.1, el contenido de AT está expresado por unidades de biomasa fresca. Este valor se calculó con la Ecuación 20, pero utilizando el PF en lugar del PS. Asimismo, se calculó el contenido de antocianinas en los frutos de maqui, obteniéndose un valor de 8,2 mg/g PF. En la Tabla H.2 se tabulan los valores de PF utilizados.

Tabla H.2: Peso fresco de la biomasa utilizado para estimar los parámetros del SIT.

Tratamiento	Biomasa fresca [mg]	
	Duplicado 1	Duplicado 2
Fruto Maqui	1.290	1.340
3MS.C.L.d	510	490

Del total de antocianinas que se producirían en el sistema de inmersión temporal, se supuso que el 73% correspondería a delfinidinas y el 27% restante, a cianidinas [15].

Considerando los requerimientos de espacio para una adecuada proliferación de los callos, se consideró el crecimiento de cuatro de estas estructuras celulares por equipo de inmersión temporal, siendo necesario subcultivarlas cada 10 semanas para reducir su tamaño y reemplazar el medio de cultivo líquido cada 5 semanas. Por esto, para efectos de cálculo y en base a la experiencia de laboratorio, se impuso que un callo debería alcanzar máximo una masa de 2 g, siendo posible mantener hasta 8 g de biomasa por reactor, utilizando 25 mL de medio líquido de cultivo. Se estimó que el diámetro de los reactores a utilizar sería de 100 mm, equivalente al de las placas Petri.

Por último, se estipuló que el establecimiento de los callos requeriría de 40 días; mientras que las Fases A, B y C, contemplan 10, 20 y 10 semanas, respectivamente.

Evaluación económica

Para la evaluación económica del sistema propuesto, se consideraron los precios de la Tabla H.3. En general, los precios de los insumos se obtuvieron en el sitio Web de PhytoTechnology Laboratories [52] y el de los productos se cotizó con el proveedor de Genytec [53].

Tabla H.3: Precio de los insumos, equipos y productos considerados en la evaluación técnica.

Elemento cotizado	Formato de venta		Precio (con IVA)	Moneda
	Cantidad o volumen	Unidad		
Medio 1,5MS	1	L	17	USD\$
D-sacarosa	25	kg	228	USD\$
Medio 3MS	1	L	18	USD\$
Medio 6MS	1	L	18	USD\$
KOH 1 N	500	mL	21	USD\$
KIN 1 mg/ml	500	mL	34	USD\$
NAA 1 mg/mL	100	mL	17	USD\$
2,4-D 1 mg/mL	500	mL	53	USD\$
Agar Planta	9	g	5	USD\$
Cloruro de cianidina	10	mg	197.440	CLP\$
Cloruro de delfinidina	10	mg	229.749	CLP\$
Reactor SIT	37	mm	203.490	CLP\$
Reactor SIT	100	mm	369.506	CLP\$

El costo de los reactores de inmersión se calculó utilizando la regla de los seis-décimos, utilizando como referencia el valor de un equipo de 37 mm de diámetro comercializado por Sigma-Aldrich [54, 55] y el precio de los medios 3MS y 6MS se ajustó a partir del valor encontrado para el medio 1,5MS y el azúcar D-sacarosa. Las relaciones utilizadas se detallan en la Ecuación 23 y la Ecuación 24, respectivamente

$$\text{Precio Reactor}_{100 \text{ mm}} [\text{CLP\$}] = \text{Precio Reactor}_{37 \text{ mm}} [\text{CLP\$}] \cdot \left(\frac{100 \text{ mm}}{37 \text{ mm}}\right)^{0,6} \quad (23)$$

$$\begin{aligned} \text{Precio Medio}_{X\text{MS}} [\text{USD\$}] \\ = \text{Precio Medio}_{1,5\text{MS}} [\text{USD\$}] + \text{Sacarosa} [\text{USD\$}] \cdot \left(\frac{10X - 15}{25.000}\right) \end{aligned} \quad (24)$$

H.2 Caso Base 1

Evaluación técnica

El primer caso base contempla la producción de una cantidad de antocianinas equivalente al contenido en 1 kg de maqui, que se estima en 8,2 g; dado que el contenido de AT de estos frutos es 8,2 mg/g PF.

Utilizando los parámetros de la Tabla H.1, se calculó que para alcanzar el nivel de producción del Caso Base 1, se requeriría una biomasa final de 21 kg, obtenida desde callos del tratamiento 3MS.C.L.sh. Es decir, que se necesitaría establecer una masa inicial de 2,3 g de callo de 6MS.C.L.b, la cual se subcultivaría sucesivamente en las condiciones descritas para las Fases A, B y C, como se muestra en la Figura H.1

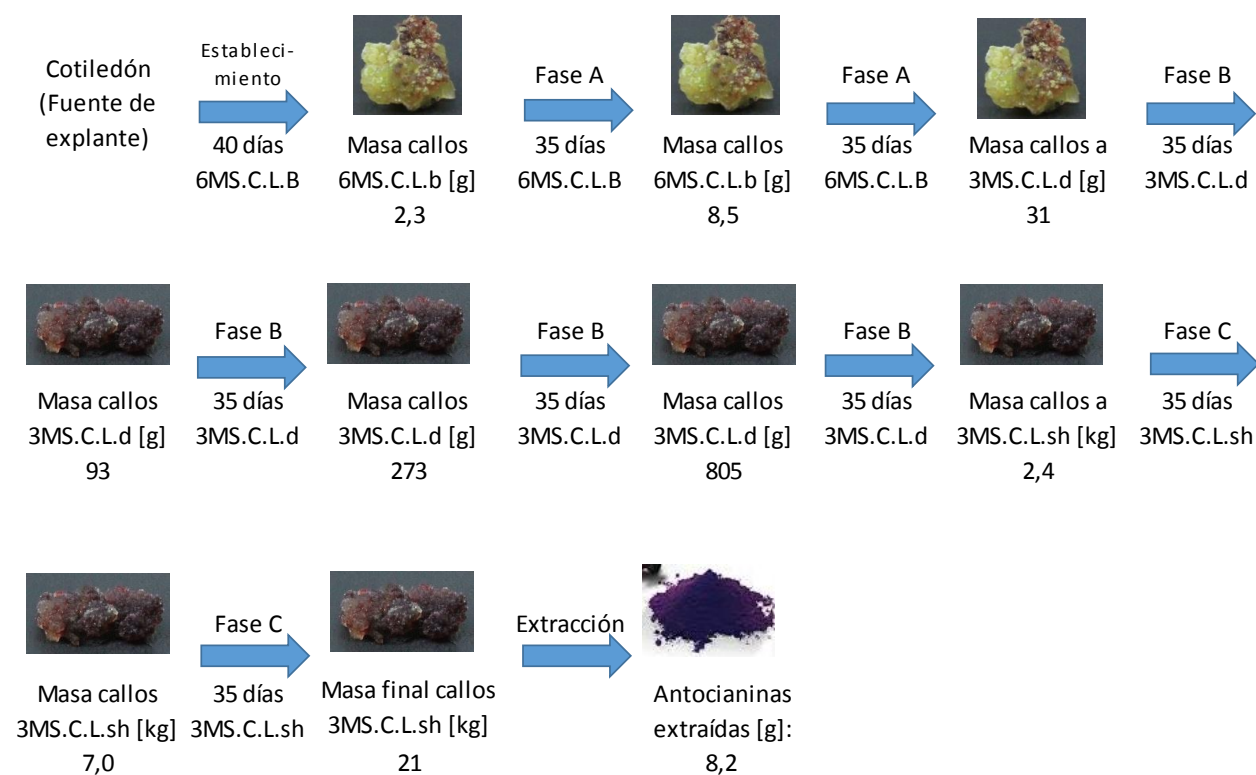


Figura H.1: Esquema de producción de biomasa para el Caso Base 1.

Considerando la capacidad estimada para los reactores de inmersión temporal, serían necesarios aproximadamente 2.585 de estos equipos para el crecimiento de más de 10 mil callos, que equivalen a los 21 kg de biomasa que se obtendrían al final de cada *batch* de proliferación *in vitro* de células de maqui.

Evaluación económica

De acuerdo a la biomasa que se generaría en el proceso, se estimó el volumen de medio de cultivo requerido para cada fase de mantención de los callos, considerando los supuestos de detallados en el Anexo H.1.

Tabla H.4: Volumen de medio de cultivo requerido para un *batch* del Caso Base 1.

Fase de cultivo	Medio de cultivo	Estado	Volumen	Unidad
Establecimiento	6MS	Sólido	100	mL
Fase A: Semana 0 a 10	6MS	Líquido	196	mL
Fase B: Semana 10 a 20	3MS	Líquido	1,71	L
Fase B: Semana 20 a 30	3MS	Líquido	14,9	L
Fase C: Semana 30 a 40	3MS.	Líquido	129	L

A partir de estos volúmenes, se determinó la cantidad necesaria de los restantes insumos, los cuales se detallan en la Tabla H.5, junto a su costo.

Tabla H.5: Dimensionamiento y costo de los reactivos requeridos para un *batch* del Caso Base 1

Reactivo	Requerido según el proceso		Requerido según formato de venta		
	Cantidad o volumen	Unidad	Unidades	Formato	Costo [USD\$]
6MS	296	mL	1	1 L	18
3MS	146	L	146	1 L	2.557
NAA 1 mg/mL	29,6	μL	1	100 mL	17
KIN 1 mg/mL	146	mL	1	500 mL	34
2,4-D 1 mg/mL	437	mL	1	500 mL	53
Agar	2,07	g	1	9 g	5
KOH			1	500 mL	21
TOTAL [USD\$]					2.704
TOTAL [CLP\$]					1.722.488

De acuerdo al valor de cada reactor, la inversión en equipos ascendería a CLP\$955.062.390. Por otra parte, los ingresos monetarios asociados a la venta de las antocianinas se detallan en la Tabla H.6

Tabla H.6: Ingresos asociados a la venta de las antocianinas.

Antocianina	AT [mg]	Ingreso [CLP\$]
Delfinidina	5.977	137.331.606
Cianidina	2.211	43.650.967
TOTAL		180.982.573

H.3 Caso base 2

Evaluación técnica

El segundo caso base contempla la producción de 100 mg antocianinas. Utilizando los parámetros de la Tabla H.1, se calculó que para alcanzar este nivel de producción se requeriría una biomasa final de 253 g, obtenida desde callos del tratamiento 3MS.C.L.sh. Es decir, que se necesitaría establecer una masa inicial de 28 mg de callo de 6MS.C.L.b, la cual se subcultivaría sucesivamente en las condiciones descritas para las Fases A, B y C, como se muestra en la Figura H.2.

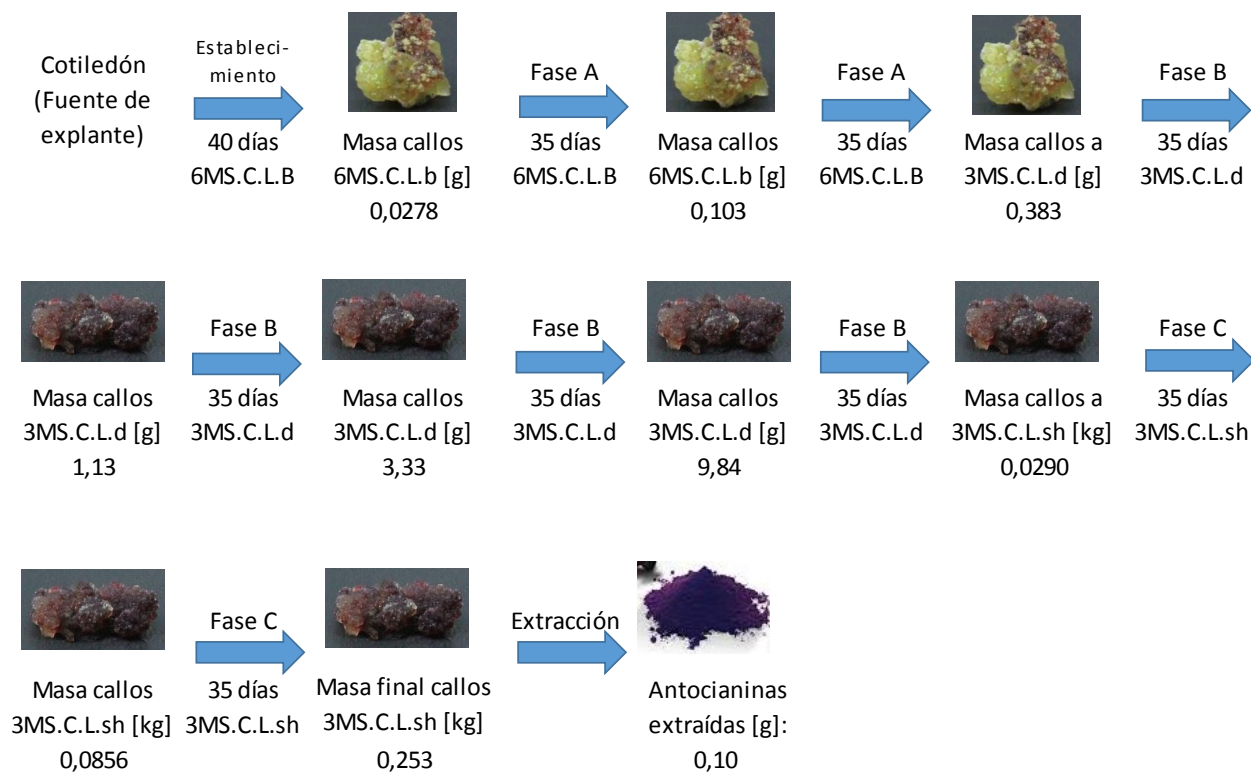


Figura H.2: Esquema de producción de biomasa para el Caso Base 2.

Para este caso, se necesitarían por lo menos 32 reactores de inmersión temporal para el crecimiento de unos 126 callos, que equivalen a los 253 g de biomasa que se obtendrían al final de cada *batch* de proliferación *in vitro* de células de maqui.

Evaluación económica

De acuerdo a la biomasa que se generaría en el proceso, se estimó nuevamente el volumen de medio de cultivo requerido para cada fase de mantenimiento de los callos, considerando los supuestos de detallados en el Anexo H.1.

Tabla H.7: Volumen de medio de cultivo requerido para un *batch* del Caso Base 2.

Fase de cultivo	Medio de cultivo	Estado	Volumen	Unidad
Establecimiento	6MS	Sólido	100	mL
Fase A: Semana 0 a 10	6MS	Líquido	2	mL
Fase B: Semana 10 a 20	3MS	Líquido	0,02	L
Fase B: Semana 20 a 30	3MS	Líquido	0,2	L
Fase C: Semana 30 a 40	3MS.	Líquido	2	L

A partir de estos volúmenes, se determinó la cantidad necesaria de los restantes insumos, los cuales se detallan en la Tabla H.8, junto a su costo.

Tabla H.8: Dimensionamiento y costo de los reactivos requeridos para un *batch* del Caso Base 2.

Reactivo	Requerido según el proceso		Requerido según formato de venta		
	Cantidad o volumen	Unidad	Unidades	Formato	Costo [USD\$]
6MS	102	mL	1	1 L	18
3MS	2	L	2	1 L	35
NAA 1 mg/mL	10,2	μL	1	100 mL	17
KIN 1 mg/mL	2	mL	1	500 mL	34
2,4-D 1 mg/mL	5	mL	1	500 mL	53
Agar	0,72	g	1	9 g	5
KOH			1	500 mL	21
TOTAL [USD\$]					183
TOTAL [CLP\$]					116.510

De acuerdo al valor de cada reactor, la inversión en equipos ascendería a CLP\$11.663.714. Por otra parte, los ingresos monetarios asociados a la venta de las antocianinas se detallan en la Tabla H.9.

Tabla H.9: Ingresos asociados a la venta de las antocianinas.

Antocianina	AT [mg]	Ingreso [CLP\$]
Delfinidina	73	1.677.164
Cianidina	27	533.088
TOTAL		2.210.252