

“Mejora de la propagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales”

“*In vitro* propagation improvement of *Vaccinium corymbosum* and avaluation of the antioxidant activity in commercial berries”

“Mellora da propagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* e avaliación da actividade antioxidante en froitos comerciais”

Ana María Castro Fernández

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética. 2015 - 2016



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

A Coruña, 27 de Julio de 2016

Directora: **Ángeles Bernal Pita da Veiga.**

Profesora Titular del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la UDC

Co-directora: **Margarita Fraga Ares.**

Directora Técnica de Cultigar Fundación Paideia Galiza

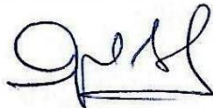
Departamento de Bioloxía Animal,
Bioloxía Vexetal e Ecoloxía

DÑA. MARIA DE LOS ANGELES BERNAL PITA DA VEIGA, PROFESORA TITULAR DE FISIOLoxÍA VEGETAL, DOCTORA EN BIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA Y DÑA. MARGARITA FRAGA ARES, DIRECTORA TÉCNICA DE CULTIGAR, DOCTORA EN QUÍMICAS

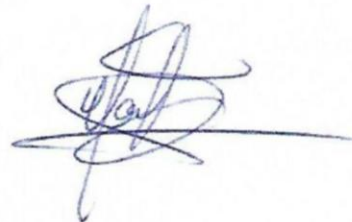
INFORMAN:

Que el presente trabajo de Master titulado "Mejora de la propagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales", presentado por ANA MARÍA CASTRO FERNÁNDEZ ha sido realizado en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de La Coruña y en el laboratorio de la Empresa CULTIGAR bajo su dirección, y cumple con las condiciones exigidas para obtener el Master de Biología Molecular, Celular y Genética, por lo que autorizan a su fin que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en A Coruña a 19 de Julio del 2016.



Fdo.: Angeles Bernal Pita da Veiga



Fdo.: Margarita Fraga Ares

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	Introducción.....	1
1.1	El arándano	1
1.2	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Vaccinium corymbosum</i>	1
1.3	Metabolismo oxidativo	2
1.3.1	Radicales libres y antioxidantes.....	2
1.3.2	Compuestos fenólicos.....	3
1.4	Métodos de determinación de capacidad antioxidante.....	3
2	Objetivos	7
3	Material y métodos	8
3.1	Reactivos	8
3.2	Material vegetal.....	8
3.2.1	Cultivo <i>in vitro</i>	8
3.2.2	Actividad antioxidante	8
3.3	Medios de multiplicación <i>in vitro</i>	8
3.4	Medios de enraizamiento <i>in vitro</i>	9
3.5	Determinación de características físico químicas de frutos de arándano	11
3.6	Extracción de compuestos fenólicos	11
3.6.1	Métodos de extracción	11
3.6.2	Determinación de contenido de fenoles totales	12
3.6.3	Determinación de actividad antioxidante:.....	12
3.7	Ensayo con DPPH	13
3.7.1	Curva patrón de ácido L-ascórbico.....	13
3.7.2	Curva patrón de Trolox	14
3.7.3	Curva patrón de quercetina.....	14
3.8	Ensayo con ABTS.....	14

3.8.1	Curva patrón de ácido L-ascórbico.....	15
3.8.2	Curva patrón de Trolox	15
3.8.3	Curva patrón de quercetina.....	15
3.9	Análisis estadístico.....	16
4	Resultados y discusión	17
4.1	Cultivo <i>in vitro</i>	17
4.1.1	Optimización de medios de multiplicación.....	17
4.1.2	Optimización de medios de enraizamiento	19
4.2	Determinación de la capacidad antioxidante.....	22
4.2.1	Características físico químicas de frutos de arándano.....	22
4.2.2	Extracción de compuestos fenólicos.....	22
4.2.3	Relación entre el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante.....	27
5	Conclusiones.....	28
5.1	Mejora de la propagación <i>in vitro</i> de <i>Vaccinium corymbosum</i>	28
5.2	Evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales.....	28
6	Bibliografía	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 - Diseño del experimento de optimización de medio de multiplicación de <i>Vaccinium corymbosum</i>	9
Tabla 2 Diseño de experimento de optimización de medio de enraizamiento de <i>Vaccinium corymbosum</i>	9
Tabla 3 - Reactivos y concentraciones para los distintos medios de multiplicación y enraizamiento	10
Tabla 4 - Resultados de los experimentos de multiplicación.....	18
Tabla 5 - Porcentaje de raíces formadas en los diferentes medios.....	20
Tabla 6 - Efecto del uso de AIB líquido sobre medio WPM	20
Tabla 7 – Datos de supervivencia tras la aclimatación a 30 y 75 días	21
Tabla 8 - Características físico - químicas de frutos de arándano	22
Tabla 9 - Contenido en fenoles totales	22
Tabla 10 - Equivalentes de antioxidantes	23
Tabla 11 - Relación entre contenido en fenoles totales y actividad antioxidante (DPPH).....	27
Tabla 12 - Relación entre contenido en fenoles totales y actividad antioxidante (ABTS).....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Plantas y frutos de <i>Vaccinium corymbosum</i>	1
Figura 2 - Reacción de reducción de DPPH.....	4
Figura 3 - Reacción de oxidación - reducción de ABTS	4
Figura 4 - Molécula de ácido L- ascórbico	5
Figura 5 - Molécula de Trolox.....	6

Figura 6 - Molécula de quercetina	6
Figura 7 - Material de partida para cultivo <i>in vitro</i>	8
Figura 8 - Clasificación de brotes y hojas en cultivo <i>in vitro</i>	17
Figura 9 – Desarrollo de brotes a 30 y 75 días de la transferencia a sustrato.....	21
Figura 10 - Contenido en fenoles totales según el tipo de extracción.....	23
Figura 11 – Resultados del ensayo DPPH. Equivalencias en antioxidantes.....	24
Figura 12 – Resultados del ensayo ABTS. Equivalencias en antioxidantes	24
Figura 13 - Actividad antioxidante en extractos acuosos de arándano y té. Método DPPH	26
Figura 14 - Actividad antioxidante en extractos acuosos de arándano y té. Método ABTS	26

Listado de abreviaturas

2ip: 2- isopentiladenina	MS: Murashige & Skoog
ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	PBS: Tampón fosfato salino
AE: Equivalentes ácido ascórbico	QE: Equivalente quercetina
AIB: ácido indolbutírico	Trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico
CA: carbón activado	TE: Equivalente Trolox
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil	WPM: Woody Plant Medium
GAE: Equivalente ácido gálico	Z: Zeatina

Resumen

En este trabajo se buscó la optimización del proceso de cultivo *in vitro* de la variedad Brigitte de arándano (*Vaccinium corymbosum*) seleccionada por su interés comercial. Para ello se sometió el material vegetal a diferentes medios de cultivo con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, hasta conseguir la multiplicación, elongación y enraizamiento adecuados para la explotación comercial de su cultivo. El medio WPM se ha comprobado como el más adecuado para la multiplicación del arándano, y la adición del regulador de crecimiento Zip parece ser el que ofrece mejores resultados de tasa de multiplicación asociada a un mayor tamaño de brotes y fenotipo robusto tanto de tallos como de hojas nuevas.

Considerando la elevada cantidad de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante que presenta el fruto del arándano, hemos puesto a punto la metodología de extracción de estos compuestos para su posterior determinación y cuantificación *in vivo*, dado su gran interés a nivel farmacológico y nutricional. En este punto nos decantamos por la extracción de compuestos fenólicos en metanol al 80% y su posterior análisis de actividad antioxidante mediante el ensayo de decoloración de DPPH.

Abstract

This work sought the optimization of the process of *in vitro* culture of the Brigitte variety of bilberry (*Vaccinium corymbosum*) selected for its commercial interest. This plant material was subjected to different media with different concentrations and combinations of plant growth regulators, to get the multiplication, elongation and rooting rate suitable for the commercial exploitation of its culture. WPM medium is proven to be the more suitable medium for the multiplication of bilberries, and the addition of the regulator of growth Zip offers the best results regarding the multiplication rate and it is associated to bigger shoots and stronger phenotype (both stems and new leaves).

Considering the high amount of them present in bilberry fruits and given their great interest to drug and nutritional level, we have developed a methodology of phenolic compounds extraction, for their subsequent *in vivo* determination and antioxidant capacity quantification. At this point we opted by the extraction of phenolic compounds in 80% methanol followed by the analysis of the antioxidant activity using the DPPH decoloration assay.

Resumo

Neste traballo buscouse a optimización do proceso de cultivo *in vitro* da variedade Brigitte de arando (*Vaccinium corymbosum*) seleccionada polo seu interese comercial. Para iso someteuse ó material vexetal a diferentes medios de cultivo con diferentes concentracións e combinacións de reguladores do crecemento, ata conseguir a multiplicación, elongación e enraizamento axeitados para a explotación comercial do seu cultivo. O medio WPM comprobouse como o máis axeitado para a multiplicación do arándano, e a adición do regulador de crecemento Zip parece ser o que ofrece mellores resultados de taxa de multiplicación asociada a un maior tamaño de brotes e fenotipo robusto tanto de tallos como de follas novas.

Considerando a elevada cantidade de compostos fenólicos con capacidade antioxidante que presenta o fruto do arando, puxemos a punto a metodoloxía de extracción destes compostos para a súa posterior determinación e cuantificación *in vivo*, dada o gran interese a nivel farmacolóxico e nutricional. Neste punto nos decantamos pola extracción de compostos fenólicos en metanol ó 80% e a súa posterior análise de actividade antioxidante mediante o ensaio de decoloración de DPPH.

Palabras clave: *Vaccinium corymbosum*, cultivo *in vitro*, medio WPM, medio MS, compostos fenólicos, actividade antioxidante, DPPH, ABTS.

1 Introducción

1.1 El arándano

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es una especie perteneciente al género *Vaccinium*, de la familia *Ericaceae* (Fig. 1). Esta especie representa aproximadamente el 80% de la superficie cultivada de este género en España (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2011). Se trata de un arbusto perenne típico de regiones frías y templadas del Hemisferio Norte con frutos de tipo baya de color azulado oscuro o rojizo, con un elevado contenido en pigmentos de tipo antocianina y carotenoides con acción antioxidante, ya que neutralizan la acción de radicales libres nocivos para el organismo. El principal interés de su explotación se debe a la creciente demanda comercial de sus frutos, usados para su consumo en fresco, en zumos, confituras, etc. así como en la industria farmacéutica debido a su alto contenido en compuestos antioxidantes.



Figura 1- Plantas y frutos de *Vaccinium corymbosum*

1.2 Cultivo *in vitro* de *Vaccinium corymbosum*

La propagación vegetativa de *V. corymbosum* mediante estaquillas no presenta unos altos índices de enraizamiento (Ostrolucká et al., 2004) por lo que no es un método capaz de suministrar suficiente material vegetal para las plantaciones que se están creando en la actualidad. De esta forma, el cultivo *in vitro* se convierte en una herramienta esencial para la producción masiva de material de siembra. Además, este método presenta una serie de ventajas como son la necesidad de un número reducido de material de partida para la producción masiva de plantas, la posibilidad de producir en cualquier época del año, la producción en ausencia de plagas y enfermedades, necesidad de espacio reducida en comparación con los sistemas tradicionales y la posibilidad de mejora genética.

Existen en la bibliografía numerosas referencias al cultivo *in vitro* del género *Vaccinium*. Así Mora (2010) emplea medio WPM con 2ip 2mg/l, Hine-Gómez & Abdelnour-Esquivel (2013) emplean WPM con 2ip 2,5mg/l, Ruzic et al. (2012) usan medio MS con Zeatina y AIB. Debnath (2009) recomienda medios con baja concentración de sales como hacen Rache y Pacheco (2010) con el medio MS 1/3, siendo recomendado también el uso de Zeatina (Ostrolucká, et al., 2004; Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991). Respecto a los medios de enraizamiento, González, et al. (2000) vieron que los brotes procedentes de cultivos *in vitro* podían enraizar en condiciones *ex vitro* en ausencia de tratamiento con auxinas, mientras que Cüce & Sökmen (2015) usan medios de enraizamiento con AIB y carbón activado.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el éxito en la micropropagación de una especie vegetal varía en función del genotipo con el que se trabaje (Debnath, 2009) por lo que es necesario adaptar las condiciones del cultivo *in vitro* a cada variedad. En la empresa Cultigar han llevado a cabo el establecimiento, multiplicación y enraizamiento de *V. corymbosum* de la variedad Brigitte empleando para el establecimiento y multiplicación el medio Woody Plant Medium (WPM) con 4mg/l de 2-isopentiladenina (2IP4) como regulador de crecimiento y para el enraizamiento el medio WPM con 2 mg/L de 2IP y 1 mg/L de AIB como reguladores de crecimiento (Mora, 2010).

1.3 Metabolismo oxidativo

1.3.1 Radicales libres y antioxidantes

Como consecuencia del metabolismo normal de cualquier planta, en sus células se forman radicales libres como son las especies reactivas de oxígeno o ROS en las que los átomos de oxígeno presentan diferente estado de oxido-reducción y de excitación electrónica. Entre las ROS están los radicales superóxido O_2^- , hidroxiperoxil $HO \cdot_2$, peróxido de hidrógeno H_2O_2 , o el hidroxilo $OH \cdot$. Todas estas moléculas se producen en diferentes compartimentos celulares, como cloroplastos, mitocondrias, pared celular, fracción microsomal o peroxisomas. Ante un incremento de los radicales libres en la célula, para evitar los daños oxidativos en la misma, los vegetales sintetizan otro tipo de compuestos que actúan con antioxidantes para restaurar el equilibrio fisiológico (Taiz, et al., 2015).

Se puede definir antioxidante biológico como toda molécula que, estando presente en menor concentración que un sustrato oxidable, disminuye o impide la oxidación de este sustrato (Benzie & Strain, 1996). Los antioxidantes pueden ser enzimas, como la catalasa, la peroxidasa o la superóxido dismutasa o bien, pueden ser metabolitos secundarios entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, pero también compuestos nitrogenados como son la capsaicina o la cafeína, carotenoides o un grupo diverso de agentes complejantes entre los que se encuentran ácidos policarboxílicos, ácido cítrico, aminoácidos o la curcumina.

1.3.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son moléculas con al menos un anillo fenólico en su estructura, que se producen en el metabolismo secundario normal de las células vegetales.

Los frutos de arándano tienen una gran cantidad de compuestos fenólicos como son la vitamina C (ácido L-ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), carotenoides y polifenoles. Dentro de los polifenoles se encuentran los denominados ácidos fenólicos como los ácidos benzoico, cafeico, gálico, clorogénico, ferúlico o cinámico, las catequinas, los flavonoles como la quercetina, kaempferol o la miricetina y las antocianinas hidrosolubles y responsables de los colores rojo y azul intenso de numerosas flores y frutos (Kraujalyte et al., 2015; Li et al., 2016).

Los compuestos fenólicos presentes en el arándano tienen una fuerte actividad antioxidante (Prior et al., 2001, Giovanelli & Buratti, 2009) y parece ser que está correlacionado con el contenido en fenoles totales más que con la concentración de antocianinas (Prior et al., 1998).

1.4 Métodos de determinación de capacidad antioxidante

La actividad antioxidante en el arándano y otros frutos se puede estudiar realizando cuatro ensayos diferentes: decoloración de ABTS, decoloración de DPPH, FRAP (ferric reducing antioxidant power) y ORAC (oxygen radical absorption capacity) (Prior, et al., 1998; Gil, et al., 2000; Thaipong, et al., 2006; Rodarte Castrejón, et al., 2008; Brambilla, et al., 2008; Kraujalyte, et al., 2015)

Tanto el ensayo de decoloración del DPPH como el del ABTS se corresponden con una determinación espectrofotométrica de la decoloración de una solución de un compuesto cromógeno oxidado (DPPH o ABTS) en presencia de compuestos antioxidantes.

En el caso del DPPH, la actividad antioxidante se determina por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de radical difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de extracto de la planta a estudiar, usando la solución del radical DPPH como blanco. La pérdida del color es proporcional al grado de captura del radical DPPH, y nos da una medida de la eficiencia antioxidante de los extractos (Teixeira, et al., 2013). Los valores son expresados en comparación a los tres compuestos patrón.

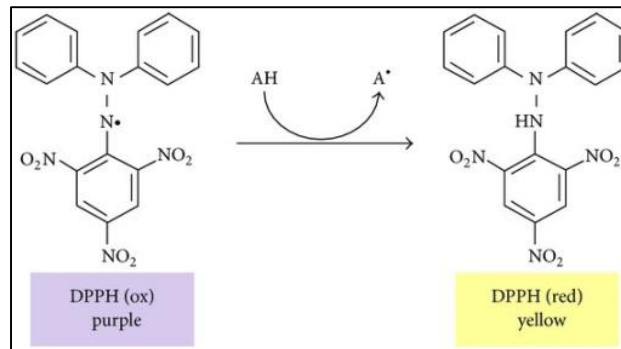


Figura 2 - Reacción de reducción de DPPH

En el caso del ABTS, la actividad antioxidante se determina también mediante el seguimiento espectrofotométrico de su decoloración, ya que el descenso de la absorbancia de una solución de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) al reaccionar con un antioxidante (incluyendo fenoles, tioles y vitamina C) es indicativo de la actividad antioxidante de la muestra estudiada. Durante la reacción, el radical catiónico de ABTS de color azul verdoso (oxidado), vuelve a su forma neutra incolora (reducido) (Boligon, et al., 2014), midiéndose la pérdida de color a 734nm.

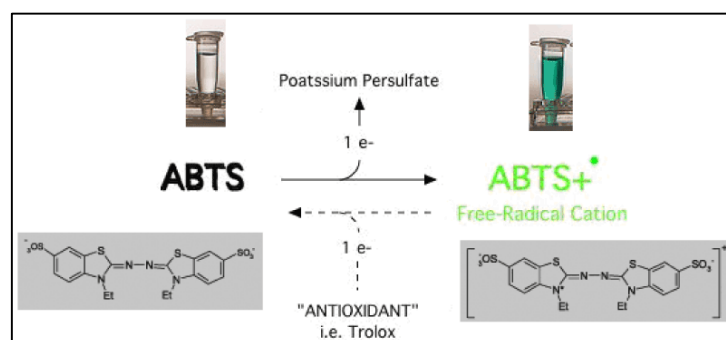


Figura 3- Reacción de oxidación - reducción de ABTS

El ORAC o ensayo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno se basa en el análisis de la disminución de fluorescencia de una molécula (generalmente la fluoresceína) al

reaccionar con moléculas generadoras de radicales peroxilo. Según este método de determinación de actividad antioxidante (generalmente aplicado a alimentos), los antioxidantes presentes en una muestra protegen a la molécula fluorescente de la degeneración oxidativa por parte de los radicales libres (Cao, et al., 1993). Recientemente el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) le retiró la validez biológica al (ORAC) y eliminó las listas de valores de ORAC de alimentos vegetales de consumo habitual, al considerar que no hay pruebas fisiológicas *in vivo* para apoyar su teoría de los radicales libres (USDA , 2016) por lo que decidimos descartarlo.

El ensayo FRAP (Ferric reducing antioxidant power) mide la capacidad de reducción de iones Fe^{+3} por parte de compuestos antioxidantes. Al reducirse los iones Fe^{+3} a Fe^{+2} a pH bajo se forma un complejo azul coloreado de hierro-tripiridiltriazina (Benzie & Strain, 1996). Al hacer reaccionar una muestra con moléculas antioxidantes con reactivo de FRAP oxidado (Fe^{+3}), éste se reduce formando el complejo (Fe^{+2} -TPTZ) y aumenta la absorbancia de la muestra a 593nm.

En este trabajo hemos optado por la realización de los ensayos con ABTS y DPPH ambos referidos a 3 estándares antioxidantes para validar los datos de capacidad antioxidante en función del número de radicales hidroxilo: el ácido ascórbico y el Trolox (ambos fenoles simples) y la quercetina (fenol complejos) (Ozgen et al., 2006).

El ácido L-ascórbico o vitamina C es un fenol simple con capacidad antioxidante presente en los vegetales (Figuras 4).

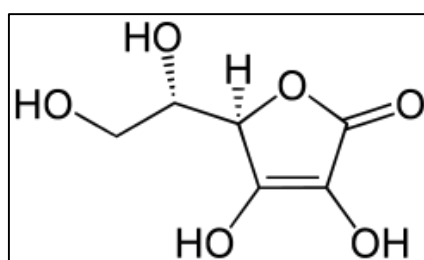


Figura 4 - Molécula de ácido L-ascórbico

El Trolox es un análogo de la vitamina E utilizado como flavonoide patrón en estudios de actividad antioxidante. (Figura 5)

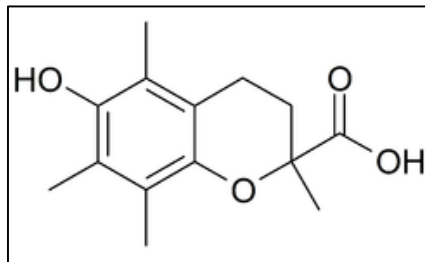


Figura 5 - Molécula de Trolox

La quercetina es un polifenol de tipo flavonol usado como estándar para medir actividad antioxidante de los fenoles complejos presentes en una determinada muestra. (Figura 6)

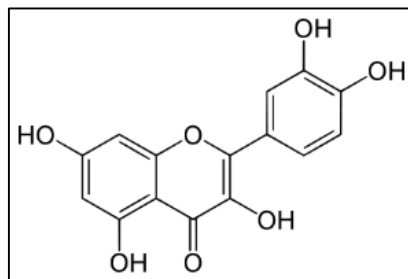


Figura 6- Molécula de quercetina

2 Objetivos

El principal problema que nos encontramos en la producción de arándano mediante el protocolo empleado en Cultigar, es la excesiva multiplicación de los explantos, dando lugar a brotes con fenotipos etiolados, con tallos muy poco lignificados y hojas excesivamente pequeñas. Por otro lado, no existe un control sobre el enraizamiento *in vitro* de la planta, que, o bien no se produce, o tarda más de 2 meses en expresarse, retrasando en gran medida el proceso de producción.

Por otra parte, la presencia de compuestos fenólicos en los frutos de arándano los convierte en un sujeto ideal para el estudio de su capacidad antioxidante.

En el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Mejora en el protocolo de producción *in vitro* de esta especie en lo referente a vigor y fenotipo
2. Aumento significativo de las tasas de enraizamiento *in vitro* y/o *ex vitro*.
3. Puesta a punto de método sencillo y fiable que permita la extracción de los compuestos fenólicos presentes en las diferentes partes del fruto del arándano.
4. Determinación de la actividad antioxidante mediante la puesta a punto de dos métodos espectrofotométricos: DPPH y ABTS.

3 Material y métodos

3.1 Reactivos

Los reactivos utilizados para la preparación de medios de cultivo *in vitro* fueron de la marca Duchefa. Los reactivos utilizados para los estudios de fenoles y actividad antioxidante fueron de la marca Sigma-Aldrich.

3.2 Material vegetal

3.2.1 Cultivo *in vitro*

Los explantos proceden de planta *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* de la variedad Brigitte cultivados en las instalaciones de Cultigar. Para cada experimento y medio ensayados, se usaron 4 jarras con 50 ml de medio cada una y se plantaron 8 explantos por jarra. Al finalizar los experimentos, se analizaron 64 brotes en cada medio.



Figura 7- Material de partida para cultivo *in vitro*

Los explantos fueron incubados a 26 ± 2 °C, iluminados con una intensidad de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^2$ y un fotoperiodo de 16 horas de luz /8 horas de oscuridad.

3.2.2 Actividad antioxidante

Los frutos analizados proceden todos de la Sociedad Cooperativa andaluza Sta. María de la Rábida "Arándano de Palos".

3.3 Medios de multiplicación *in vitro*

Los medios de multiplicación se ensayaron sometiendo al material vegetal de la variedad Brigitte a diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, empleando diferentes medios base.

Usando como medio de multiplicación control el WPM con 4mg/l de 2IP de resultados conocidos, se comparó la diferencia entre el empleo de WPM como medio base y el MS 1/3 (medio Murashige & Skoog con los macroelementos reducidos un tercio) (Rache & Pacheco, 2010). Por otro lado, se estudió el efecto producido por la reducción de la concentración de 2ip de 4 a 2,5 mg/L (Ostrolucká *et al.*, 2004; Reed & Abdelnour-Esquivel 1991) y se evaluó la influencia de la adición de AIB y Zeatina al medio de cultivo (Ruzic *et al.*, 2012). (Tablas 1 y 3)

	Medio	Regulador	Volumen para ensayo	Jarras 50 ml	Cantidad de plantas
1	WPM	2ip2,5	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones
2		2ip4	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones
3		Z0,5 / 2ip2,5	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones
4		Z0,5 / 2ip4	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones
5		Z0,5 / AIB0,1	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones
6	MS 1/3	2ip4	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones
7		Z0,5 / 2ip4	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones

Tabla 1 - Diseño del experimento de optimización de medio de multiplicación de *Vaccinium corymbosum*

3.4 Medios de enraizamiento *in vitro*

Para ensayar los medios de enraizamiento probamos el uso de ambos medios WPM y MS 1/3 sin reguladores del crecimiento (Jaakola *et al.*, 2001) y con 1 mg/L de AIB y 1 mg/L de Carbón activado (Cüce & Sökmen, 2015) (Ostrolucká *et al.*, 2004) (Tablas 2 y 3). También se probó el enraizamiento en doble fase en donde se añadió medio líquido con dos concentraciones diferentes de AIB (0,1 y 0,5 mg/L) al medio semisólido de multiplicación.

	Medio	Regulador	Volumen para ensayo	Jarras 50 ml	Cantidad de plantas
1	WPM	--	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones
2		AIB1/CA1	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones
3	MS 1/3	--	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones
4		AIB1/CA1	200ml	4	8 brotes x jarra 2 jarras x 2 repeticiones

Tabla 2 Diseño de experimento de optimización de medio de enraizamiento de *Vaccinium corymbosum*

Medio WPM pH 5,5 - 5,6		Medio MS 1/3 pH 5,5 - 5,6	
<u>Macroelementos</u>		<u>Macroelementos</u>	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	9,6 g/l	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	44 g/l
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	55 g/l	KNO ₃	190 g/l
KH ₂ PO ₄	17g/l	KH ₂ PO ₄	17 g/l
K ₂ SO ₄	99 g/l		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	37 g/l	MgSO ₄ · 7H ₂ O	37 g/l
NH ₄ NO ₃	40g/l	NH ₄ NO ₃	165 g/l
<u>Microelementos</u>		<u>Microelementos</u>	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	25 mg/l	CuSO ₄ · 5H ₂ O	25 mg/l
H ₃ BO ₃	620mg/l	H ₃ BO ₃	6200 mg/l
MnSO ₄ · H ₂ O	2230 mg/l	MnSO ₄ · H ₂ O	16900 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25 mg/l	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	250 mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860 mg/l	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8600 mg/l
FeNa EDTA	36,7 mg/l	FeNa EDTA	36,7 mg/l
		Co Cl ₂ · 6 H ₂ O	25 mg/l
		KI	830 mg/l
<u>Vitaminas</u>		<u>Vitaminas</u>	
Glicina	2 mg/l	Glicina	2 mg/l
Ácido Nicotínico	0,5 mg/l	Ácido Nicotínico	0,5 mg/l
Piridoxina	0,5 mg/l	Piridoxina	0,5 mg/l
Tiamina	1 mg/l	Tiamina	0,10 mg/l
Inositol	100 mg/l	Inositol	100 mg/l
<u>Agar</u>		<u>Agar</u>	
Agar	7 g/l	Agar	7 g/l
<u>Sacarosa</u>		<u>Sacarosa</u>	
Sacarosa	30 g/l	Sacarosa	30 g/l
<u>200 ml cada prueba de multiplicación</u>		<u>200 ml cada prueba de multiplicación</u>	
2ip4	0,8 mg	2ip4	0,8 mg
2ip2,5	0,5 mg	Z0,5 / 2ip4	0,1/0,8 mg
Z0,5 / AIB 0,1	0,1/0,02 mg		
Z0,5 / 2ip4	0,1/0,8 mg		
Z0,5 / 2ip2,5	0,1/0,4 mg		
<u>200 ml cada prueba de enraizamiento</u>		<u>200 ml cada prueba de enraizamiento</u>	
AIB1 / CA1	0,2/0,2 mg	AIB1 / CA1	0,2 / 0,2 mg
Sin reguladores	--	Sin reguladores	--

Tabla 3 - Reactivos y concentraciones para los distintos medios de multiplicación y enraizamiento

3.5 Determinación de características físico químicas de frutos de arándano

Procedimos a la caracterización físico química de frutos comerciales de arándano, mediante la determinación del peso fresco, peso seco, tamaño medio y el contenido en sólidos solubles (Prior et al., 1998). El peso medio se determinó mediante dos métodos, por un lado, se pesaron 50 frutos individualmente y se halló la media, y por otro se halló el cociente entre el peso de un grupo de frutos (en este caso 50,601 gramos de arándanos) y el número de frutos presentes en la muestra. El peso seco se determinó por triplicado tras introducir los arándanos en una estufa a 70°C durante 72 horas. El tamaño medio se determinó midiendo 50 frutos con un calibre tanto la distancia desde el punto de inserción del tallo hasta el punto opuesto como la línea perpendicular a ésta (alto y ancho), hallando después una media de estos dos valores. El contenido en sólidos solubles se determinó midiendo en un refractómetro Shibuye modelo 15287(0 – 32%) el zumo obtenido tras exprimir frutos de arándano a través de 4 capas de gasa de algodón.

3.6 Extracción de compuestos fenólicos

3.6.1 Métodos de extracción

Para poder comparar los diferentes tipos de extracción, se llevó a cabo la extracción de compuestos fenólicos en arándanos completos, en pulpa y en piel. Procedimos a la extracción en una proporción 1:1 (p/v) de los fenoles hidrofílicos en agua y los lipofílicos en metanol al 80% y en acetonitrilo al 70% acidificado al 4% de ácido acético. Se homogeneizaron con un homogeneizador Micra D-I (Art moderne Labortechnik), siendo posteriormente centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se guardó en tubos eppendorf a -80°C para posteriores análisis. El mismo procedimiento se llevó a cabo tanto en la pulpa como en la piel.

Extracción en agua:

Siguiendo un protocolo modificado a partir del trabajo de Kraujalyte et al. (2015) procedimos a homogenizar en agua destilada arándanos completos, sólo pulpa o sólo piel en una proporción 1:1 (p/v).

Extracción con metanol 80%

Siguiendo el método modificado de Díaz et al. (2001) realizamos una extracción 1:1 (p/v) en metanol al 80%, seguido de una incubación a 70°C durante 30 minutos.

Extracción con acetonitrilo al 70% con ácido acético al 4%

Utilizando el método descrito por Prior et al. (1998) realizamos una extracción en acetonitrilo al 70% con ácido acético al 4% con una relación 1:1 (p/v).

3.6.2 Determinación de contenido de fenoles totales

Método de Folin – Cicalteau y recta de calibrado de ácido gálico

Para medir el contenido de fenoles totales usamos el reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método modificado de Slinkard & Singleton (1977) usado por Kraujalyte *et al.* (2015). Mezclamos 100 µl de muestra con 1ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 10 veces. La muestra procedente de extracción de pulpa y del arándano completo fue diluida 4 veces en agua y la piel 10 veces hasta llegar al volumen final de muestra de 100 µl. Tras 4 minutos, le añadimos a cada tubo 1ml de Na₂CO₃ al 7% y 400 µl de agua destilada y se incubaron los tubos durante 90 minutos en oscuridad. Procedimos a la lectura de la absorbancia a 725nm. Para la recta de calibrado utilizamos disoluciones de ácido gálico (de 0 mg/ml hasta 0,2mg/ml). Los resultados se expresan en mg de equivalentes de ácido gálico por ml de extracto (mg GAE/ml) y por mg de peso fresco de muestra (mg GAE/ g PF).

$$\text{Recta de calibrado: Absorbancia}_{760\text{nm}} = 1,2119 \cdot [\text{equivalentes de ácido gálico}]$$

3.6.3 Determinación de actividad antioxidante:

En primer lugar era necesario conocer el rango de diluciones necesarias para llevar a cabo el ensayo, dado el intenso color de las muestras de arándano. Esto se realizó poniendo en contacto el extracto con una solución del radical libre. La dejamos actuar de modo que la intensidad de color, es decir, la concentración del radical oxidado fue disminuyendo en función

de la capacidad secuestrante del extracto y monitorizamos con el espectrofotómetro ese descenso de la absorbancia. Se midió por espectrofotometría la absorbancia de un blanco de reacción (solución de radical libre sin extracto antioxidante) y la de las mezclas de reacción de las distintas muestras. Consideramos la absorbancia del blanco como 100% y las absorbancias de las muestras se expresan en referencia a ese valor.

Calculamos el porcentaje de pérdida del color del radical por acción del extracto según la ecuación (Chinprahast et al., 2016):

$$\% \text{ Decoloración} = [1 - (A_{\text{muestra}} / A_{\text{blanco}})] \times 100$$

La pérdida de color del compuesto coloreado es proporcional a su reducción y por lo tanto a la actividad antioxidante del extracto.

3.7 Ensayo con DPPH

La actividad antioxidante se determinó por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de radical difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de extracto de arándano, usando la solución del radical DPPH como blanco según la técnica descrita por Thaipong, et al. (2006). La pérdida del color es proporcional al grado de captura del radical DPPH oxidado, y da una medida de la eficiencia antioxidante de los extractos. Los valores son expresados en comparación a tres compuestos patrón. Preparamos una solución de DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 1mM (40mg de DPPH en 100 ml de metanol absoluto). Esta disolución madre se diluyó en metanol hasta llegar a valores de absorbancia cercanos a 0,800 y en cada uno de los casos se hicieron reaccionar 50 µl del estándar antioxidante con 950µL de DPPH y variando los tiempos de incubación.

3.7.1 Curva patrón de ácido L-ascórbico

Para establecer la curva patrón utilizamos diferentes soluciones de concentraciones que varían de 50 a 750 µM con agua miliQ. Se prepararon a partir de una disolución madre de ácido L-ascórbico 1mM, para la que disolvimos 17,6 mg de ácido L-ascórbico en 100ml de agua miliQ.

Cada disolución de ascórbico se dejó reaccionar con DPPH durante 30 minutos en oscuridad y agitación.

$$\text{Absorbancia}_{515\text{ nm}} = -0,001[\text{equivalentes de ácido L-ascórbico}] + 0,7408 \quad R^2 = 0,9842$$

3.7.2 Curva patrón de Trolox

Preparamos una solución madre de Trolox 1 mM en etanol puro (25 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico en 100 ml de etanol) y a partir de ella preparamos disoluciones a diferentes concentraciones (de 10 a 600 μM). En este caso se midió la absorbancia de las muestras a intervalos de 1 minuto y observamos que la mezcla de reacción con DPPH pierde la absorbancia llegados a los 6 minutos, por lo que dejamos los extractos de arándano reaccionar solo un par de minutos.

$$\text{Absorbancia}_{515\text{ nm}} = -0,0011 \cdot [\text{equivalentes de TROLOX}] + 0,5767 \quad R^2 = 0,6939$$

3.7.3 Curva patrón de quercetina

Para la recta patrón preparamos una solución madre 1 mM en etanol puro (30,2 mg de quercetina en 100 mL de etanol). A partir de esa solución madre, preparamos disoluciones de quercetina a diferentes concentraciones en etanol (de 10 a 600 μM). La reacción de oxidación del DPPH fue muy rápida durante el primer minuto, incluso a concentraciones muy bajas de quercetina.

$$\text{Absorbancia}_{515\text{ nm}} = -0,0008 \cdot [\text{equivalentes de quercetina}] + 0,5039 \quad R^2 = 0,703$$

3.8 Ensayo con ABTS

Durante la reacción de reducción ante compuestos antioxidantes, el radical catiónico de ABTS de color azul verdoso, vuelve a su forma reducida incolora, midiéndose la absorbancia a 734nm.

La preparación del radical oxidado de ABTS se hizo siguiendo el método de Re *et al.* (1999) en el que 50ml de una solución de ABTS 2mM preparada en 100 ml de tampón PBS a pH 7,4 se hizo reaccionar con 200 μ l de persulfato potásico 70mM durante 15 – 16 horas en oscuridad.

La reacción del ABTS fue muy rápida con los tres estándares antioxidantes así como con las muestras analizadas, por lo que la medida de las absorbancias se realizó inmediatamente, preparando la mezcla de reacción en la cubeta del espectrofotómetro y sin dejar tiempo de incubación.

3.8.1 Curva patrón de ácido L-ascórbico

Del mismo modo que en el ensayo con DPPH, se realizó una recta de calibrado de la actividad antioxidante del ABTS con respecto a diferentes concentraciones de ácido L-ascórbico (50, 100, 250, 500, 750 μ M)

$$\text{Absorbancia}_{734\text{ nm}} = -0,1898 \cdot [\text{equivalentes de ácido L-ascórbico}] + 1,2061 \quad R^2 = 0,9465$$

3.8.2 Curva patrón de Trolox

Del mismo modo que en el ensayo con DPPH, se realizó una recta de calibrado de la actividad antioxidante del ABTS con respecto a diferentes concentraciones de Trolox (10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 400, 600 μ M)

$$\text{Absorbancia}_{734\text{ nm}} = -0,0013 \cdot [\text{equivalentes de TROLOX}] + 0.7331 \quad R^2 = 0,9716$$

3.8.3 Curva patrón de quercetina

Del mismo modo que en el ensayo con DPPH, se realizó una recta de calibrado de la actividad antioxidante del ABTS con respecto a diferentes concentraciones de quercetina (10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 400, 600 μ M)

$$\text{Absorbancia}_{734\text{nm}} = -0,0058 \cdot [\text{equivalentes de Quercetina}] + 0,6812 \quad R^2 = 0,8028$$

3.9 Análisis estadístico

En el caso de los cultivos *in vitro* los datos medios proceden del análisis de 64 brotes sembrados en cada tipo de medio en dos experimentos independientes. Para el estudio de actividad antioxidante y compuestos fenólicos, los ensayos se realizaron por triplicado con frutos congelados. Los datos se expresan con un análisis de la desviación estándar. La regresión lineal se llevó a cabo mediante el programa Microsoft Excel 2016.

4 Resultados y discusión

4.1 Cultivo *in vitro*

4.1.1 Optimización de medios de multiplicación

Los brotes de arándano cultivados en cada uno de los medios estudiados se analizaron al cabo de 6 semanas en la cámara de cultivo. En cada jarra de experimentación se plantaron 8 brotes, de modo que los datos de tasa de multiplicación se obtuvieron al contar el número de nuevos brotes generados a partir de los originales. La tasa de multiplicación se calculó dividiendo el número de brotes obtenidos por el número de brotes originales.

También se determinó la longitud de los brotes, así como el fenotipo de los mismos fijándonos en el vigor de los brotes (grueso, medio y fino) y las características de las hojas (Figura 8, tabla 4). Establecimos diferentes categorías de hojas según su longitud: (A) más de 4 mm, (B) entre 2-3,5 mm y (C) entre 1 y 2 mm, siendo las primeras las que debían tener los brotes preferentemente (Figura 8 b).

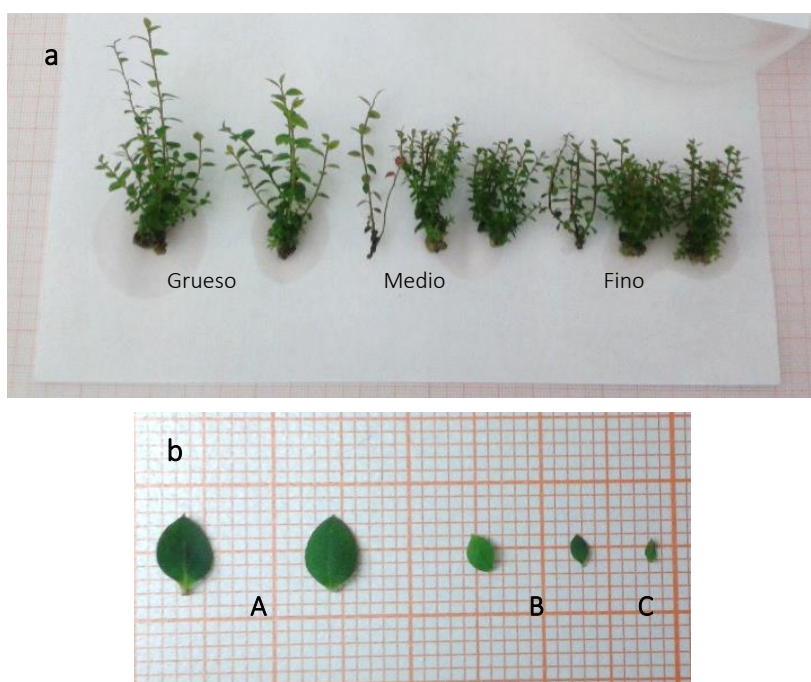


Figura 8 - Clasificación de brotes y hojas en cultivo *in vitro*

Medio basal	Reguladores crecimiento	Tasa media de multiplicación	Tamaño medio brotes (cm)	Fenotipo hojas	Vigor
WPM	2ip2,5	3,018 ± 0,57	3,275 ± 0,64	C	Gruesos
	2ip4	3,992 ± 1,26	2,936 ± 0,56	C-B	Grueso
	Z0,5 2ip2,5	3,906 ± 1,02	2,689 ± 0,57	A	Fino
	Z0,5 2ip4	4,008 ± 0,99	2,728 ± 0,29	A	Fino
	Z0,5 AIB0,1	4,375 ± 1,34	3,184 ± 0,51	B	Medio
MS/3	2ip4	3,609 ± 1,08	2,625 ± 0,42	B	Medio
	Z0,5 2ip4	2,672 ± 0,77	2,880 ± 0,38	A	Fino

Tabla 4 - Resultados de los experimentos de multiplicación

Comparación entre el uso de medio MS 1/3 y WPM

Hemos observado que el medio de cultivo más adecuado para la producción de arándano es el WPM, ya que permite el desarrollo de plantas más vigorosas. Esto concuerda con los estudios de Hine-Gómez & Abdelnour-Esquivel (2013) y Cüce & Sökmen (2015).

Los datos de tasa de multiplicación y tamaño de brotes en los diferentes ensayos no varían demasiado, pero fenotípicamente los brotes crecidos en medio MS1/3 mostraron menor lignificación y unas hojas más pequeñas.

No se ha empleado el medio MS completo ya que según Ružić et al. (2012) en sus estudios establecieron que el medio MS completo no da buenos resultados para el cultivo de arándano por la baja tasa de multiplicación y la alta incidencia de necrosis en brotes. Con el empleo de MS 1/3 no hemos apreciado necrosis, pero tampoco una mejora en las características de los brotes cultivados.

Efecto de concentración de 2isopentiladenina

Hine-Gómez & Abdelnour-Esquivel (2013) sostienen que el uso de 2ip respecto a otras citoquininas se traduce en una mayor longitud de los brotes y más cantidad de hojas. Sin embargo, a una concentración elevada de 2ip (4 mg/L), se producen brotes bastante etiolados. Por el contrario a concentraciones más bajas de 2ip (2,5 mg/L), se obtiene menor número de brotes pero más grandes y vigorosos y con mayor tamaño de las hojas, lo cual facilitará su aclimatación a condiciones de invernadero.

Efecto de Zeatina y AIB

Los estudios de Cüce & Sökmen (2015) con medio WPM suplementado con Zeatina y AIB mostraban unos resultados mucho más prometedores que los encontrados en nuestros experimentos. Obtienen unas longitudes de sus brotes fueron mayores que en medio MS, mientras que concluyen que el uso de Zip les ofrecía peores resultados al contrario de lo que indican nuestros ensayos.

La adición de Zeatina a diferentes concentraciones de Zip provocó un incremento llamativo de la tasa de multiplicación de los brotes, pero la mayoría de ellos mostraron hojas muy pequeñas, de tipo A y tallos finos rojizos, en contraposición de los tallos verdes y robustos que se formaban sólo con Zip.

Respecto al uso de Zeatina, varios autores como Ostrolucká et al. (2004) establecen que el uso de Zeatina se traduce en un mayor número de brotes respecto al uso de Zip, lo cual está de acuerdo con nuestros resultados. Sin embargo, fenotípicamente las plantas obtenidas con el uso de Zeatina son menos vigorosas que las cultivadas en un medio con Zip, por lo que quizás el coste del uso de esta hormona no suponga un beneficio a la hora de obtener plantas para su comercialización. En este punto estamos de acuerdo con los trabajos de Reed & Abdelnour-Esquivel (1991) en los que concluyeron que el alto coste de la Zeatina la excluye de un uso extensivo como hormona de crecimiento, aunque a pequeña escala su uso está recomendado por ejemplo para iniciar el crecimiento de explantos.

4.1.2 Optimización de medios de enraizamiento

Diferencias entre medio MS 1/3 y WPM

El mayor problema que nos hemos encontrado en el cultivo *in vitro* del arándano ha sido la dificultad para la formación de raíces. El uso de medios basales empobrecidos en micronutrientes como el MS 1/3 o sin adición de reguladores de crecimiento, no se comprobó como efectivo a la hora de crear las condiciones para que la planta desarrolle raíces (Tabla 5).

Medio basal	Reguladores crecimiento	% raíces formadas <i>in vitro</i>
WPM	--	15,63%
	AIB1 CA1	10,94%
MS 1/3	--	8,93%
	AIB1 CA1	20,31%

Tabla 5 - Porcentaje de raíces formadas en los diferentes medios

Rache & Pacheco (2010) llegaron a la conclusión de que aunque la inducción de enraizamiento *in vitro* no fue exitosa durante sus experimentos, la viabilidad de las plántulas obtenidas una vez transferidas a tierra era muy alta, lo cual debe ser tenido en cuenta.

Efecto de AIB con CA

Según los estudios de Cüce & Sökmen (2015), el uso de carbón activo en el medio de enraizamiento inhibe la formación de callos e incrementa el porcentaje de formación de raíces llegando a porcentajes de enraizamiento de hasta el 60%, pero en nuestros ensayos no se confirmó en todos los casos, ya que en el caso del medio MS sí que se aprecia un incremento en el porcentaje de raíces formadas al añadir AIB y CA, pero en el caso del medio WPM, los resultados de formación de raíces fueron mejores en el medio sin reguladores de crecimiento que en el medio suplementado con AIB y CA (Tabla 5). No se ha estudiado el efecto del AIB y del CA por separado, pero podría ser interesante comprobarlo en futuros ensayos.

Eficacia del cultivo en doble fase para enraizamiento

En un intento de incrementar la formación de raíces, ensayamos la adición de 12 ml de AIB líquido 0,1mg/l y 0,5 mg/l a explantos que llevaban 2 meses en un medio WPM 2ip4, para poder comprobar si al añadirle una hormona de inducción del enraizamiento a un medio que ya está empobrecido, esto se traduciría en un incremento de formación de raíces. De los 34 brotes a los que se les añadió AIB 0,5mg/l, sólo 11 desarrollaron raíces (34,38%) mientras que en el caso del AIB 0,1mg/l el porcentaje fue mucho menor (12,50%) (Tabla 6). En ningún caso se llegó a valores próximos al 60% conseguidos por Cüce & Sökmen (2015) pero sí superaron en gran medida a los obtenidos con la adición de AIB y CA a un medio de cultivo fresco.

Medio basal	Reguladores crecimiento	% raíces formadas respecto al número total de brotes	Supervivencia en sustrato (30 días)
WPM	2ip4 + AIB 0,1	12,50%	100%
WPM	2ip4 + AIB 0,5	34,38%	100%

Tabla 6 - Efecto del uso de AIB líquido sobre medio WPM

Enraizamiento ex vitro

Los brotes pasaron de medio de cultivo sólido a sustrato y continuaron en condiciones de crecimiento controladas en la cámara de aclimatación. 30 días después de la transferencia, los brotes que pasaron de medio de enraizamiento a sustrato tuvieron un porcentaje de supervivencia superior al 80% en todos los medios ensayados. Pasados 75 días desde la fecha de cambio de medio, estos altos niveles decrecieron ya que los brotes pasaron de la cámara de aclimatación al invernadero. De cualquier modo, se lograron supervivencias superiores al 40% en brotes procedentes de medio MS 1/3 suplementado con AIB y CA, llegando a datos cercanos al 88% en las plantas procedentes de medios WPM y MS 1/3 sin ningún regulador del crecimiento (Tabla 7). Estas plantas presentaron un fenotipo vigoroso, con tallos lignificados, hojas grandes y gruesas, con el verde como color predominante (Figura 9).

Medio	Reg. Crec.	Plantas aclimatadas			Supervivencia 30 días				Supervivencia 75 días			
		Con raíz	Sin raíz	Total	Con raíz	%	Sin raíz	%	Con raíz	%	Sin raíz	%
WPM	2ip4	0	56	56	0	-	50	89,29	0	-	3	5,36
	--	17	15	32	17	100	15	100	15	88,24	13	86,67
	AIB1 CA1	7	25	32	6	85,71	25	100	5	71,43	12	48
MS/3	--	6	26	32	6	100	26	100	6	100	22	84,62
	AIB1 CA1	20	22	42	20	100	12	54,55	7	35	12	54,55

Tabla 7 – Datos de supervivencia tras la aclimatación a 30 y 75 días



Figura 9 – Desarrollo de brotes a 30 y 75 días de la transferencia a sustrato

4.2 Determinación de la capacidad antioxidante

4.2.1 Características físico químicas de frutos de arándano

El diámetro medio de los frutos de arándano es de 13,74 mm \pm 1,15. El peso fresco medio un arándano es de 1,84 g \pm 0,40, mientras que en seco es de 1,41 g \pm 0,22. Los sólidos solubles en el fruto son de 10,09º Brix. Todos estos datos coinciden con los rangos determinados por Kraujalyte, et al. (2015) en sus estudios

Diámetro (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Sólidos solubles (ºBrix)
13,74 \pm 1.15	1,84 \pm 0.40	1,41 \pm 0.22	10,09 \pm 1.47

Tabla 8- Características físico - químicas de frutos de arándano

4.2.2 Extracción de compuestos fenólicos

Métodos de extracción y determinación de fenoles totales

De los tres métodos de extracción de fenoles totales, con el que se consigue mayor concentración de fenoles totales es con el metanol seguido del acetonitrilo y por último el agua, tanto en mg de equivalentes de ácido gálico por mililitro de muestra como en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco (Tabla 9).

De las tres zonas del fruto, en la que hay con diferencia más cantidad de fenoles totales es en la piel, siendo el acetonitrilo al 70% más eficaz que el metanol y el agua. El volumen de la pulpa (sin apenas fenoles) con respecto al de la piel (muy rico en fenoles) hace que la media de fenoles extraídos del fruto completo disminuya mucho respecto a los presentes solo en la piel. (Tabla 9, datos expresados como mg GAE/ g de peso fresco en los diferentes extractos)

	Total	Pulpa	Piel
Agua destilada	1,141 \pm 0,42	0,182 \pm 0,09	4,651 \pm 2,40
Metanol 80%	6,467 \pm 0,84	1,930 \pm 0,76	6,133 \pm 1,82
Acetonitrilo 70%	4,529 \pm 1,19	1,274 \pm 0,12	7,965 \pm 1,82

Tabla 9 - Contenido en fenoles totales

Analizando los datos de contenido en fenoles totales en arándanos completos, nuestros datos coinciden con los obtenidos por Kraujalyte, et al. (2015) cuando se trata de los extractos acuosos. En el caso del análisis de extractos con acetonitrilo, nuestros datos son mayores a los

obtenidos por Prior, et al. (1998) ya que en su caso sólo obtuvieron 2,273 mg GAE/g en la variedad O'Neal de *V. corymbosum*, pero se acerca bastante a los datos de *V. ashei* var. Brightwell, que presentaba 4,575 mg GAE/g.

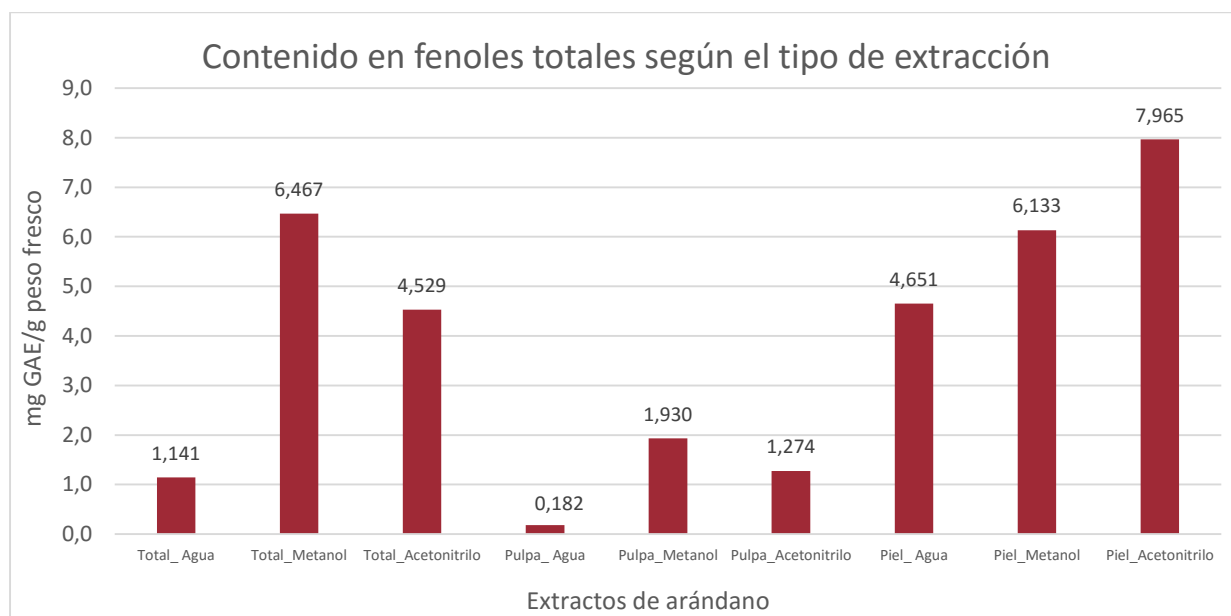


Figura 10 - Contenido en fenoles totales según el tipo de extracción

Determinación de actividad antioxidante

Una vez determinada la presencia de compuestos fenólicos utilizando diferentes métodos de extracción, procedimos a evaluar la capacidad antioxidante en los extractos de arándanos completos. Nuestros datos indican que el método de decoloración de ABTS es mucho más sensible que el DPPH para determinar la actividad antioxidante de un extracto de arándanos. Los valores de equivalentes de estándar son mayores, tanto expresados como ácido ascórbico, Trolox o quercetina, siendo del orden de micromoles en el ABTS y de nanomoles en el DPPH. (Tabla 10)

	DPPH			ABTS		
	nmol AE /g PF	nmol TE /g PF	nmol QE /g PF	μmol AE /g PF	μmol TE /g PF	μmol QE /g PF
Agua destilada	3,417 ± 0,93	3,431 ± 0,94	3,423 ± 0,93	0,133±0,01	0,100±0,01	0,101±0,01
Metanol 80%	9,477 ±1,60	9,495 ±1,60	9,485 ±1,6	2,536±0,4	2,036±0,33	2,054±0,34
Acetonitrilo 70%	7,071 ±0,75	7,090 ±0,75	7,079 ±0,75	2,737±0,5	2,205±0,45	2,228±0,45

Tabla 10 - Equivalentes de antioxidantes

En todos los extractos de arándanos completos (acuoso, metanólico o acetonitrílico) ensayados con DPPH, la concentración de fenoles simples medidos como equivalentes de ácido ascórbico o de Trolox es bastante similar a la concentración de fenoles complejos. (Figura 11). Sin embargo, al medir la actividad antioxidante con el método de decoloración de ABTS, aparece una mayor cantidad de fenoles simples equivalentes al ácido ascórbico en todas las muestras (Figura 12) respecto a los fenoles complejos o los equivalentes al Trolox.

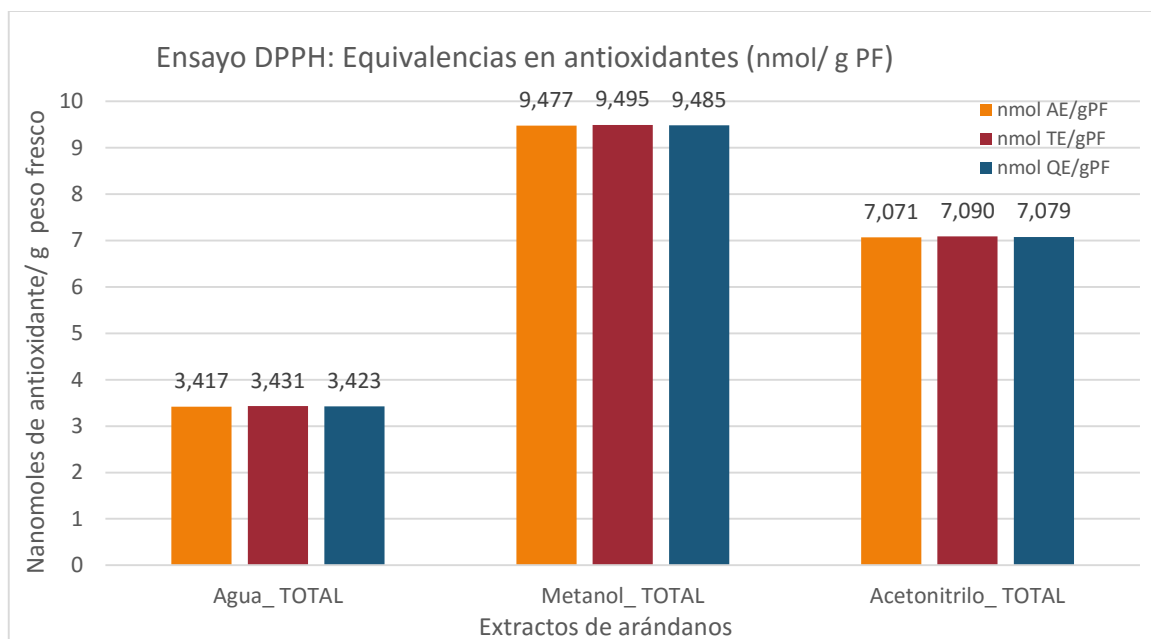


Figura 11 – Resultados del ensayo DPPH. Equivalencias en antioxidantes

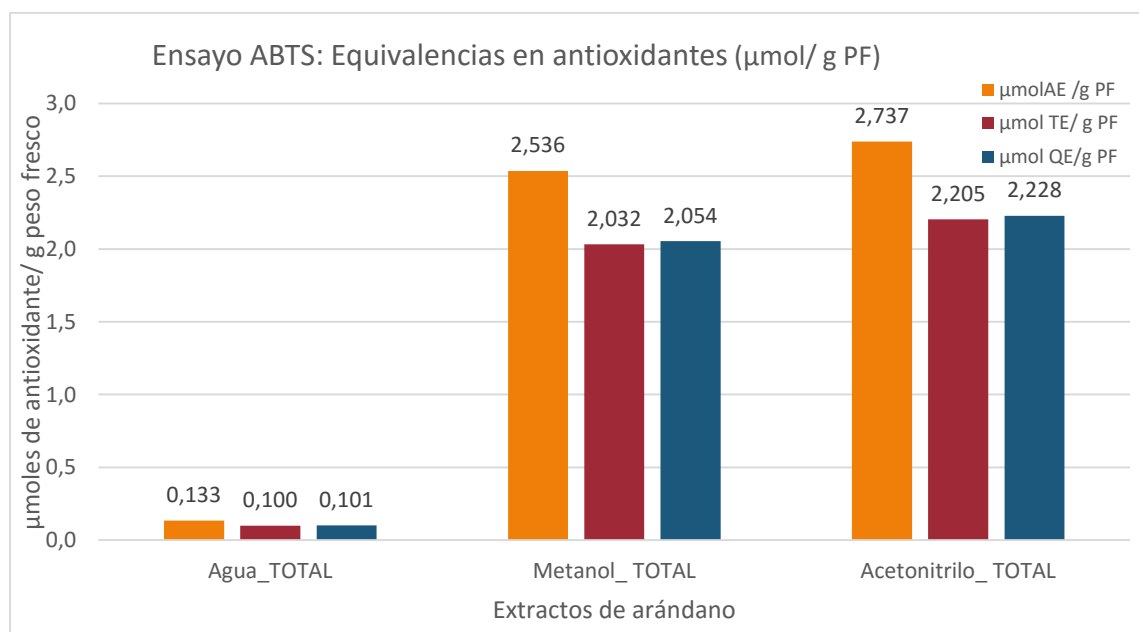


Figura 12 – Resultados del ensayo ABTS. Equivalencias en antioxidantes

El compuesto cromógeno más estable es el DPPH, por lo que, en una búsqueda de un método sencillo, la experiencia nos haría declinar hacia este compuesto, tanto por la facilidad de su preparación (no es necesario dejarlo incubarse 16 horas como el ABTS) como por la posibilidad de mantener su absorbancia durante varios días (conservado en frío) lo cual permite usar una misma disolución para una serie de experimentos a lo largo de varios días. Resultados similares respecto a los datos obtenidos con ambos métodos han sido obtenidos por Arnao (2000), Ozgen, et al. (2006), Re, et al. (1999) y Thaipong, et al. (2006)

En el caso del DPPH los valores más altos de actividad antioxidante se obtuvieron con los extractos metanólicos y en el caso del ABTS los valores más altos se obtuvieron al usar los extractos de acetonitrilo, pero la diferencia con los extractos metanólicos no es muy grande. Dado que nos hemos decantado en el primer punto por el DPPH, lo consiguiente es que la extracción de los compuestos fenólicos se realice con metanol al 80%, ya que hemos comprobado que obtenemos mayor concentración de los mismos con este método.

La extracción tradicional de fenoles se realiza con metanol y acetonitrilo, pero dado que el arándano se consume en fresco o en zumos, nos pareció interesante comparar los datos de actividad antioxidante de los extractos acuosos con dos variedades de té negro y verde (*Camellia sinensis*) preparadas en infusión (Gil et al., 2000) (Figuras 13 y 14). En el trabajo de Gil, et al. (2000), observó que la actividad antioxidante de los zumos comerciales de granada duplicaba la del té verde, pero él lo achacaba a un incremento debido al procesamiento industrial de los zumos. Por otro lado, el mismo autor lo comparaba con el zumo de frutos congelados y mencionaba que en el proceso de congelación se debía producir una degradación o transformación de compuestos antioxidantes del fruto, lo cual podría ser la causa de las diferencias encontradas. Tanto usando el ensayo de DPPH como en el de ABTS, la actividad antioxidante mostrada por el extracto acuoso de arándano es mucho menor que la de cualquiera de las dos infusiones de té, lo cual puede deberse a la ausencia de procesamiento que menciona el autor.

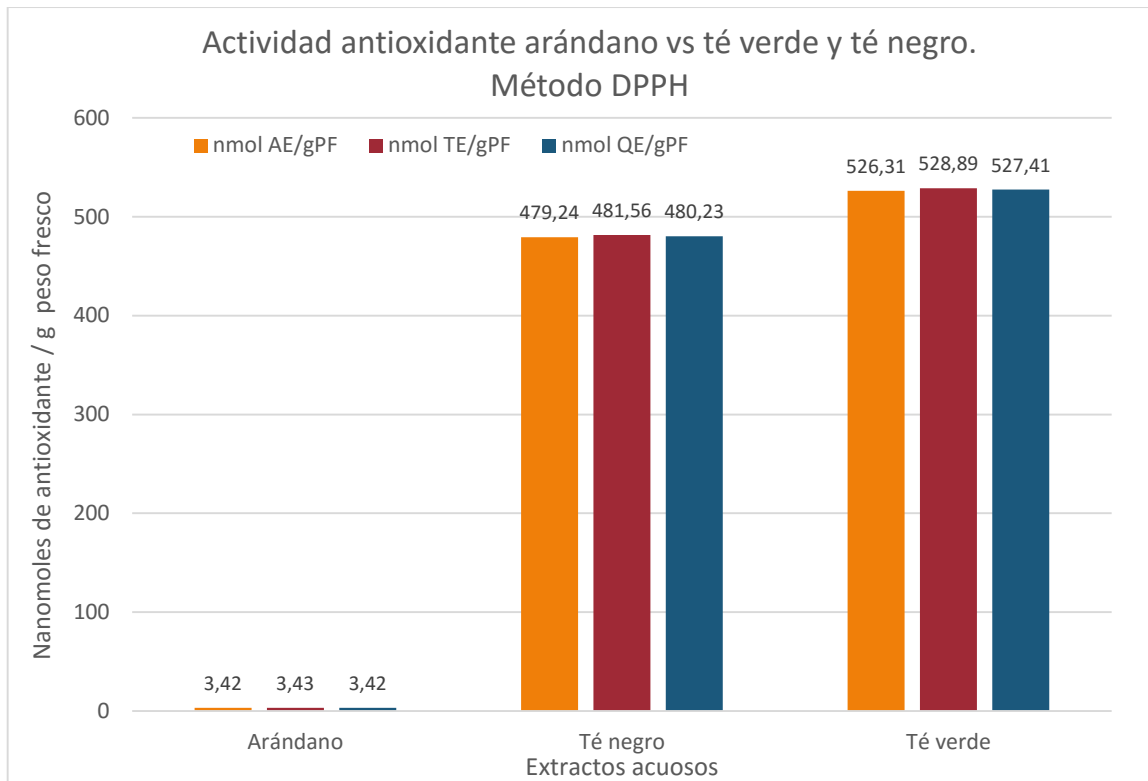


Figura 13 - Actividad antioxidante en extractos acuosos de arándano y té. Método DPPH (referido a 3 patrones)

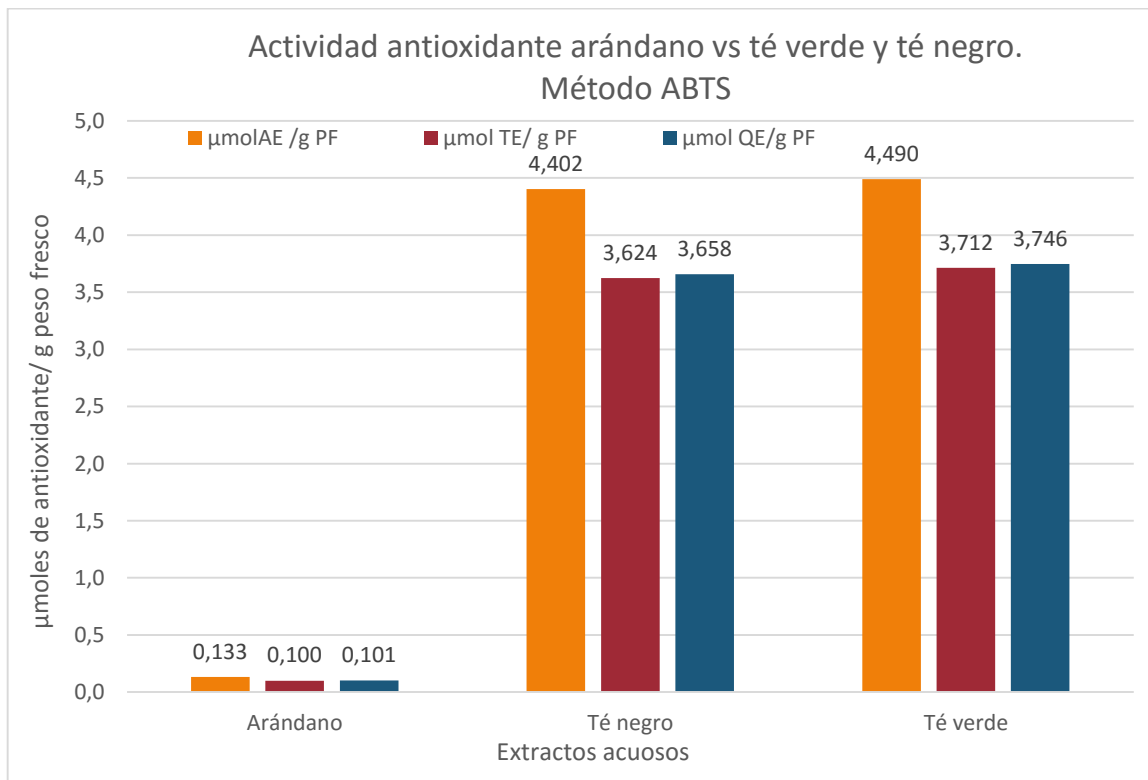


Figura 14- Actividad antioxidante en extractos acuosos de arándano y té. Método ABTS (referido a 3 patrones)

4.2.3 Relación entre el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante

Analizando ambos métodos de determinación de actividad antioxidante y los tres tipos de extracción de compuestos fenólicos, hemos encontrado en todos los casos una relación positiva entre el contenido de fenoles totales de la muestra analizada y la capacidad antioxidante, lo cual coincide con los estudios de Prior et al. (1998), Prior et al. (2001) y Castañeda-Ovando et al. (2009) (Tablas 10 y 11)

Método DPPH	Fenoles totales	Actividad antioxidante		
	[GAE] mg/g PF	nmol AE/gPF	nmol TE/gPF	nmol QE/gPF
Agua destilada	1,141 ± 0,42	3,417 ± 0,93	3,431 ± 0,94	3,423 ± 0,93
Metanol 80%	6,467 ± 0,84	9,477 ± 1,60	9,495 ± 1,60	9,485 ± 1,60
Acetonitrilo 70%	4,529 ± 1,19	7,071 ± 0,75	7,090 ± 0,75	7,079 ± 0,75

Tabla 11 - Relación entre contenido en fenoles totales y actividad antioxidante por el método DPPH

Método ABTS	Fenoles totales	Actividad antioxidante		
	[GAE] mg/g PF	μmol AE/gPF	μmol TE/gPF	μmol QE/gPF
Agua destilada	1,141 ± 0,42	0,133 ± 0,01	0,100 ± 0,01	0,101 ± 0,01
Metanol 80%	6,467 ± 0,84	2,536 ± 0,40	2,032 ± 0,33	2,054 ± 0,34
Acetonitrilo 70%	4,529 ± 1,19	2,737 ± 0,50	2,205 ± 0,45	2,228 ± 0,45

Tabla 12 - Relación entre contenido en fenoles totales y actividad antioxidante por el método ABTS

5 Conclusiones

5.1 Mejora de la propagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum*

- El medio basal más adecuado para la multiplicación es el WPM.
- Un descenso de la concentración de 2ip no afecta al crecimiento de los brotes de arándano en este medio (WPM) pero sí mejora el fenotipo.
- La adición de Zeatina no se traduce en un incremento notable de la tasa de multiplicación ni en una mejora del aspecto de los explantos.
- La ausencia de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo mejora la supervivencia de las plantas en la fase de aclimatación.
- El empleo del cultivo en doble fase, mejora la tasa de enraizamiento *in vitro* y elimina la excesiva mano de obra que implicaría la transferencia de las plantas a un medio de cultivo de enraizamiento semisólido.
- La ausencia de rizogénesis *in vitro* no impide que se pueda conseguir la aparición de raíces en una fase posterior *ex vitro*, ya que presenta una capacidad de enraizamiento relativamente elevada.

5.2 Evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales

- Un fruto de arándano comercial pesa de promedio 1,84 g en fresco y 1,41 g en seco. Su diámetro medio es de 13,74 mm y presenta 10,09°Bx de sólidos solubles.
- De los tres métodos de extracción de fenoles totales, el metanol al 80% proporciona la mayor concentración de fenoles, seguido del acetonitrilo al 70% y por último el agua.
- El contenido mayor de fenoles en los frutos de arándano se encuentra en su piel, independientemente del solvente con el que se realice la extracción.
- De los dos métodos ensayados para medir la actividad antioxidante, el DPPH es el compuesto más estable, lo cual permite una mayor reproducibilidad de los experimentos
- El té verde tiene más concentración de compuestos con actividad antioxidante que el té negro o el extracto de arándano.

6 Bibliografía

Arnao, M. B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, Issue 11, pp. 419-421.

Benzie, I. & Strain, J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, Issue 239, p. 70:76.

Boligon, A., Machado, M. & Athayde, M., 2014. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*, pp. 517-522.

Brambilla, A., Lo Scalzo, R., Bertolo, G. & Torreggiani, D., 2008. Steam-blanching highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice: phenolic profile and antioxidant capacity in relation to cultivar selection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 2643-2648.

Cao, G., Alessio, H. & Cutler, R., 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, Issue 14, pp. 303-311.

Castañeda-Ovando, A. , Pacheco, M., Páez, M., Rodríguez, J., Galán, C., 2009. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, pp. 859-871.

Chinprahast, N., Tungsomboon, T. & Nagao, P., 2016. Antioxidant activities of Thai pigmented rice cultivars and application in sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, pp. 46-53.

Cüce, M. & Sökmen, A., 2015. Micropropagation of *Vaccinium myrtillus* L. (Bilberry) naturally growing in the Turkish flora. *Turkish Journal of Biology*, pp. 233-240.

Debnath, S., 2009. Propagation and cultivation of *Vaccinium* species and less known small fruits. *Latvian Journal of Agronomy*, pp. 22-29.

Díaz, J., Bernal, Á., Pomar, F. & Merino, F., 2001. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, pp. 179-188.

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F., Hess-Pierce, B., Holcroft, D., Kader, A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volumen 48, pp. 4581-4589.

Giovanelli, G. & Buratti, S., 2009. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, pp. 903- 908.

González, M., López, M., Valdés, A. & Ordas, R., 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Annals of Applied Biology*, pp. 73-78.

Hine-Gómez, A. & Abdelnour-Esquivel, A., 2013. Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *Tecnología en Marcha*, pp. 64-71.

Jaakola, L., Tolvanen, A., Laine, K. & Hohtola, A., 2001. Effect of N-6-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 73-77.

Kraujalyte, V., Venskutonis, P., Pukalskas, A., Cesoniene, L., Daubaras, L., 2015. Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, pp. 583-590.

Li, D., Meng, X. & Li, B., 2016. Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. 1-7.

Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2011. *Guía de cultivo. Orientaciones para el cultivo del Arándano. Proyecto de cooperación "Nuevos Horizontes"*.

Mora, H. V., 2010. Organogénesis *in vitro* de arándano *Vaccinium corymbosum* L.. Tesis de Maestría: Instituto Politécnico Nacional, Michoacán.

Ostrolucká, M. G., Libiaková, G., Ondrusková, E. & Gajdosová, A., 2004. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis*, pp. 207-212.

Ozgen, M. Reese, R., Tulio, A., Scheerens, J., Miller, A., 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1151-1157.

Prior, R. L., Cao, G., Martin, A. Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischer, N., Ehlenfeldt, M., Kaldt, W., Krewer, G., Mainland, M., 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 2686-2693.

Prior, R. L., Lazarus, S., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J., 2001. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using High-Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1270-1276.

Rache, L. Y. & Pacheco, J. C., 2010. Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (*Ericaceae*). *Acta Botanica Brasilica*, pp. 1086-1095.

Reed, B. M. & Abdelnour-Esquivel, A., 1991. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience*, pp. 1320-1322.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, pp. 1231-1237.

Rodarte Castrejón, A. D., Eichholz, J., Rohn, S., Kroh, L., Huyskesns, S., 2008. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, pp. 564-572.

Ruzic, D., Vujovic, T., Libiakova, G., Cerovic, R., Gajdosova, A., 2012. Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Berry Research*, pp. 97-103.

Slinkard, K. & Singleton, V. L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, pp. 49-55.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. & Murphy, A., 2015. *Plant Physiology and Development*. Décimoquinta ed. Sinauer Associates, Inc..

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, A. Garrido, J., Borges, F., 2013. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed Research International*.

Thaipong, K. Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Ceballos, L., Hawkins, D., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. 669-675.

USDA , 2016. *United States Department of Agriculture*. [En línea] Available at: <http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=15866>