

Evaluación del cultivo in vitro de agave potatorum mediante la incorporación de compuestos bioactivos de cáscara de naranja en un medio MS reformulado

Galeazzi Galeazzi, Massimo

2024

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/6142>

<http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf>

Evaluación del cultivo *in vitro* de *Agave potatorum* mediante la incorporación de compuestos bioactivos de cáscara de naranja en un medio MS reformulado

Galeazzi Galeazzi Massimo* (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹; Suárez Carrera Daniel (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹ y Ramírez Rodríguez Rocío (profesora)¹.
¹Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México

Palabras clave: Compuestos bioactivos, cultivo de tejidos, micropropagación.

***Autor Corresponsal:** massimo.galeazzi@iberopuebla.mx

▪ Introducción

Agave potatorum es clave para la producción de mezcal en Puebla, con más de 250,000 ha cultivadas. Entre 2008 y 2018, la superficie sembrada creció un 67.33%, y en 2016 se exportaron 2013 mil litros de mezcal [1]. A pesar de su importancia, el cultivo enfrenta desafíos por su lento crecimiento y la reproducción sexual dependiente de polinizadores. La propagación asexual reduce la variabilidad genética y aumenta la vulnerabilidad a enfermedades, complicando la regeneración de poblaciones silvestres [2]. La micropropagación *in vitro* con medio Murashige & Skoog, se presenta como una alternativa, sin embargo, presenta altas concentraciones de sales como nitrato de potasio (KNO₃) y nitrato de amonio (NH₄NO₃) que pueden afectar el desarrollo del agave y no se han realizado ajustes importantes en la formulación [3]. Los residuos agroindustriales, como cáscaras de naranja, contienen compuestos bioactivos (flavonoides, flavonoles y flavonas) que actúan como fuente de carbono y tienen propiedades antifúngicas y antioxidantes, lo que sugiere que reformular el medio MS con la adición de estos residuos podría optimizar la micropropagación [4][5]. En este proyecto se plantea evaluar el efecto de la adición de compuestos bioactivos derivados de residuos agroindustriales en un medio MS reformulado para mejorar el crecimiento *in vitro* de *Agave potatorum*.

▪ Metodología

Las cáscaras de naranja se obtuvieron en una cafetería de la Universidad Iberoamericana Puebla, de las cuales se les removió la pulpa, se lavaron y secaron para deshidratarlas en horno a 60°C por 24 horas. Una vez secas, se pulverizaron y se resguardó el polvo para la extracción de compuestos bioactivos. Se utilizaron dos métodos de extracción: Maceración Dinámica (MD) [6] y Extracción Asistida por Microondas (EAM) [7]. Se midieron las mismas cantidades de polvo, etanol y agua para ambos métodos, variando la técnica de extracción donde uno se maceró por un día y el otro fue introducido a microondas por 5 minutos. Ambos extractos fueron sometidos a un ensayo de polifenoles totales de Folin-Ciocalteu [8] para determinar la cantidad de flavonoides presentes, preparando ocho soluciones de menor a mayor concentración (mg/L) de ácido gálico con agua destilada, así como una solución de carbonato sódico al 7.5% para reaccionar con el ácido gálico. Una vez realizadas las soluciones de ácido gálico y carbonato sódico, se les midió la absorbancia en espectrofotómetro a 765 nm para realizar una curva de calibración, la cual sirvió para conocer la concentración de polifenoles totales en los extractos obtenidos.

Se escogieron cuatro plantas madre de *Agave potatorum* provenientes del vivero “Cultivadores de Cactus de México S. P. R. De R. L.” ubicado en Periférico Ecológico 1607 en San Andrés Cholula, Puebla. Se seleccionaron tomando en cuenta al tamaño de la planta, el número total de hojas, la presencia de retoños en el rizoma de la planta y que a primera vista no presentara enfermedades. Una vez obtenidos se resguardaron en el Laboratorio de Cultivos de Células y Tejidos de la Universidad Iberoamericana Puebla.

Para la preparación de las muestras, se cortaron los retoños de los rizomas con un bisturí y se lavaron con agua, detergente líquido y un cepillo para remover restos de tierra. Ya limpios se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio del 10% al 15% por 20 minutos. Transcurrido el tiempo se trasladaron a un recipiente con agua estéril para eliminar residuos de cloro y con bisturí se hizo la disección de los tejidos meristemáticos para eliminar capas protectoras. Una vez retirados esos tejidos se cortaron los explantes en bloques de 0.8 cm³ para su posterior cultivo.

Para el cultivo de tejidos se usaron frascos de vidrio tipo Gerber[®] de 150 mL, utilizando tres frascos por medio de cultivo, dando un total de seis frascos (tres de medio de cultivo MS convencional y tres de medio de cultivo MS reformulado), realizando el proceso por triplicado. Se prepararon en dos matraces Erlenmeyer de 1 L el medio MS convencional (4.4 g de sales MS, 30 g de sacarosa y 8 g de agar-agar) y el medio MS al 50% (2.2 g de sales MS, 30 g de sacarosa y 8 g agar-agar) y se esterilizaron los frascos medio en autoclave por 15 minutos a 121°C. Después de la esterilización al medio MS 50% se le añadieron 3.35 mL del extracto de compuestos bioactivos antes de que solidificara para obtener una concentración de 10 mg/L de antioxidantes.

Se cultivaron tres bloques de explantes en cada frasco de vidrio Gerber[®] por cada medio de cultivo. Una vez cultivados, se incubaron en el Laboratorio de Cultivos de Células y Tejidos en un fotoperiodo controlado de 16 horas luz y 8 horas de

oscuridad ($\pm 54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a una temperatura de $\pm 24^\circ\text{C}$ durante cuatro semanas, periodo en el que se llevará a cabo la organogénesis o embriogénesis. Después de las cuatro semanas, en nuevos medios preparados (MS y MS 50%) adicionados con 1-2 mg/L de 6-BAP, se trasladaron los explantes a cada medio para mejorar su adaptación e inducir el crecimiento de brotes.

Resultados

Muestra	Concentración	Absorbancia
0	0	0
1	2	0.0097
2	4	0.0271
3	6	0.0462
4	8	0.068
5	10	0.0827
6	12	0.0937
7	14	0.1215

Figura 1. Tabla de valores de absorbancia de ácido gálico para la obtención de la curva de calibración.

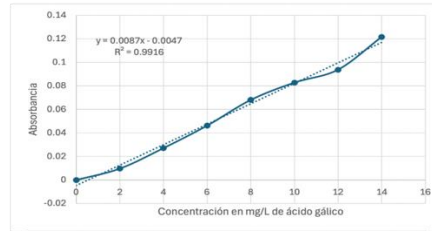


Figura 2. Curva de calibración de ácido gálico, la ecuación se utiliza para obtener la concentración de polifenoles totales presentes en los extractos de compuestos bioactivos obtenidos.

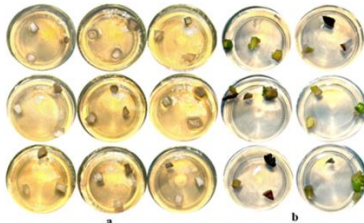


Figura 3. a. Explantes de *Agave Potatorum* sembrados en medio MS reformulado. b. Explantes de *Agave Potatorum* sembrados en medio MS convencional.

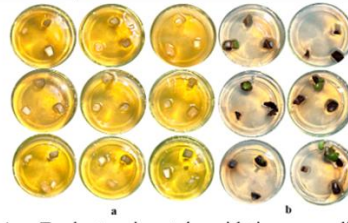


Figura 4. a. Explantes sin estrés oxidativo en medio MS reformulado + 1-2 mg/L 6-BAP. b. Explantes con alto estrés oxidativo en medio MS convencional + 1-2 mg/L 6-BAP.

Análisis de resultados

El análisis de la concentración de polifenoles mostró un rendimiento del 59.72% en el extracto obtenido por EAM, comparado con un 54.07% en el método MD. Ambos extractos presentaron características físicas idénticas, con un color verde oliva transparente y consistencia líquida. Se obtuvo el volumen necesario de extracto mediante EAM para obtener una concentración de 10 mg/L de antioxidantes por medio. Durante las primeras semanas de incubación, tres frascos del medio MS convencional presentaron contaminación, mientras que todos los cultivos en el medio MS reformulado permanecieron sin cambios ni contaminación. En la tercera semana, los explantes en MS convencional mostraron una ligera oxidación (de verde a amarillo oscuro), sin cambios ni contaminación en el medio reformulado. En la cuarta semana, los explantes en MS convencional presentaron mayor oxidación y cambios en coloración (bordes color café), mientras que en el medio MS reformulado se mantuvieron estables y sin contaminación.

En los explantes cultivados en medio MS convencional suplementado con 1-2 mg/L de 6-BAP, se observó un estrés oxidativo significativo después de dos semanas, en contraste con los explantes cultivados en el medio MS reformulado. El oscurecimiento fue más pronunciado en los explantes del medio MS convencional, lo cual puede atribuirse al potencial osmótico del medio de cultivo; al incrementarse la concentración de iones, el potencial osmótico disminuye, afectando negativamente los tejidos. El efecto de 6-BAP en el oscurecimiento de los explantes no es completamente consistente, ya que varía según la especie. Sin embargo, existen numerosas referencias que indican que este regulador de crecimiento puede favorecer el oscurecimiento en diversas especies. Este oscurecimiento era un efecto previsible, por lo que se incluyeron compuestos bioactivos en el medio MS reformulado con el objetivo de inhibir o retrasar la oxidación en los explantes. En particular, la presencia de flavonoides contribuyó a la descomposición de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y a la prevención de su formación, mitigando el estrés oxidativo en los explantes [11].

La falta de brotes en los explantes puede deberse al corto tiempo de incubación, posiblemente a una región meristemática insuficiente o no viable, y a la influencia de la posición del explante. Además, la eficiencia en la inducción de brotes puede variar estacionalmente según factores climáticos y el estado fisiológico de la planta madre.

Conclusiones

El medio MS reformulado con compuestos bioactivos de cáscara de naranja redujo el estrés oxidativo y el oscurecimiento de los explantes de *Agave potatorum* en comparación con el medio MS convencional, mostrando mayor estabilidad y ausencia de contaminación. Aunque no se mostraron brotes, estos resultados sugieren que la adición de compuestos bioactivos puede mejorar la micropropagación de *A. potatorum*, contribuyendo a un cultivo más sostenible y eficiente.

▪ Referencias

1. M. Fonseca Varela y L. E. Chalita Tovar, "Evaluación financiera de producción de agave y mezcal: caso de estudio Caltepec, Puebla," *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 12, núm. 2, pp. 263-273, mar. 2021.
2. K. S. Moreno Martínez y K. M. Monja Mio, "Cultivo *in vitro* de agaves," *Ciencia*, vol. 72, núm. 1, pp. 76-81, enero-marzo, 2021.
3. M. L. Robert, J. L. Herrera-Herrera, M. A. Herrera-Alamillo, A. Quijano-Ramayo, y E. Balam Uc, "Manual for the *in vitro* culture of agaves" Common Fund for Commodities of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), Viena, pp. 1-143, 2004.
4. S. H. Ng, P. E. Kee, H. S. Yim, P. Chen, Y. Wei y J. C. Lan, "Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts," *Bioresource Technology*, vol. 302, abril 2020.
5. J. E. Wong-Paz, P. Aguilar-Zárate, F. Veana & B. Muñiz-Márquez, "Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos", *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 23, pp. 1-11, 2020.
6. A. S. Duarte-Trujillo, J. A. Jiménez-Forero, J. Pineda-Insuasti, C. A. González-Trujillo & M. García-Juárez, "Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) por maceración dinámica", *Acta Biológica Colombiana*, vol. 25, no. 1, pp. 61-74, enero 2020.
7. L. Caputo, L. Quintieri, M. M. Cavalluzzi, G. Lentini & S. Habtemariam, "Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Citrus Water-Extracts Obtained by Microwave-Assisted and Conventional Methods, *Biomedicines-MDPI*, vol. 6, no. 2, junio 2018.
8. E. García Martínez, I. Fernández Segovia & A. Fuentes López, "Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu", *Repositorio Institucional Universitario EATSIAMN. Universidad Politécnica de Valencia*, pp. 1-9, 2015.
9. García-Mendoza, A. J. (2010). Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): Nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana*, vol. 91, pp. 71-93
10. E. García Martínez, I. Fernández Segovia & A. Fuentes López, "Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu", *Repositorio del Departamento de Tecnología de Alimentos, ETSIAMN – Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España*, pp. 1-9.
11. Á. Azofeifa, "Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*," *Agronomía Mesoamericana*, vol. 20, no. 1, pp. 153-175, 2009.