



UNICA

Universidad de Ciego de Ávila



**LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS,
DE THEOBROMA CACAO L.
A TRAVÉS DE APLICACIÓN DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS.**

Trabajo de diploma

Autor: Troy Augustine

Tutores: MSc. Janet Quiñones Gálvez

Dr. Reinaldo Trujillo Sánchez

Año: 2009



UNICA

Universidad de Ciego de Ávila



**Obtención de compuestos fenólicos
de *Theobroma cacao* L.
a través de técnicas biotecnológicas.**

Trabajo de diploma

Autor: Troy Augustine

Tutores: MSc. Janet Quiñones Gálvez

Dr. Reinaldo Trujillo Sánchez

Ciego de Ávila, Cuba



Año: 2009.



PENSAMIENTO

Aunque la higuera no florezca, Ni en las vides haya frutos, Aunque falte el producto del olivo, Y los labrados no den mantenimiento, Y las ovejas sean quitadas de la majada. Y no haya vacas en los corrales; Con todo, yo me alegraré en Jehová Y me gozaré en el Dios de mi salvación.

Habacuc. 3:17 y 18



DEDICATORIA:

Dedico este Trabajo de diploma a ti OH Señor! el autor y consumidor de la fe sin ti la vida no tiene sentido.



AGRADECIMIENTOS

Existen grandes momentos de nuestra vida por la que transcurrimos sin darnos cuenta de lo difícil que resultar enfrentarnos a esa realidad solos... Es por ello, profundamente de corazón deseo agradecer:

A Este gran ser, creador del universo por darme la vida, mi familia y la oportunidad de haber compartido con este gran pueblo cubano y convivido con hermanos de diversas culturas de diferentes partes del mundo.

A mi Iglesia Voz de Jubileo Ciego de Ávila el Pastor Daniel y su familia y todos mis hermanos en Cristo que me fortalece, La fraternidad de Jóvenes Cristianos, y El Grupo Cristiano de los Sud Africanos.

A Este inmenso caimán del caribe y al comandante en Jefe "Fidel Castro Ruz", bandera de la lucha por la justicia social, por haberme dado la oportunidad de forjarme en aulas de su universidad y entidad estatales; logros de la Revolución Cubana, lugar donde aprendí a apreciar y dar valor a las cosas por lo que son y no por lo que pudieran ser.

A Mis padres y hermanos (as) que desde la cuna me han sabido guiar por el camino correcto, brindándome todo su apoyo afecto y dedicación. Que en momentos difíciles han sido mi razón para avanzar con mi formación en la distancia.

A Mis tutores, Madre y Padre: Janet Quiñónez Gálvez y Reinaldo Trujillo Sánchez por su ayuda incondicional, su paciencia y total esmero, transmitiéndome sus conocimientos y ayudándome a consolidar el éxito de este trabajo y de mi formación profesional.

A mi profesora Cubana –Granadina, Miriam de la Caridad Romero de Santiestaban, y los demás de la misión a Granada.

A los trabajadores Yanefys, Yemey, Janetsy, Maribel, Mayelin y nuestra madre Marta Hernández del Laboratorio de Metabolitos Secundarios en este destacado Centro Biotecnología y otros especialistas de la institución.

Al colectivo de profesores desde el inicio de estos 6 años en Cuba, a mis amigos fieles a mis compañeros, al personal de las diferentes estatales y a todos aquellos de una forma u otra, directa o indirectamente han brindado lo mejor de su talento y sabiduría desinteresada, contribuyendo a mi formación profesional.

Por supuesto no puedo olvidar el regalo de la vida mi Ángel, "AJ" Jerez Orisciel Langaigne para su apoyo continuo en oraciones, ayuno, abrazos y..... el motivo para seguir.

¿De qué manera podría hacerlo sin omitir a ninguno?



Resumen

El presente estudio se realizó en el Centro de Bioplantitas de la Universidad de Ciego de Ávila. El objetivo fue obtener callos *in vitro* a partir del cultivo de *Theobroma cacao* L. para determinar su contenido de compuestos fenólicos, así como, determinar el contenido de dichos compuestos en órganos de plantas de campo. Los estaminoides mostraron un mayor crecimiento de callos y menor fenolización que el resto de los explantes evaluados. Las nucelas mostraron el mayor grado de fenolización y el menor crecimiento de callos. El thidiazurón no tuvo influencia en el crecimiento del callo a los 56 días mientras que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (12 mg.L⁻¹) causó el mayor crecimiento de los callos a igual tiempo sin diferencias con 8 mg.L⁻¹. Se observó un mayor crecimiento de los callos al aumentar la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, sin diferencias significativas para 8 y 12 mg.L⁻¹. Los mejores tiempos de desinfección de los explantes para la formación de callos fueron a los 10 y 15 minutos, pues con ellos se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación y mayor formación de callos. Se logró una mayor formación de callos al utilizar 3,0 mM de ácido indol butírico. La mayor concentración de compuestos fenólicos *ex vitro* se encontró en semillas. Los callos formados a partir de nucelas mostraron el mayor contenido de fenoles dentro de los tipos de callos evaluados. El mayor contenido de fenoles solubles se detectó cuando no se utilizó hormona, mientras que la mayor concentración de fenoles ligados a la pared y totales se registraron para la mayor concentración de ácido indol butírico.



Índice

1 INTRODUCCION	1
2 REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1 El cultivo de cacao. Origen y distribución Geografía	4
2.2 Botánica del <i>Theobroma cacao</i> L	6
2.2.1 Clasificación Taxonómica	6
2.2.2. Variedades comerciales	7
2.2.2.1 Criollos o nativos	7
2.2.2.2 Forasteros	8
2.2.2.3 Trinitarios.	9
2.3 Métodos de propagación.	9
2.3.1 Propagación en el campo.	9
2.3.2 Propagación sexual.	9
2.3.3 Propagación asexual <i>ex vitro</i>	10
2.3.4 Propagación asexual <i>in vitro</i>	10
2.4 El cultivo de callos para la obtención de fenoles.	11
2.5 Los metabolitos	13
3 MATERIALES Y METODOS	18
3.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Theobroma cacao</i> L.	18
3.1.1 Influencia de la cisteína y el polivinilpirrolidona como agentes antioxidantes para el establecimiento de callos embriogénicos de <i>Theobroma cacao</i> L.	18
3.1.2 Influencia del tipo de explante en la formación de callos de <i>Theobroma cacao</i> L.	19
3.1.3 Influencia del Thidiazurón y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético en la formación de callos de <i>Theobroma cacao</i> L.	19
3.1.4 Efecto del tiempo de desinfección sobre la contaminación del material vegetal y la formación de callos a partir de hojas jóvenes de <i>Theobroma cacao</i> . L	19
3.1.5 Efecto de la concentración de Ácido indol butírico en la formación de callos	20

a partir de hojas jóvenes de <i>Theobroma cacao</i> L.	
3.2 Determinación de la concentración de compuestos fenólicos	20
3.4 Procesamiento estadístico	21
4 RESULTADOS Y DISCUSION	22
4.1 Establecimiento “ <i>in vitro</i> ” de <i>Theobroma cacao</i> L	23
4.1.1 Influencia de la cisteína y el polivinilpirrolidona como agentes antioxidantes	23
Para el establecimiento de callos embriogénicos de <i>Theobroma cacao</i> L	
4.1.2 Influencia del tipo de explante en la formación de callos de <i>Theobroma cacao</i> L.	27
4.1.3 Influencia del Thidiazurón y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético en la formación de callos de <i>Theobroma cacao</i> L.	29
4.1.4 Efecto del tiempo de desinfección sobre la contaminación del material vegetal y la formación de callos a partir de hojas jóvenes de <i>Theobroma cacao</i> L.	31
4.1.5 Efecto de la concentración de Ácido indol butírico en la formación de callos a partir de hojas jóvenes de <i>Theobroma cacao</i> L	34
4.2 Determinación de la concentración de compuestos fenólicos	35
5. CONCLUSIONES	40
6. RECOMENDACIONES	41
7. BIBLIOGRAFIA	42

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN:

La biotecnología ofrece una oportunidad para explotar las células, tejidos y órganos de plantas a través del cultivo *in vitro*, así como su manipulación genética para obtener compuestos metabólicos. En los últimos años se ha incrementado el uso de estas técnicas para la producción de metabolitos a partir de plantas (Wu *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2003; Karam *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004).

En la actualidad existen diferentes estrategias para la producción de metabolitos secundarios: a partir del cultivo de células (callos y suspensiones celulares) y el cultivo de órganos (brotes y raíces transformadas y no transformadas) (Han *et al.*, 2001; Giridhar *et al.*, 2005).

Las plantas son una fuente extraordinaria para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios, productos de valor medicinal para el desarrollo de drogas. La especie humana depende de los metabolitos secundarios de plantas para desarrollar medicinas, saborizantes para alimentos, perfumes y otros químicos que se usan en la industria (Vanisree *et al.*, 2004).

La mayoría de los metabolitos secundarios de importancia farmacéutica se aíslan a partir de plantas debido a que su síntesis química no es factible económicamente (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004). Los compuestos secundarios en las plantas usualmente se clasifican por sus caminos biosintéticos en tres grandes grupos: fenoles, terpenos y esteroides-alcaloides. (Bourgaud *et al.*, 2001).

Cada vez son mayores las evidencias que indican que el metabolismo secundario en las plantas juega un papel crítico en la salud humana. Y sus productos pueden ser importantes como complemento nutricional (Hertog *et al.*, 1993). Las plantas cuyos metabolitos fenólicos posean propiedades farmacológicas, incluyendo actividad anticáncer, antioxidante y de inhibición de la agregación de plaquetas, son de especial interés en la actualidad (Rein *et al.*, 2000).

La obtención de metabolitos secundarios se ve frecuentemente limitada debido a la influencia de enfermedades, cambios climáticos, baja concentración de los mismos en la planta original e incluso problemas económicos de los diferentes países. En este sentido, el cultivo de tejidos y células vegetales, *in vitro*, ofrece una fuente alternativa para la producción controlada de estos productos evitando los daños ecológicos causados por la sobreexplotación de las especies productoras en la naturaleza y un mejor control de la producción; con independencia de factores ambientales, asegurando el cultivo de plantas difíciles de propagar y una calidad constante del producto.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es endémico de la cuenca del Amazonas y la América Central (Wood y Lass, 1985). Los alimentos derivados del cacao (manteca, cacao en polvo, chocolate y otros productos relacionados con el chocolate) son alimentos ricos en diferentes metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, con una alta actividad biológica.

Entre los compuestos fenólicos se agrupan un considerable rango de sustancias que poseen un anillo aromático con un sustituyente hidroxilo y aunque un grupo significativo de ellos están presentes en los animales, la mayoría son de origen vegetal. En verdad la presencia de una fracción fenólica es un rasgo característico de todos los tejidos vegetales. (Bourgaud *et al.*, 2001).

En estudios recientes se demostró que existen altos niveles de compuestos fenólicos en 112 plantas medicinales tradicionales en China, asociadas con actividad anticáncer. También se encontró que las hidroxiantraquinonas, ácidos fenólicos y taninos fueron los principales compuestos en los cultivares *Rheum tanuticum* Maxim. ex Balf., *Rheum officinale* Bail y *Rheum palmatu* (Cai *et al.*, 2004 a).

Los compuestos fenólicos en las plantas presentan varias funciones biológicas: actividad antioxidante (Krenn *et al.*, 2003, Cai *et al.*, 2004a, Cai *et al.*, 2004b, Mohd *et al.*, 2004) actividad antifúngica (Manojlovic *et al.*, 2005), antialimentaria (Morimoto *et al.*, 2002), y anticancerígena (Cai *et al.*, 2004b), entre otras. Los compuestos fenólicos son de naturaleza compleja, se asocian con los procesos de maduración, y con mecanismos de defensa ante diferentes tipos de estrés

Las evidencias de múltiples investigaciones realizadas demuestran que los metabolitos secundarios detectados en plantas sólo representan una pequeña porción de la

potencialidad que las plantas poseen para producirlos. El conocimiento del contenido de estos compuestos en los diferentes órganos es de vital importancia si se pretende desarrollar estrategias para su producción eficiente de forma *in vitro*.

Es por todo lo anteriormente mencionado sobre los compuestos fenólicos, la posibilidad de obtenerlos y manipularlos a través del cultivo *in vitro*, que **la hipótesis** del presente trabajo fue:

La aplicación de técnicas biotecnológicas, permite determinar la presencia de compuestos fenólicos en callos de diferentes tejidos de *Theobroma cacao* L.

Por lo que se trazaron los siguientes **objetivos**:

- Obtener callos *in vitro* a partir del cultivo de diferentes tejidos de plantas de *Theobroma cacao* L.
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos a partir de órganos de plantas de campo de *Theobroma cacao* L.
- Realizar la determinación de compuestos fenólicos de *Theobroma cacao* L. en callos obtenidos a partir de diferentes explantes.

Novedad científica: En Cuba no existe referencia sobre el estudio y obtención de metabolitos secundarios a partir de plantas de *Theobroma cacao* L. Con este trabajo se pretende dar inicio al aislamiento e identificación de estos productos en diferentes órganos de la planta de campo y por vías biotecnológicas, así como, la determinación de su actividad antioxidante que permitiría estudiar su posible aplicación en la industria médico farmacéutica cubana.

Valor práctico: Se identificaron los principales órganos productores de compuestos fenólicos en plantas de *Theobroma cacao* L. que permitirán trazar estrategias para la producción de estos compuestos con el empleo del cultivo *in vitro*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 El cultivo de cacao. Origen y distribución Geografía

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de gran importancia para muchos países de América latina, África y Asia, al constituir la tercera mercancía agrícola exportada en el mundo después del café y del azúcar (Sasson, 1993), Y era cultivado en América, mucho tiempo antes de la llegada de los Europeos (Braudeau, 1970). Su nombre fue derivado directamente de la lengua maya “Kajkab” significado Amargo jugo lo cual hubo muchos cambios hasta finalmente transformarse en “cacao” por facilidad de expresión (Barahona, 1987).

Las primeras referencias de la planta de cacao y sus productos son encontradas en los relatos de los exploradores y conquistadores que siguieron a Colón (Baker, 1891). Desde este tiempo y posterior a los Aztecas, este cultivo adquirió un alto valor económico ya sea por su uso como alimento, moneda o como bebida ceremonial, fue Hernán Cortez quien dio a conocer al mundo los atributos de este producto, convirtiendo a España en el primer país europeo que utilizó el cacao y monopolizó su uso por muchos años (Hardy, 1960).

Este cultivo es nativo de la selva húmeda de América del Sur entre los 18° N y 15° S a una altura generalmente inferior a 1, 250m de la cuenca del Orinoco y el río Amazonas (Braudeau, 1970, donde predomina condiciones de calor, sombra y humedad para su desarrollo. (Urquhart, 1963)

A partir del siglo XVI se sembró en muchas de las regiones tropicales de Centro y Sur América y en muchas de las islas del Caribe. Los españoles, los holandeses y los portugueses, llevaron el cacao a las islas de Golfo de Guinea en el continente Africano durante el siglo XVII, y a los holandeses y españoles se debe su introducción en el sureste de Asia, durante los siglos XVI y XVII. En el siglo XIX los alemanes llevaron el cacao a las islas de Samoa y Nueva Guinea en el Pacífico Sur. (Urquhart, 1963, Vos *et al.*,

Obtención de Compuestos Fenólicos de Theobroma cacao L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

2003). Según Walgate (1990), el continente Africano representaba un 54% de la producción mundial, América del Sur 36% y Asia y Oceanía con un 10%.

La fecha de introducción en Cuba no se conoce con exactitud. Algunas hipótesis plantean que fue introducido por Cabaiguán, actual provincia de Sancti Spiritus, en 1540 desde México, durante la etapa de la colonización española (Márquez y Aguirre, 2003), otras sustentan el criterio de que fueron los franceses quienes establecieron las primeras plantaciones en la zona de Ti arriba, en la antigua provincia de oriente (castilla, 1981)

Según Mejía y Palencia, (2000) de las cuales aproximadamente un 90% son utilizadas como materia prima para la elaboración de chocolate. Los países productores generan un ingreso anual de más de 3000 millón de dólares por exportación de cacao en grano y sus productos derivados (ITC, 2001). África representaba un 54% de la producción mundial, América del sur 36% y Asia y Oceanía con un 10% (Watgate, 1990). Costa de marfil es el país con el mayor producción de 38% del total mundial (Motamayor, et al., 2002). Adicionalmente este cultivo depende de subsistencia de muchos pequeños agricultores para genera trabajo; permitiendo así, mejora sus niveles de vida. (Mejía y Palencia, 2000).

En la actualidad se encuentran plantadas 7 019 245 hectáreas y la producción total es de 3 923 183 toneladas, con un rendimiento promedio de 560, 6 kg.ha⁻¹ (FAO, 2006). Según la Organización Internacional del Cacao ICCO (2009), la producción mundial llegará 3, 466 millones de toneladas.

Desafortunadamente, el cultivo del cacao no ha podido desarrollarse en toda su magnitud por lo que existe un déficit de producción, debido al bajo potencial productivo de los materiales sembrados y a la falta de híbridos adaptados a las zonas cacaoteras; asociado a la edad avanzada de las plantaciones, bajas densidades de siembra, la alta incidencia de enfermedades fungosas, las condiciones adversas de cultivo y los bajos precios del producto en el mercado (López *et al.*, 1997; ITC, 2001; Mejía y Palencia, 2000).

En Cuba las principales áreas de cultivo están ubicadas en las provincias de Guantánamo (75%), Santiago de Cuba (14%), Granma (8%) y Holguín (3%), con un área total de 8 383

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

hectáreas. El municipio de Baracoa, Guantánamo ocupa el 51% de las áreas productoras del país (Marquéis, 2003) con una producción de 1 500 toneladas y un rendimiento promedio de 266,1 kg.ha⁻¹, inferior en un 50% a la media mundial (FAO, 2006) entre las causas de los bajos rendimiento en Cuba se encuentran la carencia de material de propagación y clones altamente productivos, el manejo inadecuado de la plantación y las afecciones por plagas y enfermedades (Menéndez *et al.*, 2002)

Numerosos estudios han demostrado la importancia del compuesto flavonoides antioxidantes presentes en el mismo por sus efectos beneficios en la salud (Cakirer, 2003), los cuales actúan en inhibición d los daños oxidativos (Verstraeten *et al.*, 2003) y previenen diversas enfermedades como la trombosis (Pearson *et al.*, 2002), las enfermedades cardiovasculares (Kris-Etherton y Keen, 2002) y el cáncer (Wollgast y Anklam, 2000; Carnesecchi *et al.*, 2002); de ahí que el gobernó cubano haya implementado un programa para el aumento del consumo de este producto (castro, 2005), lo cual demandará de un incremento en la plantación del cultivo.

2.2 Botánica de la *Theobroma cacao* L

Se aparición en la literatura botánica en 1582 fue bajo la pluma de Charles DE L'Eclisc. En 1737 Carlos Linneo sustituye el nombre del género por el de *Theobroma*, dentro de la especie *Theobroma cacao* L. a partir de la cual se clasifican todos los cacaos cultivados hoy. (Braudeau, 1970).

2.2.1 Clasificación Taxonómica.

Según Motamayor, et. Al (2002) desde el tiempo de vista botánico el cacao se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Plantea
Subreino: Tracheobionta
División: Spermatophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Malvales
Familia: Sterculiaceae

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

Subfamilia: Byttnerioideae

Tribu: Theobromeae

Género: Theobroma

Especie: *Theobroma cacao* L.

El género *Theobroma* se divide en 6 secciones que comprende 22 especies todas originarias de los bosques húmedos tropicales de la América Ecuatorial. Entre ellos el *Theobroma cacao* L., el único que se cultivada ampliamente. (Cuatrecasas, 1964; Toxopoeus, 1985; Mossu, 1990).

2.2.2. Variedades comerciales

Los árboles de cacao tienden a ser agrupados por tradición en tres grupos principales llamados Criollo, Forastero y Trinitario; de los cuales muchos híbridos han sido y continuarán siendo desarrollados (ITC, 2001).

La diversidad es más evidente en caracteres del fruto como la forma, relieve de la superficie y color; así como la forma de la semilla y el color de los cotiledones y en menor grado en caracteres del porte, follaje y flores. Menos visibles pero de gran importancia económica son las diferencias en susceptibilidad a enfermedades fungosas (León, 2000).

Urquhart (1963), Braudeau (1970), Nosti (1970), Engles *et al.*, (1979), Castilla (1981) y Bekele (1994), coincidieron en plantear la existencia de tres grupos de cacao: Criollos, Forasteros y Trinitarios; clasificación basada en los características morfológicas y agronómicas

2.2.2.1 Criollos o nativos: El apelativo "Criollo" fue en su origen atribuido lo españoles al cacao cultivado inicialmente en Venezuela y en particular todos tipos de cotiledones blancos antiguamente cultivados en América central y México. Según Castilla (1981) existen 6 clasificaciones del cacao criollo; criollo de Venezuela, de Ceilán, de Java, de Samoa de Madagascar, de Nicaragua y de criollos porcelana. El criollo representa los cacaos originales de gran calidad, famosos por su finura y sus aromas poderosos con un destino a la chocolatería de alta gama, de escaso contenido en taninos, reservado para la

Obtención de Compuestos Fenólicos de Theobroma cacao L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

fabricación de chocolates más finos. El árbol es frágil y de escaso rendimiento. Representa, como mucho, el 10% de la producción mundial. (Braudeau, 1970) debido a su fragilidad frente a las enfermedades y frente a los insectos se ha reportado que los Criollos son extremadamente susceptibles, especialmente a *Phytophthora spp* y *Ceratocystis* y no sobreviven a ataques persistentes de plagas (Toxopeus, 1985). Se cultiva en América en Venezuela, Honduras, Colombia, Ecuador Nicaragua, Guatemala, Trinidad, Jamaica, México y Granada; y en el Caribe, en la zona del océano Índico y en Indonesia

2.2.2.2 Forasteros El grupo de los forasteros comprenden a los cacaos de Brasil y África Occidental, que proporcionan el 80% de la producción mundial. También se llaman amazónicos, porque están distribuidos en forma natural, en la cuenca de ese río y sus afluentes. El centro de origen es el área localizada entre los ríos Napo, Putumayo y Caquetá en América del Sur. Los estaminoides son pigmentados de violeta, las mazorcas son amarillas cuando maduras con surcos y rugosidad con poco conspicuos, lisos y de extremo redondeado. La cáscara de la mazorca es relativamente gruesa con mesocarpio fuertemente lignificado. Los granos son más o menos aplastados con cotiledones frescos de color púrpura oscura. Las semillas requieren de 4 a 6 días para la fermentación. Los árboles de este grupo están considerados como los más vigorosos, de alto rendimiento, con semillas planas y púrpuras (Toxopeus, 1985.; Figueira *et al.*; 1997.; León, 2000.; Toxopeus, 1985.; Figueira *et al.*; 1997.; León, 2000;).

Según Engels *et al.* (1979) los cacaos tipos forasteros están divididos en cuatro subgrupos: Angoleta, Cundeamor, Amelonado y Calabacillo, pero Castilla (1981) plantea que existe otro llamado lagarto. Braudeau (1970) e ITC (2001) explicó que la mayoría de árboles plantados de forasteros son híbridos, y sea entre variedades de forastero o mezclado entre criollo y Forastero. Estos híbridos son mucho resistentes a los ataques de *Crinipellis pernicioso* (enfermedad de la escoba de bruja). Debido a la resistencia de esta planta a las enfermedades actualmente el 90% del cacao que se cultiva en el mundo es de la variedad forastero y mucho más productivo que criollo (Braudeau, 1970 y ITC, 2001)

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

Los clones Forasteros en especial los tipos Bajo amazónicos son empleados en el 95% de la producción comercial de chocolate (Ancho y Fowler, 1994). Se trata de un cacao normal, con el tanino más elevado. Carece del fino sabor del Criollo y es conocido como el cacao más común en la industria del chocolate. Los mejores productores usan granos mezclados para dar cuerpo y amplitud al chocolate, pero la acidez, el equilibrio y la complejidad de los mejores chocolates provienen de la variedad criolla. (Motamayor, et. al 2002)

Actualmente la mayoría de árboles plantados de Forastero son híbridos, ya sea entre variedades de Forastero o una mezcla entre Criollo y Forastero. Estos híbridos son preferidos debido a la mayor resistencia a las enfermedades conocidas y a que tienen una mayor producción (ITC, 2001).

2.2.2.3 Trinitarios Datos históricos muestra que el cacao Trinitario es nativo al país Trinidad resultando de un hibridación natural entre el criollo y el Almidonado Forastero (Motamayor et al., 2003; 2008), este hibridismo ocurrido en la isla de Trinidad alrededor del año 1730 (Braudeau, 1970), donde, después de un terrible huracán que en 1727 destruyó prácticamente todas las plantaciones de la Isla, surgió como resultado de un proceso de cruce. (Motamayor *et al.*, 2002)

Motamayor *et al* (2003) plantearon existe dudas en la obtención del mismo incluyendo el origen del Trinitario; los progenitores Amelonado son de tipos Bajo amazónicos, el Orinoco o las Guyanés. Al existir una representación completa de segregación entre forasteros y Criollos, de ahí que las características genéticas y de calidad sean intermedias entre ellos. Los Trinitarios ocupan entre un 10 y 15% de la producción mundial Hancock y fowler, 1994).

2.3 Métodos de propagación

2.3.1 Propagación en el campo

La propagación del cacao se realiza por la vía sexual o por semillas y por métodos de reproducción asexual o vegetativa, la cual utiliza los métodos de estacas, injertos y acodos (Soto y Herrera, 1985; Moreno *et al.*, 1983., Castilla (1981)).

2.3.2 Propagación sexual

Es la forma más generalizada y fácil para reproducir el cacao (Moreno *et al.*, 1983).pero de este manera nunca se consigue conservar íntegramente los caracteres de la planta madre.

Obtención de Compuestos Fenólicos de Theobroma cacao L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

Castilla, 1981). Existen dos formas principales de producir cacao por semillas; la primera es plantando las semillas directamente en el campo y la segunda es sembrando las semillas en un semillero temporal (Hardy, 1960).

Las principales ventajas planteada por Castilla (1981) son: Las posturas pueden ser transplantadas al campo en un tiempo más corto, es más fácil la obtención de posturas para la plantación, el sistema radicular alcanza mayor desarrollo y el sistema de reproducción es más económico.

2.3.3 Propagación asexual *ex Vitro*

Castilla (1981) explico que la reproducción asexual, vegetativa o agámica es la reproducción, por medio de partes vegetativas. Dicho práctica no implica cambio en la constitución genética de la nueva planta manteniendo las características en la planta nueva como de la madre.

En ningún individuo superior es posible fijar indefinidamente sus caracteres cuantitativos por medio de la reproducción sexual, por cuanto resulta difícil repetir la combinación de gametos que originaron el genotipo del individuo. De allí que la propagación vegetativa que da lugar a la propagación de clones, es el único procedimiento que permite perennizar genotipos superiores (Vera, 1987). Los métodos más utilizados para la propagación del cacao en forma asexual o vegetativa, son el injerto, la estaca y el acodo.

Las técnicas descritas de propagación vegetativa presentan eficiencia variable, requieren de jardines clónales para producir suficiente material para la propagación y un alto costo por planta obtenida, por lo que su utilización es muy limitada. Como resultado de programas de mejoramiento genético del cacao desarrollados en diversos centros del mundo, existe una cantidad considerable de genotipos mejorados: sin embargo una de las mayores limitantes para aprovechar este germoplasma mejorado es la falta de métodos de clonación masiva de plantas seleccionadas, eficientes tanto desde el punto de vista económico como agronómico (López – Báez *et al.*, 2001)

2.3.4. Propagación asexual *in vitro*

Las dificultades en la propagación convencional del cultivo han incrementado el interés por el empleo de métodos biotecnológicos en el cacao. Muchos esfuerzos se han realizado para desarrollar metodologías de propagación *in Vitro* a través de brotes auxiliares (Janick y

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

Whipkey, 1985, Figueira *et al.*, 1991; Adu-ampomah *et al.*, 1992); sin embargo, no ha sido posible lograr la formación de series sucesivas de brotes.

La biotecnología ofrece una oportunidad para explotar las células, tejidos y órganos de plantas a través del cultivo *in vitro* así como su manipulación genética para obtener los compuestos deseados. En los últimos años se ha incrementado el uso de estas técnicas para la producción de estos compuestos secundarios a partir de plantas (Wu *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2001; Karam *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004).

El cultivo *in vitro* del cacao se ha trabajado por varios grupos de investigadores utilizando diferentes tipos de explantes como nuclear (Chatelet *et al.*, 1992; sondahl *et al.*, 1993), pétalos (sondahl *et al.*, 1994 y Young *et al.*, 2003) y estaminoides (López Báez *et al.*, 1993; Alemanno *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998, Silva *et al.*, 2002 y Young *et al.*, 2003). A pesar de los avances alcanzados en el mundo, existen dificultades por los bajos porcentajes de conversión de los embriones somáticos en plántulas (Furtek *et al.*, 2001 y Silva *et al.* 2002) y la variable respuesta de los genotipos a la embriogénesis somático en plántulas (Silvia *et al.*, 2002) debido a que los clones de tipo forastero responden mejor a la formación y conversión de los embriones que los tipos trinitarios (Almanno *et al.*, 1997)

La propagación *in vitro* es uno de los métodos en desarrollo para buscar una solución de este problema por los bajos porcentajes de conversión de los embriones somáticos en plántulas y la variable respuesta de los genotipos a la embriogénesis.

Las mayores ventajas del cultivo *in vitro* sobre la producción agrícola convencional son: la síntesis de los metabolitos secundarios tiene lugar en un ambiente controlado, independiente de las condiciones del clima y del suelo; se eliminan las influencias biológicas negativas tales como microorganismos e insectos; es posible seleccionar variedades con la mayor producción de metabolitos secundarios y es posible disminuir los precios e incrementar la producción con la automatización del proceso (Mulabagal y Tsay, 2004).

2.4 El cultivo de callos para la obtención de fenoles

El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido. La formación de callo comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente se desdiferencian ante la presencia de auxina

Obtención de Compuestos Fenólicos de Theobroma cacao L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

exógena en el medio de cultivo. En las células se presenta una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, dando origen a una masa amorfa de tejidos (Gómez, 1998)

Se ha formado callos utilizando diferentes tipos de explantes y plantas *in vitro* así como el uso de órganos o fragmentos de órganos encerrados en frutos o inflorescencias. Solo un pequeño porcentaje de las células en un explante dado contribuyen a la formación del callo generalmente esta situado en la superficie del explante o en la superficie extirpada. La tendencia es a emplear tejidos más indiferenciados y los más jóvenes posibles, lo cual ha permitido obtener éxito en el cultivo *in Vitro* de diferentes especies (Gómez, 1998).

La fase de formación de callos se obtiene fácilmente solamente con la presencia en el medio de cualquier tipo de auxina (Gómez, 1998). Las auxinas son ampliamente utilizadas en el micro propagación y su cooperación en los medios para estimular el crecimiento de los callos y las suspensiones celulares. El tipo de compuesto y la concentración requerida depende del nivel de auxina del explante y la capacidad del tejido a sintetizar auxinas naturales, así como la interacción entre la auxina sintética añadida y la sustancia natural endógena. (George, 2008)

La auxina más frecuentemente utilizada para iniciar el cultivo de callos es el 2, 4-D, aunque algunos investigadores prefieren utilizar ANA o AIA, o para transferir los callos a estos medios después de haber sido iniciado con 2,4-D. La inducción de callos de plantas de hojas anchas, 2,4-D se obtienen al utilizar niveles de concentración entre 4.5 – 13.6 μM (1.0 – 3.0 mg.L^{-1}) (George, 2008)

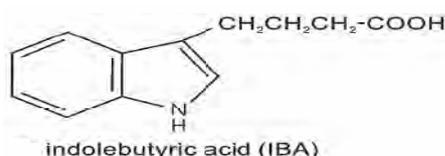
Algunos investigadores han utilizado mezclas de diferentes auxinas para la formación de callos (Blackmond *et. al.*; 1981). Biswas *et., al.* (2007) utilizaron concentraciones de BAP y KIN, para inducir brotes y induce raíces con WPM suplementado con 0.1 mg.L^{-1} IBA, IAA, y NAA. Sarker *et., al* (2007) obtuvo mejor resultados con el uso de 0.3 mg/L de AIB en la inducción de raíces a partir de brotes regenerados en plantas de *Corchorus capsularis L.*)

Caboni y Tonalli (1999), señalan que el AIB es la auxina más efectiva para la inducción de raíces en un amplio rango de especies. También es conocido que el AIB es superior al AIA y ANA por ser de forma natural más estable (Hutchinson 1995). Munshi *et al.* 2007, obtuvo

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

similares resultados al obtener la regeneración *in Vitro* de la Col (*Brassica oleracea* L. var. Capitata) a través del cultivo de hipocotilo y cotiledones.

Jalal y Colin (2006) en subcultivos consecutivos obtuvieron callos y suspensiones celulares en *Theobroma cacao* con la utilización de ácido indolbutírico (AIB) y zeatina (Z). Ellos utilizaron concentraciones de 1 mg L^{-1} IBA y 0.05 mg L^{-1} de zeatina para formación de callos y 10 mg L^{-1} IBA y 0.5 mg L^{-1} zeatina para obtención de la suspensión celular.



2.5 Los Metabolitos

Las plantas poseen rutas metabólicas por las cuales sintetizan y utilizan ciertos compuestos orgánicos: azúcares, aminoácidos, ácidos comunes, nucleótidos y polímeros derivados de ellos, por un proceso se denomina metabolismo primario, (Looney y Ellis, 2000; Verpoorte *et al.*, 2000). También a través del metabolismo secundario se obtienen compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales en las plantas, intervienen en las interacciones ecológicas con el ambiente. (Croteau *et al.*, 2000; Lincoln *et al.*, 2006; Judd *et al.*, 2002).

Algunos metabolitos provienen del metabolismo primario, tales como: ficina (Singleton y Buttle, 1998), papaína, quimopapaína, caricina, proteasa IV de papaya (Looze, 1998), bromelina (Hernández *et al.*, 1997; Rowan, 1998). Otros provienen del metabolismo secundario como: saponinas (Lu *et al.*, 2001); taxol (Wu *et al.*, 2001, ácido rosmárico (Karma *et al.*, 2003), ajmalicine y serpentine (Wong *et al.*, 2004), flavonoides (Schijlen *et al.*, 2004), furanocoumarinas (Massot *et al.*, 2000), antocianinas (Meyer *et al.*, 2002) artemisinina, (Kim *et al.*, 2001) y antraquinonas (Han *et al.*, 2001), entre otros.

Cada vez son mayores las evidencias que indican que el metabolismo secundario en las plantas juega un papel importante en la salud humana y en ocasiones para la nutrición (Hertog *et al.*, 1993). Los metabolitos secundarios son una fuente importante para la obtención de medicamentos y otros valiosos productos químicos como: venenos,

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, colorantes, insecticidas y aditivos nutritivos (Verpoorte *et al.*, 2000, Croteau *et al.*, 2000; Lincoln *et al.*, 2006; Judd *et al.*, 2002).

Muchos productos de metabolitos secundarios están implicados en relaciones ecológicas de la planta productora con otros organismos de ámbito natural, y es una fuente importante de principios activos de medicamentos y de otros valioso productos químicos como son las esencias, colorantes, insecticidas y aditivos nutritivos (Verpoorte *et al.*, 2000).

Las evidencias de múltiples investigaciones realizadas demuestran que los metabolitos secundarios detectados en plantas solo representan una pequeña porción de la habilidad potencial que las plantas poseen para producirlos. El conocimiento del contenido de estos compuestos en los diferentes órganos es de vital importancia si se pretende desarrollar estrategias para su producción eficiente de forma *in Vitro*. (Vanisree *et al.*, 2004).

Las plantas son una fuente extraordinaria para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios. (Vanisree *et al.*, 2004). La biotecnología ofrece una oportunidad para explotar las células, tejidos y órganos de plantas a través del cultivo *in vitro* así como su manipulación genética para obtener los compuestos deseados. En los últimos años se ha incrementado el uso de estas técnicas para la producción de estos compuestos secundarios a partir de plantas. (Wu *et al.*; 2001; Han *et al.*; 2003; Karma *et al.*; 2003; Wong *et al.*, 2004). La mayoría de los metabolitos secundarios de importancia farmacéutica se aíslan a partir de plantas debido a que su síntesis química no es factible económicamente (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004).

Las evidencias de múltiples investigaciones realizadas demuestran que los metabolitos secundarios detectados en plantas solo representan una pequeña porción de la habilidad potencial que las plantas poseen para producirlos. El conocimiento del contenido de estos compuestos en los diferentes órganos es de vital importancia si se pretende desarrollar estrategias para su producción eficiente de forma *in vitro*. Giridhar *et al.*, 2005).

Existen diferentes estrategias para la producción de metabolitos secundarios: a partir de cultivo de células (callos y suspensiones celulares) y de órganos (brotes y raíces transformadas y no transformadas) (Han *et al.*, 2001; Giridhar *et al.*, 2005). Todos pueden ser realizados a partir de estrategias eficientes de forma *in vitro*. (Wu *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2001; Karma *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004).

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

La posibilidad de obtener los metabolitos secundarios *in vitro* es una alternativa atractiva para su producción. Las mayores ventajas de esta tecnología sobre la producción agrícola convencional son: la síntesis de los metabolitos secundarios tiene lugar en un ambiente controlado, independiente de las condiciones del clima y el suelo; se eliminan las influencias biológicas negativas tales como microorganismos e insectos; se facilita la selección de variedades con mayor producción de metabolitos secundarios y es posible disminuir los precios e incrementar la producción con la automatización del proceso (Mulabagal y Tsay, 2004).

Los compuestos secundarios en las plantas usualmente se clasifican en tres grandes grupos en base a sus orígenes biosintéticos: fenilpropanoides, terpenoides y esteroides y alcaloides. (Bourgaud *et al.*, 2001; Croteau *et al.*, 2000; Lincoln *et al.*, 2006). Estos compuestos fenólicos en las plantas presentan varias funciones biológicas: actividad antioxidante (Krenn *et al.*, 2003, Cai *et al.*, 2004a, Cai *et al.*, 2004b, Mohd *et al.*, 2004) actividad antifúngica (Manojlovic *et al.*, 2005), antialimentaria (Morimoto *et al.*, 2002), y anticancerígena (Cai *et al.*, 2004b), entre otras.

Los compuestos fenólicos se agrupan en un considerable rango de sustancias que poseen un anillo aromático con un sustituyente hidroxilo y aunque un grupo significativo de ellos están presentes en los animales, la mayoría son de origen vegetal. Además presentan una fracción fenólica que es característica de cada tejido y especie vegetal. (Bourgaud *et al.*, 2001). En general son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la vía del ácido shikímico o la de los policétidos (Bruneton, 1991.; Dominguez, 1973).; Trease, *et al.* 1996.; Wagner y Bladt (1996), o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo los flavonoides) (Croteau *et al.*, 2000.; Lincoln *et al.*, 2006.; Judd *et al.*, 2002.; Bruneton, 1991.; Dominguez, 1973.; Trease, *et al.* 1996.; Wagner and Bladt, 1996).

Por la vía del ácido shikímico ocurre en la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas superiores. Los sustratos iniciales son la eritrosa-4-fosfato (de la vía de las pentosas fosfato) y el ácido fosfoenolpirúvico (proveniente de la glucólisis). Uno de los productos de esta vía es la fenilalanina, de la que se deriva la mayoría de los fenoles. La fenilalanina, un aminoácido esencial parte del metabolismo primario de las plantas y animales, entra al

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

metabolismo secundario cuando la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la eliminación de un amonio convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico.

La vía del ácido malónico es una importante fuente de fenoles en bacterias y hongos, y en las plantas superiores existe aunque no es tan utilizada como en aquéllos. Su sustrato es el acetil-CoA. Junto con la vía del ácido shikímico participa en la biosíntesis de los flavonoides, la lignina y otros fenoles. (Lincoln *et al.*, 2006)

Los compuestos fenólicos de las plantas son un grupo heterogéneo de productos con más de 10.000 compuestos. Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles. Este grupo también juega una variedad muy heterogénea de roles en las plantas, que son atribuidos en general a los productos secundarios, muchos son productos de defensa ante herbívoros y patógenos (Verpoorte y col., 2000. ; Croteau *et al.*, 2000; Lincoln *et al.*, 2006; Judd *et al.*, 2002), otros proveen soporte mecánico a la planta, otros atraen polinizadores o dispersores de semillas, algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos (por ejemplo reducen el crecimiento de plantas competidoras que estén cerca). (Swain, 1973; Levin, 1976; Cronquist, 1977; Lincoln *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos en las plantas presentan varias funciones biológicas: actividad antioxidante (Krenn *et al.*, 2003, Cai *et al.*, 2004a, Cai *et al.*, 2004b, Mohd *et al.*, 2004) actividad antifúngica (Manojlovic *et al.*, 2005), antialimentaria (Morimoto *et al.*, 2002), y anticancerígena (Cai *et al.*, 2004b), entre otras. Los métodos químicos que se usan comúnmente para la separación e identificación de estos compuestos fitoquímicos a partir de extractos de plantas, son la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Weng y Sheu, 2000, Derksen *et al.*, 2003, Hai-Xia y Man-Cang, 2004; Coll y Tandrán, 2005) La cromatografía líquida en Capa Fina de Alta Resolución (HP-TLC) (Narendra *et al.*, 2005), entre otros.

Las evidencias de múltiples investigaciones realizadas demuestran que los metabolitos secundarios detectados en plantas solo representan una pequeña porción de la potencialidad que las plantas poseen para producirlos. El conocimiento del contenido de estos compuestos en los diferentes órganos es de vital importancia si se pretende desarrollar estrategias para su producción eficiente de forma *in vitro*.

Obtención de Compuestos Fenólicos de Theobroma cacao L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

Uno de los mayores problemas de las plantas crecidas en campo como fuente de metabolitos secundarios es asegurar el suministro constante de los compuestos pero esta limitada debido a la influencia de enfermedades, cambios climáticos, baja concentración de los mismos en la planta original e incluso problemas económicos de los diferentes países., ya que este fuente alternativa ofrece mayor ventaja en un ambiente controlado para la selección de variedades con mayor producción de metabolitos secundarios.

En Cuba no existe referencia sobre el estudio y obtención de metabolitos secundarios a partir de plantas de *Theobroma cacao* L. Con este trabajo se pretende dar inicio al aislamiento e identificación de estos productos en diferentes tejidos de la planta por vías biotecnológicas.

Se identificaron los mejores explantes productores de compuestos fenólicos en plantas de *Theobroma cacao* L. lo que permitirá trazar estrategias para la producción de estos compuestos con el empleo del cultivo “*in vitro*”.

En este sentido, el cultivo de tejidos y células vegetales ofrece una fuente alternativa para la producción controlada de estos productos evitando los daños ecológicos causados por la sobreexplotación de las especies productoras en la naturaleza y un mejor control de la producción; con independencia de factores ambientales, asegurando el cultivo de plantas difíciles de propagar y una calidad constante del producto.

Con todo lo anteriormente mencionado, la posibilidad de obtención de compuestos fenólicos a partir del metabolitos secundaria tiene una amplia ventaja especialmente en diversos campos como: la medicina, la farmacia lucha contra plagas, en la industria alimentaría.

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS:

Los experimentos relacionados con el cultivo de tejidos se desarrollaron en los Laboratorios de Células y Tejidos e Ingeniería Metabólica del Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila. En todos los casos, los experimentos se montaron con 45 explantes por tratamiento.

Para el cultivo de tejidos, los botones florales, hojas jóvenes y frutos inmaduros se transportaron en agua destilada estéril a temperatura ambiente. La desinfección e implantación se realizó antes de las cuatro horas de tomado el material vegetal.

Las determinaciones de compuestos fenólicos se realizaron en el laboratorio de Ingeniería Metabólica del Centro de Bioplantas. Para ello se utilizaron hojas jóvenes y adultas, flores, ramas, semillas y raíces de plantas adultas de *Theobroma cacao* L. del poblado de Modesto Reyes (Ciego de Ávila), así como, callos formados a partir de nucelas, pétalos, estaminoides y hojas jóvenes de dichas plantas.

Para las determinaciones bioquímicas el material vegetal se transportó en nitrógeno líquido.

3.1 Establecimiento *in vitro* de *Theobroma cacao* L.

Proceso de desinfección:

Los botones florales (para extraer estaminoides y pétalos) y las semillas (para extraer las nucelas) se desinfectaron de la siguiente forma:

- Lavado en solución de detergente al 1%.
- Enjuague con agua destilada estéril tres veces.
- Desinfección con hipoclorito de sodio al 1% por 20 minutos.
- Lavado con agua destilada estéril cuatro veces.

3.1.1 Influencia de la cisteína y el polivinilpirrolidona como agentes antioxidantes para el establecimiento de callos con estructuras embriogénicas de *Theobroma cacao* L.

Explantes evaluados: Pétalos, estaminoides y nucelas.

Antioxidantes: Cisteína (0,0; 0,050; 0,100 y 0,150 g.L⁻¹)

Polivinilpirrolidona (PVP) insoluble (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 g.L⁻¹)

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

Medio de cultivo semisólido: Crecimiento primario de callos (PCG) del protocolo de Pennsylvania (Young *et al.*, 2003) con 0,005 mg.L⁻¹ de thidiazurón (TDZ) y 2 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Se evaluó el número de explantes fenolizados por tratamiento a los 14 días después de implantado el material vegetal y el crecimiento (mm) de los callos cada 14 días para cada tipo y dosis de antioxidante probado.

3.1.2 Influencia del tipo de explante en la formación de callos de *Theobroma cacao* L.

Explantes evaluados: Pétalos, estaminoides de botones florales de 1 cm de longitud y nucelas de frutos inmaduros.

Medio de cultivo: PCG (Young *et al.*, 2003) con 0,005 mg.L⁻¹ de TDZ y 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Se evaluó el crecimiento (mm) en el tiempo de los callos cada 14 días después de implantado el material vegetal

3.1.3 Influencia del thidiazurón y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético en la formación de callos de *Theobroma cacao* L.

Explante: Estaminoides de botones florales de 1cm de longitud.

Medio de cultivo semisólido: PCG (Young *et al.*, 2003) con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y TDZ (0,0; 0,005; 0,010; 0,020 y 0,030 mg.L⁻¹).

Medio de cultivo semisólido: PCG (Young *et al.*, 2003) con 0,005 mg.L⁻¹ de TDZ y 2,4-D (0,0; 2,0; 4,0; 8,0; y 12,0 mg.L⁻¹)

Se evaluó el crecimiento de los callos (mm) durante el transcurso del tiempo cada 14 días después de implantado el material vegetal para cada tipo y dosis de hormona probada.

3.1.4 Efecto del tiempo de desinfección sobre la contaminación del material vegetal y la formación de callos a partir de hojas jóvenes de *Theobroma cacao* L.

Explante: Secciones de 1 cm² de hojas jóvenes de *Theobroma cacao* L.

Procedimiento de desinfección: Se lavaron en solución de detergente al 1%, se enjuagaron tres veces con agua corriente y luego se trasladaron al flujo laminar en agua destilada estéril.

Se desinfectaron en hipoclorito de sodio a 2% durante los diferentes tiempos evaluados (5, 10 y 15 min.). Después de la desinfección se realizaron tres enjuagues con agua estéril. Se

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

estableció un tratamiento testigo sin desinfección. Este último se sometió solo a condiciones de lavado y enjuague similares a los tratamientos con desinfección.

Medio de cultivo: Medio basal MS, suplementado con myo-inositol, tiamina.HCL, y la hormona ácido indol butírico (AIB) a 2.0 mM. Todos los tratamientos se incubaron en las condiciones de oscuridad y se realizó la evaluación del porcentaje de explantes contaminados y porcentaje de formación de callos cada 3 días. Para el análisis estadístico se utilizaron como réplicas cinco grupos de nueve explantes cada uno.

3.1.5 Efecto de la concentración de ácido indol butírico en la formación de callos a partir de hojas jóvenes de *Theobroma cacao* L.

Explante: Secciones de 1 cm² de hojas jóvenes de *Theobroma cacao* L.

Procedimiento de desinfección: Se lavaron en solución de detergente al 1%, se enjuagaron tres veces con agua corriente y luego se trasladaron al flujo laminar en agua destilada estéril.

Se desinfectaron en hipoclorito de sodio a 2% durante 10 minutos. Después de la desinfección se realizaron tres enjuagues con agua estéril.

Medio de cultivo: Medio basal MS, suplementado con myo-inositol, tiamina.HCL y la hormona AIB a 0,0; 1,0; 2,0 y 3,0 mM. Se estableció un tratamiento testigo sin hormona. Todos los tratamientos se incubaron en las condiciones de oscuridad y se realizó la evaluación del porcentaje de formación de callos cada 3 días. Para el análisis estadístico se utilizaron como réplicas cinco grupos de nueve explantes cada uno.

3.2 Determinación de la concentración de compuestos fenólicos en callos y diferentes órganos de plantas de campo de *Theobroma cacao* L.

Para la extracción de compuestos fenólicos de *Theobroma cacao* L., se maceraron en nitrógeno líquido 100mg de cada material vegetal (hojas jóvenes y adultas, flores, ramas, semillas y raíces de plantas adultas, callos formados a partir de nucelas, pétalos, estaminoides y hojas jóvenes de dichas plantas). Los fenoles solubles se extrajeron tres veces con metanol. Los extractos se centrifugaron por 5 min a 12000 rpm. Los fenoles ligados a la pared se extrajeron posteriormente con hidróxido de sodio 1M a 70°C por 16 h, neutralizada la reacción con ácido clorhídrico 1M y centrifugados los extractos por 5 min a 12000 rpm .

Obtención de Compuestos Fenólicos de Theobroma cacao L. a través de Técnicas Biotecnológicas.

La concentración de fenoles se determinó con el reactivo Folin-Ciocalteu de acuerdo con el método de Gurr *et al.* (1992). La densidad óptica se midió con un espectrofotómetro a 725nm. La curva patrón se estableció con ácido clorogénico.

3.3 Procesamiento estadístico:

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó con el utilitario *Statistical Package for Social Sciences* (versión 11.5 para *Windows*, *SPSS Inc.*). En todos los casos se realizaron pruebas paramétricas: ANOVA de un factor, Tukey ($p \leq 0.05$). En el caso de los porcentajes de explantes contaminados y de formación de callos los datos fueron transformados por la ecuación $y' = 2 \arcsen (y/100)^{1/2}$ mientras que para el análisis del número de explantes fenolizados se realizó por la ecuación $y = (0,5+y)^{1/2}$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1 Establecimiento *in vitro* de *Theobroma cacao L.*

4.1.1 Influencia de la cisteína y el polivinilpirrolidona como agentes antioxidantes para el establecimiento de callos embriogénicos de *Theobroma cacao L.*

En las Tablas 1, 2 y 3 se muestran el comportamiento de la fenolización en los tres tipos de explantes (estaminoides, pétalos y nucelas).

Tabla 1. Número de estaminoides fenolizados (\bar{x}) con el empleo de cisteína y polivinilpirrolidona (PVP) a los 14 días de implantado el material vegetal de *Theobroma cacao L.*

Tipo de antioxidante	Concentración de antioxidante (g.L ⁻¹)	Número de estaminoides fenolizados (x)
Cisteína	0,00	0,00 b
	0,05	0,07 b
	0,10	0,00 b
	0,15	0,13 ab
Polivinilpirrolidona	0,00	0,00 b
	0,50	0,33 a
	1,00	0,00 b
	1,50	0,00 b

Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$. Datos transformados por la ecuación $y' = (0,5+y)^{1/2}$.

Tabla 2. Número de pétalos fenolizados (\bar{x}) con el empleo de cisteína y polivinilpirrolidona (PVP) a los 14 días de implantado el material vegetal de *Theobroma cacao L.*

Tipo de antioxidante	Concentración de antioxidante (g.L ⁻¹)	Número de pétalos fenolizados (\bar{x})
Cisteína	0,00	2,50 b
	0,05	1,35 c
	0,10	3,65 a
	0,15	3,65 a
Polivinilpirrolidona	0,00	2,50 b
	0,50	2,55 b
	1,00	3,60 ab
	1,50	3,25 ab

Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$. Datos transformados por la ecuación $y' = (0,5+y)^{1/2}$.

Tabla 3. Número de nucelas fenolizadas (\bar{x}) con el empleo de cisteína y polivinilpirrolidona (PVP) a los 14 días de implantado el material vegetal de *Theobroma cacao* L.

Tipo de antioxidante	Concentración de antioxidante (g.L ⁻¹)	Número de nucelas fenolizadas (\bar{x})
Cisteína	0,00	4,44 a
	0,05	3,89 ab
	0,10	4,89 a
	0,15	3,67 ab
Polivinilpirrolidona	0,00	4,44 a
	0,50	3,78 ab
	1,00	3,78 ab
	1,50	3,44 b

Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$. Datos transformados por la ecuación $y' = (0,5+y)^{1/2}$.

En el caso de los estaminoides (Tabla 1) la mayor cantidad de explantes se fenolizaron con el tratamiento de PVP al 0,5 g.L⁻¹ sin diferencias significativas con el de cisteína 0,15 g.L⁻¹. Para el caso de los pétalos (Tabla 2), las mayores concentraciones de ambos antioxidantes, cisteína (0,15 g.L⁻¹ y 0,1 g.L⁻¹) y PVP (1 y 1,5 g.L⁻¹) provocaron una mayor fenolización del tejido. Mientras que en las nucelas (Tabla 3) se mantuvo una alta fenolización en todos los casos, siendo el mayor valor para los controles y el tratamiento de cisteína a 0,1 g.L⁻¹ sin diferencias significativas con el resto de los tratamientos excepto para PVP 1,5 g.L⁻¹. Los explantes que presentaron la menor fenolización fueron los estaminoides, mientras que las nucelas resultaron los tejidos más fenolizados.

Jiménez (1998) refirió que los compuestos fenólicos acumulados en grandes cantidades en las vacuolas se mezclan con los contenidos de los plastidios y otros organelos, donde se encuentran las polifenoloxidasas, que producen la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación, lo que constituye un impedimento en la formación de callos, no obstante, en el presente experimento, los resultados no mostraron que la fenolización afectara en gran medida al crecimiento de los callos.

En la figura 1 se puede observar el crecimiento de los callos con los diferentes explantes y antioxidantes evaluados. En el caso de las nucelas los tratamientos con cisteína (figura 1A) solo mostraron diferencias significativas a los 28 días, donde el mayor crecimiento de los callos se asoció con la mayor concentración del antioxidante (0,15 g.L⁻¹) sin diferencias significativas con los de 0,05 y 0,1 g.L⁻¹. Mientras que para el caso del PVP (figura 1B) a

Obtención de Compuestos Fenólicos de Theobroma cacao L. a través de Técnicas Biotecnológicas

los 28 días el menor crecimiento fue el tratamiento control. A los 42 días se produjo un mayor crecimiento en los callos tratados con PVP a 1 y 1,5 g.L⁻¹. A partir de este momento no existieron diferencias significativas entre tratamientos.

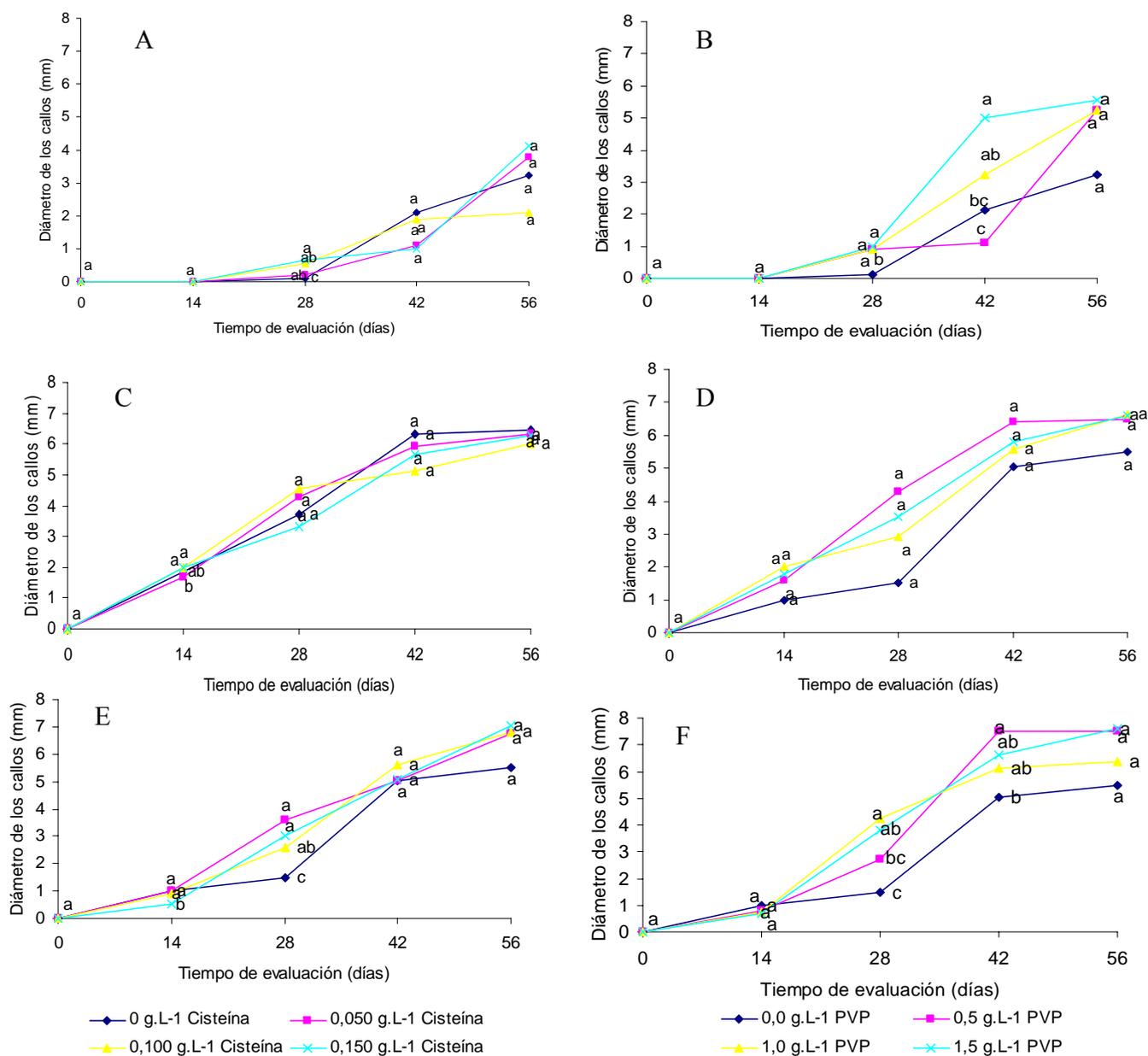


Figura 1. Crecimiento de los callos con el empleo de cisteína y polivinilpirrolidona (PVP) en el tiempo (0, 14, 28, 42 y 56 días) de implantado el material vegetal (Nucelas (A-B), estaminoides (C-D) y pétalos (E-F)) de *Theobroma cacao* L. Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$.

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas

Para los estaminoides (figura 1C y D), el crecimiento de los callos no estuvo asociado con las concentraciones ni tipos de antioxidantes pues se mantuvo un crecimiento muy similar en todos los momentos y concentraciones evaluadas excepto en el caso del la cisteína (figura 1C) a los 14 días donde los explantes colocados a concentración de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ mostraron un menor crecimiento.

En los pétalos tratados con cisteína (figura 1E), el tratamiento de $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ mostró los menores valores de crecimiento a los 14 días, mientras que el menor valor a los 42 días fue para el control, sin diferencias significativas con el tratamiento de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$. En el resto de los momentos evaluados, el comportamiento fue similar para todos los tratamientos. Para los tratamientos con PVP (figura 1F) el mayor crecimiento se encontró a 1 g.L^{-1} sin diferencias con $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ a los 28 días, por otro parte a los 42 días fue para la concentración de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ sin diferencias con 1 y $1,5 \text{ g.L}^{-1}$.

Estos resultados demostraron que para las nucelas de cacao existe la necesidad del empleo de altas concentraciones de antioxidantes, en comparación con los niveles utilizados en café por Santana (1993), quien refirió respuestas favorables con la cisteína en concentraciones que variaron de $0,025$ a $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ para la formación de callos a partir de explantes de hojas.

En el caso de los estaminoides la fenolización fue muy baja en comparación con los pétalos y nucelas además de mostrar un crecimiento de los callos similar en todos los tratamientos a los tiempos evaluados (figura 1C y D). En los pétalos (figura 1E y F) la fenolización fue mayor que para en estaminoides. No obstante, el tejido que mostró una mayor fenolización de todos los probados fue el de las nucelas, por lo que seleccionar el tipo de explante para futuros experimentos de formación de callos resulta de gran importancia.

De forma general podemos señalar que los tipos y concentraciones de los antioxidantes utilizados no influyeron en grado de fenolización y crecimiento de los callos. Se obtuvieron los menores valores de fenolización cuando se emplearon los estaminoides como explantes. A pesar de haber alguna diferencia en algunos de los momentos estudiados, durante el crecimiento de los callos, a partir de los 40 y hasta los 56 días, los valores se igualaron.

4.1.2 Influencia del tipo de explante en la formación de callos de *Theobroma cacao* L.

En la inducción de la embriogénesis somática de cacao, varios autores estudiaron la respuesta de explantes a la callogénesis, ya sea en estaminoides y pétalos (López-Báez *et al.*, 1993; Alemanno *et al.*, 1995, 1997; Young *et al.*, 2003; Niemenak *et al.*, 2007), como en nucelas (Essan, 1977.; Chatelet *et al.*, 1992 y Figueira y Janik, 1993) y en otros tipos de explantes, los que obtuvieron diferentes resultados de acuerdo a la metodología utilizada y al tipo de explante. De igual modo, en el presente trabajo, a pesar que todos los explantes indujeron callogénesis la respuesta varió en dependencia del tipo utilizado (figura 2). Respuestas similares también han informado para otros cultivos como el café (Etienne *et al.*, 1999; Fisichella *et al.*, 2000), entre otros.

Durante los 14 días iniciales de cultivo en el medio de inducción de callo, los estaminoides y pétalos mostraron un aumento en tamaño y volumen para dar lugar a la formación de callos en diferentes grados de intensidad, que fue mayor para el caso de los estaminoides (figura 2), lo cual coincide con los resultados obtenidos por Alemanno (1995) y Li *et al.* (1998), donde la formación de callos fue mayor para los estaminoides que para los pétalos.

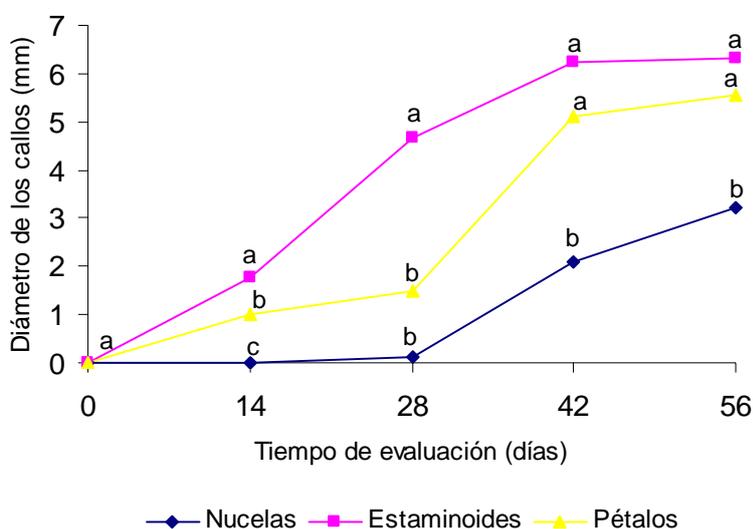


Figura 2. Crecimiento en el tiempo (0, 14, 28, 42 y 56 días) de callos embriogénicos implantados a partir de nucelas, estaminoides y pétalos de *Theobroma cacao* L. Diámetro de los callos (mm.). Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$.

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas

Contrario a esto, las nucelas presentaron un menor desarrollo y la aparición del callo no siempre se dió tras el aumento de volumen del explante. En la mayoría de los casos los explantes se necrosaron (figura 2 y 3A) y fue a partir de este tejido, que posterior a los 14 días comenzó la formación de callos, los que mantuvieron un menor crecimiento que en el caso de los estaminoides y pétalos durante todo el tiempo evaluado, excepto a los 28 días donde no mostraron diferencias con los pétalos (figura 2).

Las etapas de la formación de los callos para los 3 tipos de explantes empleados se puede observar en la figura 3.

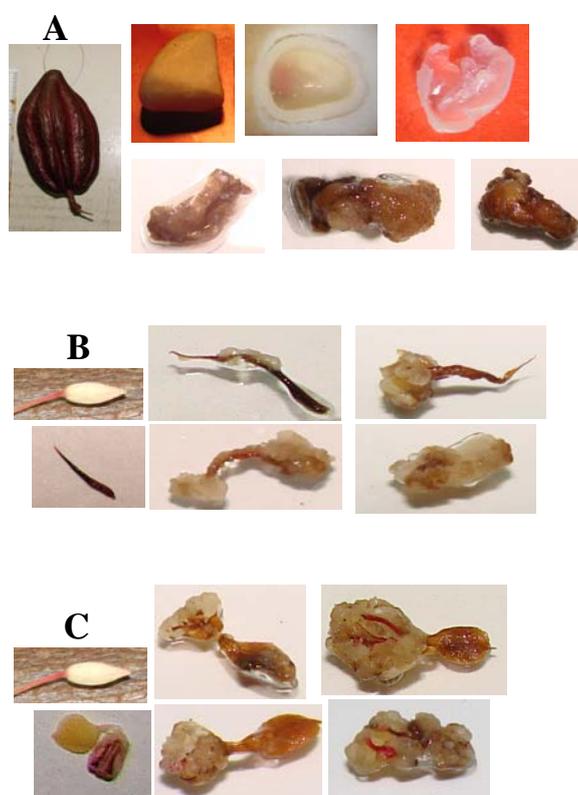


Figura 3. Etapas de la formación de los callos para los 3 tipos de explantes. **A.** Nucelas, **B.** Estaminoides y **C.** Pétalos.

En el caso de los estaminoides y pétalos se observa que ocurre la formación de callos sin o con muy poco necrosamiento (figura 3 B y C), además durante el crecimiento de los mismos se encontraron diferentes tipos de callos que variaban en cuanto a su forma y coloración (figura no mostrada), la coloración varía en dependencia de las etapas, algunos callos adquieren una coloración más oscura por la presencia de fenoles.

En los explantes donde hubo formación de embriones (figura 4), los callos cesaron su crecimiento y tenían aspecto de encontrarse en un proceso de necrosamiento, presentando una coloración café oscura, resultado de la acumulación de compuestos fenólicos (Alemanno, 1996 y 2003).

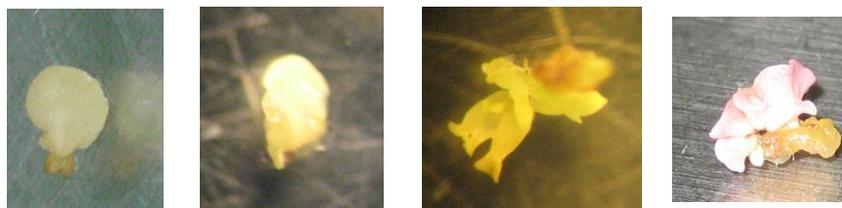


Figura 4. Embriones en diferentes estados de madurez, obtenidos a partir de nucelas, estaminoides y pétalos de *Theobroma cacao* L

Los embriones se formaron a partir de los tres tipos de explantes pero en pequeñas cantidades hasta la fecha de la última evaluación, lo que puede estar dado por la alta asincronía de este proceso en el cacao (Alemanno, 1996 y 2003, Niemenak, 2007).

4.1.3 Influencia del Thidiazurón y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético en la formación de callos de *Theobroma cacao* L.

En la figura 5 se muestra el comportamiento de la formación de callos a partir de estaminoides de *Theobroma cacao* L. con la variación de concentraciones de TDZ (5 A) y 2,4-D (5 B) en el medio de cultivo.

En estos resultados se encuentra una baja influencia del TDZ sobre la formación de callos a partir de estaminoides (figura 5A), en el tratamiento control (sin TDZ), no existió crecimiento de los callos durante todo el tiempo evaluado. A partir de los 14 y hasta los 42 días el mayor crecimiento de los callos se obtuvo para la concentración de 0,01 mg.L⁻¹ sin diferencias con 0,005; 0,02 y 0,03 mg.L⁻¹ a los 14 días, 0,02 y 0,03 mg.L⁻¹ a los 28 días y 0,005 y 0,03 mg.L⁻¹ a los 42 días. A partir de los 42 días no existieron diferencias significativas entre los tratamientos probados.

En el caso del 2,4-D (figura 5 B), solo existieron diferencias a los 14 y 56 días, donde los mejores tratamientos fueron para las concentraciones 2 y 4 mg.L⁻¹ (14 días) y 12 mg.L⁻¹ sin diferencias con 8 mg.L⁻¹ a los 56 días. De manera general el tratamiento 0 mg.L⁻¹ no favoreció el crecimiento de los callos en ninguno de los momentos evaluados.

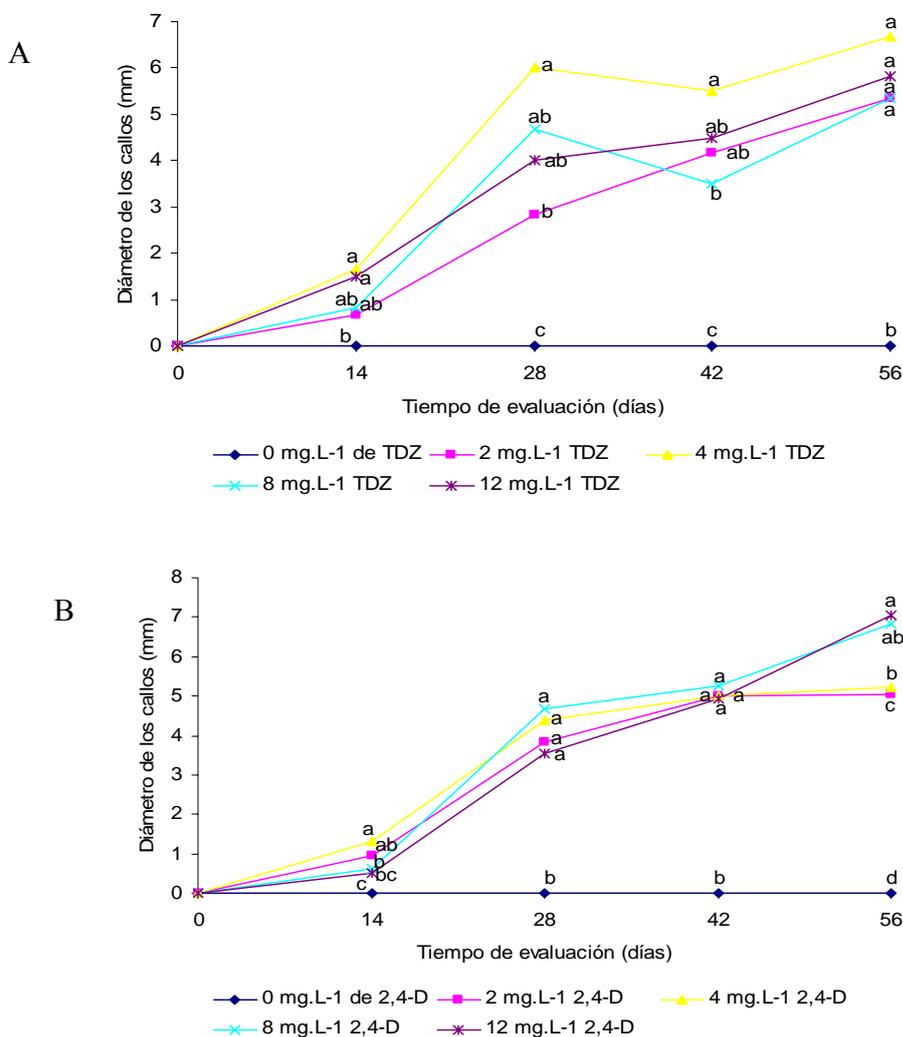


Figura 5. Crecimiento de callos con el empleo de diferentes concentraciones de Thidiazurón (A) y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (B) en el tiempo (0, 14, 28, 42 y 56 días) de implantado el material vegetal (estaminoides) de *Theobroma cacao* L. Diámetro de los callos (mm.). Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$.

Según Murthy *et al.* (1998) el TDZ es un compuesto derivado de la fenilurea, empleado como herbicida que tiene una alta actividad citoquinínica en el cultivo de tejidos vegetales. Su empleo permite la formación de callos, embriones somáticos, yemas axilares y adventicias en plantas leñosas y afecta la elongación en brotes y raíces. Mientras que 2,4-D se considera una potente auxina para inducir la formación de callos y de embriones somáticos (George, 2008).

En el cacao la combinación de estas dos hormonas (2,4-D y TDZ) resulta de gran importancia para la obtención de callos y embriones somáticos (Young *et al.*, 2003), no obstante, se han empleado otras combinaciones de auxinas y citoquininas con buenos resultados como 2,4-D y 2iP (Tan y Furtek, 2003), 2,4-D y kinetina (Alemanno *et al.*, 2003). En el presente trabajo el TDZ no tuvo influencia en el crecimiento del callo a los 56 días mientras que el 2,4-D (12 mg.L⁻¹) causó el mayor crecimiento de los callos a igual tiempo sin diferencias con 8 mg.L⁻¹.

4.1.4 Efecto del tiempo de desinfección sobre la contaminación del material vegetal y la formación de callos a partir de hojas jóvenes de *Theobroma cacao* L.

En la figura 6 se muestra el porcentaje de explantes contaminados en el tiempo posterior a la desinfección con hipoclorito de sodio al 2% por 0, 5, 10 y 15 minutos.

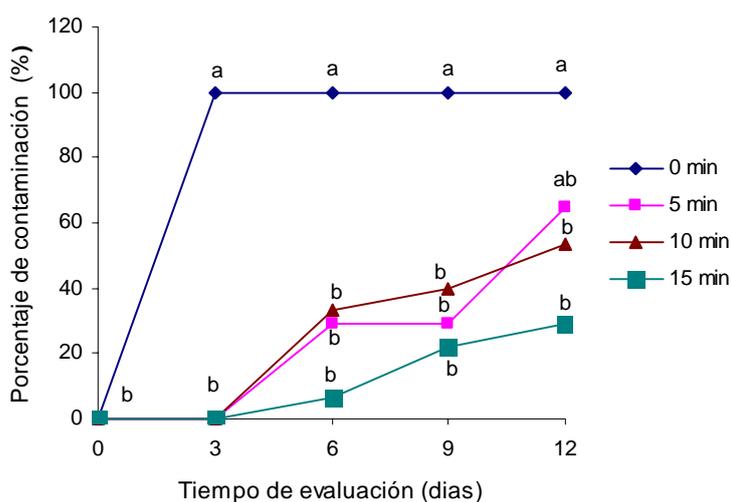


Figura 6. Porcentaje de explantes contaminados con los diferentes tiempos de desinfección (0, 5, 10 y 15 minutos), a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de evaluados. Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para cada tiempo de evaluación $p \leq 0.05$. Datos transformados por la ecuación. $X' = 2 \cdot \arcsen \sqrt{(x/100)}$.

A partir de los 3 días de evaluación (figura 6) el tratamiento control mostró un 100% de explantes contaminados, mientras que el resto de los tratamientos comenzaron a mostrar diferentes porcentajes de contaminación a partir de los 6 días de evaluación, sin diferencias significativas entre ellos y si con el control. A los 12 días de evaluación los tratamientos de 10 y 15 minutos de desinfección mantuvieron un menor porcentaje de explantes contaminados con respecto al control no siendo así para el tratamiento de 5 minutos de

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao L.* a través de Técnicas Biotecnológicas

desinfección, siendo el tratamiento de 15 minutos el que menor porcentaje de contaminación mostró (29%) aunque sin diferencias significativas con respecto a los tratamientos de 5 (64%) y 10 minutos (53%). Es necesario señalar que los explantes tratados en el tiempo de 15 minutos manifestaban mayor síntomas de daños que los demás tratamientos (datos no mostrado).

La desinfección es un paso indispensable en el proceso de establecimiento del *cultivo In vitro* de plantas, particularmente cuando los explantes proceden de condiciones del campo. Al respecto, George, (2008) señaló que la concentración y tiempo son factores importantes en la desinfección de los explantes del campo. Una concentración alta o un tiempo extendido puede dañar los tejidos, mientras una concentración baja no destruye los microorganismos. Así, una baja concentración con tiempo extendido no pueden ser más efectivo que las concentraciones altas en un periodo corto. Por este razón existe un punto el cual los dos factores tienen mayor efecto sin causar daños a las explantes.

Los contaminantes microbianos de la superficie de los explantes se eliminan comúnmente por inmersión de estos en soluciones desinfectantes tales como: etanol, hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio [Ca(ClO)₂], peróxido de hidrogeno (H₂O₂), cloro comercial y bicloruro de mercurio (HgCl₂), entre otros. (Capó, 1998 y Cassells, 1991, Jiménez, 1998).

El hipoclorito de sodio es uno de los desinfectante que con mayor frecuencia su uso se informa en la literatura (George, 2008). Esto se basa en lo fundamental por su eficiencia y bajo costo, sin embargo la dosis utilizada y el tiempo de desinfección cambian según la especie a trabajar en lo fundamental por las características morfológicas y las estructuras que se encuentran en su superficie.

Gaiser *et al.*, (1981) en sus experimentos de descontaminación mostraron que a cinco minutos de desinfección en 1% de NaClO hubo mayor efecto que en un minuto con 0.1 % en tallos de *Epiphyllum*. Por su parte Kolozasarvari, (2005) realizó una doble desinfección con hipoclorito de sodio al 19% por 20 y 5 minutos consecutivamente, después de mantenerlo por 1 minuto en alcohol al 70%.

En la figura 7 se puede observar el comportamiento de la formación de callos durante el experimento de desinfección para cada uno de los tiempos que se evaluaron.

Obtención de Compuestos Fenólicos de Theobroma cacao L. a través de Técnicas Biotecnológicas

A los 6 y 9 días de evaluación (figura 7), el mayor porcentaje de formación de callos se obtuvo para el tratamiento de 10 minutos de desinfección (100%) y los menores para 0 (0%) y 5 minutos (13% a los 6 y 20% a los 9 días). A los 15 minutos de desinfección se alcanzó un 62 y 71% respectivamente, para un valor intermedio de formación de callos.

A los 12 días de evaluación, el porcentaje de formación de callos (figura 7) alcanzó el mayor valor para el tratamiento de 10 minutos (100%) con diferencias significativas con respecto a los tratamientos control y 5 minutos. No existió diferencia con los 15 minutos de desinfección que alcanzó un 84% de formación de callos.

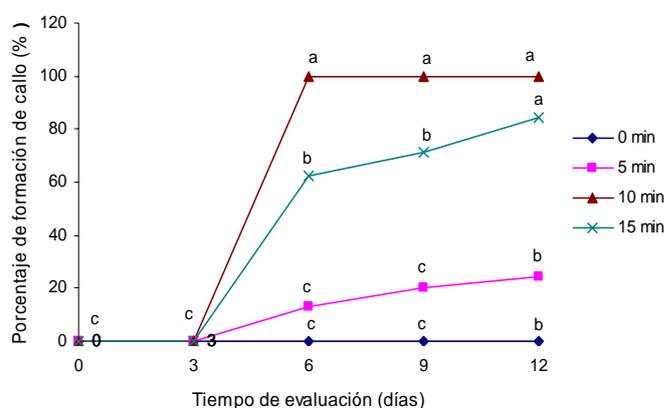


Figura 7. Porcentaje de formación de callos con diferentes tiempos de desinfección (0, 5, 10 y 15 minutos) a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de evaluados. Medias con letras distintas difieren significativamente para cada tiempo de evaluación según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$. Datos transformados por la ecuación $X' = 2 \cdot \arcsin \sqrt{x/100}$.

Se puede decir entonces que los mejores tiempos de desinfección de los explantes para la formación de callos fueron 10 y 15 minutos, pues con ellos se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación y mayor formación de callos, pero con el tratamiento de 15 minutos se observó un mayor número de explantes dañados durante la desinfección y menor formación de callos que para los 10 minutos sin diferencias significativas. Por lo que la desinfección de hojas jóvenes para experimentos posteriores se realizó con 10 minutos. El material vegetal del que se partió y los callos formados en este tratamiento se pueden observar en la figura 8.



Figura 8. Material vegetal utilizado y formación de callos a partir de hojas jóvenes de *Theobroma cacao* L.

4.1.5 Efecto de la concentración de Ácido indol butírico en la formación de callos a partir de hojas jóvenes de *Theobroma cacao* L.

En la figura 9 se muestra el porcentaje de formación de callos con la utilización de diferentes concentraciones de AIB.

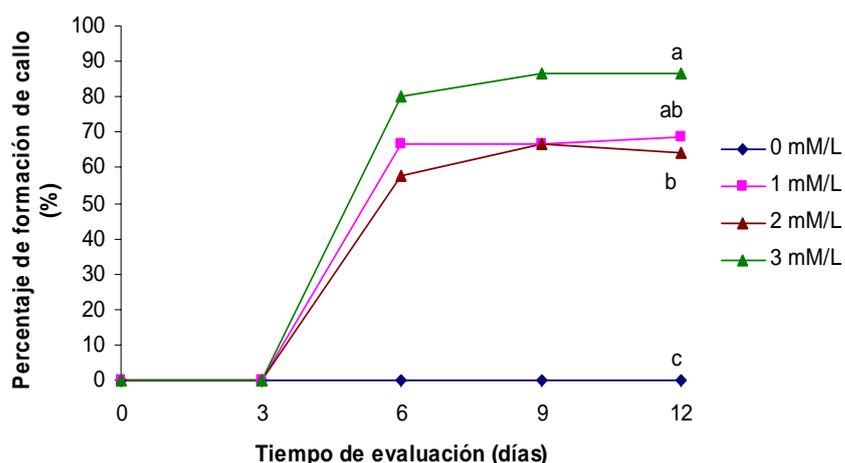


Figura 9. Porcentaje de formación de callos con la utilización de diferentes concentraciones de AIB (ácido indol Butírico) 0; 1,0; 2,0 y 3,0 mM a las 0, 3, 6, 9 y 12 días de evaluación. Medias con letras distintas difieren significativamente para cada tiempo de evaluación según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$. Datos transformados por la ecuación $X' = 2 \cdot \arcsen \sqrt{(x/100)}$.

Se puede observar que a partir de los tres días, la concentración de 3,0 mM de AIB influyó en una mayor formación de callos hasta los 12 días de evaluados, sin diferencias significativas con respecto al tratamiento con 1,0 mM, pero sí con respecto a los demás tratamientos 2,0 mM y 0,0 mM de AIB y donde en este último no ocurrió la formación de callos en ninguno de los momentos evaluados. El tratamiento de 1,0 mM constituye la

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao L.* a través de Técnicas Biotecnológicas

mejor dosis utilizada, por ser esta la concentración mínima que nos proporciona igual formación de callo.

Un aspecto importante a señalar es que el AIB forma parte del grupo de las auxinas que se utiliza en lo fundamental para la formación de raíces, tanto en los métodos de propagación *in vitro* como *ex vitro* (Caboni y Tonalli, 1999, George, 2008), este regulador por lo general no se usa para la formación de callo, aunque no existen referencia al respecto. Sin embargo en la aplicación de este regulador solo o combinado en la inducción de raíces de esquejes de plantas, provoca que en su base se forme un callo inicial de cicatrización como respuesta a la herida, surgiendo raíces directamente del callo y del tejido diferenciado de la estaca (Hartman *et al.*, 1997). En nuestros resultados esta formación de callo a partir de hoja va acompañada de la aparición de raicillas (datos no evaluados) que pudiera ser un suceso de gran importancia para el cultivo de raíces *in vitro* (ver figura 10).



Figura 10. Raíces de callos *in vitro* formado con AIB a partir de hojas jóvenes de *Theobroma cacao L.*

4.2 Determinación de la concentración de compuestos fenólicos.

Determinación de la concentración de compuestos fenólicos en callos y diferentes órganos de plantas de campo de *Theobroma cacao L.*

En las tablas 4, 5 y 6 se muestran las concentraciones de fenoles en los diferentes órganos de plantas de campo evaluados.

Tabla 4. Concentración de fenoles solubles, ligados a la pared y totales en hojas jóvenes, hojas adultas, flores, semillas, ramas y raíces de plantas de campo de *Theobroma cacao* L.

Órgano	Concentración de fenoles solubles (mg.g ⁻¹ M.F.)	Concentración de fenoles ligados a la pared (mg.g ⁻¹ M.F.)	Concentración de fenoles totales (mg.g ⁻¹ M.F.)
Hojas jóvenes	0,16 e	23,95 a	24,12 b
Hojas adultas	0,81 f	15,94 c	16,02 d
Flores	0,74 d	14,62 d	15,36 d
Semillas	2,13 a	29,27 a	31,41 a
Ramas	0,98 c	5,36 e	6,66 e
Raíces	1,28 b	15,74 c	17,22 c

Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$.

Para el caso de los fenoles solubles (tabla 4), se puede observar que la mayor concentración de compuestos fenólicos se encontró en semillas con diferencias significativas con respecto al resto de los órganos analizados, seguidas por las raíces y el menor contenido fenoles se encontró en hojas adultas.

En los fenoles ligados a la pared (tabla 4) el comportamiento fue similar, pues las semillas mostraron mayor concentración de fenoles, pero en este caso seguidas por las hojas jóvenes que estuvieron por encima de las raíces y hojas adultas. El menor contenido de fenoles ligados a la pared se observó para las ramas.

Los fenoles totales aparecen en la tabla 4, el comportamiento fue similar al de los fenoles ligados a la pared, los contenidos mayores de fenoles totales se encontraron para las semillas, seguidas por las hojas jóvenes y raíces, mientras que las ramas mostraron concentraciones inferiores de los compuestos fenólicos.

Los fenoles totales son el resultado de la sumatoria de los fenoles ligados a la pared y los solubles por lo que se explica que su comportamiento se encuentre en correspondencia con lo obtenido para el caso de los fenoles solubles y ligados a la pared.

Los compuestos fenólicos se encuentran abundantemente en todas las partes de la planta, tales como ramas, tallos, hojas, frutos, raíces, flores, polen y semillas (Pratt y Hudson, 1992). Existe diferencia en la capacidad de síntesis, acumulación y excreción de metabolitos fenólicos por las plantas. En la planta evaluada de *Theobroma cacao* L., las

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas

semillas, hojas jóvenes y raíces resultaron los órganos con mayor contenido de fenoles solubles, mientras que las ramas, a pesar de tener mayor contenido de compuestos fenólicos solubles que otros órganos, contienen los menores niveles de fenoles totales de los órganos evaluados.

La semilla es el órgano de donde se produce el chocolate, que es un alimento rico en compuestos fenólicos, por lo que los resultados obtenidos pueden estar relacionados con que la síntesis de estos compuestos se realiza tempranamente en las hojas y posteriormente se trasloca hacia sus diferentes funciones, almacenándose una gran parte en la semilla.

El tipo de fenol producido y su cantidad dependen del órgano de la planta y su estado de desarrollo, lo cual se pudo confirmar en las evaluaciones realizadas a los diferentes órganos de los clones. Por otra parte el genotipo además puede influir en los contenidos de fenoles.

Zapata *et al.* (2000) obtuvieron resultados similares en plantas de girasol y tabaco. Ellos demostraron que la excreción de estos compuestos depende del genotipo, edad y estado de desarrollo de la planta. Por otra parte observaron mayor acumulación de fenoles en la parte aérea que en la raíz y en plantas adultas más que en las jóvenes, lo cual no coincide con los resultados alcanzados en el presente trabajo, donde las raíces mostraron mayor contenido de compuestos fenólicos que las partes aéreas de la planta.

Por su parte, Zheng y Wang (2001) encontraron que la concentración fenólica en hierbas medicinales estuvo en el rango de 0.23 a 2.85 mg (equivalentes a ácido gálico, EAG).g⁻¹ de masa fresca. En la planta evaluada de *Theobroma cacao* L los valores de fenoles totales se mantuvieron en el orden de los 6,66 a 24,12 mg. g⁻¹ de masa fresca, superior a lo informado para las hierbas medicinales.

Los datos de fenoles solubles, ligados a la pared y totales en callos formados *in vitro* a partir de estaminoides, pétalos y nucelas de *Theobroma cacao* L. se observan en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración de fenoles solubles, ligados a la pared y totales en callos formados *in vitro* a partir de estaminoides, pétalos y nucelas de *Theobroma cacao* L.

Órgano	Concentración de fenoles solubles (mg.g ⁻¹ M.F.)	Concentración de fenoles ligados a la pared (mg.g ⁻¹ M.F.)	Concentración de fenoles totales (mg.g ⁻¹ M.F.)
Callos de estaminoides	1,79 ab	2,70 b	4,50 b
Callos de pétalos	1,36 b	3,03 b	4,39 b
Callos de nucelas	1,93 a	3,91 a	5,84 a

Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$.

La mayor concentración de fenoles solubles se encontró en los callos formados a partir de nucelas, sin diferencias con los de estaminoides, mientras que los provenientes de pétalos mostraron menor concentración (tabla 5).

Por otra parte, al analizar los fenoles ligados a la pared (tabla 5), los callos formados de nucelas mostraron mayor concentración al igual que para los fenoles solubles, pero los formados de estaminoides y pétalos mantuvieron valores similares por debajo a los obtenidos para las nucelas.

Al analizar la concentración de fenoles totales (tabla 5) encontramos igual comportamiento que para el caso de los fenoles ligados a la pared, siendo las nucelas las que mantuvieron la mayor concentración de fenoles. Este resultado puede estar relacionado con el comportamiento del tejido nucelar como respuesta al cultivo *in vitro*. En la tabla 3 se pudo observar que este es el tejido con mayor número de explantes fenolizados, no obstante, el tejido se recupera y se logra una buena formación de callos, aunque en menor medida que para los pétalos y estaminoides.

Alemanno *et al.*, (2003) analizaron la composición fenólica durante el proceso de formación de callos a partir de pétalos y estaminoides en *Theobroma cacao* L. Durante todo el proceso después de la implantación, el contenido de polifenoles sufrió variaciones, para los clones que evaluaron los niveles de compuestos fenólicos en los callos embriogénicos y no embriogénicos tuvo un comportamiento diferente. La síntesis de estos compuestos en callos, bajo diferentes condiciones creadas, para propiciar la embriogénesis somática, reveló mayores concentraciones de estos compuestos en callos no embriogénicos. En el

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao L.* a través de Técnicas Biotecnológicas

presente estudio no se llegaron a comparar los contenidos de fenoles para callos embriogénicos y no embriogénicos pero sí se encontró diferencias entre los tipos de callos obtenidos a partir de diferentes tejidos (nucelas, estaminoides y pétalos), siendo las nucelas el tejido que produjo mayores niveles de fenoles.

Determinación de la concentración de compuestos fenólicos (solubles, ligado a la pared y totales) de callos In vitro con diferentes concentraciones de AIB en hojas de *Theobroma cacao L.*

En la tabla 6 se muestran los contenidos de fenoles en callos formados *in vitro* a partir de hojas jóvenes de cacao que fueron crecidos en diferentes concentraciones de AIB (ácido indol butírico).

Tabla 6. Concentración de fenoles solubles, ligados a la pared y totales en callos formados *in vitro* con diferentes concentraciones de AIB (0; 1,0; 2,0 y 3,0 mM. L⁻¹), a partir de hojas jóvenes de *Theobroma cacao L.*

Concentración de AIB (mM)	Concentración de fenoles solubles (mg.g ⁻¹ M.F.)	Concentración de fenoles ligados a la pared (mg.g ⁻¹ M.F.)	Concentración de fenoles totales (mg.g ⁻¹ M.F.)
0,0	3,35 a	6,68 b	10,03 b
1,0	1,70 bc	4,42 b	6,11 bc
2,0	1,40 bc	4,82 b	6,23 bc
3,0	1,95 b	9,41 a	11,36 a

Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey para $p \leq 0.05$.

Para el caso de los fenoles solubles (tabla 6) se puede observar que la mayor concentración de compuestos fenólicos se encontró cuando no se utilizó AIB, con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos analizados.

En los fenoles ligados a la pared (tabla 6) las mayores concentraciones se encontraron con 3,0 mM de ácido indol Butírico, tratamiento que se diferenció significativamente del resto de concentraciones de AIB evaluadas. No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos 0; 1,0 y 2,0 mM de AIB.

Obtención de Compuestos Fenólicos de *Theobroma cacao* L. a través de Técnicas Biotecnológicas

El comportamiento de los fenoles totales fue similar al de los fenoles ligados a la pared (tabla 6), los contenidos mayores de fenoles totales se encontraron para las hojas tratadas con 3,0 mM de ácido indolbutírico, mientras que para las restantes concentraciones evaluadas no hubo diferencias significativas.

Los polifenoles en el cacao se encuentran en los pigmentos celulares de los cotiledones y hojas (Osman et al., 2004). Caboni and Tonalli (1999), señalan que el IBA es la auxina más efectiva para la inducción de raíces en un amplio rango de especies, pero Jalal y Colin (2006) en subcultivos consecutivos obtuvieron callos y suspensiones celulares en *Theobroma cacao* con la utilización de ácido indolbutírico (AIB) y zeatina (Z). Ellos utilizaron concentraciones de 1 mg l^{-1} IBA y 0.05 mg L^{-1} de zeatina para formación de callos y 10 mg l^{-1} IBA y 0.5 mg L^{-1} zeatina para obtención de la suspensión celular.

Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con los informados en la literatura para especies de este género y tiene gran importancia para desarrollar futuras estrategias de producción de estos metabolitos a partir del cultivo *in vitro* de *Theobroma cacao* L. De aquí la importancia de determinar el órgano de mayor acumulación de estos metabolitos *in vivo*, lo cual permitirá ajustar las condiciones para diseñar protocolos eficientes que permitan la obtención de estos compuestos a partir de órganos o tejidos de las plantas propagadas *in vitro*.

Para el caso de la *Theobroma cacao* L. la concentración de compuestos fenólicos totales, se encontró en el siguiente orden descendente: semillas, hojas jóvenes, raíces, hojas adultas, flores, ramas, callos de hojas (3,0; 0,0; 2,0 y 1,0 mM), callos de nucelas, callos de estaminoides y callos de pétalos. Resulta importante señalar que las hojas jóvenes contienen uno de los mayores niveles de compuestos fenólicos en plantas de campo y a su vez los callos formados a partir de ellas también poseen mayor cantidad de compuestos fenólicos que los que se obtienen a partir de partes florales. Por lo que será un dato a tener en cuenta para próximas investigaciones con este cultivo.

5. CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES:

1. Los estaminoides mostraron un mayor crecimiento de callos y menor fenolización que el resto de los explantes evaluados.
2. De los explantes evaluados, las nucelas mostraron el mayor grado de fenolización y el menor crecimiento de callos.
3. El thidiazurón no tuvo influencia en el crecimiento del callo a los 56 días mientras que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (12 mg.L⁻¹) causó el mayor crecimiento de los callos a igual tiempo sin diferencias con 8 mg.L⁻¹.
4. Se observó un mayor crecimiento de los callos al aumentar la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, sin diferencias significativas para 8 y 12 mg.L⁻¹.
5. Los mejores tiempos de desinfección de los explantes para la formación de callos fueron a los 10 y 15 minutos, pues con ellos se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación y mayor formación de callos.
6. Se logró una mayor formación de callos al utilizar 3,0 mM de ácido indol butírico.
7. La mayor concentración de compuestos fenólicos *ex vitro* se encontró en semillas, con diferencias significativas con respecto al resto de los órganos analizados. Los callos formados a partir de nucelas mostraron el mayor contenido de fenoles dentro de los tipos de callos evaluados.
8. El mayor contenido de fenoles solubles se detectó cuando no se utilizó hormona, mientras que la mayor concentración de fenoles ligados a la pared y totales se registraron para la mayor concentración de ácido indol butírico.

6. RECOMENDACIONES



6. RECOMENDACIONES:

1. Obtener suspensiones celulares a partir de callos.
2. Realizar análisis por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a los extractos de compuestos fenólicos analizados.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7. Revisión Bibliografía

1. **Adu-Ampomah, Y.; Novak, F. J.; Afza, R.; Van Durren, M.** Meristem-tip culture of cocoa (*Theobroma cacao* L.) Trop. Agric. 1992, vol. 69, no. 3, p.268- 272.
2. **Alemanno, L, 1995.** Embryogenese Somatique du Cacaoyer *Theobroma cacao* L. Contraintes, Progres et Perspectives. Tesis Doctora. Montpellier, Francia, Universite Montpellier II. 194 .
3. **Alemanno, L.; Berthouly, M.; Ferriere, N., M. 1996.** Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. Plant Cell, Tissue and organ culture 46; 187-194.
4. **Alemanno, L.; Berthouly, M.; Ferriere, N., M. 1997.** A comparison between *Theobroma cacao* L zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. In Vitro Cell. Dev. Biol, Plant 33:163-172.
5. **Alemanno, L; Ramos, T.; Gargadenec, A.; Andary, C.; Ferriere, N. 2003.** Localization and identification of phenolic compound in *Theobroma cacao* L. Somatic embryogenesis. Annals of Botany. 92:613-623.
6. **Baker. W. 1891.** The Chocolate Plant (*Theobroma cacao*) and its products. Jhon Wilson and son. Cambridge, England. 164p.
7. **Barahona, J. 1987.** Manual del Cultivo del Cacao. INIAP. Quevedo, Ecuador. 109p.
8. **Bekele, F. L.; Kennedy, A McDavid, C, Lauckner F.; Bekele, E I.** Numerical taxonomic studies on cacao (*Theobroma cacao* L.) in Trinidad. Euphita. 1994, no.75, p. 234-240.
9. **Biswas B.K; Joshee N; Yadat A; and Yaday A.K;** Development and Application of Biotechnology in Guava: a Nutraceutical Fruit Acta Hort. 2007
10. **Blackmond W. j., Reynolds B. D, & Postek C, E. 1981** production of somatic embryos from cantaloupe hypocotyl exlants. HortScience 16, 451 (Abst. Bot. 21, 438 – 439).
11. **Bourgaud, F., A. Gravoy, S. Milesi, E. Gontier. 2001.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspectiva. Plant Science 161: 839-851.
12. **Braudeau, J. 1970** El cacao, técnicas agrícolas y producciones tropicales (*Theobroma cacao* L.). La habana: Editorial pueblo y educación.

13. **Bruneton, J. 1991.** *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Ed. Acribia. Zaragoza.
14. **Caboni E, Tonalli MG (1999)** Effect of 1,2 - Benzisoxazole-3 acetic acid on adventitious shoot regeneration and *in vitro* rooting in apple. *Plant Cell Reports*. **18**: 985-988.
15. **Cai, Y. B., Q. Luo, M. Sum, H. Corke. 2004b.** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*. 74: 2157-2184.
16. **Cai, Y., M. Sun, J. Xing, H. Corke. 2004a.** Antioxidant Phenolic Constituents in Roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: Structure-Radical Scavenging Activity Relationships. *J. Agric. Food Chem*. 52: 7884-7890.
17. **Carnesecchi, S. ; Schneider, Y. ; Lazarus, S.A. ; Coehlo, D. ; Gosse, F. ; Raul, F.** Flavanols and Procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Letters*. 2002, vol. 175, p. 147- 155
18. **Cassells, A.C., 1991.** Problem in tissue culture: culture contamination. En P Debergh y R. H. Zimmerman (EWds), *Micropropagación*, pp. 31-45 Academic Publishers, Dordrecht.
19. **Capó, Y. A. 1998.** Contaminación Microbiana en el Cultivo *in Vitro* de Plantas En. Perez - Ponce, J.N. (ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. Pp.81-104.
20. **Castilla. J.** *Fitotecnia del cacao*. La Habana. Editorial Pueblo y Educación. 1981, 179p.
21. **Cakirer, M.S.** Color as an indicator of flavinol content in the fresh seeds of *Theobroma cacao L.* [Thesis of science]; The Pennsylvania state University. The Graduate School. College of Agricultural Science. 2003, 106p.
22. **Castro, F** Intervención en el acto nacional por el 8 de marzo. *Periodico Granma* 9 de marzo. 2005.
23. **Chatelet, P; Michaux Ferriere; Dublin, P. 1992.** Potentialités Embryogènes du Nucelle du Tégumen Interne de Graines Immatures de Cacaoyer (*Theobroma cacao L.*). *Compte-Rendus de l'Academie des Sciences*. no. 315: 55-62

- 24. Coll, J., Y. Tandrón. 2005.** Isolation and identification of neo-Clerodane Diterpenes from *Ajuga remota* by High-performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis* 16: 61-67.
- 25. Cronquist A. 1977.** "On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms". *Plant Syst Evol.*, suppl 1: 179-189.
- 26. Croteau, R. Kutchan, T. M. Lewis. N. G.** "Natural Products (Secondary Metabolites)". En: Buchanan, Grissem, Jones (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. 2000. Capítulo 24.
- 27. Cuatrecasas, J. 1964.** A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contr. U. S. Natl. Herb.* 35(6): 379-607.
- 28. Derksen, G. C., N. Martijn, A. V-B. Teris, A. Capelle, K. H. Ingrid, A. V-D. Henk, E. de Groot. 2003.** Chemical and Enzymatic Hydrolysis of Anthraquinones Glycosides from Madder Roots. *Phytochemical analysis* 14: 137-144.
- 29. Dominguez, J. A. 1973.** *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa, México.
- 30. Engles, J.; bartley,B.; Enriquez, G.** Descriptores de cacao, sus clases y modus operando. CATIE Costa Rica. 1979. 75p.
- 31. Essan, E. 1977.** Tissue Culture Studies on Cocoa (*Theobroma cacao* L.) A Suplimentation of Current Research. Actes de la 5^a Conférence Internationales sur la Recherche Cacaoyere. Nigeria. Ibadan:116- 125.
- 32. Etienne, H; Barry-Etienne, D; Vásquez, N; Berthouly, M. 1999.** Aportes de la Biotecnología al Mejoramiento Genético del Café: El Ejemplo de la Multiplicación por Embriogénesis Somática de Híbridos F1 en América Central. En. Bertrand, B y Rapidel, B. Eds. Desafíos de la Caficultura en Centroamérica. Costa Rica, San José. Cirad, IICA. p 457 499.
- 33. FAO Bases estadística FAOSTATS. 2006.** <http://www.fao.org> (marzo de 2006)
- Figueira, A., Whipkey, A.; Janick, J.** Increased CO₂ and light promote in vitro shoot growth and development of *Theobroma cacao*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1991, vol.116, no. 3 p.585-589.
- 34. Figueira, A.; Janick, J. 1993.** Development of Nucellar Somatic Embrios of *Theobroma cacao*. *Acta Horticulturae* 336: 231-236.

- 35. Figuerira, a.; Lambert, s.; carpenter, D.; Pires, J.L.; cascado, J.C.M.; Romanczyk,L.** The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* L. From Brazil and Malaysia. *Tropical agriculture*. 1997, vol. 74, no. 2, p. 132-139.
- 36. Fisichella, M; Silvi, E; Morini, S. 2000.** Regeneration of Somatic Embryos and Roots from Quince Leaves Cultured on Media with Diferent Macroelement Composition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 101–107.
- 37. Furtek, D.; Kasran, R.; Chia. T.; Jonshiul,L.; Mohammed, A.;Hartney, V.; Mohd, M.; Lamin, K.; Ming Tong, L.** Biotechnology research by the Malaysian cocoa board. En: *Proceeding of the international Workshop on New technologies and Cocoa Breeding*. Kota Kinabalu, Malaysia. 2001, p. 157
- 38. Gaiser M. S, Lazart, J. E, Brown, O. R. 1981.** *In vitro* propagation of *Epiphyllum chrysocardium*. *HortSciencia* 16, 425 (Abst. 194)
- 39. George E. F 2008** *Plant Propagation by Tissue culture part 1*. 2nd. Edition Ed. 574p. Exegetics Ltd.
- 40. Giridhar, P; Rajasekaran, T; Ravishankar, G.A. 2005.** Production of a root-specific flavour compound, 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde by normal root cultures of *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn (*Asclepiadaceae*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85 (1): 61-64.
- 41. Gómez, R.** Cultivo de células y tejidos. En Editor: J. Pérez Ponce *Propagación y mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, Cap. 2. 1998, Vol. 1.IBP, Santa Clara. pp.25-44.
- 42. Gurr, S. I., M. I. Mc. Pherson, D. J. Bowles. 1992.** Lignin and associated phenolic acids in cell walls. En: D. L. Wilkinson (ed.). *Molecular plant pathology: a practical approach*. No. III, IRL Press, Oxford. Pp. 51-56.
- 43. Hai-Xia, Z., L. Man-Cang. 2004.** Separation procedures for the pharmacologically active components of rhubarb. *Journal of Chromatography B*, 812: 175-181.
- 44. Han, Y-S; van der Heijden, R; Verpoorte, R 2001** Biosíntesis of anthraquinones in cell culture of the Rubiaceae plant *Cell, Tissue and organ culture*. 67: 201-220.
- 45. Han, Y. S., B. Hofte, R. van der Heijden, R. Verpoorte. 2003.** Analysis of Anthraquinones in cell cultures of *Cinchona Robusta* by HPLC with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection. *Phytoquematical Analysis* 14: 298-305

46. **Hancock, B. L. y Fowler, M.S.** cocoa beans production and transport. En s.T. Beckett (Ed.) Industrial chocolate Manufacture and Use (p 12). (London: Chapman & Hall.1994.
47. **Hardy, F. 1960.** Cacao Manual (English Edition). IICA. Turrialba, Costa Rica. 395 p.
48. **Hernández M, Chávez M, Rodríguez G, Santos R, González J, Carvajal C. 1997.** Proceso de obtención de Bromelina a partir de Tallo de Piña Patente cubana C12N 9/50.
50. **Hartman, H. T., Kester, D. E., Davies, Jr., F. T and Geneve, R. L., 1997.** Plant Propagation: Principles and Practices 6th. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 770p.
51. **Hertog, M.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D.** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. Lancet 1993, 342, 1007-1011. [ChemPort] [Medline] [CrossRef]
52. **Hutchinson JF 1995** Tissue culture: propagation of fruit trees. *In: Proc. COSTED symp. In: Tissue Culture of Economically Important Plants.* Rao A.N. (Ed.), Singapore, pp.113-120, 1981.
53. **ICCO Base estadística (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION). 2009.** Disponible en: http://www.icco.org/about/press2.aspx?Id=b3e12024_visitado en Junio del 2009
54. **ITC. 2001.** Cocoa; A Guide to Trade Practices. International Trade Centre. Product and Market Development. Geneva. 180 p
55. **Jalal M. A. F y Collin H. A** Secondary Metabolism in Tissues Culture of *Theobroma Cacao* *New Pathologist* Volume 83 Issue 2. Pages 343-349 Published online 2 May 2006
56. **Janick, J. y Whipkey, A.** Axillary proliferation of shoots from cotyledonary nodal tissue of cocoa. *Revista Theobroma.* 1985, vol. 15, no. 2, p. 125-131.
57. **Jiménez, E. A. 1998** Cultivo de Ápices y Meristemas. En: Perez-Ponce, J.N. (ed), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas, Santa Clara, Cuba. Pp.45-56
58. **Jiménez. V. M., Castillo, J., Tavares, E., Guevara, E., Montiel, M. 2006** *In Vitro* propagation of the neotropical giant bamboo. *Guadua angustifolia* Kunth, through auxiliary shoot proliferation. *Plant cell Tiss. Organ Cult.* 86: 389-395
59. **Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P.F.; Donoghue, M. J. 2002.** "Secondary Plant Compounds". *Plant systematics: a phylogenetic approach, Second Edition.* Sinauer Assoc, USA. Capítulo 4; "Structural and Biochemical Characters".

- 60. karam, N-S; Jawad, F-M; Arikat, N-S; Shibli, R-A. 2003.** Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root culture of wild *Salvia fruticosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 73: 117-121.
- 61. Kim, Y; Wyslouzil, B-E; Weathers, P-J 2001** A comparative study of mist and bubble column reaction in the in vitro production of artemisinin. *Plant Cell Rep.* 20:451-455.
- 62. Kolozasarvari, J. N., Sule, S., Sampaio, J. P., 2005.** Apple tissue culture contamination by RHODOTORULA SPP.: Identification and prevention. *In vitro Cel. Dev. Biol. Plant* 41: 520-524.
- 63. Krenn. L., P. Armin, P. Riddhi, B. Beate, P. Dietrich, M. K. Klaus, K. Brigitte. 2003.** Sulfemodin 8-O- β -D-Glucoside, a New Sulfated Anthraquinone Glycoside, and Antioxidant Phenolic Compounds from *Rheum emodi*. *J.Nat. Prod.* 66: 1107-1109.
- 64. Kris-Etherton, P.M y Keen, C.L** Evidence that the antioxidant flavonoids in human health? *Food Research International*. 2002, vol. 33 no. 6, p. 449-459.
- 65. León, J. 2000.** *Botánica de los Cultivos Tropicales*. Tercera edición. Costa Rica, San José, IICA. 678p.
- 66. Levin, DA. 1976.** "The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores". *Ann Rev. Ecol. Syst.* 7: 121-159.
- 67. Lincoln T. y Zeiger E.** "Secondary Metabolites and Plant Defense". En: *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Inc. 2006. Capítulo 13.
- 68. Li, Z; Abdoulaye, T; Maximova, S; Guiltinan, M. 1998.** Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Floral Explants of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Using Thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 34: 293-299.
- 69. Looney, M. B., Ellis. B. E. 2000.** *The Phytochemical World. An Introduction to Plant Secondary Metabolism*. M.Sc. thesis project. Department of Plant Science at the University of British Columbia. pp. 22.
- 70. Lopez-Báez, O.; Esponda, G.; Hernandez, V.; Fraire, V.; Evans, H.; Fontanel, A. 1997.** Progresos Recientes en el Clonamiento de Cacao. *Actas del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria*. Venezuela. Maracay. p 15-16.
- 71. López-Báez, O; Bollon, H; Eskes, A; Pétiard, V. 1993.** Embryogenèse Somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à partir de Pièces Florales. *Compte- Rendus de L'Académie de Sciences Paris* 316: 579-584.

- 72. López-Báez, O.; Moreno, J.L.; Pacheco, S.** avances en propagación de cacao *Theobroma cacao* por embriogénesis somática en México. En: Proceeding of the Internacional Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Kota Kinabalu, Malaysia. 2001, p. 163-177
- 73. Lu, M-B; Wong, H-L; Teng, W-L. 2001.** Efectos of elicitation on the production of saponin in cell culture of panax ginseng. *Plant cell Rep.* 20:674-677.
- 73. Manojlovic. N.T., S. Solujic, S. Sukdolak, M. Milosev. 2005.** Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia.* 76: 244-246.
- 74. Márquez, J. J y Aguirre, M. B.** Manual Técnico de cosecha y beneficio del cacao. Unidad de Impresiones Gráficas del MINREX. Ciudad de la Habana. Cuba. 2003, 59p.
- 75. Massot, B; Milesi, S; Gontier, E Bourgaud, F; Guckert, A. 2002.** Optimizad culture conditions for production of furanocumarins by micropropagated shorts of *Ruta graveolens*. *Plant cell, tiss. Org. Cult.* 6281) 11-19.
- 76. Mejía L. y Palencia G. 2000.** Manejo Integrado del Cultivo de Cacao. Primera Edición. Bucaramanga. CO. Litografía y Tipografía La Bastilla Ltda. 24 p.
- 77. Menéndez, M. ; lambertte, W.** Columbié, A Selección de clones de *Theobroma cacao* L. con alto potencial productivo y de calidad industrial. *Café y cacao.* 2002, vol. 3. no 1, p. 64-66.
- 78. Meyer, J-E; Pépin, M-F; smith, M-A. L. 2002** Anthocyanin production from *Vaccinium pahalae*: limitations of the physical microenvironment. *Journal of Biotechnology.* 93(1): 45-57.
- 79. Mohd. Zin Z., A. Abdul Hamid, A. Osman, N. Saari. 2004.** Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) *Food Chemistry.* 94: 169-178.
- 80. Moreno, L.; Cadavid, S.; Cubillos, G.; Sánchez, J. 1983.** Manual para el Cultivo del Cacao. Compañía Nacional de Chocolates. Colombia. 151 p.
- 81. Morimoto. M, K. Tanimoto, A. Sakatani, K. Komai. 2002.** Antifeedant activity of anthraquinone aldehyde in *Galium aparine* L. against *Spodoptera litura* F. *Phytochemistry.* 60: 163-166.
- 82. Mossu, G. 1990.** Le cacaoyer. Le Technicien d'agriculture Tropicale. Editions Maisonneuve et Larose. 159 p

- 83. Motamayor J.C., Risterucci A.M, Lopez P.A., Ortiz C.F., Moreon A., Lanaud C. 2002.** "Cacao domestication I: The Origin of the cacao cultivated by the Mayas", *Heredity* 89: 380-386.
- 84. Motamayor J.C., Risterucci A.M, Heath M. and Lanaud C.** Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar *Heredity* (2003) 91, 322–330
- 85. Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Loor R, Kuhn DN, J.Steven Brown, Raymond J. Schnell. 2008.** Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE* 3(10): e3311. doi:10.1371/journal.pone.0003311
- 86. Mulabagal, V; Tsay, H-s. 2004.** Plant Cell Cultures – An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering.* 2 (1): 29-48.
- 87. Munshi, M. K., Roy P.K., Kabir M.H. and Ahmed G.** *In vitro* Regeneration of Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. Capitata) through Hypocotyl and Cotyledon Culture *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 17(2): 131-136, 2007 (December) *Institute of Food and Radiation Biology, Atomic Energy Research Establishment, G.P.O. Box-3787, Dhaka-1000, Bangladesh*
- 88. Murthy, B.N.S.; Murch, S.J.; Saxena, P.** Thidiazuron: a potent regulador of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro cell Dev. Biol.plant.* 1998, Vol. 34, no 6, p. 267-275.
- 89. Narendra, P., A. Gupta, A. Sinka, P. Ahuja. 2005.** High-Performance thin layer chromatography method for quantitative determination of four major anthraquinone derivatives in *Rehum emodi*. *Journal of Chromatography A.* 1077(2): 202-206.
- 90. Niemenak, N.; Saare-Surminski, K.; Rohsius, Ch.; Ndoumou, D.O. Lieberei, R. 2007.** Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant cell Report.*
- 91. Nosti, J.** cacao y café. 2ed. La habana. Instituto del Libro 1970, p. 13-15.
- Odutayo O. I, Amusa N.A, Okutade O.O, y Ogunsanwo Y.R. 2007,** Determination of the sources of Microbial Contaminants of Cultures Plant Tissues. *Plant Patology Journal* 6 (1): 77-81

- 92. Oksman-Caldentey, K.M; Inzé, D. 2004.** Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*. 9 (9):433-440.
- 93. Osman, H., Nazaruddin, R., Lee, S.L., 2004.** Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chem*. 86, 41–45.
- 94. Pearson, D.A. ; Paglieroni, T.G. ; Rein, D.; Wun,T.; Schramm,D.D. ; Wang, j.F. ; Holt, R.R. ; Gosselin, R. ; Schmitz, H.H. ; Keen, C.L.** The effect of flavanol-rich cocoa and aspirin on *ex vitro* plantlet function. *Thrombosis Research*. 2002, no. 106, p. 191-197.
- 95. Pratt, D. E., B. Hudson. 1992.** Natural oxidants not exploited commercially. *Food Antioxidants*. pp. 171-192.
- 96. Rein, D.; Paglieroni, T. G.; Wun, T.; Pearson, D. A.; Schmitz, H. H.; Gosselin, R.; Keen, C. L.** Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 72, 30-35. [ChemPort] [Medline]
- 97. Rowan, A. 1998.** Stem bromelain. In: Barret, Rawlings, N.; Woessner, J (eds.) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Uk: Academic Press. Pp.566-572.
- 98. Santana, N.** Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*coffeto sp.*). [Tesis de Geado]; INCA. 1993, 115p.
- 99. Sasson, A.** La Alimentación del hombre del Mañana UNESCO Editorial Reverté. S.A Barcelona, España 1993. 750p.
- 100. Sarker, R. H. Al-Amin, G.M., and Hoque, M. I.** *In vitro* Regeneration in Three Varieties of White jute (*Corchorus capsularis* L.) *Plant Breeding and Biotechnology Laboratory, Department of Botany, University of Dhaka, Dhaka-1000, Bangladesh Plant Tissue Cult. & Biotech.* 17(1): 11-18, 2007 (June)
- 101. Schijlen, E; Ric de Vos, C.H; van Tunen, arjen; Bovy, a-G. 2004.** Modification of flavinoid biosíntesis in crop culture. *Phytochemistry* 65 (19) 2631–2648.
- 102. Silva, J.J.; montes, s.; Acosta L., Áries, E.; Garcia, A.; Pupo, A.; Ramirez, V.; Camejo R. 2002.** Avances en la embrogenesis somatica de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Cuba. *Café cacao*. 3(2): 27-30
- 103. Singleton, A.; Buttle, D. 1998.** Ficain. In: Barret, A., Rawalinga, N., Wosessner, J. (eds.). *Handbook of protolytic enzyme*. Uk: Academic Press, pp 571-572

- 104. Sondahl, M.; Liu, S.; Bellato, C.; Bragin, A. 1993.** Cacao Somatic Embryogenesis. *Acta Horticulturae* 336: 245- 248.
- 105. Sondahl, M.R; Liu, S.; Bellato, C.; Bragin, A.** Recent advances in cacao micropropagation through the production of somatic embryos from non sexual tissues. The Scientific Research Council. Jamaica. 1994, p. 79-84.
- 106. Soto, J.; Herrera, S. 1985.** Propagación. In. SARH. Manual sobre el Cultivo del Cacao. Tapachula, Chiapas, México. p 38-49.
- 106. Swain, T (editor). 1973.** *Chemistry in evolution and systematics*. Butterworth, Londres.
- 107. Tan, C.L. y Furtek, D, B.** Development o fan *in Vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissue. *Plant Sciences*. 2003, no, 164, p. 407-412.
- 108. Toxopeus, H. 1985.** Botany, Types and Population, in Cocoa. London. Longman. p 11-37.
- 109. Trease, G. E., Evans, W. Ch. 1996.** *Pharmacognosy*. 14^a Edición. Edit Interamericana. México.
- 110. Urquhart, D.H.** El cacao. En: Edición Revolucionario La habana. Cuba 1963, 230p.
- 111. Vanisree, M., L. Chen-Yue, L. Shu-Fung, N. Satish, L. Chien, T. Hsin-. 2004.** Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 1-22.
- 112. Verpoorte, R., R. van der Heijden, H. J. G. ten Hoopen, J. Memelink. 2000.** Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res.* 9: 323-343.
- 113. Verstraeten, S.V.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.;Fraga, C.G.; Oteiza, P.I.** Flavan-3ols and procyanidins Project liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free radicals biology and Medicine*, 2003, no. 34,, p. 84-92
- 114. Vera, J. 1987.** Material de Siembra y Propagación. In Suarez, C. ed. Manual del Cultivo del Cacao. Programa Nacional del Cacao. Quevedo, INIAP. p 16-26.
- 115. Vos J. G. M., Ritchie J. B., Flood J., R. 2003** Discovery Learning about Cocoa CIBA Bioscience . Uk p.110. Disponible en: http://www.worldcocoafoundation.org/info-center/pdf/cabi_fr_1.pdf Visitado 19 Junio 2009

- 116. Wagner, S. & Bladt, S. (1996).** *Plant Drug analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.* 2 ed. Springer, New York.
- 117. Walgate, R.** mircale or menace?. *Biotechnology and the third World.* The panos institute London. 1990, 199p.
- 118. Wollgast, J. y Anklam, E.** Polyphenols in chocolate: is their a contribution to human health?. *Food Research International.* 2000, no. 33, p. 423-447.
- 119. Weng, W., S. Sheu. 2000.** Separation of antraquinones by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. High Resol Chromatogr* 23: 143-148.
- 120. Wong, P-L; Royce, A-J, Lee_Parsons, C-W-T. 2004.** Improved ajmalicine production and recovery from *Catharanthus roseus* suspension with increased product removal rates. *Biochemical Engineering Journal*, 21(3): 253-258
- 121. Wood, G; Lass, R. 1985.** *Cocoa*, New York, Longman Group Limited. Cuarta edición 620
- 122. Wu, J; wang, c; Mei X. 2001.** Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp cell culture by rare earth chemical lanthanum. *Journal of Biotechnology*, 85:67-73.
- 123. Young, A; Miller, C; Antunez, G; Swanson, J; Pishak, S; Maximova, S; Gultinan, M. 2003.** *Cacao Tissue Culture Protocol Book.* Versión 1.4. Pennsylvania State University. 32 p.
- 124. Zapata, J., M. Hernandez, M. Ojeda, M. Benlloch, E. Prast, M. Tena, R. Lopez, J. Jorriñ., 2000.** Toxic metals accumulation and total soluble phenolics in Sunflower and Tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 38: 178-180.
- 125. Zheng, W., S. Y. Wang. 2001.** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (11): 5165-5170.