



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

POSGRADO EN HORTICULTURA

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FENILALANINA Y TIROSINA SOBRE EL
CONTENIDO FENÓLICO EN PLÁNTULAS DE *Elettaria cardamomum*,
PROPAGADAS *In vitro*.

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

presenta:

DANIEL MENDOZA TIRZO



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
FICHA DE EXÁMENES PROFESIONALES

BAJO LA SUPERVISIÓN DE: JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O,
DOCTOR.

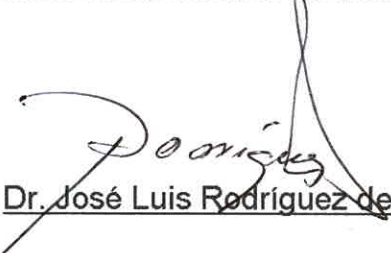


Chapingo, Texcoco, Estado de México, Junio 2019.

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FENILALANINA Y TIROSINA SOBRE EL
CONTENIDO FENÓLICO EN PLÁNTULAS DE *Elettaria cardamomum*,
PROPAGADAS *In vitro*.**

Tesis realizada por **Daniel Mendoza Tirzo** bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada y aceptada como requisito parcial, para obtener el grado
de:

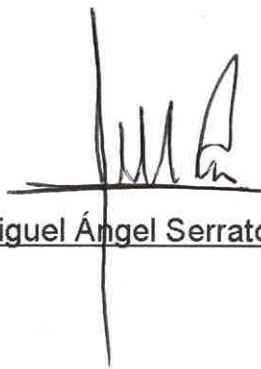
**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**



Director: Dr. José Luis Rodríguez de la O



Co-directora: Dra. Diana Guerra Ramírez



Asesor: M.C. Miguel Ángel Serrato Cruz

ÍNDICE

ÍNDICE	ii
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS	x
RESUMEN GENERAL	xi
GENERAL ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1 Plagas principales.....	16
2.2 Enfermedades principales.....	17
2.3 Producción y cosecha	17
2.4 Cultivo <i>In vitro</i>	18
2.4.1 Factores que intervienen en el cultivo de tejidos.....	19
2.4.2 Fases del medio de cultivo.....	23
2.5 Antecedentes de trabajo <i>In vitro</i>	24
2.6 Ruta de biosíntesis de los metabolitos secundarios.....	25
2.7 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	25
2.7.1 Compuestos fenólicos.....	25
2.7.2 Flavonoides	26
2.7.3 Determinación de la capacidad antioxidante	28
2.8 REFERENCIAS	30
III. PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN <i>In vitro</i> DE CARDAMOMO (<i>Elettaria cardamomum</i>).....	33
RESUMEN.....	33
ABSTRACT	34
3.1 INTRODUCCIÓN.....	35
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.2.1 Ubicación del experimento.....	37
3.2.2 Fuente de explantes	37

3.2.3 Medio de cultivo	37
3.2.4 Fase de multiplicación	37
3.2.5 Análisis estadístico	38
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.3.1 Altura de explantes	39
3.3.2 Desarrollo de hojas	41
3.3.3 Desarrollo de brotes.....	43
3.3.4 Formación de Raíz.....	45
3.4 CONCLUSIÓN.....	48
3.5 REFERENCIA	49
IV. EFECTO DEL USO DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE PLANTULAS DE CARDAMOMO (<i>Elettaria cardamomum</i>).....	51
RESUMEN.....	51
ABSTRACT	52
4.1 INTRODUCCIÓN.....	53
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	54
4.2.1 Tratamientos de micropropagación	54
4.3 Propiedades antioxidantes	55
4.3.1 Reactivos e instrumentación	55
4.3.2 Preparación de extractos	55
4.3.3 Contenido fenólico total (CFT)	55
4.3.4 Flavonoides totales (FT)	56
4.4 Capacidad antioxidante.....	56
4.4.1 Ensayo ABTS	56
4.4.2 Ensayo DPPH.....	57
4.4.3 Ensayo FRAP	57
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
4.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.7 CONCLUSIÓN.....	66
4.7 REFERENCIAS	67
4.8 ANEXOS	70

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Reguladores de Crecimiento Vegetal en mg. L ⁻¹	37
Cuadro 2. Resultados de las variables: Altura de los brotes, número de hojas, número de brotes y número de raíces.....	39
Cuadro 3. Distribución de los aminoácidos en mg L ⁻¹	54
Cuadro 4. Contenido fenólico total (CFT), flavonoides totales (FT), capacidad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP), de plántulas de cardamomo <i>Elettaria</i> <i>cardamomum</i>	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de los reguladores de crecimiento en brotes de cardamomo (<i>Elettaria cardamomum</i>), después de 90 días de crecimiento bajo condiciones in vitro. T1 (control), T2 (BA-AIA), T3 (2iP-ANA), T4 (KIN-AIB).	40
Figura 2. Plántulas de cardamomo (<i>Elettaria cardamomum</i>) producidas bajo condiciones in-vitro. a) T1: Control, b) T3: Plántulas con tratamiento ANA-2iP.	41
Figura 3. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la formación de hojas en plántulas de cardamomo (<i>Elettaria cardamomum</i>), a los 90 días de crecimiento bajo condiciones in vitro; (control), T2 (BA-AIA), T3 (2iP-ANA), T4 (KIN-AIB).	42
Figura 4. Formación de hojas en plántulas de cardamomo (<i>Elettaria cardamomum</i>), a los 90 días de crecimiento en condiciones in vitro, el a) T4 (KIN-AIB), b) T3 (2iP-ANA).	43
Figura 5. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes en plántulas de cardamomo (<i>Elettaria cardamomum</i>), después de 90 días de crecimiento bajo condiciones in vitro. T1 (control), T2 (BA-AIA), T3 (2iP-ANA), T4 (KIN-AIB).	44
Figura 6. El a) corresponde al T3, con bajo el efecto de ANA-2iP, con un promedio de 3.66, mientras que el b) corresponde al T3 (control), con una media de 3.33 hojas.	45
Figura 7. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes en plántulas de cardamomo (<i>Elettaria cardamomum</i>), después de 90 días de crecimiento bajo condiciones in vitro. T1 (control), T2 (BA-AIA), T3 (2iP-ANA), T4 (KIN-AIB).	46
Figura 8. El a) corresponde al T3, bajo el efecto de ANA-2iP, con un promedio de 13.6 mientras que el b) corresponde al T3 (control), con una media de 9.6 raíces.	47
Figura 9. Contenido total de fenoles y flavonoides.	62
Figura 10. Capacidad antioxidante, evaluado por los métodos (ABTS, DPPH, FRAP).	64

ABREVIATURAS

IAA	ácido indolacético
ANA	ácido naftalacetico
IBA	ácido indolbutírico
BA	benciladenina
2iP	2-isopentiladenina
KIN	kinetina
mg. L ⁻¹	miligramos por litro
CTF	contenido fenólico total
FT	fenoles totales

DEDICATORIA

Con un enorme cariño y un sincero agradecimiento, dedico este trabajo de investigación científica, a quienes me han guiado en este trayecto de vida, por ser fuente de inspiración, motivación y superación, que me han llevado a ser una persona más noble, más consiente de nuestra realidad, a todos ellos muchas gracias.

A mis padres, por darme la vida y por darme su motivación con una mirada, con una sonrisa, muchas gracias.

A mis hermanos, sobrinos y familia, que han estado conmigo en las buenas y en las malas, por encontrar las palabras correctas en el momento preciso, y por darme las fuerzas de apoyo para salir adelante, a todos ellos les quedo muy agradecido.

AGRADECIMENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante los dos años, para llevar a cabo mi maestría en Ciencias.

A la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme llevar a cabo mi maestría en Ciencias y desarrollar mi investigación, en esta máxima casa de estudios.

Al Doctor José Luis Rodríguez de la O, por ser un gran profesor, pero sobre todo un excelente ser humano y por el apoyo en el uso del laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales, y por el conocimiento que adquirí, sé que serán muy útiles en mi vida profesional y por sus importantes aportaciones en este trabajo de investigación.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez, por ser una persona extraordinaria, una excelente maestra, por brindarme todo su apoyo y confianza en la elaboración en este trabajo, por sus grandes e importantes aportaciones, por sus enseñanzas y por creer en mí persona.

Al Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz por su orientación, asesoría y dedicación en este trabajo de investigación, sobre todo por su amistad y su colaboración en la redacción de este trabajo.

A la M en C. Guillermina Hernández Rodríguez por su gran ayuda, apoyo, dedicación y orientación en este trabajo, sobre todo por ser una gran amiga y un excelente ser humano.

Al Dr. Benito Reyes Trejo por haberme permitido hacer uso del Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola, por su amabilidad y por su apoyo.

A la Dra. Irma Salgado por sus consejos, asesorías que me brindo durante la investigación, por ser una gran persona.

A mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

A mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Daniel Mendoza Tirzo

Fecha de nacimiento: 10 de octubre de 1993

Lugar de nacimiento: Hueytlalpan, Puebla

CURP: METD931010HPLNRN04

Profesión: Licenciatura en Biotecnología

Cedula Profesional: 11187254

Desarrollo académico:

Universidad Interserrana del Estado de Puebla-Ahuacatlán

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FENILALANINA Y TIROSINA SOBRE EL CONTENIDO FENÓLICO EN PLÁNTULAS DE *Elettaria cardamomum*, PROPAGADAS *In vitro*.

RESUMEN GENERAL

El cardamomo (*Elettaria cardamomum*) es una de las especias más caras del mundo, por lo que existe mucho interés en su propagación. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de propagación *in vitro* de cardamomo y evaluar el efecto de la adición de la fenilalanina y tirosina sobre sus propiedades antioxidantes. Como fuente de explantes se utilizaron yemas axilares, obtenidas de plantas germinadas *in vitro*, cada yema axilar fue micropropagada en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) al 100%, adicionando diferentes combinaciones y concentraciones de las auxinas, ácido indolacético (AIA), ácido naftalacetico (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y citocininas, benciladenina (BA), 2-isopentiladenina (2iP), kinetina (KIN). Después de establecer el protocolo de micropropagación de cardamomo, el mejor tratamiento fue seleccionado para evaluar el efecto de los aminoácidos (fenilalanina y tirosina) para obtener plántulas con altas concentraciones de compuestos fenólicos, con capacidades antioxidantes. Para el protocolo de micropropagación, la mejor combinación de los reguladores fue ANA y 2iP a concentraciones de 0.3 y 3.0 mg. L⁻¹, respectivamente. La máxima concentración de compuestos fenólicos (4.05±0.46 mg EAG g_{bs}⁻¹), se presentó cuando se adicionaron 160 y 80 mg.L⁻¹ de fenilalanina y tirosina, respectivamente. La máxima concentración de flavonoides (1.96±0.58 mg EC g_{bs}⁻¹) se obtuvo cuando se adicionaron 80 mg.L⁻¹ de cada uno de los aminoácidos. La máxima capacidad antioxidante se presentó en las plántulas con mayor concentración de flavonoides, observándose una misma tendencia por los tres métodos ensayados. Con base en los resultados, la fenilalanina y tirosina promueven la biosíntesis de compuestos fenólicos en las plántulas de cardamomo, lo cual podría garantizar su futura aclimatación.

Palabras clave: aminoácidos, *in vitro*, RCV.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Daniel Mendoza Tirzo.

Director de Tesis: Dr. José Luis Rodríguez de la O.

**EFFECT OF THE ADDITION OF PHENYLALANINE AND TYROSINE ON
THE PHENOLIC CONTENT IN *Elettaria cardamomum* PLANT,
PROPAGATED *In vitro*.**

GENERAL ABSTRACT

Cardamom (*Elettaria cardamomum*) is one of the most expensive spices in the world, so there is a wide interest in its spread. The objective of this work was to establish a protocol of propagation of cardamomum *in vitro* and to evaluate the effect of the addition of phenylalanine and tyrosine on its antioxidant properties. Axillary buds, obtained from *in vitro* germinated plants, were used as source of explants, each axillary bud was micropropagated in the culture medium of Murashige and Skoog (1962) at 100%, adding different combinations and concentrations of the auxins, indoleacetic acid (AIA), naphthalacetic acid (ANA), indolebutyric acid (AIB) and cytokinins, benzyladenine (BA), 2-isopentyladenine (2iP), kinetin (KIN). After establishing the cardamom micropropagation protocol, the best treatment was selected to evaluate the effect of amino acids (phenylalanine and tyrosine) to obtain seedlings with high concentrations of phenolic compounds. For the micropropagation protocol, the best combination of the regulators was ANA and 2iP at concentrations of 0.3 and 3.0 mg. L⁻¹, respectively. The maximum concentration of phenolic compounds (4.05±0.46 mg EAG g_{bs}⁻¹) occurred when 160 and 80 mg.L⁻¹ of phenylalanine and tyrosine were added, respectively. The maximum concentration of flavonoids (1.96±0.58 mg EC g_{bs}⁻¹) was obtained when 80 mg.L⁻¹ of each of the amino acids was added. The maximum antioxidant capacity was found in the seedlings with the highest concentration of flavonoids, observing the same tendency for the three tested methods. Based on the results Phenylalanine and tyrosine promote the biosynthesis of phenolic compounds in cardamom seedlings, which may guarantee their future acclimatization.

Keywords: amino acids, *in vitro*, PGR.

I. INTRODUCCIÓN

El cardamomo (*Elettaria cardamomum*), especia que ocupa el tercer lugar dentro de las más caras del mundo, ha tomado su importancia por los usos que puede tener a nivel industrial y farmacéutica. Debido a que posee compuestos volátiles que se encuentran presentes en las semillas, como; el acetato de α -terpenilo, 1,8-cineol, α -terpinilo, limoneno, sabineno y pineno, entre otros (HUANG *et al.*, 2000; Villada *et al.*, 2017).

Sin embargo, esta especie enfrenta problemas de germinación, que dificultan la micropropagación masiva para su siembra, trayendo pérdidas económicas y de tiempo a los agricultores. Cuando las semillas de cardamomo recién cosechadas se hacen germinar, se obtiene un 72% de germinación, pero a los 15 y 90 días después de su cosecha, la germinación alcanza un 36% y un 42%, respectivamente (Ruano, 2002).

Dada la gran importancia económica que representa este cultivo a nivel mundial, es necesario explorar otros métodos de propagación masiva, que garanticen una mayor producción con calidad fitosanitaria y genética. Una de las herramientas biotecnológicas es la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En México, el estado de Chiapas fue el primer estado donde se introdujo el cardamomo, en el año 2005, principalmente en cuatro regiones; Soconusco, Sierra, Norte y Selva, por sus condiciones ambientales, que favorecen el crecimiento y desarrollo, sin embargo, este proyecto impulsado por el gobierno del estado fracasó, por el desinterés de los agricultores (SAGARPA, 2013).

Por otro lado, el creciente interés por el estudio de sustancias de origen natural, como los metabolitos secundarios, han llamado la atención de las industrias de alimentos, farmacéutica y cosméticos. Como una alternativa de reemplazo de sustancias sintéticas utilizadas actualmente, por su capacidad antioxidante que tienen las plantas, de inhibir o retardar los procesos de oxidación.

Con en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos: determinar el protocolo para la micropropagación de cardamomo variando las

concentraciones y reguladores de crecimiento, para obtener plántulas con características morfológicas que garanticen su adaptación y evaluar el efecto de la adición de aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina, sobre el contenido fenólico y capacidad antioxidante de las plántulas de cardamomo, para mejorar su defensa, ante los factores bióticos y abióticos, durante su aclimatación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del Cardamomo (*Elettaria Cardamomum*)

Es una planta perenne perteneciente a la familia de la Zingiberacea, originaria de los bosques de la India meridional (Villada et al, 2017), su clasificación taxonómica, según Luttman (1985), se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del *Elettaria cardamomum*.

Subreino	Embryobionta
División	Magnoliophyta
Orden	Zingiberales
Familia	Zingiberaceae
Género	Elettaria
Especie	Cardamomum

Las características siguientes, fueron descritas por Luttman, (1985). La planta posee rizomas carnosos de forma irregular. De éstos se originan las raíces, las cuales pueden medir hasta 150 cm de largo por 0.5 cm o menos de ancho. Las raíces se ramifican y ejercen funciones de soporte, además de funciones nutricionales. Los tallos son cañas erectas envueltas por vainas de hojas con altura entre 2 y 5 metros, diámetros de 3 a 5 cm y posee 15 a 20 hojas por tallo. Las hojas son lanceoladas y alternas con 0.60 a 1.0 metros de largo y de 15 a 20 cm de ancho. El haz es de color verde oscuro y el envés verde claro, los tallos tienen un crecimiento vertical y los tallos florales crecen en forma horizontal. Los tallos florales pueden medir desde 80 a 150 cm de largo y 1 cm de ancho, según variedad.

Las flores miden 3.5 a 4 cm de largo y 2 cm de ancho, son zoomórficas protegidas con brácteas foliares. El fruto es una cápsula trilocular dehiscente, con forma ovoidea base redonda y ápice agudo de 10 a 20 mm de largo y 5 a 10 mm de ancho, de color verde pálido a verde amarillento. Cada lóculo del fruto tiene de 5 a 7 semillas que miden entre 3 a 4 mm de largo, duras y angulosas con membrana incolora, delgada y mucilaginosas.

El cardamomo se adapta en climas cálidos, propio de selvas húmedas y lluviosas (Espín, 2010). Con una temperatura anual entre 22 a 28 grados, con alturas mayores de 400 a 1100 msnm. El cardamomo, tiene gran similitud con los requerimientos agroclimáticos del café, por ello este cultivo tiende a sustituirlo al poseer un mayor valor agregado. De acuerdo con Mejía (2016), este cultivo no sólo se podría adaptar en el estado de Chiapas, sino que es factible su producción en la Sierra Norte del Estado de Puebla, por las condiciones climáticas favorables.

Según Ruano (2000), recomienda las siguientes observaciones, para obtener una buena producción y rendimiento se debe establecer el cultivo bajo sombra temporal, durante dos años, con un control de malezas, una fertilización adecuada con nitrógeno, fósforo y potasio, que requiere la planta en mayor proporción considerando su desarrollo vegetativo, su sistema radicular y su tipo de producción.

2.1 Plagas principales

Las plagas principales que atacan al cultivo de cardamomo, afectando su crecimiento, desarrollo y producción se describen a continuación con base en lo reportado por Ruano (2000).

Picudo del cardamomo: esta plaga es de importancia económica, cuando no existe un control preventivo adecuado, por el uso de un agente químico es necesario estimar el daño, debido a que la polinización es cruzada por medio de insectos, el cual pueden ser eliminados fácilmente con la aplicación de insecticidas, afectando drásticamente la producción.

Nematodos: causan lesiones en el tejido celular, lo cual constituye la entrada de patógenos principalmente hongos causantes de pudriciones, por la infección de los nematodos, promoviendo la formación de hojas amarillas y pérdida de lustre natural, además de promover el desarrollo anormalmente de los brotes y un crecimiento lento.

Barrenador del tallo: es una larva que barrena el tallo, lo cual expone el tejido a la infección de patógenos, principalmente hongos. Los insecticidas sistémicos pueden ser funcionales, pero sus efectos limitan el rendimiento del cultivo.

2.2 Enfermedades principales

Cercóspora: enfermedad fungosa cuya incidencia se observa principalmente en el área foliar de las plantaciones de cardamomo expuestas al sol. Se propaga por medio de esporas transportadas por el viento. Los indicios son puntos rojizos que aumentan de tamaño conforme transcurre el tiempo en función de las condiciones ambientales prevalecientes, estas manchas llegan a cubrir totalmente la hoja, lo cual limita el proceso fotosintético debido a la reducción del área foliar vital.

Pudrición de rizomas y base de tallos: esta enfermedad ha adquirido alta importancia en los últimos años y se caracteriza porque inicialmente se secan las hojas y los tallos, posteriormente se pudren los rizomas y el sistema radicular, causando fuertes reducciones en la densidad de población y por ende en la producción de frutos.

Mosaico (Virus del cardamomo): las plantas adultas infectadas no aparentan estar enfermas, pues mantienen su desarrollo y producción, sin embargo, en los siguientes años los brotes nuevos ya no desarrollan normalmente, la producción se reduce cada año y el fruto se torna amarillento. El virus infecta plantas de toda edad causando que las hojas se rizan y los tallos se doblan hacia abajo.

2.3 Producción y cosecha

La producción inicial de semillas ocurre a los 3 años del establecimiento, sin embargo, al inicio la cantidad de semillas es baja, pero se incrementa conforme el tiempo, en función del manejo agronómico. La cosecha inicia en los meses de junio y finaliza entre marzo y abril. La forma de cosecha es escalonada debido a que el desarrollo de las flores ubicadas alternadamente en el tallo floral es heterogéneo, primero desarrollan las flores de la base y gradualmente van desarrollando las otras hasta llegar al ápice del tallo floral. Por tal razón los

primeros frutos cortados son los de la base y por último se cortan los del ápice del tallo floral.

2.4 Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, es una técnica que sobresale en la Biotecnología Agrícola, por sus amplias aplicaciones en la agricultura moderna, pudiendo solucionar muchos problemas relacionados al campo. La definición de cultivo de tejidos (micropropagación), o propagación *in vitro* (del latín en vidrio), se le conoce así, debido a que se cultiva dentro de un recipiente de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inoculo con potencialidad de diferenciación en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas (Abdelnour y Vincent, 1994). Además, permite obtener plantas libres de enfermedades y acelerar el tiempo de propagación (Rebolledo *et al.* 2006). Por lo tanto, el cultivo *in vitro*, permite establecer las condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de un fragmento de tejido u órgano vegetal denominado explante (Calva y Pérez, 2005). La vía de reproducción es asexual, por lo que todos los descendientes de la planta madre propagada *in vitro* son clones, es decir, son copias genéticamente idénticas a la planta madre (Abdelnour y Vincent, 1994).

La obtención de una planta completa a partir de un tejido vegetal (yema axilar, tallo, hoja, meristemos), se debe al principio de la totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, por lo tanto, tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul, 2000), por medio de la división y diferenciación celular.

Con este sistema de propagación masiva, se ha logrado un éxito para la obtención de especies de alto valor económico, como los ornamentales, cultivos hortícolas y frutales (Rosa *et al.*, 2012).

La técnica de propagación *in vitro*, se ha convertido en una herramienta útil, entre ellos destaca la propagación masiva de plantas de interés económico o alimenticio, farmacológico, plantas en peligro de extinción, protegidas, mejoramiento genético, obtención de plantas libres de bacterias y virus, bancos

de germoplasma, biosíntesis de metabolitos, investigación en áreas de genética, fisiología y bioquímica (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Calva y Pérez, 2005)

El cardamomo ha mostrado importantes ventajas en comparación con la propagación convencional, entre los que destaca, según Villalobos y Thorpe (1993).

- a) Reducción del tiempo de crecimiento.
- b) Obtención en grandes cantidades de plantas en una superficie reducida.
- c) Mayor control sanitario del material que se propaga.
- d) Facilidad de transporte del material vegetal de un país a otro con menos restricciones aduaneras.
- e) Mayor garantía para multiplicación de variedades con pocos ejemplares.

2.4.1 Factores que intervienen en el cultivo de tejidos

Según Villalobos y Thorpe (1993), los factores físicos más importantes, que aseguran el crecimiento y desarrollo del explante, se enlistan a continuación.

- a) La forma física del medio
- b) Humedad
- c) Los gases
- d) Condiciones de luz
- e) El pH
- f) Fuente de carbono
- g) Reguladores de crecimiento vegetal
- h) Vitaminas y aminoácidos
- i) Agente gelificante (Agar)
- j) Sustancias antioxidantes

El medio consiste de una mezcla de sustancias sobre el cual crecen los explantes, con una dieta equilibrada de nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal, que permiten el desarrollo y diferenciación celular. El medio de cultivo, primero se esteriliza en una autoclave o por filtración a través del papel filtro (Abdelnour y Vincent, 1994).

El medio de cultivo debe contener sales inorgánicas, ricas en nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca), magnesio (Mg) y hierro (Fe), además, de elementos que se requieren en cantidades pequeñas como: boro (B), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), cobalto (Co), zinc (Zn), cobre (Cu), cloro (Cl) y yodo (I) (Abdelnour y Vincent, 1994).

La humedad, juega un papel importante en estas condiciones, representando el 100% dentro de los frascos. Por ello las plantas en general no desarrollan adecuados sistemas de regulación hídrica tales como; cera, estomas, cutícula, (Abdelnour y Vincent, 1994).

El intercambio gaseoso según Abdelnour y Vincent (1994), ocurre dentro de los frascos de cultivo, los gases que se ha detectado en este intercambio: O_2 (oxígeno), CO_2 (dióxido de carbono), y C_2H_4 (etileno). Así como; etano, etanol y acetaldehído, estos últimos influyen y controlan el crecimiento, además de afectar procesos de diferenciación y morfogénesis celular (Thomas y Murashige, 1979; Righetti *et al.*, 1990).

La luz juega un papel importante en la fotosíntesis, para proveer energía de la luz solar y transformarla en energía química almacenada en forma de carbohidratos y otras moléculas orgánicas (Karp, 2010). En condiciones *in vitro* la intensidad de la luz es muy baja (10 W/M^2 comparado con las condiciones naturales donde la luz representa hasta 900 W/M^2). Cuando la calidad de luz es baja se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de ondas, dado que el espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros (Abdelnour y Vincent, 1994.)

El pH, se refiere al grado de acidez o alcalinidad del medio de cultivo, esto es importante y específico para cada tipo de planta, por lo que es necesario y recomendable ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio. Sin embargo, el pH adecuado estará en el rango de 4.5 a 7 para las plantas (Abdelnour y Vincent, 1994).

Las plantas *in vitro* no son autótrofas, por lo que se le suministra una fuente de carbono, como los azúcares, que proveen de elementos esenciales: hidrógeno (H), carbono (C) y oxígeno (O) (Abdelnour y Vincent, 1994). En un porcentaje de 2 a 5%, pudiendo reemplazarse por glucosa y fructuosa, así como la

incorporación de mio-inositol al medio (100 mg/L), dando un mejor resultado en la formación de callos y suspensiones de células (Mroginski y Roca, 1993). Los azúcares son productos de la fotosíntesis; proceso en el que la energía de la luz solar se transforma en energía química y se almacena en carbohidratos y otras moléculas orgánicas (Karp, 2011).

Los reguladores de crecimiento vegetal están presentes en las plantas en bajas cantidades, con diferentes actividades para las respuestas morfogénicas (Jordán y Casaretto, 2006), su función es regular las respuestas de crecimiento y desarrollo durante la ontogenia de las plantas. Los principales reguladores son las auxinas y citocininas, que intervienen en la elongación, división celular, formación de brotes, raíces y la germinación de semillas (Abdelnour y Vincent, 1994).

Las auxinas son un grupo de hormonas naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas. Las formas predominantes en las plantas son el ácido indolacético (IAA), ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-IAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA), ácido indol propiónico, ácido naftalacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y picloram (Jordán y Casaretto, 2006). Estas se encuentran presentes en todos los tejidos de la planta, aunque la mayor concentración ocurre en regiones de crecimiento activo, principalmente en meristemos apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo (Jordán y Casaretto, 2006).

Se sabe que las plantas tienen varias rutas para sintetizar IAA, ninguna de estas rutas ha sido definida al detalle, tampoco se conocen las enzimas e intermediarios que participan, aunque de manera general las plantas usan dos rutas biosintéticas para producir IAA, una dependiente del triptófano (Trp) y otra independiente de él, siendo la primera la más importante y de la que se tiene más información (Jordán y Casaretto, 2006).

Las citocininas promueven la división celular y son esenciales en varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas, así como el modo de acción de varios genes (Jordán y Casaretto, 2006). Los más representativos

encontramos a; bencilaminopurina (BA), kinetina, zeatina, giberelinas y al ácido abscísico en algunos casos (Abdelnour y Vincent, 1994).

Las citocininas naturales se generan a partir del pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), por la vía del ácido mevalónico y del adenosin monofosfato (5'-AMP), su síntesis ocurre principalmente en la raíz, meristemo apical y semillas inmaduras (Kakimoto, 2003).

El mecanismo de transporte de los nutrientes, es mediante sistemas conductores (floema-xilema), promoviendo la iniciación de brotes, organogénesis y androgénesis. Las citocininas causan una dominancia apical reducida o anulada, para promover la brotación y crecimiento de yemas axilares (Howell *et al.* 2003), y su presencia se considera como una posible señal vinculada con un déficit de nutrientes en el suelo.

Las vitaminas estimulan procesos específicos, la más importante es la tiamina, sin embargo, con frecuencia se utilizan la biotina, ácido nicotínico, piridoxina, pantotenato, rivo flavina, entre otras (Abdelnour y Vincent, 1994). Otros nutrientes que se añaden a los medios de cultivo, para la micropropagación *in vitro* son los aminoácidos, como la L-arginina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutámico y L-tirosina. Asimismo, se emplean compuestos orgánicos, tales como el inositol, la adenina, y los ácidos cítrico y ascórbico, para evitar la oxidación de los tejidos (Abdelnour y Vincent, 1994).

El agente gelificante, se encarga de dar rigidez al medio de cultivo, en los medios semisólidos se adiciona de 0.6 a 1.0 % de agar. Se debe considerar la pureza del agar, ya que con frecuencia existe la impureza (Mroginski y Roca, 1993). La marca comercial, junto con las concentraciones del agar puede alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Debergh, 1982).

El empleo de sustancias antioxidantes como el ácido ascórbico, la L-cisteína y la polivinilpirrolidona, puede ser de gran utilidad para el cultivo de explantes con un alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y muerte de los explantes. En estos casos también es útil usar las soluciones antioxidantes

durante la preparación del explante e incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz (Mroginski y Roca, 1993).

2.4.2 Fases del medio de cultivo

La micropropagación se compone de cuatro etapas secuenciales: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación (Bouthern y Bron, 1994). Primero, las plantas provenientes del campo, se desinfectan sistemática y externamente, con el fin de eliminar bacterias-hongos, que puedan dañar al explante e infectar al medio de cultivo. Se recomienda mantener a la planta madre (donadora de explantes), en un invernadero bajo condiciones controladas durante un período de una a tres meses, en condiciones sanitarias óptimas, con un control nutricional y riego adecuado, que permitirán un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

La multiplicación de los brotes se obtiene de los explantes de la fase anterior, los cuales originaron brotes, hojas, yemas axilares al ser expuesta en el medio de cultivo. Los nuevos brotes se deben subcultivar, mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes. Esta manipulación se realiza dentro de la campana de flujo laminar, debido a que proporciona condiciones adecuadas de asepsia, de esta forma se aumenta el número de plantas en cada subcultivo. La cantidad de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio. Ya que por la vía de la micropropagación *in vitro* permite alcanzar incrementos exponenciales, tomando en cuenta que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

El enraizamiento es un factor importante en donde se debe considerar la altura, como mínimo dos centímetros de longitud. Una vez alcanzado estas características las plántulas se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento vegetal o solo con hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde se desarrollan, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de este proceso, depende de la aclimatación.

En el momento que se extraen los explantes enraizados de los frascos, están poco adaptados para crecer dentro de un invernadero o a campo abierto, debido a que han crecido en ambientes muy húmedos con un bajo desarrollo de estomas, estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta, los cuales no son funcionales frente a descensos de la humedad relativa, por lo tanto, son demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, el crecimiento de explantes en ambientes húmedos repercute la formación de la cutícula; barrera física a base de cera que evita la pérdida de agua en la planta.

2.5 Antecedentes de trabajo *In vitro*

Se reportan trabajos, desde los años 1987, por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE, 1994), en donde se reporta el uso de medio Murashige y Skoog, suplementado con diferentes concentraciones de BA, para inducir la formación de nuevos brotes, utilizando como material vegetal el ápice vegetativo de plantas adultas. Pedro (1997), reportó el uso del medio Murashige y Skoog en concentraciones (100% y 50%), de las sales minerales. El medio MS al 50% tiene efectos positivos en la brotación, sin embargo, el medio de sales inorgánicas al 100%, fue el más apto para la propagación del jengibre. El efecto de la auxina; ácido naftalacetico (ANA) y citoquinina; bencíl adenina (BA), muestran resultados satisfactorios, sin embargo, este último mostró mayor producción de brotes a partir de callos y yemas apicales en concentraciones de 5 mg. L⁻¹. Concentraciones altas de citoquininas BA, (5 y 2 mg. L⁻¹), promueven la formación de callos y yemas apicales, mientras las auxinas (0.5 de ANA mg. L⁻¹), también se produjeron callos a partir de yemas axilares, con dosis de ANA y BA (0 a 1.0 mg. L⁻¹). Mientras que ZÚÑIGA, *et al.*, (2010) reporta el uso de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP), en las siguientes concentraciones 3, 4, 7 y 10 mg. L⁻¹, con el medio Murashige y Skoog al 100%. En otra investigación los mismos autores reportaron el uso de 1 mg. L⁻¹ de AIA con 0,7 mg. L⁻¹ de BAP, por lo tanto, con esta planta se ha trabajado muy poco con la técnica del cultivo *invitro*.

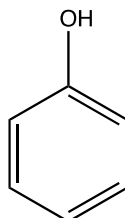
2.6 Ruta de biosíntesis de los metabolitos secundarios

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo vegetal constituye el metabolismo, en donde la mayor parte del carbono, nitrógeno y de la energía termina en moléculas, como; aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas. Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico, (Serrano y Elisa, 2007). A nivel molecular, la ruta biosintética de los flavonoides comienza con la condensación de una molécula de 4-cumaroil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA, que producen un tetracétido. El intermedio de tetracétido sufre una ciclación intramolecular, para formar naringenina-chalcona, esta reacción es catalizada por la chalcona sintasa (CHS). Durante la condensación, se produce la descarboxilación de malonil-CoA, a un carbonión acetil-CoA (Kreuzaler et al., 1978; Jaganath y Crozier, 2011), de esta forma se generan los flavonoides.

2.7 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

2.7.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático (Peñarrieta *et al.*, 2014), siendo el fenol (**1**) la molécula base. Miles de compuestos fenólicos se encuentran en las plantas y se clasifican en dos grandes grupos los flavonoides y los ácidos fenólicos. Los fenoles reaccionan con reactivos redox específicos (Folin-Ciocalteu), para formar un complejo azul que puede cuantificarse mediante espectrofotometría de luz visible. La reacción forma un cromóforo azul constituido por un complejo fosfotungstico-fosfomolibdeno (Schofield *et al.*, 2001).



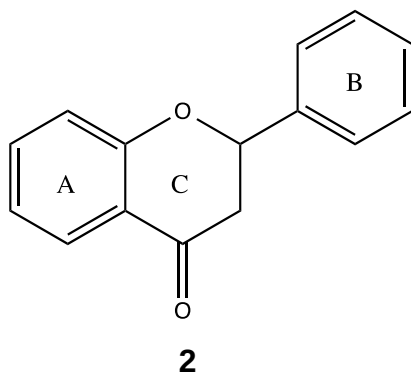
1

Los fenoles tienen la capacidad de funcionar como antioxidantes, al donar un electrón a un radical libre convirtiéndolo en una molécula inocua. Muchos

compuestos fenólicos se encuentran en plantas, frutas, hortalizas, raíces y cereales y se clasifican en diferentes grupos funcionales. Estos desempeñan un papel elemental en el metabolismo de las plantas, que se encuentran en proceso de crecimiento, reproducción, también ante los factores ambientales, como: protección contra patógenos externos, estrés, la radiación UV y los depredadores. Además de ser responsables del color y las características sensoriales de las plantas y alimentos (Peñarrieta et al., 2014). El uso de compuestos fenólicos, tiene efectos positivos en la salud humana ya que pueden ser usados como antibióticos, antiparasitarios y citotóxicos (Kozubek y Tyman, 1999).

2.7.2 Flavonoides

El término flavonoide viene del latín "flavus", que significa amarillo, debido a que muchos flavonoides purificados presentan un color amarillo (Peñarrieta et al., 2014). Son la clase más abundante de los compuestos fenólicos, derivados de aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina. El esqueleto químico está basado en compuestos de 15 carbonos (C₆-C₃-C₆), con numerosos sustituyentes. Los cuales comparten un esqueleto de carbono tipo difenil 1,3-propano con dos anillos enlazados (anillo A y B) ligados por un tercer anillo de pirano (anillo C) (**2**) (Vermerris & Nicholson, 2007; Valencia et al., 2017).



Los flavonoides, pigmentos naturales presentes en las células vegetales, protegiendo al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como: rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos (Martínez et al., 2002), distribuidos en plantas, frutas, verduras. Estas se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de luz en la fotosíntesis, durante la cual catalizan el transporte de electrones (Das, 1994).

El origen de síntesis se origina a partir de la molécula fenilalanina, junto con tres malonil-CoA. Esta reacción bioquímica que origina a los flavonoides está regulada por dos enzimas: la chalcona sintasa y chalcona flavonona isomerasa (Manach *et al.*, 2004; Limon *et al.*, 2010).

La utilidad de los flavonoides, para el ser humano, consiste en la protección por daños de tipo oxidativo, con efectos terapéuticos en patologías, abarcando la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis (Martínez *et al.*, 2002), siendo predominante la quercetina. En los alimentos, las principales fuentes de los flavonoides, son de origen vegetal, principalmente; en el té negro, las cebollas, las manzanas, la pimienta negra que contiene cerca de 4 g/kg de quercitina, y bebidas alcohólicas como vino y cerveza (Vosgen *et al.*, 1980).

La capacidad antioxidante que tienen los flavonoides ha sido reconocida en diversos estudios, debido a que son capaces de unirse a las enzimas transportadoras de hormonas y al DNA. Además, de quelar iones metálicos como; Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y eliminar los radicales libres (Javanovic *et al* 1998; Limon *et al.*, 2010).

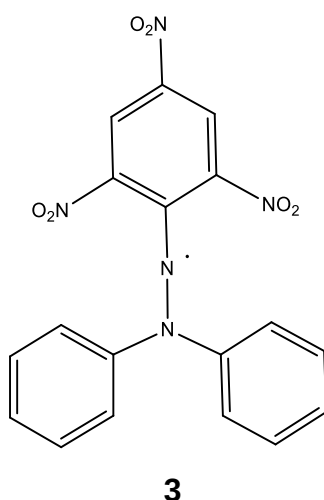
Además de su autodefensa, se han podido usar en el tratamiento de patologías como la diabetes *mellitus*, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, úlceras, y como antialérgicos, antitrombóticos y antiinflamatorios (Limon *et al.*, 2010).

Las propiedades neuroprotectoras de los flavonoides, se explican mediante dos mecanismos importantes: el estrés oxidativo y la neuroinflamación, por medio de modelos de muerte neuronal (Youdim *et al.*, 2001; Limon *et al.*, 2010). Pudiendo ser aplicado como agentes neuroprotectoras y en el tratamiento de otras enfermedades degenerativas (Luo *et al.*, 2002; Limon *et al.*, 2010).

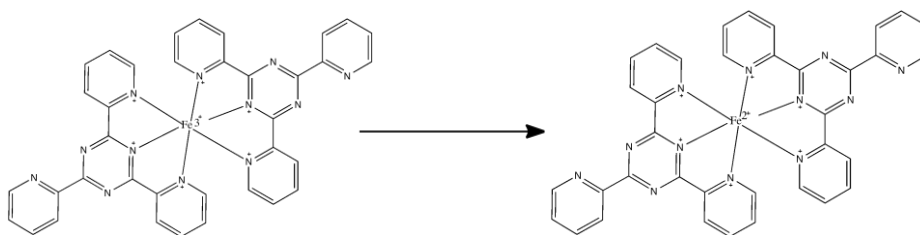
2.7.3 Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las plantas puede determinarse empleando varios métodos analíticos con diferentes mecanismos. Los ensayos utilizados con mayor frecuencia son DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (2), FRAP (poder antioxidante reductor férrico, ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina6-sulfónico), entre otros (Embuscado, 2015).

El ensayo DPPH fue propuesto originalmente por Brand-Williams, el DPPH (3) es uno de los pocos radicales nitrogenados orgánicos estables que tiene un color púrpura intenso, el ensayo consiste en medir capacidad reductora de los antioxidantes de las plantas sobre este reactivo. Este ensayo mide la pérdida de color DPPH (púrpura) a 515 nm en un espectrómetro después de la reacción con el antioxidante (Prior y Schaich, 2005: Embuscado, 2015).

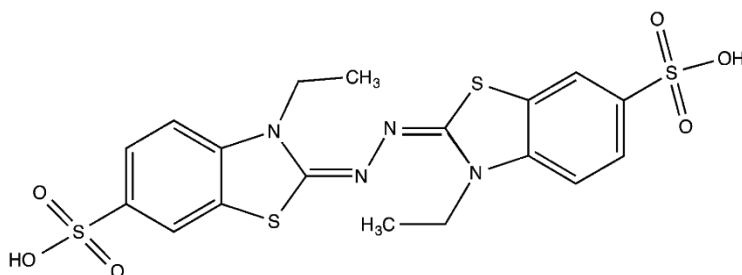


El ensayo FRAP fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain (1996), este ensayo consiste en medir la reducción del 2, 4, 6-tripiridil-triazina férrica (TPTZ) a una solución coloreada (azul) (4,5), se mide a 595 nm, pero no puede detectar compuestos que actúan mediante la extinción radical (transferencia de H), en particular tioles y proteínas (Prior y Schaich, 2005).



Se ha argumentado que la capacidad para reducir el hierro se correlaciona poco con la estabilización de radicales libres; sin embargo, la oxidación o reducción de radicales para formar iones puede detener la oxidación en cadena y por lo tanto el poder reductor reflejaría la capacidad de un compuesto para regular el estado redox del plasma o tejidos (Londoño, 2012).

El ensayo ABTS se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado $\text{ABTS}^{\bullet+}$, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico) (6) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox o TEAC (por su nombre en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Londoño 2012).



2.8 REFERENCIAS

- Abdelnour, A., & Vincent, J. (1994). CONCEPTOS BASICOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES. Aplicaciones.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- Boutherin, D., & Bron, G. (1994). Multiplicación de plantas hortícolas. ACRIBIA. Zaragoza, España. 225 p.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES: FUENTE DE ALIMENTOS PARA EL FUTURO. *Revista Digital Universitaria*, 6, 16.
- Das, D. K. (1994). Naturally Occurring Flavonoids: Structure, Chemistry, and High-performance Liquid Chromatography Methods for Separation and Characterization. *Methods in Enzymology*, 234, 410-420.
- Embuscado, M. E. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of Functional Foods*, 18, 811–819. <https://doi:10.1016/j.jff.2015.03.005>.
- Espín, (2010). Proyecto de factibilidad para la exportación de cardamomo a Egipto. Tesis profesional. Universidad Tecnológica Equinoccial. Ecuador.
- Ferl, R., Paul a. L. (2000). Genome Organization and Expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.
- Howell, S., Lall, S., & Che, P. (2003). Cytokinins and Shoot Development. *Trends in Plant Science*, 8(9), 453-459. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00191-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00191-2).
- Jaganath, I., & Crozier, A., (2011). Flavonoid Biosynthesis: Ashihara, H., Crozier, A., & Komamine, A. (WILEY), *Plant Metabolism and Biotechnology*. (pp. 293-308). Tokyo, Japan.

- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. 15, 28.
- Kakimoto, T. (2003). Perception and Signal Transduction of Cytokinins. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 605-627. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802>.
- Karp, G. (2010). *Cell Biology by Gerald Karp*. Wiley. Mc GRAW-HILL. PP: 208-225.
- Kozubek, A., & Tyman, J. H. P. (1999). Resorcinolic Lipids, the Natural Nonisoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. *Chemical Reviews*, 99(1), 1-26. <https://doi.org/10.1021/cr970464o>.
- Londoño, J. L. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *In Desarrollo y Transversalidad. Lasallista Investigación y Ciencia*. 34.
- Luttman, N. (1985). El cardamomo y su cultivo, Guatemala, Pp: 84.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., & Culebras, J. M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 8. Departamento de Fisiología, Universidad de León. Hospital de León, España.
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD. *REVISTA BOLIVIANA DE QUÍMICA*, 31, 15. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.
- Prior, R. L., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Rebolledo, v., Aparicio, A., & Cruz, H. (2006). Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana*, (8),2. Xalapa, México.
- Righetti, B., Magnanini, E., Infante, R., & Predieri, S. (1990). Ethylene, Ethanol, Acetaldehyde and Carbon Dioxide released by *Prunus Avium* Shoot cultures. *Physiologia Plantarum*, 78, 507-510. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05234.x>

- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT. Pp: 79-93.
- Rosa, M., Domínguez, M., Pérez, Martha., & Pérez, B., (2012). Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género. *Turbinicarpus* Interciencia, vol. 37, núm. 2, pp. 114-120. Caracas, Venezuela.
- Ruano, R. (2002). EL CULTIVO DE CARDAMOMO (*Elettaria cardamomun*) EN GUATEMALA. INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRICOLAS.
- Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of Condensed Tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1), 21-40. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0).
- Serrano, D., & Elisa, M. (2007). *Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38, 10.
- Thomas, D., & Murashige, T. (1979). Volatile Emissions of Plant Tissue Cultures. *In vitro*, 15(9), 659-663. <https://doi.org/10.1007/BF02618243>.
- Valencia, E., Figueroa, I., Sosa, E., Bartolomé, M., Martínez, H., & García, M. (2017). *Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas* | *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. 16, 1390-1869.
- Villada, M. E., Millán, L. de J., Peláez, C. A., Arroyave, C., González, M. I., & Gil, M. A. (2017). Caracterización del aceite microencapsulado de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) extraído por fluidos supercríticos a escala semiindustrial. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20(0). <https://doi.org/10.1590/1981-6723.09915>.
- Villalobos, A., & Thorpe T. A. 1993. Establecimiento de cultivos de Vosgen, B., Herrmann, K. (1980). Flavonol Glykoside von Pfeffer (*Piper Nigum* L.), Gewürznelken (*Syzygium aromaticum* (L.) Marr. Et Perry) und Piment (*Pimentadiaoica* (L.) Merr.). *Z Lebensm Unters Forsch*, pp: 204-207.

III. PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *In vitro* DE CARDAMOMO (*Elettaria cardamomum*).

RESUMEN

Las semillas de cardamomo se encuentran entre las especias más caras a nivel mundial. La propagación convencional del cardamomo se lleva a cabo mediante rizomas, sin embargo, las plantas son susceptibles al ataque de bacterias y hongos, por lo que el rendimiento de producción es bajo. Dentro de la biotecnología vegetal el cultivo *in vitro* de tejidos, ha resultado una técnica exitosa para propagación masiva de plantas de diferentes especies. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de propagación *in vitro* de *Elettaria cardamomum* para su producción masiva. Como fuente de explantes se utilizaron yemas axilares, provenientes de semillas germinadas *in vitro*. Los explantes se propagaron utilizando el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 100%, adicionando diferentes combinaciones y concentraciones de las auxinas, ácido indolacético (AIA), ácido naftalacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y citocininas, benciladenina (BA), 2-isopentiladenina (2iP), kinetina (KIN). Después de ocho semanas de incubación, se evaluaron las variables: altura 4.40 ± 0.42 (cm), número de hojas 17.67 ± 2.06 , raíces 13.67 ± 4.33 . De acuerdo con los resultados la mejor combinación de los reguladores de crecimiento vegetal fueron el ANA y 2iP en concentraciones de (0.3 y 3.0 mg. L⁻¹ respectivamente), mostrando las mejores características de desarrollo y crecimiento. Con los resultados, fue posible identificar a los reguladores de crecimiento, tipos y concentraciones que permitieron promover la obtención y multiplicación de plantas de cardamomo, generando así un protocolo eficiente para lograr un escalamiento de producción de plantas.

Palabras clave: RCV, *in vitro*, aminoácidos.

PROTOCOL FOR THE *In vitro* PROPAGATION OF CARDAMOM (*Elettaria cardamomum*).

ABSTRACT

Cardamom seeds are among the most expensive spices worldwide. The conventional propagation is done by rhizomes, however, the plants are susceptible to the attack of bacteria and fungi, so the production yield is low. Within Plant Biotechnology, *in vitro* tissue culture has been a successful technique for plants mass propagation of different species. The objective of this work was to establish a protocol of propagation *in vitro* of *Elettaria cardamomum* for its mass production. As source of explants, axillary buds from germinated seeds were used *in vitro*. The explants were propagated using the culture medium of Murashige and Skoog (1962) at 100%, adding different combinations and concentrations of auxins, indoleacetic acid (AIA), naphthalacetic acid (ANA), indolebutyric acid (IBA) and cytokinins, benzyladenine (BA), 2-isopentyladenine (2iP), kinetin (KIN). After eight weeks of incubation, evaluate the variables: height 4.40 ± 0.42 (cm), number of leaves 17.67 ± 2.06 , roots 13.67 ± 4.33 . According to the results the best combination of plant growth regulators is ANA and 2iP in the content of (0.3 and 3.0 mg. L⁻¹ respectively), showing the best characteristics of development and growth. With the results, it was possible to identify growth regulators, types and means that allowed to promote the obtaining and multiplication of cardamom plants, thus generating an efficient protocol to achieve an escalation of the production of plants.

Key words: PGR, *in vitro*, amino acids.

3.1 INTRODUCCIÓN

El cardamomo (*Elettaria cardamomun*), es una planta perenne perteneciente a la familia de la Zingiberaceae, originaria de los bosques de la India meridional principalmente en Sri Lanka, Malasia y Sumatra (Zúñiga *et al.*, 2010; Villada *et al.*, 2017). Este cultivo se distribuye en zonas subtropicales muy húmedas y bosque pluvial montano (Ruano, 2002), y resiste temperaturas bajas. Crece a una altura de 250 a 1,500 metros sobre el nivel del mar y una precipitación anual de 1,000 mm a 3,500 mm y una temperatura que oscila entre 10 y 35 °C (Acceso, 2011). En el continente americano, Guatemala es el principal productor y exportador a nivel mundial de esta especie (MAGA, 2014). En México—el cardamomo se está introduciendo siguiendo la ruta del café, siendo el principal productor el estado de Chiapas con una extensión de 67.5 hectáreas (Revista Vinculando, 2007).

El cardamomo se considera una de las especias más caras del mundo, ocupando el tercer lugar a nivel mundial, después de la vainilla y el azafrán (Afanador *et al.*, 2010), y de la cual sólo se usan las semillas, por su agradable sabor y aroma. Los responsables de estas características son los compuestos volátiles, como el acetato de α -terpenilo, 1,8-cineol, α -terpinilo, limoneno, sabineno y pineno, entre otros (HUANG *et al.*, 2000; Villada *et al.*, 2017). Gracias a estos compuestos, el cardamomo es carminativo, estimulante, antiespasmódico, y aromático, adquiriendo importancia en las industrias alimenticia y farmacéutica (Ríos *et al.*, 2007; Zúñigas *et al.*, 2010).

La propagación del cardamomo se puede hacer mediante dos vías (sexual y asexual), la sexual consiste en la propagación de semillas en almácigo, mientras que en la forma asexual los rizomas se propagan por esquejes. Cada uno de estos tipos de propagación, tienen ventajas y desventajas. Por la vía sexual se evita la propagación del virus del mosaico del cardamomo, sin embargo, sólo germinan el 72% de las semillas recién cosechada, un 42% a los 15 días y un 36% a los 90 días después de su cosecha (Ruano, 2002), el proceso de germinación es lento y se elevan los costos del cultivo debido a que las semillas estarían disponibles alrededor de los 4 años, después de la siembra.

La reproducción por rizomas ha sido el método más utilizado por el fácil manejo y menor costo, la productividad es menor y las plantas son más susceptibles a plagas y enfermedades (Ruano, 2002), sin embargo, la producción de semillas inicia a los 2 o 3 años, después de la siembra.

El cardamomo ha cobrado interés a nivel comercial, en el año 2012 se importaron más de 1,971 toneladas en los mercados europeos (MAGA, 2014). Dada la importancia económica que representa este cultivo a nivel mundial, el objetivo de este trabajo fue explorar nuevas vías de propagación masiva del cardamomo, que garanticen la producción con calidad fitosanitaria haciendo uso de la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, y evaluando el comportamiento de los reguladores de crecimiento vegetal.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Ubicación del experimento

La propagación *in vitro* de los explantes de cardamomo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. La fase de aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* se aclimató en el centro Regional Universitario del Oriente (CRUO), Huatusco, Veracruz.

3.2.2 Fuente de explantes

Como material vegetal, se utilizó la yema axilar, de longitud de 1 ± 0.1 cm, a partir de plantas con un buen vigor, de seis semanas de edad, y una altura de 3 ± 1 cm.

3.2.3 Medio de cultivo

Se empleó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) al 100%, suplementando con mio-inositol ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), L-cisteína ($60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), sulfato de adenina ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), agar ($7 \text{ gr} \cdot \text{L}^{-1}$) y 3% de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.7 ± 0.1 , con NaOH y HCl 1N. El medio se esterilizó en una autoclave a 121°C , con una presión de 1.1 a 1.2 Kg/cm^2 (15 libras por pulgada cuadrada), durante 20 minutos. Los cultivos fueron incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo un fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), por lámparas fluorescentes blancas de $45 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2.4 Fase de multiplicación

Para la multiplicación de explantes, se empleó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) al 100%, combinado bajo los siguientes reguladores de crecimiento vegetal, diferentes a lo reportado por otros autores.

Cuadro 1. Reguladores de Crecimiento Vegetal en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

AUXINAS				CITOCININAS		
Tratamientos	AIA	ANA	AIB	BA	2iP	KIN
T1	0	0	0	0	0	0
T2	0.3	0	0	3	0	0
T3	0	0.3	0	0	3	0
T4	0	0	0.3	0	0	3

Reguladores de crecimiento vegetal, auxinas; ácido indolacético (AIA), ácido naftalacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y citocininas, bencíladenina (BA), 2-isopentiladenina (2iP), kinetina (KIN), distribuidos en los medios de cultivo.

Se seleccionarán 40 brotes (plántulas), extrayendo las yemas axilares con una longitud de 1.0 ± 0.2 cm, los cuales se colocaron en frascos de vidrio con 20 mL de medio de cultivo, para cada uno de los cuatro tratamientos.

3.2.5 Análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones en cada tratamiento, cuya unidad experimental consistió en un tubo de ensayo con 20 mL de medio de cultivo y una yema axilar, luego de 8 semanas, se evaluaron las siguientes variables: altura de planta, número de brotes, hojas y raíces. Los datos obtenidos en cada tratamiento se sometieron a un análisis de varianza, con 95% de confianza y comparaciones de medias con la prueba Tukey ($P \leq 0.05$), analizado con el paquete estadístico SAS®, versión (9.1).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Altura de explantes

Como se muestra en el Cuadro 2, el mejor tratamiento fue el T3, se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a la altura, número de hojas y raíces, con respecto al número de brotes no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Cuadro 2. Resultados de las variables: Altura de los brotes, número de hojas, número de brotes y número de raíces.

Tratamientos	Altura (cm)	No. hojas	No. brotes	No. Raíces
T1	3.12 b $\pm$ 0.43	9.44 bc $\pm$ 3.91	3.67 a $\pm$ 2	9.67 ab $\pm$ 4.36
T2	2.82 b $\pm$ 0.53	11.44 b $\pm$ 3.88	3.44 a $\pm$ 1.33	11.00 ab $\pm$ 1.80
T3	4.40 a $\pm$ 0.42	17.67 a $\pm$ 2.06	3.33 a $\pm$ 1.5	13.67 a $\pm$ 4.33
T4	2.71 b $\pm$ 1.00	6.43 c $\pm$ 3.69	2.14 a $\pm$ 1.34	6.58 b $\pm$ 3.82

Valores con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) $\pm$ desviación estándar.

Aplicando el tratamiento T1 (control), el crecimiento de tallos y hojas fue menor, debido a que no se desarrollaron de manera regular (ver Figuras 1 y 2), además, a los 60 días de crecimiento, las plántulas presentaron más del 30% de muerte celular, llegando a la deshidratación total.

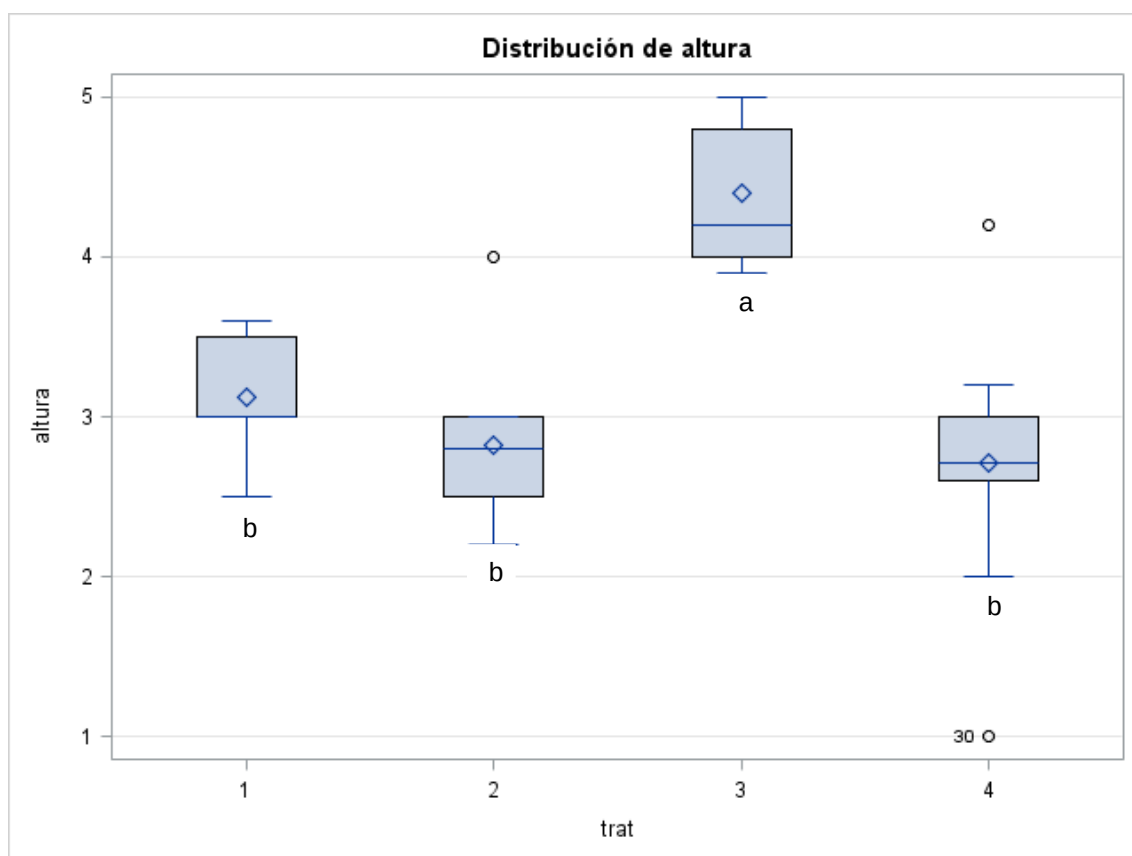


Figura 1. Efecto de los reguladores de crecimiento en brotes de *Elettaria cardamomum*, después de 90 días de crecimiento bajo condiciones *in vitro*. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con base en la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) $\pm$ desviación estándar. T1 (control), T2 (BA-AIA), T3 (2iP-ANA), T4 (KIN-AIB).

La aplicación del T3, dio como resultado la obtención de plántulas con una altura promedio de 4.40 ± 0.42 cm. Hasta la fecha la combinación de los reguladores de crecimiento, 2-isopentiladenina/ácido naftalacético en proporción 1:10, no se había utilizado para el cultivo *in vitro* de cardamomo, sin embargo, *Renealmia alpina*, que también pertenece a la familia Zingiberaceae, fue propagada utilizando 1 mg L^{-1} de BA y presentó un crecimiento promedio de 8.90 ± 1.54 cm en un periodo de 8 semanas (Alarcón *et al.*, 2008). Por otro lado, Urrea *et al.*, (2011) en plántulas de la especie de *Cúrcuma longa* obtuvieron una altura de 6 ± 3 cm, bajo la aplicación de 2 mg L^{-1} de BAP, estos resultados fueron similares a los obtenidos en cardamomo aplicando el tratamiento ANA-2iP ($0.3:3.0 \text{ mg L}^{-1}$).

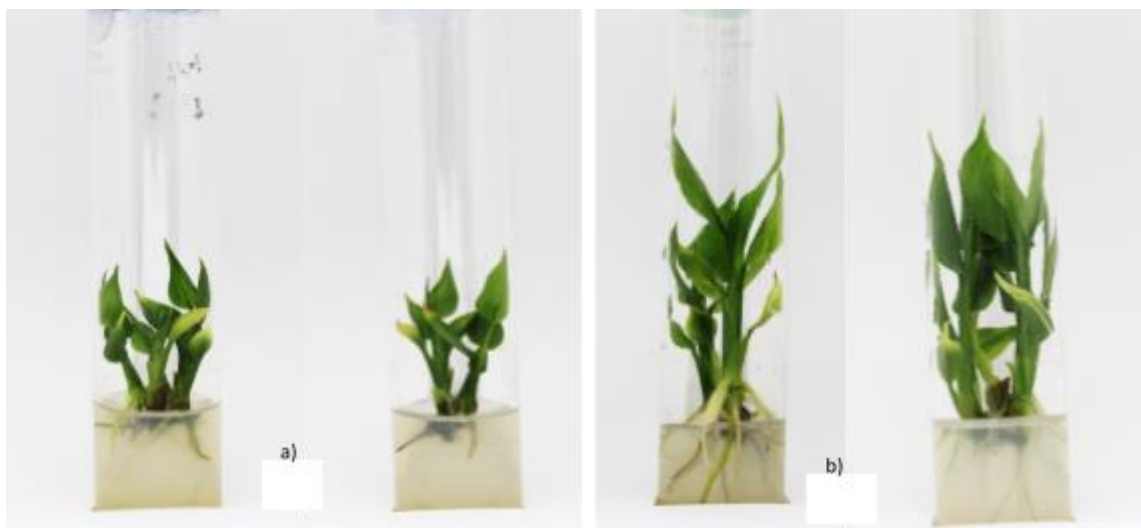


Figura 2. Plántulas de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) producidas bajo condiciones *in vitro*, apartir de yemas axilares. a) T1: control, b) T3: plántulas con tratamiento ANA-2iP.

3.3.2 Desarrollo de hojas

Para la variable desarrollo de hojas, los resultados se detallan en el Cuadro 1., hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$), en los tratamientos T2, T3 y T4, siendo el T3 en donde se obtuvo un mayor desarrollo con 17.67 ± 2.06 hojas (Figuras 3 y 4), bajo la combinación de los siguientes reguladores de crecimiento, en relación 1:10 de 2iP/ANA (3.0:0.3), respectivamente. Sin embargo, el T2 también fue en donde se registró un mayor número de hojas, con un promedio de 11.44 ± 3.88 , combinado con BA-AIA (3.0:0.3), en relación 1:10, respectivamente. Mientras que, en el T4, fue en donde se obtuvo el menor desarrollo de hojas, con apenas 6.43 ± 3.69 , bajo el efecto de KIN-AIB (3.0:0.3), en relación 1:10, respectivamente.

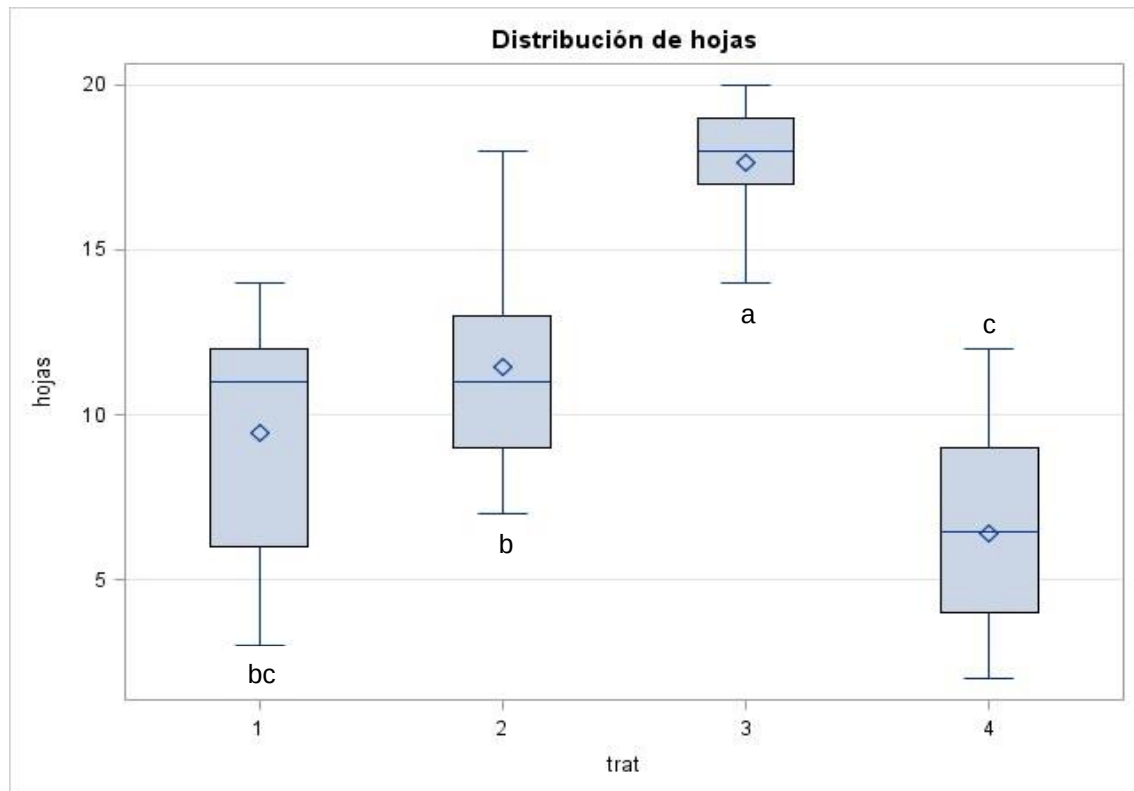


Figura 3. Efecto de los reguladores para la formación de hojas en *Elettaria cardamomun*, a los 90 días de crecimiento bajo condiciones *in vitro*, valores con la misma letra son estadísticamente iguales con base en la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) $\pm$ desviación estándar. T1 (control), T2 (BA-AIA), T3 (2iP-ANA), T4 (KIN-AIB).

Espinosa *et al.*, (2012), reportaron que la aplicación 4 mg L^{-1} de BA en *Cúrcuma longa* dio en promedio de 6.6 hojas por planta, este resultado es menor con lo obtenido en este trabajo. Se ha encontrado que la combinación de auxinas y citocininas a diferentes concentraciones en el medio de cultivo, favorecen en gran medida el desarrollo de plántulas, dando varias respuestas alternativas (Jordán y Casaretto, 2006).

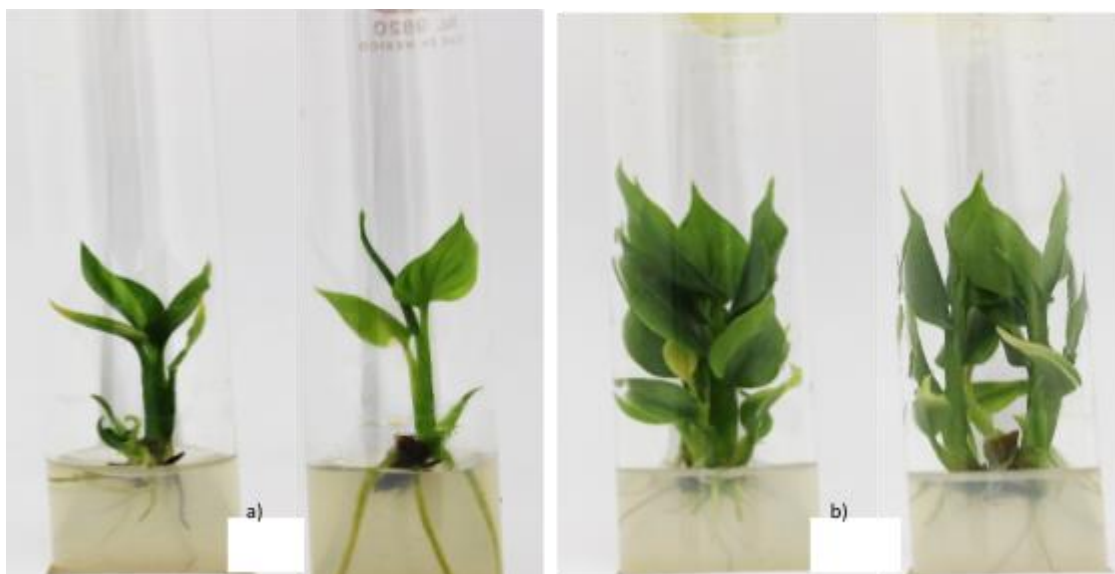


Figura 4. Formación de hojas en plántulas de cardamomo (*Elettaria cardamomun*), apartir de yema axilar. a) T4 (KIN-AIB), b) T3 (2iP-ANA).

3.3.3 Desarrollo de brotes

Los resultados de esta variable, para la formación de brotes se muestran en el Cuadro 1, estadísticamente no hay diferencia significativa, sin embargo, el T1 fue donde se registra el mayor número de brotes con 3.67 ± 2 brotes (Figura 5), en este tratamiento no se le aplicó ningún regulador de crecimiento, pero a los 45 días en varias unidades de experimentación comenzaron con la muerte celular, y la disminución en el crecimiento (Figura 6).

Este resultado en cuanto la formación de brotes en medios sin reguladores de crecimiento, concuerda con Isabel *et al.*, (2014), dado que fue donde obtuvo mejores resultados en cuanto a número de brotes (3.1 brotes en promedio), mientras que al suplementar 1.0 mg/L de ANA y la misma concentración de BAP, obtuvieron 2.9 brotes en promedio, muy similares a los restos de los tratamientos. En este mismo trabajo se evaluó unas capas de tejidos, reportando que el mayor número promedio de brotes fue obtenido en el medio MS sin reguladores de crecimiento (1,8 brotes en promedio) y cuando fue suplementado con ANA y BAP ambos a 2,0 mg/L (1,3 brotes en promedio), estos resultados son inferiores con lo obtenido en esta investigación. Por otro lado, Alarcón *et al.*, 2008, reportó un promedio de 12.2 brotes utilizando como regulador de crecimiento 3mg/L de BA, en la especie de *Renealmia alpinia*, perteneciente a la familia de cardamomo.

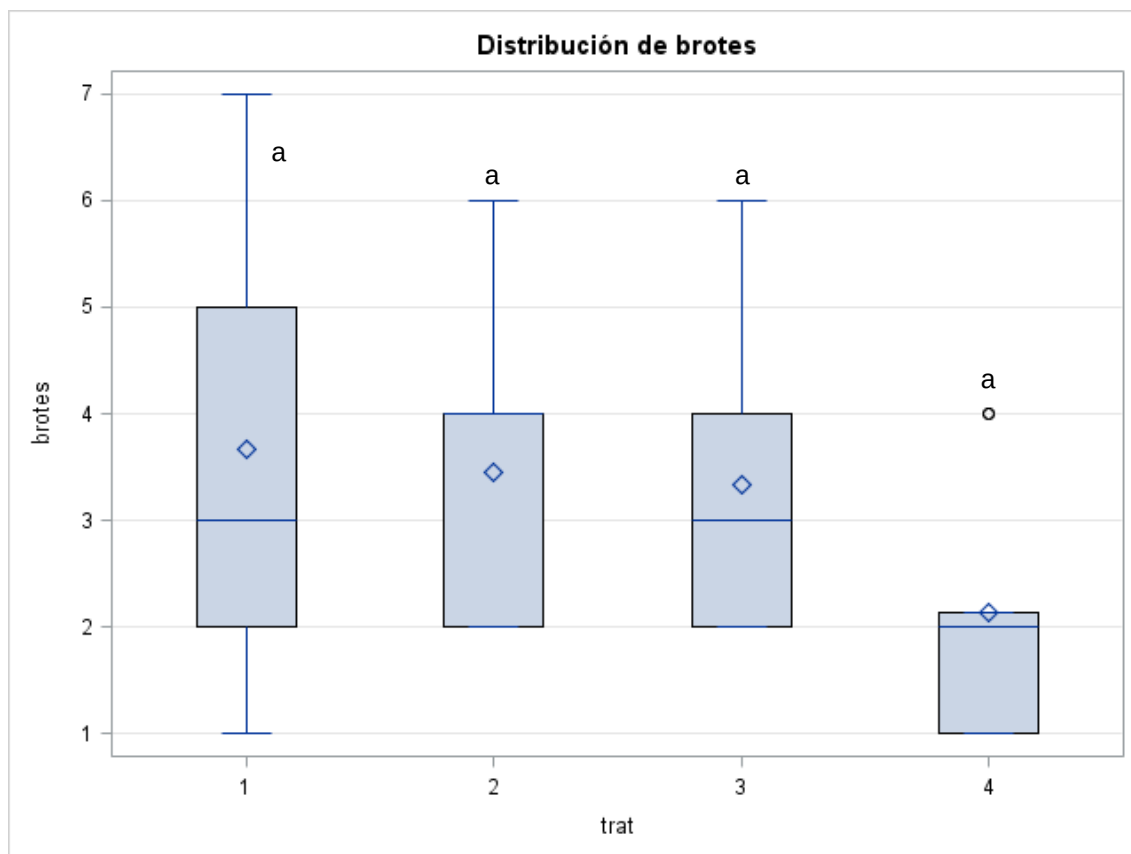


Figura 5. Efecto de los reguladores, para la formación de brotes en plántulas de *Elettaria cardamomum*, después de 90 días de crecimiento bajo condiciones *in vitro*, no hay diferencias estadísticas. T1 (control), T2 (BA-AIA), T3 (2iP-ANA), T4 (KIN-AIB).

La media del mejor tratamiento, correspondo a 3.7 brotes, este resultado es parecido a lo reportado por Zúñigas *et al.*, (2010), al utilizar 3 mg/L BAP, obteniendo entre 5-10 brotes de *Elettaria cardamomum*. Este resultado concuerda con lo reportado por Roca y Mroginski (1993), quienes afirman que cuando se experimenta con la técnica *in vitro* de tejidos diferenciados, ya sea meristemos, ápices de tallo y yemas apicales, se obtiene estructuras genéticamente estables, los cuales mantienen el material genético uniforme.



Figura 6. Micropropagación de cardamomo, apartir de yema axilar. a) correspondo al T3, bajo el efecto de ANA-2iP, con un promedio de 3.66, mientras que el b) corresponde al T3 (control), con una media de 3.33 hojas.

En otra investigación Isabel *et al.*, (2014), uso dos tipos de explantes; tallos con hoja y capas de tejidos delgados, reportando que para los brotes obtuvo un promedio de 3.4, mientras que para las capas un promedio de 3.0, utilizando 2.0 mg/L de BAP en la especie de *Cúrcuma longa* L.

3.3.4 Formación de Raíz

Para esta variable los resultados se detallan en la Cuadro 1, indicando que la mayor formación de raíces se dio el tratamiento T3, con 13.67 ± 4.33 , combinación con ANA-2iP (0.3:3.0), en relación 10:1, respectivamente. Aunque los explantes de manera gradual desarrollaban las raíces. En el tratamiento control fue donde se desarrolló las raíces de forma acelerada, esto coincide con lo reportado por Urrea *et al.*, (2011), para la especie de *Cúrcuma longa*, perteneciente a la familia de la familia de la zingiberácea. Sin embargo, el T1, con el paso del tiempo las raíces comenzaron a secarse y a presentar poco engrosamiento, los resultados se pueden analizar gráficamente (ver Figuras 7 y 8).

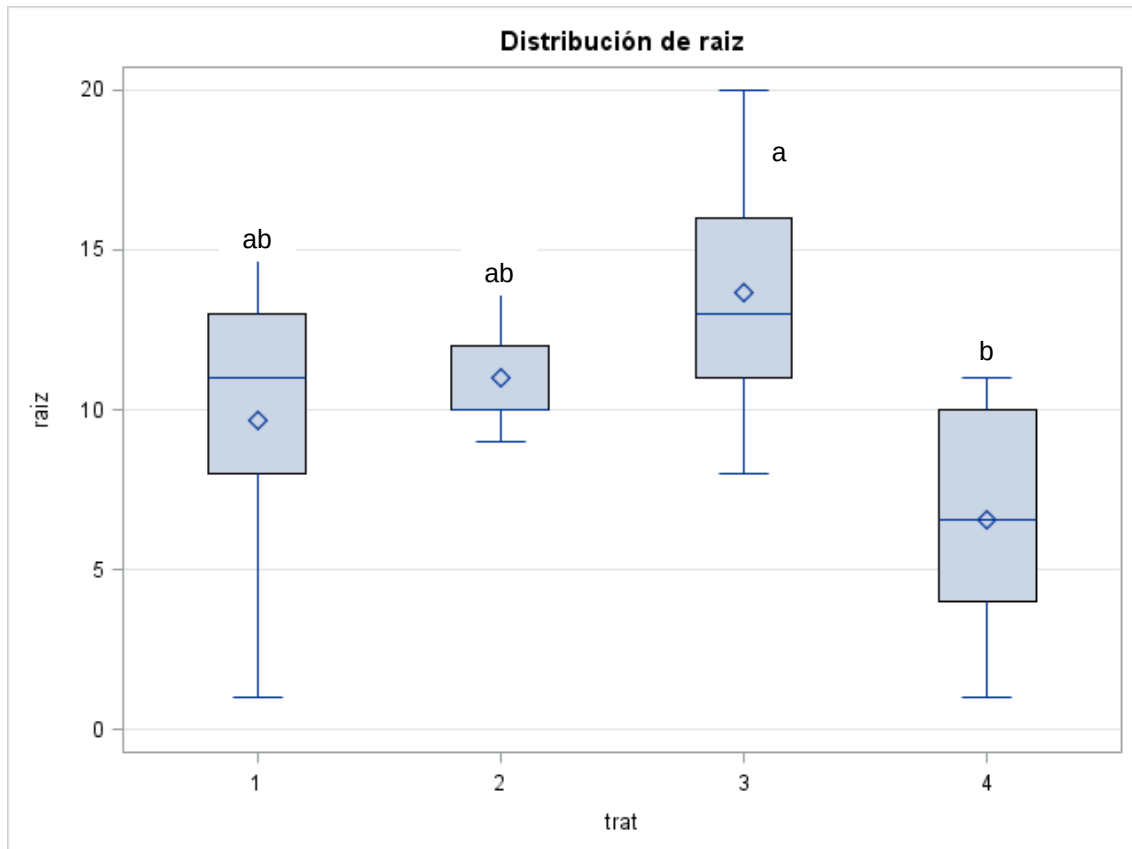


Figura 7. Efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de brotes en plántulas *Elettaria cardamomun*, después de 90 días de crecimiento bajo condiciones *in vitro*. valores con la misma letra son estadísticamente iguales con base en la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) $\pm$ desviación estándar. T1 (control), T2 (BA-AIA), T3 (2iP-ANA), T4 (KIN-AIB).

El análisis estadístico realizado, señala que existe diferencia mínima significativa con respecto a la formación de raíces en los diferentes tratamientos con respecto a la ($p\text{-valué}=0.05$). Los tratamientos (T1 y T2), no mostraron diferencias significativas al realizar la prueba Tukey, siendo estos en donde se obtuvieron un bajo formación de raíces.

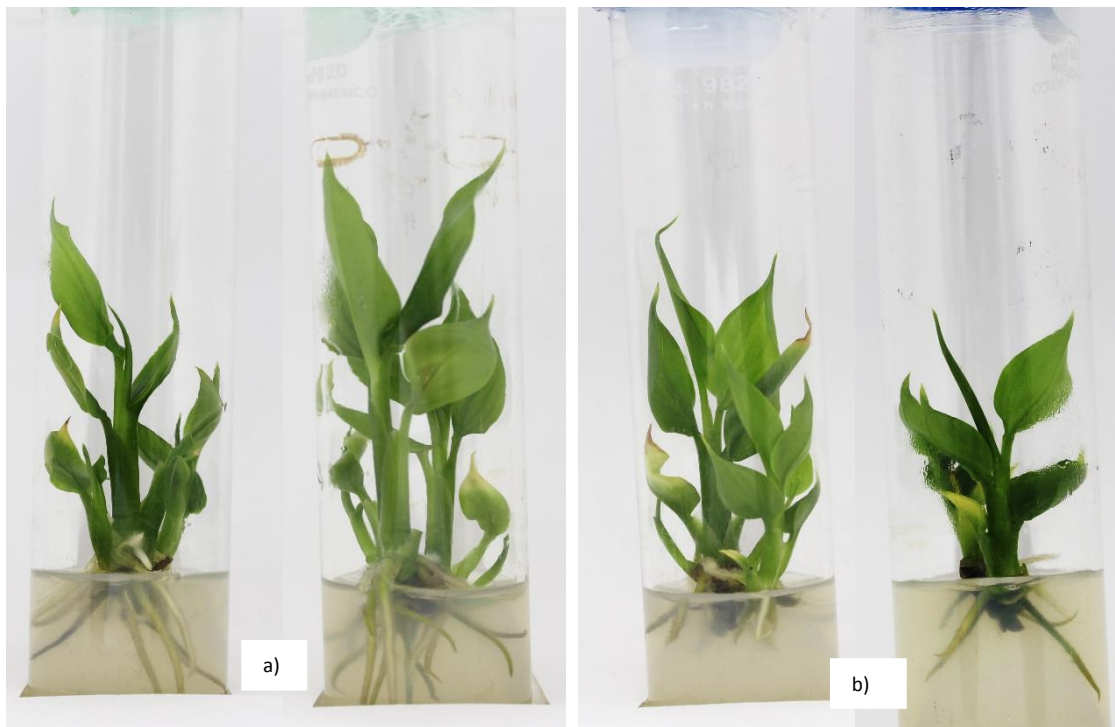


Figura 8. Micropropagación de cardamomo, apartir de yema axilar. a) correspondo al T3, bajo el efecto de ANA-2iP, con un promedio de 13.6 mientras que el b) corresponde al T3 (control), con una media de 9. 6 raíces.

El uso de ANA en el medio de cultivo favorece la formación de raíces, tal como lo reporta Isabel *et al.*, (2014), en la especie de *Cúrcuma longa*, aplicando las siguientes combinaciones de los reguladores de crecimiento usando como explante la base de hoja: (KIN 0.5-ANA 2,0), (BAP 1,0-ANA 2,0), (KIN 1 ,0-ANA 2,0), (BAP 2,0-ANA 1,0), (BAP 2,0-ANA 2,0) y (KIN 1-ANA 1,0), los resultados fueron homogéneos con un promedio de 7.1 raíces, mientras en los explantes de capas de tejidos delgados el mayor número de raíces fue obtenido empleando el medio MS sin reguladores de crecimiento (4.9 raíces). El efecto de la Kinetina, para la formación de raíces no fue el adecuado en este trabajo, mientras que Alarcón *et al.*, (2008), reporta que el uso de este regulador para la especie de *Renealmia alpinia*, en concentraciones (5 y 3 mg/L de kinetina), se obtiene el mejor promedio.

3.4 CONCLUSIÓN

La micropropagación *in vitro* de cardamomo, requiere de combinaciones exactas de reguladores de crecimiento (auxinas/citocininas), mezclados en diferentes concentraciones. Siendo la mejor combinación ANA/2iP (0.3:3.0 mg L⁻¹, respectivamente), donde se obtiene la mayor altura, la mayor formación/desarrollo de hojas y la mejor formación de raíces. Al principio, el comportamiento inicial de la yema axilar es similar, con el resto, pero con el paso de los días comienza la diferenciación entre tratamientos.

3.5 REFERENCIA

- Acceso, (2011). El mercado mundial para el cardamomo. Estudio de Mercado.
- Afanador, L., Hoyos, R., y Zúñigas, D., (2010). Evaluación de plántulas de cardamomo (*Elettaria cardamomun* (L.) Maton) por su resistencia *in vitro* al filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* Link. *Facultad de química farmacéutica*, 10-15.
- Alarcón, P., Martínez, R., Quintana, C., Jiménez, R., Díaz, C., Jiménez, I. (2008). Propagación *in vitro* de *Renealmia alpinia* (ROTTB), planta con actividad antifúngica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Vol. 15, núm. 1, pp. 61-69.
- Espinosa, Á., Silva, J., Misterbino, B., González, O., Pérez, J., & Fajardo, L. (2012). *Evaluación de plantas de Curcuma longa L. obtenidas por cultivo de tejidos en condiciones de organopónico*. (2), 7.
- Isabel, Z., Urrea, A. I., & Canal, A. (2014). *Organogénesis y embriogénesis en Curcuma longa L. a partir de capas delgadas de células, segmentos y bases de hoja*. (2), 10. Rev. Colomb. Biotecnol. No. 2. Pp: 74-83
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. 15, 28.
- MAGA. (2014). Perfil Comercial Cardamomo. Gobierno de Guatemala.
- Mejía, G., (2016). Estudio de factibilidad técnica y económica del cardamomo (*Elettaria cardamomun*), en la sierra norte del estado de Puebla. Academia Journals. Tuxpan, Veracruz.
- Revista Vinculando, (2007). *Agricultores Orgánicos en Chiapas*. Recuperado de Revista Vinculando: http://vinculando.org/organicos/directorio_de_agricultores_organicos_en_mexico/agricultores_organicos_en_chiapas_2005_3.html.
- Ríos, L., Lopera, G., Caicedo, R., Granda, F., Montoya, A., Restrepo, G., & Suárez, R. (2007). *Extraction and characterization of cardamom oil (Elettaria cardamomum)*. 6.
- Roca, W., Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT. Pp: 79-93.
- Ruano, R. (2002). El cultivo de cardamomo (*Elettaria cardamomun*) en Guatemala. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas.

- Urrea, A., Canal, A., & Monsalve, Z. (2011). Micropropagación e inducción de órganos de almacenamiento en *curcuma longa* L. *Actual Biol*, 11. Medellín (Antioquia), Colombia. Pp: 5-15.
- Villada, M. E., Millán, L. de J., Peláez, C. A., Arroyave, C., González, M. I., & Gil, M. A. (2017). Caracterización del aceite microencapsulado de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) extraído por fluidos supercríticos a escala semi-industrial. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20(0). <https://doi.org/10.1590/1981-6723.09915>.
- Zúñigas, D., Hoyos, R., & Afanador, L. (2010). Evaluación de plántulas de cardamomo (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton), por su resistencia *in vitro* al filtrado de cultivo de *Fusarium Oxysporum* Link. *Vitae*, 17(2), 155-164.

IV. EFECTO DEL USO DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE PLANTULAS DE CARDAMOMO (*Elettaria cardamomum*).

RESUMEN

Las semillas de cardamomo contienen aceites esenciales con propiedades antioxidantes, sin embargo, a la fecha no se tienen reportes del potencial antioxidante de las plántulas de *Elettaria cardamomum*. El Objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la fenilalanina y la tirosina sobre la producción de compuestos fenólicos, por las plántulas de cardamomo micropropagadas *in vitro*. Los aminoácidos aromáticos, fueron adicionados, a diferentes concentraciones (T0: control, T1:80, T2:100, T3:160, T4:80, T5:100, T6:160, T7:80-160, T8:100-100, T9:160-80, T10:80-80, T11:160-160, T12:80 T13:100 mg. L⁻¹), al medio de cultivo de la micropropagación de *Elettaria cardamomum*, después de 90 días de incubación las plántulas fueron liofilizadas y molidas, para cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales y la capacidad antioxidante por los ensayos FRAP, DPPH Y ABTS. Los mejores tratamientos para el contenido fenólico total, fueron los tratamientos T9 y T11 (4.02 ± 0.42 , 4.05 ± 0.46 mg EAG g_{bs}⁻¹), los flavonoides totales, T4, T8 y T10 (1.89 ± 0.92 , 1.89 ± 0.73 , 1.96 ± 0.58 mg EC g_{bs}⁻¹), para las pruebas ABTS, DPPH y FRAP, el mejor tratamiento fue el T10 (29.02 ± 2.48 μmol ET g_{bs}⁻¹, 34.18 ± 4.17 μmol ET g_{bs}⁻¹ y 14.21 ± 1.26 μmol ET g_{bs}⁻¹, respectivamente). La fenilalanina y tirosina en determinadas concentraciones promueve la biosíntesis de compuestos fenólicos en las plántulas de cardamomo.

Palabras clave: *in vitro*, aminoácidos, capacidad antioxidante.

**EFFECT OF THE USE OF AROMATIC AMINO ACIDS ON THE
ANTIOXIDANT PROPERTIES OF CARDAMOM SEEDLINGS (*Elettaria
cardamomum*).**

ABSTRACT

The cardamom seeds contain essential oils with antioxidant properties, however, there are no reports of the antioxidant potential of the *Elettaria cardamomum* seedlings so far. The objective of this work was to evaluate the effect of phenylalanine and tyrosine on the production of phenolic compounds by micropropagated cardamom seedlings *in vitro*. The aromatic amino acids were added at different concentrations in the range of 80-160 mg. L⁻¹, after 90 days of incubation, in the harvested seedlings previously freeze-dried and ground, the content of phenols and total flavonoids was quantified, as well as the antioxidant capacity by the FRAP, DPPH and ABTS assays. The maximum concentration of phenolic compounds (4.05±0.46 mg EAG g_{bs}⁻¹) occurred when 160 and 80 mg.L⁻¹ of phenylalanine and tyrosine were added, respectively. The maximum concentration of flavonoids (1.96 ± 0.58 mg EC g_{bs}⁻¹) was obtained when 80 mg.L⁻¹ of each of the amino acids was added. The maximum antioxidant capacity was found in the seedlings with the highest concentration of flavonoids, observing the same tendency for the three tested methods. Phenylalanine and tyrosine promote the biosynthesis of phenolic compounds in cardamom seedlings, which may guarantee their future acclimatization.

Key words: amino acids, antioxidant capacity, *in vitro*.

4.1 INTRODUCCIÓN

Todas las plantas tienen la capacidad de producir compuestos bioactivos como parte de su metabolismo secundario, estos compuestos no son indispensables, ni participan en procesos bioquímicos vitales, sin embargo, desempeñan un papel determinante en la interacción planta-ambiente, ante los factores bióticos y a bióticos (Jiménez *et al.*, 2003; Sánchez y Alvarenga, 2014).

El consumo de especies vegetales ricas en antioxidantes previene y en algunas ocasiones combate el daño oxidativo, provocado por el desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad del sistema biológico para generar una respuesta al daño resultante (Venereo, 2002). Los antioxidantes, tienen una capacidad de retrasar o prevenir la oxidación de un sustrato, aun en concentraciones bajas (Pisoschi y Pop, 2015), evitando así alteraciones en la estructura y función en cualquier órgano o grupo celular (Venereo, 2002). Las frutas y hortalizas, ricas en antioxidantes naturales, son benéficas para la salud por la capacidad de evitar enfermedades cardíacas, cáncer, cataratas, degeneración muscular y enfermedades neurológicas (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

Por lo anterior, ha surgido el interés por la búsqueda de nuevas técnicas para promover la obtención de metabolitos secundarios de interés comercial, en particular, la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales, como una estrategia para producir sustancias que resultan difíciles o escasos de obtener de manera natural (Robert *et al.*, 1991).

De acuerdo con diversos estudios, las semillas de cardamomo son una fuente rica en fitoquímicos con diversas propiedades farmacológicas atribuidas a su capacidad antioxidante, sin embargo no hay reportes del tipo de fitoquímicos, en particular de compuestos fenólicos, presentes en toda la planta de cardamomo, ni estudios de cultivo *in vitro* conducentes a la obtención de plántulas ricas en este tipo de compuestos, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades antioxidantes en plántulas de cardamomo cultivadas *in vitro*, adicionando diferentes proporciones de fenilalanina/tirosina, con el fin de encontrar el mejor tratamiento que proporcione plántulas con un alto potencial nutracéutico.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Tratamientos de micropropagación

El medio de micropropagación de plántulas de cardamomo, fue el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) al 100%, suplementando con mio-inositol (100 mg. L^{-1}), L-cisteína (60 mg. L^{-1}), sulfato de adenina (80 mgL^{-1}), agar (7 g. L^{-1}) y 3% de sacarosa. Con la combinación ANA:2iP ($0.3/3.0 \text{ mg. L}^{-1}$, respectivamente), en cada tratamiento se adicionó diferente concentración y combinación de fenilalanina y tirosina (Cuadro 3). Finalmente, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.1 , con NaOH y HCl 1N.

Cuadro 3. Distribución de los aminoácidos en mg.L^{-1}

Tratamientos	Aminoácidos	
	Fenilalanina	Tirosina
T0	0	0
T1	80	0
T2	100	0
T3	160	0
T4	0	80
T5	0	100
T6	0	160
T7	80	160
T8	100	100
T9	160	80
T10	80	80
T11	160	160
T12	80	0
T13	100	0

El medio se esterilizó en una autoclave a 121°C , con una presión de 1.1 a 1.2 Kg/cm^2 (15 libras por pulgada cuadrada), durante 20 minutos. Los cultivos fueron incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo un fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), por lámparas fluorescentes blancas de $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, durante un periodo de 90 días.

4.3 Propiedades antioxidantes

4.3.1 Reactivos e instrumentación

Los reactivos de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio anhidro, ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), 2,2-azinobis ácido -3 etilbenzotiazolino-6-sulfónico (ABTS), ácido sulfúrico, persulfato de potasio, acetato de sodio trihidratado, ácido acético glacial, 2,4,6-tripiridil-s triazina (TPTZ), ácido clorhídrico, cloruro de hierro (III) hexahidratado, catequina, β -caroteno fueron adquiridos de Sigma Aldrich. La medición de absorbancias para cuantificar los fenoles totales, flavonoides y evaluar la capacidad antioxidante se llevó a cabo en un lector de microplacas (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA), equipado con bombas de inyección automática y el software de análisis de datos Gen5™ data.

4.3.2 Preparación de extractos

Los extractos de las plántulas de cardamomo, previamente liofilizada y molida, se mezcló con metanol al 80% (v/v) en una proporción 1:10 (p/v) ajustando el pH 3 con HCl al 10%. A continuación, la extracción se hizo por agitación en vórtex (1000 rpm, 3 min), sonicación (15 min), agitación en incubadora (150 rpm, 37°C, 30 min) y nuevamente sonicación (15 min). Después la mezcla fue centrifugada (2500 rpm, 15 min) y el sobrenadante se recuperó y se llevó a un volumen final de 10 mL. A partir de este extracto se cuantificaron los fenoles, flavonoides totales, antocianinas y capacidad antioxidante. Cada muestra se procesó por triplicado.

4.3.3 Contenido fenólico total (CFT)

El contenido fenólico total se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, propuesta por Singleton y Rossi (1965), adaptado a microplacas. En una microplaca de 96 pozos se colocaron, en cada pozo, una alícuota (25 μ L) de la muestra, agua destilada (125 μ L), reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 (20 μ L) y carbonato de sodio al 20 % (30 μ L). La mezcla fue agitada y se dejó reposar durante 30 min protegida de la luz, la absorbancia frente al blanco fue medida a 760 nm. La curva de calibración de ácido gálico se preparó en el intervalo lineal de 2.5-29.0 μ g mL⁻¹. Los resultados se expresaron como miligramos

equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca $\text{mgEAG g}_{\text{bs}}^{-1}$. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.3.4 Flavonoides totales (FT)

Los flavonoides totales fueron determinados de acuerdo al método de Kubola y Siriamornpun (2011), adaptado a microplacas. Una alícuota del extracto de plántulas de cardamomo (0.5 mL) se mezcló con agua destilada (2.5 mL) y NaNO_2 al 5% (0.15 mL). Después de 5 min se agregaron 0.3 mL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 %). La mezcla se dejó reposar durante 5 min y enseguida se agregó 1 mL de NaOH (5%); las muestras fueron agitadas en vortex (3,000 rpm, 3 min). Finalmente se transfirieron 200 μL de cada muestra a los pozos de la microplaca y se midió la absorbancia a 510 nm en un lector de microplacas. La curva de calibración de catequina se preparó en el intervalo de concentraciones de 0 a 130.2 μM . Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra en base seca ($\text{mgEC g}_{\text{bs}}^{-1}$). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.4 Capacidad antioxidante

4.4.1 Ensayo ABTS

La capacidad antioxidante por el ensayo ABTS se evaluó por el método de Re *et al.* (1999), adaptado a microplacas. El radical libre $\text{ABTS}^{\cdot+}$ fue generado por la reacción entre las disoluciones de ABTS 7.4 mM y persulfato de sodio 2.6 mM, la cuales se mezclaron en una proporción 1:1 (v/v) y se dejaron reaccionar, protegidas de la luz, durante 16 h. Posteriormente, una alícuota de la mezcla de reacción (600 μL) se aforó a 10 mL con metanol. En cada pozo de la microplaca se colocaron 20 μL del extracto, apropiadamente diluido, y 180 μL la disolución de $\text{ABTS}^{\cdot+}$. La disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción se midió a 734 nm. La curva de calibración de Trolox se construyó en un intervalo de concentraciones de 4.99 a 59.93 μM . Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base fresca. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.4.2 Ensayo DPPH

El ensayo DPPH se llevó a cabo de acuerdo con el método de Cheng *et al.* (2006), con modificaciones. En cada pozo de una microplaca se mezclaron 200 μ L de una serie de diluciones de los extractos y 50 μ L de disolución de DPPH (0.099 mM). Como blanco se empleó metanol al 80 % (250 μ L) y como control una mezcla de metanol al 80 % (200 μ L) y DPPH 0.099 mM (50 μ L). La microplaca fue agitada y conservada en oscuridad durante 30 min, después se midió la absorbancia a 515 nm. La curva de calibración de Trolox se preparó en un intervalo de concentraciones de 1.05 a 40.59 μ M. Los resultados fueron expresados y como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base húmeda. El porcentaje de DPPH degradado fue determinado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ DPPH}^{\cdot}_{\text{degradado}} = \left(1 - \frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \times 100$$

Donde A_m , A_b , A_c representa la absorbancia del antioxidante de referencia o de la muestra, blanco y el control, respectivamente.

4.4.3 Ensayo FRAP

La capacidad antioxidante por el ensayo FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) se evaluó de acuerdo con el procedimiento de Benzie y Strain (1999), adaptado a microplacas. El reactivo FRAP se preparó en el momento de su uso mezclando buffer de acetatos (300 mM, pH 3.6), disolución de TPTZ 10mM en HCl 40 mM y disolución de cloruro de fierro (III) 20 mM, en una proporción de 10:1:1, respectivamente. Una alícuota (20 μ L) de la muestra (apropiadamente diluida) se mezcló con 180 μ L del reactivo FRAP y con 60 μ L de agua destilada. La absorbancia se midió a 595 nm. La curva de calibración de Trolox se preparó en un intervalo de concentraciones de 3.8 a 46 μ M. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados aplicando un diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones en cada tratamiento, cuya unidad experimental consistió en un frasco con tres extracciones por tratamiento, se evaluaron las siguientes variables: Contenido fenólico total (CFT), flavonoides

totales (FT), capacidad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP). Los datos obtenidos en cada tratamiento se sometieron a un análisis de varianza, con 95% de confianza y comparaciones de medias con la prueba Tukey ($P \leq 0.05$), analizado con el paquete estadístico SAS® (versión 9.1).

4.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especias en general, han mostrado interés por ser una fuente de compuestos con capacidades antioxidantes efectivos (Suhaj, 2006). En este contexto, el cardamomo es considerado una de las especias más antiguas del mundo, sus semillas contienen aceites esenciales y un aroma agradable, por lo que se utiliza en diversos platillos (Acceso, 2011).

Actualmente, no existen estudios previos que reporten el contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante en plántulas de cardamomo sometidos a los efectos de los aminoácidos en condiciones *in vitro*. Los estudios que existen con respecto al tema de fitoquímica, se enfocan a las semillas ricas en componentes bioactivos (Villada *et al.*, 2017).

En el Cuadro 4, se muestran los resultados de las propiedades antioxidantes de las plántulas de cardamomo propagadas bajo los diferentes tratamientos, consistentes en la variación de concentraciones de los aminoácidos tirosina y fenilalanina. Como se observa, existen diferencias significativas en el contenido fenólico, de flavonoides y capacidad antioxidante, cuando se aplican concentraciones diferentes de aminoácidos aromático como precursores de la biosíntesis de dichos compuestos.

Cuadro 4. Contenido fenólico total (CFT), flavonoides totales (FT), capacidad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP), de plántulas de cardamomo (*Elettaria cardamomum*).

Tratamientos	CFT ($mg\ EAG\ g_{bs}^{-1}$).	FT($mg\ EC\ g_{bs}^{-1}$).	ABTS ($\mu mol\ ET\ g_{bs}^{-1}$).	DPPH($\mu mol\ ET\ g_{bs}^{-1}$).	FRAP($\mu mol\ ET\ g_{bs}^{-1}$)
T0	2.10 e $\pm$ 0.03	0.98 c $\pm$ 0.43	16.50 f $\pm$ 1.43	15.21 f $\pm$ 4.17	6.10 d $\pm$ 0.67
T1	2.78 cde $\pm$ 0.00	1.22 cb $\pm$ 0.52	18.81 ef $\pm$ 1.67	16.41 def $\pm$ 3.89	6.72 d $\pm$ 0.89
T2	3.59 abc $\pm$ 0.34	1.43 abc $\pm$ 0.58	20.37 cdef $\pm$ 0.95	15.47 ef $\pm$ 2.78	5.94 d $\pm$ 0.24
T3	2.92 bcde $\pm$ 0.34	1.51 abc $\pm$ 0.56	21.47 cdef $\pm$ 1.63	20.73 cdef $\pm$ 5.68	6.16 d $\pm$ 0.45
T4	3.59 abc $\pm$ 0.44	1.89 a $\pm$ 0.92	25.04 abcd $\pm$ 0.69	23.36 abcdef $\pm$ 8.75	10.07 bc $\pm$ 0.91
T5	3.66 abc $\pm$ 0.60	1.47 abc $\pm$ 0.58	22.46 cde $\pm$ 0.59	22.11 bcdef $\pm$ 7.35	7.97 cd $\pm$ 0.23
T6	3.45 abcd $\pm$ 0.13	1.51 abc $\pm$ 0.53	23.04 bcde $\pm$ 0.99	26.07 abcdef $\pm$ 0.98	11.46 b $\pm$ 0.61
T7	3.71 abc $\pm$ 0.42	1.83 ab $\pm$ 0.71	25.41 abc $\pm$ 2.75	27.10 abcd $\pm$ 2.95	11.46 b $\pm$ 0.88
T8	3.90 ab $\pm$ 0.43	1.89 a $\pm$ 0.73	28.23 ab $\pm$ 3.31	24.20 abcdef $\pm$ 0.42	12.09 ab $\pm$ 0.10
T9	4.02 a $\pm$ 0.42	1.54 abc $\pm$ 0.51	21.47 cdef $\pm$ 1.23	33.73 a $\pm$ 2.22	11.71 b $\pm$ 0.66
T10	3.51 abcd $\pm$ 0.20	1.96 a $\pm$ 0.58	29.02 a $\pm$ 2.48	34.18 a $\pm$ 4.17	14.21 a $\pm$ 1.26
T11	4.05 a $\pm$ 0.46	1.51 abc $\pm$ 0.53	23.72 abcde $\pm$ 1.73	33.36 ab $\pm$ 3.23	11.50 b $\pm$ 1.22
T12	2.13 e $\pm$ 0.65	1.45 abc $\pm$ 0.81	19.97 def $\pm$ 0.91	29.77 abcde $\pm$ 1.76	7.30 d $\pm$ 0.55
T13	2.52 de $\pm$ 0.48	1.55 abc $\pm$ 0.82	19.94 def $\pm$ 1.29	27.82 abc $\pm$ 1.83	7.39 d $\pm$ 0.38

Valores con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) $\pm$ desviación estándar.

En los 14 tratamientos evaluados, el contenido fenólico se encuentra en el intervalo de 2.10-4.05 mg EAG g_{bs}⁻¹. La concentración más alta de compuestos fenólicos en las plántulas de cardamomo (Figura 9), corresponde a los tratamientos T9 y T11 (4.02 ± 0.42 y 4.05 ± 0.46 mg EAG g_{bs}⁻¹), estos valores no muestran diferencias estadísticas significativas. Mientras que en el control (T0), se registró el contenido fenólico más bajo, (2.10 ± 0.03 mg EAG g_{bs}⁻¹).

En otras especies, pertenecientes a la misma familia del cardamomo, se realizaron estudios en frutos, en donde se reportaron concentraciones altas (10.22±0.87 mg EAG g_{bs}⁻¹), para la especie jengibre (Ali *et al.*, 2018). Mientras que Alvis *et al.* (2012), reportó valores inferiores en la especie de cúrcuma (1.76 mg EAG g_{bs}⁻¹), concentraciones inferiores a las encontradas en el control.

De acuerdo a los resultados, el efecto de incorporar aminoácidos aromáticos (fenilalanina-tirosina), en las concentraciones de 160:80 y 160:160 mg. L⁻¹, respectivamente, produce el mismo efecto en el contenido fenólico de las plántulas.

Los componentes principales de todas las especias en su mayoría son compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides (Chaieb et al. 2007). Estos compuestos en las especias son los responsables de las propiedades antioxidantes, confiriéndole los usos medicinales (Bozin et al., 2008).

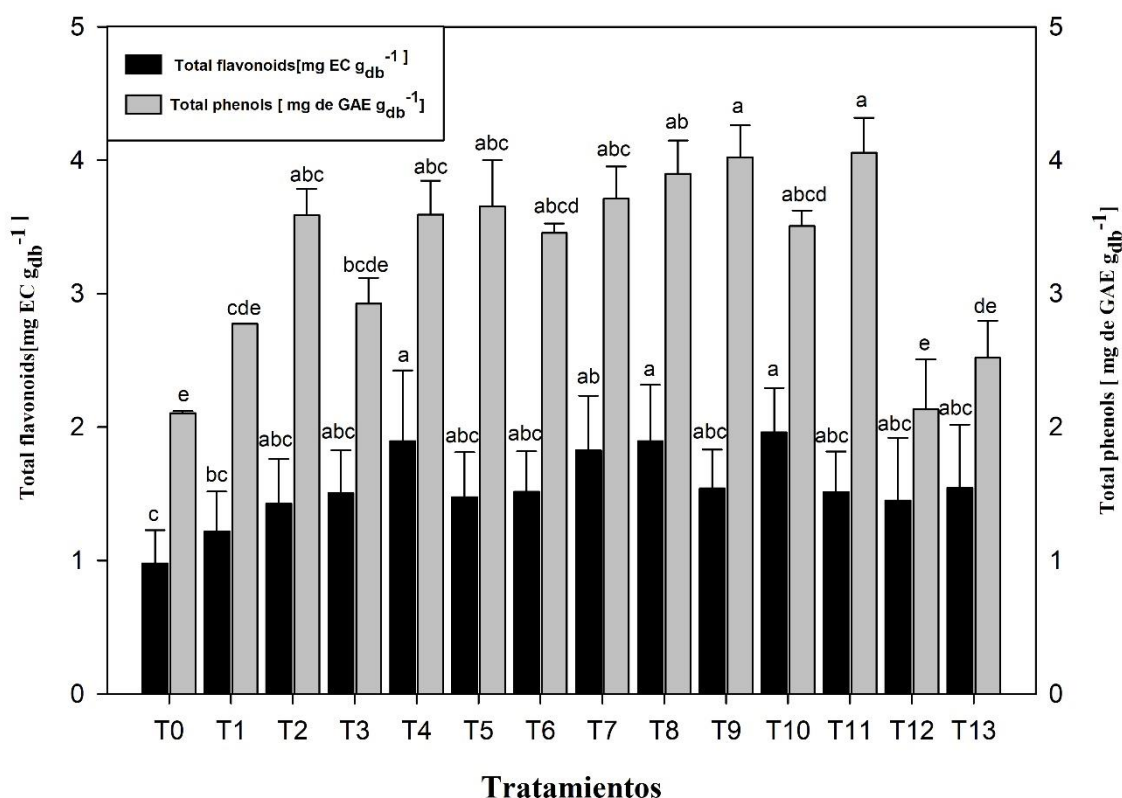


Figura 9. Contenido total de fenoles y flavonoides.

Los flavonoides, representan el grupo más extenso, dentro de los compuestos fenólicos (Kim et al., 2011), con una amplia distribución. En la planta presentan actividades de estimulación a través de las uniones en hendidura, con un impacto sobre el crecimiento celular e inducción de enzimas (monooxigenasas dependientes de citocromo), para la destoxificación (Gonzales et al., 2002).

Contribuyen también en las actividades farmacológicas de la salud humana (Khalid et al., 2019). Dentro de los beneficios que proporcionan los flavonoides a la salud humana se tienen los siguientes: tratamiento de asma y enfermedades gastrointestinales, desintoxicador, antidepresivos, salud bucal, mal aliento, prevención del cáncer, estimulante, entre otros (Roopan y Madhumitha, 2018)

El contenido de flavonoides en las plántulas de cardamomo osciló entre 0.98 y 1.96 mg EC g⁻¹_{bs} (Cuadro 4), este tipo de compuestos son parte de los fenólicos, por lo tanto, se observa que los datos son consistentes, debido a que en todos los casos la concentración de flavonoides fue inferior al CFT. El contenido de flavonoides en la mayoría de los tratamientos (T2, T3, T5, T6; T9; T11, T12 y T13) no mostró diferencias estadísticamente significativas. Los tratamientos en los que las plántulas produjeron una mayor concentración de flavonoides son: T4, T8 y T10. Según Kim *et al.* (2011), cuanto más alto sea el contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides totales, mayor es su actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante de las especias está estrechamente relacionada con la presencia de componentes químicos con actividad antioxidante (Coronado *et al.*, 2015). Para evaluar la capacidad antioxidante de las plántulas de cardamomo se emplearon tres métodos (ABTS, DPPH, FRAP), para cada uno de los tratamientos. La capacidad antioxidante fue determinada en las plántulas de cardamomo, bajo las diferentes combinaciones/concentraciones de los aminoácidos con la técnica del cultivo *in vitro*, muestra que el ensayo ABTS, presentó un intervalo de 16.50 a 29.02 µmol ET g⁻¹_{bs}, mostrando una diferencia estadísticamente significativa. El T10 (29.02 ± 2.48) es superior al resto, bajo la mezcla de fenilalanina-tirosina en relación 80:80 mg.L⁻¹.

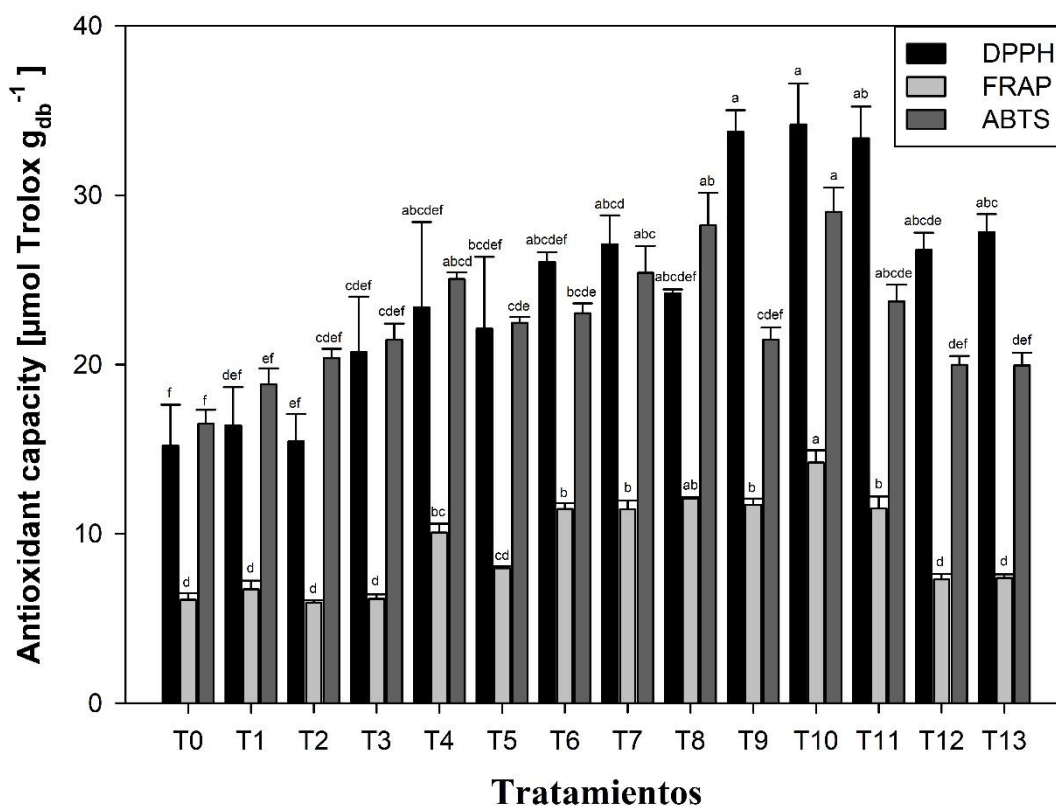


Figura 10. Capacidad antioxidante, evaluado por los métodos (ABTS, DPPH, FRAP).

Para el ensayo DPPH, los resultados se muestran en el Cuadro 4, con un rango que va de 15.21 a 34.18 $\mu\text{mol ET g}^{-1}_{\text{bs}}$, el análisis estadístico mostró que existe una diferencia mínima estadísticamente significativa entre los tratamientos, siendo el T0, T9 y T10 los más sobresalientes, con valores de $(15.21 \pm 4.17, 33.73 \pm 2.22, 34.18 \pm 4.17 \mu\text{mol ET g}^{-1}_{\text{bs}}$, respectivamente), los dos últimos regulado con la combinación de fenilalanina-tirosina en relación 160:80 y 80:80 mg.L^{-1} , estadísticamente se aprecia en la Figura 10. Estos resultados obtenidos son muy inferiores con lo reportado por otros autores, en especies pertenecientes a la familia del cardamomo. En el Jengibre se ha reportado valores de 270.07 $\text{ET g}^{-1}_{\text{bs}}$ (Mercado et al. 2013). En otra investigación Akinola *et al.*, (2014), reporto que para la especie de Cúrcuma se ha obtenido valores de 266.95 $\text{ET g}^{-1}_{\text{bs}}$, muy superiores a lo reportado en este trabajo.

Por otro lado, mediante el ensayo FRAP se encontraron valores de 5.94 a 14.21 $\mu\text{mol ET g}^{-1}_{\text{bs}}$ (Cuadro 4), encontrándose diferencias significativas en los diferentes tratamientos. Entre los más sobresalientes, encontramos al T8, T10

(12.09 ± 0.10 , 14.21 ± 1.26 , respectivamente) (Figura 10), en relación 100:100, 80:80 mg.L⁻¹, de fenilalanina-tirosina.

Estos resultados están muy por debajo con lo reportado por otros autores al trabajar con plantas de la misma familia del cardamomo. En el caso del jengibre, se ha reportado valores de $176.26 \pm 21 \mu\text{mol ET g}^{-1}_{\text{bs}}$ y cúrcuma $231.73 \pm 21 \mu\text{mol ET g}^{-1}_{\text{bs}}$, (Akinola et al., 2014).

Para el análisis de ABTS, el rango va de 6.10 ± 0.67 a 14.21 ± 1.26 , siendo el T10 el mejor tratamiento con un resultado de 14.21 ± 1.26 , bajo la combinación de los aminoácidos (fenilalanina/tirosina), en relación 80/80 mg.L⁻¹. De los tres ensayos empleados se puede observar que la prueba DPPH mostró valores mayores seguido de la prueba ABTS y finalmente FRAP.

Actualmente, no se han hecho estudios del contenido total fenólico/flavonoide y capacidad antioxidante en la planta de cardamomo, tampoco se ha reportado el uso de aminoácidos como precursores de estos metabolitos secundarios.

La capacidad antioxidante está relacionada con la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, además de la presencia de otros metabolitos como cineol, acetato de terpinilo, linalol, β -pineno (Rios et al., 2007) y eugenol (Majdalawieh et al., 2010), compuestos que pertenecen a las semillas del cardamomo. Se ha comprobado que el extracto acuoso de cardamomo posee efectos anticancerígenos al promover la actividad citotóxica (Majdalawieh et al., 2010; Qiblawi et al., 2015).

4.7 CONCLUSIÓN

Los mejores tratamientos para el contenido fenólico total, son los tratamientos T9 y T11, bajo la combinación de 160:80,160:160 mg.L⁻¹ de fenilalanina/tirosina, respectivamente. Para los flavonoides totales, los mejores tratamientos, son; T4, T8, T10, combinado de 0:80,100:100, 80:80 mg.L⁻¹ de fenilalanina/tirosina, respectivamente. Mientras que para las pruebas ABTS, DPPH, FRAP el mejor tratamiento corresponde al T10, bajo el efecto de 80:80 mg.L⁻¹ de fenilalanina/tirosina, respectivamente). Con base en los resultados, los aminoácidos (fenilalanina y tirosina), promueven la biosíntesis de compuestos fenólicos en las plántulas de cardamomo obtenidas *in vitro*, lo cual podría garantizar su futura aclimatación, por el alto contenido de fenoles y flavonoides, los cuales son metabolitos que se sintetizan ante los factores bióticos y abióticos.

4.7 REFERENCIAS

- Acceso, (2011). El mercado mundial para el cardamomo. Estudio de Mercado.
- Akinola, A. A., Ahmad, S., & Maziah, M. (2014). Total Anti-Oxidant Capacity, Flavonoid, Phenolic Acid and Polyphenol Content in Ten Selected Species of Zingiberaceae Rhizomes. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 11(3), 7-13.
- Ali, A. M. A., El-Nour, M. E. M., & Yagi, S. M. (2018). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some *elicitors*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 677-682. doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.003.
- Alvis, A., Arrazola, G., & Martinez, W. (2012). Evaluación de la Actividad y el Potencial Antioxidante de Extractos Hidro-Alcohólicos de Cúrcuma (*Cúrcuma longa*). *Información tecnológica*, 23(2), 11-18. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000200003>.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- Bozin, B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran, A., & Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae) – ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460800530X>.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzgium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research: PTR*, 21(6), 501-506. <https://doi.org/10.1002/ptr.2124>.
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7429-7436. doi:10.1021/jf0611668.
- Coronado H, M., Vega y León, S., Gutiérrez T, R., Vázquez F, M., & Radilla V, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>.
- Corral-Aguayo, R. D., Yahia, E. M., Carrillo-Lopez, A., & González-Aguilar, G. (2008). Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight

Horticultural Crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10498-10504. <https://doi.org/10.1021/jf801983r>.

González, D. (2007). *El complejo enzimático citocromo p450 en las plantas*. 7.

Jiménez, G., Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 21.

Khalid, M., Bilal, M., & Huang, D. (2019). Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens — A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(1), 211-230. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62555-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62555-4).

Kim, I.-S., Yang, M.-R., Lee, O.-H., & Kang, S.-N. (2011). Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(6), 4120-4131. <https://doi.org/10.3390/ijms12064120>.

Kubola, J. & Siriamornpun, S. 2011. Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127, 1138-1145.

Majdalawieh, A., & I Carr, R. (2010). In vitro Investigación of the Potential Immunomodulatory and Anti-Cáncer Activities of Black Pepper (*Piper nigrum*) and Cardamom (*Elettaria cardamomum*). *Journal of medicinal food*, 13, 371-381. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.1131>.

Mercado, G. M., Laura, A., Medrano, A. W., Díaz, J. A. L., & Parrilla, E. Á. (2013). COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIAS TÍPICAS. *NUTRICION HOSPITALARIA*, (1), 36-46. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>.

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Proyecto AdA-Integración, (2014). Perfil comercial Cardamomo. Guatemala.

Qiblawi, S., Dhanarasu, S., & Faris, M. A. (2015). Chemopreventive Effect of Cardamom (*Elettaria cardamomum* L.) Against Benzo(α)Pyrene-Induced Forestomach Papillomagenesis in Swiss Albino Mice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cáncer*, 34(2), 95-104.

- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radicals in Biology and Medicine*: 26(9/10), 1231– 1237.
- Ríos, L., Lopera, G., Caicedo, R., Granda, F., Montoya, A., Restrepo, G., & Suárez, R. (2007). *Extraction and characterization of cardamom oil (Elettaria cardamomum)*. 6.
- Robert, M., Reyes, J., & Loyola, V. (1991). Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas in vitro.
- Roopan, S. M., & Madhumitha, G. (Eds.). (2018). *Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview*. Recuperado de <https://www.springer.com/gp/book/9783319742090>.
- Sánchez-Calvo, L., & Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Callus formation of cell suspensions in *Uncaria tomentosa* (cat's claw). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), 105. <https://doi.org/10.18845/tm.v28i1.2195>.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Suhaj, M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 531-537. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.11.005>.
- Villada, M. E., Millán, L. de J., Peláez, C. A., Arroyave, C., González, M. I., & Gil, M. A. (2017). Caracterización del aceite microencapsulado de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) extraído por fluidos supercríticos a escala semi-industrial. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20(0). <https://doi.org/10.1590/1981-6723.09915>.

4.8 ANEXOS

Determinación de fenoles totales

Preparación de disoluciones:

- a) Disolución de carbonato de sodio al 20%.
- b) Disolución del reactivo de Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v).

Preparación de la curva de ácido gálico:

Pesar 12.5 mg de ácido gálico, disolver con 1 mL de etanol y aforar a 25 mL con agua destilada. A partir de esta disolución tomar las alícuotas indicadas y aforar a 1000 μL con aguadestilada.

Curva de ácido gálico

Alícuotas de disolución madre de ácido gálico (μL)	Agua destilada (μL)	Concentración final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
20	980	
40	960	
60	940	
80	920	
100	900	
120	880	
140	860	
160	840	
180	820	

Determinación de flavonoides totales

Preparación de los reactivos:

Preparación de 100 mL (disolución), de nitrito de sodio al 5%. En un vaso de precipitados disolver 5 g de nitrito de sodio con 30 mL de agua destilada, verter un matraz aforado de 100 mL. Realizar 2 lavados más al vaso de precipitados y finalmente aforar.

Preparación de 100 mL de disolución de cloruro de aluminio hexahidratado al 10%. En un vaso de precipitados disolver 10 g de cloruro de aluminio hexahidratado con 30 mL de agua destilada, verter un matraz aforado de 100 mL. Realizar 2 lavados más al vaso de precipitados y finalmente aforar.

Disolución de hidróxido de sodio al 5%. En un vaso de precipitados disolver 5 g de hidróxido de sodio con 30 mL de agua destilada, verter un matraz aforado de 100 mL. Realizar 2 lavados más al vaso de precipitados y finalmente aforar.

Curva de Trolox catequina:

Disolución stock: pesar 29 mg de catequina y aforar a 1 mL con metanol al 80%.

Colocar 250 μL de la disolución stock en un matraz aforado de 25 mL, aforando con metanol al 80%. A partir de esta disolución tomar las alícuotas indicadas y aforar a 1 mL en tubos eppendorf.

Curva de Trolox

Disl. std.	Alícuotas de la disolución stock de Trolox (μL)	mL de metanol al 80%
1	20	980
2	50	950
3	100	900
4	200	800
5	400	600
6	600	400
7	800	200
8	1000	0

*Colocar como blanco 0.5 mL de metanol al 80%.

Ensayo ABTS

Alícuotas de Trolox y metanol al 80%.

Disl. std.	Alícuotas de la disolución stock de Trolox (μL)	mL de metanol al 80%	Concentración final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	50	950	12.5
2	100	900	25
3	150	850	37.5
4*	200	800	50
5*	300	700	75
6	400	600	100
7	500	500	125
8	600	400	150

*disoluciones estándar se utilizarán en el paso 3.

Realizar pruebas previas con el extracto para determinar la concentración óptima. Seleccionando tres pozos de la microplaca, en el primero se deben colocar 20 μ L de la disolución estándar 4, en el segundo 20 μ L de la disolución estándar 5 y en el tercero 20 μ L de extracto puro y posteriormente agregar 180 μ L de disolución de ABTS, en cada uno de los pozos para llegar a un volumen final de 200 μ L. Esperar 10 min a que ocurra la reacción química, después se debe medir la absorbancia a 734 nm y comparar el color del extracto con el de las disoluciones 4 y 5. La disolución óptima del extracto será aquella que se encuentre en el intervalo de absorbancias de las disoluciones 4 y 5, por lo tanto el color de la disolución debe ser parecido.

Ensayo del radical libre DPPH

Disolución Stock:

Preparar 100 mL de una disolución 1mM DPPH 1 mL de acetona).

Metodología para preparar la disolución stock:

Para preparar la disolución 1 mM de DPPH se pesan 19.7 mg de DPPH y se agregan en un matraz aforado de 100 mL, posteriormente se disuelve con 1 mL de acetona y finalmente se afora con metanol al 80 %.

Metodología para preparar la curva de calibración de Trolox. De la disolución preparada anteriormente, tomar las alícuotas indicadas y aforar a 10 mL con metanol al 80 %

Curva de calibración de Trolox

μ L de la disolución stock Trolox (1mM)
50
100
150
200
300
400
500

Pruebas previas con el extracto:

Hacer pruebas para determinar la concentración de extracto, que degrade un 50 % del DPPH. Primero se utiliza el extracto puro, mezclando 200 µL con 50 µL de la disolución DPPH. El color de la mezcla (después de 15 min), debe ser rosa pálido. Si la decoloración ocurre antes de los 15 min y presenta un color amarillo, indica que tiene una alta capacidad antioxidante, por lo tanto, se deben hacer diluciones del extracto. Entonces, se recomienda hacer diluciones consecutivas 1:1 (500 µL de extracto con 500 µL de metanol al 80 %) hasta encontrar la concentración que proporcione una coloración rosa pálido.

La concentración debe dar una lectura entre 0.25-0.30 de absorbancia. Siendo esta la concentración ideal para realizar las diluciones del extracto.

Preparación de las diluciones del extracto

A partir de la disolución de extracto obtenida en el paso anterior, se toman las alícuotas que se indican y se diluyen con metanol para obtener un volumen final de 1000 µL (tubos eppendorf).

Ensayo FRAP

Preparación las siguientes disoluciones

DISOLUCIÓN 1: Preparar 100 mL de a una concentración 300 mM, PH=3.6. Pesar 4.624 g de acetato de sodio trihidratado ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$, PM= 82,0343 g/mol), y medir 18.2 mL de ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$, PM=60,05 g/mol). En un vaso de, disolver el acetato de sodio con 30 mL de agua destilada después verter la disolución al matraz aforado de 100 mL. Realizar tres enjuagues al vaso con agua destilada. Agregar el ácido acético glacial y finalmente aforar con agua destilada.

DISOLUCIÓN 2: Preparar 100 mL de una disolución 10 mM de TPTZ (2,4,6 Tripiridil-s triazina, PM=312.33) utilizando como disolvente HCl 40 mM en lugar de agua.

Preparación del HCl 40 mM

Preparar 250 mL de HCl 40 mM se colocando 200 mL de agua destilada en un matraz aforado de 250 mL y después agregar 1 mL de HCl concentrado y finalmente aforar.

Preparación del TPTZ 10 mM

Disolver 312.33 mg de TPTZ en un matraz aforado de 100 mL y aforar con HCl 40 mM.

DISOLUCIÓN 3: Preparar 100 mL de la disolución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mM (Iron (III) chloride hexahydrate, PM=270.30 g/mol).

Se pesan 54.03 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se colocan en un matraz aforado de 100 mL, se disuelve y se afora con agua destilada. Colocar en un frasco ámbar y cuando se utilice verificar que no haya precipitados.

Preparación de la disolución de FRAP.

En un frasco ámbar mezclar:

10 mL de buffer de acetato (300 mM);

1 mL de solución TPTZ (10mM) y

1 mL de solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM).

Curva de Trolox

Pesar 12.5 mg de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, PM 250.29), aforar a 50 mL con metanol al 80 %. A partir de esta disolución tomar las alícuotas indicadas en el Cuadro 8 y aforar a 1 mL.

Realizar pruebas previas con el extracto para determinar la concentración óptima. Seleccionar tres pozos de la microplaca, en el primero se deben colocar 20 μL de la disolución estándar 4, en el segundo 20 μL de la disolución estándar 5 y en el tercero 20 μL de extracto puro, posteriormente agregar 180 μL de disolución de FRAP en cada uno de los pozos, finalmente 60 μL de agua destilada para llegar a un volumen final de 260 μL . Esperar 10 min a que ocurra la reacción química, después medir la absorbancia a 595 nm y comparar el color

del extracto con el de las disoluciones 4 y 5. La disolución óptima del extracto será aquella que se encuentre dentro del intervalo de absorbancias de las disoluciones 4 y 5, por lo tanto el color de la disolución debe ser parecido.