

## Contenido de polifenoles totales en callos de *Theobroma cacao* L. clon 'UF-650'

Lillien Fajardo Rosabal<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7337-8122>

Yeilen Paula Figueredo Delgado<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0505-5874>

Ursula Rosabal Cordoví<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6616-6455>

Yans Guardia Puebla<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1347-0963>

Suyén Rodríguez Pérez<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8019-1315>

Juan José Silva-Pupo<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1049-5740>

Yosvel Viera Tamayo<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8185-8647>

<sup>1</sup>Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo km 17,5 Peralejo. Bayamo. Granma. Cuba. CP 85100.

<sup>2</sup>Laboratorio Farmacéutico de Líquidos Orales, Medilip. Carretera Central vía Santiago de Cuba kilómetro 845. Bayamo. Granma. Cuba.

<sup>3</sup>Centro de estudios de Química Aplicada, Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo km 17,5 Peralejo. Bayamo. Granma. Cuba. CP 85100.

<sup>4</sup>LABEX, Centro de Inmunología Molecular. Calle 23 y Carretera del Caney s/n. Santiago de Cuba. Santiago de Cuba. Cuba.

\*Autora para correspondencia: e-mail: lfajardor@udg.co.cu

### RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es de gran interés como fuente de compuestos de origen natural, y son los polifenoles los de mayor bioactividad. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el contenido de polifenoles totales en callos de *Theobroma cacao* clon 'UF-650'. Se obtuvieron callos desarrollados a partir de tres tipos de explantes: pétalos, estaminoides y hojas jóvenes. A estos, se les realizó la identificación cualitativa y cuantificación de polifenoles totales por espectrofotometría UV-visible según el ensayo de Folin-Ciocalteu. Los resultados mostraron la presencia de polifenoles totales en los callos obtenidos de los tres tipos de explantes. El mayor contenido de polifenoles totales ( $11.208 \mu\text{g g}^{-1}$ ) expresado como  $\mu\text{g}$  de pirocatecol por gramo de muestra fue encontrado en extracto de callos obtenidos a partir de estaminoides. Los resultados son promisorios para la producción de compuestos fenólicos por cultivo *in vitro* de *T. cacao* clon 'UF-650'.

Palabras clave: compuestos fenólicos, explantes florales, hojas jóvenes

### Total polyphenol content in callus of *Theobroma cacao* L. 'UF-650' clone

### ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is of great interest as a source of compounds of natural origin, and polyphenols are those with the highest bioactivity. The objective of this work was to determine the total polyphenol content in callus of *Theobroma cacao*, 'UF-650' clone. Calluses developed from three types of explants were obtained: petals, staminoids, and young leaves. To these, the qualitative identification and quantification of total polyphenols was performed by UV-visible spectrophotometry according to the Folin-Ciocalteu assay. The results showed the presence of total polyphenols in the calluses obtained from the three types of explants. The highest content of total polyphenols ( $11.208 \mu\text{g g}^{-1}$ ) expressed as  $\mu\text{g}$  of pyrocatechol per gram of sample was found in callus extract obtained from staminoids. The results are promising for the production of phenolic compounds by *in vitro* culture of *T. cacao* 'UF-650' clone.

Keywords: floral explants, phenolic compounds, young leaves

## INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son metabolitos secundarios presentes en todas las plantas vasculares, y constituyen una gran familia de compuestos altamente diversos con variada actividad biológica (Grootaert *et al.*, 2015). Miles de compuestos fenólicos se han caracterizados y agrupado en varias clases. Según Munin y Edwards-Lévy (2011), las variaciones están dadas esencialmente por el grado de oxidación, hidroxilación, metilación, glicosilación y posibles conexiones con otras moléculas (metabolitos primarios: carbohidratos, lípidos, proteínas, entre otros).

A estos compuestos se han atribuido actividades farmacológicas y médicas relacionadas con la prevención y/o mejora del estado de salud. Entre estas se destacan efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, estrogénicos e inhibidores de la fosfolipasa A2, de la cicloxigenasa, lipoxigenasa, glutatión reductasa y xantina oxidasa (Middleton *et al.*, 2000). Además, estos compuestos tienen utilidad para prevenir enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes (Carpene *et al.*, 2015).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) y sus derivados han recibido una atención diferenciada por su contenido de polifenoles. Los polifenoles de interés en el cacao son los del grupo de flavonoides, como las catequinas (37%), antocianinas (4%) y procianidinas (58%). Los flavonoides se destacan por su baja toxicidad y elevada acción antioxidante y su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica al reducir radicales libres y quelar metales (Negaresh y Marin, 2013). Son conocidos los diversos usos medicinales del cacao y el chocolate: antioxidante, antiinflamatorio antiparasitario, diurético, tonificante, anticelulítico e hipoglucemiante (Giraldo *et al.*, 2017).

Junto a la extracción directa a partir de materia vegetal o la síntesis química, se ha desarrollado el cultivo de células vegetales como una prometedora alternativa para la producción de compuestos bioactivos de difícil obtención o poco rentables (Pérez- Alonso y Jiménez, 2011). En este sentido, el empleo del cultivo de tejidos para la producción de

metabolitos secundarios se ha referido por varios autores (Verpoorte *et al.*, 2002; Espinosa Leal *et al.*, 2018) y en particular de compuestos fenólicos (Gonçalves y Romano, 2018). Como la acumulación de metabolitos activos es genotipo específico, es necesaria una apropiada selección de las especies y luego los órganos de dónde tomar los explantes para la obtención por ejemplo de callos (Murthy *et al.*, 2014; Ochoa-Villarreal *et al.*, 2016).

Las investigaciones para la obtención de polifenoles del cacao se han realizado mayormente en planta natural (Padilla *et al.*, 2008; Hii *et al.*, 2009; Sotero *et al.*, 2011; Ordoñez *et al.*, 2019; Indiarío *et al.*, 2019) y productos derivados (Hii *et al.*, 2009). A partir del cultivo *in vitro* ha sido abordada a partir de callos, raíces, hojas, peciolo, cotiledones (Marziah *et al.*, 1993) y callos con estructuras embriogénicas obtenidos de explantes florales (Quiñones-Galvez *et al.*, 2016).

En estudios histológicos a partir del cultivo *in vitro* de explantes florales se ha relacionado la distribución de estos compuestos con la respuesta embriogénica del callo (Gallego *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que la respuesta a la producción de polifenoles es genotipo-dependiente (Quiñones *et al.*, 2013; Gallego *et al.*, 2016). Estudios previos informaron que el clon 'UF-650' es promisorio para la obtención de metabolitos secundarios, entre ellos fenoles totales y taninos que difunden al medio de cultivo (Fajardo *et al.*, 2015). Sin embargo, no se han identificado ni cuantificado los compuestos fenólicos presentes.

Por otra parte, aún son insuficientes los trabajos relacionados con la obtención de estos compuestos en el cultivo *in vitro* y el empleo de métodos más eficientes para la identificación de la presencia de polifenoles en estos tipos de muestra. Atendiendo a lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el contenido de polifenoles totales en callos de *Theobroma cacao* clon 'UF-650'.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) de la Universidad de Granma, Cuba.

### Material vegetal

Hojas y botones florales de plantas adultas de *Theobroma cacao* clon 'UF-650' se recolectaron en el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental III Frente, Santiago de Cuba. La identificación de la especie se realizó en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma según la Norma Ramal de Salud Pública 309 (NRSP, 1992), confirmada por el especialista de la estación experimental y depositada con el número 3012 del herbario del Jardín Botánico Cupaynicú, serie Catasús. Para la obtención de los callos se utilizaron estaminoides y pétalos de botones florales inmaduros y hojas jóvenes.

### Formación de callos

Previo al establecimiento *in vitro*, las hojas se lavaron en solución de detergente al 1.0% (m/v) en agitación (zaranda) durante 15 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, se sumergieron en solución al 2.0% (v/v) de hipoclorito de sodio (NaClO), en condiciones asépticas durante 15 minutos. Finalmente, se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril. Con ayuda del bisturí, se tomaron como explantes secciones de aproximadamente 1.0 cm<sup>2</sup> de la zona más cercana a la nervadura central.

Los botones florales fueron sumergidos en solución de detergente al 1.0% (m/v) durante 30 minutos con agitación (zaranda), seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego en área aséptica, se sumergieron en solución de NaClO (2.0%) (v/v) durante 20 minutos, seguido de cuatro enjuagues con agua destilada estéril. Para su establecimiento en condiciones asépticas, se extrajeron los pétalos y estaminoides.

El medio de cultivo estuvo compuesto por: Sales MS (Murashige y Skoog, 1962) (4.32 g l<sup>-1</sup>), vitaminas LB (López-Báez *et al.*, 1993) (10 ml l<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg l<sup>-1</sup>), glicina (3.0 mg l<sup>-1</sup>), sacarosa (40 g l<sup>-1</sup>), kinetina (0.25 mg l<sup>-1</sup>), ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (2.0 mg l<sup>-1</sup>) y agar E (BioCen) (6.0 g l<sup>-1</sup>). El medio de cultivo fue distribuido, en frascos de 25 ml de capacidad, a razón de 10 ml por frasco. Antes de la esterilización en autoclave, se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.7.

El pesaje de los reactivos utilizados en la preparación del medio de cultivo se realizó en la balanza analítica (SARTORIUS). La esterilización del instrumental y del medio de cultivo se efectuó en autoclave vertical a 121 °C y 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 15 minutos. La manipulación del material vegetal se realizó en cabinas de flujo laminar (FASTER), y se empleó para la desinfección etanol al 70% (v/v).

Los pétalos y estaminoides se colocaron a razón de cinco explantes por frasco de cultivo y los segmentos de hoja a razón de dos explantes por frasco, para un total de 50 frascos por cada tipo de explante. La incubación se realizó en oscuridad a 25 ± 2 °C. A los 28 días de cultivo se cuantificó el número de explantes que formaron callos y se expresó como porcentaje de callogénesis. Los callos fueron mantenidos bajo sus mismas condiciones de cultivo por tres meses con el objetivo de aumentar la biomasa fresca para obtener extractos a partir ellos y se evaluó el grado de desarrollo según escala referida por Díaz-López *et al.* (2015). Los resultados fueron expresados como porcentaje de callos en el grado de desarrollo.

### Contenido de polifenoles

Para obtener extractos de los callos e identificar cualitativamente la presencia de polifenoles se emplearon callos de tres meses de cultivo provenientes de diferentes explantes en las condiciones descritas previamente. Se siguió el método propuesto por Folin-Ciocalteu (Suárez-Peregrin, 1972). Se tomó un 1.0 g de callo obtenido a partir de cada tipo de explante y se le añadieron 10 ml de una mezcla de acetona/agua (1:1 v/v), se mantuvo durante 24 horas en frascos cerrados herméticamente a temperatura ambiente, en la oscuridad. Los extractos obtenidos se filtraron (0.45 µm) y de cada uno se tomó una alícuota de 1.0 ml, a la cual se le adicionaron dos gotas de reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac®) y dos gotas de hidróxido de sodio (NaOH) 30% (m/v), se agitó y dejó reposar durante cinco minutos. El ensayo fue positivo si se observó la aparición de coloración azul.

El contenido de polifenoles totales se estimó por espectrofotometría UV/Visible (Jenway 6305), siguiendo la metodología de determinación colorimétrica de fenoles solubles

en material vegetal, mediante el reactivo Folin-Ciocalteu (Ainsworth y Guillespie, 2007).

Se realizó previamente la curva de calibración con patrón pirocatecol p.a (Sigma-Aldrich) con ocho puntos, en el rango de concentraciones de 0 a 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Se utilizaron las siguientes soluciones: solución de carbonato de sodio ( $\text{CaCO}_3$ ) 0.7 M, solución stock de pirocatecol 500  $\text{mg l}^{-1}$  (en solvente acetona/agua 1:1 v/v) y solución de trabajo de pirocatecol 50  $\text{mg l}^{-1}$  (se diluyeron 10 ml de la solución stock de pirocatecol a 100 ml con la mezcla acetona/agua (1:1 v/v)).

Aleatoriamente se escogieron muestras de callos hasta obtener 1.0 g de masa fresca proveniente de los diferentes explantes, se le añadieron 10 ml de una mezcla de acetona/agua (1:1 v/v) para formar extractos provenientes de cada tipo de explante (tres extractos). Luego de transcurridas 48 horas en maceración, el extracto obtenido se filtró (Milipore 0.45  $\mu\text{m}$ ). Después se tomó 1.0 ml del filtrado de cada extracto, se le agregaron 2.0 ml de reactivo Folin-Ciocalteu y, a los dos minutos, se adicionaron 8.0 ml de la solución de  $\text{CaCO}_3$  (0.7 M). Se dejó desarrollar color, de igual forma que se hizo para la curva de calibración con patrón pirocatecol. Las lecturas fueron realizadas a  $\lambda=760\text{ nm}$ , luego de transcurridos 30 minutos para desarrollo de color, para cada punto, y se realizaron tres lecturas por punto.

El contenido de compuestos fenólicos expresados en  $\mu\text{g}$  de pirocatecol por gramo de masa fresca, se determinó por medio de la ecuación:  $\text{Contenido} = ((C_{\text{ex}} \cdot V_{\text{ex}})/Pm) \cdot 1000$ . Donde, Pm es la masa de la muestra (g),  $V_{\text{ex}}$  es el volumen del extracto utilizado, y  $C_{\text{ex}}$  es la concentración encontrada en el extracto (según curva de calibración).

#### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el programa STATGRAPHICS Centurion XV (Trial versión 15.2.06). Para comprobar la normalidad de los datos del contenido de polifenoles totales se realizó la prueba de Kormogorov- Smirnov; mientras, la prueba de Cochran se utilizó para verificar la homogeneidad de varianzas. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significación y la prueba de Tukey cuando se detectaron diferencias significativas, al 95% de probabilidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Formación de callos

La calogénesis se observó a partir de los 15 días de cultivo en explantes florales. Este resultado se corresponde con lo informado por Díaz-López *et al.* (2015), quienes observaron un inicio de la calogénesis a los 14 días en explantes florales en cinco clones venezolanos ('SCA-6', 'OC-61', 'OC-77', 'CHO-41' y 'PORC'). A los 28 días, se obtuvo un 86.13% de formación de callos a partir de pétalos y 83.46% a partir de estaminoides. Sin embargo, en explantes de hojas, este evento comenzó a partir del quinto día; pero estos callos presentaron un lento desarrollo, por lo que se observó a los 28 días sólo un 55% de formación de callos. Resultados similares con mayor porcentaje de formación de callos en explantes florales (85%) que en hojas (65%) informó Pancaningtyas (2015) en el clon 'Sulawesi 1', de Indonesia.

Los callos obtenidos a partir de pétalos y estaminoides fueron color amarillo crema, de consistencia friable, formados de forma general a partir de la base del explante (Figura 1 b y c). Los resultados se correspondieron con los descritos previamente por Rodríguez *et al.* (2004) en este clon, pero solo a partir de estaminoides, con la formación de callos de color amarillo-crema a partir de la base del explante.

Los resultados concuerdan además con lo informado por autores como Díaz-López *et al.* (2015) quienes, utilizando explantes florales, observaron en callos formados de estaminoides provenientes de diferentes cultivares venezolanos, una coloración amarillo crema y consistencia compacta. Por otra parte, a partir de pétalos, observaron callos de apariencia y consistencia más friable y con la misma coloración amarillo crema.

En esta investigación, los callos a partir de estaminoides, presentaron en ocasiones, zonas nodulares que se tornaron de color pardo, al parecer por la acumulación de polifenoles. Al respecto, autores como Gallego *et al.* (2016), han observado que callos compactos, contienen de forma aleatoria, polifenoles en todo el tejido y plantean que la capacidad embriogénica parece estar relacionada con el balance, concentración y distribución de polifenoles.

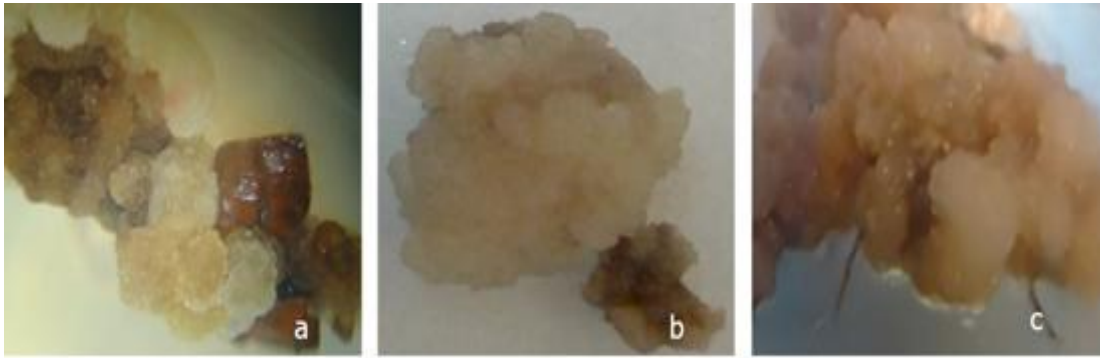


Figura 1. Callos de *Theobroma cacao* L. clon 'UF-650' obtenidos a los 3 meses de cultivo a partir de tres tipos de explantes. a. hojas, b. pétalos, c. estaminoides.

Los callos obtenidos de pétalos y estaminoides no mostraron estructuras embriogénicas. Respecto a ello, Ikeuchi *et al.* (2013) clasifican los callos friables y nodulares o compactos, como aquellos que típicamente no son ni embriogénicos, ni organogénicos.

A partir de hojas, se observaron tanto callos friables como nodulares; o en un mismo callo, se presentaron zonas tanto nodulares como friables (Figura 1 a). Los callos obtenidos a partir de hojas, generalmente, tuvieron poco desarrollo debido a un crecimiento lento, resultado de una limitada multiplicación. Esta respuesta pudo estar dada por la acción de compuestos fenólicos en las zonas nodulares, en las cuales se ha inhibido la actividad auxínica que promueve el desarrollo del callo. Los flavonoides pueden ser inhibidores del transporte de auxinas (Peer y Murphy, 2007; Zhou *et al.*, 2016) y modulan la actividad de proteínas (Zhou *et al.*, 2016).

A los tres meses de cultivo, se obtuvo un 80.74, 70.73 y 58% de callos que alcanzaron grado 3 de desarrollo, provenientes de pétalos, estaminoides y hojas, respectivamente, de los cuales se escogieron al azar, para la obtención de extractos.

#### Contenido de polifenoles

El ensayo cualitativo para la identificación de la presencia de polifenoles (Figura 2), resultó positivo para todas las muestras evaluadas, al desarrollarse una coloración azul en todos los casos. El método para la identificación de polifenoles totales Folin-Ciocalteu se fundamenta en su carácter reductor. Se utiliza el mismo principio que la técnica utilizada para

la cuantificación utilizando como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, que origina óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) (Kuskoski *et al.*, 2005). Para la cuantificación el medio básico es la solución de  $CaCO_3$  (0.7 M) y para la identificación el medio básico es una solución de NaOH al 30% (7.5 M), lo cual permite una mayor sensibilidad del método al utilizarse una base más fuerte y más concentrada que aumenta la velocidad de la reacción y su capacidad para la detección de la presencia de polifenoles, siendo más rápido y económico. Esto garantiza que se pueda hacer una correcta discriminación de los mismos antes de pasar a la determinación cuantitativa.

Estos resultados corroboran lo informado por Alemanno *et al.* (2003) que a través de un estudio histoquímico en explantes florales y callos obtenidos a partir de estos en *T. cacao*, observaron presencia de polifenoles que estuvieron localizados fundamentalmente en la epidermis. Otros autores como Ricchelle *et al.* (2001), Hii *et al.* (2009), Negaresh y Marin (2013) y Quiroz-Reyes *et al.* (2013), identificaron polifenoles en cacao y en productos derivados. La presencia de dichos compuestos es común en esta especie.

Mediante la cuantificación de compuestos fenólicos por espectrofotometría UV/Visible, usando como patrón pirocatecol según el protocolo descrito por Ainsworth y Gillespie (2007), se demostró el cumplimiento de la linealidad y exactitud en el intervalo de concentración de 0 a  $50 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $y = 0.0241x - 0.0018$ ;  $R^2 = 0.9994$ ).



Figura 2. Resultado de ensayo de identificación cualitativa de polifenoles en extractos obtenidos a partir de callos de hojas, estaminoides y pétalos de *Theobroma cacao* L. clon 'UF-650'.

El mayor contenido de compuestos fenólicos expresado como  $\mu\text{g}$  de pirocatecol por gramo de muestra se obtuvo en callos de estaminoides ( $11.208 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Tabla 1), con diferencias significativas respecto a los otros dos tipos de explantes. Esta respuesta pudo deberse a que en callos de estaminoides se observaron zonas nodulares, duras, de coloración parda, por el proceso de acumulación de compuestos fenólicos (Gallego *et al.*, 2016).

En el caso de los pétalos, al ser más homogéneos en su coloración y consistencia friable, presentaron más actividad de multiplicación celular, lo que resulta en menor acumulación de polifenoles en las células (Hopkins, 1999; Isah, 2019). Gran parte de los compuestos fenólicos producidos pudieron ser de bajo peso molecular y difundidos al medio de cultivo; por lo cual no se cuantificaron en el callo. Tanto el contenido, como la composición de polifenoles pudo variar en dependencia del origen y grado de desarrollo de los callos. Esto está en correspondencia con lo informado por Pérez-Alonso y Jiménez (2011), quienes plantearon que la composición química de un callo, suele variar dependiendo de su fuente de explante o tejido materno y la edad del callo en sí. La biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a períodos de estrés. Por ello, si se emplearan los callos de este clon para la producción de compuestos fenólicos sería necesario seleccionar las condiciones de cultivo que propicien un incremento en su contenido.

Sin embargo, los resultados difirieron de los informados por Quiñones *et al.* (2013) que al estudiar el contenido de fenoles en el cultivo de callos embriogénicos de cacao, a partir de nucelas, estaminoides y pétalos; pero con ácido clorogénico como patrón, no observaron diferencias entre el contenido en callos de pétalos y estaminoides. Estos autores obtuvieron para el clon 'UF-654',  $4.5$  y  $4.2 \text{ mg g}^{-1}$ , en callos formados a partir de estaminoides y pétalos respectivamente, según patrón ácido clorogénico, valores superiores a los alcanzados en este trabajo. Por otra parte, estudios realizados por Pancaningtyas (2015) en el clon 'Sulawesi 1', pero en base a patrón ácido gálico, obtuvieron fenoles totales (1.0%), flavonoides totales (3.2%) y catequinas totales (4.2%) en extractos de callos de explantes florales y en extractos de callos a partir de explantes hojas, con porcentajes de 0.67; 2.1 y 7.0% de fenoles totales, flavonoides totales y catequinas totales, respectivamente.

En la literatura científica consultada, existen pocos trabajos referidos a identificación y cuantificación *in vitro* de estos compuestos fenólicos en *T. cacao*. Generalmente, los estudios realizados en cacao son en planta natural, el chocolate y productos derivados. Por ejemplo, autores como Ortega *et al.* (2007) observaron que el cacao contiene un elevado nivel de fenoles y flavonoides en comparación con el Té negro, el Té verde y el vino rojo.

Tabla 1. Contenido de polifenoles (expresados como  $\mu\text{g g}^{-1}$  de pirocatecol por gramo de muestra) en muestras de callos de *Theobroma cacao* L. clon 'UF-650' obtenidos a partir de hojas jóvenes y botones florales.

Callo obtenido de	Concentración ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	EE
Estaminoides	11.21a	$0.19 \cdot 10^{-2}$
Pétalos	0.91 c	$0.33 \cdot 10^{-3}$
Hojas jóvenes	7.34b	$0.58 \cdot 10^{-3}$

Medias con letras desiguales difieren significativamente según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ )

Aunque las concentraciones de fenoles totales son bajas si se comparan con registros de otras partes de la planta de *T. cacao*, los resultados mostrados, son promisorios en cuanto a la actividad biológica variada que pudieran mostrar los compuestos obtenidos *in vitro* a partir de los callos. Distintos autores han determinado que existe una correlación lineal positiva entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante (Indiarto *et al.*, 2019; Ordoñez *et al.*, 2019; Ebuehi *et al.*, 2019).

En este sentido, Padilla *et al.* (2008), cuantificaron polifenoles a partir 1.0 g de muestra de semilla de cacao y obtuvieron una concentración de  $6.66 \pm 0.044$  AGE g/100 g (ácido gálico equivalente g/100g). Por otra parte, Sotero *et al.* (2011), estudiando cuatro especies de la familia Sterculiaceae: *Theobroma cacao* L., *Herrenia nitida* (Poepp) Schultes, *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) Schum y *Theobroma bicolor* (Humb y Bomp); obtuvieron la mayor concentración de polifenoles en semillas de cacao con 12101.46 mg/100 g, referido a patrón catequina. También, Indiarto *et al.* (2019) cuantificaron concentraciones en semillas de cacao de 207.14-721.83 mg  $\text{g}^{-1}$  AGE.

Se comprobó que es posible la producción de polifenoles en los tres tipos de callos evaluados, los que pueden servir como punto de partida para la implementación de técnicas alternativas para el incremento de su producción mediante cultivo *in vitro*. Dado a los elevados costos en la obtención de metabolitos secundarios por vías tradicionales y de síntesis química, resultan de gran interés los estudios encaminados a la producción de metabolitos secundarios

utilizando métodos biotecnológicos. Por tanto, las técnicas de cultivo *in vitro*, son ahora indispensables no sólo para la producción de plantas libres de microorganismos patógenos, rápida multiplicación de cultivares de interés y transformación del genoma de la planta; sino también, para la producción de metabolitos secundarios derivados de plantas (Debnarh *et al.*, 2006; Altpeter *et al.*, 2016).

Por otra parte, generalmente para estudios preliminares de contenido de metabolitos secundarios, generalmente se emplean métodos de tamizaje fitoquímico para comprobar la presencia de familias de compuestos en las muestras. Ello persigue como finalidad guiar ensayos tanto biológicos, como químicos previos al empleo de análisis químico de tipo cuantitativo. El proceso de selección del método depende del tipo de compuesto que se necesita producir, si el producto de interés es un pigmento, puede ser empleado un método espectrométrico; si no, otros basados en la aproximación química son necesarios (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2016; Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

En el presente trabajo se empleó como método de identificación de polifenoles totales, una variante de la técnica de Folin-Ciocalteu (Suárez-Peregrin, 1972). En ella se utiliza como medio básico una solución de hidróxido de sodio al 30% que aumenta la sensibilidad de la técnica, capaz de detectar muy bajas concentraciones de polifenoles y que puede sustituir al tamizaje fitoquímico, previo a la utilización de métodos de cuantificación, en extractos provenientes de cultivo *in vitro*. Además, emplea poco tiempo y es de bajo costo. No

se encontró en la literatura científica consultada la utilización anterior de esta técnica para este fin.

## CONCLUSIONES

Callos obtenidos de tres tipos de explantes en *Theobroma cacao* L. clon 'UF-650' contienen polifenoles totales. La mayor concentración (11. 208 µg g<sup>-1</sup>) expresados como pirocatecol, se obtiene a partir de callos de estaminoides. Este resultado es una referencia para el escalado en medios de cultivo líquidos de la producción de polifenoles totales, que puede ser asistido por técnicas de ingeniería metabólica.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada en el marco del proyecto VLIR: *In vitro Plant Biotechnology to increase food security in eastern Cuba*. CU 2017 TEA 438 A103. Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

### Conflicto de interés

Los autores no declaran conflicto de intereses.

### Contribución de los autores

Conceptualización LFR y UMRC, Análisis formal YGP y URC, Adquisición de fondos JSP, Investigación LFR, URC, YFD y YVT, Metodología LFR y URC, Recursos JSP y SRP, Supervisión SRP, Escritura-Primera redacción LFR, URC y YGP, Escritura-Revisión y Edición LFR y URC.

## REFERENCIAS

Ainsworth EA, Guillespie KM (2007) Estimation of phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2: 875-877

Alemanno L, Ramos T, Gargadene A, Andary C, Ferriere N (2003) Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Ann Bot* 92: 613-623

Altpeter F, Springer NM, Bartley LE, Blechl AE, Brutnell TP, Citovsky V, Conrad L, Gelvin SB, Jackson D, Kausch AP, Lemaux PG, Medford

Jl, Orozco-Cardenas M, Tricoli D, VanEck J, Voytas DF, Walbot V, Wang K, Zhang ZJ, Stewart CN (2016) Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell* 28: 1510-1520; doi: 10.1105/tpc.16.00196

Carpene C, Gomez-Zorita S, Deleruyelle S, Carpena MA (2015) Novel strategies for preventing diabetes and obesity complications with natural polyphenols. *Curr Med Chem* 22: 150-164

Debbarh M, Malik CP, Baisen PS (2006) Micropropagation: a tool for the production of high quality plant based medicines. *Curr Pharm Biotechnol* 7: 33-49

Díaz-López AA, Sánchez D, Valera-Leal J, Vegas AL (2015) Formación de embriones somáticos en cinco cultivares de *Theobroma cacao* L. cultivados en Venezuela. *Biotecnología Vegetal* 15(1): 27-34

Ebuehi OAT, Anams C, Gbenle OD, Ajagun Ogunleye MO (2019) Hydro ethanol seed extract of *Theobroma cacao* exhibits antioxidant activities and potential anticancer property. *J Food Biochem*: e12767; doi: 10.1111/jfbc.12767

Espinosa Leal CA, Puente Garza CA, García Lara S (2018) *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* 248: 1-18; doi: 10.1007/s00425-018-2910-1

Fajardo L, Silva JJ, Viera Y, Cobas Y (2015) Efecto del ácido salicílico sobre la formación de callos en tres clones de *Theobroma cacao* L. *Biotecnología Vegetal* 15(4): 217-225

Gallego AM, Henao AM, Urrea AI, Atehortúa L (2016) Polyphenols distributions and reserve substances analysis in cacao somatic embryogenesis. *Acta Biol Colomb* 21(2): 335-345; doi: 10.15446/abc.v21n2.50196

Giraldo M, Toro JM, Arango, CM, Posada, LG, García HI (2017) Ensayo clínico aleatorizado y controlado del efecto del consumo de cacao en pacientes con resistencia a la insulina. *Acta Médica Colombiana* 42(2): 90-96

Gonçalves S, Romano A (2018) Biotechnological approaches for the



- propagation of anticancer plants and the production of vital compounds. En: Akhtar MS, Swamy MK (eds). Anticancer plants: natural products and biotechnological implements, pp. 507-527. Springer Nature Singapore; doi: 10.1007/978-981-10-8064-7\_21
- Grootaert SK, Capanoglu E, Van Camp J (2015) Cell systems to investigate the impact of polyphenols on cardiovascular health charlotte. *Nutrients* 7: 9229–9255; doi: 10.3390/nu7115462
- Hii CL, Law CL, Suzannah, S, Misnawi, Cloke M (2009) Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *As J Food Ag-Ind* 2(4): 702-722
- Hopkins WC (1999) Introduction to Plant Physiology 2<sup>nd</sup> ed. Wiley & Sons, New York; ISBN: 0-471-19281-3
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A (2013) Plant Callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25: 3159-3173
- Indiarto R, Pranoto Y, Santoso U, Supriyanto (2019) *In vitro* Antioxidant Activity and Profile of Polyphenol Compounds Extracts and their Fractions on Cacao Beans. *Pak J Biol Sci* 22(1): 34-44
- Isah T (2019) Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research* 52: 39; doi: 10.1186/s40659-019-0246-3
- Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R (2005) Aplicación de distintos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpas de frutos. *Ciênc Tecnol Aliment* 25: 726-732
- López-Báez O, Bollon H, Esque S (1993) Embryogénese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 316: 579-584
- Marziah M, Iyer KDN, Muse R (1993) Production of polyphenols in cultured tissues of cocoa, *Theobroma cacao*. En: You CB (eds). *Biotechnology in Agriculture*, pp. 328-331. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol* 52: 673-839
- Munin A, Edwards-Lévy F (2011) Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds: a Review. *Pharmaceutics* 3: 793-829; doi: 10.3390/pharmaceutics3040793
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 118: 1-16
- Negaraesh S, Marin I (2013) El cacao y la salud humana: propiedades antioxidantes del cacao nicaragüense y productos alimenticios comercializados. *Rev Agroforestería de las Américas Managua* 49: 93-98
- NRSP (1992) Norma Ramal de Salud Pública 309, Droga cruda Métodos de ensayos. La Habana, Cuba
- Ochoa-Villarreal M, Howat S, Hong SM, Jang MO, Jin YW, Lee EK, Loake GJ (2016) Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Rep* 49(3): 149-158
- Ordoñez ES, Leon-Arevalo A, Rivera-Rojas H, Vargas E (2019) Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), uva (*Vitis vinifera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria* 10(2): 175-183
- Ortega N, Romero MP, Macia A, Reguant J, Angles N, Morello JR, Motilva MJ (2007) Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *J Agric Food Chem* 56: 9621-9627
- Padilla FC, Rincón AM, Bou-Rached L (2008) Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 58(3): 303-308

- Pancaningtyas S (2015) Study on the presence and influence of phenolic compounds in callogenesis and somatic embryo development of cacao (*Theobroma cacao* L.). Pelita Perkebunan 31(1): 14-20
- Peer WA, Murphy AS (2007) Flavonoids and auxin transport: Modulators or regulators? Trends Plant Sci 12(4): 556-563
- Pérez-Alonso N, Jiménez E (2011) Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. Biotecnología vegetal 11(4): 195-211
- Quiñones J, Trujillo R, Capdesuñer Y, Quirós Y, Hernández M (2013) Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). Revista Cubana de Plantas Medicinales 18(2): 201-215
- Quiñones-Galvez J, Hernández de la Torre M, Quirós Y, Capdesuñer Y, Trujillo R (2016) Factors controlling phenol content on *Theobroma cacao* callus culture. Cultivos Tropicales 37: 118-126; doi: 10.13140/RG.2.1.4038.1047
- Quiroz-Reyes CN, Aguilar-Mendez MA, Ramirez-Ortiz ME, Ronquillo-De Jesus E (2013) Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). Revista mexicana de Ingeniería Química 12(1): 11-18
- Ricchelle M, Tavazzi I, Offord E (2001) Comparison of the anti-oxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (Coffee, Cocoa and Tea) prepared per cup serving. J Agric Food Chem 49: 3438-3442
- Sotero V, Maco M, Vela J, Merino C, Dávila E, García D (2011) Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia *Sterculiaceae*. Rev Soc Quím Perú 77(1): 66-74
- Suárez-Peregrin E (1972) Manual técnico de análisis clínicos 9<sup>na</sup> ed. Prieto, Granada
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for production of plant secondary metabolites. Phytochem Rev 1(1):13-25; doi: 10.1023/A: 1015871916833
- Zhou T, Yang X, Guo K, Deng J, Xu J, Gao W, Lindsey K, Zhang X (2016) Embryogenesis via the Regulation of Auxin Signaling in Cotton. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology 15(6): 2108-2124

Recibido: 23-01-2020

Aceptado: 19-02-2020

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.