



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de sistemas biotecnológicos de pitahaya (*Hylocereus megalanthus*)
como sustituto alimentario

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingenieros Biotecnólogos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autores: Jennifer Elizabeth Corella Moncada

Jorge Luis Solis Zambrano

Tutor: Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

Ambato – Ecuador

Septiembre – 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 19 de julio del 2023

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

1803601853

TUTOR

AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Jennifer Elizabeth Corella Moncada y Jorge Luis Solis Zambrano, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las referencias bibliográficas.



Jennifer Elizabeth Corella Moncada

1804204103

AUTOR



Jorge Luis Solis Zambrano

1804357984

AUTOR

DERECHOS DEL AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedemos los derechos en línea patrimoniales de nuestro Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



Jennifer Elizabeth Corella Moncada

1804204103

AUTOR



Jorge Luis Solis Zambrano

1804357984

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente de Tribunal

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

1802726628

Mg. Juan de Dios Espinoza Moya

1803201431

Ambato, 23 de agosto de 2023

DEDICATORIA

*A **Dios**, el todo, que es uno conmigo y yo uno con él. Mi fortaleza, mi escudo y mi lanza en toda situación de mi vida.*

*A mi madre **Esthela**, reina y amor de mi vida, promotora de mis sueños quien es y ha sido mi oráculo de vida, ejemplo de amor y resiliencia.*

*A mi padre **Luis**, ángel por siempre de cada paso que doy, que desde lo eterno sigues enseñándome, ejemplo de entereza y coraje.*

*A mi hermana **Viviana**, que con su cariño y risueño ser me ha empujado a estar motivado en toda esta etapa y recordado que soy ejemplo de que todo se logra.*

*A mis **tíos y primos** quienes han sido un pilar de apoyo y motivación ante cualquier adversidad.*

*A mis abuelitos **Rosa y Luis** que también desde lo eterno con el todo son ángeles de mis andares.*

Jorge Luis Solís Zambrano

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por todas las bendiciones brindadas, por permitirme seguir creciendo a lado de las personas que más amo y por su motivación para luchar por mis objetivos.

Agradezco a mis padres por ser el pilar fundamental en mi vida, a mis hermanos por acompañarme en este arduo camino, a mi abuelita que nunca quitó su pensamiento en mí y a mi mascota Valentina por siempre recibirme en casa llena de alegría.

A mi tutora que con su sabiduría pudo brindarme su apoyo incondicional y ser guía para completar esta etapa de mi vida.

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato por abrirme sus puertas a su noble institución, por acogerme y prepararme académicamente y moralmente para el campo laboral.

Jennifer Elizabeth Corella Moncada.

AGRADECIMIENTO

Agradezco con todo mi ser a Dios, por brindarme una historia más para mi colección de vida.

A toda mi familia, quienes fueron motor y pilar en cada paso que he atravesado durante toda esta etapa.

A la Dra. Liliana Lalaleo por la confianza, tiempo y paciencia que depositó en mí para iniciar este proyecto. Por sus conocimientos compartidos y palabras de vida.

A la Universidad Técnica de Ambato, en especial la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por ser los medios que me hicieron llegar aquí y darme un panorama de vida para el futuro.

A todas las personas e historias que se me han cruzado en esta etapa universitaria e hicieron posible culminar esta meta.

Que los sueños sirvan para no olvidar quienes somos y quienes debemos ser.

Jorge Luis Solis Zambrano

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
DERECHOS DEL AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
AGRADECIMIENTO.....	viii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	xv
RESUMEN EJECUTIVO	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. La pitahaya, origen y distribución	3
1.1.2. La pitahaya en el Ecuador	3
1.1.3. Taxonomía.....	4
1.1.4. Características fisicoquímicas y valor nutricional	4
1.1.5. Micropropagación de la pitahaya.	5
1.1.6. Células vegetales	6
1.1.7. Perspectivas a futuro	7
1.2. Objetivos.....	8

1.2.1. Objetivo general	8
1.2.2. Objetivos específicos.....	8
CAPÍTULO II	9
METODOLOGÍA	9
2.1. Materiales	9
2.2. Métodos.....	10
2.2.1. Obtención de material vegetal.....	10
2.2.2. Tratamiento y desinfección de semillas	11
2.2.3. Micropropagación <i>in vitro</i>	12
2.2.4. Optimización de medios de cultivo.....	13
2.2.5. Disgregación celular	15
2.2.6. Escalamiento de cultivos celulares (curva de crecimiento)	15
2.2.7. Análisis de grasa (con hidrólisis)	17
2.2.8. Análisis de fibra dietética total (enzimática).....	17
2.2.9. Análisis de carbohidratos totales, cenizas y proteínas	17
2.2.10. Determinación de pH y sólidos solubles totales (STT)	17
2.2.11. Pretratamiento de la fruta y callo (DPPH, fenoles, flavonoides).....	18
2.2.12. Análisis de la capacidad antioxidante (DPPH).....	19
2.2.13. Análisis de fenoles	19
2.2.14. Análisis de flavonoides totales.....	19
CAPÍTULO III	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
3.1. Tratamiento de semillas para la obtención de plantas <i>in vitro</i> de pitahaya .	20
3.2. Optimización de medios de cultivo.....	21
3.3. Curva de crecimiento celular	28
3.4. Análisis de propiedades nutricionales.....	29
3.4.1. pH y sólidos solubles totales (SST).....	29

3.4.2. Análisis de la capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides	30
3.4.3. Análisis comparativo de la fruta y callos	34
CAPÍTULO IV	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
4.1. Conclusiones.....	37
4.2. Recomendaciones	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Equipos de laboratorio	9
Tabla 2. Reactivos de laboratorio.....	10
Tabla 3. Tratamientos para eliminación de residuos en semillas	11
Tabla 4. Formulaciones para los tratamientos de los medios de cultivo MS y B5 ...	14
Tabla 5. Tratamientos de semillas propuestos para la obtención de plántulas de pitahaya	20
Tabla 6. Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo MS.....	22
Tabla 7. Análisis cualitativo del crecimiento de callo en el medio MS después de 35 días.	23
Tabla 8. Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo B5.....	26
Tabla 9. Análisis cualitativo del crecimiento de callo en el medio B5 después de 35 días.	27
Tabla 10. Comparación entre valores evaluados y bibliográficos de las propiedades nutricionales de la pitahaya.	35
Tabla 11. Análisis de las propiedades nutricionales de la fruta y callo.....	36
Tabla 12. Descripción de los macronutrientes, micronutrientes y componentes orgánicos para un litro (L) de medio MS	48
Tabla 13. Descripción de los macronutrientes, micronutrientes y componentes orgánicos para un litro (L) de medio B5	49
Tabla 14. Fotografías de los análisis de la fruta y callo realizado por LACONAL ..	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variedades existentes de pitahaya (<i>Hylocereus</i> sp) - fruta.....	4
Figura 2. Proceso de micropropagación de pitahaya.	6
Figura 3. Ubicación de la finca en donde se obtuvo el material vegetal.....	11
Figura 4. Etapas de la desinfección de semillas.	12
Figura 5. Proceso de micropropagación in vitro de pitahaya (<i>H. megalanthus</i>) a partir de semillas.	13
Figura 6. Proceso de callogénesis e incremento de biomasa.	15
Figura 7. Proceso de disgregación celular, escalamiento de cultivos celulares y construcción de la curva de crecimiento	16
Figura 8. Determinación de sólidos solubles totales (STT) por método refractométrico	18
Figura 9. Crecimiento de raíz y callo en el tratamiento 5.	24
Figura 10. Monitoreo del crecimiento y adaptación de la biomasa celular en el medio optimizado.....	28
Figura 11. Curva de crecimiento celular en el medio óptimo.	29
Figura 12. Capacidad antioxidante por el método DPPH.....	31
Figura 13. Contenido de fenoles totales.....	33
Figura 14. Contenido de flavonoides totales.....	34
Figura 15. Curva de calibración de fenoles totales.	49
Figura 16. Curva de calibración de flavonoides.....	50
Figura 17. Análisis de cenizas.....	50
Figura 18. Análisis de humedad.....	50
Figura 19. Análisis de grasa.....	51
Figura 20. Proceso de cenizas y proteína	51
Figura 21. Procesos de digestión.....	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composición de medio B5	49
Anexo 2. Curvas de calibración de fenoles y flavonoides.	49
Anexo 3. Análisis realizados en LACONAL.....	50

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **2,4 D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
- **ANA:** Ácido 1-naftalenacético.
- **B5:** Medio Gamborg.
- **BAP:** 6-Bencilaminopurina o bencil adenina.
- **CH₃COOH:** Ácido acético.
- **Cotiledón:** Primeras hojas formadas a partir del embrión.
- **DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
- **FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- **INIAP:** Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
- **KIN:** Kinetina.
- **MS:** Medio Murashige & Skoog.
- **NaOH:** Hidróxido de sodio.
- **SST:** Sólidos solubles totales.
- **TDZ:** Tidiazurón

RESUMEN EJECUTIVO

El estudio consistió en evaluar sistemas biotecnológicos de pitahaya como sustituto alimentario. La agricultura celular brinda soluciones alimentarias y aumenta la producción a gran escala, estas tecnologías están surgiendo como una alternativa innovadora de alimentos del futuro.

Se realizó un tratamiento de semillas de pitahaya (solución ácida y básica, agua e incubación.), que permitió el desarrollo de plántulas *in vitro*. Una vez obtenidas las plantas, se indujo la callogénesis, con la optimización de medios de cultivo, en base a la composición de Murashige - Skoog y Gamborg, y diferentes fitohormonas: citoquininas (6-Bencilaminopurina y kinetina), auxinas (ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ácido naftalenacético). La biomasa obtenida permitió establecer suspensiones celulares, e identificar la curva de crecimiento. Finalmente, se comparó las propiedades nutricionales del cultivo celular con la fruta.

Los resultados sugieren que para eliminar el mucilago de las semillas se deben sumergir en agua por 1 h. Además, el medio idóneo de callogénesis es Gamborg con 2 mg por L de ácido naftalenacético y 1 mg por L de kinetina. En las suspensiones celulares se observó mayor contenido de fenoles y antioxidantes a los 14 días con 34,074 mgGAE por g y 32,901 por ciento respectivamente, mientras que a los 21 días se obtuvo un alto valor de flavonoides: 29,465 mgQE por g. Finalmente, el perfil nutricional del cultivo celular muestra valor característico en fibra 2,53 por ciento y proteína 1,61. Por tanto, las células tienen propiedades nutricionales significativa, que podrían constituir un sustituto alimentario.

Palabras clave: sistemas biotecnológicos, pitahaya, sustituto alimentario, *Hylocereus megalanthus*.

ABSTRACT

The study consisted of evaluating biotechnological systems of pitahaya as a food substitute. Cellular agriculture provides food solutions and increases large-scale production; these technologies are emerging as an innovative food alternative of the future.

A treatment of pitahaya seeds (acid and basic solution, water and incubation) was developed, which allowed the development of seedlings in vitro. Once the plants were obtained, callogenesis was induced, with the optimization of culture media, based on the composition of Murashige - Skoog and Gamborg, and different phytohormones: cytokinins (6-Benzylaminopurine and kinetin), auxins (2,4-dichlorophenoxyacetic acid and naphthaleneacetic acid). The biomass obtained allowed the establishment of cell suspensions and the identification of the growth curve. Finally, the nutritional properties of the cell culture were compared with the fruit.

The results suggest that to remove the mucilage from the seeds, they should be immersed in water for 1 h. In addition, the ideal medium for callogenesis is Gamborg with 2 mg per L of naphthaleneacetic acid and 1 mg per L of kinetin. In the cell suspensions, higher phenol and antioxidant contents were observed at 14 days with 34.074 mgGAE per g and 32.901 percent respectively, while at 21 days a high value of flavonoids was obtained: 29.465 mgQE per g. Finally, the nutritional profile of the cell culture shows characteristic value in fiber 2.53 percent and protein 1.61. Therefore, the cells have significant nutritional properties, which could constitute a food substitute.

Key words: biotechnological systems, pitahaya, food substitute, *Hylocereus megalanthus*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

La fruta del dragón (*Hylocereus spp.*) también conocida como pitahaya es una fruta exótica tropical originaria de América, es apreciada por los numerosos beneficios que posee la pulpa. Específicamente, la pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) es una fruta que ha llegado a tener un interés comercial a nivel nacional e internacional y una amplia fama en sectores agrícolas o investigación por sus ventajas nutricionales y sus acciones farmacológicas (Angonese et al., 2021; Mállap-Detquizán et al., 2022a).

Esta fruta es una fuente rica de vitaminas (C, B1, B2, B3, niacina, piridoxina y cobalamina), minerales (sodio, potasio, calcio, hierro, fosforo y zinc), carbohidratos, fibra, proteínas y antioxidantes (Ibrahim et al., 2018). La demanda de esta fruta se ha elevado y por tanto se necesita poner en marcha metodologías que suplan esta demanda (Mállap-Detquizán et al., 2022a)

A estos factores se suma el aumento de la población mundial, que, de acuerdo con estimaciones, para mitad de siglo afectará los alimentos disponibles en el mundo. Se estima que la demanda de productos agrícolas superará entre un 60 y 70% (FAO, 2017). Además, la tierra agrícola se puede incrementar en tan solo un 2% del área total de la tierra, debido a la industrialización, crecimiento demográfico y cambio climático que deterioran las condiciones del suelo (Nordlund et al., 2018)

Actualmente, la producción de plataformas biotecnológicas como cultivos celulares u órganos vegetales está en la mira dentro de las nuevas tecnologías para la producción de alimentos (Ritala et al., 2022). Ante ello se tiene a los alimentos funcionales de origen vegetal, fundamentales dentro de la dieta humana porque proporcionan nutrientes y compuestos bioactivos que son benéficos para la salud (Fernandes et al., 2019).

El cultivo de células vegetales es un nuevo planteamiento para la producción de alimentos a base de plantas (Nordlund et al., 2018; Ritala et al., 2022). Esta alternativa de alimentos se centra en la generación de callos que son una masa de

células somáticas no diferenciadas de una planta. La inducción de callo es una desdiferenciación y división celular intensiva que depende del explante, medio de cultivo y la combinación o concentración de fitohormonas. Para el proceso de inducción de callo se utilizan hojas, folíolos y tallos de plantas (Aparecida Rodrigues et al., 2022; Hernández-Amasifue et al., 2021).

Estos cultivos han sido utilizados para la producción comercial de productos: fitoquímicos, farmacéuticos, pigmentos e ingredientes para cosméticos y alimentos. Bajo este contexto, la biomasa que se genera por esta técnica podría ser considerada incluso como un posible sustituto alimenticio, sin embargo, existen pocas aplicaciones reportadas que apliquen a estos cultivos o sus extractos como alimento (Molkanova et al., 2019). A pesar de ello, las pocas investigaciones han demostrado que las células vegetales indiferenciadas como sustituto alimentario son prometedoras por el buen valor nutricional que contienen. Esta aplicación, abre posibilidades en sitios donde la agricultura llega a estar restringida ya sea por el espacio o las condiciones climáticas (Häkkinen et al., 2020).

La agricultura celular es tema de investigación actual debido a que se basa en la obtención de productos alimentarios usando células, con la finalidad de disminuir el impacto ambiental, generando alimentos puros e inoctrinos, los mismos que pueden mejorar sus propiedades nutraceuticas (Moldes, 2018). Dichos productos son de investigación ya que no únicamente se espera que contengan su mismo valor nutricional, sino que sean económicamente viables y de impacto dentro de la sociedad (Rodríguez Beraud et al., 2018).

El presente trabajo propone evaluar cualitativamente los sistemas biotecnológicos de la pitahaya (*H. megalanthus*) a partir de la generación de células en dos medios de cultivo para estimar las propiedades nutricionales, con el propósito de comparar con la fruta y establecer la posibilidad de un sustituto de la misma.

1.1.1. La pitahaya, origen y distribución

La pitahaya o también conocida como la fruta del dragón, es una fruta exótica originaria de la parte sur de México, Centro América y gran parte de Sudamérica. Del mismo modo, la pitahaya puede crecer en otros países como: China, Australia, Estados Unidos (Florida y California), Israel, Vietnam, Indonesia y Taiwán. Esta planta ha llegado a tener un interés comercial a nivel nacional e internacional, así como también, una amplia fama en sectores agrícolas o investigación por sus ventajas nutricionales y sus acciones farmacológicas (Ibrahim et al., 2018; INIAP, 2020; Mercado-Silva, 2018).

1.1.2. La pitahaya en el Ecuador

Se tiene evidencia que la pitahaya fue colectada en 1983 específicamente en los alrededores del río Yasuní. Esta fruta es cultivada en: el noroccidente de la provincia de Pichincha, Loja, Morona Santiago, Sucumbíos, Orellana e Imbabura. La pitahaya amarilla (*H. megalanthus*) es la especie que comúnmente se cultiva en el país. Siendo así que existen dos variedades de la fruta que se las denominan “ecotipos”. La primera variedad se la conoce como “Nacional” o “Pichincha”, las mismas llegan a pesar alrededor de unos 150 g y se cultivan en el noroccidente de Pichincha. Por último, se tiene a la segunda variedad conocida como “Palora”, su fruto pesa alrededor de 350 g y es cultivada en la provincia de Morona Santiago en el cantón Palora (INIAP, 2020; Sotomayor et al., 2019).

En el país no existe suficiente información con respecto a evaluaciones de calidad de la fruta, a pesar de ello, se ha encontrado que el ecotipo “Palora” de la pitahaya presenta mejores características fisicoquímicas como la consistencia del fruto (firmeza), cantidades de vitamina C, pH, polifenoles y capacidad antioxidante. Es por ello que esta variedad de pitahaya resulta ser más exportada a comparación de la variedad “Pichincha” (Sotomayor et al., 2019).

1.1.3. Taxonomía

La planta de pitahaya pertenece al género *Hylocereus* y a la familia de las Cactaceae. Existen diferentes especies de esta fruta (Figura 1), se distinguen por medio del color del fruto y de la pulpa: *H. megalanthus* (pulpa blanca y fruto amarillo); *H. polyrhizus* (pulpa roja y fruto rosado) y *H. undatus* (pulpa blanca y fruto rosado) (Ibrahim et al., 2018).

Figura 1.

Variedades existentes de pitahaya (Hylocereus sp) - fruta



Fuente: (Ibrahim et al., 2018)

1.1.4. Características fisicoquímicas y valor nutricional

La pitahaya es conocida por su riqueza en antioxidantes y su contenido de proteínas, aminoácidos, azúcares solubles y minerales en combinación con otros compuestos bioactivos, es por ello que la pitahaya posee un alto valor nutricional (Usaga et al., 2022). La pulpa de la pitahaya representa de un 60% a un 80% del peso total de la fruta madura. Los carbohidratos que contiene la pulpa de la pitahaya son representados mayormente por la pectina (compuesta por galactosa y arabinosa) y fibra dietética que se considera un ingrediente alimentario con actividades prebióticas, ya que su consumo contribuye a mejorar el microbioma intestinal. (Jiang et al., 2021; Mercado-Silva, 2018).

De la misma forma, la pulpa contiene componentes que poseen actividad biológica. Estos componentes son conocidos como antioxidantes, estos han despertado el interés en la industria y la salud. Esto se debe a que los antioxidantes contribuyen al mantenimiento de la salud y la protección de enfermedades coronarias y cáncer (Ibrahim et al., 2018). Además, se tienen a los compuestos fenólicos que son los metabolitos secundarios más abundantes en las frutas y su presencia está relacionada al contenido total de compuestos fenólicos en la pulpa (Angonese et al., 2021).

1.1.5. Micropropagación de la pitahaya.

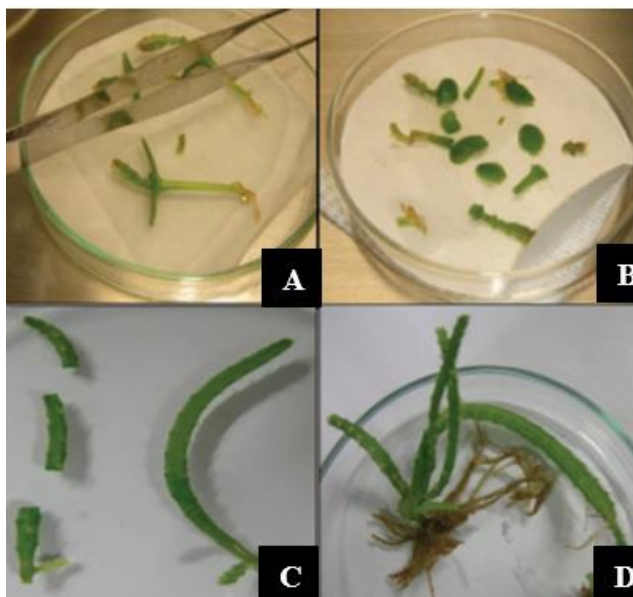
La micropropagación consiste en la producción masiva de plantas genéticamente similares, a partir de explantes de la planta madre logrando una descendencia uniforme (Qiansheng et al., 2021). El proceso de propagación *in vitro* permite conseguir cultivos libres de patógenos con características genéticamente específicas por medio de la adecuación de las condiciones necesarias para el desarrollo del explante dentro de un medio nutritivo (Renneberg, 2023).

El cultivo *in vitro* conserva la integridad genética de las especies vegetales y, además, es una alternativa al cultivo en campo. Esto se debe a que mejora el retardo en la producción y la vida útil de las plantas de pitahaya (Qiansheng et al., 2021).

La micropropagación de *H. megalanthus* se realiza mediante esquejes de plantas (Figura 2) provenientes de semillas germinadas *in vitro*, las mismas que originan nuevos brotes para el crecimiento de una planta madura (Montiel-Frausto et al., 2016).

Figura 2.

Proceso de micropropagación de pitahaya.



Nota: **A.** Plántulas, **B.** Fragmentos de cladodio y hojas, **C.** Tallo para la obtención de explantes y segmentos separados para su traslado a cultivo, **D.** Planta madura de pitahaya amarilla (Suárez Román et al., 2015).

1.1.6. Células vegetales

Un callo es un conjunto de células no diferenciadas que se desarrollan en un medio sólido, que se utiliza como punto de partida para crear suspensiones celulares (Hernández-Amasifuen et al., 2021). Las células vegetales son de gran importancia científica por que aportan al estudio de su función morfológica y bioquímica, conociendo la utilidad de los compuestos que presentan las plantas y el interés que pueden llegar a tener a nivel nutricional y farmacológico (Alcántara et al., 2017).

Las primeras investigaciones realizadas de cultivos celulares vegetales en suspensión permitieron conocer los aspectos del cultivo, es decir, su actividad metabólica y fisiológica. Además, permite optimizar las condiciones del cultivo para el desarrollo de biomasa y la producción de metabolitos secundarios (Renneberg, 2023).

1.1.7. Perspectivas a futuro

La revolución alimentaria y el futuro de la producción de alimentos han llegado mediante los alimentos celulares. La agricultura celular es una herramienta para desarrollar soluciones alimentarias y aumentar la producción a gran escala (FAO, 2021).

La producción de alimentos a través de la agricultura celular está surgiendo como una alternativa innovadora. Actualmente se han lanzado al mercado los primeros productos de consumo y se están desarrollando diversos proyectos en todo el mundo para investigar las posibilidades que ofrecen los alimentos celulares (Nordlund et al., 2018).

Actualmente, la aplicación del cultivo celular ha estado ganando terreno en la llamada agricultura celular. Estudios del Centro de Investigación Técnica VTT de Finlandia han demostrado que los cultivos celulares vegetales abren paso hacia la producción sostenible de alimentos (Rischer, 2021).

Bajo la mano de VTT nace el proyecto: “VTT Cellular Food” que se basa en el cultivo de células vegetales en fermentadores con el fin de producir ingredientes alimenticios (VTT Research, 2022). Es así que, el trabajo de investigación por parte de este proyecto comenzó con cultivos celulares de café para: instaurar líneas celulares, adaptar las células a un biorreactor para producir una biomasa considerable y a partir de ello diseñar un proceso de tostado. El resultado de esto fueron las primeras muestras de café cultivado en laboratorio con el mismo sabor y olor del café convencional (Rischer, 2021; VTT Research, 2022).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar los sistemas biotecnológicos de la pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) para constituir un sustituto alimentario mediante la valoración de sus propiedades nutricionales.

1.2.2. Objetivos específicos

- Analizar un tratamiento adecuado de semillas previo a la desinfección para la obtención de plántulas *in vitro* de pitahaya (*H. megalanthus*).
- Formular un medio cultivo óptimo para el desarrollo de sistemas biotecnológicos (líneas celulares y/u órganos vegetales) de pitahaya (*H. megalanthus*) a nivel de laboratorio.
- Establecer una curva de crecimiento mediante un análisis gravimétrico de los sistemas biotecnológicos de pitahaya (*H. megalanthus*)
- Comparar las propiedades nutricionales de los sistemas biotecnológicos con la pitahaya (fruta).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Para este proyecto de investigación se utilizaron los equipos, materiales e insumos que se describen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1.

Equipos de laboratorio

Equipos	Materiales e insumos
Cámara climática Bixel	Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml
Incubadora Memmert 2 (25 °C)	Placas Petri
Balanza analítica Ohaus Adventure Pro Model: AV264C	Paquete de fundas Ziploc Espátula
Potenciómetro Mettler Toledo	Bisturís, Agujas estériles
Plancha de calentamiento IKA RO 10	Magnetos Elicrom
Destilador de agua QUMIS	Frasco ámbar
Nevera MABE (4 °C)	Papel aluminio (DIAMOND)
Cabina de Flujo Laminar ESCO	Papel absorbente
Ultracongelador (-80 °C)	Tubos tipo Falcon (50 mL)
Centrifuga Labnet Spectrafuge	Botellas de vidrio de tapa de azul
Espectrofotómetro de placa Fisher Scientific	Pinzas Tubos Eppendorf
Agitador orbital New Brunswick (Modelo G-25 571470)	Micropipeta 20 – 200 µl
Autoclave	Pipetas estériles 10 ml
Vórtex	Rollo de Parafilm 4 in x 125 ft
Pipeta Automática eléctrica	Paquetes de Vasos de plásticos 14 oz

Tabla 2.*Reactivos de laboratorio*

Reactivos	
Etanol (70 y 96 % de pureza).	8 L
Tween 20	50 mL
Hipoclorito de sodio (5%)	500 mL
Agua estéril	8 L
Agua destilada	12 L
Nitrógeno líquido	2 L
Metanol	50 mL
DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)	1 g
Solución cloruro de aluminio 2%	1 g
Reactivo de Folin- Ciocalteu	1 g
Solución de carbonato de sodio 7%	1 g

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de material vegetal

El material vegetal (pitahaya entera) fue comprado en la finca productora Carreño (Figura 3) a 910 msnm en el cantón Palora, Parroquia Arapicos, provincia de Morona Santiago (01°51'14" S 77°56'51" W). Posterior a su recolección, se trasladó el material vegetal a temperatura ambiente, donde se extrajeron las semillas y se almacenaron a 4 °C.

Figura 3.

Ubicación de la finca en donde se obtuvo el material vegetal.



Fuente: (Google Maps, 2023).

2.2.2. Tratamiento y desinfección de semillas

Tratamiento de las semillas

El material vegetal se sometió a seis tratamientos descritos en la Tabla 3 para eliminar los residuos de pulpa en las semillas:

Tabla 3.

Tratamientos para eliminación de residuos en semillas

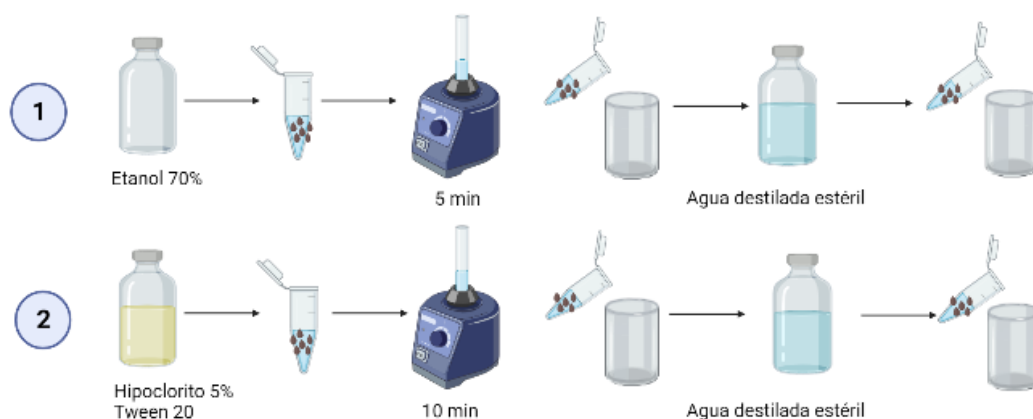
Tratamiento	Condiciones
T1	Incubación a 30 °C/ por 24 h.
T2	Incubación a 30 °C/ por 24 h, previamente lavadas.
T3	Temperatura ambiente por 24 h.
T4	Colocadas en un vaso de precipitación con agua durante 1 h, previamente retirado parte del residuo de la pulpa.
T5	Colocadas en un vaso de precipitación con CH ₃ COOH al 1% por 30 min.
T6	Colocadas en un vaso de precipitación con NaOH al 1% durante 30 min.

Desinfección de las semillas.

Se estableció un protocolo de desinfección (Figura 4), el mismo que se basó en el trabajo de Mállap-Detquizán et al. (2022). Primero, se lavaron las semillas de pitahaya con agua destilada estéril, después se colocaron en una solución de etanol al 70% durante 5 min. Luego, las semillas se lavaron tres veces con abundante agua destilada estéril. Posteriormente, se sumergieron las semillas en una solución de hipoclorito al 5% con 0,2 ml de Tween 20 durante 10 min. Por último, se enjuagaron con abundante agua estéril tres veces durante 1 min. Todos los lavados con las soluciones se lo realizaron con agitación por medio de un vórtex.

Figura 4.

Etapas de la desinfección de semillas.



Nota: **1:** primera etapa con lavados de etanol y agua destilada estéril. **2:** segunda etapa con lavados de hipoclorito 5%, tween 20 y agua destilada estéril.

2.2.3. Micropropagación *in vitro*

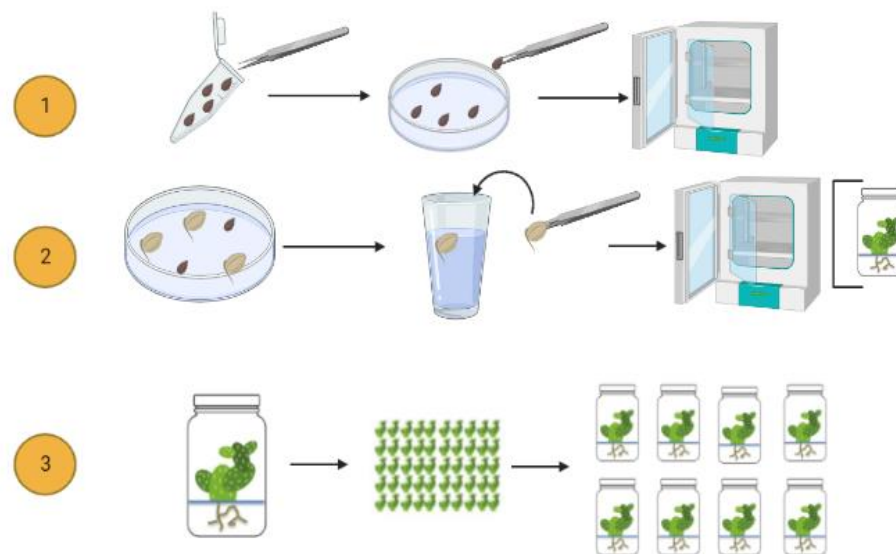
Una vez que se realizó la desinfección de las semillas, se procedió a cultivarlas en placas Petri que contenían medio de cultivo Murashige & Skoog (MS). Para la elaboración del mismo se siguió la composición descrita en el Anexo 1. Se cultivó 5 semillas en cajas Petri por cada tratamiento. Los cultivos se realizaron por quintuplicado y se las almacenó en una cámara climática Bixel a una temperatura de 25 °C y fotoperiodo de 16 (luz)– 8 (oscuridad).

Después del cultivo, las semillas fueron monitoreadas durante 35 días para evaluar cualquier tipo de contaminación o visualizar brotes de raíz en las semillas. El medio de cultivo MS se colocó en vasos plásticos de 14 oz para permitir el desarrollo vegetativo.

Una vez que se obtuvo un lote primario se procedió a cortar los tallos que se desarrollaron a partir de los primeros brotes de las semillas para realizar el proceso de la micropropagación *in vitro* con el fin de obtener un stock más grande de plantas de pitahaya (Espinosa-Leal et al., 2018).

Figura 5.

Proceso de micropropagación in vitro de pitahaya (H. megalanthus) a partir de semillas.



Nota: **1)** Siembra de las semillas desinfectadas en medio MS sin hormonas. **2)** Trasplante de semillas germinadas. **3)** Proceso de micropropagación para obtención de lotes de plantas de pitahaya.

2.2.4. Optimización de medios de cultivo

El proceso de optimización de medios de cultivo se realizó por medio de la inducción de callo, técnica que permitió evaluar cualitativamente la generación de células vegetales totipotentes. Para ello se cortó explantes de aproximadamente 1 cm de las

plantas *in vitro* de pitahaya, estos explantes fueron cultivados en dos medios de cultivo sólidos: Murashige & Skoog (MS) y Gamborg (B5) descritos en los Anexos 1 y 2, de acuerdo con las metodologías revisadas de los trabajos de González Burgas, (2020); Lalaleo, (2012) y Zambrano & Ríos, (2015). En cada medio de cultivo se estableció ocho tratamientos en los que se evaluaron dos concentraciones de auxinas (2,4 D, ANA) y de citoquininas (KIN, BAP), como se describen a detalle en la Tabla 4. Siendo así que, se preparó cinco cajas Petri para cada tratamiento de los medios de cultivo MS y B5 y por consiguiente se evaluó cualitativamente ochenta placas Petri por 60 días.

Tabla 4.

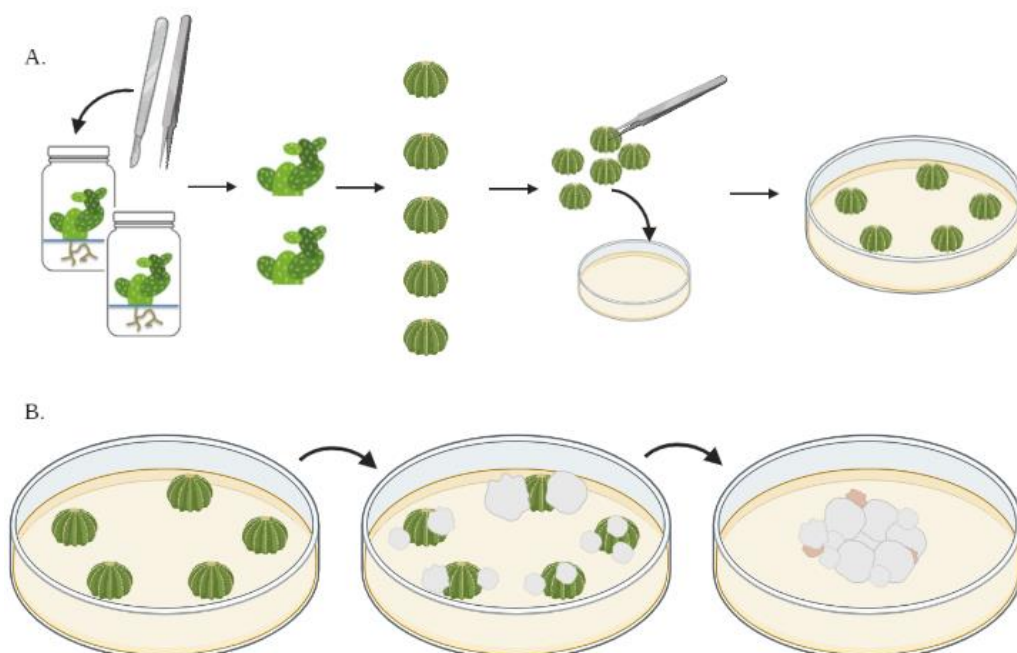
Formulaciones para los tratamientos de los medios de cultivo MS y B5

Tratamiento	Medio	Fuente de carbono	Auxinas	Concentración (mg/L)	Citoquininas	Concentración (mg/L)
1	B5	S	2,4 D	1	KIN	1
2	B5	S	2,4 D	1	BAP	0,5
3	B5	S	2,4 D	2	KIN	0,5
4	B5	S	2,4 D	2	BAP	1
5	B5	S	ANA	1	BAP	1
6	B5	S	ANA	1	KIN	0,5
7	B5	S	ANA	2	BAP	0,5
8	B5	S	ANA	2	KIN	1
1	MS	S	2,4 D	1	KIN	0,5
2	MS	S	2,4 D	1	BAP	1
3	MS	S	2,4 D	2	KIN	1
4	MS	S	2,4 D	2	BAP	0,5
5	MS	S	ANA	1	KIN	1
6	MS	S	ANA	1	BAP	0,5
7	MS	S	ANA	2	BAP	1
8	MS	S	ANA	2	KIN	0,5

La optimización de medios de cultivo permitió identificar el medio de cultivo y tratamiento en el cual se desarrolló una mayor cantidad de callo. Seguido, se procedió a incrementar la biomasa celular a partir de la recolección de los callos obtenidos en el estudio de optimización en el mejor tratamiento identificado.

Figura 6.

Proceso de callogénesis e incremento de biomasa.



Nota: **A)** Proceso de callogénesis a partir de explantes de plantas de pitahaya in vitro. **B)** Recolección de biomasa de todos los tratamientos donde se obtuvo callo friable para el crecimiento en el medio de cultivo optimizado.

2.2.5. Disgregación celular

Para la disgregación celular se empleó 1g de callo friable en medio líquido (medio óptimo, sección 2.2.4) en una relación (1:20), en recipientes de vidrio estériles. Los cultivos celulares fueron colocados a las siguientes condiciones para su crecimiento: oscuridad, 25 °C y agitación de 110 rpm en un agitador orbital (New Brunswick, Modelo G-25 571470) (Allegue & Mercedes, 2018).

La suspensión fina celular fue subcultivada cada 21 días bajo las condiciones antes mencionadas.

2.2.6. Escalamiento de cultivos celulares (curva de crecimiento)

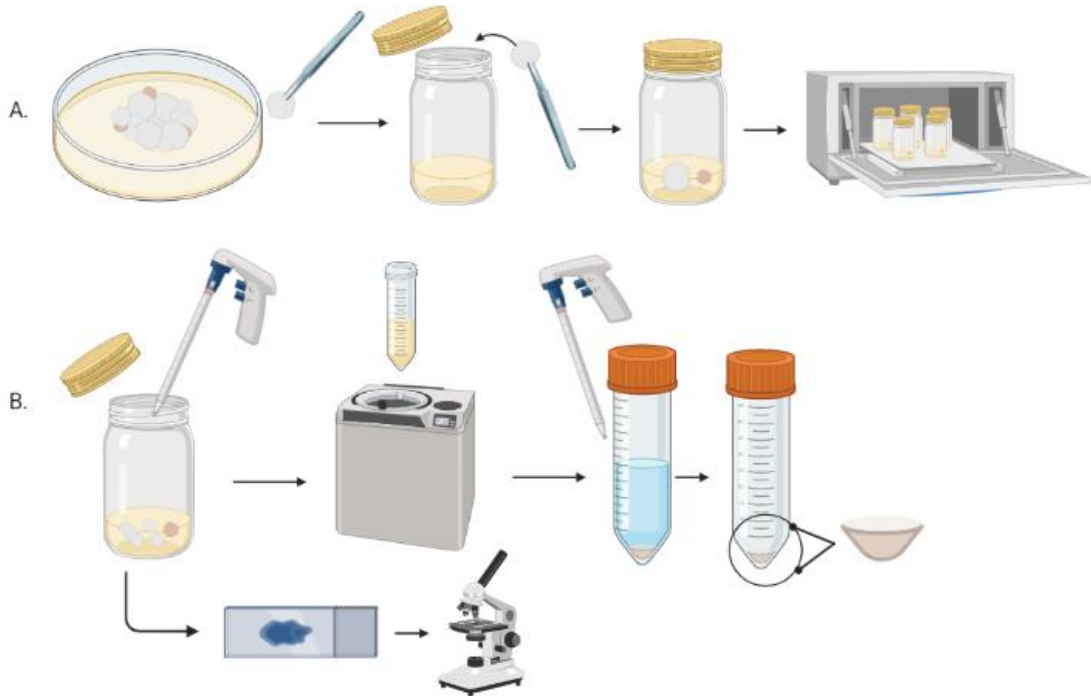
Se realizó un monitoreo de las suspensiones celulares mediante un análisis gravimétrico en intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 30 días) con tres replicas para evaluar

el aumento o disminución de biomasa. Para el análisis gravimétrico se tomó 2 mL de la muestra (cultivo celular) y se colocó en tubos Falcon para llevarlos a centrifugación por 5 min a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante y se mantuvo el sedimento el cual fue pesado. La determinación del peso final fresco se obtuvo por medio de la siguiente fórmula: $P = F_1 - F_0$, donde: P es el peso del sedimento, F_1 es el peso del tubo Falcon sin el sobrenadante y F_0 es el peso del tubo Falcon vacío.

La cuantificación del peso final del sedimento permitió constituir una curva la misma que permitió determinar las fases de crecimiento de los cultivos celulares de pitahaya. Adicionalmente, se evaluó la viabilidad celular en cada intervalo anteriormente descrito mediante la técnica de azul de tripano a 0,4% y con la ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 40X.

Figura 7.

Proceso de disgregación celular, escalamiento de cultivos celulares y construcción de la curva de crecimiento



Nota: A) Proceso de disgregación celular y escalamiento de cultivos a partir de la biomasa recolectada y medio líquido optimizado. B) Construcción y evaluación de la curva de crecimiento por medio de la obtención de la suspensión celular.

2.2.7. Análisis de grasa (con hidrólisis)

Este análisis se realizó en el LACONAL empleando el método para grasas: AOAC Ed. 21, 2019 2003.06. donde la muestra es la fruta y las células que se obtuvo del escalamiento de cultivos celulares.

2.2.8. Análisis de fibra dietética total (enzimática)

El método para fibra dietética total que se realizó en el LACONAL empleando el método AOAC 985.29 Ed. 21, 2019 donde la muestra es la fruta y las células que se obtuvo del escalamiento de cultivos celulares.

2.2.9. Análisis de carbohidratos totales, cenizas y proteínas

Este análisis se realizó en el LACONAL con los datos que fueron obtenidos en el mismo laboratorio donde la muestra es la fruta y las células que se obtuvieron del escalamiento de cultivos celulares.

2.2.10. Determinación de pH y sólidos solubles totales (STT)

La determinación pH se realizó con un potenciómetro, para lo cual se colocó el jugo de pitahaya en un vaso de precipitación para su análisis (Merouane et al., 2021). Por otro lado, para el análisis de los STT se utilizó un refractómetro y en este se agregó 0,1 ml de jugo de pitahaya por medio de un gotero (Winson et al., 2020).

Figura 8.

Determinación de sólidos solubles totales (STT) por método refractométrico



2.2.11. Pretratamiento de la fruta y callo (DPPH, fenoles, flavonoides)

Pretratamiento para la fruta

Se extrajo la pulpa de la pitahaya, la cual fue pasada por un colador. El líquido resultante se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm con el fin de separar el jugo de la pulpa. La suspensión resultante se congeló a -20 °C para los análisis de antioxidantes, fenoles y flavonoides (Esther et al., 2016).

Pretratamiento para el callo

Se pulverizó 500 mg de callos en nitrógeno líquido, después se suspendió en 1 mL de metanol y se mantuvo a temperatura ambiente por 24 h con agitación cíclica en un agitador orbital (Stuart). Luego, se pasó través de papel filtro. El extracto seco se disolvió en 50 µl y se almacenó a 4 °C hasta que se realizó los análisis anteriormente mencionados (Golkar & Taghizadeh, 2018).

2.2.12. Análisis de la capacidad antioxidante (DPPH)

Para el ensayo DPPH se disolvió 0,0059 g de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en 100 mL de metanol. Se mezcló 20 μ L de la muestra con 180 μ L de la solución de DPPH. La reacción se desarrolló a temperatura ambiente (20 °C) durante 40 min en oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de placa Fisher Scientific a una longitud de onda de 515 nm. El porcentaje de DPPH se calculó utilizando la siguiente ecuación descrita por Hyeon et al. (2021), donde A_{sample} es la absorbancia de la muestra, A_{blank} es la absorbancia del blanco y $A_{control}$ es la absorbancia del control:

$$\%DPPH = \left[1 - \left(\frac{A_{sample} - A_{blank}}{A_{control} - A_{blank}} \right) \right] \times 100$$

2.2.13. Análisis de fenoles

El análisis de fenoles se desarrolló mediante el método de Folin- Ciocalteu (modificado) referido por Rumpf et al. (2023). Para este análisis se utilizó una microplaca de 96 pocillos. Primero, se mezcló 10 μ L de la muestra con 130 μ L de agua destilada, después se agregó 10 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó en reposo por 6 min. Posteriormente se agregó 100 μ L de la solución de carbonato de sodio (7%). La reacción se llevó a incubación por 90 min en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia con una longitud de onda de 750 nm.

2.2.14. Análisis de flavonoides totales

El análisis de flavonoides totales se realizó mediante el ensayo de cloruro de aluminio. Se agregó 60 μ L de la muestra y 120 μ L de cloruro de aluminio al 2% (p/v) en una microplaca de 96 pocillos. Posteriormente, se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 60 min. Finalmente se midió la absorbancia con una longitud de onda de 420 nm. Los datos calculados se expresaron como equivalentes de miligramos de quercitina (Anexo 3) por gramo de peso seco de muestra (mg QE/g DW) (Merouane et al., 2021).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Tratamiento de semillas para la obtención de plantas *in vitro* de pitahaya

Para la obtención de las plantas *in vitro* de pitahaya, las semillas extraídas de la fruta se sometieron a 6 tratamientos. Cada tratamiento fue analizado por quintuplicado a través de la desinfección y siembra de las semillas en medio MS. La germinación se observó a las tres semanas de su siembra y se identificó que el tratamiento 4 (sumergidas en agua durante 1 h y mínimo residuo de mucílago) tuvo un porcentaje del 35% de germinación (Tabla 5). De acuerdo a la investigación realizada por Martínez et al. (2011) menciona que el bajo porcentaje de germinación de las semillas de pitahaya *in vitro*, se debe a la acción del mecanismo de latencia producido al no retirar por completo el mucílago de las semillas. Estos resultados fueron confirmados en este estudio, en el tratamiento 1, en donde las semillas no fueron sometidas a hidratación y el mucílago no se retiró completamente, con el cual se obtuvo un porcentaje de germinación de 0% (Tabla 5).

Estudios de Villa et al. (2020) mencionan que la función del mucílago es inducir la germinación de las semillas al tener contacto con el agua. Esto se debe a que aumenta el volumen formando una capa húmeda que ayuda a su germinación. Este estudio únicamente se ha observado en campo de cultivo ya que los mucílagos facilitan la introducción de las raíces en la tierra. Cabe mencionar que no hay suficiente información de germinación de semillas; sin embargo, lo poco se sabe es que la propagación de estas es un proceso lento que requiere al menos 3 años para la obtención de una planta madura, según lo reportado por el IICA (2018).

Tabla 5.

Tratamientos de semillas propuestos para la obtención de plántulas de pitahaya

Tratamiento	Número de semillas	Porcentaje de contaminación (%)	Porcentaje de germinación (%)
1	20	0	0
2	20	0	10
3	20	0	25
4	20	0	35
5	20	20	5
6	20	0	20

3.2. Optimización de medios de cultivo

A partir de las plantas *in vitro* de pitahaya (*H. megalanthus*), se cortaron explantes del vástago y se sometieron al proceso de callogénesis en los tratamientos en estudio.

Con respecto al medio de cultivo MS, se identificó que los tratamientos 5 (ANA 1mg/L- KIN 1 mg/L), 6 (ANA 1 mg/L- BAP 0,5 mg/L) y 8 (ANA 2 mg/L- KIN 0,5 mg/L) tuvieron formación de callo a partir de los 21 días; como se evidencia en los tres tratamientos hubo la presencia de la auxina ANA. Sin embargo, al culminar los 35 días se identificó una inducción óptima en el tratamiento 6, donde se observa que concentraciones altas de ANA independientemente de las citoquininas BAP y KIN ayuda al desarrollo del callo. Los tratamientos suplementados con 2,4-D + KIN y 2,4-D + BAP presentaron baja formación de callo (Tabla 6 y Tabla 7). Además, se observó pardeamiento de la biomasa, el cual puede deberse al estrés oxidativo en los explantes de partida para la formación de callo, que a su vez se relaciona con los desórdenes fisiológicos, morfológicos y genéticos (Álvaro et al., 2020).

El estudio realizado por Winson et al. (2020), reportan una buena inducción de callos de la pitahaya de Costa Rica (*H. costaricensis*) a partir de explantes del epicótilo y cotiledón en medio MS mediante reguladores de crecimiento TDZ (5 μ M) y ANA (20 μ M), en donde se obtuvo callos compactos con condiciones de fotoperiodo de 16 h y 8 h de oscuridad.

El porcentaje de inducción de callos de los explantes variaron entre 94% y 100%. Por tanto, se puede establecer que la concentración de ANA empleada en la investigación, favorece el desarrollo de células totipotentes que más adelante se formará en callo. Cabe recalcar que en el presente estudio no se utilizó TDZ, sin embargo, se emplearon otros reguladores de crecimiento como citoquininas BAP y KIN con los cuales se obtuvieron buenos resultados.

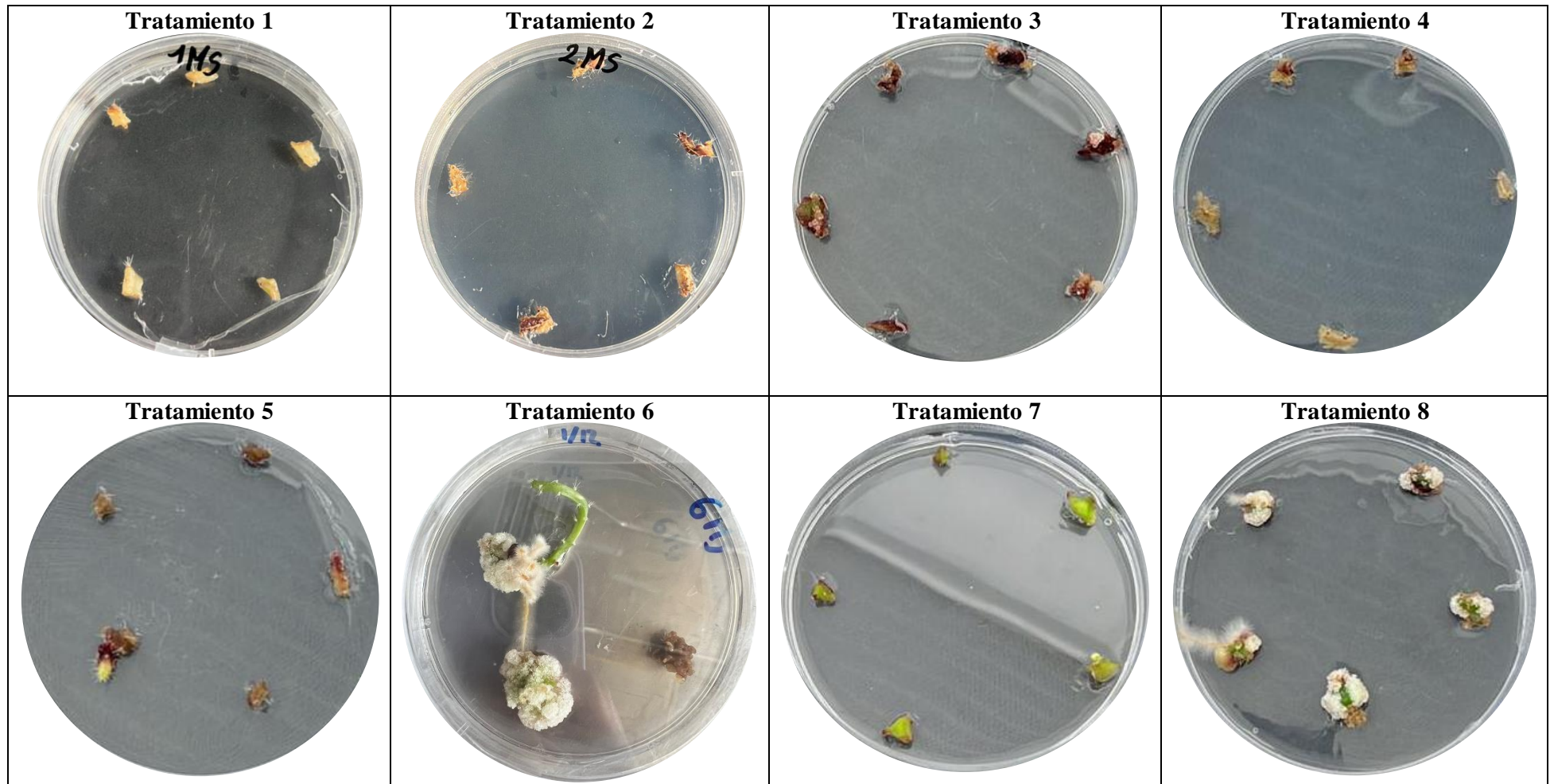
Similar a una investigación realizada por Díaz et al. (2021), se constató el pardeamiento de los explantes antes de la formación de callo donde se reportó que la oxidación se debe al corte que sufre el explante y por el alto contenido de polifenoles dificultando al cultivo *in vitro*. Este proceso se conoce como oxidación fenólica dando como resultado oscurecimiento y muerte del explante.

Tabla 6. Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo MS.

Tiempo	Tratamiento	Auxinas	Concentración (mg/L)	Citoquininas	Concentración (mg/L)	Porcentaje de contaminación (%)	Observaciones
7 días	1	2,4 D	1	KIN	0,5	0	No existió cambios.
	2	2,4 D	1	BAP	1	20	No existió cambios.
	3	2,4 D	2	KIN	1	0	No existió cambios.
	4	2,4 D	2	BAP	0,5	0	No existió cambios.
	5	ANA	1	KIN	1	20	No existió cambios.
	6	ANA	1	BAP	0,5	20	No existió cambios.
	7	ANA	2	BAP	1	0	No existió cambios.
	8	ANA	2	KIN	0,5	0	No existió cambios.
15 días	1	2,4 D	1	KIN	0,5	40	No hay formación de callo.
	2	2,4 D	1	BAP	1	33,33	No hay formación de callo.
	3	2,4 D	2	KIN	1	20	No hay formación de callo.
	4	2,4 D	2	BAP	0,5	20	No hay formación de callo.
	5	ANA	1	KIN	1	25	No hay formación de callo.
	6	ANA	1	BAP	0,5	25	No hay formación de callo.
	7	ANA	2	BAP	1	20	No hay formación de callo.
	8	ANA	2	KIN	0,5	0	No hay formación de callo.
21 días	1	2,4 D	1	KIN	0,5	0	No existió cambios.
	2	2,4 D	1	BAP	1	0	No existió cambios.
	3	2,4 D	2	KIN	1	25	No existió cambios.
	4	2,4 D	2	BAP	0,5	25	No existió cambios.
	5	ANA	1	KIN	1	0	Poca formación de callo en dos placas.
	6 *	ANA	1	BAP	0,5	0	Poca formación de callo en las placas.
	7	ANA	2	BAP	1	25	No existió cambios.
	8 *	ANA	2	KIN	0,5	20	La formación de callo es significativa.
28 días	1	2,4 D	1	KIN	0,5	0	No existió cambios.
	2	2,4 D	1	BAP	1	0	Los explantes empiezan a oxidarse.
	3	2,4 D	2	KIN	1	25	Se visualizó poco crecimiento de callo.
	4	2,4 D	2	BAP	0,5	25	No hay cambios significativos.
	5	ANA	1	KIN	1	0	Poca formación de callo.
	6 *	ANA	1	BAP	0,5	0	Crecimiento significativo de raíces, sin embargo, aún hay crecimiento de callo.
	7	ANA	2	BAP	1	25	No hay cambios significativos.
	8 *	ANA	2	KIN	0,5	20	Formación de callo.
35 días	1	2,4 D	1	KIN	0,5	0	Los explantes tienden a tornarse amarillentos.
	2	2,4 D	1	BAP	1	0	La coloración de los explantes es oscura, no hay formación de callo.
	3	2,4 D	2	KIN	1	25	Poca formación de callo, sin embargo, el color de los explantes es oscuro.
	4	2,4 D	2	BAP	0,5	25	No hay cambios significativos, los explantes tienden a volverse pálidos.
	5	ANA	1	KIN	1	0	Poca formación de callo.
	6 *	ANA	1	BAP	0,5	0	Formación de callo, raíces y planta.
	7	ANA	2	BAP	1	25	No existió cambios.
	8 *	ANA	2	KIN	0,5	20	El callo formado es blanquecino y compacto, además existe poco crecimiento de raíz.

* : Crecimiento significativo de callo.

Tabla 7. Análisis cualitativo del crecimiento de callo en el medio MS después de 35 días.



Por otro lado, los resultados obtenidos con el medio B5 presentaron inducción de callo a partir de los 14 días en gran parte de sus tratamientos (Tabla 8). A los 35 días se pudo evidenciar que los tratamientos con la auxina 2,4-D presentaron poca formación de callo y oxidación de las mismas.

En los tratamientos que tuvieron la auxina ANA, se observó mayor crecimiento de biomasa. Se destaca que el tratamiento 8 (2 mg/L de ANA – 1 mg/L de KIN) fue el óptimo en la inducción de callo, debido a que presentó callos compactos con una coloración blanquecina (Tabla 9). Esto contrasta la investigación realizada por Lozzi et al. (2019), en donde la optimización del sistema de cultivo *in vitro* de algarrobo (*Cerotonia siliqua*), dio resultados favorables con altos niveles de inducción de callo. En este estudio, se usó medio B5 suplementado con 2,4-D (2,5 µM) produciendo el mayor peso seco de 32,5 g. La diferencia de los resultados se debe a la variabilidad en la especie vegetal y a las concentraciones de las fitohormonas.

El tratamiento 5 (1 mg/L ANA- 1 mg/L BAP) indujo el crecimiento de raíces, de la misma manera como lo reportaron Hernández & Diaz (2019), mostraron la presencia de raíces en procesos de callogénesis, debido a un ajuste metabólico que se está desarrollando en el explante. Sin embargo, la formación de raíces adventicias puede no ser tan beneficioso si lo que se pretende es conseguir un cultivo celular, ya que consumiría nutrientes del medio y provocaría que el crecimiento del callo se reprima.

Figura 9.

Crecimiento de raíz y callo en el tratamiento 5.



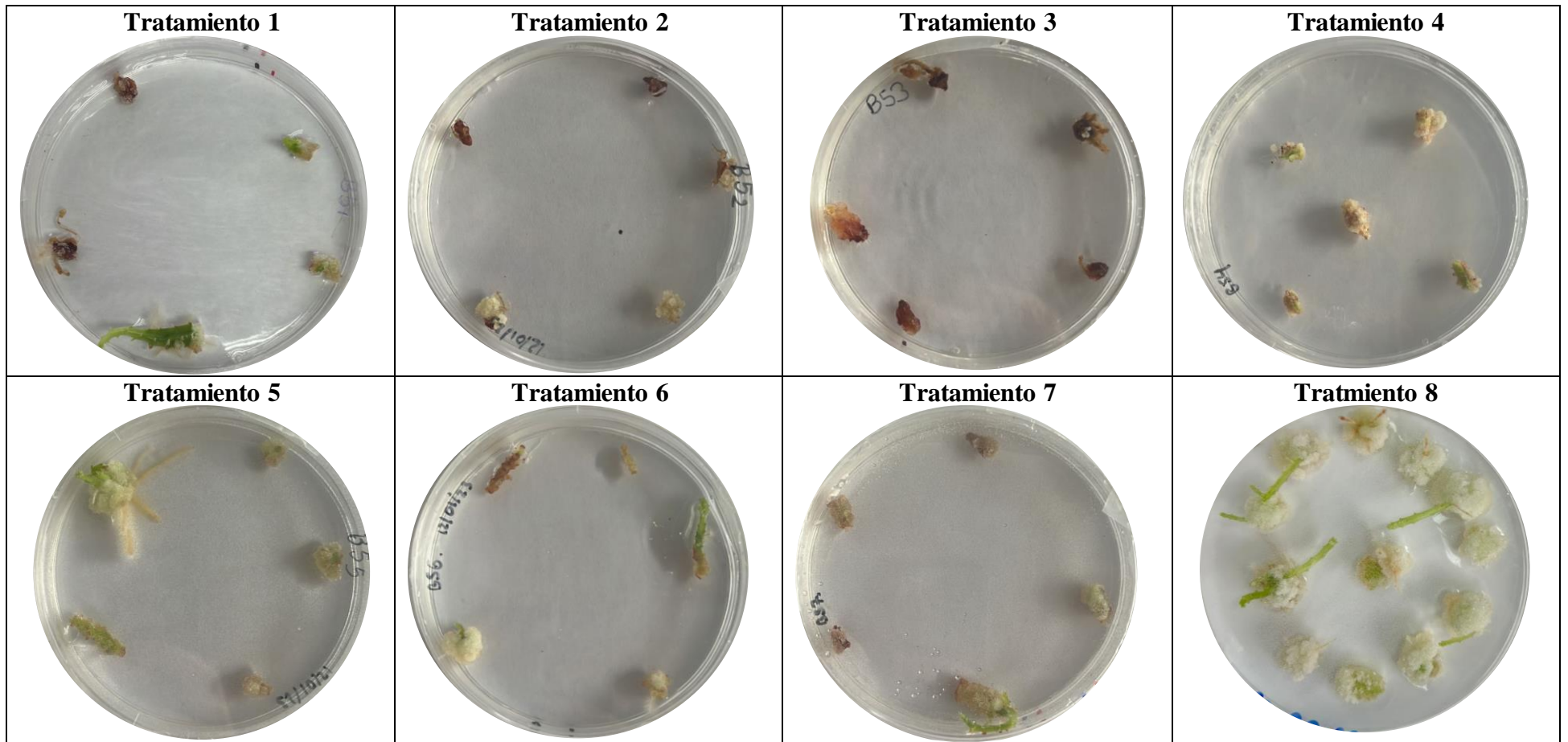
Cabe recalcar que, no hay suficientes investigaciones sobre la inducción de callo de plantas pertenecientes a la familia de las cactáceas en medio de cultivo B5, los pocos estudios se reportan en medio MS, siendo una variable de estudio importante al momento de establecer callogénesis y el establecimiento de cultivo *in vitro*. Al comparar la inducción de callo en el medio MS y B5 (Tabla 7 y 9), se obtuvo mayor crecimiento en el medio B5, ya que presentó crecimiento a partir de los 14 días en gran parte de los tratamientos en estudio. Por el contrario, los resultados obtenidos en el medio MS, mostraron cambios significativos en la formación de callo a los 21 días únicamente en los tratamientos 5, 6 y 8, concluyendo así que el medio de cultivo más idóneo para el desarrollo y crecimiento de callo es el medio B5.

Tabla 8. Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo B5.

Tiempo	Tratamiento	Auxinas	Concentración (mg/L)	Citoquininas	Concentración (mg/L)	Porcentaje de contaminación (%)	Observaciones
7 días	1	2,4 D	1	KIN	1	0	No existió cambios.
	2	2,4 D	1	BAP	0,5	0	No existió cambios.
	3	2,4 D	2	KIN	0,5	0	No existió cambios.
	4	2,4 D	2	BAP	1	0	No existió cambios.
	5	ANA	1	BAP	1	0	No existió cambios.
	6	ANA	1	KIN	0,5	0	No existió cambios.
	7	ANA	2	BAP	0,5	0	No existió cambios.
	8	ANA	2	KIN	1	0	No existió cambios.
14 días	1	2,4 D	1	KIN	1	0	No existió cambios.
	2	2,4 D	1	BAP	0,5	0	No existió cambios.
	3	2,4 D	2	KIN	0,5	0	No existió cambios.
	4	2,4 D	2	BAP	1	0	No existió cambios.
	5	ANA	1	BAP	1	0	Poca formación de callo.
	6	ANA	1	KIN	0,5	0	Poca formación de callo.
	7	ANA	2	BAP	0,5	0	No existió cambios.
	8	ANA	2	KIN	1	0	Poca formación de callo.
21 días	1	2,4 D	1	KIN	1	0	No existió cambios.
	2	2,4 D	1	BAP	0,5	0	No existió cambios.
	3	2,4 D	2	KIN	0,5	0	No existió cambios.
	4	2,4 D	2	BAP	1	0	Poca formación de callo.
	5	ANA	1	BAP	1	0	Crecimiento de callo, raíz y planta.
	6	ANA	1	KIN	0,5	0	Formación de callo.
	7	ANA	2	BAP	0,5	20	Poca formación de callo.
	8 *	ANA	2	KIN	1	0	Formación de callo.
28 días	1	2,4 D	1	KIN	1	0	Poca formación de callo, esquejes se tomaron negros
	2	2,4 D	1	BAP	0,5	0	Poca formación de callo, esquejes se tomaron negros
	3	2,4 D	2	KIN	0,5	0	Poca formación de callo
	4	2,4 D	2	BAP	1	0	Formación de callo
	5	ANA	1	BAP	1	0	Formación de callo, raíz y parte vegetal
	6	ANA	1	KIN	0,5	0	Formación de callo y parte vegetal
	7	ANA	2	BAP	0,5	0	Poca formación de callo
	8 *	ANA	2	KIN	1	0	Formación de callo compacto y parte vegetal
35 días	1	2,4 D	1	KIN	1	0	Poca formación de callo, esquejes se tomaron negros.
	2	2,4 D	1	BAP	0,5	0	Poca formación de callo, esquejes se tomaron negros.
	3	2,4 D	2	KIN	0,5	0	Poca formación de callo, esquejes se tomaron negros.
	4	2,4 D	2	BAP	1	0	Formación de callo con aspecto cremoso.
	5	ANA	1	BAP	1	0	Formación de callo, raíz y parte vegetal
	6	ANA	1	KIN	0,5	0	Formación de callo y parte vegetal
	7	ANA	2	BAP	0,5	0	Poca formación de callo
	8 *	ANA	2	KIN	1	0	Formación de parte vegetal y callo de coloración blanca

* : Crecimiento significativo de callo.

Tabla 9. Análisis cualitativo del crecimiento de callo en el medio B5 después de 35 días.

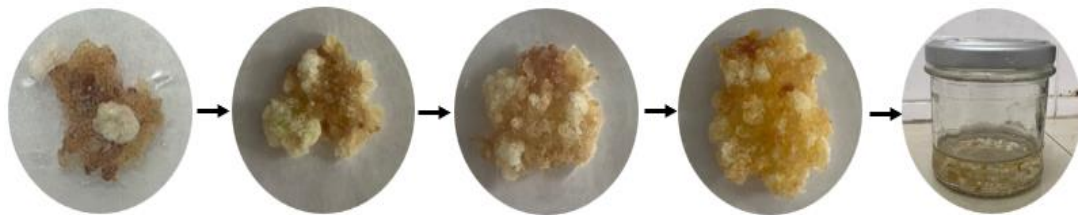


3.3. Curva de crecimiento celular

Se estableció un cultivo de células en suspensión a partir de callos friables obtenidos en cada tratamiento y en el medio optimizado (tratamiento 8: 2 mg/L de ANA – 1 mg/L de KIN).

Figura 10.

Monitoreo del crecimiento y adaptación de la biomasa celular en el medio optimizado



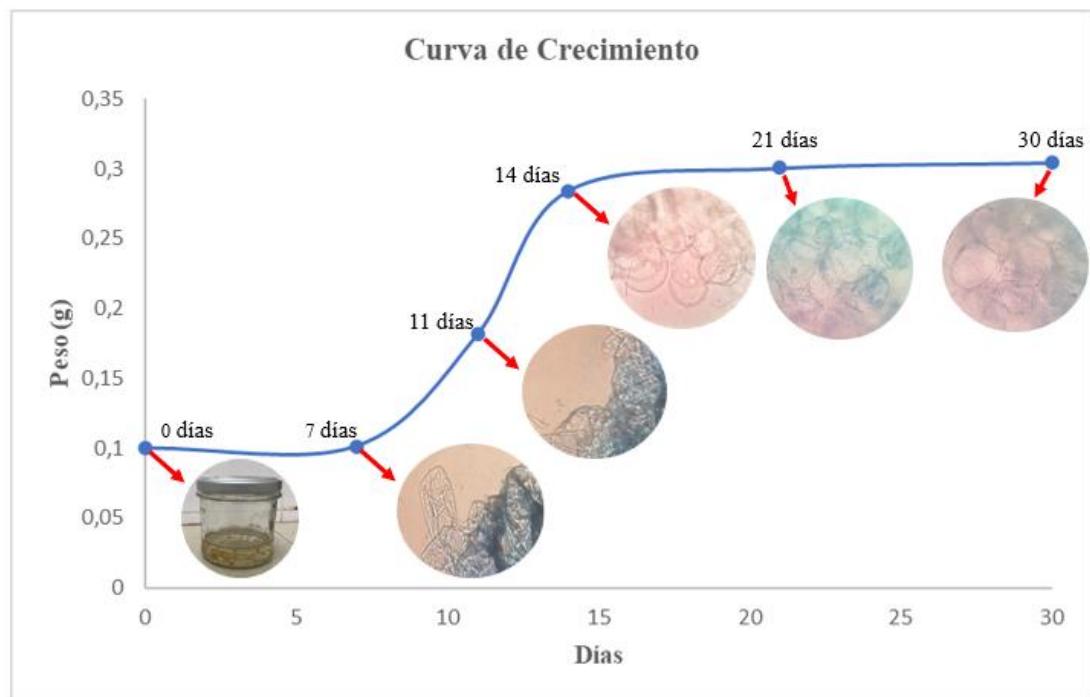
Se colocó 1 g de callo friable en frascos de vidrio con 20 mL de medio líquido B5 optimizado (tratamiento 8: 2 mg/L de ANA – 1 mg/L de KIN) para establecer las suspensiones celulares, cuyo crecimiento fue evaluado mediante análisis gravimétrico por 30 días. Este análisis permitió establecer una curva de crecimiento celular (Figura 11). Por otro lado, se recalca que en este estudio se utilizó el mismo medio optimizado para obtener callos friables y cultivos celulares, optimizando así el proceso de dediferenciación y crecimiento de la biomasa celular, ya que como se reporta en el estudio descrito por da Silva Santos et al. (2021) en la obtención de callos de cacto candelabro (*Cereus hildmannianus*), para el establecimiento de las suspensiones celulares se tuvo que transferir de medio MS suplementado con TDZ (0,07 mg/L), ANA (0,05 mg/L), 2-4 D (4mg/L) y KIN (4 mg/L) a un medio MS líquido suplementado con vitamina B5 y como fitorreguladores de crecimiento a 2,4-D (4 mg/L) y KIN (4 mg/L).

La curva de crecimiento se basa en monitorear al cultivo de células en suspensión por medio del peso en función de un tiempo determinado. Por tanto, en este estudio se realizó el monitoreo por 30 días, donde se observaron las diferentes fases de crecimiento. En las suspensiones celulares de pitahaya se tiene una fase de crecimiento hasta los 14 días y una fase estacionaria hasta los 30 días (Figura 11). Estos resultados se corroboran con los de otras investigaciones como la reportada por Reyes Martínez

et al. (2019), en donde se realizó curvas de crecimiento para el cactus bola de nieve (*Mammillaria candida*) y la biznaguita (*Turbincarpus laui*), las mismas que fueron monitoreadas hasta los 42 días. Los resultados arrojaron una fase de latencia hasta los 14 días para *M. candida*, mientras que para *T. laui* no se pudo observar una fase de latencia, únicamente una fase de crecimiento que se extendió a lo largo de los días de experimentación. Sin embargo, cabe mencionar que este estudio se desarrolló en base análisis gravimétricos de callos mas no de suspensiones celulares, en donde se determinó peso seco y peso fresco.

Figura 11.

Curva de crecimiento celular en el medio óptimo.



Nota: La curva de crecimiento se desarrolló durante 30 días con la toma de muestra en intervalos de 7 días, los datos se reportan en peso fresco (g). Además, se realizó un análisis de viabilidad con azul de tripano (0,4%) a 40X en un microscopio óptico.

3.4. Análisis de propiedades nutricionales

3.4.1. pH y sólidos solubles totales (SST)

Las mediciones de los grados Brix y el pH se realizaron por triplicado a partir de la fruta madura. Los SST se determinaron directamente del jugo de la fruta con un

refractómetro teniendo un resultado de $17,5 \pm 0,02$ °Brix. El sabor de la fruta depende de su madurez, el cual es un factor importante dentro de la concentración de los azúcares, se sabe que los SST de la pitahaya que tiene mayor influencia es la glucosa y fructosa (Canicoba, 2022). Autores como Usaga et al. (2022), caracterizaron el jugo de pitahaya teniendo un contenido de sólidos solubles de 11 °Brix y un pH de $3,78 \pm 0,04$. Cabe recalcar que estos últimos resultados fueron caracterizados de la pitahaya morada (*Hylocereus* sp.) y por tal razón difieren de los resultados obtenidos en esta investigación. Mientras que, Arivalagan et al. (2021) caracterizó a la pitahaya con pulpa blanca y midió un pH de 4,9 acercándose más al resultado obtenido de 4,84.

Estudios más cercanos de la variedad de pitahaya como los de Canicoba (2022), reportaron a *H. megalantus* con valores entre 16 y 19 °Brix, corroborando así los resultados de la presente investigación. Otro estudio señaló que la fruta madura de Palora posee un valor de 20,10 °Brix y 17,9 °Brix para el ecotipo Nacional, adicionando que la pitahaya amarilla tiene un alto contenido de azúcares en comparación de la pitahaya roja (Sotomayor et al., 2019).

3.4.2. Análisis de la capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides

Capacidad Antioxidante

El análisis de DPPH realizado de las células de pitahaya presentó 33,285% menos comparados con el jugo de la fruta (Figura 12). El resultado obtenido del callo presentó resultados bajos 6,197%. Estudios similares reportados por Mercedes & Allegue (2018), del análisis en células de *Moringa oleífera* presentaron 15,234% de la capacidad antioxidante, los datos difieren debido a la especie vegetal y por el uso de elicitores.

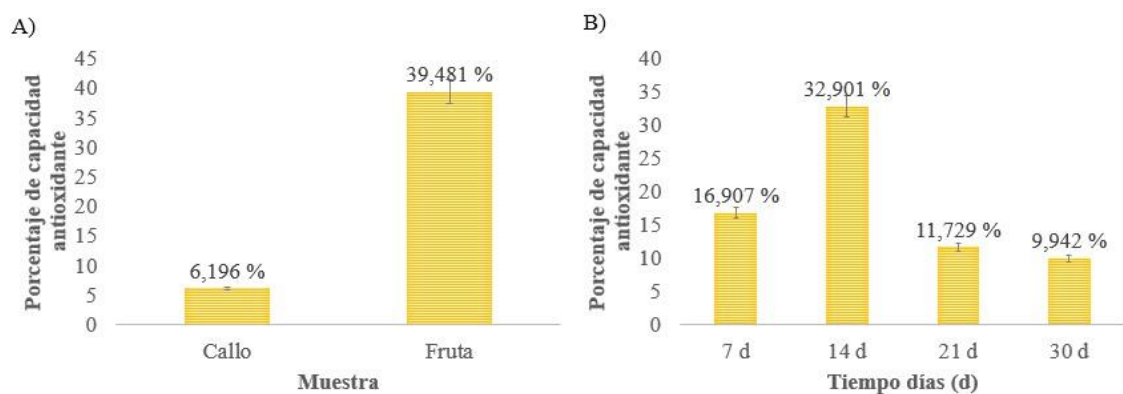
Los análisis de DPPH realizados del jugo de la fruta en la presente investigación dio valores de 39,481% (Figura 12:A) mostrando resultados similares reportados en Corea del Sur por Kim et al. (2011), la pitahaya de pulpa blanca presentó $23,8 \pm 3,3\%$ de capacidad antioxidante. De la misma manera, Montoya Vizúete et al. (2022), corroboraron los resultados en la especie *Hylocereus* sp. de pulpa blanca con un contenido de 36,5%.

Estudios realizados en Colombia mostraron resultados superiores en extracto etanólico de *H. megalanthus* ($85,0 \pm 0,2\%$). Además, Quispe et al. (2021) reporta que en extractos metanólicos de la pulpa blanca de pitahaya presenta $93,14 \pm 3,70\%$. La diferencia de los resultados puede deberse al uso del solvente, las variaciones genéticas de la especie y las condiciones climáticas de desarrollo de la fruta (Morillo-Coronado et al., 2017).

El análisis de DPPH durante el crecimiento celular se muestra en la Figura 12:B, en donde se observa un alto valor a los 14 días con un 32,901% de capacidad antioxidante, esto puede deberse a que el valor es proporcional al aumento de la biomasa, en donde el metabolismo celular se encuentra activo para realizar procesos de mitosis y favorecer la tasa de crecimiento, esto sucede una vez el cultivo haya encontrado un equilibrio (Arano, 2022). Los estudios de las suspensiones celulares de *H. costaricensis* determinó la actividad antioxidante en sus diferentes etapas de crecimiento (desde 4 a 28 días), en donde se identificó a los 4 y 8 días resultados elevados ($71,33 \pm 2,31\%$ y $68,01 \pm 3,48\%$), mientras que en el día 20 la capacidad antioxidante disminuyó significativamente hasta obtener un $49,97 \pm 2,80\%$ (Winson et al., 2020). La diferencia de los resultados se debe previo análisis de la muestra.

Figura 12.

Capacidad antioxidante por el método DPPH.



Nota: Las muestras fueron diluidas en agua (1:10). **A)** Capacidad antioxidante en callo y fruta. **B)** Cuantificación de la capacidad antioxidante en la curva de crecimiento celular.

Fenoles

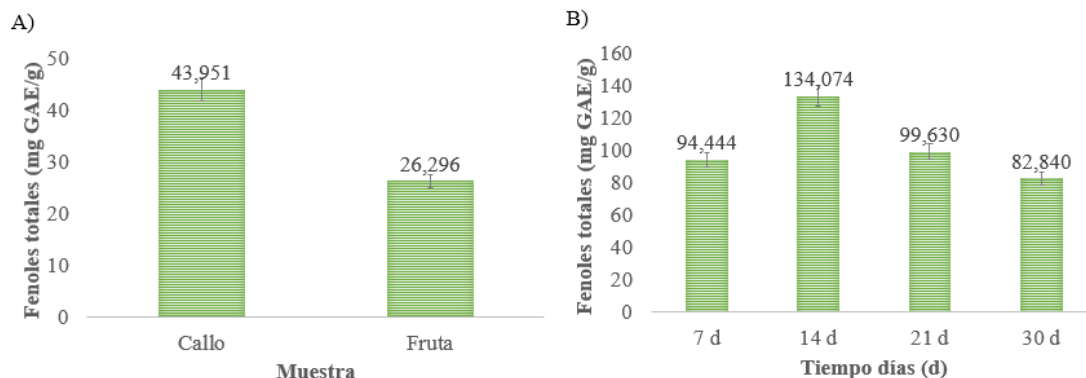
En el análisis del contenido de fenoles totales (Figura 13:A), el valor más alto lo presentó los sistemas celulares con un 43,95 mg GAE/g, siendo 1,67 veces superior a la fruta. Estudios previos en pitahaya roja (*H. polyrhizus*) reportan diferentes contenidos de fenoles en los que se alcanzan valores de hasta $60,88 \pm 14,18$ mg GAE/100 g (Hernández & Salazar 2017). Tal como se cita en el mismo estudio, el método de Folin-Ciocalteu resulta ser no muy específico para analizar los fenoles solubles totales de una muestra y es por esto que, el valor obtenido puede ser sobrevalorado por la presencia de aminoácidos o azúcares en la muestra.

Otras especies cercanas como *Pereskia* spp., perteneciente a la familia de las Cactaceae presentaron valores de $2,72 \pm 0,12$ y $5,86 \pm 0,09$ mg GAE/g para callo a partir de tallo y hoja respectivamente (Macías, 2017). Estos resultados muestran que el contenido de fenoles totales es alto y esto puede estar relacionado a la diferencia taxonómica de *P. sacharosa* y *H. megalanthus*, que a pesar de pertenecer a la misma familia presentan datos discrepantes. Además, se puede también inferir que el solvente empleado en el método de extracción es importante para la evaluación del contenido de fenoles. En el caso de este estudio se realizó con metanol, mientras que para la evaluación de callos de *P. sacharosa* con etanol (Hassanbaglou et al., 2012; Macías, 2017).

Los niveles de fenoles totales en cultivos celulares fueron evaluados conforme la curva de crecimiento, los datos se muestran en la Figura 13:B. En los resultados se observa el contenido más alto de fenoles en callos de *H. megalanthus* siendo de 134,074 mg GAE/g a los 14 días del establecimiento de los cultivos celulares. Esta tendencia se observa también en estudios de suspensiones celulares de *T. laui* perteneciente a la familia de las Cactaceae, en los que existen altos niveles de fenoles entre los 12 y 15 días después del inicio de los cultivos celulares (Reyes Martínez et al., 2019).

Figura 13.

Contenido de fenoles totales.



Nota: Las muestras fueron diluidas en agua (1:5). **A)** Contenido de fenoles totales en callo y fruta. **B)** Cuantificación del contenido de fenoles totales a lo largo de la construcción de la curva de crecimiento.

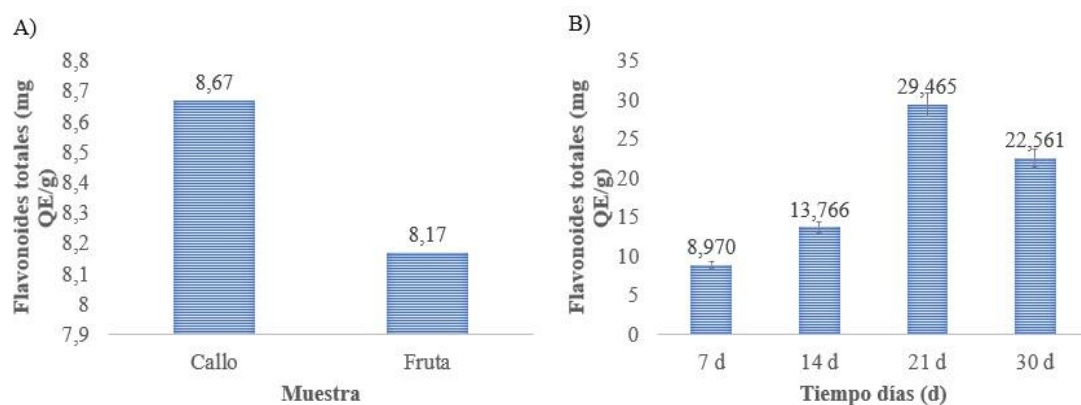
Flavonoides

El contenido de flavonoides no presenta una diferencia significativa entre el callo y la fruta, los datos se muestran en la Figura 14:A. No existen investigaciones previas que reporten el contenido de flavonoides en especies de la familia de las Cactaceae en sistemas biotecnológicos como células vegetales. Sin embargo, si se reporta en la fruta de pitahaya de la variedad *H. polyrhizus* que presentó 7,2 mg QE/g. Estos resultados son relativamente similares a los obtenidos en este estudio en la variedad *H. megalanthus* con un valor de 8,17 mg QE/g (Corzo et al., 2016).

Por otro lado, los resultados obtenidos en la curva de crecimiento de suspensiones celulares se muestran en la Figura 14:B y reflejan el más alto contenido de flavonoides a los 21 días con 29,465 mg QE/g. Contrariamente esta tendencia no se evidencia en las pocas investigaciones como la de Winson et al. (2020), reportando que en el día 4 se obtuvo el mayor resultado (5,03 mg QE/g) y esta disminución se ve acentuada al día 20 con un valor de $0,58 \pm 0,19$ mg QE/g.

Figura 14.

Contenido de flavonoides totales.



Nota: Las muestras fueron diluidas en agua (1:5). **A)** Contenido de flavonoides totales en callo y fruta. **B)** Cuantificación del contenido de flavonoides totales a lo largo de la construcción de la curva de crecimiento.

3.4.3. Análisis comparativo de la fruta y callos

Se evaluó los componentes nutricionales de la pulpa de la pitahaya amarilla (*H. megalanthus*), en donde se obtuvo un contenido en cenizas de 0,344 %. Las cenizas corresponden a los residuos de carácter inorgánico que no llegan a incinerarse cuando se realizan estudios de determinación de calidad de alimentos (Márquez, 2014). El valor evaluado de cenizas se equiparó a los resultados mostrados por Huachi et al., (2015); Ibrahim et al. (2018); Mercado-Silva (2018) de 0,4 %. En cuanto al contenido de proteína este fue de 11,1 %, el cual se pudo contrastar con la información reportada por Ibrahim et al., (2018) y Mercado-Silva, (2018) donde reportaron un contenido de 0,4 % mientras que Obregón et al., (2021) de $0,5 \pm 0,02$ %.

Existe escasa información que permitan comparar los datos de la presente investigación en *H. megalanthus*. Sin embargo, se reporta el contenido nutricional en otras variedades cercanas como *H. guatemalensis* en el estudio realizado por Huachi et al., (2015) y Sotomayor et al., (2019), donde obtuvieron un valor de 0,67 % para proteína en la pulpa. Este valor difiere con el dato obtenido en esta investigación (Tabla 10) y podría deberse a que *H. guatemalensis* corresponde a una pitahaya de

pulpa roja y fruto rojo, sin embargo, se menciona que las características nutricionales que presenta *H. megalanthus* son mejores a las de otras especies (Obregón et al., 2021).

A continuación, se reporta una tabla comparativa con otros estudios referente al contenido nutricional en la fruta de pitahaya, en donde se puede concluir que existe una notable diferencia entre los valores evaluados de proteína, grasas, fibra y carbohidratos (Tabla 10). Estas diferencias están relacionadas con la diversidad genética que existe en una misma especie de pitahaya en este caso de *H. megalanthus*. Siendo así que, estas características son regidas por las condiciones geográficas y ambientales en las que se desarrolló el fruto. Por esta razón, los componentes nutricionales varían entre la pitahaya amarilla de este estudio y la encontrada en literatura (Morillo-Coronado et al., 2017).

Tabla 10.

Comparación entre valores evaluados y bibliográficos de las propiedades nutricionales de la pitahaya.

Componente nutricional	Valor evaluado	(Ibrahim et al., 2018; Mercado-Silva, 2018)	(Giménez Solano, 2021; Obregón et al., 2021)	(Huachi et al., 2015; Vargas et al., 2020)
Cenizas	0,344 %	0,4 %	0,19 ± 0,02 %	0,4 %
Proteína	11,1 %	0,4 %	0,5 ± 0,02 %	0,67 %
Humedad	80,8 %	85 %	82 ± 0,2 %	84,8 %
Grasas	1,01 %	0,1 %	-	0,21 %
Fibra Dietética	4,20 %	0,5 %	0,3 ± 0,1 %	0,77 %
Carbohidratos	3,00 %	13,2 %	9,1 ± 0,20 %	13,38 %

Con respecto a los callos específicamente del género *Hylocereus* y la familia Cactaceae no se han encontrado datos bibliográficos del contenido nutricionales con los grupos aquí evaluados (cenizas, proteína, humedad, grasas, fibra y carbohidratos) que permitieran realizar una comparativa. Sin embargo, existen reportes de evaluaciones

de contenido de fenoles, flavonoides y antioxidantes en la familia Cactaceae, los mismos que han sido presentado en las anteriores secciones.

De manera general se puede decir que, al comparar las propiedades nutricionales de la fruta y el callo (Tabla 11), se obtuvo que el callo posee valores significativos que pueden llegar a constituir un sustituto alimentario de la pitahaya. En el caso de los carbohidratos totales, la fruta y el callo poseen el mismo resultado (3%). Con respecto al componente de proteínas, la fruta posee 6,8 veces más comparado con el callo, mientras que en fibra dietética total en el callo posee la mitad del valor de la fruta. Las cenizas y humedad son mayores en el callo, esto se debe a que los cultivos vegetales *in vitro* requieren más humedad relativa entre el 50% y 80% comparada con la del ambiente para que el callo pueda mantenerse en constante proliferación (Aranzales, 2018).

Tabla 11.

Análisis de las propiedades nutricionales de la fruta y callo.

Ensayo	Fruta	Callo	Unidades
*Cenizas, Gravimetría	0,344	0,595	%
*Proteína, Kjeldhal	11,1	1,61	%
*Humedad, Gravimetría	80,8	94,6	%
*Grasas, Gravimetría	1,01	0,123	%
*Fibra dietética total	4,20	2,53	%
*Carbohidratos Totales	3,00	3,00	%
Sólidos solubles	17,5 ± 0,02	-	° Brix
pH	4,84	-	-

*: Análisis realizados en LACONAL, ± refiere a la desviación estándar

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El tratamiento con menor cantidad de mucílago en las semillas para establecer plántulas de pitahaya con una tasa de germinación del 35% fue el tratamiento 4, cuando las semillas fueron sumergidas a 1 hora de hidratación, eliminándose grandes cantidades de mucilago.
- En el estudio de la optimización de un medio de cultivo para el establecimiento de desdiferenciación celular y callogénesis se encontró que los tratamientos suplementados con la mayor concentración de ANA (2 mg/L) y KIN (1 mg/L) como reguladores de crecimiento fueron eficaces para inducir la formación de callos a partir de explantes de pitahaya. Por otro lado, el uso de 2,4-D mostró resultados desfavorables, con poca formación de callos y oxidación de los explantes.
- Con respecto a la mejor composición de medio de cultivo se observó que el que el medio B5 fue exitoso en la formación de callos compactos frente al MS, aunque en varios tratamientos también se obtuvo un crecimiento de raíces durante la inducción de callos, lo que sugiere que también puede ser útil para el desarrollo de órganos vegetales específicos.
- El establecimiento de cultivos celulares de *H. megalanthus* permitió identificar las distintas fases crecimiento, el cual será útil para escalamientos a futuro. La fase de adaptación se observó hasta los 7 días, la fase de crecimiento desde el día 7 al día 14 y la fase estacionaria que comprende desde el día 14 al día 30, no se logró evidenciar la fase de muerte celular, aún a los 30 días de experimentación.
- En el análisis nutricional de sistemas biotecnológicos como los cultivos celulares se observó que hasta los 14 días (fase de crecimiento) se tiene el valor más alto de capacidad antioxidante (32,901 %) y contenido de fenoles totales (134,074 mg GAE/g). Mientras que un alto valor de flavonoides totales (29,465 mg QE/g) se lo encontró hasta los 21 días en la fase estacionaria.

- La comparación nutricional entre la fruta y los cultivos celulares de *H. megalanthus* mostró que el contenido de proteína en la fruta es 6,89 veces más alto que en los cultivos celulares. Mientras que el contenido de fibra dietética total en los cultivos celulares es 1,66 veces menor en comparación de la fruta. En cuanto al contenido de carbohidratos totales fue de 3% siendo similar tanto en fruta como en las células.
- De manera general se puede decir que, lo sistemas biotecnológicos como el cultivo celular puede representar un sustituto alimentario a futuro.

4.2. Recomendaciones

- Para complementar el perfil nutricional se debería realizar estudios metabólicos dirigidos que nos permita una visión holística del perfil nutricional en diferentes sistemas biotecnológicos de pitahaya amarilla (azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas y ácidos fenólicos) por medio de técnicas analíticas más precisas como un RMN o LC masas.
- Complementar este estudio con otros sistemas biotecnológicos a partir de órganos vegetales como raíces adventicias y transformadas, ya que permitiría conocer diferencias de presencia y concentración de metabolitos, lípidos y/o aminoácidos frente a los cultivos celulares, presentados en este estudio. Por lo tanto, este enfoque aportaría a encontrar diferentes sistemas biotecnológicos que puedan constituir un mejor sustituto alimentario.
- Los sistemas biotecnológicos podrían ser un sustituto alimentario a futuro, sin embargo, se podría mejorar las características de los perfiles nutricionales con procesos de elicitación o con la adición de precursores que potencien las rutas metabólicas de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, Z. (2022). Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de extractos obtenidos de *Scenedesmus* sp. *Universidad Técnica de Ambato*, 33(1), 1–12. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/36548/1/CBT_008.pdf
- Alcántara, J., Castilla, M., & Sánchez, R. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *Invitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 1, 72–83.
- Allegue, M., & Mercedes, E. (2018). *Estudio de la capacidad antioxidante en células de pimiento elicidadas con un extracto de hojas de Moringa oleifera* [Universidad de Coruña]. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/21546>
- Álvaro, O., Ayala, G., Lugo, G., Ochoa, A., & Pacheco, A. (2020). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis en explantes de *Krameria erecta* Willd *In vitro* induction of callogenesis and organogenesis in explants of *Krameria erecta* Willd INTRODUCCION La familia de las Krameriaceae comprende 17 especies en un solo. *Revistasabanico*, 1–13.
- Angonese, M., Motta, G. E., Silva de Farias, N., Molognoni, L., Daguer, H., Brugnerotto, P., de Oliveira Costa, A. C., & Olivera Müller, C. M. (2021). Organic dragon fruits (*Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*) grown at the same edaphoclimatic conditions: comparison of phenolic and organic acids profiles and antioxidant activities. *LWT*, 149, 111924. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111924>
- Aparecida Rodrigues, M., Aparecida da Silveira, F., Amato Moreira, R., Souza Pádua, M., Eduardo Brasil Pereira Pinto, J., Aparecida Salles Pio, L., Nazaré dos Santos, D., Sílvia de Sousa Bueno Filho, J., & Alves Carvalho Reis, L. (2022). Regeneration of pitaya by indirect organogenesis evaluated by scanning electron microscopy and flow cytometry. *Pesq. Agropec. Bras.* <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2022.v57.02312>
- Arano, H. (2022). Cultivo de tejidos y células vegetales para la producción de compuestos bioactivos. *Revista de Divulgación Científica IBIO*. <http://revistaibio.com/ojs33/index.php/main/article/view/112/117>

- Aranzales, E. (2018). Conservación in vitro. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*.
- Arivalagan, M., Karunakaran, G., Roy, T. K., Dinsha, M., Sindhu, B. C., Shilpashree, V. M., Satisha, G. C., & Shivashankara, K. S. (2021). Biochemical and nutritional characterization of dragon fruit (*Hylocereus* species). *Food Chemistry*, 353(129426). <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129426>
- Canicoba, C. J. (2022). *Influencia del estado de madurez en las características físico-químicas y nutricionales de pitahaya amarilla (Hylocereus megalanthus) bajo sistema de tutor*. 88. https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/2733/Canicoba_Rubio_Carla_Julissa.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Corzo, L., Bautista, M., de la Mercedes, Y., & Torres, L. (2016). Frutas de cactáceas: compuestos bioactivos y sus propiedades nutraceuticas. *Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI Del IPN), México*, 1–31.
- da Silva Santos, É., Braz de Oliveira, A. J., de Fátima Pires da Silva Machado, M., Mangolin, C. A., & Correia Gonçalves, R. A. (2021). *Cereus hildmannianus* (K.) Schum. (Cactaceae): ethnomedical uses, phytochemistry and biological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 264(113339). <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.113339>
- Díaz, M., Rodas, J., Gonzalez, L., & Ortiz, M. (2021). Control de la oxidación fenólica de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* en condiciones in vitro. *Cedamaz*, 11(1), 1–5.
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1). <https://doi.org/10.1007/S00425-018-2910-1>
- Esther, M., Alarcón, T., Luis, I.-I. O., Lagares, V., Alfonso, E., Abello, C., Glicerio, I., Méndez, L., Clemente, I.-I., Conde, G., Nerlis, I., Pajaro, P., Soledad, M., & Soto, C. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante de las pulpas de *Rubus*

- glaucus B, Vaccinium floribundum K y Beta vulgaris L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1–8.
- FAO. (2017). El futuro de la alimentación y la agricultura, tendencias y desafíos. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura*, 1(1). <https://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>
- FAO. (2021). *Cell-based food | Food safety and quality | Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <https://www.fao.org/food-safety/scientific-advice/crosscutting-and-emerging-issues/cell-based-food/en/>
- Fernandes, S., Coelho, M., & Salas-Mellado, M. (2019). Bioactive compounds as ingredients of functional foods. In *Bioactive Compounds* (pp. 129–142). <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00007-4>
- Golkar, P., & Taghizadeh, M. (2018). *In vitro* evaluation of phenolic and osmolite compounds, ionic content, and antioxidant activity in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under salinity stress. 134, 357–368. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1427-4>
- González Burgas, G. (2020). *Micropropagación in vitro de pitahaya amarilla (Selenicereus megalanthus Haw) a partir de tallos seleccionados de siembras comerciales, Limoncito - Santa Elena* [Universidad Agraria del Ecuador]. https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/GONZALEZ%20BURGAS%20GUSTAVO%20ANDRES_compressed.pdf
- Google maps. (2023). *Ubicación de Palora*.
- Häkkinen, S. T., Nygren, H., Nohynek, L., Puupponen-Pimiä, R., Heiniö, R. L., Maiorova, N., Rischer, H., & Ritala, A. (2020). Plant cell cultures as food— aspects of sustainability and safety. *Plant Cell Reports*, 39(12), 1655–1668. <https://doi.org/10.1007/S00299-020-02592-2/FIGURES/6>
- Hassanbaglou, B., Hamid, A. A., Roheeyati, A., Saleh, N. M., Abdulmir, A., Khatib, A., & Sabu, M. (2012). Antioxidant activity of different extracts from leaves of *Pereskia bleo* (Cactaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(15). <https://doi.org/10.5897/jmpr11.760>

- Hernández, A., & Diaz, H. (2019). Inducción in vitro de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en “ papa In vitro induction of embryogenic callus from anther culture in “ yellow potato ” *Solanum goniocalyx* Juz . *Arnaldoa*, 26(1), 277–286.
- Hernández, G., & Salazar, M. (2017). *Efecto de las betalaínas y fenoles solubles totales de pitahaya (Hylocereus polyrhizus) como antioxidantes en yogur* [Grado académico , Escuela Agrícola Panamericana]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/5d9e94ed-3b91-428b-a83b-56cdf17e8dc/content>
- Hernández-Amasifue, A., Agüelles Curaca, A., Cortez Lázaro, A., & Díaz Pillasca, H. (2021). Inducción in vitro de callos a partir de explantes foliares en rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *La Granja. Revista de Ciencias de La Vida*, 34(2). <https://www.redalyc.org/journal/4760/476068396011/476068396011.pdf>
- Hernández-Amasifuen, A. D., Argüelles-Curaca, A., Cortez-Lázaro, A. A., & Díaz-Pillasca, H. B. (2021). In vitro induction of callus from foliar explants in rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *Granja*, 34(2), 127–135. <https://doi.org/10.17163/LGR.N34.2021.09>
- Huachi, L., Yugsi, E., Paredes, M. F., Coronel, D., Verdugo, K., & Coba, P. (2015). Desarrollo de la pitahaya (*Cereus* sp) en ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 22(2). <https://doi.org/10.17163/lgr.n22.2015.05>
- Hyeon, B. S., Cao, L., Jeong, S. J., Kim, H.-R., Taek Jeung, N., & Lee, S. G. (2021). *The comparison of total phenolics, total antioxidant, and anti-tyrosinase activities of korean Sargassum species.*
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Khedr, A. I. M., Zayed, M. F., & El-Kholy, A. A. E. S. (2018). Genus *Hylocereus*: beneficial phytochemicals, nutritional importance, and biological relevance. *Journal of Food Biochemistry*, 42(2), e12491. <https://doi.org/10.1111/JFBC.12491>
- IICA. (2018). *Pitahaya o fruta del dragón se fomenta significativamente en la República Dominicana*. Instituto Interamericano de Cooperación Para La

Agricultura. <https://www.iica.int/es/prensa/noticias/la-pitahaya-o-fruta-del-dragon-se-fomenta-significativamente-en-la-republica>

INIAP. (2020). Manual del cultivo de pitahaya para la amazonía ecuatoriana. *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Estación Experimental Central de La Amazonía*, 117. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5551/1/INIAPMANUAL117-2020.pdf>

Jiang, H., Zhang, W., Li, X., Shu, C., Jiang, W., & Cao, J. (2021). Nutrition, phytochemical profile, bioactivities and applications in food industry of pitaya (*Hylocereus* spp.) peels: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 199–217. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.06.040>

Kim, H. J., Choi, H. K., Moon, J. Y., Kim, Y. S., Mosaddik, A., & Cho, S. K. (2011). Comparative Antioxidant and Antiproliferative Activities of Red and White Pitayas and Their Correlation with Flavonoid and Polyphenol Content. *Journal of Food Science*, 76(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01908.x>

Lalaleo, L. (2012). *Obtención y Optimización de líneas celulares vegetales de Corylus avellana para la producción de taxanos*. 38.

Lozzi, A., Abdelwahd, R., & Abousalim, A. (2019). Optimization of a mature cotyledons-based in vitro culture system for embryogenic-callus induction in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-40182019000100071&script=sci_abstract

Macías, D. D. (2017). *Establecimiento de cultivos de callos de Pereskia spp., su análisis fitoquímico y evaluación de actividad antioxidante* [Grado, Universidad Autónoma de Aguascalientes]. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/1385/420077.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mállap-Detquizán, G., Vilca-Valqui, N., Meléndez-Mori, J., Huaman-Huaman, E., & Oliva, M. (2022a). Multiplicación in vitro de pitahaya amarilla (*Hylocereus*

- megalanthus) a partir de plántulas obtenidas in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1), 1–13. <https://www.redalyc.org/journal/437/43768481012/html/>
- Mállap-Detquizán, G., Vilca-Valqui, N., Meléndez-Mori, J., Huaman-Huaman, E., & Oliva, M. (2022b). Multiplicación in vitro de pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) a partir de plántulas obtenidas in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1), 1–13.
- Márquez, B. (2014). *Cenizas y grasas. Teoría del muestreo. Refrigeración y congelación de alimentos: terminología, definiciones y explicaciones* [Profesionalización, Universidad Nacional de San Agustín]. <https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/e8bd5b97-f205-4b7e-bcd6-b34d7ab4fbe2/content#:~:text=%E2%9E%A2%20El%20t%C3%A9rmino%20%22cenizas%20de,esta%20temperatura%20se%20denomina%20ceniza.>
- Martínez, Y., Rodríguez, M., Villegas, Á., Tejacal, I., Villegas, O., & López, V. (2011). *Cultivo in vitro de pitayo (Stenocereus stellatus [Pfeiffer] Riccobono)*. Rev. Chapingo Ser.Hortic. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000300002
- Mercado-Silva, E. (2018). Pitaya. *Hylocereus undatus* (Haw). In *Exotic Fruits* (pp. 339–349). <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00045-9>
- Mercedes, E., & Allegue, M. (2018). Estudio de la capacidad antioxidante en células de pimiento elicidadas con un extracto de hojas de *Moringa oleifera*. *Universidad de Coruña*, 1–31.
- Merouane, A., Fellag, S., & Noui, A. (2021). Variation of phenolic content and antioxidant activity in organs and populations of *phlomis crinita* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 25(4).
- Moldes, E. (2018, October 6). Estudio de la capacidad antioxidante en células de pimiento elicidadas con un extracto de hojas de *Moringa oleifera*. *Memoria Del Trabajo de Fin de Grado*, 3–31. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/21546>

- Molkanova, O., Koroleva, O., Shirmina, I., & Konovalova, T. (2019). Basics of long-term conservation and micropropagation of valuable plant species and cultivars in gene pool collections of MBG RAS. *Journal of Biotechnology*, 305, S55. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2019.05.194>
- Montiel-Frausto, L. B., Enríquez del Valle, J., & Cisneros, A. (2016). Propagación in vitro de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) britton y rose. *Biotecnología Vegetal*, 16(2), 113–123. <https://biblat.unam.mx/hevila/Biotecnologiavegetal/2016/vol16/no2/6.pdf>
- Montoya Vizuite, S. N., Castillo Mendoza, B. E., Cajas Palacios, M. P., & Garcia Larreta, F. S. (2022). Actividad antioxidante, fenoles totales y tamizaje fitoquímico de Dragón Fruit roja y amarilla. *Reciamuc*, 6(3), 408–417. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(3\).julio.2022.408-417](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(3).julio.2022.408-417)
- Morillo-Coronado, A. C., Tovar-León, P., & Coronado, M. (2017). Caracterización molecular de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw.) en la provincia de Lengupá, Boyacá-Colombia. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 11–18. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)11-18](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)11-18)
- Nordlund, E., Lille, M., Silventoinen, P., Nygren, H., Seppänen-Laakso, T., Mikkelsen, A., Aura, A. M., Heiniö, R. L., Nohynek, L., Puupponen-Pimiä, R., & Rischer, H. (2018). Plant cells as food - a concept taking shape. *Food Research International*, 107, 297–305. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.02.045>
- Obregón, A., Peñafiel, C., Contreras, E., Arias, G., & Romero, M. (2021). Características fisicoquímicas, nutricionales y morfológicas de frutas nativas. *Journal of High Andean Research*, 23(1), 17–25. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ria/v23n1/2313-2957-ria-23-01-17.pdf>
- Qiansheng, L., Ping, Y., Jingru, L., & Mengmeng, G. (2021). Micropropagation of the potential blueberry rootstock—*Vaccinium arboreum* through axillary shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*, 280. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.109908>

- Quispe, E., Chávez, J., Medina, M., & Apumayta, E. (2021). Caracterización química, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de dos ecotipos de pitahaya (*Hylocereus* spp.). *Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472021000309723&script=sci_arttext&tlng=en
- Renneberg, R. (2023). Green Biotechnology. *Biotechnology for Beginners*, 241–290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85569-3.00017-9>
- Reyes Martínez, A., Antunes Ricardo, M., Gutiérrez Uribe, J., & Santos Díaz, M. del S. (2019). Enhanced production and identification of antioxidants in in vitro cultures of the cacti *Mammillaria candida* and *Turbinicarpus laui*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2583–2595. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-09656-8/TABLES/2>
- Rischer, H. (2021, December 10). *Lab-grown coffee & cellular agriculture: The next food revolution*. *Agriculture News*. <https://www.openaccessgovernment.org/cellular-agriculture/125936/>
- Ritala, A., Heiniö, R. L., Häkkinen, S. T., Lille, M., Hyytiäinen-Pabst, T., & Rischer, H. (2022). Tailoring sensory properties of plant cell cultures for food use. *Food Research International*, 157, 111440. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111440>
- Rodríguez Beraud, M. M., Iatsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2018). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111–118. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Rumpf, J., Burger, R., & Schulze, M. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123470. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123470>
- Sotomayor, A., Pitizaca, S., Sánchez, M., Burbano, A., Díaz, A., Nicolalde, J., Viera, W., Caicedo, C., & Vargas, Y. (2019). Evaluación físico química de fruta de pitahaya (*Selenicereus megalanthus*) en diferentes estados de desarrollo. *INIAP -*

Estación Experimental Central Amazónica, 1, 89–96.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5385/1/F%C3%ADsico-qu%C3%ADmico%20fruta%20pitahaya.pdf>

Suárez Román, R. S., Caetano, C. M., Ramírez, H., & Morales, J. (2015). Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronómica*, 63(3), 272–281. <https://doi.org/10.15446/ACAG.V63N3.40980>

UnADM. (2017). Cultivo de tejidos vegetales medios de cultivo. *Universidad Abierta y a Distancia de México*, 36. <https://issuu.com/jazinaruizhernandez/docs/unidad2.mediosdecultivo>

Usaga, J., Barahona, D., Arroyo, L., & Esquivel, P. (2022). Probiotics survival and betalains stability in purple pitaya (*Hylocereus* sp.) juice. *NFS Journal*, 27, 47–53. <https://doi.org/10.1016/J.NFS.2022.05.001>

Villa, D., Osorio, M., & Villacis, N. (2020). Extraction, properties and benefits of mucilages. In *Revista Científica Dominio de la Ciencia*. <http://dx.doi.org/10.23857/dc.v6i2.1181>

VTT Research. (2022). *Cellular food solutions and cellular agriculture*. VTT CellularFood - Creating and Piloting Sustainable, Novel Food Solutions. <https://www.vttresearch.com/en/ourservices/vtt-cellularfood-creating-and-piloting-sustainable-novel-food-solutions>

Winson, K. W. S., Chew, B. L., Sathasivam, K., & Subramaniam, S. (2020). The establishment of callus and cell suspension cultures of *Hylocereus costaricensis* for the production of betalain pigments with antioxidant potential. *Industrial Crops and Products*, 155(April), 112750. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112750>

Zambrano, C., & Ríos, J. (2015). Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación in vitro de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla). *Revista Tumbaga*, 1(10), 76–87.

ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio MS

Tabla 12. Descripción de los macronutrientes, micronutrientes y componentes orgánicos para un litro (L) de medio MS

Componentes Inorgánicos		Componentes Orgánicos	
Macronutrientes		Vitaminas	
KNO ₃	1900 mg/L	Piroxidina HCL	0,5 mg/L
CaCl ₂	440 mg/L	Ácido Nicotínico	0,5 mg/L
MgSO ₄	370 mg/L	Tiamina HCL	0,5 mg/L
(NH ₄).NO ₃	1650 mg/L	Glicina	2 mg/L
KH ₂ PO ₄	170 mg/L		
Micronutrientes		Otros	
KI	0,83 mg/L	Mio-inositol	0,1 mg/L
H ₃ BO ₃	6,2 mg/L	Sucrosa	30 g/L
MnSO ₄ . H ₂ O	16,9 mg/L		
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,63 mg/L		
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25 mg/L		
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0025 mg/L	pH	
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0025 mg/L	5,8±0,2	

Fuente: (UnADM, 2017).

Anexo 1. *Composición de medio B5*

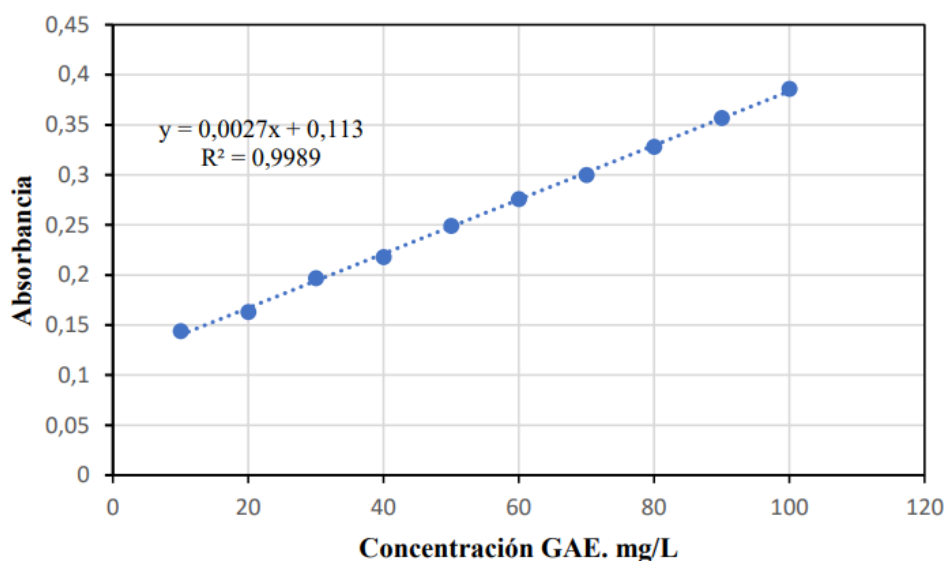
Tabla 13. *Descripción de los macronutrientes, micronutrientes y componentes orgánicos para un litro (L) de medio B5*

Componentes Inorgánicos		Componentes Orgánicos	
Macronutrientes		Vitaminas	
KNO ₃	2527,5 mg/L	Piroxidina HCL	1 mg/L
CaCl ₂ . 2H ₂ O	150 mg/L	Ácido Nicotínico	1 mg/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	246,5 mg/L	Tiamina HCL	10 mg/L
(NH ₄) ₂ . SO ₄	134 mg/L		
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150 mg/L		
Micronutrientes		Hormonas	
KI	0,75 mg/L	2-4 D	(1-2) mg/L
H ₃ BO ₃	3 mg/L	Kinetina	(0,5-1) g/L
MnSO ₄ . H ₂ O	10 mg/L	BAP	(0,5-1) g/L
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2 mg/L	NAA	(1-2) mg/L
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25 mg/L	Otros	
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025 mg/L	Mio-inositol	0,1 mg/L
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0025 mg/L	Sucrosa	30 g/L
Hierro		pH	
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37,2 mg/L	5,8±0,2	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8 mg/L		

Fuente:(UnADM, 2017).

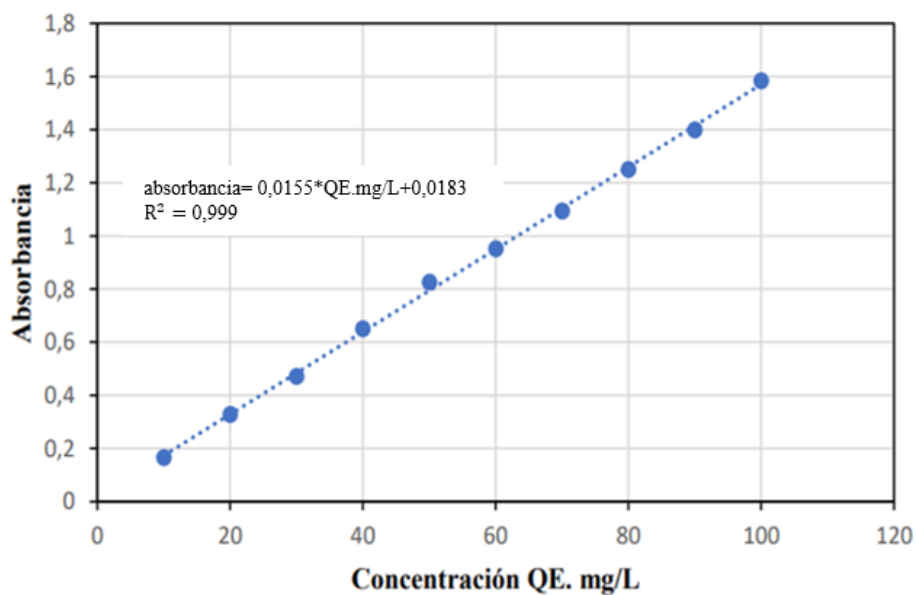
Anexo 2. *Curvas de calibración de fenoles y flavonoides.*

Figura 15. *Curva de calibración de fenoles totales.*



Fuente:(Abril, 2022)

Figura 16. Curva de calibración de flavonoides.



Fuente: (Abril, 2022)

Anexo 3. Análisis realizados en LACONAL.

Tabla 14. Fotografías de los análisis de la fruta y callo realizado por LACONAL

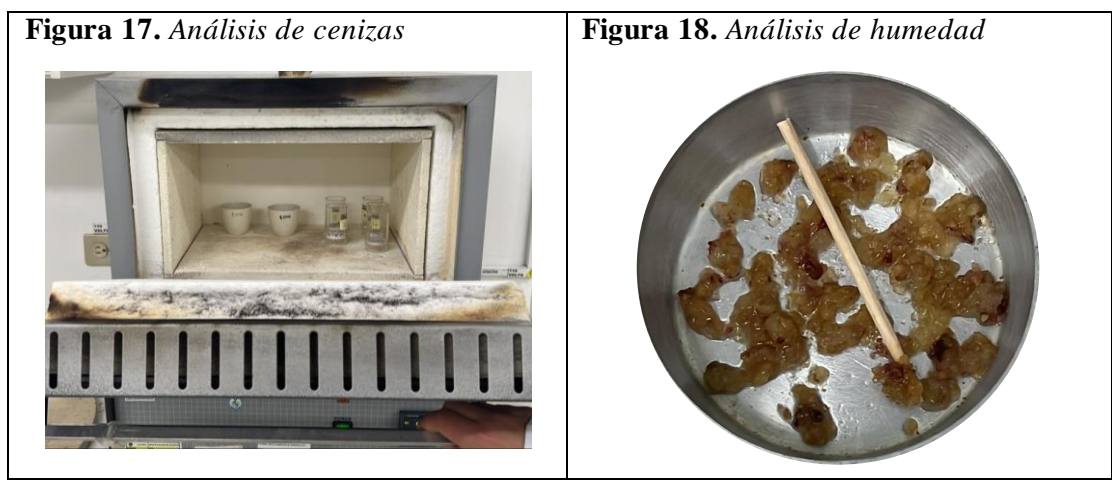


Figura 19. Análisis de grasa



Figura 20. Proceso de cenizas y proteína



Figura 21. Procesos de digestión

