



DOCINADE

Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo
Énfasis en Sistemas de Producción Agrícola

Tesis de Doctorado

**Diseño de un proceso para la obtención de
compuestos bioactivos con capacidad
antioxidante a partir de cultivos celulares de mora
(*Rubus adenotrichos* Schltdl.) en biorreactor**

Alexander Schmidt Durán

Dr. Mario Rodríguez Monroy
Director de Tesis

Dr. Oscar Gerardo Acosta Montoya
Asesor de Tesis

Dra. Laura Andrea Calvo Castro
Asesor de Tesis

San José, Costa Rica, Diciembre, 2023

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Dr. Freddy Muñoz Acosta
Representante Dirección de Posgrados TEC

Dr. David Valverde Barquero
Coordinador General DOCINADE

Dr. Mario Rodríguez Monroy
Director de tesis

Dr. Oscar Gerardo Acosta Montoya
Miembro del Comité Asesor de Tesis

Dra. Laura Andrea Calvo Castro
Miembro del Comité Asesor de tesis

Tabla de contenidos

ÍNDICE DE TABLAS	4
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	5
AGRADECIMIENTOS	6
DEDICATORIA	7
RESUMEN	8
PALABRAS CLAVES	9
ABSTRACT	10
KEYWORDS	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	18
3. SÍNTESIS	19
4. ARTÍCULO 1	21
5. ARTÍCULO 2	53
6. ARTÍCULO 3	61
7. DISCUSIÓN GLOBAL	80
8. CONCLUSIONES	83
9. RECOMENDACIONES	84
10. REFERENCIAS	86

Índice de tablas

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno de importancia biológica

13

Declaración de autenticidad

Yo, Alexander Schmidt Durán, con documento de identidad 113560430, estudiante del Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo, declaro que la Tesis Doctoral que presento para su exposición y defensa titulada *“Diseño de un proceso para la obtención de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante a partir de cultivos celulares de mora (Rubus adenotrichos Schltl.) en biorreactor”* para optar por el Grado Académico de Doctor en Ciencias Naturales para el Desarrollo con énfasis en Sistemas de Producción Agrícola ha sido desarrollada íntegramente por el autor que lo suscribe y afirmo que no existe plagio de ninguna naturaleza. Asimismo, dejo constancia de que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en la tesis, por lo que no se ha asumido como propias las ideas emitidas por terceros. Además, afirmo que soy responsable de todo su contenido y asumo, como autor, las consecuencias ante cualquier falta, error u omisión de referencias en el documento. Se que este compromiso de autenticidad y no plagio puede tener connotaciones éticas y legales. Por ello, en caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a lo dispuesto en las normas académicas que dictaminen las Universidades participantes de este programa doctoral.

Cartago, Costa Rica, 06 de Diciembre de 2023.

Alexander Schmidt Durán
Documento de identidad: 113560430

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer a mi familia, los cuales siempre me han apoyado en todas las aventuras que he realizado.

Adicionalmente, quiero agradecer:

A mi director de tesis, Dr. Mario Rodríguez, por su asesoría y guía para la elaboración de la tesis, a nivel experimental y escrita, así como su ayuda en la pasantía que realicé con él.

A mis asesores de tesis, Dr. Oscar Acosta y Dra. Laura Calvo por su colaboración en la parte de cuantificación y concentración de los compuestos de interés y concentración del metabolito, así como por los consejos y ayuda en el proyecto doctoral.

En general, al Comité de Tesis, su ayuda y guía fue fundamental para poder culminar este proyecto doctoral.

A mis compañeros del Centro de Investigación en Biotecnología y de la Escuela de Biología por su aprobación y ayuda para la elaboración de la tesis, especialmente al Dr. Randall Chacón por su ayuda en los análisis estadísticos y en la revisión de uno de los artículos.

A mis asistentes de los proyectos de investigación relacionados a la tesis, los cuales me colaboraron en incontables tareas que se realizaron durante todo este tiempo.

Al Instituto Tecnológico de Costa Rica y al DOCINADE por darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en este tema que me apasiona.

Dedicatoria

A mi familia, María y Santiago, ellos son mi motor que me impulsa todos los días a salir adelante y a dar lo mejor de mí.

A mi abuelo, porque siempre estuvo para mí.

Resumen

Los antioxidantes son compuestos que pueden neutralizar los radicales libres. El cuerpo humano produce antioxidantes de forma natural; sin embargo, en ciertas condiciones, estos no son suficientes para contrarrestar el efecto de los radicales libres, por lo que se hace necesario suplementarlos a través de la alimentación. La mora ha sido catalogada como una fruta con alta capacidad antioxidante, debido principalmente a su contenido de elagitaninos. Los elagitaninos son polifenoles que, al ser metabolizados por la microbiota intestinal se transforman en urolitinas, las cuales presentan una alta biodisponibilidad y funcionan como potentes agentes antioxidantes. Sin embargo, los estudios de los compuestos bioactivos en la mora se han centrado en la fruta o el jugo, pero hay poca investigación científica usando herramientas biotecnológicas. Por esta razón, el objetivo de este proyecto doctoral fue diseñar un proceso para la obtención de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante a partir de cultivos celulares de mora obtenidos en biorreactor. Primeramente, se realizó una búsqueda y análisis de todos los trabajos disponibles sobre la mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.). En el documento de revisión, se evidenció la alta concentración de elagitaninos que posee la fruta de mora; las diferencias existentes entre diferentes especies y variedades de mora; así como la influencia que tienen las condiciones ambientales en la acumulación de los metabolitos de interés. Además, se documentó cómo los elagitaninos sufren degradación en el procesamiento para la obtención de jugo, especialmente por fenómenos relacionados con el aumento de la temperatura, por lo que diferentes investigadores generaron estrategias de concentración de los metabolitos de interés sin la intervención de calor. No obstante, a pesar de que existe degradación de los compuestos de la mora, éstos mantuvieron su actividad biológica *in vitro*, mostrando efectos antioxidantes y antiinflamatorios, así como generando apoptosis celular en líneas celulares cancerígenas. Además, en las pruebas *in vivo* que se han realizado, el jugo de mora evidenció potencial para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Los trabajos realizados hasta la fecha demuestran el alto potencial que esta fruta tiene como agente antioxidante, pero a su vez, también evidenció la poca investigación en esta especie utilizando herramientas biotecnológicas.

Seguidamente, se estableció el cultivo de las células de mora en matraz Erlenmeyer, determinando el tipo de tapón y le medio de cultivo donde se obtuvieron las mayores concentraciones de ácido elágico y vanillina. Para esto, se estandarizó las metodologías de extracción y cuantificación de los compuestos de interés. Se trabajó con la técnica de

polifenoles totales por Folin-Ciocalteu, la capacidad antioxidante mediante el radical libre DPPH y la cuantificación de compuestos específicos de interés mediante el uso del UHPLC. Se determinó que tres extracciones a las células de mora liofilizadas con metanol al 100% como solvente, era el método donde se obtenía las concentraciones más altas de los metabolitos estudiados. Se eligió el tapón de algodón para los cultivos en los matraces Erlenmeyer, debido a que resultó el más adecuado para el crecimiento de los cultivos. Además, se evaluaron seis medios de cultivo distintos, obteniendo que el medio Gamborg, suplementado con 6-benciladenina, ácido indol-3-butírico y fuentes de nitrógeno orgánicas como la L-glutamina y la caseína hidrolizada fue el que más favoreció la producción de ácido elágico y vanillina.

Por último, se establecieron las condiciones para los cultivos celulares de la mora en biorreactor de tanque agitado. Se observó que el estrés hidrodinámico es un factor que afecta significativamente a las células de mora, ya que al utilizar un impulsor turbina Rushton, el cual provoca un mayor estrés hidrodinámico, ocasionó una disminución de la biomasa obtenida, principalmente por los daños letales que se produjeron. Sin embargo, también se producen daños subletales, los cuales activan metabolismos de defensa en la célula, especialmente los relacionados con el estrés oxidativo, lo cual pudo haber sido la causa de que en este tipo de impulsor se obtuviera una mayor síntesis de ácido gálico, ácido elágico y vanillina, en comparación con el impulsor de propela marina. Adicionalmente, se pudo comprobar que los polifenoles estudiados también son degradados por procesos de concentración térmica como el rotavapor.

Se logró demostrar que es factible producir compuestos bioactivos con capacidad antioxidante a partir de cultivos celulares de mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) aceptando la hipótesis propuesta con el proyecto doctoral.

Palabras claves

Mora; *Rubus adenotrichos*; cultivos celulares, biorreactor, compuestos antioxidantes.

Abstract

Antioxidants are compounds that can neutralize free radicals. The human body produces antioxidants naturally; however, under certain conditions, these antioxidants are not enough to counteract effect of free radicals, and it is necessary to supplement them through food. The blackberry has been classified as a fruit of high antioxidant capacity, mainly due to its ellagitannins content. Ellagitannins are polyphenols that, when metabolized by the gut bacteria, are transformed into urolithins; compounds which are highly available and function as important antioxidant agents. However, research performed on blackberry has focused on the fruit or its juice, and there are few studies considering the use of biotechnological tools. Therefore, the aim of this doctoral project was the development of a process design that would allow obtaining bioactive compounds with antioxidant capacity from blackberry cell cultures grown in a bioreactor.

First, a study of all the research available on blackberry (*Rubus adenotrichos* Schlttdl.) was performed. In the document review, it was possible to confirm the high ellagitannin content found in blackberry fruit, the existing differences between the diverse species and varieties of blackberry, as well as the influence of environmental conditions in the accumulation of the metabolites of interest. Also, the degradation of ellagitannins suffered from the process of obtaining juice was also documented, especially the phenomena related to the increase in temperature; causing researchers to generate concentration strategies for the metabolites of interest without the use of heat. However, although there is a degradation of the blackberry compounds, the *in vitro* biological activity is maintained, and it is possible to observe the antioxidant and anti-inflammatory effects, as well as the generation of cell apoptosis in cancerous cell lines. Additionally, on *in vivo* testing performed, blackberry juice has evidenced its potential for the treatment of cardiovascular diseases. The studies performed to date show the high potential of the fruit as an antioxidant agent, but at the same time, it also showed how little research was done on this species using biotechnological techniques.

As part of this research, a blackberry cell culture in Erlenmeyer flasks was established, and the production of ellagic acid and vanillin was quantified. To perform this, extraction and quantification methodologies were standardized for the compounds of interest. The technique of total polyphenols by Folin-Ciocalteu was used, and the antioxidant capacity was quantified through the DPPH free radicals and the use of UHPLC. It was determined that performing three extractions to the lyophilized blackberry cells, with 100% methanol as

a solvent, was the method where higher concentrations of the studied metabolites were observed. For the cell cultures on Erlenmeyer flasks, the cotton plug was chosen since it resulted as more adequate for cell growth. Also, six different culture media were evaluated, establishing that the culture media Gamborg, supplemented with 6-benzyladenine, indole-3-butyric acid and organic nitrogen sources, such as L-glutamine and hydrolyzed casein, promoted the production of ellagic acid and vanillin.

Finally, the conditions for the blackberry cell cultures grown in a stirred tank bioreactor were established. It was observed that the hydrodynamic stress is a considerable factor that affects blackberry cells, since when using the Rushton turbine, which leads to higher hydrodynamic stress, a decrease in the obtained biomass was observed due to the lethal damages it generates to the cells. However, other sublethal damages are produced, which activate defense metabolites in the cell, mainly related to oxidative stress, which could have contributed to the higher synthesis of gallic acid, vanillin and ellagic acid when using this impeller when compared to the marine impeller. Additionally, it was possible to verify that the studied polyphenols are also degraded by thermal concentration processes such as rotary evaporator.

It was demonstrated that it is feasible to produce bioactive compounds with antioxidant capacity from blackberry (*Rubus adenotrichos* Schlttdl.) cell cultures, accepting the proposed hypothesis of this doctoral project.

Keywords

Blackberry, *Rubus adenotrichos*, cell cultures, bioreactor, antioxidants compounds.

1. Introducción

La Tierra es el único planeta conocido en nuestro sistema solar que tiene la suficiente cantidad de oxígeno (O_2) para mantener la vida. A medida que el contenido de O_2 en la atmósfera aumentó, expuso a los organismos vivos a toxicidad por él. En condiciones normales, el O_2 es inerte y es el principal aceptor biológico de electrones, siendo vital para el funcionamiento celular. Sin embargo, durante la actividad metabólica normal y por consecuencia de factores ambientales como la temperatura, la radiación, toxinas, entre otros, el O_2 es capaz de aumentar su estado de excitación reactiva produciendo radicales libres y sus derivados (Mandelker, 2011).

Un radical libre es definido como cualquier especie que contenga uno o más electrones desapareados (Barros et al., 2016; Islam y Shekhar, 2015). Mientras que las especies reactivas es un término general de radicales y ciertos derivados no radicales de oxígeno, nitrógeno o sulfuro que pueden fácilmente generar radicales y/o causar estrés oxidativo (Barros et al., 2016).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales se menciona en la Tabla 1, se producen en sistemas biológicos en la mitocondria o en el retículo endoplasmático, así como por enzimas como las NADPH oxidasas o la xantina oxidasa, principalmente por el transporte de electrones que involucra al oxígeno. Las ERO juegan un papel crucial en los procesos fisiológicos celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de las células (Carvajal, 2019).

Sin embargo, una alta concentración de ERO o problemas en la remoción de éstos pueden provocar el estrés oxidativo, un serio desbalance entre la generación de las ERO y la actividad antioxidante (Barros et al., 2016; Morales y Paredes, 2014; Khan et al., 2013), el cual ocurre cuando hay un incremento en la producción de oxidantes y la formación de radicales libres, la cual excede la habilidad del cuerpo de neutralizarlos y eliminarlos (Mandelker, 2011).

El estrés oxidativo puede causar daño a las células y los tejidos, ya que generan modificaciones en macromoléculas como el ADN, lípidos y proteínas. Las ERO inducen disfunciones de los tejidos por el daño directo de las células bajo diferentes mecanismos como lo son la peroxidación de la membrana celular y organelas de lípidos, la oxidación del ADN, la activación de la matriz de metaloproteinasas y calpaínas, la producción de lisis osmótica celular y la apertura del poro de transición permeable de la mitocondria (Schulz y Di Lisa, 2016).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno de importancia biológica

Especies reactivas de oxígeno (ERO)			
Radicales libres	Fórmula química	No radicales libres	Fórmula química
Superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Hidroxilo	$\cdot OH$	Oxígeno singulete	1O_2
Radical alcoxilo	$RO\cdot$	Ácido hipocloroso	HOCl
Radical peroxilo	$ROO\cdot$	Ozono	O_3
		Peróxido orgánico	ROOH
		Ácido hipobromoso	HOBr

Fuente: Carvajal, 2019.

Existe evidencia científica que relaciona la etiología de algunas enfermedades humanas con el estrés oxidativo, aunque puede ser que el estrés oxidativo solo sea un factor en el proceso patológico y no la causa primaria en muchos casos. Todas las células, especialmente en tejidos enfermos o viejos y todo el sistema de órganos está involucrado en el estrés oxidativo, pero cuando este es excesivo puede producir un daño que puede tener un efecto directo en la salud humana. Los órganos que pueden ser afectados son los riñones, el hígado, el páncreas, el corazón, tejidos y células de los nervios e intestinos, así como tejidos de la tiroides, pulmones, médula ósea y suprarrenales (Mandelker, 2011); los cuales han sido implicados en procesos de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, arterosclerosis, cáncer, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Sudhakar y Fukai, 2014; Tusevski et al., 2014; Khan et al., 2013).

En Costa Rica, las enfermedades cardiovasculares son la causa más frecuente de muerte, especialmente la isquemia del corazón y las cerebrovasculares, teniendo una tasa de mortalidad de 3,7 por cada 1000 habitantes, con una incidencia mayor al 11%, representando la tercera causa más importante de años potencialmente perdidos (Castillo et al., 2006). Mientras que, a nivel mundial, las cardiopatías son la principal causa de muerte, provocando 17,5 millones de defunciones al año (Gómez, 2012).

La diabetes es la segunda enfermedad crónica más importante de Costa Rica, ocupando el octavo lugar de América Latina, con una incidencia del 10,5%, siendo uno de los principales factores de riesgo de sufrir infartos y derrames cerebrales, en donde, por día, fallece una persona por esta enfermedad. En el mundo 387 millones de personas sufren esta condición, donde el 70% de los casos podrían prevenirse mediante una dieta balanceada y el ejercicio (Rodríguez, 2014).

El cáncer es otra enfermedad sumamente importante; en promedio, en Costa Rica 12 personas mueren diariamente por esta causa, debido principalmente a una mala alimentación, obesidad, el sedentarismo y el consumo de tabaco y alcohol. En el mundo se diagnostican más de 14 millones de nuevos casos de cáncer al año y 8,2 millones de muertes se relacionan con esta enfermedad (Madrigal, 2017).

Se estima que, en Costa Rica, la población mayor de 65 años en el 2050 alcanzará entre un 18 a un 23% de la población total (Castillo et al., 2006). Mientras que, a nivel mundial, un informe de las Naciones Unidas (2019), estima que será una de cada seis personas. Bajo esta premisa, la búsqueda de soluciones de prevención y tratamiento de enfermedades crónicas, como el cáncer y las cardiovasculares, que son de las más importantes en Costa Rica y el mundo, podrían mejorar la calidad de vida de la población. El efecto tóxico de las ERO y los radicales libres pueden ser contrarrestado por la acción de los antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos (Islam y Shekhar, 2015). Los antioxidantes son definidos como cualquier sustancia que previene o retarda significativamente la oxidación celular ya que reducen los agentes oxidantes, removiendo los radicales libres (Sudhahar y Fukai, 2014). Los antioxidantes pueden ser producidos naturalmente o ser suplementados con la alimentación (Sudhahar y Fukai, 2014; Mehla et al., 2017).

El daño en las ERO es usualmente minimizado por una gran cantidad de enzimas y mecanismos que son protectores naturalmente. La defensa enzimática emplea enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasas, peroxiredoxinas y glutatión peroxidasa (Schulz y Di Lisa, 2016). Sin embargo, los antioxidantes endógenos pueden ser insuficientes para prevenir completamente el daño oxidativo; por esta razón, una dieta rica en antioxidantes es muy importante para evitar enfermedades relacionadas con este problema (Barros et al., 2016).

Existen diversas fuentes naturales de antioxidantes como hierbas, especias, cereales, nueces, semillas aceitosas, leguminosas, vegetales, productos animales y productos microbianos (Charles, 2012; Khan et al., 2013). Las propiedades de los antioxidantes han

sido ampliamente estudiadas. Diferentes compuestos como vitamina E, vitamina C, polifenoles y carotenoides han sido reportados como antioxidantes endógenos del sistema de defensa de la planta que pueden ser fuente de antioxidantes exógenos para el ser humano. Las propiedades de los antioxidantes como polifenoles, especialmente flavonoides y ácidos fenólicos, pueden ser agentes reductores, donadores de hidrógenos, eliminadores de moléculas de oxígeno singulete, eliminadores de ERO y quelantes de metales (Barros et al., 2016; Tusevski et al., 2014).

Las bayas son una fuente potencial de antioxidantes naturales, con un gran espectro de funciones biomédicas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con desordenes cardiovasculares, envejecimiento celular por estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y diversas enfermedades degenerativas. A pesar de que las frambuesas y las moras poseen comparativamente bajos niveles de antocianinas, presentan una mayor capacidad antioxidante que otras bayas debido a la presencia de elagitaninos (Charles, 2012).

Las especies del género *Rubus*, conocidas como moras o zarzamoras, constituyen una fuente importante de compuestos de interés, especialmente metabolitos secundarios con actividad antioxidante, cuya posible aplicación está dirigida a reducir riesgos de enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otros (Mertz et al., 2007). En América Central, Costa Rica es uno de los mayores productores de mora, cultivando principalmente *Rubus adenotrichos*. Las investigaciones realizadas hasta el momento han determinado que la variedad "Vino" de *R. adenotrichos*, presenta un alto contenido de antioxidantes, específicamente elagitaninos, incluso en mayor medida que otras frutas reconocidas por esta característica, y en comparación con otras variedades de la misma especie (Acosta-Montoya et al., 2010; Araya et al., 2017; Soto et al., 2019; Montero et al., 2022). Sin embargo, los trabajos realizados hasta la fecha se han centrado en la determinación de la concentración de los compuestos de interés en la fruta y el jugo, o en pruebas de su potencial beneficio a la salud tanto *in vitro* como *in vivo*, pero no en la producción a gran escala por procesos biotecnológicos.

Actualmente, las plantas son responsables de la producción del 80% de los 30 000 productos naturales conocidos, incluyendo aromas, pigmentos, cosméticos, nutracéuticos, farmacéuticos y químicos finos. Sin embargo, la calidad y cantidad de las sustancias activas dependen de las condiciones ambientales. La productividad comercial de estas moléculas está influenciada por la baja cantidad en que se producen en las plantas, el cual usualmente es menor al 1% del peso seco y, por el alto costo que implica su producción por medio de la síntesis química (Sharma et al. 2014).

Es por esto que, los cultivos celulares *in vitro* vienen a ser una alternativa para la producción de metabolitos secundarios. Los cultivos celulares de plantas proveen una producción y recuperación del producto completamente controlada, sin riesgo de contaminación por el ambiente o con patógenos humanos (Sharma y Shahzad, 2013). Por ende, el cultivo masivo de células vegetales *in vitro* en biorreactor es una alternativa viable para la producción de fitoquímicos y compuestos de interés obtenidos de fuentes naturales como las plantas (Chattopadhyay et al., 2002).

Adicionalmente, las fuentes naturales bióticas y abióticas que provee el planeta Tierra, son cruciales en la economía y el sustento de la vida para la sociedad humana en el mundo, ya que son parte importante de las cadenas de suministro e impulsa el crecimiento económico (Corrado y Sala, 2018). Una economía basada en estos recursos biológicos y naturales es conocido como bioeconomía (Corrado y Sala, 2018). En general, la bioeconomía se basa en el uso sostenible de los recursos biológicos haciendo uso de las tecnologías modernas, principalmente la biotecnología (Viaggi, 2020). La bioeconomía es un área de desarrollo sumamente importante en las economías actuales, especialmente en aquellas que se basan en economías circulares. Una economía circular es aquella que minimiza la disposición final de residuos y subproductos fomentando su reutilización y valorización (Corrado y Sala, 2018).

Ésta investigación se planteó con el fin de producir los compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante que tienen potencial para el tratamiento de diferentes enfermedades humanas, contribuyendo al tercer objetivo del desarrollo sostenible Salud y Bienestar (Naciones Unidas, 2018), a través de un bioproceso, el cual posee una serie de ventajas comparadas a la obtención tradicional de compuestos producidos por las plantas, con el fin de poder generar conocimiento para una futura comercialización a gran escala, contribuyendo a su vez, a un sistema de generación de riqueza basado en la bioeconomía. El proyecto doctoral, planteó el diseño de un proceso que permitiera obtener compuestos con capacidad antioxidante de la mora (*R. adenotrichos* Schltdl.) a partir de cultivos celulares en biorreactor, estableciendo las condiciones que influyen en la producción y obtención de los metabolitos secundarios.

Para esto, se produjo callos a partir de segmentos de hoja de mora y con éstos, se elaboraron suspensiones celulares finas. Se optimizó una metodología de extracción y cuantificación de los compuestos polifenólicos mediante diferentes solventes extractores y tipos de material, cuantificando polifenoles totales y capacidad antioxidante mediante pruebas bioquímicas, así como la cuantificación de ácido gálico, ácido elágico y vanillina

mediante UHPLC. Se determinó la influencia del tipo de tapón del matraz Erlenmeyer, así como de diferentes medios de cultivo en la concentración de los compuestos de interés. Posteriormente, los cultivos celulares se escalaron a un biorreactor de 2 L, en el cual se determinó la influencia del tipo de impulsor y el estrés hidrodinámico en la concentración de los metabolitos. Por último, el extracto obtenido fue concentrado en rotavapor, determinando el efecto del calor en la recuperación de los compuestos de interés.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Diseñar un proceso a partir de cultivos celulares de mora (*Rubus adenotrichos* Schtdl.) en biorreactor para la obtención de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante.

2.2. Objetivos específicos

1. Establecer la producción de los compuestos funcionales con actividad antioxidante en cultivos celulares de mora en matraz.
2. Desarrollar un protocolo de crecimiento de los cultivos celulares de mora en biorreactor para la obtención y concentración de los compuestos funcionales con capacidad antioxidante.

3. Síntesis

La tesis está dividida en tres capítulos, cada uno comprende un artículo científico publicado en revistas indexadas o en proceso de publicación. Posteriormente, se presenta una discusión de los principales resultados presentados en los artículos científicos, para finalizar con las conclusiones y recomendaciones generales.

El primer capítulo es una revisión de literatura, en donde se detallan los trabajos documentados con *R. adenotrichos*, haciendo un análisis sistemático de los valores de polifenoles totales, capacidad antioxidante y cuantificación de compuestos bioactivos como antocianinas y elagitaninos. Este capítulo, evidencia el potencial que tiene esta especie de mora, como posible alimento funcional, así como la pertinencia de generar conocimiento y desarrollo a través del uso de herramientas biotecnológicas para producir y optimizar la producción de estos compuestos de interés. Además, es el marco teórico que engloba los antecedentes del trabajo de investigación doctoral. El artículo científico fue aceptado en la revista Tecnología en Marcha, una revista indexada en *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *Directory of Open Access Journals* (DOAJ) y *Web of Science Core Collection*. El artículo científico se publicará en diciembre del 2023, en el Volumen 37, Número 1. La escogencia de la revista se da por la distribución geográfica de *Rubus adenotrichos*, la cual se encuentra principalmente en México y Centro América (Segura et al., 2012), siendo la especie mayormente sembrada en Costa Rica (Flores-Mora y Argüello-Delgado, 2005). Esta revista se seleccionó ya que al ser el artículo una revisión de literatura de los artículos referentes a esta especie, donde la mayoría de las investigaciones se desarrollaron en Costa Rica, una revista latinoamericana podría ser de mayor impacto para el público meta.

El segundo capítulo detalla el establecimiento de las condiciones de crecimiento celular y producción de los metabolitos secundarios de interés en la mora a nivel de matraces Erlenmeyer. En el artículo se detallan las condiciones de producción de callo y suspensiones celulares, así como la optimización de las condiciones de extracción para los compuestos polifenólicos estudiados. Por último, hace referencia al efecto de diferentes tipos de tapón del matraz Erlenmeyer y de medios de cultivo sobre la biomasa y la producción de los metabolitos secundarios de interés obtenidos de los cultivos celulares de mora. Este capítulo engloba el cumplimiento del objetivo 1 de la tesis doctoral. El artículo científico fue publicado en el idioma inglés en la revista *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), indexada en Scopus y *Web of Science* (Schmidt-Durán et al. 2022), revista que

se ubica en el cuartil 2 y es una de las más importantes en cultivo de tejidos de plantas y biotecnología de plantas que existen a nivel mundial.

El tercer capítulo hace referencia al establecimiento de las condiciones para el crecimiento de los cultivos de la mora en biorreactores de 2 L y la producción de los compuestos de interés, además detalla una estrategia sencilla de concentración de los compuestos a través de técnicas térmicas. El artículo científico analiza el efecto que el estrés hidrodinámico produce en los cultivos celulares, describiendo como una condición de estrés hidrodinámico puede servir como una alternativa para favorecer la producción de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes. Asimismo, el artículo menciona el efecto que el calor produce en la concentración de los polifenoles estudiados, con el fin de generar estrategias de concentración de los compuestos obtenidos en biorreactor, que impacten lo menos posible en la concentración de los metabolitos de interés. Este artículo científico resume los resultados obtenidos para cumplir con el objetivo 2 propuesto, el cual va a ser sometido a una revista científica indexada.

Los tres artículos demuestran que *Rubus adenotrichos* Schltdl. presenta una alta concentración de compuestos antioxidantes, especialmente elagitaninos, los cuales pueden ser producidos a partir de cultivos celulares de mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) como una alternativa viable para una futura producción industrial y estandarizada de los metabolitos de interés de la mora.

4. Artículo 1

La mora tropical de altura (*Rubus adenotrichos* Schltl.) como potencial alimento funcional: una mirada a las investigaciones realizadas.

The tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltl.) as a potential functional food: a look at the research carried out.

Alexander Schmidt-Durán^{1,2}

¹ Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica.

² Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

Autor de correspondencia: aschmidt@itcr.ac.cr

ORCID: 0000-0002-1061-6840.

Mario Rodríguez-Monroy³

³ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Morelos, México.

Correo: mrmonroy@ipn.mx

ORCID: 0000-0001-6201-7594.

Oscar Acosta-Montoya⁴

⁴ Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Correo: oscar.acosta@ucr.ac.cr

ORCID: 0000-0001-8156-6556.

Resumen

La mora (*Rubus adenotrichos* Schltl.) ha sido catalogada como una de las frutas con alto potencial como alimento funcional, especialmente por su concentración de elagitaninos y antocianinas. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue hacer una recopilación de todos los artículos científicos realizados con esta especie, desde los trabajos agronómicos y de cultivos de tejidos, los análisis de los compuestos en la fruta y en el procesamiento del jugo,

el potencial benéfico para la salud de esta fruta en pruebas realizadas tanto *in vitro* como *in vivo* así como la posibilidad que las herramientas biotecnológicas permiten para escalar la producción de estos compuestos, compilando en las mismas unidades de medición, la concentración de los principales compuestos bioactivos de la mora.

Palabras claves

Rubus adenotrichos, mora, polifenoles, antioxidantes, capacidad de absorbanca de radicales de oxígeno.

Abstract

Blackberry (*Rubus adenotrichos* Schlttdl.) has been classified as a fruit with high potential as a functional food, due to its high concentration of ellagitannins and anthocyanins. Therefore, the aim of this study is to compile the research articles performed with these species, from agronomical to tissue culture studies, to analysis of fruit compounds and fruit juice processing; and the potential health benefits from this fruit in studies performed *in vitro* and *in vivo*, as well as the possibility of using biotechnological tools for bioprocessing and upscaling of the production of compounds of interest, compiling, in the same units of measure, the concentration of the main bioactive blackberry compounds.

Key Words

Rubus adenotrichos, blackberry, polyphenols, antioxidants, oxygen radical absorbance capacity.

1. Introducción

Las moras pertenecen al género *Rubus*, se caracterizan por tener un crecimiento arbustivo de tipo erecto, semierecto o rastrero [1] [2]. La planta se reproduce principalmente de forma asexual por medio de acodos y presenta en su ciclo de cultivo en tres etapas: vegetativa, reproductiva y de producción [1]. Los tallos de la planta de mora generalmente poseen espinas y tienen un sistema radical fibroso, los cuales crecen en forma de macolla [2]. Las hojas tienen bordes dentados y presentan de tres a cinco folíolos [1] [2]. Presenta frutas agregadas que pueden ser de color rojas o moradas oscuras, formadas por drupas carnosas de forma redonda o elipsoidal, las cuales contienen a las semillas [1] [3]. Las flores son hermafroditas y actinomorfas, contienen varios estambres y pistilos, crecen en inflorescencias terminales o axiales, de color blanco, rosado o morado. Las flores tienen

cinco pétalos y cinco sépalos y su polinización se realiza por insectos, especialmente abejas (*Apis mellifera* L.) [1] [2].

Las frutas de la mora se consumen de manera fresca o procesada, a través de la producción de productos congelados, enlatados, pulpas, jugos y frutas liofilizadas [3]. La producción de mora a nivel mundial se ha expandido drásticamente, siendo Estados Unidos el mayor productor mundial, mientras que, en Europa, Serbia es el principal país que lo cultiva. En latinoamericana se cultiva principalmente en México y América Central, donde sobresalen Costa Rica y Guatemala, y en menor medida se encuentran Ecuador y Chile. En Asia, China es su principal productor, mientras que Nueva Zelanda destaca en Oceanía y en África solo se tiene reportes de producción por parte de Sudáfrica [3] [4] [5].

Las investigaciones en *Rubus* han aumentado significativamente en los últimos años, ya que además de su valor nutricional, presenta una alta capacidad antioxidante debido a su contenido de polifenoles, los cuales presentan un potencial beneficio a la salud, como se detalla en la revisión de Lee et al. [6]. *Rubus adenotrichos* es una especie de mora que crece en un clima tropical de altura y ha sido estudiada desde hace más de 30 años, aunque más intensamente en los últimos 15 años por sus compuestos de interés, especialmente elagitaninos y antocianinas. Es por esta razón, que el objetivo de este trabajo fue compilar, hasta nuestro saber, los trabajos realizados en *R. adenotrichos* (mencionada en algunos artículos como *R. adenotrichus*), detallando la concentración de polifenoles totales, elagitaninos, antocianinas y capacidad antioxidante obtenidos en las investigaciones. Para esta revisión, debido a su objeto de estudio, se descartaron las publicaciones realizadas por González y Perez [7], Rodríguez-Díaz et al. [8] y Segura et al. [9] con esta especie.

2. Investigaciones en *Rubus adenotrichos*

2.1 Primeras investigaciones

Desde mediados de los años 90, se han realizado investigaciones en Costa Rica relacionadas con el cultivo de la mora (*Rubus* spp.), especialmente con *Rubus adenotrichos* variedad Vino espina roja, según su denominación local, debido a su interés comercial y potencial uso medicinal y alimenticio que posee [1] [2]. Inicialmente los trabajos se centraron en la caracterización fenotípica, diseños de siembra, distancias de siembra, fertilización, podas, problemas fitosanitarios [1] [2], conservación de germoplasma, micropropagación, elaboración de productos agroindustriales [10], enraizamiento [10] [11] [12] y aclimatación de plantas [10] [11].

En las investigaciones agronómicas, Orozco et al. [13] evaluaron el efecto del sistema de propagación en el rendimiento de la cosecha de la mora en las variedades Vino espina roja y Vino sin espinas. Para esto, utilizaron un sistema de propagación vegetativa, a través de una reproducción asexual por acodos aéreos y un sistema de micropropagación, a través de plántulas obtenidas *in vitro* y aclimatadas en invernadero antes de ser sembradas en campo. Los investigadores evidenciaron que los rendimientos de la variedad Vino espina roja son de tres a cuatro veces superiores a los obtenidos por la variedad Vino sin espinas. Además, en el primer año de evaluación, las plantas propagadas por acodos obtuvieron cosecha, mientras que las micropropagadas no. Sin embargo, a partir del segundo año de evaluación, los rendimientos de ambos tipos de reproducción fueron similares para ambas variedades. Las plantas *in vitro* generalmente requieren de un mayor tiempo para adaptarse en campo, sin embargo, tomando en cuenta que son plantas élite libre de enfermedades, es una alternativa viable de implementar para el agricultor.

También, Orozco y Muñoz [14] determinaron el efecto del compost y lombricompost sobre el suelo y los rendimientos de la mora, logrando determinar que los abonos orgánicos mejoraron especialmente el contenido de micronutrientes y el pH del suelo en las fincas evaluadas, lo cual condujo a obtener un mayor rendimiento de cosecha. Además, se logró determinar que los abonos utilizados, no afectaron las cadenas tróficas, ni los microorganismos presentes en el suelo [15]. Los abonos orgánicos, además de su aporte de nutrientes y de mejorar la estructura del suelo, aportan microorganismos benéficos a la rizosfera, siendo esperable un aumento en las poblaciones microbianas. Sin embargo, este efecto no fue posible visualizarlo en esa investigación.

Por otro lado, Flores et al. [11] reportaron para la multiplicación de la planta de mora, un método de enraizamiento en sistemas de inmersión temporal y de aclimatación de las plántulas en invernadero. La implementación de dicha metodología logró reducir en un 50% el tiempo de la etapa de enraizamiento comparado a estudios previos y permitió alcanzar más de un 75% de supervivencia de las plantas durante su aclimatación en invernadero. Flores et al. [12] trabajando con la misma línea celular de mora, probó el efecto de nanotubos de carbono como promotores del crecimiento de la planta y su efecto en el enraizamiento. Sus resultados demostraron que los nanotubos de carbono de pared simple funcionalizados con un grupo carboxilo, aumentan el tamaño de las plantas, promueven una mayor cantidad de raíces en un menor tiempo y presentan una mayor diferenciación celular en los tejidos de crecimiento, evidenciando que los nanotubos de carbono pueden ser usados como promotores del crecimiento vegetal para la mora.

El uso de nanotubos de carbono en las investigaciones, especialmente con cultivos de consumo humano, genera controversia, ya que hay reportes de los efectos adversos para la salud [16]. La investigación realizada por [12] se limita a su uso bajo condiciones de laboratorio, por lo que se requiere de futuras investigaciones que permitan clarificar si éstos pueden ser encontrados en la fruta, si son retenidos por la planta en algún tejido u órgano, o son desechados bajo algún mecanismo, con el fin de ver si el uso de los nanotubos de carbono puede ser una estrategia viable para usarse en la micropropagación de las plantas de mora.

A pesar de que las primeras investigaciones tuvieron un énfasis más agronómico y de producción *in vitro*. Los trabajos de Mertz et al. [17] y Acosta-Montoya et al. [18] en donde se reportaron el contenido de polifenoles totales, elagitaninos y antocianinas presentes en la fruta, provocó un cambio en la perspectiva de los trabajos realizados para esta planta.

2.2 Compuestos polifenólicos de la fruta

Como se mencionó, en general, la mora ha sido catalogada como una fruta rica en polifenoles con capacidad antioxidante, los cuales tienen posibles efectos benéficos para la salud humana [6]. Por esta razón, el trabajo de Mertz et al. [17] fue el primero que reportaron el contenido de metabolitos secundarios para la mora tropical de altura. Los autores realizaron un estudio en frutas maduras de dos especies de mora (*Rubus glaucus* y *Rubus adenotrichos*), cuantificando la concentración de diferentes compuestos de interés: taninos hidrolizables, antocianinas, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides (Tabla 1). Los autores realizaron la extracción de 2 g de la fruta liofilizada con 60 ml de una solución de acetona (70% v/v) como solvente extractor con 2% de ácido fórmico. El análisis fue realizado mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos (HPLC-DAD) y espectrofotometría de masas con trampa de iones por electropulverización (ES/MS IT), en donde se determinó que *R. adenotrichos* presenta valores de flavonoides, la antocianina cianidina-3-glucósido y el elagitanino Lambertianin C en mayor proporción que *R. glaucus*. La metodología descrita por [17] fue la base para la extracción y cuantificación de antocianinas y elagitaninos realizadas en otras investigaciones [18] [19] [20] [21] [22] [23]. Sin embargo, no hubo un estudio sistemático para la estandarización de las condiciones de extracción y solventes a utilizar, que permita determinar estadísticamente las condiciones de extracción, más adecuadas para la obtención de los biocompuestos. Múltiples factores intervienen en la recuperación de los compuestos bioactivos, tales como el solvente a utilizar, la fuente del material a extraer y la metodología de extracción [24] [25] [26]. Por

ejemplo, el agua, el etanol y sus mezclas, son los solventes extractores más utilizados por su baja toxicidad; mientras que el metanol es donde se ha obtenido la mayor recuperación de taninos [27]. Por lo que resulta particular que, el método de extracción utilizado por muchos de los artículos en esta especie, no haya contemplado una optimización de estas condiciones y se limitaran a utilizar la misma metodología de [17].

Mertz et al. [19], determinaron el contenido de polifenoles totales, carotenoides y capacidad antioxidante de dos variedades de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y mora (*R. adenotrichos* y *R. glaucus*) mediante pruebas espectrofotométricas (Folin-Ciocalteu y ORAC) y HPLC-DAD-MS. Se logró determinar que el contenido de polifenoles totales, así como la concentración de elagitaninos y antocianinas fue mayor en la mora, que en las dos variedades de tomate de árbol evaluadas. Los autores probaron diferentes solventes para evaluar la capacidad antioxidante, determinando la acetona presentaba los valores más altos (Tabla 1). Sin embargo, los autores no evaluaron otros solventes más polares como el etanol o el metanol.

Debido al potencial que se observaba en la mora, Acosta-Montoya et al. [18] investigaron el efecto del estado de madurez en el contenido polifenólico y en su capacidad antioxidante. Los autores concluyeron que, al aumentar el estado de madurez (grado 3), aumenta la cantidad de azúcares, sólidos solubles y antocianinas en la fruta, pero disminuye la concentración de elagitaninos, flavonoides y derivados del ácido elálgico. Sin embargo, en su estado más inmaduro (grado 1), la mora contiene una alta concentración de elagitaninos, como se observa en la Tabla 1. Los investigadores concluyeron que *R. adenotrichos* presenta una de las mayores cantidades de elagitaninos reportados para cualquier fruta comestible, por lo que podía tener un alto potencial comercial como alimento funcional. Sin embargo, las concentraciones más altas se encontraron en valores de fruta inmadura, la cual usualmente no es consumible.

Martínez-Cruz et al. [28] determinaron en *R. adenotrichos* silvestre procedentes de Veracruz, México, el contenido de compuestos potencialmente bioactivos y reportaron que la mora silvestre contiene 1,7 veces más cianidina-3-glucósido y una menor concentración de polifenoles totales que lo obtenido en moras cultivadas de Costa Rica y reportado por [17]. Los autores sugieren que las moras silvestres también deben ser consideradas como alimento funcional. Es importante señalar que [28] utilizaron una metodología de extracción y de cuantificación mediante HPLC distinta a la establecida por [17], lo que limita la comparación directa de los resultados con los reportados en otras investigaciones previas.

Después de los análisis directos a la fruta de mora, las investigaciones se centraron en determinar la concentración de los compuestos polifenólicos en diferentes variedades de *R. adenotrichos*, para determinar cuál poseía un mayor potencial económico. Los trabajos previos realizados habían utilizado la variedad Vino espina roja, una de las variedades comerciales utilizadas en Costa Rica. Primeramente, Araya et al. [24] evaluó las variedades Dulce, Vino espina roja y Vino sin espinas, bajo tres diferentes estados de madurez, las cuales para esta revisión se catalogaron en grado 1, 2 y 3, para la comparación con los resultados obtenidos por [18]. Los autores evaluaron diferentes solventes de extracción, así como la cantidad de extracciones necesaria para obtener la mayor cantidad de polifenoles en las muestras. La investigación determinó que realizando cuatro extracciones con etanol al 95%, fue el método de extracción adecuado para obtener la mayor cantidad de polifenoles totales y concluyen que, sin importar la variedad evaluada, las frutas inmaduras presentaban valores más altos de polifenoles totales, capacidad antioxidante y proantocianidinas; mientras que, al aumentar el grado de madurez, aumenta la concentración de antocianinas, resultados similares a lo reportado por [18]. Además, se evidencia que, aunque existen diferencias notables entre las variedades de mora, la variedad Vino espina roja fue la que obtuvo las mayores concentraciones de los compuestos de interés.

Siguiendo esta misma línea, Soto et al. [22] evaluaron el efecto del genotipo en la concentración de los compuestos polifenólicos en moras cultivadas en Costa Rica. Para esto, fueron comparadas cinco variedades de *R. adenotrichos* (Vino espina roja, Vino espina blanca, Vino sin espinas, Dulce y Enana), dos variedades de *R. urticifolius*, así como una variedad de *R. miser* y *R. glaucus*. Las variedades Vino sin espinas y Enana, fueron las que tuvieron el mayor contenido de elagitaninos y antocianinas, respectivamente; resultados que difirieron con los reportados por [24], lo anterior puede deberse a que la metodología de extracción y análisis de compuestos utilizada en los estudios fue distinta. Además, los autores determinaron el efecto de las condiciones medioambientales en el contenido polifenólico de la fruta para la variedad Vino espina roja (Tabla 1), siendo la localidad de Dota, cultivada bajo un régimen orgánico la que obtuvo las mayores concentraciones de los compuestos de interés, obteniendo más antocianinas en la época lluviosa y más elagitaninos en la época seca.

A partir de los reportes de [18] y [24], se puede concluir, que las frutas de mora menos maduras tienen un alto contenido de elagitaninos, pero que conforme la fruta va madurando, estos compuestos disminuyen y el contenido de antocianinas va en aumento. Las

investigaciones mencionadas hasta este momento evidencian que el genotipo, el ambiente y la metodología de extracción y cuantificación empleada provocan variaciones en la concentración de los compuestos de interés.

Por último, Montero et al. [23] estudiaron la composición nutricional, contenido de compuestos potencialmente bioactivos y capacidad antioxidante de once cultivos comestibles ampliando lo realizado por [19], donde la mora presentó valores intermedios en los análisis físico-químicos realizados en comparación a las otras frutas evaluadas, exceptuando en el pH (siendo la más ácida) y en el contenido de fibra dietética en base húmeda (obteniendo el valor más alto). Sin embargo, siendo congruente con los resultados obtenidos por otros investigadores, la mora presentó 1,5 veces más concentración de polifenoles y 2,5 veces mayor capacidad antioxidante (Tabla 1) que la segunda fruta en importancia evaluada, determinando que a pesar de que la mora no destaca por su contenido nutricional, sí posee una de las mayores capacidades antioxidantes y contenido polifenólico entre frutas de consumo en Costa Rica.

2.3 Compuestos polifenólicos del jugo de mora en su procesamiento

Tomando en cuenta que la mora frecuentemente se consume como bebida, existen varios reportes documentando el efecto que ocasionan diferentes técnicas de procesamiento industrial del jugo de la mora, sobre la concentración de los compuestos polifenólicos. Cisse et al. [29] determinaron el efecto de la temperatura en el contenido de antocianinas en los jugos de mora, naranja y jamaica, estableciendo que las antocianinas sufren una degradación térmica. Los autores propusieron ecuaciones de primer orden, para modelar la degradación de las antocianinas por la temperatura, la cual puede ser utilizada como herramienta para determinar la pérdida de este compuesto en procesos térmicos.

Luego, Gancel et al. [20] evaluaron el efecto que tiene el procesamiento y almacenamiento de la fruta sobre el contenido de sus compuestos y su capacidad antioxidante. Para esto, elaboraron un diagrama del procesamiento de la fruta obteniendo extractos para cada etapa del proceso, las cuales fueron: frutas cortadas, pulpa, residuos, jugo y bebida. Además, determinaron el efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento en la concentración de los compuestos de interés. La fruta inicial utilizada mostró resultados similares a los obtenidos previamente por otros autores. Sin embargo, el procesamiento de las muestras para la elaboración del jugo redujo significativamente la concentración de elagitaninos y antocianinas. En general, se observó que la bebida de mora procesada obtuvo únicamente un 54% de todos los compuestos polifenólicos iniciales de la mora y su capacidad

antioxidante disminuyó a la mitad. El escaldado que se realiza antes de cortar las frutas, fue el paso donde hubo una mayor disminución de antocianinas y el llenado en caliente para la elaboración de la bebida final, fue donde hubo una mayor disminución de elagitaninos. Además, durante el almacenamiento se presentó una pérdida adicional de los compuestos polifenólicos, la cual se ve incrementada al aumentar la temperatura.

Los resultados obtenidos por [20] y [29] evidencian que el aumento de temperatura es un factor crítico que afecta la estabilidad de los polifenoles, ya que procesos térmicos provocan una disminución en la concentración de estos compuestos. Por lo que, es necesario buscar formas alternativas de procesamiento del jugo que eviten el uso de estos métodos. Es por ello por lo que, Acosta et al. [30] propusieron la ultrafiltración para la separación y purificación de elagitaninos en mora como método alternativo. Frutas de mora cortadas fueron prensadas con una prensa hidráulica y posteriormente pretratadas enzimáticamente; el jugo obtenido fue clarificado mediante una microfiltración y concentrado bajo evaporación osmótica, probando diferentes membranas y presiones de filtración y controlando la temperatura en cada proceso. Se encontró una combinación de presión transmembrana (2MPa) y membrana (GK de GE Osmonics) capaz de retener el 100% de la concentración de elagitaninos con el mayor flujo de antocianinas, siendo una opción viable para separar y purificar estos compuestos del jugo de mora.

Soto et al. [21] determinaron el efecto de pretratamientos enzimáticos y mecánicos sobre la concentración de los polifenoles en el jugo. Además, se seleccionaron los pretratamientos continuo y discontinuo, ambos con adición de enzima, para posteriormente pasar por un proceso de clarificación para determinar el efecto combinado de ambas técnicas en la concentración de los compuestos potencialmente bioactivos. De los cinco pretratamientos evaluados, la prensa continua con preparación enzimática, fue la que obtuvo la mejor recuperación de elagitaninos y antocianinas. Sin embargo, este método de extracción, cuando el jugo se clarificó, produjo una disminución en la concentración de las antocianinas y elagitaninos; contrario al método discontinuo con preparación enzimática, el cual la clarificación, no redujo la concentración de estos compuestos.

Acosta et al. [31] determinó el contenido de polifenoles totales del jugo de la mora bajo nanofiltración, luego de obtener el jugo mediante el método de extracción y clarificación reportado por [21]. La nanofiltración es una técnica que permite concentrar antocianinas y elagitaninos de una manera más eficiente y a menor costo, sin reducir los compuestos potencialmente bioactivos por efectos del calor. Los autores determinaron que utilizando una membrana NF270 a una presión transmembrana de 3MPa, se obtiene el mayor flujo

de permeado y se retiene más del 90% de total de sólidos solubles y el 100% de las antocianinas y elagitaninos [31]. Lo anterior, muestra que la nanofiltración debe ser considerado como un método factible para favorecer la concentración de los compuestos de interés en los jugos de la mora.

González et al. [32] realizaron una aproximación metabólica del jugo de la mora endulzado con estevia o con sacarosa, sin pasteurizar o pasteurizando bajo diferentes temperaturas de almacenamiento. Los autores reportaron que la composición de iones del jugo de mora varía entre los tratamientos evaluados, concluyendo que el procesamiento del jugo cambia la composición metabólica del mismo. Sin embargo, los autores no identificaron a que compuestos metabólicos correspondían los cambios de los iones, que permitieran aportar un mejor conocimiento de los cambios del jugo durante su procesamiento.

Por último, Quirós et al. [33] evaluaron el efecto de la extracción etanólica, la concentración térmica al vacío, la ultrafiltración y el secado por aspersión en los subproductos de la mora, el cual corresponde principalmente a semillas. Se determinó que el etanol al 57,1 % v/v con agua es el solvente extractor óptimo para obtener los compuestos de interés. Además, la ultrafiltración permitió aumentar la concentración de los compuestos mayoritarios de los subproductos con una mayor pureza que la obtenida por la concentración térmica, mientras que el secado por aspersión disminuyó en aproximadamente un 80-90% la concentración de antocianinas y elagitaninos, siendo un proceso inviable para la formulación. Esto confirmó que, los procesos de concentración sin uso de calor, son mejores para la preservación de los elagitaninos.

Los trabajos mencionados en esta sección, exceptuando el de [32], muestran el impacto que tienen diferentes técnicas de procesamiento en la concentración de los elagitaninos y antocianinas en el jugo de mora (Tabla 1). La metodología para la obtención de jugo de mora con alto contenido de elagitaninos fue patentada [34] y representa un aporte de la factibilidad técnica para la explotación comercial de esta bebida.

2.4 Efectos *in vitro* del jugo de la mora

Al comprobar que tanto la fruta de la mora, como el jugo procesado poseía los compuestos potencialmente bioactivos, se empezaron a realizar pruebas *in vitro* con el fin de determinar si estos compuestos presentaban posibles efectos benéficos para la salud. Cuevas-Rodríguez et al. [35] determinaron la concentración de polifenoles totales, capacidad antioxidante y la inhibición de la respuesta proinflamatoria en líneas celulares de macrófagos utilizando diferentes extractos obtenidos de especies de mora silvestre. En

todos los extractos evaluados, menos el rico en proantocianidinas, las muestras de *R. adenotrichos* fueron las que obtuvieron los valores más altos de polifenoles totales y capacidad antioxidante. Además, en términos generales, de los extractos probados, esta especie fue la que presentó los mayores porcentajes de inhibición entre las enzimas proinflamatorias evaluadas o en los compuestos que estas enzimas producen, como lo son el óxido nítrico y la prostaglandina, denotando que una dieta rica en moras podría reducir el estrés oxidativo.

Posteriormente, Azofeifa et al. [36] compararon la capacidad antioxidante y el efecto protector a la peroxidación lipídica de un jugo de mora fresco y uno microfiltrado. El jugo de mora microfiltrado presentó menor contenido de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante mediante ORAC, no así mediante DPPH. Sin embargo, al evaluar la capacidad para proteger la peroxidación lipídica, no hubo diferencias con ambos jugos, tanto con el modelo de hígado, como el de liposomas, demostrando que, el procesamiento del jugo afecta la capacidad antioxidante pero no la capacidad protectora de la peroxidación lipídica.

Todas las células, incluidos los eritrocitos, presentan una defensa propia contra los oxidantes extracelulares conocido como sistema Cell-MAP, es por esta razón que González et al. [37] evaluaron la actividad antioxidante celular de eritrocitos (ERYCA) y el aporte que la protección antioxidante mediada por células (Cell-MAP) y la eliminación directa de radicales libres (ORAC) brindan a los eritrocitos de diferentes frutas. La prueba ERYCA reflejó que el Cell-MAP aporta de 3 a 4 veces más protección antioxidante a los glóbulos rojos que la eliminación directa de radicales libres, determinando el posible aporte del consumo de frutas en la capacidad antioxidante de las células. Además, en términos generales, la capacidad antioxidante global de los eritrocitos fue más alta en las bayas tropicales de Costa Rica (arándano y mora) que en las demás frutas evaluadas.

Luego, Azofeifa et al. [38] determinaron la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de la mora mediante ORAC, la concentración inhibidora media máxima (IC₅₀) del jugo que se requiere para neutralizar al radical libre DPPH, la actividad de eliminación de óxido nítrico (NO) mediante IC₅₀, la inhibición de la producción del anión superóxido y de la interleucina-6 (IL-6), la inhibición de la peroxidación lipídica en liposomas e hígado y un ensayo antiinflamatorio a una línea celular de macrófagos murinos. Se determinó que el jugo de mora presenta un IC₅₀ de NO 12 veces menor y un IC₅₀ de DPPH similar al del ácido elágico, con una capacidad antioxidante ocho veces mayor comparado con el mismo estándar. Además, al aumentar la dosis del extracto, se incrementó la capacidad de inhibición de la

peroxidación lipídica, tanto en liposomas como en homogenizados de hígado. Asimismo, el extracto tuvo la capacidad de inhibir la producción del anión superóxido, del óxido nítrico y del IL-6. Estos resultados evidenciaron que los extractos de mora disminuyen el estrés oxidativo de las células, protegiendo contra diferentes radicales libres y tienen potencial para disminuir procesos inflamatorios.

Calvo-Castro et al. [39] utilizaron líneas celulares epidérmicas humanas de queratinocitos y fibroblastos para evaluar el efecto del jugo de mora como protector contra los rayos ultravioleta B (UVB), el principal agente responsable del cáncer de piel. A las líneas celulares se les agregó una dilución de jugo de mora ultrafiltrado 2 h antes y 24 h después de ser irradiadas con rayos UVB. Los resultados mostraron que existe un efecto fotoquimioprotector a las líneas celulares. Además, se determinó que existe un aumento en la apoptosis de las células irradiadas, el cual es uno de los primeros mecanismos de defensa de las células de la piel para contrarrestar los efectos de agentes cancerígenos.

La pasteurización es un método térmico muy utilizado para reducir la concentración de patógenos en líquidos el cual podría tener un efecto negativo en la concentración de los compuestos de interés como se evidenció en los estudios relacionados al procesamiento del jugo. Debido a esto, Azofeifa et al. [40] determinaron si este proceso podría afectar la inhibición de la peroxidación lipídica, el ERYCA y la capacidad antioxidante del jugo de mora. Los autores probaron el control con un jugo pasteurizado a 75 °C y otro a 92° C. Los resultados que obtuvieron determinaron que la pasteurización no afectó el contenido de polifenoles totales ni elagitaninos, ni los valores de capacidad antioxidante, ERYCA e inhibición de la peroxidación lipídica en liposomas e hígado. Sin embargo, sí tuvo efectos negativos en la concentración de antocianinas, similar a lo obtenido por [29], en el IC₅₀ del DPPH y en el IC₅₀ del NO. No obstante, en términos generales, se puede concluir que la pasteurización mantuvo las propiedades biológicas de los compuestos bioactivos de la mora.

Azofeifa et al. [41] realizaron pruebas para determinar la actividad antioxidante de un jugo microfiltrado de mora en un proceso de digestión *in vitro*. Los resultados obtenidos demostraron que la digestión inicial con pepsina aumentó los valores de antocianinas y elagitaninos, sin embargo, el proceso de diálisis demostró una reducción significativa en la concentración, disminuyendo en más de un 50% en la muestra que se desecha al colon y en la muestra que representa la solución absorbida por el cuerpo. Sin embargo, los valores obtenidos de IC₅₀ de DPPH y NO, así como la capacidad antioxidante mostraron resultados similares entre sí en la inhibición de la peroxidación lipídica en liposomas e hígado y en el

ERYCA. Los resultados obtenidos demuestran que, a pesar de que hay una disminución en los compuestos bioactivos de la mora luego de ser tratadas por las enzimas gastrointestinales, éstos presentar un efecto antioxidante similar en cada etapa.

Por último, Madrigal-Gamboa et al. [42] determinaron el impacto del procesamiento del jugo de la mora (fruta, pulpa, jugo microfiltrado y jugo diafiltrado) en el efecto citotóxico de los polifenoles bajo diferentes líneas celulares de cáncer. En términos generales, el contenido de polifenoles totales, elagitaninos y antocianinas disminuyeron en cada paso del proceso. Asimismo, la fruta sin procesar fue la que obtuvo los mayores efectos citotóxicos contra las diferentes líneas celulares exceptuando la de piel. Además, las líneas celulares de colon, estómago e hígado presentaron un aumento significativo en la apoptosis celular comparadas al control, sugiriendo un potencial uso terapéutico y corroborando los resultados obtenidos por [39].

Los valores obtenidos en polifenoles totales, elagitaninos, antocianinas y capacidad antioxidante por [38], [40] y [41] son muy superiores al resto de las publicaciones mencionadas en la Tabla 1, obteniendo, por ejemplo, valores 30 veces menores en IC₅₀ de DPPH (2,5-6,5 µg/ml) o 15 veces mayores en ORAC (4000-8000 µmol ET/g). Esto es debido a que los autores no cuantifican el peso húmedo o seco del jugo de mora, sino lo hacen de un extracto purificado rico en polifenoles obtenido a través de una cromatografía de afinidad, razón por la cual, estos resultados no pueden ser comparados con la del resto de las investigaciones y fueron excluidos de la Tabla 1. Además, los resultados obtenidos en esta sección evidencian que, a pesar de que el procesamiento del jugo de mora afecta la concentración de los compuestos de interés, en términos generales, no afecta su efecto antioxidante en diferentes pruebas *in vitro*.

2.5 Efectos *in vivo* del jugo de la mora

Las pruebas *in vitro* mostraron que los compuestos polifenólicos presentan un uso potencial como agentes antioxidantes benéficos para la salud, por lo que el siguiente paso a seguir es evaluar su efecto a través de pruebas *in vivo*. La urolitina es un compuesto producido por las bacterias intestinales al degradar alimentos que contengan elagitaninos y ácido elágico, los cuales se les atribuye un efecto benéfico al disminuir el envejecimiento celular y contrarrestar enfermedades como la obesidad, diabetes, problemas cardiovasculares o cáncer, entre muchas otras [43].

Debido a esto, García-Muñoz et al. [44] analizaron muestras de orina de 26 individuos con el fin de encontrar urolitina. La investigación determinó que existen tres grupos de individuos

diferentes de acuerdo con la concentración de urolitinas en la orina. El primero no presentó concentraciones de urolitina A ni B, el segundo grupo presentó altas concentraciones de urolitina A y el último grupo presentó niveles elevados de urolitina B, lo que permite generar evidencia sobre la variabilidad interindividuo en la digestión de frutas con componentes benéficos para la salud. Además, que existe una interacción con la comida y la microbiota de cada individuo, lo que permite una absorción diferencial de los elagitaninos y su conversión a urolitinas.

El estrés oxidativo y el desbalance en las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en la aparición de enfermedades como la diabetes, hiperglicemia y resistencia a la insulina, así como en problemas cardiovasculares y complicaciones renales. El estudio de Azofeifa et al. [45] analizó el efecto que tiene la bebida de mora en ratones Sprague-Dawley que fueron inducidos a diabetes. Los ratones diabéticos tuvieron una pérdida de peso mientras que el grupo control, más bien aumento de peso. Sin embargo, las ratas diabéticas que fueron alimentadas con jugo de mora, especialmente las que contenía un 25% v/v jugo de mora:agua, mostraron una reducción de un 50% en la concentración de glucosa en sangre, así como una reducción en diferentes indicadores: 30% en el colesterol, 20% en la peroxidación lipídica en el hígado y de un 45% en los triacilglicéridos. Los resultados obtenidos por los investigadores demostraron que beber jugo de mora mejora el control de la glucemia y reduce la concentración de lípidos en la sangre, sugiriendo que puede ser utilizado como una alternativa alimenticia para el control de la diabetes.

Madrigal et al. [46] determinaron el poder antioxidante y las características fisicoquímicas de formulaciones dermo-cosméticas a partir de extractos de mora. Los autores realizaron diferentes metodologías de extracción y utilizaron diferentes solventes orgánicos, de acuerdo con la prueba que querían desarrollar, obteniendo tanto las fases acuosas como las fases orgánicas. Los resultados obtenidos determinaron que las formulaciones a base de mora son bacteriostáticas, hidratantes de la piel, nutritivas y evitan el envejecimiento y las arrugas en la piel. El producto formulado, posee propiedades astringentes que le permiten ayudar a cicatrizar pequeñas heridas superficiales de la piel y su pH ácido es beneficioso para mantener el manto ácido cutáneo y favorecer la flora normal de la piel.

Quesada-Morúa et al. [47] evaluaron a trece individuos sin historial médico de enfermedades cardiovasculares, hepáticas, renales o gastrointestinales en dos grupos diferentes. Primeramente, ambos grupos tuvieron una dieta baja en antioxidantes durante tres días, luego, al cuarto día y hasta el día 11, la dieta se cambió a un consumo promedio de 4000 kcal/día, alta en carbohidratos y grasas. El primer grupo en cada comida consumía

250 ml de jugo microfiltrado de mora, mientras que el grupo 2 bebía agua. Al finalizar este período, cada individuo retomaba su vida cotidiana por 16 días, y posteriormente se repetía la metodología, pero intercambiando los grupos. En promedio, el grupo que tomó mora obtuvo valores menores a los expresados inicialmente, en la concentración de colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de glucosa en sangre. Los resultados obtenidos sugieren que la bebida de mora tiene un efecto antioxidante el cual puede tener beneficios cardiovasculares.

Los resultados obtenidos por [44] sugieren que, en una muestra reducida de 26 individuos, la respuesta de un alimento nutraceutico como la mora, depende mucho de la flora intestinal del individuo, por lo que, los resultados obtenidos por [47], aunque son prometedores, deben ampliarse a un número mayor de individuos, con el fin de evaluar esa variabilidad interindividuo que podría provocar efectos benéficos a algunas personas, pero a otras no, con el fin de llegar a conclusiones más robustas y confiables.

2.6 Producción de compuestos fenólicos mediante técnicas biotecnológicas

Para aprovechar los compuestos bioactivos de la mora, estos se pueden obtener a través de la fruta o el jugo, sin embargo, también es posible hacer uso de herramientas biotecnológicas para obtenerlos, tomando en cuenta que la producción de mora en campo depende de las condiciones medioambientales y el grado de madurez de la fruta [18] [22] [24]. Por esta razón, Martínez-Cruz et al. [48] escarificaron semillas de mora y las pusieron bajo dos medios de cultivo diferente para favorecer la germinación, asimismo hojas de este cultivo fueron sometidas a la formación de callo con diferentes medios de cultivo. Los autores reportaron los mayores índices de germinación al remover la cubierta de la semilla, en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, y obtuvieron un callo friable de color morado, tanto en un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido naftalenacético y kinetina, como en un medio Woody Plant médium (WPM) suplementado con polivinilpirrolidona, ácido ascórbico y 2,4-diclorofenoxiacético. El callo es definido como un aglomerado de células indiferenciadas que sirve como base para los cultivos de células en suspensión en cultivos en matraces o en biorreactores. Sin embargo, los autores no cuantificaron el contenido de los compuestos polifenólicos en los callos, por lo que generaron una estrategia de producción de células desconociendo si tenían potencial para la producción de los compuestos de interés.

Schmidt-Durán et al. [49] indujeron callo a partir de segmentos de hoja de plantas de mora y establecieron suspensiones celulares finas con fines de producción de los compuestos

potencialmente bioactivos de manera *in vitro*. Los autores determinaron las cinéticas de crecimiento en callo y las células en suspensión de mora, obteniendo una concentración de 0,0256 mg EAG/g de peso fresco a una concentración de $1,0 \times 10^6$ células/ml de un extracto del cultivo celular.

Posteriormente, Schmidt-Durán et al. [50] optimizaron las condiciones de crecimiento en matraz para la obtención de los compuestos de interés. Los autores determinaron que el metanol con células liofilizadas era el método de extracción donde obtenían la mayor concentración de los compuestos de interés. Además, evidenciaron que utilizando una tapa de gasa en el erlenmeyer conteniendo el medio de cultivo Gamborg suplementado con 1 mg/l de ácido indolbutírico, 5 mg/l de 6-bencilaminopurina, 20 mg/l de L-glutamina y 200 mg/l de caseína hidrolizada incrementan considerablemente la producción de los metabolitos secundarios analizados en las células en suspensión, obteniendo 0,313 mg EAG/g de polifenoles totales; 3,647 μmol ET/g de capacidad antioxidante mediante DPPH; 0,135 mg EAE/g de ácido elálgico y 2,389 mg equivalente de vanillina/g; considerando que los resultados obtenidos por los autores están expresados por gramo de peso seco de células en suspensión.

Las investigaciones realizadas por [49] y [50] determinaron que el uso de herramientas biotecnológicas para la producción de células vegetales en cultivos líquidos en suspensión también es una posibilidad para obtener los compuestos de interés reportados en la fruta y el jugo de la mora, brindando la posibilidad de estandarizar y optimizar las condiciones de crecimiento para la obtención de estos compuestos a través de cultivos celulares con miras a su producción en biorreactores.

3. Perspectivas futuras

De acuerdo con las investigaciones realizadas en *R. adenotrichos*, es necesario profundizar en el conocimiento de cómo las condiciones medioambientales (relación genotipo:ambiente) intervienen en la producción de los compuestos de interés, que permita generar estrategias a nivel agronómico que favorezcan la concentración de los compuestos polifenólicos en el cultivo, dando un valor agregado a la comercialización de la fruta o la venta de productos agroindustriales, como alimento funcional. Adicionalmente, las investigaciones con cultivos celulares *in vitro* y su posible escalamiento en biorreactores, tema poco estudiado hasta el momento en este cultivo, abre la posibilidad de contar con condiciones controladas que permitan aumentar la concentración de los compuestos de interés y puedan ser usados posteriormente a nivel macrobiótico o como un aditivo

alimenticio. Por último, es necesario seguir realizando investigaciones *in vivo*, que permitan ampliar el conocimiento de los posibles efectos benéficos que consumir mora podría tener para mejorar la calidad de vida de las personas.

4. Conclusiones

Esta revisión logró determinar que *R. adenotrichos* presenta una serie de compuestos potencialmente bioactivos, especialmente elagitaninos y antocianinas en la fruta, las cuales presentan una alta capacidad antioxidante comparado a otras frutas, no obstante, el procesamiento de la fruta para la elaboración de jugo disminuye considerablemente la concentración de estos compuestos. A pesar de esto, el efecto antioxidante *in vitro* del jugo no se ve afectado, ya que se ha logrado demostrar que tiene potencial antioxidante al inhibir diferentes radicales libres y un posible efecto benéfico al inhibir la peroxidación lipídica, ayudar en procesos antiinflamatorios y tener un efecto fotoquimioprotector y apoptótico en líneas celulares cancerígenas. Además, *in vivo*, el jugo de mora puede tener efectos cardiovasculares benéficos, además de que, al ser digerido, puede producir urolitinas, moléculas muy estudiadas por sus posibles efectos beneficiosos para la salud. Por último, a nivel biotecnológico, hay un gran potencial de poder utilizar cultivos celulares de mora en biorreactores, que permitan generar un bioproceso para la producción de estos compuestos a gran escala y de una manera comercial.

5. Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Ph. D Randall Chacón por sus recomendaciones al manuscrito.

Tabla 1. Polifenoles totales, capacidad antioxidante, antocianinas y elagitaninos reportados por gramo de peso seco obtenidos a partir de *Rubus adenotrichos* Schldl. de las diferentes investigaciones.

Cita	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante	Compuestos polifenólicos
Investigaciones que utilizaron la fruta de la mora			
			Técnica HPLC-DAD
[17]	Técnica Folin-Ciocalteu 63 mg EAG/g		Elagitaninos 10,18 mg/g Antocianinas 7,20 mg/g
		Técnica ORAC	
[19] ¹	Técnica Folin-Ciocalteu 63 mg EAG/g	Extracto crudo: 106,86 µmol ET/g Extracto de acetona: 243,43 µmol ET/g Extracto de acetona lavado: 249,14 µmol ET/g Extracto de XAD-7: 220,57 µmol ET/g Extracto de hexano: 0,69 µmol ET/g	
			Técnica HPLC-DAD
[18]	Técnica Folin-Ciocalteu Grado 1: 33,7 mg EAG/g Grado 2: 29,0 mg EAG/g Grado 3: 35,0 mg EAG/g	Técnica ORAC Grado 1: 222 µmol ET/g Grado 2: 269 µmol ET/g Grado 3: 432 µmol ET/g	Elagitaninos Grado 1: 22,0 mg EAE/g Grado 2: 20,0 mg EAE/g Grado 3: 14,6 mg EAE/g Antocianinas Grado 1: 1,14 mg EC3G/g Grado 2: 3,49 mg EC3G/g Grado 3: 8,96 mg EC3G/g

			Método diferencial de pH
			Antocianinas Grado 1: 0,5 mg EC3G/g Grado 2: 1,8 mg EC3G/g Grado 3: 5,2 mg EC3G/g
			Técnica HPLC
			Antocianinas 11,5 mgEC3G/g
[28]	Técnica Folin-Ciocalteu 29,23 mg EAG/g	Técnica IC50 DPPH 148 µg/ml	Técnica Método diferencial de pH
			Antocianinas 12,3 mg/g
			Técnica Método diferencial de pH
	Técnica Folin-Ciocalteu	Técnica ORAC	Antocianinas
	Dulce	Dulce	Dulce
	Grado 1: 83 mg EAG/g	Grado 1: 1781 µmol ET/g	Grado 1: 0,71 mg /g
	Grado 2: 20,3 mg EAG/g	Grado 2: 866 µmol ET/g	Grado 2: 2,02 mg /g
	Grado 3: 13,5 mg EAG/g	Grado 3: 551 µmol ET/g	Grado 3: 9,0 mg /g
[24]	Sin espinas	Sin espinas	Sin espinas
	Grado 1: 93,0 mg EAG/g	Grado 1: 2131 µmol ET/g	Grado 1: 0,92 mg/g
	Grado 2: 25,3 mg EAG/g	Grado 2: 1230 µmol ET/g	Grado 2: 2,37 mg/g
	Grado 3: 17,6 mg EAG/g	Grado 3: 767 µmol ET/g	Grado 3: 11,3 mg/g
	Espina roja	Espina roja	Espina roja
	Grado 1: 104,0 mg EAG/g	Grado 1: 2805 µmol ET/g	Grado 1: 1,38 mg/g
	Grado 2: 31,0 mg EAG/g	Grado 2: 1543 µmol ET/g	Grado 2: 3,30 mg/g
	Grado 3: 20,0 mg EAG/g	Grado 3: 994 µmol ET/g	Grado 3: 15,40 mg/g
			Técnica HPLC-DAD
[22]			Elagitaninos

	Vino espina roja: 32,0 mg EAE/g Vino espina blanca: 27,0 mg EAE/g Vino sin espinas: 47,0 mg EAE/g Dulce: 23,0 mg EAE/g Enana: 15,3 mg EAE/g
	Antocianinas Vino espina roja: 10,1 mg EC3G/g Vino espina blanca: 10,3 mg EC3G/g Vino sin espinas: 7,5 mg EC3G/g Dulce: 4,7 mg EC3G/g Enana: 12,0 mg EC3G/g

	Técnica Folin-Ciocalteu	Técnica ORAC
[23] ¹	32,02 mg EAG/g	369,64 μmol ET/g

Cita	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante	Compuestos polifenólicos
Investigaciones que utilizaron el jugo de la mora			

	Técnica Folin-Ciocalteu	Técnica ORAC	Técnica Método diferencial de pH
[29] ^{2,3}			Antocianinas Filtrado: 16,48 mg EC3G/g Pulpa: 14,40 mg EC3G/g

	Técnica Folin-Ciocalteu	Técnica ORAC	Técnica HPLC-DAD
[20] ¹	Frutas congeladas: 31,41 mg EAG/g Pulpa tamizada: 44,22 mg EAG/g Residuos gruesos: 11,37 mg EAG/g Pulpa pasteurizada: 50,30 mg EAG/g Residuos finos: 41,34 mg EAG/g	Frutas congeladas: 306,81 μmol ET/g Pulpa tamizada: 471,96 μmol ET/g Residuos gruesos: 131,18 μmol ET/g Pulpa pasteurizada: 533,33 μmol ET/g Residuos finos: 403,96 μmol ET/g	Elagitaninos Frutas congeladas: 9,86 mg EAE/g Pulpa tamizada: 14,89 mg EAE/g Residuos gruesos: 2,12 mg EAE/g Pulpa pasteurizada: 18,66 mg EAE/g Residuos finos: 13,58 mg EAE/g

Pulpa congelada: 50,97 mg EAG/g	Pulpa congelada: 607,53 $\mu\text{mol ET/g}$	Pulpa congelada: 18,62 mg EAE/g
Jugo descongelado: 54,06 mg EAG/g	Jugo descongelado: 578,12 $\mu\text{mol ET/g}$	Jugo descongelado: 19,45 mg EAE/g
Bebida a base de fruta: 5,29 mg EAG/g	Bebida a base de fruta: 54,90 $\mu\text{mol ET/g}$	Bebida a base de fruta: 1,34 mg EAE/g
Producto final: 4,90 mg EAG/g	Producto final: 46,84 $\mu\text{mol ET/g}$	Producto final: 0,91 mg EAE/g
	Técnica DPPH	Antocianinas
	Frutas congeladas: 223,04 $\mu\text{mol ET/g}$	Frutas congeladas: 7,23 mg EC3G/g
	Pulpa tamizada: 282,24 $\mu\text{mol ET/g}$	Pulpa tamizada: 8,70 mg EC3G/g
	Residuos gruesos: 71,10 $\mu\text{mol ET/g}$	Residuos gruesos: 0,85 mg EC3G/g
	Pulpa pasteurizada: 416,16 $\mu\text{mol ET/g}$	Pulpa pasteurizada: 9,60 mg EC3G/g
	Residuos finos: 412,38 $\mu\text{mol ET/g}$	Residuos finos: 5,05 mg EC3G/g
	Pulpa congelada: 330,11 $\mu\text{mol ET/g}$	Pulpa congelada: 10,61 mg EC3G/g
	Jugo descongelado: 398,44 $\mu\text{mol ET/g}$	Jugo descongelado: 10,94 mg EC3G/g
	Bebida a base de fruta: 42,16 $\mu\text{mol ET/g}$	Bebida a base de fruta: 1,13 mg EC3G/g
	Producto final: 33,67 $\mu\text{mol ET/g}$	Producto final: 0,98 mg EC3G/g
		Técnica HPLC-DAD
[30] ²	Técnica ORAC	Elagitaninos
	238,89 $\mu\text{mol ET/g}$	3,39 mg EAE/g
		Antocianinas
		2,44 mg EC3G/g
[21]		Técnica HPLC-DAD

Elagitaninos

Extracción: 18,87 mg EAE/g
Clarificación: 15,46 mg EAE/g
Finalizador de frutas: 15,89 mg EAE/g
Prensado discontinuo: 4,37 mg EAE/g
Enzima con prensado discontinuo: 7,99 mg EAE/g⁴
Enzima con prensado discontinuo y clarificado: 6,85 mg EAE/g
Prensado continuo: 16,71 mg EAE/g
Enzima con prensado continuo: 18,09 mg EAE/g⁴
Enzima con prensado continuo y clarificado: 9,99 mg EAE/g

Antocianinas

Extracción: 7,62 mg EC3G/g
Clarificación: 10,36 mg EC3G/g
Finalizador de frutas: 11,02 mg EC3G/g
Prensado discontinuo: 7,03 mg EC3G/g
Enzima con prensado discontinuo: 12,24 mg EC3G/g⁴
Enzima con prensado discontinuo y clarificado: 14,02 mg EC3G/g
Prensado continuo: 10,97 mg EC3G/g
Enzima con prensado continuo: 13,51 mg EC3G/g⁴
Enzima con prensado continuo y clarificado: 12,75 mg EC3G/g

Elagitaninos
3,39 mg EAE/g

Antocianinas
2,44 mg EC3G /g

Técnica HPLC-DAD

Elagitaninos
Fruta: 7,75 mg EAE/g
Extracción: 55,47 mg EAE/g
Concentración térmica al vacío:
54,21 mg EAE/g
Retenido de la Ultrafiltración:
78,27 mg EAE/g
Permeado de la ultrafiltración:
22,70 mg EAE/g
Polvo del extracto: 5,94 mg
EAE/g
Polvo del concentrado: 7,24 mg
EAE/g
Polvo del retenido ultrafiltrado:
5,40 mg EAE/g

Antocianinas
Fruta: 2,83 mg EC3G/g
Extracción: 8,08 mg EC3G/g
Concentración térmica al vacío:
7,80 mg EC3G/g
Retenido de la Ultrafiltración: 6,87
mg EC3G/g
Permeado de la ultrafiltración:
5,45 mg EC3G/g
Polvo del extracto: 0,85 mg
EC3G/g

Técnica Folin-Ciocalteu

Fruta: 32,06 mg EAG/g
Extracción: 289,92 mg EAG/g
Concentración térmica al
vacío: 274,35 mg EAG/g
Retenido de la Ultrafiltración:
337,11 mg EAG/g
[33] Permeado de la ultrafiltración:
111,63 mg EAG/g
Polvo del extracto: 29,57 mg
EAG/g
Polvo del concentrado: 41,86
mg EAG/g
Polvo del retenido ultrafiltrado:
30,88 mg EAG/g

Polvo del concentrado: 1,24 mg
EC3G/g
Polvo del retenido ultrafiltrado:
0,71 mg EC3G/g

Cita	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante	Compuestos polifenólicos
Investigaciones que realizaron pruebas <i>in vitro</i> de la mora			
	Técnica Folin-Ciocalteu	Técnica ORAC	
	Extracto crudo: 22,35 mg EAG/g	Extracto crudo: 316,95 μ mol TE/g	
[35] ⁴	Extracto rico en polifenoles: 115 mg EAG/g	Extracto rico en polifenoles: 3286,25 μ mol TE/g	
	Extracto rico en antocianinas: 277,95 mg EAG/g	Extracto rico en antocianinas: 4596,05 μ mol TE/g	
	Extracto rico en proantocianidinas: 546,7 mg EAG/g	Extracto rico en proantocianidinas: 4063,75 μ mol TE/g	
		Técnica IC50 DPPH	
	Técnica Folin-Ciocalteu	Jugo fresco: 101,2 μ g/ml Jugo microfiltrado: 94,08 μ g/ml	Técnica HPLC-DAD
[36]	Jugo fresco: 45,0 mg EAG/g Jugo microfiltrado: 24,9 mg EAG/g	Técnica ORAC Jugo fresco: 547 μ mol ET/g Jugo microfiltrado: 417 μ mol ET/g	Antocianinas Jugo fresco: 11,5 mg EC3G/g Jugo microfiltrado: 5,6 mg EC3G/g
		Técnica ORAC	
[37] ¹		127,74 μ mol ET/g	
			Técnica HPLC-DAD
[39] ^{1,3}			Elagitaninos Microfiltrado: 12,61 mg EAE/g Ultrafiltrado: 21,93 mg EAE/g

			Antocianinas Microfiltrado: 5,04 mg EC3G/g Ultrafiltrado: 8,77 mg EC3G/g
			Técnica HPLC-DAD
			Elagitaninos Fruta: 7,4 mg EAE/g Pulpa: 3,0 mg EAE/g Jugo microfiltrado: 0,4 mg EAE/g Jugo diafiltrado: 0,6 mg EAE/g
[42]	Técnica Folin-Ciocalteu Fruta: 37,2 mg EAG/g Pulpa: 29,0 mg EAG/g Jugo microfiltrado: 28,9 mg EAG/g Jugo diafiltrado: 22,9 mg EAG/g		Antocianinas Fruta: 11,8 mg EC3G/g Pulpa: 11,4 mg EC3G/g Jugo microfiltrado: 8,2 mg EC3G/g Jugo diafiltrado: 8,2 mg EC3G/g
Cita	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante	Compuestos polifenólicos
Investigaciones que realizaron pruebas <i>in vivo</i> de la mora			
[44] ^{2,3}			Técnica UPLC-DAD/ESI-Q-TOF/MS Elagitaninos 4,77 mg EAE/g
[45] ^{1,3,5}	Técnica Folin-Ciocalteu 34,03 mg EAG/g	Técnica ORAC 398,53 µmol ET/g	
[46]	Técnica Folin-Ciocalteu 20,85 mg EAG/g	Técnica ORAC 311 µmol ET/g	Técnica Método diferencial de pH Antocianinas 10,51 mg/g
[47] ^{1,3,5}	Técnica Folin-Ciocalteu 63,09 mg EAG/g	Técnica ORAC 325,56 µmol ET/g	Técnica HPLC-DAD Elagitaninos 15,93 mg EAE/g

ET, equivalentes de Trolox, EAG, equivalente de ácido gálico, EAE, equivalentes de ácido elágico, EC3G, equivalentes de cianidina-3-glucósido.

¹ Los datos reportados se expresaron sobre gramo de peso seco a través de la humedad de la muestra reportada en el artículo.

² Los datos reportados se expresaron sobre gramo de peso seco a través de la humedad reportada por [21] o [39] dependiendo del tipo de jugo utilizado en el artículo.

³ Los datos reportados se transformaron sobre gramo de peso fresco a través de la densidad del jugo, determinada en 1017,63 kg/m³. La densidad del jugo se obtuvo mediante la fórmula $\rho = \frac{1}{\sum(m_i/\rho_i)}$ donde m_i es la fracción másica de cada componente de la bebida y ρ_i es la densidad de cada componente. La fracción másica de cada componente se determinó con el promedio de los valores reportados de proteínas, grasas, carbohidratos, fibra, cenizas y agua por [18], [22] y [23] en base húmeda. La densidad de cada componente se calculó con las fórmulas de Choi y Okos [51] a 20 °C (temperatura ambiente).

⁴ Los datos reportados se determinaron mediante el promedio de los resultados obtenidos en el artículo.

⁵ Los datos reportados se determinaron con base en el 100% v/v de jugo de mora.

Financiamiento

El trabajo se financió por el Instituto Tecnológico de Costa Rica (Proyecto 1510121).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Bibliografía

- [1] J. J. Castro y M. M. Cerdas, "Mora (*Rubus* spp). Cultivo y manejo poscosecha," Costa Rica, Imprenta Nacional, 2005.
- [2] D. Flores, A. Montero, R. Orozco y F. Arguello, "Primer Foro-Taller Nacional sobre el cultivo de la mora (*Rubus* spp.)," Costa Rica, Editorial Centro de Información Tecnológica, 2003.
- [3] C. E. Finn, "Blackberries," en *Temperate Fruit Crop Breeding*, F. Hancock, ed, Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 83-114, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9_3
- [4] R. M. Brennan, P. S. Caligari, J. R. Clark, P. N. Brás de Oliveira, C. E. Finn, J. F. Hancock, et al., "Berry Crops," en *Horticulture: Plants for people and places, Volume 1*," G. R. Dixon, D. E. Aldous, eds, Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 301-325, 2014. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8578-5_9

- [5] J. Graham y M. Woodhead, "Rubus," en *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, C. Kole, ed, Springer, Heidelberg, Berlin, pp. 179-196, 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8_9
- [6] J. Lee, M. Dossett y C. E. Finn, "Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing," *Food Chem*, vol. 130, pp. 785-796, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.022>
- [7] C. Gonzalez y E. Perez, "Extracción enzimática de esteviolglucósidos en jugo de mora (*Rubus adenotrichus*)," *Rev Colomb Investig Agroindustriales*, vol. 4, no. 1, pp. 24-38, 2017. <https://doi.org/10.23850/24220582.663>
- [8] K. Rodríguez-Díaz, H. Silva-Rojas, J. Boyzo-Marin, S. Segura-Ledesma, S. Leyva-Mir, Á. Rebollar-Alviter, "Molecular detection of *Peronospora sparsa* in sources of primary inoculum and components of resistance in wild blackberry species," *Eur J Plant Pathol*, vol. 149, no. 4, pp. 845-851, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1232-7>
- [9] S. Segura, A. Rebollar-Alviter, J. Boyzo-Marín, M. Hernández-Bello y J. López-Medina, "Genetic resources of blackberry wild species in Michoacan, Mexico," *Acta Horti*, vol. 946, pp. 107-111, 2012. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.946.14>
- [10] D. Flores-Mora y F. Argüello-Delgado, "Cultivo de la mora. Innovaciones Tecnológicas," Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica, 2005.
- [11] D. Flores, R. Chacón, V. Jiménez y F. Ortiz, "Enraizamiento de mora (*Rubus adenotrichus*) en medio líquido en el sistema de inmersión temporal y su aclimatación en invernadero," *Tecnol Marcha*, vol. 25, no. 2, pp. 3-9, 2012. <https://doi.org/10.18845/tm.v25i2.300>
- [12] D. Flores, R. Chacón, L. Alvarado, A. Schmidt, C. Alvarado y J. Chaves, "Effect of using two different types of carbon nanotubes for blackberry (*Rubus adenotrichos*) in vitro plant rooting, growth and histology," *Am J Plant Sci*, vol. 05, no. 24, pp. 3510-3518, 2014. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.524367>
- [13] R. Orozco-Rodríguez, D. Flores-Mora y F. Argüello-Delgado, "Efecto de diferentes tipos de propagación en el rendimiento de mora vino (*Rubus adenotrichus*)," *Agron Mesoam*, vol. 22, no. 1, pp. 91-97, 2011. <https://doi.org/10.15517/am.v22i1.8671>
- [14] R. Orozco y R. Muñoz, "Efecto de abonos orgánicos en las propiedades químicas del suelo y en rendimiento de la mora (*Rubus adenotrichus*) en dos zonas agroecológicas de Costa Rica," *Tecnol Marcha*, vol. 25, no. 1, pp. 16-31, 2012. <https://doi.org/10.18845/tm.v25i1.173>
- [15] M. Orozco-Aceves, J. Calvo-Araya, J. Gamboa-Tabares, W. Peraza-Padilla, O. Varela-Rodríguez y R. Orozco-Rodríguez, "Efecto de dos abonos orgánicos en las cadenas tróficas

- del suelo cultivado con mora,” *Agron Mesoam*, vol. 28, no. 3, pp. 619-628, 2017. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.25861>
- [16] T. J. Park, J. G. Martin y R. Linhardt, “Pharmacological applications of biocompatible carbon nanotubes and their emerging toxicology issues,” en *Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes. Carbon Materials: Chemistry and Physics*, vol 1, F. Cataldo, T. Da Ros, eds, Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 283-316, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6845-4_12
- [17] C. Mertz, V. Cheynier, Z. Günata y P. Brat, “Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry,” *J Agric Food Chem*, vol. 55, no. 21, pp. 8616-8624, 2007. <https://doi.org/10.1021/jf071475d>
- [18] O. Acosta-Montoya, F. Vaillant, S. Cozzano, C. Mertz, A. Pérez y M. Castro, “Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltld.) during three edible maturity stages,” *Food Chem*, vol. 119, no. 4, pp. 1497-1501, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032>
- [19] C. Mertz, A. Gancel, Z. Gunata, P. Alter, C. Dhuique-Mayer, F. Vaillant, et al., “Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits,” *J Food Compos Anal*, vol. 22, no. 5, pp. 381-387, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.008>
- [20] A. Gancel, A. Feneuil, O. Acosta, A. Pérez y F. Vaillant, “Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*),” *Food Res Int*, vol. 44, no. 7, pp. 2243-2251, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.013>
- [21] M. Soto, O. Acosta, F. Vaillant y A. Pérez, “Effects of mechanical and enzymatic pretreatments on extraction of polyphenols from blackberry fruits,” *J Food Process Eng*, vol. 39, no. 5, pp. 492-500, 2016. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12240>
- [22] M. Soto, A. Pérez, M. Cerdas, F. Vaillant y O. Acosta, “Physicochemical characteristics and polyphenolic compounds of cultivated blackberries in Costa Rica,” *J Berry Res*, vol. 9, no. 2, pp. 283-296, 2019. <https://doi.org/10.3233/jbr-180353>
- [23] M. Montero, C. Rojas-Garbanzo, J. Usaga y A. Pérez, “Composición nutricional, contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante hidrofílica de frutas costarricenses seleccionadas,” *Agron Mesoam*, vol. 33, no. 2, 2022. <https://doi.org/10.15517/am.v33i2.46175>

- [24] M. Araya, Y. Carvajal, V. Alvarez, R. Orozco y G. Rodriguez, "Polyphenol characterization of three varieties of blackberry fruits (*Rubus adenotrichos*), cultivated in Costa Rica," J Berry Res, vol. 7, no. 2, pp. 97-107, 2017. <https://doi.org/10.3233/jbr-170150>
- [25] J. P. Rojas-Llanes, J. R. Martínez y E. E. Stashenko, "Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora (*Rubus glaucus* Benth) obtenidos bajo diferentes condiciones," Rev Vitae, vol. 21, no. 3, pp. 218-227, 2014. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.18852>
- [26] H. P. Makkar, "Measurement of total phenolics and tannins using Folin-Ciocalteu method," en Quantification of tannins in tree and shrub foliage, H. P. Makkar, ed, Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 49-51, 2003. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7_3
- [27] S. Vijayalaxmi, S. K. Jayalaksmi y K. Sreeramulu, "Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties," J Food Sci Technol, vol. 52, no. 5, pp. 2761-2769, 2014. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1295-9>
- [28] N. Martínez-Cruz, K. Arévaño-Niño, M. J. Verde-Star, C. Rivas-Morales, A. Randay-Cárdenas, M. A. Núñez-González, et al., "Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltld (zarzamora)," Rev Mex Cienc Farm, vol. 42, no. 4, pp. 66–71, 2011.
- [29] M. Cisse, F. Vaillant, O. Acosta, C. Dhuique-Mayer y M. Dornier, "Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using the arrhenius, eyring, and ball models," J Agric Food Chem, vol. 57, no. 14, pp. 6285-6291, 2009. <https://doi.org/10.1021/jf900836b>
- [30] O. Acosta, F. Vaillant, A. Pérez y M. Dornier, "Potential of ultrafiltration for separation and purification of ellagitannins in blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltld.) juice," Sep Purif Technol, vol. 125, pp. 120-125, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.037>
- [31] O. Acosta, F. Vaillant, A. Pérez y M. Dornier, "Concentration of polyphenolic compounds in blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltld.) juice by nanofiltration," J Food Process Eng, vol. 40, 2017. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12343>
- [32] C. González, L. Hernández y F. Vaillant, "Análisis de un jugo de mora (*Rubus adenotrichos*) endulzado con estevia (*Stevia rebaudina* Bertoni), una aproximación metabolómica," Rev Udca Actual Divul Cient, vol. 20, no. 1, pp. 121-129, 2017. <https://doi.org/10.31910/rudca.v20.n1.2017.69>
- [33] A. Quirós, O. Acosta, E. Thompson y M. Soto, "Effect of ethanolic extraction, thermal vacuum concentration, ultrafiltration, and spray drying on polyphenolic compounds of tropical highland

- blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltl.) by-product,” J Food Process Eng, vol. 42, no. 4, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13051>
- [34] O. Acosta, F. Vaillant, M. Dornier y A. M. Pérez, “Método para la obtención de un extracto rico en taninos del ácido elálgico a partir de frutos que contienen estos compuestos y extracto obtenido usando dicho método,” [Internet]. Patente Internacional 2012/152232, Noviembre 15, 2012. Disponible en: https://patentscope.wipo.int/search/es/detail.jsf?docId=WO2012152232&_fid=US124047089.
- [35] E. O. Cuevas-Rodríguez, V. P. Dia, G. G. Yousef, P. A. García-Saucedo, J. López-Medina, O. Paredes-López, et al., “Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts,” J Agric Food Chem, vol. 58, no. 17, pp. 9542–9548, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf102590p>
- [36] G. Azofeifa, S. Quesada y A. Pérez, “Effect of the microfiltration process on antioxidant activity and lipid peroxidation protection capacity of blackberry juice,” Rev Bras Farmacogn, vol. 21, no. 5, pp. 829-834, 2011. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000133>
- [37] E. González, F. Vaillant, A. Pérez y G. Rojas, “In vitro cell-mediated antioxidant protection of human erythrocytes by some common tropical fruits,” J Nutr Food Sci, vol. 2, no. 3, 2012. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000139>
- [38] G. Azofeifa, S. Quesada, F. Boudard, M. Morena, J. Cristol, A. Pérez, et al., “Antioxidant and anti-inflammatory in vitro activities of phenolic compounds from tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos*),” J Agric Food Chem, vol. 61, no. 24, pp. 5798-5804, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf400781m>
- [39] L. Calvo-Castro, D. Syed, J. Chamcheu, F. Vilela, A. Pérez, F. Vaillant, et al., “Protective effect of tropical highland blackberry juice (*Rubus adenotrichos* Schltl.) against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in a reconstituted skin equivalent model,” Photochem Photobiol, vol. 89, no. 5, pp. 1199-1207, 2013. <https://doi.org/10.1111/php.12104>
- [40] G. Azofeifa, S. Quesada, A. Pérez, F. Vaillant y A. Michel “Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals,” J Food Compos Anal, vol. 42, pp. 56-62, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.015>
- [41] G. Azofeifa, S. Quesada, A. Pérez, F. Vaillant y A. Michel, “Effect of an in vitro digestion on the antioxidant capacity of a microfiltrated blackberry juice (*Rubus adenotrichos*),” Beverages, vol. 4, no. 2, pp. 30, 2018. <https://doi.org/10.3390/beverages4020030>

- [42] V. Madrigal-Gamboa, J. Jiménez-Arias, O. Hidalgo, S. Quesada, A. Pérez y G. Azofeifa, “Membrane processing effect of blackberry (*Rubus adenotrichos*) on cytotoxic and proapoptotic activities against cancer cell lines,” *J Food Process Preserv*, vol. 45, no. 6, 2021. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15575>
- [43] D. D`Amico, M. Olmer, A. M. Fouassier, P. Valdés, P. Andreux, C. Rinsch, et al., “Urolithin A improves mitochondrial health, reduces cartilage degeneration, and alleviates pain in osteoarthritis,” *Trends Mol Med*, vol. 27, no. 7, pp. 687-699, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.04.009>
- [44] C. García-Muñoz, L. Hernández, A. Pérez y F. Vaillant, “Diversity of urinary excretion patterns of main ellagitannins' colonic metabolites after ingestion of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*) juice,” *Food Res Int*, vol. 55, pp. 161-169, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.049>
- [45] G. Azofeifa, S. Quesada, L. Navarro, O. Hidalgo, K. Portet, A. Pérez, et al., “Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats,” *J Funct Foods*, vol. 26, pp. 330-337, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.007>
- [46] G. Madrigal, R. Vargas, G. Carazo, N. Ramirez, L. Fonseca y J. Campos, “*Rubus adenotrichus* fruits extracts phytochemical characterization and antioxidant power evaluation for dermocosmetics formulation,” *Int J Phytocosmetics Nat Ingred*, vol. 4, no. 1, 2017. <https://doi.org/10.15171/ijpni.2017.05>
- [47] M. Quesada-Morúa, O. Hidalgo, J. Morera, G. Rojas, A. Pérez, F. Vaillant, et al., “Hypolipidaemic, hypoglycaemic and antioxidant effects of a tropical highland blackberry beverage consumption in healthy individuals on a high-fat, high-carbohydrate diet challenge,” *J Berry Res*, vol. 10, no. 3, pp. 459-474, 2020. <https://doi.org/10.3233/jbr-190516>
- [48] N. S. Martínez-Cruz, K. Arévalo-Niño, M. J. Verde-Star, A. Oranday-Cárdenas, C. Rivas-Morales, J. Treviño-Neávez, et al., “Germinación in vitro e inducción de callo en *Rubus adenotrichus* Schltdl.,” *Polibotánica*, vol. 35, pp. 99-107, 2013.
- [49] A. Schmidt-Durán, C. Alvarado-Ulloa, R. Chacón-Cerdas, L. Alvarado-Marchena y D. Flores-Mora, “Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) and its microscopic analysis,” *Springerplus*, vol. 5, no. 1, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3381-0>
- [50] A. Schmidt-Durán, L. A. Calvo-Castro, C. Alvarado-Ulloa, O. Acosta-Montoya y M. Rodríguez-Monroy, “Cell suspension cultures for the production of antioxidant phenolic

compounds: experiments with tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino),” *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02428-9>

- [51] Y. Choi y M. Okos, “Effect of temperature and composition on the thermal properties of foods,” en: *Food Engineering and Process Applications*, Vol. 1, L. M. Maguer, P. Jelen, eds, New York, Elsevier, pp. 93-101, 1986.

5. Artículo 2

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)
https://doi.org/10.1007/s11240-022-02428-9

RESEARCH NOTE



Cell suspension cultures for the production of antioxidant phenolic compounds: experiments with tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino)

Alexander Schmidt-Durán^{1,2} · Laura A. Calvo-Castro² · Carlos Alvarado-Ulloa² · Oscar Acosta-Montoya³ · Mario Rodríguez-Monroy⁴

Received: 18 October 2022 / Accepted: 1 December 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract

Tropical highland blackberries (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino) fruits have shown high antioxidant content, including some of the highest known dietary concentrations of ellagitannins, and greater polyphenol accumulation in leaves and stems relative to the fruits. This study aimed to generate a methodology to obtain and quantify antioxidant phenolic compounds from leaf-derived blackberry calli and cellular suspensions. Friable calli and disaggregate cell suspensions were successfully obtained from leaf segments. The effects of three different flask-capping assemblies and six different culture media on blackberry cell culture kinetics was evaluated, as well as total polyphenol concentration, antioxidant capacity, and vanillin and ellagic acid content. The highest yields in terms of biomass (cell viability and fresh weight) were obtained when using homemade cotton plugs for closing the cell suspension flasks, while the Gamborg culture medium supplemented with 20 mg/L of L-glutamine, 200 mg/L of hydrolyzed casein, 5 mg/L of BA and 1 mg/L of IBA promoted a greater accumulation of total polyphenols, a greater antioxidant capacity and presented the highest concentration of vanillin and ellagic acid equivalents. These results correspond to the first bioactive compound quantification and optimization of the tropical highland blackberry cells culture growth conditions, and even though they results are lower than those reported by previous research studies using the fruit or their juice, they are comparable to the ones obtained from cell cultures of other berries.

Key message

This study allowed the establishment of blackberry calli and cell cultures with relatively high phenolic content and antioxidant activity.

Keywords Antioxidant capacity · Biomass · *Rubus adenotrichos* · Total polyphenols · UHPLC-DAD

Communicated by Konstantin V. Kiselev.

✉ Alexander Schmidt-Durán
aschmidt@iter.ac.cr

¹ Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica

² Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

³ Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

⁴ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Morelos, México

Abbreviations

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
ANOVA	Analysis of variance
BA	6-benzyladenine
DPPH 2	2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DW	Dry weight
DWC	Dry weight cells
FW	Fresh weight
GAE	Gallic acid equivalents
GLM	General lineal model
IBA	Indole-3-butyric acid
KN	Kinetin
MS	Murashige and Skoog basal medium

Published online: 14 December 2022

Springer

NAA	1-Naphthaleneacetic acid
r ²	Coefficient of determination
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revolutions per minute
TE	Trolox equivalents
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UHPLC-DAD	Ultra High Performance Liquid Chromatographic-Diode Array Detection

Introduction

Free radicals are atoms or molecules that contain unpaired electrons and therefore, are highly reactive (Islam and Shekhar 2015). Free radicals, especially reactive oxygen species (ROS), are necessary as physiological regulators of intracellular signaling pathways, where they function as messenger molecules in proliferation, differentiation, apoptosis, and several other biological processes (Carvajal 2019). However, in large quantities, free radicals can induce tissue dysfunction due to direct cell damage under different mechanisms, such as lipid peroxidation, DNA oxidation, metalloproteinase and calpainase matrix activation, osmotic cellular lysis, and the opening of permeable transition pores in the mitochondria (Schulz and Di Lisa 2016).

The toxic effect of free radicals can be countered by the neutralizing action of antioxidant compounds (Islam and Shekhar 2015), which may prevent or significantly delay cell oxidation (Sudhakar and Fukai 2014) by reducing or removing ROS and other reactive species (Mehla et al. 2017). In humans, exogenous antioxidants obtained through food intake are considered to aid in preventing oxidative stress (Sudhakar and Fukai 2014), a condition that occurs when the formation of free radicals exceeds the organism's ability to neutralize and eliminate them (Mandelker 2011).

The plant species from the *Rubus* genus, known as blackberries, constitute an important source of antioxidant secondary metabolites with known benefits for human health (Mertz et al. 2007). In Central America, Costa Rica is one of the main blackberry crop producers, growing mainly *Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichos* species. The variety known as "Vino" (*R. adenotrichos* Schltdl.) presents high antioxidant content (Acosta-Montoya et al. 2010; Mertz et al. 2009), including one of the highest contents of ellagitannins reported in fruits (González et al. 2012). Previous studies have shown the potential of this blackberry as a chemoprotective agent against genotoxic damages from solar radiation on skin (Calvo-Castro et al. 2013); as well as antioxidant and inflammatory effects in vitro (Azofeifa et al. 2013); hypoglycemic and hypolipidemic effects on diabetic rats (Azofeifa et al. 2016); and cytotoxic activity against

cancerous stomach, colon, liver, and skin cells (Madrigal-Gamboa et al. 2021). However, research performed so far use and quantify these compounds directly from fruit or its juice, and there are no previous investigations at cell culture level; except for the study performed by Schmidt-Durán et al. (2016) in which blackberry calli and cell suspensions was established.

The production of plant secondary metabolites is frequently low, less than 1% fresh weight (FW), and it depends on the physiology and the development stage of the plant, usually accumulating in specialized cells or organs (Smetanska 2008). In vitro plant cell cultures are an alternative study tool for producing secondary metabolites with optimized production and recovery systems in controlled conditions (Kumar 2015). Cell suspensions are established from undifferentiated and friable calli, which are transferred to flasks with liquid culture medium, in an orbital or rotating shaker (Bhojwani and Dantu 2013). Hence, the aim of this study was optimized tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) cell suspensions from leaf-derived calli as a study model to produce antioxidant phenolic compounds.

Materials and methods

Polyphenol extraction from leaf-derived blackberry calli

Phenolic compounds from fresh or freeze-dried leaf-derived blackberry (*R. adenotrichos* cv. Vino) calli (Schmidt et al. 2016) were extracted with ethanol (EtOH) or methanol (MeOH) at 0%, 50%, 75% and 100% v/v in water. Fresh calli samples (1 g FW, 0.05 DW) or freeze-dried samples (5 g FW, 0.2 g DW) were mixed with the extraction solvent (1:10 ratio) in an ultrasonicator (QSonica®) at 100 microns of amplitude during 1 min in an ice bath, centrifuged (5 min, 7500 rpm), and the pooled supernatant from three consecutive extractions was collected and evaporated in a vacuum evaporator (25 °C, R-300, BUCHI). The samples were resuspended in 6 mL MeOH and placed at -80 °C until total polyphenol content and antioxidant capacity analysis were performed.

Total polyphenol content in blackberry calli

Total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu method described by González et al. (2012). Samples (50 µL) were incubated with the Folin reagent (250 µL) at room temperature during 2 min, and then incubated with sodium carbonate (75 g/L, 200 µL) at 50 °C for 15 min. Then, the samples were cooled using an ice bath,

and the absorbance at 620 nm was determined (FLUOstar OPTIMA, BMG LabTech) and compared against a calibration curve ($y=0.0109x+0.01$, $r^2=0.9984$) of gallic acid (10 to 70 mg/L). Data is shown as gallic acid equivalents (GAE).

Determination of the antioxidant capacity in blackberry calli

Antioxidant capacity was determined with the free radical DPPH method described by Gancel et al. (2011). Samples (1.15 mL) were mixed with 1.85 mL DPPH and incubated in the dark for 30 min. Absorbance was quantified at 517 nm (Evolution 201, Thermo Scientific) and compared against a Trolox (10 to 70 $\mu\text{mol/L}$) calibration curve ($y=0.0051x+0.011$, $r^2=0.9592$). Data is shown as Trolox equivalents (TE).

Cell suspensions

Blackberry (*R. adenotrichos* cv. Vïno) cell suspensions were obtained from previously established calli as described by Schmidt-Durán et al. (2016). Then, 4 g (FW) of leaf-derived calli were cultured in 125 mL Erlenmeyer flasks with 30 mL of MS (Murashige and Skoog, 1962) culture medium without growth regulators, and incubated for 15 days in the dark at 75 rpm and 20 ± 2 °C. After this, the cell cultures were transferred to 250 mL flasks with 50 mL media for 15 days under the same growth conditions. Disaggregate cell suspensions were allowed to sediment for 15 min, and 25 mL supernatant with 25 mL fresh media were kept in new 250 mL flasks for 14 days.

Plugging effect on cell culture growth and phenolic compounds accumulation

Disaggregate cell suspensions (25 mL sample with 25 mL MS media without supplements) were incubated for 4 days in the dark (75 rpm, 20 ± 2 °C) in 500 mL Erlenmeyer flasks capped with aluminum foil (100 cm² squares), cotton plugs (3 g of cotton wrapped in 100 cm² gauze) or silicone sponge plugs (SIGMA) ($n=10$ each treatment) (Orozco-Sánchez et al. 2011). Fresh weight was calculated from total cell suspensions collected after vacuum filtering (Whatman® #2 paper filter) the media, and dry weight was recorded after drying the biomass for 24 h at 80 °C. Cell viability was determined by Evans blue staining (Capataz-Tafur et al. 2010).

Ellagic acid and vanillin content in the samples was determined using an UHPLC-DAD Shimadzu Nexera XTS (SCL-40, DGU-405, LC-10D XR, SIL-40 C XR, CTO-40 S, SPD-M40) system with a XR-ODS (100 \times 3 mm, 2.2 μm particle size) silica column kept at 35 °C. Mobile

phase A (deionized water with 1% formic acid) and a mobile phase B (methanol) were delivered in a gradient method (2 min 5% B, 6 min 2–50% B, 3 min 50% B, 1 min 50–95% B, 2 min 95% B) with a flow rate of 0.1 mL/min and 20 μL sample injection modifying the methodology described by Peñarrieta et al. (2007). The eluting was monitored through a photodiode array detector at 271 nm and the samples were quantified against external analytical standard curves for vanillin ($y=114595x$, $r^2=0.9994$) and ellagic acid ($y=131079x$, $r^2=0.9997$). The data is shown as the mean \pm SD and the results were analyzed through a one-way ANOVA, using Minitab® statistical program.

Culture medium effect on cell culture growth and phenolic compounds accumulation

Six different culture media were evaluated (Table 1). Cell suspensions were grown in each medium ($n=3$) for 30 days, followed by centrifugation (5000 rpm). Polyphenols were extracted from the cell pellet, using the conditions previously detailed. FW, DW, total polyphenols, antioxidant capacity and vanillin and ellagic acid concentrations were determined as described in the sections above. The data is shown as the mean \pm SD and the results were analyzed through a one-way ANOVA, using Minitab® statistical program.

BA, 6-benzyladenine; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; IBA, indole-3-butyric acid; KN, kinetin; MS, Murashige and Skoog (1962) basal medium; $\frac{1}{2}$ MS, MS culture medium with 50% macro- and micro-nutrients, 100% vitamins and organic compounds; NAA, 1-naphthaleneacetic acid.

Results and discussion

Tropical highland blackberry (*R. adenotrichos* cv. Vïno) cell suspensions

Through this study, it was possible to satisfactorily use the methodology described by Schmidt-Durán et al. (2016) to generate friable calli and to establish cell suspensions (Fig. 1). Given that polyphenol recovery depends on multiple factors, including the extraction method, the choice of solvent, and the source material (Araya et al. 2017; Pilar-Rojas et al. 2014; Makkar 2003), different combinations of ethanol and methanol in water were used to determine the concentration of total polyphenols and the antioxidant capacity in the biomass (Vijayalaxmi et al. 2014), starting from calli (Table 2). The freeze-dried calli samples showed significantly higher recovery of total polyphenols ($p<0.05$) and higher antioxidant capacity ($p<0.05$) relative to the

Table 1 Cell culture media tested for growing blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino) cell suspensions

Treatment	T1-Control	T2	T3	T4	T5	T6
Culture media	MS	MS	MS	Gamborg	MS	½ MS
Sucrose (g/L)	30.0	50.0	30.0	30.0	30.0	30.0
2,4-D (mg/L)	1.5	-	-	-	-	1.0
NAA (mg/L)	-	-	2.0	-	0.5	3.0
IBA (mg/L)	-	-	-	1.0	-	-
BA (mg/L)	0.5	-	-	5.0	2.0	-
Picloran (mg/L)	-	1.0	-	-	-	-
KN (mg/L)	-	0.5	0.2	-	-	-
L-Glutamine(mg/L)	-	200.0	-	20.0	-	-
Hydrolyzed casein (mg/L)	-	-	-	200.0	-	-
pH	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
Reference	Schmidt-Durán et al. (2016) modified	Karwasara and Dixit (2013)	Sivanandhan et al. (2012)	Sahraroo et al. (2016)	Khampour-Ardestani et al. (2015)	Deepthi and Sathesikumar (2017)

fresh calli samples in all extracting treatments. In addition, within the freeze-dried samples, recovery with 100% methanol and 100% ethanol yielded higher total polyphenol concentrations, while 100% methanol, 50% ethanol and control (water) resulted in higher values of antioxidant capacity. Therefore, the freeze-dried material extracted with 100% methanol was selected as the best method for recovering antioxidant polyphenols for this study.

DW, dry weight; EtOH, ethanol; FW, fresh weight; GAE, gallic acid equivalents; MetOH, methanol; TE, Trolox equivalents. Different letters within columns show significant differences (Tukey test, $\alpha=0.05$) within total polyphenol content or antioxidant capacity regarding each extracting solvent and type of sample.

Oxygen availability is a crucial factor in the metabolic growth of aerobic organisms, and yet, there is few information available regarding the oxygen mass transfer in agitated flasks, using different types of closing caps (Nikakhtari and Hill 2006). Hence, we evaluated the effect of three different types of flask closures on cell growth. Foil capping resulted in the lowest ($p < 0.05$) cell proliferation, but only in terms of cell viability and FW; however, there was no significant difference between closure systems regarding dry weight, growth index and vanillin and ellagic acid content in the cell suspensions (Table 3). Thus, considering its low cost and easy preparation, the cotton plug was selected as an optimal closing cap for allowing cell growth and polyphenol accumulation in blackberry cell suspensions.

DW, dry weight; FW, fresh weight. Different letters represent significant differences between treatments (Tukey test, $\alpha=0.05$). DW growth index was determined as $(X_f - X_i)/X_i$, where X_f is the final biomass and X_i is initial biomass.

Six different culture media were compared for establishing cell suspensions with optimum polyphenol production. When testing different culture media, the most important factors to consider are the source and concentration of carbon, nitrogen and growth regulators. Plant cell growth and the production of secondary metabolites with phenolic structure are also influenced by the ratio of $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ in the medium (Sahraroo et al. 2016). In this regard, relative to the MS-based media, the Gamborg medium (Gamborg et al. 1968) (T4) presents a lower concentration of NH_4^+ and a higher rate of NO_3^- and has been frequently used for promoting the production of phenolic secondary metabolites in cell suspensions (Rani and Vimolmangkang 2022). Thus, as expected, the highest yield of total polyphenols and antioxidant activity in this study were obtained in cell suspensions grown in Gamborg medium (Table 4). Moreover, vanillin and ellagic acid concentrations were at least 11.5 and 2.8 times higher respectively in the Gamborg-grown cell suspensions than in the other media.

Fig. 1 Tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino) leaf-derived callogenesis induction (a), friable callus (b) and cell suspensions (c)

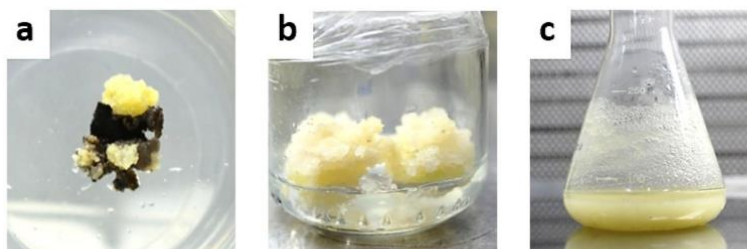


Table 2 Total polyphenols and antioxidant capacity (mean \pm SD) of blackberry extracts (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino) obtained from fresh and freeze-dried calli by different extraction treatments

Extracting solvent	Polyphenols (mg GAE/g DW)		DPPH (μ mol TE/g DW)	
	Fresh	Freeze-dried	Fresh	Freeze-dried
0% MeOH	0.024 \pm 0.020 b	0.098 \pm 0.170 b	8.410 \pm 0.686 bcd	60.843 \pm 1.702 ab
50% MeOH	0.128 \pm 0.095 b	0.136 \pm 0.181 b	9.124 \pm 0.195 abc	58.930 \pm 0.345 ab
75% MeOH	0.174 \pm 0.104 b	0.654 \pm 0.364 ab	2.687 \pm 1.763 e	58.539 \pm 0.552 ab
100% MeOH	0.074 \pm 0.038 b	1.510 \pm 0.269 a	5.056 \pm 1.454 de	61.539 \pm 3.384 ab
0% EtOH	0.011 \pm 0.007 b	0.206 \pm 0.182 b	9.241 \pm 0.831 abc	64.452 \pm 2.718 a
50% EtOH	0.106 \pm 0.055 b	0.432 \pm 0.668 ab	4.133 \pm 1.521 e	63.496 \pm 2.225 a
75% EtOH	0.119 \pm 0.100 b	0.686 \pm 350 ab	4.600 \pm 2.412 de	59.061 \pm 0.726 ab
100% EtOH	0.058 \pm 0.013 b	1.008 \pm 1.096 ab	6.114 \pm 1.286 cde	58.278 \pm 0.726 ab

Table 3 Effect of three flask closing types ($n=10$) on biomass and percentage cell viability (mean \pm SD) from blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino) cell suspensions

Flask closure	FW (g/L)	FW growth index ¹	DW (g/L)	DW growth index	Viability (%)	Vanillin (mg/g DW)	Ellagic acid (mg/g DW)
Aluminum foil	117.39 \pm 17.29 b	0.607 a	9.99 \pm 1.15 a	1.014 a	42.82 \pm 4.31 b	0.613 \pm 0.214 a	0.381 \pm 0.015 a
Cotton plug	143.58 \pm 25.27 a	0.557 a	10.52 \pm 0.61 a	0.947 a	45.75 \pm 2.08 a	0.230 \pm 0.086 a	0.355 \pm 0.007 a
Silicone sponge	145.19 \pm 17.02 a	0.575 a	10.60 \pm 0.38 a	0.963 a	47.39 \pm 2.24 a	0.500 \pm 0.324 a	0.261 \pm 0.159 a

However, there was no significant difference ($p > 0.05$) in antioxidant activity in cell suspensions grown in the Gamborg medium (T4) respective to the T2 medium, even though T2 yielded very little polyphenol content (Table 4). In this regard, both T2 (200 mg/L) and T4 (20 mg/L) were the only media that contained L-Glutamine. Glutamine is an amino acid that can be used as an energy source to enhance nitrogen assimilation, while hydrolyzed casein is a source of organic nitrogen, calcium, phosphate, microelements, vitamins and amino acids (Reyes-Díaz et al. 2018). Such nitrogen supplementation could have influenced cell metabolism, allowing the cells to produce a higher concentration of phenolic compounds relative to the other media. Moreover, given that the T2 medium was also supplemented with glutamine, but it did not contain hydrolyzed casein, this could also suggest that both the source and the nitrogen concentration were relevant for influencing phenolic secondary metabolites in this species. Further studies will be required for determining the effect of nitrogen supplementation in phenolic compounds production from blackberry (*R. adenotrichos*) cell suspensions. Of note, total polyphenols were below the limit of detection in T2, and it had the second to lowest vanillin and

gallic acid concentrations (125.7 and 9 times lower than T4, respectively). Given that the DPPH method for quantifying antioxidant activity can also react to amino acids and considering the high glutamine content in T2 (10 times higher than in T4), this could also suggest that the relatively high antioxidant activity observed in T2 was either an artifact or an interference in the DPPH method.

Also relevant, the $\frac{1}{2}$ MS medium (T6) had the largest biomass production (up to 13.7 times higher FW relative to the other media); however, it showed one of the lowest yields in polyphenol content and antioxidant activity (Table 4). Therefore, no significant correlation could be observed between biomass, polyphenol content and antioxidant activity in relation to the culture media; nonetheless, it is clear that the Gamborg medium yielded over an order of magnitude more polyphenols with relevant antioxidant activity than the other treatments.

DW, dry weight; FW, fresh weight; GAE, gallic acid equivalents; TE, Trolox equivalents. Different letters show significant differences between treatments (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

Table 4 Effect of six different culture media ($n=3$) on biomass, polyphenol production, and antioxidant capacity (mean \pm SD) from blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino) cell suspensions

Culture media	FW (g/L)	DW (g/L)	Polyphenols (mg GAE/g DW)	DPPH (μ mol TE/g DW)	Vanillin (mg/g DW)	Ellagic acid (mg/g DW)
T1	12.293 \pm 14.593 b	1.953 \pm 1.214 a	0.021 \pm 0.032 b	1.670 \pm 0.056 b	0.053 \pm 0.046 b	0.048 \pm 0.045 ab
T2	9.173 \pm 2.394 b	1.247 \pm 0.508 a	ND	3.297 \pm 0.443 a	0.019 \pm 0.023 b	0.015 \pm 0.015 b
T3	19.853 \pm 20.903 b	2.280 \pm 2.188 a	0.095 \pm 0.107 ab	1.997 \pm 0.518 b	0.031 \pm 0.012 b	0.021 \pm 0.005 ab
T4	19.213 \pm 4.210 b	1.307 \pm 0.329 a	0.313 \pm 0.218 a	3.637 \pm 0.325 a	2.389 \pm 0.584 a	0.135 \pm 0.070 a
T5	19.380 \pm 2.090 b	7.200 \pm 10.583 a	0.016 \pm 0.021 b	0.570 \pm 0.055 c	0.208 \pm 0.040 b	0.002 \pm 0.000 b
T6	125.747 \pm 19.821 a	8.633 \pm 0.976 a	0.019 \pm 0.018 b	0.700 \pm 0.181 c	0.009 \pm 0.001 b	0.005 \pm 0.004 b

Tropical highland blackberries (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino) have previously shown high antioxidant content with bioactive potential. Acosta-Montoya et al. (2010) reported that the highest ellagic acid concentrations were found in blackberry fruits at immature stages (up to 35.0 mg GAE/g DW relative to 0.3 mg GAE/g DW in ripe fruits). Meanwhile, Calvo-Castro et al. (2013) reported up to 2545.37 mg GAE/L in concentrated blackberry juice, and Araya et al. (2017) obtained up to 25.3 mg GAE/g DW in their analysis of total polyphenols of three different blackberry (*Rubus adenotrichos*) varieties grown in Costa Rica. Moreover, preliminary studies from our laboratory (Schmidt-Durán et al. 2016) reported a concentration of 0.0256 mg GAE/g FW from a blackberry cell suspension (0.512 mg GAE/g DW).

In this study, recovery of total polyphenols from blackberry cell suspensions grown in T4 medium was comparable to those obtained by Schmidt-Durán et al. (2016) from blackberry calli (0.0256 mg GAE/g FW; 0.512 mg GAE/g DW), but considerable lower than the results reported by Calvo-Castro et al. (2013) and Araya et al. (2017). However, it is important to highlight that those studies were performed from ultra-concentrated juice and fresh fruit (respectively), and not from cell suspensions, as it is the focus of the current research. In contrast, the cell suspensions grown in T4 had ten times higher total polyphenol concentrations, two times higher catechin content (relative to vanillin), and ten times lower ellagic acid than those reported by Krauze-Baranowska et al. (2014) from *Rubus idaeus* sprouts using HPLC (0.72 mg/g DW gallic acid, 1.29 mg/g DW catechin, 11.52 mg/g DW ellagic acid). Nonetheless, differences between reports may also be subject to different extraction and analytical methods, as well as the source material (genetics, plant tissue, ripeness, culture system, and growth conditions).

Conclusions

Methanol at 100% from freeze-dried samples was the best extraction methods for recovering polyphenols from in vitro cultured blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) calli.

Additionally, the type of flask closure used in the blackberry cell suspension cultures led to changes in biomass production and cell viability concentrations, but not in polyphenol concentration. Finally, the Gamborg medium supplemented with auxins, cytokinin and organic sources of nitrogen, led to a considerable increase in the concentration of total polyphenols, antioxidant capacity, and vanillin and ellagic acid concentrations. Considering that several authors have confirmed that blackberry (*Rubus adenotrichos*) contains a large quantity of ellagitannins and high antioxidant capacity (Acosta-Montoya et al. 2010; González et al. 2012) with beneficial effects in vitro and in vivo (Calvo-Castro et al. 2013; Azofeifa et al. 2013, 2016; Madrigal-Gamboa et al. 2021), the implementation and optimization of biotechnological techniques such as blackberry calli and cell suspensions to produce those compounds is a relevant strategy for enhancing the concentration of metabolites in cell suspension systems, aiming towards their eventual production at a bioreactor scale.

Author contributions All authors contributed to the study's conception and design. The preparation of material, assay execution and the data analysis were performed by Alexander Schmidt-Durán. Carlos Alvarado-Ulloa maintained the calli and the cellular suspensions, Laura A. Calvo-Castro performed the UHPLC-DAD analysis. Oscar Acosta-Montoya and Mario Rodríguez-Monroy provided counseling throughout the research. The first draft of the manuscript was written by Alexander Schmidt-Durán and Laura A. Calvo-Castro, and all authors read and approved the final manuscript.

Funding This work was funded by Instituto Tecnológico de Costa Rica (Project 1510121).

Data Availability The data are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of interest The authors have no financial or non-financial interests to disclose.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Acosta-Montoya O, Vaillant F, Cozzano S et al (2010) Phenolic content and antioxidant capacity of tropical Highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schldl.) During three edible maturity stages. *Food Chem* 119:1497–1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032>
- Araya M, Carvajal Y, Alvarez V et al (2017) Polyphenol characterization of three varieties of Blackberry fruits (*Rubus adenotrichos*), cultivated in Costa Rica. *J Berry Res* 7:97–107. <https://doi.org/10.3233/JBR-170150>
- Azofeifa G, Quesada S, Boudard F et al (2013) Antioxidant and anti-inflammatory *in vitro* activities of phenolic compounds from Tropical Highland blackberry (*Rubus adenotrichos*). *J Agric Food Chem* 61:5798–5804. <https://doi.org/10.1021/jf400781m>
- Azofeifa G, Quesada S, Navarro L et al (2016) Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Funct Foods* 26:330–337. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.007>
- Bhojwani SS, Dantu PK (2013) Tissue and cell culture. In: Bhojwani SS, Dantu PK (eds) *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer, India, pp 39–50. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_4
- Calvo-Castro L, Syed DN, Chamcheu JC et al (2013) Protective effect of Tropical Highland Blackberry Juice (*Rubus adenotrichos* Schldl.) Against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in reconstituted skin equivalent model. *Photochem Photobiol* 89:1199–1207. <https://doi.org/10.1111/php.12104>
- Capataz-Tafur J, Hernandez-Sanchez AM, Rodriguez-Monroy M et al (2010) Sucrose induces arabinogalactan protein secretion by *Beta vulgaris* L. *Cell Suspension Cultures Acta Physiologiae Plantarum* 32(4):757–764. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0460-7>
- Carvajal C (2019) Especies reactivas de oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina legal de Costa Rica* 36(1):91–100. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&nrm=iso. Accessed 28 November 2022
- Deepthi S, Satheshkumar K (2017) Cell line selection combined with jasmonic acid elicitation enhance camptothecin production in cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(2):545–558. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7808-x>
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gancel AL, Feneuil A, Acosta O et al (2011) Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Res Int* 44:2243–2251. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.013>
- González E, Vaillant F, Pérez A et al (2012) *In vitro* cell-mediated antioxidant protection of human erythrocytes by some common tropical fruits. *J Nutr Food Sci* 2(3):1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000139>
- Islam MM, Shekhar H (2015) Impact of oxidative stress in human health. In: Rani V, Yadav UCS (eds) *Free radicals in Human Health and Disease*. Springer, India, pp 59–73. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0_5
- Karwasara V, Dixit V (2013) Culture medium optimization for camptothecin production in cell suspension cultures of *Nothapodytes nimmoniana* (J. Grah.) Mabblerley. *Plant Biotechnol Rep* 7(3):357–369. <https://doi.org/10.1007/s11816-012-0270-z>
- Khanpour-Ardestani N, Sharifi M, Behmanesh M (2015) Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss.: an *in vitro* approach for acetoside production. *Cytotechnology* 67(3):475–485. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9705-4>
- Krauze-Baranowska M, Glód D, Kula M et al (2014) Chemical composition and biological activity of *Rubus idaeus* shoots – a traditional herbal remedy of Eastern Europe. *BMC Complement Altern Med* 14:480. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-480>
- Kumar A (2015) Improving secondary Metabolite production in tissue cultures. In: Bahadur B et al (eds) *Plant Biology and Biotechnology: Volumen II: Plant Genomics and Biotechnology*. Springer, India, pp 397–406. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_20
- Madrigal-Gamboa V, Jiménez-Arias J, Hidalgo O et al (2021) Membrane processing of blackberry (*Rubus adenotrichos*) on cytotoxic and pro-apoptotic activities against cancer cell lines. *J Food Process Preserv* 12. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15575>
- Makkar HP (2003) Measurement of total phenolics and tannins using Folin-Ciocalteu Method. In: Makkar HP (ed) *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. Springer, Dordrecht, pp 49–51. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7_3
- Mandelker L (2011) Oxidative stress, free radicals, and cellular damage. In: Mandelker L, Vajdovich P (eds) *Studies on Veterinary Medicine*. Springer, United States, pp 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-071-3_1
- Mehla N, Sindhi V, Josula D et al (2017) An introduction to Antioxidants and their roles in plant stress tolerance. In: Khan M, Iqbal R, Khan N (eds) *Reactive oxygen species and antioxidant. Systems in plants: role and regulation under abiotic stress*. Springer, Malaysia, pp 1–23. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_1
- Mertz C, Cheymier V, Gunata Z et al (2007) Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J Agricultural Food Chem* 55(21):8616–8624. <https://doi.org/10.1021/jf071475d>
- Mertz C, Gancel AL, Gunata Z et al (2009) Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *J Food Compos Anal* 22:381–387. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.008>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nikakhtari H, Hill GA (2006) Closure effects on oxygen transfer and aerobic growth in shake flasks. *Biotechnol Bioeng* 95(1):15–21. <https://doi.org/10.1002/bit.20930>
- Orozco-Sánchez F, Sepúlveda-Jiménez G, Trejo-Tapia G et al (2011) Oxygen limitations to grow *Azadirachta indica* cell culture in shake flasks. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10(3):343–352. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000300001&lng=es&nrm=iso. Accessed 28 November 2022
- Peñarrieta JM, Alvarado JA, Åkesson B, Bergenstål B (2007) Separation of phenolic compounds from foods by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Revista Boliviana de Química* 24(1):1–4. <http://www.scielo.org.bo/pdf/rbqv/24n1/v24n1a01.pdf>. Accessed 28 November 2022
- Pilar-Rojas J, Martínez JR, Stashenko EE (2014) Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora (*Rubus glaucus* Benth) obtenidos bajo diferentes condiciones. *Revista VITAE* 21(3):218–227. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/vitae/article/view/18852/17941>. Accessed 28 November 2022
- Rani D, Vimolmangkang S (2022) Trends in the biotechnology production of isoflavonoids in plant cell suspension cultures. *Phytochem Rev*. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09811-6>
- Reyes-Díaz JJ, Arzate-Fernández AM, Piña-Escutia JL (2018) Sucrose and organic nitrogen sources have an influence in *Agave angustifolia* somatic embryogenesis. *Revista Mexicana de Ciencias*

- Agrícolas 9(7):1508–1513. <https://doi.org/10.29312/remexa.v9i7.1676>
- Sahraroo A, Mirjalili MH, Corchete P et al (2016) Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: a new in vitro source of rosmarinic acid. *Cytotechnology* 68:1415–1424. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9901-x>
- Schmidt-Durán A, Alvarado-Ulloa C, Chacón-Cerdas R et al (2016) Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schldl.) And its microscopic analysis. *Springer Plus* 5:1717–1725. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3381-0>
- Schulz R, Di Lisa F (2016) Oxidative stress and nitrosative stress. In: Schlüter KD (ed) *Cardiomyocytes-active players in Cardiac Disease*. Springer, Switzerland, pp 267–278. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31251-4_10
- Sivanandhan G, Arun M, Mayavan S et al (2012) Optimization of elicitation conditions with methyl jasmonate and salicylic acid to improve the productivity of withanolides in the adventitious root culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Appl Biochem Biotechnol* 168(3):681–696. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9809-2>
- Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv Biochem Engin Biotechnol* 111:181–228. https://doi.org/10.1007/10_2008_103
- Sudhakar V, Fukui T (2014) Antioxidant supplementation and therapies. In: Tsukahara H, Kaneko K (eds) *Studies on Pediatric Disorders. Oxidative stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Springer, United States, pp 183–209. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0679-6_11
- Vijayalaxmi S, Jayalaxmi SK, Sreeramulu K (2014) Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *J Food Sci Technol* 52(5):2761–2769. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1295-9>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

6. Artículo 3

Cultivo de células y producción de compuestos polifenólicos de *Rubus adenotrichos* Schldl. en un biorreactor de tanque agitado

Plant cell culture and production of polyphenolic compounds of *Rubus adenotrichos* Schldl. in a stirred tank bioreactor

Alexander Schmidt-Durán^{1,2}, Laura A. Calvo-Castro², Oscar Acosta-Montoya³, Mario Rodríguez-Monroy⁴.

¹ Doctorado en Ciencia Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica. Autor de correspondencia: aschmidt@itcr.ac.cr. ORCID: 0000-0002-1061-6840.

² Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. ORCID: 0000-0001-5101-9105

³ Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. ORCID: 0000-0001-8156-6556.

⁴ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. ORCID: 0000-0001-6201-7594.

Resumen

Rubus adenotrichos Schldl tiene un alto contenido de compuestos polifenólicos con propiedades antioxidantes; sin embargo, la obtención de éstos a partir de los frutos presenta limitaciones. Los cultivos celulares en biorreactores de tanque agitado (STR) son una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios de plantas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una propela marina y de una turbina Rushton en el cultivo células de *R. adenotrichos* y la producción de ácido gálico, vanillina y ácido elágico, utilizando un STR. Se observó que la propela marina favorece el crecimiento del cultivo, pero no la acumulación de los compuestos polifenólicos. Mientras que con la turbina Rushton, el crecimiento del cultivo fue limitado, pero se favoreció la producción de los metabolitos de interés. El efecto de la disminución en el crecimiento del cultivo y del aumento en el contenido de los metabolitos especializados, puede asociarse con tamaños de *eddys* menores producidos por la turbina Rushton, lo que provoca la activación de mecanismos letales y subletales en las células vegetales por causa del estrés hidrodinámico. Adicionalmente, se comprobó que existe una degradación térmica diferencial para cada uno de

los compuestos que fueron sometidos a procesos de concentración a diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

Palabras claves

Mora, *Rubus adenotrichos*, biorreactor de tanque agitado, impulsor, polifenoles, estrés hidrodinámico.

Abstract

Rubus adenotrichos Schltl. has a high content of polyphenolic compounds with antioxidant properties; however, there are several limitations from obtaining polyphenols from the plant. Cell cultures on stirred tank reactors (STR) are an alternative for obtaining plant secondary metabolites. The aim of this research was to evaluate the effect of a marine propeller and a Rushton turbine in the cell culture of *R. adenotrichos* and the production of gallic acid, vanillin and ellagic acid, using a STR. It was observed that the marine propeller favored the growth of the cell culture, but not the accumulation of the polyphenolic compounds. While with the Rushton turbine, the growth of the cell culture was limited but the production of the metabolites of interest was favored. The resulting decrease in the growth of plant cell culture and the increase in the content of specialized metabolites can be associated with smaller sized eddies produced by the Rushton turbine, which generate hydrodynamic stress to the cells, and consequently activates lethal and sublethal mechanisms in plant cells. Additionally, it was found that there is a differential thermal degradation for each of the compounds that were subjected to concentration processes at different temperatures and exposure times.

Key words

Blackberry, *Rubus adenotrichos*, stirred tank reactor, impeller, polyphenols, hydrodynamic stress.

Introducción

Las plantas producen más de 30 000 tipos de metabolitos especializados, incluidos productos farmacéuticos, aromas, pigmentos, cosméticos, nutracéuticos y otros (Sharma y Sahzad, 2013). Sin embargo, la producción de estos compuestos es inferior al 1% del peso fresco y depende de la fisiología de la planta, estado de desarrollo y de las condiciones medioambientales (Ebrahimi y Mokhtari, 2017; Smetanska 2008). Debido a lo anterior, el cultivo de células vegetales es

considerado como una alternativa biotecnológica para la producción de compuestos naturales provenientes de plantas (Li et al. 2016; Sharma y Sahzad, 2013; Karuppusamy, 2009).

Los cultivos de células vegetales presentan ventajas con relación a la obtención de plantas crecidas en campo, incluyendo la seguridad de contaminación, la producción estandarizada, la rapidez y la trazabilidad de los metabolitos (Amini et al. 2022). Sin embargo, presentan desventajas como la baja acumulación de los metabolitos en las células bajo condiciones *in vitro* (Amini et al. 2022), la tasa de crecimiento lento de las células y las diferencias entre los metabolomas del tejido original en toda la planta con las células y tejidos cultivados *in vitro* (Ebrahimi y Mokhtari, 2017).

Los biorreactores utilizados para crecer microorganismos se han adaptado para el crecimiento de cultivos celulares de plantas y la producción a gran escala de metabolitos secundarios. La transferencia de los cultivos desde los matraces Erlenmeyers a un biorreactor es un paso crítico y esencial para la comercialización de productos basado en cultivos celulares. Los biorreactores permiten tener un monitoreo y control de parámetros críticos para el crecimiento de las células, como lo es el pH, la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura, la agitación y el dióxido de carbono, siendo posible determinar las condiciones más favorables para el crecimiento celular y la producción de compuestos (Ahmadi-Sakha et al. 2016; Chen et al. 2007), logrando que los cultivos celulares en biorreactor presenten homogeneidad, rendimientos reproducibles y permitan aumentar el volumen de trabajo (Sharma y Sahzad, 2013).

Uno de los biorreactores más utilizados es el biorreactor de tanque agitado (STR) (Amini et al. 2022; Sharma y Sahzad, 2013). Este biorreactor ofrece muchas ventajas al cultivo de células vegetales, ya que permite agregados celulares más pequeños, mejora la homogenización de medio y puede evitar la formación de espuma (Amini et al. 2022). Sin embargo, durante el cultivo celular en biorreactor, la acumulación de compuestos bioactivos se ve afectada por varios factores, como la eficiencia de la transferencia de oxígeno, las fuerzas de corte, las fuerzas hidrodinámicas y el entorno fisicoquímico (Li et al. 2016).

La agitación en STR se realiza por un impulsor que mezcla el medio de cultivo (Ruffoni et al. 2010) el cual puede generar diferentes grados de estrés hidrodinámico en las células (Amini et al. 2022). El estrés hidrodinámico produce daños letales o subletales en las células vegetales dependiendo de la intensidad y de la duración del estrés, afectando la concentración de los metabolitos especializados de interés (Busto et al. 2008).

La mora es una fruta con un alto contenido de compuestos polifenólicos que incluyen a los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lignanos y estilbenos (Cheng et al. 2017). La mora tropical

de altura (*Rubus adenotrichos* Schldl.) presenta un alto contenido de elagitaninos (Acosta-Montoya et al. 2010; Araya et al. 2017; Soto et al. 2019; Montero et al. 2022). Los metabolitos especializados de *R. adenotrichos* podrían tener un uso farmacéutico, alimentario y nutracéutico con un alto potencial benéfico para la salud (Azofeifa et al. 2011; Azofeifa et al. 2013; Calvo-Castro et al. 2013; Garcia-Muñoz et al. 2014; Azofeifa et al. 2016, Quesada-Morúa et al. 2020; Madrigal-Gamboa et al. 2021), sin embargo, ha habido pocos reportes de la producción de los compuestos de interés en la mora (*R. adenotrichos*) mediante cultivos celulares en biorreactor. Nuestro grupo de investigación previamente reportó el establecimiento de cultivos de células de *R. adenotrichos* en matraces agitados, los cuales produjeron compuestos fenólicos con actividad antioxidante (Schmidt-Durán et al. 2022), por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar, en un biorreactor STR, el efecto de una propela marina y de una turbina Rushton, para el cultivo células de *R. adenotrichos* y la producción de compuestos polifenólicos, así como el efecto de la concentración térmica en la obtención de los metabolitos especializados producidos en biorreactor.

Metodología

Establecimiento de cultivos en suspensión de *R. adenotrichos*

Se siguió la metodología descrita por Schmidt et al. (2016) a partir de plantas en vivero de *R. adenotrichos* pretratadas con agroquímicos. Se colectaron hojas que fueron usadas para inducir callos. Las hojas se lavaron con agua y jabón. Luego, se realizó una doble desinfección con NaOCl al 1.0% i.a por 8 min y al 0.5% i.a por 10 min. Las hojas se colocaron en una solución de ácido ascórbico (1.0 g L^{-1}) por 10 min y posteriormente la cara abaxial del segmento foliar se puso en un medio de cultivo Murashige and Skoog (1962) conteniendo ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (1.5 mg L^{-1}). Después de 60 días, los callos formados fueron propagados utilizando el mismo medio de cultivo.

Para el establecimiento de los cultivos en suspensión, se sembraron callos friables (4.0 g de peso fresco) en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio de cultivo Gamborg (1968) suplementado con ácido indol-3-butírico (IBA) (1.0 mg L^{-1}), 6-bencil aminopurina (BA) (5.0 mg L^{-1}), L-glutamina (20 mg L^{-1}) y caseína hidrolizada (200 mg L^{-1}). Los cultivos se incubaron en una agitación rotatoria a 75 rpm, a una temperatura de $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad, durante 15 días. Los cultivos fueron transferidos después de 15 días a matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL del medio Gamborg descrito anteriormente. Los agregados más grandes fueron

decantados para obtener las suspensiones celulares finas de acuerdo con la metodología descrita por Schmidt et al. (2022).

Cinética de crecimiento de cultivos celulares de *R. adenotrichos* en biorreactor

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de los cultivos de *R. adenotrichos* en un biorreactor STR empleando una turbina Rushton de seis paletas con una relación de 0.354 al diámetro del tanque y una propela marina de cuatro paletas, con una relación de 0.331 al diámetro del tanque. Se utilizó un biorreactor de 2 L (Applikon®) con un volumen de trabajo de 1 L. El biorreactor se inoculó con cultivos celulares de *R. adenotrichos* al 20% v/v. El STR se aireó con un difusor de seis orificios empleando 0.25 vvm, la agitación se fijó a 150 rpm, con un pH inicial de 5.7. Cada 2-3 días se tomó una muestra de 50 mL del biorreactor, para determinar el crecimiento celular mediante peso fresco (PF) y peso seco (PS). Se realizaron dos repeticiones por tratamiento.

Los datos fueron procesados para realizar una comparación de los parámetros cinéticos del cultivo con ambos impulsores: crecimiento máximo (BM), índice de crecimiento (GI), velocidad de crecimiento (μ), concentración máxima de los metabolitos especializados (P_{max}), contenido de los metabolitos especializados por unidad de biomasa ($Y_{p/x}$), productividad volumétrica de los metabolitos especializados (Q_p) y velocidad específica de formación de los metabolitos especializados (q_p) (Vasquez-Marquez et al., 2019). Adicionalmente, se calculó la longitud de un remolino (*eddy*) (l) mediante el modelo de Kolgomorov (1941), utilizando la ecuación:

$$l = \left[\frac{(\mu/\rho)^3}{Pm} \right]^{1/4}$$

donde μ es la viscosidad dinámica del líquido, ρ es la densidad del líquido y Pm es la potencia aplicada al sistema por unidad de masa del fluido. El cálculo de la potencia que entra al sistema se determinó mediante la fórmula de potencia en un sistema no gaseado (P_o), utilizando la ecuación:

$$P_o = N_p * \rho * N^3 * Di^5$$

donde N_p es el número de potencia, N es la velocidad de agitación y Di es el diámetro del impulsor. Posteriormente, se relacionó la potencia no gaseada con la potencia gaseada utilizando la ecuación propuesta por Hughmark (1980):

$$\frac{P_g}{P_o} = 0,10 \left(\frac{F_g}{N V} \right)^{-(1/4)} * \left(\frac{N^2 D_i^4}{g W_i V^{2/3}} \right)^{-(1/5)}$$

donde P_g es la potencia gaseada, F_g es el caudal volumétrico de gas, V es el volumen del líquido, D_i es el diámetro del impulsor, g es la aceleración gravitacional y W_i es el ancho de la paleta del impulsor.

Determinación de polifenoles mediante HPLC

Siguiendo la metodología de Schmidt-Durán et al. (2022) se realizó la determinación del contenido de ácido gálico (AG), vanillina (VA), y ácido elágico (AE). Una muestra de 25 mL del cultivo crecido en el biorreactor, de cada punto de la cinética, fue liofilizada. Se realizó la extracción utilizando metanol al 100% $v v^{-1}$ en agua (1:10 peso seco:solvente) en un ultrasonicador (Qsonica®) a 100 micrones de amplitud por 1 min en baño de hielo, centrifugando a 7500 rpm durante 5 min y recolectando el sobrenadante obtenido. Se realizaron tres extracciones con cada una de las muestras. La solución obtenida se evaporó hasta sequedad en un rotavapor al vacío a 35° C (Buchi®). Las muestras se resuspendieron en 2 mL de metanol al 100% y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

El contenido de ácido gálico, vanillina y ácido elágico fue determinado utilizando un UHPLC-DAD Shimadzu Nexera XTS (SCL-40, DGU-405, LC-10D XR, SIL-40 C XR, CTO- 40 S, SPD-M40) con una columna de sílica XR-ODS (100 × 3 mm, 2.2 μm tamaño de partícula) a 35 °C y una inyección de muestra de 20 μL . La fase móvil A consistió en agua desionizada con 1% de ácido fórmico y la fase móvil B fue metanol. El gradiente utilizado fue: 2 min 5% B, 6 min 2-50% B, 3 min 50% B, 1 min 50-95% B y 2 min 95% B; con un flujo de 0.1 mL min^{-1} . Se analizó la elución a 271 nm y las muestras fueron cuantificadas mediante curvas estándar de ácido gálico ($y = 134531695.24x$; $r^2 = 0.9835$), vanillina ($y = 170165775x$; $r^2 = 0.9998$) y ácido elágico ($y = 30277302.48x$; $r^2 = 0.9989$). El análisis se realizó por duplicado.

Concentración térmica de los polifenoles

La biomasa sobrante de las fermentaciones fue recolectada y extraída siguiendo la metodología anteriormente mencionada, pero utilizando como solvente extractor una solución al 96% $v v^{-1}$ de etanol en agua. El extracto obtenido fue cuantificado mediante UHPLC en la concentración de ácido gálico, vanillina y ácido elágico. Posteriormente, se realizó una concentración térmica, para

esto, 50 mL del extracto fue evaporado en un rotavapor (Buchi®) hasta sequedad y se resuspendió la muestra en 1 mL de etanol al 96% vv⁻¹. Se utilizaron cuatro temperaturas de evaporación: 35, 45, 55 y 65 °C y se determinó el tiempo que tardó cada muestra en llegar a sequedad, siendo este el tratamiento a evaluar (Cuadro 1). Luego cada muestra se resuspendió en 2 mL de metanol y se analizó mediante UHPLC. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se realizó un Análisis de Varianza y una prueba de Tukey para cada metabolito evaluado utilizando el programa estadístico Minitab®.

Cuadro 1. Tratamientos empleados para concentrar los metabolitos obtenidos de los cultivos celulares en biorreactor de *R. adenotrichos*.

Tratamiento	Condición	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Control	-	-
1	35	51,24 ± 2,56
2	45	18,44 ± 0,62
3	55	10,84 ± 0,34
4	65	7,93 ± 0,13

Resultados y discusión

Siguiendo la metodología reportada previamente (Schmidt-Duran et al. 2016; Schmidt-Durán et al. 2022) se obtuvieron callos y cultivos celulares finos de *R. adenotrichos*, que fueron utilizadas para la preparación de los inóculos requeridos para el STR.

En ensayos previos (datos no publicados), se había observado que las células de *R. adenotrichos* en matraz presentaban baja viabilidad al aumentar la velocidad de agitación, por lo que se decidió establecer una agitación constante (150 rpm) capaz de mantener suspendidas a las células dentro del STR.

Los resultados del crecimiento de los cultivos de *R. adenotrichos* en el STR con la propela marina y la turbina Rushton se muestran en la Figura 1. Con la propela marina, el cultivo creció a una velocidad de crecimiento 0.124 días⁻¹, alcanzando un crecimiento de 2.32 g_{PS} L⁻¹ (33.02 g_{PF} L⁻¹) a los 14 días de cultivo. Mientras que con la turbina Rushton, el cultivo creció a una velocidad de crecimiento de 0.101 días⁻¹ alcanzando una biomasa de 1.68 g_{PS} L⁻¹ (24.56 g_{PF} L⁻¹) en 14 días de

crecimiento. El crecimiento del cultivo de *R. adenotrichos* en el STR fue de un 70% mayor para la propela marina, y de un 26% mayor para la turbina Rushton que lo reportado previamente para los cultivos en matraces Erlenmeyer (Schmidt-Durán et al. 2022).

Verna et al. (2013) mencionan que los cultivos de células de plantas crecen mejor con una turbina Rushton en cultivos de tanque agitado debido a que proporcionan un flujo radial en la dispersión de células, con suficiente transferencia de masa de oxígeno y un esfuerzo cortante mínimo, como se observó en el crecimiento de células de *Catharanthus roseus* (L). Sin embargo, Zhong et al. (1994) determinó que la velocidad en la punta del impulsor y el tamaño del impulsor afectan la biomasa, viabilidad celular y la producción de antocianina en *Perilla frutescens*. Asimismo, Arias et al. (2021) determinó que diferentes velocidades de agitación provocan respuestas diferenciales en el índice de crecimiento y el rendimiento de la biomasa sobre el sustrato de *Thevetia peruviana*.

El estudio de los impulsores que pueden ser utilizados para el cultivo de células vegetales, cobra importancia para cada especie que se desea cultivar en STR, debido a que existen diferencias entre las células de las especies vegetales (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007). La agitación y el impulsor afectan el mezclado del biorreactor, que interviene en los requerimientos de transferencia de masa; pero también se relaciona con el daño potencial que pueden tener las fuerzas hidrodinámicas en el crecimiento del cultivo (Georgiev et al., 2013), generando diferentes tasas de crecimiento en los cultivos vegetales, como se observó en los resultados obtenidos por Arias et al. (2021), Verna et al. (2013) y Zhong et al. (1994).

Esto ocurre ya que las células de plantas son más grandes y sensibles a la agitación que microorganismos como las bacterias (Georgiev et al., 2013) siendo más afectadas por las condiciones de estrés hidrodinámico que se presentan en los STR. La sensibilidad de este tipo de células se le atribuye a que presentan una pared rígida de celulosa y muchas veces contienen vacuolas que pueden alcanzar hasta el 95% del volumen de la célula (Zhong et al. 1994). En este trabajo para el cultivo de células de *R. adenotrichos*, observamos que la propela marina, que presenta un patrón de flujo axial, favorece más la velocidad de crecimiento y el crecimiento de las células, que la turbina Rushton, la cual presenta un patrón de flujo radial.

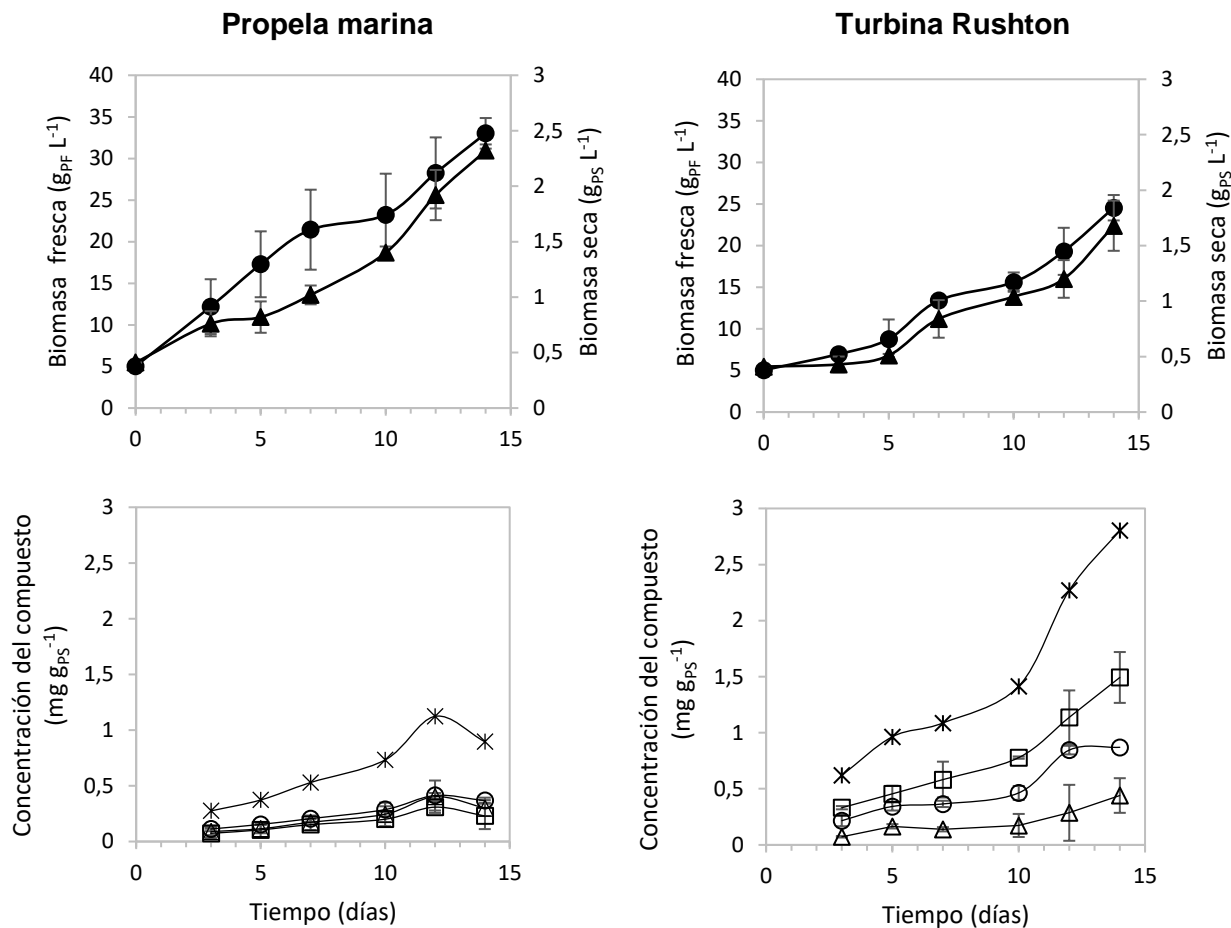


Figura 1. Cinética de crecimiento celular (peso fresco en círculos rellenos y peso seco en triángulos rellenos) de cultivos de *R. adenotrichos* y de producción de ácido gálico (círculos sin relleno), vanilina (cuadrados sin relleno), ácido elágico (triángulos sin relleno) y el total de los metabolitos especializados (asteriscos) en un biorreactor de tanque agitado con una propela marina y una turbina Rushton. n= 2.

Por otro lado, los resultados de producción de los metabolitos de interés de los cultivos de *R. adenotrichos* determinaron que el uso de la turbina Rushton produjo un 69% más ácido gálico y casi un 300% más de vanilina que la propela marina (Figura 1). El rendimiento, la productividad y la velocidad de formación de producto también fueron superiores para la turbina Rushton (Cuadro 2). Con respecto a la concentración de ácido elágico, la propela marina generó valores de producción mayores a la turbina Rushton; sin embargo, el pico de producción de los metabolitos para la propela marina se dio a los 12 días (Figura 1), observando después un

descenso en la concentración de estos, a pesar del aumento de la biomasa. No obstante, con la turbina Rushton, se obtuvo un aumento gradual de la concentración de los metabolitos hasta el día 14, en el cual no se pudo observar el pico de producción máximo, siendo posible que este se alcance en días posteriores a los evaluados en el estudio.

El contenido de vanillina obtenido en los cultivos de *R. adenotrichos* en el STR con la turbina Rushton, fueron 5 veces mayores a los obtenidos en matraz Erlenmeyer; sin embargo, no se observó un aumento en la concentración de ácido eláxico y ácido gálico en el STR, comparado a los resultados obtenidos previamente (Schmidt-Durán et al. 2022).

Cuadro 2. Parámetros cinéticos del crecimiento celular y producción de algunos compuestos especializados de *R. adenotrichos* en tanque agitado bajo dos impulsores distintos. n= 2.

Parámetros	Impulsor	
	Propela marina	Turbina Rushton
Peso seco máximo BM (g L ⁻¹)	2.32	1.68
Índice de crecimiento GI	4.658	3.097
Velocidad de crecimiento μ (días ⁻¹)	0.124	0.101
Contenido máximo de ácido gálico P _{maxAG} (mg L ⁻¹)	0.216	0.364
Rendimiento de ácido gálico sobre biomasa Y _{pAG/x} (mg g _{PS} ⁻¹)	0.137	0.286
Productividad volumétrica del ácido gálico Q _{pAG} (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	0.018	0.026
Productividad específica del ácido gálico q _{pAG} (mg g _{PS} ⁻¹ día ⁻¹)	0.009	0.015
Contenido máximo de vanillina P _{maxVA} (mg L ⁻¹)	0.141	0.557
Rendimiento de vanillina sobre biomasa Y _{pVA/x} (mg g _{PS} ⁻¹)	0.089	0.439
Productividad volumétrica de vanillina Q _{pVA} (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	0.012	0.040
Productividad específica de vanillina q _{pVA} (mg g _{PS} ⁻¹ día ⁻¹)	0.006	0.024

Contenido máximo de ácido elágico $P_{\max AE} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	0.171	0.122
Rendimiento del ácido elágico sobre la biomasa $Y_{pAE/x} \text{ (mg g}_{PS}^{-1}\text{)}$	0.108	0.096
Productividad volumétrica del ácido elágico $Q_{pAE} \text{ (mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}\text{)}$	0.014	0.009
Productividad específica del ácido elágico $q_{pAE} \text{ (mg g}_{PS}^{-1} \text{ día}^{-1}\text{)}$	0.007	0.005

El estrés hidrodinámico puede provocar daños letales, lo que genera apoptosis y la lisis celular; o daños subletales, que incluyen alteraciones metabólicas en las células. Los daños subletales activan mecanismos de respuesta al estrés en las células vegetales, como lo es la defensa al estrés oxidativo, lo que genera la producción de diversos metabolitos (Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006).

Para comparar el efecto de la turbina Rushton, contra el impulsor de propela marina en la producción de biomasa y de acumulación de metabolitos de interés en cultivos celulares de *R. adenotrichos*, se calcularon los valores de la longitud de escala de un remolino (*eddy*), de acuerdo con la teoría de la turbulencia isotrópica de Kolgomoroff (1941). De acuerdo con la teoría, la agitación de un impulsor en un biorreactor de tanque agitado provoca que se genere remolinos de diferentes tamaños en el fluido (Busto et al. 2013; Busto et al. 2008; Landau y Lifshitz 1987). Cuando el tamaño del remolino es mayor al de una célula, ésta no debería verse afectada por el estrés hidrodinámico; sin embargo, cuando la longitud del remolino se acerca al tamaño de la célula, esta puede empezar a sufrir problemas por la agitación (Busto et al. 2008).

De acuerdo con las dimensiones del biorreactor y las características del medio de cultivo (Cuadro 3), se determinó que el *eddy* del cultivo celular utilizando la turbina Rushton fue de $l=0.087$ mm, mientras que con el impulsor de propela marina fue de $l= 0.187$ mm, teniendo una diferencia de un orden de magnitud. Una célula vegetal tiene un tamaño aproximado entre 0.04 a 0.1 mm y presenta una tendencia a formar agregados de mayor tamaño (Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006; Zhong et al. 1994), por lo que los tamaños de *eddy* calculados con la turbina Rushton se ubican dentro del tamaño de una célula vegetal, haciendo que esta sea afectada por el estrés hidrodinámico generado por el impulsor.

Esto puede explicar la disminución en la concentración de la biomasa (Figura 1), tanto para el peso seco como para el peso fresco, debido a los efectos letales. Sin embargo, este mismo

fenómeno, puede provocar un aumento en la concentración de metabolitos secundarios, cuando se activa los mecanismos de defensa producto de los efectos subletales.

Vasquez-Marquez et al. (2019) obtuvieron diferentes concentraciones de polifenoles, de acuerdo con la velocidad de agitación que probaron, denotando que la agitación afecta diferencialmente a cada polifenol que estudiaron. Asimismo, Busto et al. (2013) y Trejo-Tapia et al. (2007) concluyeron que, al aumentar el estrés hidrodinámico, obtuvieron mayor concentración de antraquinonas y alcaloides monoterpénicos en cultivos celulares de *Rubia tinctorum* y *Uncaria tomentosa*, respectivamente.

El cultivo de diferentes células en suspensión en sistemas agitados presenta una variabilidad en el grado de sensibilidad al estrés por la agitación, afectando la viabilidad celular, la lisis celular y la producción de metabolitos (Zhong et al. 1994) como se ha visto en otras investigaciones. En el estudio particular de *R. adenotrichos*, el aumento del estrés hidrodinámico provocado por el impulsor produjo un aumento en la concentración del ácido gálico y vanillina, no así del ácido elágico, pero al mismo tiempo, disminuyó la biomasa obtenida del cultivo celular.

Cuadro 3. Determinación de la longitud de escala *eddy* de un remolino en un biorreactor tipo tanque agitado con una propela marina y una turbina Rushton.

Variable	Propela marina	Turbina Rushton
Densidad ρ (kg m ⁻³)*	1005.84	1005.84
Viscosidad μ (kg m ⁻¹ s ⁻¹)**	0.00105	0.00105
Número de Potencia Np	0.35	6
Diámetro del Tanque D (m)	0.14	0.14
Ancho de la paleta W (m)	0.015	0.012
Longitud del <i>Eddy</i> l (mm)	0.187	0.087

* Se determinó mediante la medición del peso de 100 ml de medio en una balanza analítica. n= 3.

** Similar a la del agua.

Luego de la obtención de los compuestos de interés, se evaluó el efecto de un método térmico de concentración de compuestos, como es la evaporación por rotaevaporador. Así como se reportó en otras investigaciones, en este trabajo, la concentración de ácido gálico, ácido elágico y vanillina se vieron afectadas por el método de concentración térmica (Figura 2). Para el caso del ácido gálico, es posible obtener este metabolito utilizando incluso una temperatura de 45 °C (tratamiento 2), sin que sea vea afectado la concentración del compuesto recuperado

comparándolo con el control. Para la vanillina, esto es posible solo con el tratamiento 1, el cual no mostro diferencias significativas con el control. No obstante, el ácido eláxico si sufrió una disminución significativa respecto al control por el tratamiento térmico, en un rango de un 33-41% para los tratamientos 1, 2 y 3. En todos los casos, el tratamiento 4 (65 °C por un periodo de 7.93 min) produjo una variación significativa en la concentración de todos los compuestos evaluados comparados al control, disminuyendo en un 8% para el ácido gálico, un 85% para la vanillina y de un 84% para el ácido eláxico.

El aumento de la temperatura produce la degradación de compuestos metabólicos antioxidantes (Ling et al. 2022). En el caso de la mora (*R. adenotrichos*) se ha reportado una degradación térmica tanto de antocianinas (Cisse et al. 2009), como de elagitaninos (Gancel et al. 2011) en el jugo; mismo fenómeno que se logró observar con los metabolitos obtenidos a partir de cultivos celulares de *R. adenotrichos*. Sin embargo, se ha visto que la disminución en el contenido de los elagitaninos no ha provocado una disminución del efecto benéfico en pruebas *in vitro* (Azofeifa et al. 2015).

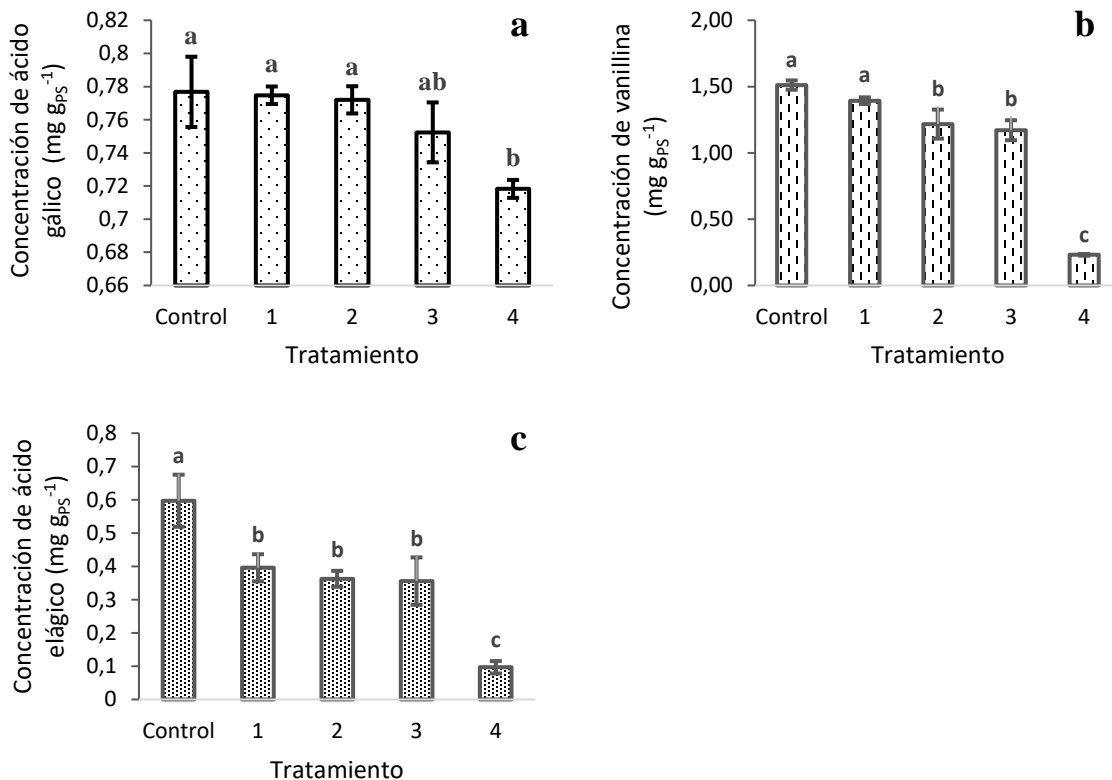


Figura 2. Concentración de ácido gálico (a), vanillina (b) y ácido eláxico (c) bajo diferentes temperaturas y tiempos de exposición térmica en el rotavapor. Tratamiento 1 (35 °C durante

51,24 min), tratamiento 2 (45 °C durante 18,44 min), tratamiento 3 (55 °C durante 10,84 min) y tratamiento 4 (65 °C durante 7,93 min). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada compuesto evaluado ($\alpha=0,05$). $n= 3$.

Conclusiones

El cultivo celular de *R. adenotrichos* en STR utilizando una turbina Rushton generó un crecimiento celular de la mitad al obtenido con la propela marina; sin embargo, este impulsor obtuvo un contenido de ácido gálico y vanillina de dos a tres veces mayor que el observado con la propela marina. El efecto de la disminución en el crecimiento del cultivo y del aumento en el contenido de los metabolitos especializados, puede asociarse con tamaños de *eddies* menores obtenidos con la turbina Rushton, lo que genera estrés hidrodinámico en los cultivos de *R. adenotrichos*, favoreciendo la activación de los mecanismos de defensa en las células, siendo uno de ellos, la producción de compuestos polifenólicos que eviten el estrés oxidativo. Por último, la concentración térmica degradó diferencialmente a cada compuesto, siendo el ácido gálico el compuesto menos afectado por la temperatura y el ácido elágico el que se degradó en una mayor proporción. La condición que mejor preservó los metabolitos especializados fue una temperatura de 35°C con un tiempo de 51,24 min.

Bibliografía

- (1) Acosta-Montoya O, Vaillant F, Cozzano S, Mertz C, Pérez A, Castro M. 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schlttdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*. 119 (4): 1497-1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032>
- (2) Ahmadi-Sakha S, Sharifi M, Niknam V. 2016. Bioproduction of phenylethanoid glycosides by plant cell culture of *Scrophularia striata* Boiss.: from shake-flasks to bioreactor. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 124: 275-281. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0891-3>
- (3) Amini S, Ziaratnia SM, Hemmati K. 2022. Optimization of conditions for increasing of saffron cell biomass and crocin production in stirred bioreactor. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 149: 243-255. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02233-4>
- (4) Araya M, Carvajal Y, Alvarez V, Orozco R, Rodriguez G. 2017. Polyphenol characterization of three varieties of blackberry fruits (*Rubus adenotrichos*), cultivated in Costa Rica. *Journal Of Berry Research*. 7(2): 97-107. <https://doi.org/10.3233/jbr-170150>

- (5) Arias JP, Mendoza D, Arias M. 2021. Agitation effect on growth and metabolic behavior of plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana* at bench scale reactor. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 145: 307-319. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02009-2D>
- (6) Azofeifa G, Quesada S, Boudard F, Morena M, Cristol J, Pérez A, et al. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory in vitro activities of phenolic compounds from tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 61 (24): 5798-5804. <https://doi.org/10.1021/jf400781m>
- (7) Azofeifa G, Quesada S, Navarro L, Hidalgo O, Portet K, Pérez A, et al. 2016. Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods.* 26: 330-337. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.007>
- (8) Azofeifa G, Quesada S, Pérez A. 2011. Effect of the microfiltration process on antioxidant activity and lipid peroxidation protection capacity of blackberry juice. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 21(5): 829-834. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000133>
- (9) Azofeifa G, Quesada S, Pérez A, Vaillant F, Michel A. 2015. Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals. *Journal of Food Composition and Analysis.* 42: 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.015>
- (10) Busto V, Calabro-Lopez A, Rodriguez-Talou J, Giulietti AM y Merchuk JC. 2013. Anthraquinones production in *Rubia tinctorum* Cell suspension cultures: down scale of shear effects. *Biochem Engineering J.* 77: 119-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.05.013>
- (11) Busto V, Rodríguez-Talou J, Giulietti AM y Merchuk JC. 2008. Effect of shear stress on Anthraquinones Production by *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Biotechnol Prog.* 24: 175-181. <https://doi.org/10.1021/bp0702370>
- (12) Calvo-Castro L, Syed D, Chamcheu J, Vilela F, Pérez A, Vaillant F, et al. 2013. Protective effect of tropical highland blackberry juice (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in a reconstituted skin equivalent model. *Photochemistry and Photobiology.* 89 (5): 1199-1207. <https://doi.org/10.1111/php.12104>
- (13) Chen WH, Xu CM, Zeng JL, Zhao B, Wang XD, Wang YC. 2007. Improvement of echinacoside and acteoside production by two stage elicitation in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. *World J Microbiol Biotechnol.* 23: 1451-1458. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9389-4>

- (14) Cheng HS, Ton SH, Abdul, K. 2017. Ellagitannin geraniin: a review of the natural sources, biosynthesis, pharmacokinetics and biological effects. *Phytochem Rev.* 16:159-193. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9464-2>
- (15) Cisse M, Vaillant F, Acosta O, Dhuique-Mayer C, Dornier M. 2009. Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using the arrhenius, eyring, and ball models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57 (14): 6285-6291. <https://doi.org/10.1021/jf900836b>
- (16) Ebrahimi M, Mokhtari A. 2017. Engineering of Secondary Metabolites in Tissue and Cell Culture of Medicinal Plants: An Alternative to Produce Beneficial Compounds Using Bioreactor Technologies. En: Abdullah S, Chai-Ling Hy Wagstaff C. (eds). *Crop Improvement.* Springer, Cham. pp137-167. https://doi.org/10.1007/978-3-319-65079-1_7
- (17) Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research.* 50: 151-158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- (18) Gancel A, Feneuil A, Acosta O, Pérez A, Vaillant F. 2011. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International.* 44 (7): 2243-2251. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.013>
- (19) García-Muñoz C, Hernández L, Pérez A, Vaillant F. 2014. Diversity of urinary excretion patterns of main ellagitannins' colonic metabolites after ingestion of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*) juice. *Food Research International.* 55: 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.049>
- (20) Georgiev MI, Eibl R, Zhong JJ. 2013. Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 3787–3800. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4817-x>
- (21) Hughmark GA. 1980. Power requirements and interfacial area in gas-liquid turbine agitated systems. *Ind Eng Chem Process Des Dev.* 19 (4): 638-641. <https://doi.org/10.1021/i260076a023>
- (22) Karuppusamy S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res.* 3: 1222-1239. https://academicjournals.org/article/article1380530836_Karuppusamy.pdf

- (23) Kolmogorov AN. 1941. The local structure of turbulence in incompressible viscous fluid for very large Reynolds numbers. Dokl. Akad. Nauk SSSR 30. Translated by V. Levin. Reprinted in Proc. R. Soc. Lond A 434, 9-13. 1991. <https://doi.org/10.1098/rspa.1991.0075>
- (24) Landau LD, Lifshitz EM. 1987. Fluid Mechanics (en línea). Pergamon. Press: Oxford, UK. <https://phys.au.dk/~srf/hydro/Landau+Lifschitz.pdf>
- (25) Li H, Piao XC, Gao R, Jin MY, Jiang J, Lian ML. 2016. Effect of several physicochemical factors on callus biomass and bioactive compound accumulation of *R. sachalinensis* bioreactor culture. In Vitro Cell Dev Biol-Plant. 52: 241-250. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9758-5>
- (26) Ling JKU, Sam JH, Jeevanandam J, Chan YS y Nandong J. 2022. Thermal Degradation of Antioxidant Compounds: Effects of Parameters, Thermal Degradation Kinetics, and Formulation Strategies. Food Bioprocess Technology. 15: 1919-1935. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02797-1>
- (27) Madrigal-Gamboa V, Jiménez-Arias J, Hidalgo O, Quesada S, Pérez A, Azofeifa G. 2021. Membrane processing effect of blackberry (*Rubus adenotrichos*) on cytotoxic and pro-apoptotic activities against cancer cell lines. Journal of Food Processing and Preservation. 45 (6). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15575>
- (28) Montero M, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Pérez A. 2022. Composición nutricional, contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante hidrofílica de frutas costarricenses seleccionadas. Agronomía Mesoamericana. 33 (2). <https://doi.org/10.15517/am.v33i2.46175>
- (29) Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- (30) Quesada-Morúa M, Hidalgo O, Morera J, Rojas G, Pérez A, Vaillant F, et al. 2020. Hypolipidaemic, hypoglycaemic and antioxidant effects of a tropical highland blackberry beverage consumption in healthy individuals on a high-fat, high-carbohydrate diet challenge. Journal of Berry Research. 10 (3): 459-474. <https://doi.org/10.3233/jbr-190516>
- (31) Ruffoni B, Pistelli L, Bertoli A, Pistelli L. 2010. Plant Cell Cultures: Bioreactors for Industrial Production. En: Giardi MT, Rea G, Berra B. (eds) Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 698. Springer, Boston, MA. pp. 203-221 https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_15
- (32) Schmidt-Durán A, Alvarado-Ulloa C, Chacón-Cerdas R, Alvarado-Marchena L, Flores-Mora D. 2016. Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry

- (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) and its microscopic analysis. Springerplus. 5 (1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3381-0>
- (33) Schmidt-Durán A, Calvo-Castro LA, Alvarado-Ulloa C, Acosta-Montoya O, Rodríguez-Monroy M. 2022. Cell suspension cultures for the production of antioxidant phenolic compounds: experiments with tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino). Plant Cell Tiss Organ Cult. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02428-9>
- (34) Sharma S, Shahzad A. 2013. Bioreactors: A rapid approach for secondary metabolite production. En Shahid M, Shahzad A, Malik A y Sahai A (eds). Recent trends in biotechnology and therapeutic applications of medicinal plants. Springer, Dordrecht. Pp 25-49. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6603-7_2
- (35) Smetanska I. 2008. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. Adv Biochem Engin Biotechnol. 111: 181-228. https://doi.org/10.1007/10_2008_103
- (36) Soto M, Pérez A, Cerdas M, Vaillant F, Acosta O. 2019. Physicochemical characteristics and polyphenolic compounds of cultivated blackberries in Costa Rica. Journal of Berry Research. 9 (2): 283-296. <https://doi.org/10.3233/jbr-180353>
- (37) Trejo-Tapia G, Sepúlveda-Jiménez G, Trejo-Espino JL, Cerda-García-Rojas CM, de la Torre M, Rodríguez-Monroy M, Ramos-Valdivia AC. 2007. Hydrodynamic stress induces monoterpene indole alkaloid accumulation by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. cell suspension cultures via oxidative burst. Biotechnol. Bioeng. 98 (1): 230-238. <https://doi.org/10.1002/bit.21384>
- (38) Trejo-Tapia G, Rodríguez-Monroy M. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. Interciencia. 32 (10): 669-674. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33901004>
- (39) Trujillo-Roldán M, Valdez-Cruz N. 2006. El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados (en línea). Revista Latinoamericana de Microbiología. 48 (3-4): 269-280. https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi063_4f.pdf
- (40) Vazquez-Marquez V, Zepeda-Gómez C, Burrola-Aguilar C, Bernabé-Antonio A, Nieto-Trujillo A, Cruz-Sosa F, et al. 2019. Effect of stirring speed on the production of phenolic secondary metabolites and growth of *Buddleja cordata* cells cultured in mechanically agitated bioreactor. Plant Cell Tiss Organ Cult. 139: 155-166. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01673-9>
- (41) Verma P, Mathur AK, Masood N, Luqman S, Shanker K. 2013. Tryptophan over-producing cell suspensions of *Catharanthus roseus* (L) G. Don and their up-scaling in stirred tank

bioreactor: detection of a phenolic compound with antioxidant potential. *Protoplasma*. 250: 371-380. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0423-5>

(42) Zhong JJ, Fujiyama K, Seki T, Yoshida T. 1994. A quantitative analysis of shear stress effects on Cell suspensions and cell cultures of *Perilla frutescens* in bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*. 44 (5): 649-654. <https://doi.org/10.1002/bit.260440512>

7. Discusión global.

Los compuestos polifenólicos son compuestos bioactivos encontrados en plantas que presentan funciones de bioestimulación del crecimiento o de defensa. Estos compuestos también son conocidos como antioxidantes naturales, los cuales presentan propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, antialérgicas, antivirales, antitrombóticas, hepatoprotectivas, como aditivos de alimentos y en la señalización de moléculas, entre otras (Maniglia et al. 2021). La mora (*R. adenotrichos*) ha sido estudiada debido a su alto contenido de polifenoles con capacidad antioxidante, especialmente elagitaninos, los cuales presentan un beneficio potencial en diferentes pruebas realizadas a nivel *in vitro* e *in vivo* (Acosta-Montoya et al. 2010; Azofeifa et al. 2016, Quesada-Morúa et al. 2020). Lo anterior pudo comprobarse a través del artículo 1 de esta tesis “La mora tropical de altura (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) como potencial alimento funcional: una mirada a las investigaciones realizadas”, donde se evidenció la alta concentración de elagitaninos con capacidad antioxidante que posee la fruta, así como su contenido de antocianinas.

A pesar de esto, las investigaciones realizadas con este cultivo se han centrado en analizar los metabolitos de interés en la fruta, el impacto en la concentración de los compuestos en el procesamiento del jugo, y la actividad biológica de éste. Sin embargo, no había conocimientos en la producción de estos compuestos a través de herramientas biotecnológicas. Inicialmente, Schmidt-Durán et al. (2016) plantearon la metodología para la producción de callos a partir de segmentos foliares de hojas e implementaron suspensiones celulares finas. Sin embargo, en su investigación no se optimizaron las condiciones de crecimiento en matraz ni la síntesis y cuantificación de los polifenoles de interés.

Se han usado varias estrategias para la acumulación de biomasa y la síntesis de metabolitos secundarios, tales como el aislamiento de líneas altamente productoras, optimización del medio y condiciones de cultivo, elicitación, alimentación con nutrientes o precursores, permeabilización, inmovilización y métodos de biotransformación. La acumulación de biomasa y la síntesis de metabolitos en cultivos celulares es un proceso de dos etapas: un cultivo inicial de células para el crecimiento, multiplicación y acumulación de biomasa y, la síntesis de los metabolitos a partir de la biomasa (Murthy et al. 2014).

Ante esto, era necesario generar una metodología estandarizada de obtención de los compuestos de interés y la optimización del medio de cultivo en matraz Erlenmeyer. Por esta razón, se realizó una evaluación de diferentes medios de cultivos, reguladores de crecimiento y

componentes nutricionales, así como del requerimiento de oxígeno que las células necesitaban para la acumulación de la biomasa, cuyos resultados se sintetizan en el artículo 2 “Cell suspension cultures for the production of antioxidant phenolic compounds: experiments with tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino)”.

Asimismo, ante la diversidad de polifenoles con capacidad antioxidante de interés, se decidió cuantificar la presencia y producción de tres compuestos de interés presentes en los sistemas de cultivo *in vitro* de la mora: el ácido gálico, un tipo de ácido hidroxibenzoico que presenta propiedades antioxidantes y es precursor de los elagitaninos (Cruz et al., 2019; Lipińska et al., 2014), la vanillina, el polifenol saborizante más importante que existe (Zeb, 2021) la cual se ha reportado presente en la mora (Arturo-Perdomo et al., 2021), y el ácido elágico, un polifenol con propiedades antioxidantes presente en una serie de frutas como las bayas.

El ácido elágico existe principalmente en forma de elagitaninos. Los elagitaninos unen el ácido elágico a un poliol central, como la glucosa, principalmente a través de un enlace éster (Huang et al. 2007). Además, el ácido elágico y los elagitaninos son transformados en urolitinas cuando son consumidos y entran en contacto con la microbiota intestinal (D`Amico et al. 2021). Las urolitinas son compuestos metabólicos altamente biodisponibles con alta actividad biológica (Shahraki y Ebrahimi, 2019). Los resultados del análisis con el UHPLC presentados en los artículos 2 y 3, muestran que dichos compuestos están presentes en los sistemas de cultivo *in vitro* de la mora.

Por último, se presentó el establecimiento de las condiciones para el cultivo de las células de mora en un STR, considerando que esta es una alternativa viable para la producción de metabolitos secundarios de interés, en donde se pueden controlar varios parámetros de importancia, como lo son: suministro de nutrientes, control de temperatura y condiciones hidrodinámicas (Amini et al. 2022).

La agitación es un factor importante que debe controlarse desde los cultivos celulares en matraz hasta en biorreactores a gran escala, ya que la mezcla de cultivos promueve un mejor crecimiento, al mejorar la transferencia de nutrientes desde las fases líquidas y gaseosas a las células. Adicionalmente, las células vegetales son consideradas como un sistema sensible al corte por las tensiones hidrodinámicas presentes en los biorreactores, esto se atribuye a su tamaño celular, a su crecimiento en forma de agregados, a la presencia de una pared celular rígida y a la existencia de vacuolas (Trejo Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

Las condiciones hidrodinámicas que acompañan una mezcla adecuada de los caldos en el biorreactor pueden reducir el tamaño medio de los agregados y ocasionar daños letales en los

cultivos. Las células vegetales, por lo tanto, a menudo se cultivan en biorreactores de tanque agitado a velocidades de agitación muy bajas (Murthy et al. 2014) o utilizando diferentes tipos de impulsor, ya que estos presentan diferencias en el estrés hidrodinámico que provocan a los cultivos celulares de plantas. Existen en la literatura varias especies vegetales que se han crecido en biorreactores de tipo tanque agitado, como, por ejemplo: *Buddleja cordata* (Vazquez-Marquez et al. 2019), *Sphaeralcea angustifolia* (Pérez-Hernández et al. 2019), *Bursera linanoe* (Pavón-Reyes et al. 2017) y *Uncaria tomentosa* (Trejo-Tapia et al. 2005).

Busto et al. (2008) y Trejo-Tapia et al. (2007) han reportado que el cultivo *in vitro* células vegetales en los biorreactores, al ser expuestos a condiciones de estrés hidrodinámico, pueden sufrir una condición de elicitación abiótica que produce un aumento en la producción de los metabolitos secundarios. En este sentido los resultados presentados en esta tesis en el artículo 3 “Determinación de la concentración de compuestos polifenólicos de cultivos celulares de mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) crecidos en biorreactores de tanque agitado bajo diferentes impulsores”, son consistentes con los reportado en la literatura para otras especies. En donde se demostró que el impulsor Rushton en un STR, favorece un aumento en la producción de los compuestos polifenólicos de la mora, debido a una condición de estrés hidrodinámico.

El proyecto doctoral permitió generar una estrategia inicial de producción de un cultivo de células de *R. adenotrichos* en STR, con el fin de producir compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante con potencial beneficio a la salud, mediante herramientas biotecnológicas, las cuales pueden ser escalables y comercializables, contribuyendo a generar una economía basada en recursos biológicos.

8. Conclusiones

Mediante la revisión sistemática de los antecedentes de la mora, se documentó el potencial que posee esta fruta, por su alto contenido de elagitaninos. Estos compuestos presentan efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos y beneficiosos para la salud. Asimismo, se encontró que el desarrollo de procesos biotecnológicos basados en el cultivo de células de mora *in vitro* es un enfoque poco estudiado, el cual podría llevar a obtener múltiples beneficios en la obtención de los metabolitos y su producción a gran escala.

Se logró optimizar las condiciones de crecimiento de los cultivos de células de mora en matraz. El medio Gamborg, suplementado con 6-benciladenina, ácido indol-3-butírico y fuentes de nitrógeno orgánicas como la L-glutamina y la caseína hidrolizada, así como el empleo de un tapón de algodón en el Erlenmeyer, favoreció la producción de ácido elágico y vanillina. Además, se estandarizó la metodología de obtención de los compuestos potencialmente bioactivos, tanto en la extracción de éstos, como en los análisis de polifenoles totales, capacidad antioxidante y compuestos específicos en el UHPLC.

Se determinó que el estrés hidrodinámico de un biorreactor STR, con un impulsor turbina Rushton es un factor que promueve la concentración de ácido gálico y vanillina, posiblemente al activar el metabolismo de defensa contra el estrés oxidativo de las células de mora. También, fue posible evidenciar la degradación térmica que sufren los metabolitos por un método de concentración como es el uso del rotavapor, permitiendo determinar un tratamiento que preserve en mayor medida los compuestos bioactivos producidos.

Con todo lo anterior, se demostró que es posible producir compuestos bioactivos con capacidad antioxidante a partir de cultivos celulares de mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) en biorreactor.

9. Recomendaciones

Durante la tesis doctoral, se evidenció que es muy importante comprobar la contaminación de los cultivos celulares especialmente por microorganismos endófitos, ya que estos pueden bajar los rendimientos y las productividades de los ensayos realizados. Es necesario realizar pruebas de inocuidad y asepsia de los callos y suspensiones celulares antes de cada prueba de laboratorio que se realice.

Los cultivos celulares lograron evidenciar concentraciones de los compuestos de interés; sin embargo, estos fueron inferiores a lo reportado para la fruta. Es posible generar estrategias de mejoramiento genético a las rutas metabólicas de producción de los compuestos estudiados, como puede ser el silenciamiento de genes o la mejora de promotores, con el fin de favorecer una mayor producción de los metabolitos.

La concentración de biomasa, tanto en peso fresco como peso seco, fue inferior a lo reportado para cultivos celulares en otras especies, lo que abre toda una posibilidad de optimización de las condiciones de crecimiento para la acumulación de biomasa y la síntesis de los compuestos de interés. Por ejemplo, en matraz, se hace necesario investigar más en componentes puntuales del medio de cultivo, especialmente en relación con los reguladores de crecimiento y las fuentes de nitrógeno orgánicas.

El estrés hidrodinámico que sufren las células evidenció un aumento en la concentración de metabolitos relacionados con el estrés oxidativo, funcionando como un agente elicitador físico. Sin embargo, existen otros elicitores físicos y químicos que se han utilizado en cultivos celulares de diferentes especies, que han provocado un aumento en la concentración de otros metabolitos secundarios. Usar otros elicitores en los cultivos celulares puede ser una alternativa de aumento de rendimientos y productividades con las células de mora.

Aunque el STR es uno de los biorreactores más utilizados en cultivos líquidos, los cultivos celulares de plantas también se han crecido en otros fermentadores, como los *airlift* o las columnas de burbujeo. Estos sistemas no presentan efectos relacionados con el estrés hidrodinámico, pero pueden provocar aumentos significativos de la biomasa. Se podría implementar un sistema en dos etapas, en el cual el primer biorreactor se centre en la generación de biomasa y el segundo fermentador tenga como objetivo generar el estrés hidrodinámico a las células, lo cual podría provocar un aumento en las productividades de los metabolitos de interés. La producción de un compuesto de interés en un biorreactor es un método viable para estandarizar y escalar metabolitos de interés a niveles comercializables, sin embargo, todavía

existen pocos casos de éxito, ya que las concentraciones obtenidas, como en el caso de esta tesis doctoral, son todavía inferiores a las producidas por el cultivo. Esto provoca que sea necesario seguir generando investigación relacionada con los cultivos de interés, que permita optimizar el bioproceso a niveles que puedan ser industrializados y comercializables.

10. Referencias

- Acosta-Montoya, O, Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A., Castro, M. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119 (4): 1497-1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032>
- Amini, S., Ziaratnia, S.M. y Hemmati, K. (2022). Optimization of conditions for increasing of saffron cell biomass and crocin production in stirred bioreactor. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 149: 243-255. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02233-4>
- Araya, M., Carvajal, Y., Alvarez, V., Orozco, R. y Rodriguez, G. (2017). Polyphenol characterization of three varieties of blackberry fruits (*Rubus adenotrichos*), cultivated in Costa Rica. *Journal Of Berry Research*, 7 (2): 97-107. <https://doi.org/10.3233/jbr-170150>
- Arturo-Perdomo, D., Jiménez, J.P., Ibáñez, E., Cifuentes, A., Hurtado-Benavides, A. y Montero, L. (2021). Extraction and characterization of the polar lipid fraction of blackberry and passion fruit seeds oil using supercritical fluid extraction. *Food Analytical Methods*, 14: 2026-2037. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02020-5>
- Azofeifa, G., Quesada, S., Navarro, L., Hidalgo, O., Portet, K., Pérez, A., et al. (2016). Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 26: 330-337. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.007>
- Barros, L., Morales, P., Carvalho, A. y Ferreira, I. (2016). Antioxidant Potential of Wild Plant Foods en Sánchez-Mata, M. y Tardío, J. (Eds.), *Mediterranean Wild Edible Plants* (pp. 209-232). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3329-7_10
- Busto, V., Rodríguez-Talou, J., Giulietti, A.M. y Merchuk, J.C. (2008). Effect of shear stress on Anthraquinones Production by *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Biotechnol Prog*, 24: 175-181. <https://doi.org/10.1021/bp0702370>
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas de oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina legal de Costa Rica*, 36 (1): 91-100. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlnq=es
- Castillo, L.M., Alvarado, A.T. y Sánchez, M.I. (2006). Enfermedad cardiovascular en Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 15 (28): 3-16.

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292006000100003&lng=en&nrm=iso. ISSN 1409-1429

- Charles, D.J. (2012). Introduction en Charles, D.J. (Ed.) *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources* (pp. 3-8). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4310-0_1
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A.K. y Bisaria, V.S. (2002). Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspensions cultures. *Biotechnology Bioprocess Eng*, 7: 138-149. <https://doi.org/10.1007/BF02932911>
- Corrado, S. y Sala, S. (2018). Bio-Economy contribution to circular economy en Benetto, E., Gericke, K. y Guiton, M. (Eds.) *Designing Sustainable Technologies, Products and Policies* (49-59). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66981-6_6
- Cruz, E., Barbosa, L. y das Graças, M. (2019). Antiinflammatory properties of Schinus terebinthifolius and its use in arthritic conditions en Ross, R. y Preedy, V.R. (Eds.) *Bioactive food as dietary interventions for arthritis and related inflammatory diseases* (pp. 489-505). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00028-3>
- D'Amico, D., Olmer, M., Fouassier AM., Valdés P., Andreux, P., Rinsch, C., et al. (2021). Urolithin: A improves mitochondrial health, reduces cartilage degeneration, and alleviates pain in osteoarthritis, *Trends Mol Med*, 27 (7): 687-699. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.04.009>
- Flores-Mora, D. y Argüello-Delgado, F. (2005). *Cultivo de la mora. Innovaciones tecnológicas*. 1 ed. Costa Rica: Editorial Tecnológica de Costa Rica.
- Gómez, J.E. (2012). Morbimortalidad cardiovascular en el mundo. *Rev Colomb Cardiol*, 19 (6). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-56332012000600005
- Huang, W., Niu, H., Gong, G.H., Lu, Y.R., Li, Z.S. y Li, H. (2007). Individual and combined effects of physicochemical parameters on ellagitannin acyl hydrolase and ellagic acid production from ellagitannin by *Aspergillus oryzae*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 30: 281-288. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0125-0>
- Islam, M.M.T., y Shekhar, H.U. (2015). Impact of Oxidative Stress on Human Health en Rani, V. y Yadav, U. (Eds.) *Free Radicals in Human Health and Disease* (pp. 59-73). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0_5
- Khan, M.A., Rahman, A.A., Islam, S., Khandokhar, P., Parvin, S., Islam, M.B., et al. (2013). A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Research Notes* 6: 1-24. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-24>

- Lipińska, L., Klewicka, E. y Sójka, M. (2014). The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 13 (3): 289-299. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.3.7>
- Madrigal, K. (1 de febrero de 2017). 12 personas con cáncer mueren por día en Costa Rica. *La República*. <https://www.larepublica.net/noticia/12-personas-con-cancer-mueren-por-dia-en-costa-rica>
- Mandelker, L. (2011). Oxidative Stress, Free Radicals, and Cellular Damage en Mandelker, L. y Vajdovich, P. (Eds.) *Studies on Veterinary Medicine. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* (pp 1-17). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-071-3_1
- Maniglia, B.C., Rebelatto, E.A., Andrade, K.S., Zielinski, A. y de Andrade, C.J. (2021). Polyphenols en Galanakis, C.M. (Ed.) *Food Bioactives and Health* (pp. 1-39). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57469-7_1
- Mehla, N., Sindhi, V., Josula, D., Bisht, P. y Wani, S.H. (2017). An Introduction to Antioxidants and Their Roles in Plant Stress Tolerance en Khan, M. y Khan, N. (Eds.) *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress* (pp. 1-23). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_1
- Mertz, C., Cheynier, V., Gunata, Z. y Brat, P. (2007). Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55 (21): 8616-8624. <https://doi.org/10.1021/jf071475d>
- Montero, M., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J. y Pérez, A. (2022). Composición nutricional, contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante hidrofílica de frutas costarricenses seleccionadas. *Agronomía Mesoamericana*, 33 (2). <https://doi.org/10.15517/am.v33i2.46175>
- Morales, G. y Paredes, A. (2014). Antioxidant activities of *Lampaya medicinalis* extracts and their main chemical constituents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 259. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-259>
- Murthy, H.N., Lee, E.J. y Paek, K.Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 118: 1-16. <http://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>

- Naciones Unidas. (2018). La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe. <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/cb30a4de-7d87-4e79-8e7a-ad5279038718/content>
- Naciones Unidas. (2019). World Population Prospects 2019. <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/>
- Pavón-Reyes, L., Evangelista-Lozano, S., Sepúlveda-Jiménez, G., Chávez Ávila, V. y Rodríguez-Monroy, M. (2017). Cell culture of *Bursera linanoe* in a stirred tank bioreactor for production of linalool and linalyl acetate. *Natural Products Communications*, 12 (3): 319-322. <https://doi.org/10.1177/1934578X17012003>
- Pérez-Hernández, J., Nicasio-Torres, M., Sarmiento-López, L. y Rodríguez-Monroy, M. (2019). Production of anti-inflammatory compounds in *Sphaeralcea angustifolia* cell suspension cultivated in stirred tank bioreactor. *Engineering in Life Sciences*, 19 (3): 196-205. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800134>
- Quesada-Morúa, M., Hidalgo, O., Morera, J., Rojas, G., Pérez, A., Vaillant, F., et al. (2020). Hypolipidaemic, hypoglycaemic and antioxidant effects of a tropical highland blackberry beverage consumption in healthy individuals on a high-fat, high-carbohydrate diet challenge. *Journal of Berry Research*, 10 (3): 459-474. <https://doi.org/10.3233/jbr-190516>
- Rodríguez, I. (16 de noviembre de 2014). Costa Rica ocupa octavo lugar en América Latina con casos de diabetes. *La Nación*. <http://www.nacion.com/ciencia/salud/costa-rica-ocupa-octavo-lugar-de-america-latina-con-casos-de-diabetes/IR3UXNOXARH6ZF636SY2HE3WME/story/>
- Schmidt-Durán, A., Alvarado-Ulloa, C., Chacón-Cerdas, R., Alvarado-Marchena, L. y Flores-Mora, D. (2016). Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) and its microscopic analysis. *Springerplus*, 5 (1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3381-0>
- Schmidt-Durán, A., Calvo-Castro, L.A., Alvarado-Ulloa, C., Acosta-Montoya, O. y Rodríguez-Monroy, M. (2022). Cell suspension cultures for the production of antioxidant phenolic compounds: experiments with tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl. cv. Vino). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02428-9>
- Schulz, R. y Di Lisa, F. (2016). Oxidative Stress and Nitrosative Stress en Schlüter, K.D. (Ed.) *Cardiomyocytes - Active Players in Cardiac Disease* (pp. 267-278). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31251-4_10

- Segura, S., Rebollar-Alviter, A., Boyzo-Marín, J., Hernández-Bello, M. y López-Medina, J. (2012). Genetic resources of blackberry wild species in Michoacan, Mexico. *Acta Horticulturae*, 946: 107-111. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.946.14>
- Shahraki, A. y Ebrahimi, A. (2019). Ellagitannin derivatives and some conjugated metabolites: aqueous-DMSO proton affinities and acidity constants. *Structural Chemistry*, 30: 1343-1351. <https://doi.org/10.1007/s11224-019-1284-8>
- Sharma, S. y Shahzad, A. (2013). Bioreactors: A Rapid Approach for Secondary Metabolite Production en Shahid, M., Shahzad, A., Malik, A. y Sahai, A. (Eds.) *Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants* (pp. 25-49). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6603-7_2
- Sharma, P., Sharma, S., Yadav, S., Srivastava, A., Purohit, I. y Shrivastava, N. (2014). Plant Derived Bioactive Molecules: Culture Vessels to Bioreactors en Paek, K.Y., Murthy, H. y Zhong, J.J. (Eds.) *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology* (pp. 47-60). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_3
- Soto, M., Pérez, A., Cerdas, M., Vaillant, F. y Acosta, O. (2019). Physicochemical characteristics and polyphenolic compounds of cultivated blackberries in Costa Rica. *Journal of Berry Research*, 9 (2): 283-296. <https://doi.org/10.3233/jbr-180353>
- Sudhahar, V. y Fukai, T. (2014). Antioxidant Supplementation and Therapies en Tsukahara, H. y Kaneko, K. (Eds.) *Studies on Pediatric Disorders. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* (pp. 183-209). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0679-6_11
- Trejo-Tapia, G., García-Rojas, C., Rodríguez-Monroy, M. y Ramos-Valdivia, A. (2005). Monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. cell suspension culture in a stirred tank bioreactor. *Biotechnology Progress*, 21 (3): 786-792. <https://doi.org/10.1021/bp049608s>
- Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, 32 (10): 669-674. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007001000006
- Trejo-Tapia, G., Sepúlveda-Jiménez, G., Trejo-Espino, J.L., García-Rojas, C., de la Torre-Martínez, M., Rodríguez-Monroy, M. y Ramos-Valdivia, A. (2007). Hydrodynamic stress induces monoterpenoid oxindole alkaloid accumulation by *Uncaria tomentosa* (Willd) D. C. cell suspension cultures via oxidative burst. *Biotechnology and Bioengineering*, 98 (1): 230-238. <https://doi.org/10.1002/bit.21384>

- Tusevski, O., Kostovska, A., Iloska, A., Trajkovska L. y Gadzovska, S. (2014). Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Cent Eur J Biol*, 9 (9): 888-900. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0322-1>
- Vazquez-Marquez, A.M., Zepeda-Gómez, C., Burrola-Aguilar, C., Bernabé-Antonio, B., Nieto-Trujillo, A., Cruz-Sosa, F., Rodríguez-Monroy, M. y Estrada-Zúñiga, M.E. (2019). Effect of stirring speed on the production of phenolic secondary metabolites and growth of *Buddleja cordata* cells cultured in mechanically agitated bioreactor. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 139 (1): 155-166. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01673-9>
- Viaggi, D. (2020). Understanding Bioeconomy Systems: Integrating Economic, Organizational and policy Concepts en Keswani, C (Ed.) *Bioeconomy for Sustainable Development* (pp- 3-19). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9431-7_1
- Zeb, A. (2021). Biosynthesis of Phenolic Antioxidants en Zeb, A (Ed.) *Phenolic Antioxidants in Foods: Chemistry, Biochemistry and Analysis*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-74768-8_11.