



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS FORESTALES

**PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE LAS ESPECIES NATIVAS
Berberis microphylla y *Luma apiculata* PARA LA OBTENCIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS BIOACTIVOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Forestales para optar al
Grado Académico de Magister en Ciencias Forestales

POR

CAMILA CONSTANZA DELGADO NAVARRETE

Profesora Guía: Dra. Martha Hernández de la Torre
Dpto. de Silvicultura
Facultad de Ciencias Forestales

Concepción, Chile 2025

© 2025

CAMILA CONSTANZA DELGADO NAVARRETE

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Proliferación *in vitro* de las especies nativas *Berberis microphylla* y *Luma apiculata* para la obtención de compuestos fenólicos bioactivos.

Esta Tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Centro de Biotecnología y la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. Martha Hernández de la Torre
Ciencias Biológicas, Ph. D.
Profesor Asociado. Facultad de Ciencias Forestales.
Universidad de Concepción

COMISIÓN EVALUADORA

Dra. Katherine Sossa Fernández
Profesora Asociada. Facultad de Ciencias Forestales.
Universidad de Concepción, Chile

Dr. Manuel Sánchez Olate
Profesor Asociado. Facultad de Ciencias Forestales.
Universidad de Concepción, Chile

Dr. Walter David Obregón
Investigador CONICET
Director del Centro de Estudio de Proteínas Vegetales
Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la
Plata, Argentina

Vicente Hernández Castillo
Ingeniero en Maderas, Dr.
Director de Programa Magister

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia. Mamá y abuela, les agradezco por estar siempre y entregarme amor y comprensión cada día en mi camino. A mis hermanos, quienes me motivan a esforzarme y enseñarles que nunca hay que rendirse, incluso cuando el camino se hace difícil. También a mi pareja, por su cariño, paciencia y ayuda constante durante este proceso. Y, por último, a mi perrito Buddy, que, con solo verlo y abrazarlo, me daba la fuerza y tranquilidad para continuar. Los amo profundamente.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, en primer lugar, a mi profesora guía, Dra. Martha Hernández de la Torre, por permitirme realizar mi investigación y, especialmente, por su orientación académica, ayuda y comprensión durante todo el magíster.

A la Dra. Darcy Ríos Leal, por su generosa orientación en los inicios de la investigación, cuando aún no contaba con experiencia en cultivo *in vitro*, y al Dr. Manuel Sánchez Olate, por brindarme conocimientos importantes para llevar a cabo parte de este trabajo.

Al Dr. Walter David Obregón y a Brenda Ozón, del Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe), por su amabilidad al recibirme durante la pasantía y, sobre todo su orientación durante el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Andy J. Pérez, por su colaboración durante los ensayos y por su disposición para apoyarme, aun cuando tenía un tiempo limitado, siempre con amabilidad y claridad.

A la Facultad de Ciencias Forestales y a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción, por otorgarme la Beca de Articulación Pregrado-Postgrado que hizo posible la realización de este magíster.

A todos mis compañeros y colegas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Centro de Biotecnología con los que coincidí en este tiempo. A los Lucianos, por su amistad, consejos y apoyo constante. También a las grandes científicas que me inspiraron a ser como ellas, Daniela, Inelvis y Negra, gracias por compartir sus conocimientos, sabiduría y orientarme en todo momento.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1 <i>Berberis microphylla</i> (calafate).....	9
1.2 <i>Luma apiculata</i> (arrayán).....	10
1.3 Propagación de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	11
1.4 Metabolitos especializados en plantas	11
1.4.1 <i>Compuestos fenólicos</i>	12
1.4.2 <i>Obtención compuestos fenólicos bioactivos en B. microphylla y L. apiculata</i> ...	15
1.4.3 <i>Cultivo de tejidos vegetales para la obtención de compuestos fenólicos</i>	16
II. MATERIALES Y Métodos	19
2.1 Material vegetal.....	19
2.2 Establecimiento <i>in vitro</i>	19
2.3 Proliferación <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	20
2.4 Extracción y cuantificación de fenoles totales	21
2.5 Extracción y cuantificación de antocianinas totales.....	22
2.6 Análisis LC-MS.	22
2.7 Actividad biológica	23
2.7.1 <i>Actividad antioxidante</i>	23
2.7.2 <i>Actividad antimicrobiana contra cepas bacterianas y fúngicas patógenas</i>	24
2.8 Análisis estadísticos	25
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1 Germinación <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i>	26
3.2 Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	27
3.3 Contenido de fenoles y antocianinas totales de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	29
3.4 Análisis LC-MS	32
3.5 Actividad biológica	41
3.5.1 <i>Actividad antioxidante</i>	41
3.5.2 <i>Actividad antimicrobiana</i>	44
III. CONCLUSIONES	51
IV. REFERENCIAS.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de temperaturas de remojo de semillas y medios de cultivo en germinación <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i>	20
Tabla 2. Tratamientos con diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) y ácido indol-3-butírico (IBA) en la proliferación de brotes de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	21
Tabla 3. Efecto de diferentes temperaturas de remojo de semillas y medios de cultivo en germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>B. microphylla</i> luego de 2 semanas.	26
Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de BAP e IBA en la proliferación de brotes <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	28
Tabla 5. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de hojas <i>ex vitro</i> de <i>B. microphylla</i> desde HPLC- MS.	36
Tabla 6. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de brotes <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> desde HPLC- MS.	38
Tabla 7. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de hojas <i>ex vitro</i> de <i>L. apiculata</i> desde HPLC- MS.	39
Tabla 8. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de brotes <i>in vitro</i> de <i>L. apiculata</i> desde HPLC- MS.	40
Tabla 9. Capacidad antioxidante de fenoles solubles, fenoles ligados y antocianinas totales en extractos de hojas <i>ex vitro</i> y brotes <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i> , determinada por los ensayos ABTS y DPPH.	41
Tabla 10. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos fenólicos de hojas <i>ex vitro</i> y brotes <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	46
Tabla 11. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos fenólicos de hojas <i>ex vitro</i> y brotes <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Germinación <i>in vitro</i> y multiplicación de brotes de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	29
Figura 2. Contenido de compuestos fenólicos en hojas <i>ex vitro</i> y brotes <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	30
Figura 3. Cromatogramas HPLC-MS de extractos de fenoles solubles desde hojas <i>ex vitro</i> y brotes cultivados <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	34
Figura 4. Cromatogramas HPLC-MS de extractos de fenoles ligados desde hojas <i>ex vitro</i> y brotes cultivados <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	35
Figura 5. Diagramas de dispersión de correlación de Pearson.	43
Figura 6. Inhibición del crecimiento bacteriano por extractos fenólicos de hojas <i>ex vitro</i> y brotes <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	44
Figura 7. Inhibición del crecimiento fúngico por extractos fenólicos de hojas <i>ex vitro</i> y brotes <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	47
Figura 8. Esquema general de la proliferación <i>in vitro</i> y análisis de compuestos fenólicos en extractos de hojas <i>ex vitro</i> y brotes cultivados <i>in vitro</i> de <i>B. microphylla</i> y <i>L. apiculata</i>	50

RESUMEN

En Chile existe gran variedad de berries nativos, cuyos usos medicinales son comunes en la cultura mapuche y rural. *Berberis microphylla* y *Luma apiculata* son especies nativas reconocidas por su capacidad de producir compuestos fenólicos bioactivos. Este estudio, partiendo de la hipótesis “la proliferación *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata* induce cambios favorables en la síntesis de compuestos fenólicos bioactivos con respecto a los obtenidos desde plantas que crecen en su ambiente natural” se realizó con el objetivo general de comparar el contenido de compuestos fenólicos bioactivos en *B. microphylla* y *L. apiculata* a partir de plantas provenientes de cultivo *in vitro* y plantas que crecen en ambiente natural. Para ambas especies se logró establecer un protocolo para la proliferación *in vitro* de brotes en medio WPM suplementado con 2,2 μM de BAP y 0,25 μM de IBA. Se demostró la influencia de las condiciones de cultivo en la acumulación de compuestos bioactivos. Los brotes *in vitro* de *B. microphylla* presentaron mayor contenido de antocianinas totales con una alta capacidad antioxidante y las hojas *ex vitro* exhibieron niveles más altos de fenoles solubles. Los mayores contenidos de fenoles ligados de *L. apiculata* se detectaron en extractos del material *ex vitro*. El análisis por LC-MS permitió identificar compuestos específicos para cada especie, siendo mayoritarios los ácidos cafeoilquínicos en *B. microphylla* y derivados de miricetina en *L. apiculata*, algunos exclusivos de condiciones *in vitro*. Ambas especies presentaron alta actividad antimicrobiana; los extractos *ex vitro* de *B. microphylla* inhibieron todas las cepas bacterianas evaluadas y los extractos de fenoles solubles (*in vitro* y *ex vitro*) mostraron actividad antifúngica frente a *Candida tropicalis*. Todos los extractos de *L. apiculata* presentaron similar actividad antimicrobiana, sólo los extractos de fenoles solubles inhibieron el crecimiento de *Candida albicans*. Todos los extractos de ambas especies fueron efectivos frente a *Candida glabrata*. Los resultados obtenidos destacan el potencial del cultivo *in vitro* como una herramienta sostenible para la producción dirigida de compuestos fenólicos bioactivos, con aplicaciones en las industrias farmacéutica, nutracéutica e incluso como estrategia para la conservación y valorización de especies vegetales nativas.

ABSTRACT

In Chile, there is a great diversity of native berries, whose medicinal uses are common in Mapuche and rural culture. *Berberis microphylla* and *Luma apiculata* are native species recognized for their ability to produce bioactive phenolic compounds. This study, based on the hypothesis that “*in vitro* proliferation of *B. microphylla* and *L. apiculata* induces favorable changes in the synthesis of bioactive phenolic compounds compared to those obtained from plants growing in their natural environment,” aimed to compare the content of bioactive phenolic compounds in *B. microphylla* and *L. apiculata* from *in vitro* cultured plants and plants growing in natural environments. For both species, a protocol was established for the *in vitro* proliferation of shoots in WPM medium supplemented with 2.2 μ M BAP and 0.25 μ M IBA. The influence of culture conditions on the accumulation of bioactive compounds was demonstrated. *In vitro* shoots of *B. microphylla* exhibited higher total anthocyanin content with strong antioxidant capacity, while *ex vitro* leaves showed higher levels of soluble phenols. The highest levels of bound phenols in *L. apiculata* were detected in extracts from *ex vitro* material. LC-MS analysis allowed the identification of species specific compounds, with caffeoylquinic acids being predominant in *B. microphylla* and myricetin derivatives in *L. apiculata*, some of which were exclusive to *in vitro* conditions. Both species showed high antimicrobial activity; *ex vitro* extracts of *B. microphylla* inhibited all tested bacterial strains, and soluble phenol extracts (*in vitro* and *ex vitro*) exhibited antifungal activity against *Candida tropicalis*. All *L. apiculata* extracts showed similar antimicrobial activity, with only soluble phenol extracts inhibiting the growth of *Candida albicans*. All extracts from both species were effective against *Candida glabrata*. The results highlight the potential of *in vitro* cultivation as a sustainable tool for the targeted production of bioactive phenolic compounds, with applications in the pharmaceutical and nutraceutical industries, and as a strategy for the conservation and valorization of native plant species.

I. INTRODUCCIÓN

Los berries o bayas son un grupo de frutos carnosos que destacan por ser aromáticos y poseer colores vistosos. Su consumo está asociado a una mejor calidad de vida, dado que, además de ser una fuente de vitaminas, minerales, proteína y fibra, contienen compuestos bioactivos con capacidad para evitar el estrés oxidativo de las células (Romero et al., 2019). Diversos estudios han demostrado que estos efectos se deben principalmente a su alto contenido y diversidad de compuestos fenólicos, como antocianinas, flavonoles y taninos, los cuales presentan actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Seeram, 2008). En Chile, existe una alta variedad de berries nativos con usos medicinales arraigados a la cultura mapuche y rural, producidos por plantas vasculares de las familias *Ericaceae*, *Rosaceae*, *Myrtaceae*, *Berberidaceae* entre otras, distribuidas principalmente desde la región de Coquimbo hasta la de Magallanes (Fredes, 2009; López et al., 2021).

Dentro de las especies de berries que destacan en Chile se encuentra *Berberis microphylla* G. Forst (calafate) y *Luma apiculata* (D.C.) Burret (arrayán). Los frutos de estas especies son empleados en la producción de una variedad de productos gastronómicos, tales como mermeladas, jaleas, jugos, licores, vinos, cervezas, así como en la fabricación de fármacos y cosméticos naturales (Cordero et al., 2017; Bustamante et al., 2023). Así mismo, en la medicina tradicional, se utilizan las hojas, raíces y corteza por sus propiedades astringentes, febrífugas, digestivas, antisépticas y antiinflamatorias (Cordero et al., 2017; Hurrel et al., 2011). Debido al valor ecológico y cultural, la conservación y el aprovechamiento sustentable de *B. microphylla* y *L. apiculata* constituyen una oportunidad relevante para el desarrollo de estrategias de investigación y aplicación biotecnológica.

1.1 *Berberis microphylla* (calafate)

B. microphylla, perteneciente a la familia *Berberidaceae*, es un arbusto perenne nativo de la Patagonia argentina y chilena. En Chile, se distribuye desde Curicó hasta Tierra del Fuego, sin embargo, su mayor expresión, en términos de diversidad genética y calidad de fruta, se encuentra entre las regiones de Aysén y Magallanes (Mc Leod et al., 2015). Esta especie se adapta a diversas condiciones climáticas, por lo que es común encontrarla en claros y

márgenes de bosques, así como en sitios alterados por incendios, ganadería y otras actividades humanas. También, se encuentra en mallines y en las orillas de lagos y ríos (Tacón, 2017). De acuerdo con sus características morfológicas, el calafate alcanza una altura mediana de hasta 3 metros. Sus ramas son largas y delgadas, con pequeñas hojas ovaladas de color verde brillante que presentan una pequeña espina en la punta y se agrupan en ramilletes de 10 hojas. Además, posee numerosas espinas de color café, más largas que las hojas y divididas en tres puntas. Sus flores, de color amarillo, son solitarias, y dan lugar a un fruto globoso de color azulado a negro que cuelga solitario de un largo pedúnculo, conteniendo entre 6 y 10 semillas (Dalzotto et al., 2019). Florece entre octubre y noviembre y fructifica durante el verano, con los frutos maduros presentes en enero y febrero (Silva et al., 2020).

1.2 *Luma apiculata* (arrayán)

L. apiculata es un árbol perenne nativo de Argentina y Chile, perteneciente a la familia *Myrtaceae*. En Chile se distribuye desde las regiones de Valparaíso hasta Aysén. Normalmente crece a orillas de lagos, ríos y otros cursos de agua, desde la costa hasta los 1.000 metros de altitud en ambas cordilleras y en el valle central (Rodríguez et al. 1983; García & Ormazabal, 2008). Puede alcanzar hasta 25 metros de altura y posee un tronco normalmente torcido, de hasta 60 cm diámetro, con una corteza muy lisa, de color rojizo y manchas blancas (Alvarado Ojeda et al., 2012; García & Ormazabal, 2008). Sus hojas son simples, opuestas, aromáticas, de color verde oscuro y presentan una capa brillante en la cara superior. Las flores son blancas, hermafroditas, axilares y se encuentran reunidas en grupos de 3 a 5 unidades (Alvarado Ojeda et al., 2012). La floración ocurre mayoritariamente de enero a mayo, sin embargo, en algunos lugares hay ejemplares que florecen en otras épocas del año. El fruto es una baya pequeña y redondeada, de color negro-violeta, que contiene 3 semillas. Su fructificación ocurre desde fines de febrero hasta mayo (Rodríguez et al., 1983).

1.3 Propagación de *B. microphylla* y *L. apiculata*

Tanto *B. microphylla* como *L. apiculata* son especies que se propagan sexualmente mediante semillas, las cuales se dispersan principalmente por aves y mamíferos. Además, la reproducción vegetativa de *B. microphylla* se lleva a cabo mediante estolones que brotan a cierta distancia, permitiendo una rápida colonización en el hábitat natural (Tacón, 2017).

Para fines de conservación, mejoramiento y/o investigación, se han implementado diferentes estrategias de propagación *ex situ*, fuera de su hábitat natural. *B. microphylla* y *L. apiculata* se propagan desde semillas en otoño, las cuales requieren un periodo de estratificación en frío para romper su latencia y optimizar su germinación. *B. microphylla*, además, se propaga por rizomas en otoño, colocando secciones de estos tallos en vivero con sustrato suelto para favorecer la emergencia de las raíces y brotes en la siguiente temporada de crecimiento (Radice et al., 2018). También, puede propagarse por esquejes que se plantan directamente al suelo una vez tratados con hormonas que favorecen el enraizamiento. Por otra parte, *L. apiculata* se puede propagar en verano desde esquejes apicales en camas frías en arena, aplicando previamente hormonas de enraizamiento (Cordero et al., 2017).

1.4 Metabolitos especializados en plantas

Como se mencionó anteriormente, la importancia de los berries, y en particular de *B. microphylla* y *L. apiculata*, radica en su capacidad para sintetizar compuestos bioactivos, los cuales se producen durante su metabolismo.

El metabolismo corresponde al conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener moléculas simples (Shih & Morgan 2020). En el caso de las plantas, estas reacciones permiten la producción de cientos de metabolitos que han sido aprovechados por el ser humano como fuente de alimento y de compuestos químicos de gran interés en distintas industrias como la farmacéutica y nutraceútica. Estas moléculas producidas por las plantas se clasifican en metabolitos primarios y especializados (también denominados secundarios). Los metabolitos primarios, son compuestos esenciales para el

funcionamiento de las plantas porque cumplen un rol estructural o participan en las reacciones vitales del organismo como crecimiento, desarrollo y reproducción. Por otro lado, los metabolitos especializados, no cumplen funciones definidas en los procesos vitales, sin embargo, juegan un papel fundamental en la interacción del organismo con su ambiente, al contribuir a su defensa, adaptación y supervivencia en el ecosistema (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

La síntesis de metabolitos especializados suele estar restringida a estados específicos del desarrollo vegetal y a resistencia a factores adversos. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a una determinada familia de plantas, a un género, o incluso a algunas especies específicas (Shih & Morgan 2020).

Según las sendas metabólicas, los metabolitos especializados pueden clasificarse en glicósidos, alcaloides (compuestos nitrogenados), compuestos fenólicos y terpenos (Buchanan et al., 2015). Estos metabolitos cumplen funciones ecológicas específicas, como atraer o repeler animales. Algunos actúan como pigmentos que proporcionan colores a flores y frutos, lo que facilita la polinización y la dispersión de semillas al atraer a insectos polinizadores o a animales que utilizan los frutos como fuente de alimento (Buchanan et al., 2015). Otros tienen función protectora, actuando como repelentes o generando sabores amargos o tóxicos, que los hacen indigestas o venenosos (Shih & Morgan, 2020). Además, muchos de estos compuestos participan activamente en los mecanismos de defensa frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Lee et al., 2015; Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

1.4.1 Compuestos fenólicos

1.4.1.1 Clasificación

Los compuestos fenólicos, o polifenoles, constituyen uno de los grupos más importantes y numerosos de metabolitos especializados en las plantas. Tienen estructuras muy diversas y cumplen diferentes funciones. Están constituidos por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilos, y que comúnmente se encuentran conjugados a un azúcar o a ácidos

orgánicos (Porrás-Loaiza & López-Malo, 2009). La estructura de su esqueleto de carbono determina su clasificación (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019):

- Clase C6: contienen un sólo anillo de benceno (entre los fenoles simples están el catecol, la hidroquinona y el floroglucinol, entre otros)
- Clase C6-Cn: poseen un anillo C6 con una cadena de carbono que contiene de uno a cuatro, o siete átomos de carbono.
- Clase C6-C1: categoría limitada que incluye ácido benzoico y derivados de benzaldehído.
- Clase C6-C2: incluye derivados hidroxilados y/o metoxilados del ácido fenilacético, acetofenona y alcohol fenético, denominados feniletanoides.
- Clase C6-C3: incluye los fenilpropanoides, es decir, ácidos hidroxicinámicos, aldehídos cinámicos, monolignol, fenil propenos, cumarinas, isocumarinas y cromonas, (los monolignoles son los precursores para la biosíntesis de lignanos y ligninas).
- Clase C6-Cn-C6: presentan un esqueleto más complejo donde la cadena de carbono se une además a un segundo anillo de benceno; es una amplia clase de compuestos fenólicos que incluyen los xantonoides, estilbenoides, 5 antraquinonas, antronas; la familia de flavonoides; y los diaril heptanoides.

Los compuestos fenólicos más abundantes son los flavonoides, pigmentos responsables de los colores rojo, rosado, morado y azul, entre estos destacan los flavanoles, flavonoles y antocianinas, compuestos que protegen a los tejidos vegetales frente al daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, contaminación y otros agentes reactivos (Khoo et al., 2017).

1.4.1.2 Síntesis

La biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas se origina principalmente a partir de dos rutas metabólicas: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. Esta última es común en hongos y bacterias, pero poco frecuente en plantas. En cambio, la ruta del ácido shikímico es la principal vía por la cual las plantas sintetizan compuestos fenólicos

(Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019). En esta ruta, a partir de eritrosa-4-P y ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que dan origen al ácido shikímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). Entre ellos, la fenilalanina es el precursor principal de la mayoría de los compuestos fenólicos en plantas (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019). La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la conversión de fenilalanina en ácido cinámico, liberando una molécula de amonio. Esta reacción representa un punto de ramificación entre el metabolismo primario y especializado, y constituye una etapa reguladora fundamental en la producción de fenoles (Buchanan et al., 2015). A partir del ácido cinámico, se originan compuestos intermedios como el ácido p-cumárico, a través de reacciones de hidroxilación. Este compuesto, junto con otros derivados, como los ácidos ferúlico y cafeico, actúa como precursor en la síntesis de fenoles más complejos, tales como flavonoides, lignina taninos, isoflavonoides y cumarinas (Pérez-Urrúa & Ávalos, 2009; Buchanan et al., 2015).

1.4.1.3 Actividad biológica

Actualmente, los compuestos fenólicos se consideran una de las familias de productos naturales más investigadas debido a sus propiedades bioactivas, entre las que se incluyen su actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena y potencial como conservantes naturales de alimentos. Entre ellas, la capacidad antioxidante es la más estudiada y se considera la actividad biológica responsable del efecto preventivo de enfermedades de origen cardíaco e inmunológico (Fernandes de Araújo et al., 2021). Esta actividad se basa en la capacidad de estos compuestos para neutralizar los radicales libres, moléculas inestables y altamente reactivas generadas en el organismo como consecuencia de factores ambientales, incluidos la contaminación atmosférica, la radiación ultravioleta y ciertas toxinas. Los radicales libres, al poseer un electrón desapareado, reaccionan con componentes celulares esenciales, como lípidos de membrana, proteínas y ADN, provocando daño oxidativo que contribuye al envejecimiento celular y al desarrollo de diversas patologías (Echavarría et al., 2009). En este contexto, los compuestos fenólicos ejercen su acción antioxidante al donar átomos de hidrógeno a los radicales libres, estabilizándolos y reduciendo su reactividad, lo

que ayuda a prevenir el daño celular (Echavarría et al., 2009; Fernandes de Araújo et al., 2021).

1.4.2 Obtención compuestos fenólicos bioactivos en B. microphylla y L. apiculata

Los estudios previos sobre compuestos bioactivos de *B. microphylla* y *L. apiculata* se han concentrado principalmente en extractos obtenidos a partir de los frutos, donde se han reportado altos niveles de ácidos fenólicos, flavonoles y antocianinas, además de alta capacidad antioxidante en comparación con otras especies de berries nativas de Chile (Ruiz et al., 2010; Simirgiotis et al., 2013; Brito et al., 2014). En el caso de *B. microphylla*, los extractos de hojas también muestran una alta concentración de ácidos fenólicos y flavonoles en comparación con otras especies del mismo género (Nova-Baza et al., 2022), mientras que, en raíces, han confirmado la presencia de compuestos bioactivos como flavonoides y taninos (Furrianca et al., 2017). De igual manera, los extractos de hojas de *L. apiculata* han mostrado altas concentraciones de polifenoles y una considerable capacidad antioxidante (Carrasco et al., 2022).

Diversas investigaciones han evidenciado una serie de efectos beneficiosos obtenidos a partir de extractos de *B. microphylla* y *L. apiculata* que aumentan el interés en el estudio de estos compuestos. En el caso de *B. microphylla*, los extractos de raíces presentaron actividad hipoglucemiante, aumentando el consumo de glucosa en condiciones de sensibilidad y resistencia a la insulina (Furrianca et al., 2017). Los extractos de fruto mostraron influencia en la lipoperoxidación, lo que sugiere un potencial efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares (Olivares-Caro et al., 2020). Además, estos extractos con mayor contenido de antocianinas han reducido la viabilidad *in vitro* y la capacidad de migración de líneas celulares de cáncer gástrico y de vesícula biliar (Calderón-Reyes et al., 2020). En *L. apiculata* se ha reportado actividad antimicrobiana en los extractos obtenidos a partir de hojas y fruto, que actúan contra los patógenos *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Treulen et al., 2019; Viktorová et al., 2020). Esta actividad se evaluó realizando un recubrimiento comestible en fresas, que inhibió el crecimiento de diferentes bacterias patógenas y levaduras de descomposición (Benavides & Franco, 2023).

La mayoría de los estudios asociados a la obtención de compuestos fenólicos en *B. microphylla* y *L. apiculata*, son para extractos obtenidos de material vegetal procedente de plantas cultivadas o silvestres. La mayoría de las investigaciones previas utilizan los frutos por ser la principal fuente de estos compuestos; sin embargo, la obtención de los frutos está limitada a las épocas de fructificación, lo que restringe la disponibilidad del material vegetal. Por otra parte, se ha demostrado que frutos de *B. microphylla* que crecen en diferentes localidades presentan diferencias en cuanto al contenido de fenoles, antocianinas totales y capacidad antioxidante, lo que sugiere que factores ambientales, como el clima, pueden influir en la síntesis de estos compuestos (Mariangel et al., 2013; Arena et al., 2021).

1.4.3 Cultivo de tejidos vegetales para la obtención de compuestos fenólicos

La recolección de plantas silvestres para la obtención de compuestos bioactivos en *B. microphylla* y *L. apiculata* puede llevar a una sobreexplotación de las especies, comprometiendo su conservación y alterando el equilibrio de los ecosistemas en que se desarrollan. Además, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han centrado en material vegetal proveniente de frutos, cuya disponibilidad está condicionada por los periodos de fructificación. Estas limitaciones, representan un desafío considerable para el desarrollo de estrategias sostenibles orientadas a la producción de compuestos fenólicos en *B. microphylla* y *L. apiculata*.

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* representa una herramienta biotecnológica clave para la obtención de estos metabolitos especializados, ofreciendo ventajas significativas como la consistencia y homogeneidad en la producción de estos compuestos. Esta técnica permite una producción controlada y continua, minimizando el impacto ambiental y eliminando riesgos de contaminación (Dias et al. 2016). Además, facilita la modificación y optimización de los procesos, lo que favorece la obtención de los compuestos fenólicos, junto con la posibilidad de realizar cosechas continuas. También permite proporcionar condiciones de estrés específicas que estimulan su biosíntesis y liberación por los tejidos vegetales (Matkowski, 2008).

Si bien existen diversos estudios sobre la obtención de compuestos fenólicos bioactivos en *B. microphylla* y *L. apiculata*, no se han realizado estudios sobre la síntesis de estos compuestos desde material producido a partir de cultivo *in vitro*. Sin embargo, estudios realizados en especies afines sugieren el potencial de esta técnica. En *Berberis Chitria*, se evaluó el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante en hojas obtenidas desde cultivo *in vitro* y de plantas silvestres. Los resultados mostraron que las plantas cultivadas *in vitro* presentaron los mayores valores superiores en ambos parámetros (Pandey et al., 2013). De manera similar, en *Aristotelia chilensis*, berrie nativo de Chile, se comparó el contenido de compuestos fenólicos en hojas de plantas adultas, considerando diferentes estados de desarrollo y épocas del año, en comparación con hojas obtenidas a partir de microtallos procedentes de cultivo *in vitro*. Los resultados mostraron que el contenido total de fenoles fue mayor en las muestras *in vitro*, y que los compuestos identificados en las muestras *ex vitro* coincidieron en su mayoría con los presentes en los extractos de hojas cultivadas *in vitro* (Crisóstomo-Ayala et al., 2021).

Considerando los antecedentes mencionados y las propiedades bioactivas que caracterizan a *B. microphylla* y *L. apiculata*, la presente investigación evaluará el contenido y diversidad de compuestos fenólicos bioactivos en tejidos vegetales de ambas especies obtenidos a partir de propagación *in vitro*, y compararlos con aquellos provenientes de plantas que crecen en su ambiente natural. De esta forma, se busca contribuir al desarrollo de estrategias más sostenibles y eficientes para la producción de metabolitos fenólicos de interés biotecnológico.

HIPÓTESIS

La proliferación *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata* induce cambios favorables en la síntesis de compuestos fenólicos bioactivos con respecto a los obtenidos desde plantas que crecen en su ambiente natural.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar el contenido de compuestos fenólicos bioactivos en *B. microphylla* y *L. apiculata* a partir de plantas provenientes de cultivo *in vitro* y plantas que crecen en ambiente natural.

Objetivos específicos

- Establecer cadenas proliferativas *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*.
- Determinar compuestos fenólicos y antocianinas totales en extractos de plantas de *B. microphylla* y *L. apiculata*, provenientes de proliferación *in vitro* y de su ambiente natural.
- Determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de fenoles y antocianinas totales de *B. microphylla* y *L. apiculata*, provenientes de proliferación *in vitro* y de su ambiente natural.
- Evaluar la influencia de la proliferación *in vitro* en la síntesis de fenoles bioactivos de *B. microphylla* y *L. apiculata*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Brotes y frutos de *B. microphylla* fueron colectados camino a Puerto Aysén, región de Aysén (45°24'11.7"S 72°39'37.8"W), mientras que brotes de *L. apiculata* fueron colectados en Concepción, región del Biobío (36°49'40.2"S 73°02'13.1"W). En este estudio, el término *ex vitro* se empleó para referirse al material proveniente de plantas crecidas en condiciones naturales. El material vegetal fue transportado dentro de cajas isotérmicas de poliestireno expandido (EPS) con bolsas de gel refrigerante, para mantener la cadena de frío durante el traslado. Los brotes fueron envueltos en papel humedecido para preservar su hidratación y posteriormente cubiertos con film plástico. En el laboratorio, las hojas de los brotes fueron limpiadas y almacenadas a -20°C hasta su análisis, mientras que las semillas se mantuvieron a 4°C. Estas últimas fueron extraídas del fruto, lavadas con abundante agua corriente y, tras el secado, almacenadas bajo refrigeración.

2.2 Establecimiento *in vitro*

Germinación de embriones de B. microphylla

Se evaluaron diferentes condiciones para la germinación *in vitro* de embriones de *Berberis microphylla* mediante seis tratamientos experimentales, que combinaron dos temperaturas de hidratación de semillas (4 °C y 20 °C, durante 48 horas) con tres medios de cultivo basal: Woody Plant Medium (WPM; Lloyd & McCown, 1980), Driver and Kuniyuki Walnut (DKW; Driver & Kuniyuki, 1984) y Murashige and Skoog (MS; Murashige & Skoog, 1962) (Tabla 1). Las semillas se lavaron con agua corriente utilizando detergente comercial (Quix), luego se trataron con una mezcla fungicida de captan y benomilo (1:1) durante 10 minutos. La desinfección se realizó en cámara de flujo laminar mediante inmersión en etanol al 70% por 5 minutos, seguida de tres lavados secuenciales con agua destilada estéril (ADE) por 1, 3 y 5 minutos. Posteriormente, se aplicó hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5% durante 1 minuto, seguido de tres lavados adicionales con ADE en los mismos tiempos.

Los embriones fueron extraídos manualmente desde las semillas para eliminar barreras físicas y favorecer su germinación. Esta estrategia ha sido reportada en otras especies de

Berberis, donde la eliminación de la cubierta de las semillas aumenta significativamente las tasas de germinación (de Castro et al., 2023). Los embriones se cultivaron en 5 mL de los medios basales mencionados anteriormente (n= 30 por tratamiento), suplementados con 20 g·L⁻¹ de sacarosa y 3 g·L⁻¹ de gelrite, con pH ajustado a $5,8 \pm 0,05$ con NaOH 0,1 M. Se incubaron a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante dos semanas, y luego se expusieron a un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad, bajo iluminación fluorescente ($37 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). A las tres semanas, se registró el número de embriones germinados y la longitud de los brotes.

Tabla 1. Tratamientos de temperaturas de remojo de semillas y medios de cultivo en germinación *in vitro* de *B. microphylla*.

Tratamientos	Temperatura remojo ($^{\circ}\text{C}$)	Medio de cultivo
1	4	MS
2	4	DKW
3	4	WPM
4	20	MS
5	20	DKW
6	20	WPM

2.3 Proliferación *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*

Se utilizaron brotes en fase de proliferación *in vitro* obtenidos a partir de semillas, los cuales se homogeneizaron en medio WPM sin reguladores de crecimiento durante dos semanas. Posteriormente, se iniciaron cadenas de proliferación a partir de explantes, brotes de 1,5-2 cm de longitud y con al menos dos yemas. Los explantes fueron cultivados en medio basal WPM suplementado con 30 g·L⁻¹ de sacarosa, 3 g·L⁻¹ de gelrite y 1 g·L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), para disminuir la oxidación de los tejidos. Se evaluaron diferentes concentraciones de las hormonas 6-Bencilaminopurina (BAP) y ácido indol-3-butírico (IBA) (Tabla 2). En cada frasco se colocaron cuatro explantes con 20 mL de medio de cultivo (n = 32 brotes por tratamiento). El pH del medio se ajustó a $5,8 \pm 0,05$ con NaOH 0,1 M. Los cultivos se mantuvieron en cámara de crecimiento bajo las condiciones descritas en el acápite 2.2. Se registró el número y la longitud de brotes luego de tres subcultivos de 21 días. El

coeficiente de multiplicación se calculó como la relación entre el número final de brotes y el número inicial de brotes.

Tabla 2. Tratamientos con diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) y ácido indol-3-butírico (IBA) en la proliferación de brotes de *B. microphylla* y *L. apiculata*.

Tratamientos	BAP (μM)	IBA (μM)
1	0	0
2	2,2	0,25
3	4,4	0,49

2.4 Extracción y cuantificación de fenoles totales

La extracción de fenoles totales y su cuantificación se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Gurr et al., (1992). Se maceraron 0,1 g de material vegetal de *B. microphylla* y *L. apiculata* provenientes de condiciones *ex vitro* e *in vitro*, en un mortero durante 5 min con 1 mL de agua/metanol 1:1 (v/v) y se centrifugaron a $13\,000\times g$ por 10 min. Los sobrenadantes obtenidos se colectaron para determinar el contenido de fenoles solubles y el pellet se utilizó para determinar el contenido de fenoles ligados. Se realizó hidrólisis básica a los pellets y se colectó el sobrenadante. Los extractos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Para determinar el contenido de fenoles totales se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi (1965). Para la cuantificación se utilizaron 100 μL de los extractos de fenoles solubles y ligados por separado, y fueron diluidos en 900 μL de agua destilada cada uno. Luego se adicionaron 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar por 5 minutos, transcurrido el tiempo se añadió 600 μL de una solución de NaOH 1 M saturada con Na_2CO_3 . La mezcla se incubó por una hora a temperatura ambiente para permitir la reacción y el desarrollo del color azul. Las absorbancias fueron medidas a 725 nm. El contenido de compuestos fenólicos fue expresado en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (PS), referidos a una curva patrón de ácido gálico. Las extracciones y cuantificación fueron realizadas por triplicado.

2.5 Extracción y cuantificación de antocianinas totales

Los extractos de antocianinas se prepararon de acuerdo con la metodología de García-Seco et al. (2015), con algunas modificaciones. Se agregaron 0,1 g de material liofilizado en 1 mL de metanol acidificado al 80%, se sonicó 10 min en baño ultrasónico y se centrifugó a $4\,000\times g$ durante 5 min. El sobrenadante se colectó y se utilizó para la determinación del contenido de antocianinas totales CAT por el método de pH diferencial de acuerdo con la metodología de Giusti & Wrolstad. (2001). Se colocaron 200 μL de muestra a dos tubos separados, uno con 800 μL de solución tampón de cloruro de potasio (pH: 1,0) y otro con 800 μL de tampón de acetato de sodio (pH: 4,5). Las soluciones se dejaron reaccionar por 20 min en oscuridad. Las absorbancias se leyeron a 510 y 700 nm. Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar de cianidina-3 glucósido (26 900) y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de cianidina-3-glucósido $\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (mg Cy3GE $\cdot\text{g}^{-1}$ PS). Las extracciones y cuantificación fueron realizadas por triplicado.

2.6 Análisis LC-MS.

Para la preparación de las muestras, se adicionaron 120 μL de los extractos correspondientes a fenoles solubles y fenoles ligados a 880 μL de metanol al 80% (en agua, v/v) a 4°C, se agitaron durante 30 s a 30 Hz y se centrifugaron durante 10 min a $13.300\times g$. El análisis metabolómico se llevó a cabo mediante LC-MS/MS en un sistema de cromatografía líquida de ultra alta resolución (Elute UHPLC, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) equipado con un detector de matriz de diodos (Elute DAD) y acoplado en tándem con un espectrómetro de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo fuera de línea equipado con una fuente de iones de electrospray a presión atmosférica (Compact ESI-QTOF, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). La separación cromatográfica se realizó en una columna Kinetex C18 UHPLC (100 $\times$ 3,0 mm, 1,7 μm ; Phenomenex) utilizando una precolumna Security Guard Ultra Cartridge UHPLC C18 de 3,0 mm y mantenida a 30°C. La fase móvil consistió en disolvente A (ácido fórmico al 0,1 % en agua Milli-Q, v/v) y disolvente B (ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo hipergrado, v/v) a un caudal de 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. La elución en gradiente comenzó con un tiempo de equilibrio de 2,0 min al 5% de B y continuó de la

siguiente manera: 0,0 – 15,0 min, 5 – 35 % B lineal; 15,0 – 15,5 min, 35 – 100% B lineal; 15,5 – 18,5 min, 100 % B; 18,5-19,5 min, 100 – 5 % B lineal. El volumen de inyección fue de 2,0 µl. El DAD se operó en el rango de longitud de onda de 194 nm a 600 nm a una velocidad de adquisición de datos de 10,0 Hz.

El espectrómetro de masas se operó en modo ESI negativo con adquisición auto-MS/MS dependiente de los datos. Los parámetros de MS se ajustaron de la siguiente manera: rango de masas: 50 – 1500 m/z; tiempo de ciclo de barrido: 0,2 s; temperatura de secado: 200°C; voltaje capilar, 3,5 kV (–ESI); desplazamiento de la placa terminal, 0,5 kV; flujo de gas de desolvatación: 9,0 L·min⁻¹ (N₂); presión del nebulizador: 4,0 bar. Los espectros MS/MS se adquirieron de cada barrido sometiendo iones (máximo 2) a disociación inducida por colisión (CID) si sus intensidades absolutas superaban las 1000 cuentas por ciclo de 0,2 s, con una energía de colisión variable en el rango de 20 a 50 eV. Se aplicó la exclusión activa del ion precursor después de un espectro, y se reconsideró la fragmentación si su intensidad era al menos igual a la medida previamente. Como referencia interna, se bombeó continuamente una solución de formiato de sodio (10 mM en iso-PrOH/H₂O, 1:1, v/v) a una velocidad de 1 µL·min⁻¹ a través de una válvula de seis puertos, de modo que se suministraran 20 µL al espectrómetro de masas justo antes de cada análisis.

2.7 Actividad biológica

2.7.1 Actividad antioxidante

La capacidad de eliminación de radicales libres se determinó en los extractos de fenoles y antocianinas totales mediante los ensayos DPPH y ABTS. Para ambos ensayos se elaboró una curva estándar tomando como analito de referencia Trolox, y los resultados se expresaron como µmol equivalentes de Trolox por g de peso seco (µmol TE g⁻¹ PS). Las absorbancias se midieron con un lector de microplacas (Biotek Epoch Microplate, Santa Clara, CA, USA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo DPPH

El ensayo con el radical DPPH[•] se realizó según el método desarrollado por Brand et al. (1995), con algunas modificaciones. Brevemente, se preparó una solución diluida de radical DPPH[•] con 0,002 g de DPPH en 40 mL de metanol. Se agregaron primero 10 mL de metanol

y se dejó incubando a temperatura ambiente en agitador orbital durante 30 min en oscuridad, luego se añadieron los otros 40 mL de metanol a la solución. Para la lectura de los extractos, se agregaron 50 μ L de la muestra y 200 μ L de la solución diluida de radical DPPH $^{\bullet}$, se agitó vigorosamente y se dejó reaccionar durante 20 min a temperatura ambiente ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$) en oscuridad. Luego se midió la absorbancia a 517 nm.

Ensayo ABTS

El ensayo con el radical ABTS $^{+\bullet}$, 2,2' azinobis-(3- etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico), se realizó según el método desarrollado por Re et al. (1990), con algunas modificaciones. El radical fue generado mezclando 0,0388 g de ABTS y 0,0066 g de persulfato de potasio en 10 mL de agua destilada e incubado en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 h. Una vez formado el radical ABTS $^{+\bullet}$ se diluyó con tampón fosfato 50 mM a pH 7.4 hasta obtener un valor de absorbancia de $1 \pm 0,01$ a 734 nm. Para la lectura de los extractos, se preparó 10 μ L de muestra y 190 μ L de radical ABTS $^{+\bullet}$ diluido, se agitó vigorosamente y se dejó reaccionar durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se midió la absorbancia a 734 nm.

2.7.2 Actividad antimicrobiana contra cepas bacterianas y fúngicas patógenas

La actividad antimicrobiana fue evaluada utilizando extractos de compuestos fenólicos solubles y ligados, previamente liofilizados y resuspendidos en ADE, manteniendo un volumen de resuspensión equivalente al volumen original de cada extracto. Las pruebas se realizaron contra cepas microbianas patógenas: *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Candida albicans* (CIPROVE), *Candida glabrata* (CIPROVE), *Candida tropicalis* (CIPROVE). El ensayo se realizó mediante el método de difusión en agar, basado en el procedimiento descrito por Bauer et al. (1966), con modificaciones de acuerdo con Cotabarren et al. (2023). Las suspensiones microbianas fueron ajustadas con solución fisiológica estéril a la escala de McFarland de $0,3 (10^5 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1})$. Para los ensayos, se aplicaron 200 μ L de extracto sobre placas de agar Sabouraud previamente inoculadas. Como control negativo se utilizó ADE. Las placas fueron incubadas a 36°C durante 24h. La actividad antimicrobiana fue evaluada

midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, expresados en milímetros (mm).

2.8 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software InfoStat (Infostat, Córdoba, Argentina). Se realizaron análisis de ANOVA para determinar diferencias significativas entre medias. Para determinar la homogeneidad de varianzas se aplicó prueba de Levene's (valor $p < 0,05$). Para comparar las medias de los experimentos se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan (valor $p < 0,05$). El coeficiente de correlación de Pearson (r) se utilizó para analizar la correlación entre variables y se determinó la significación estadística del índice de Pearson (valor $p < 0,05$).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Germinación *in vitro* de *B. microphylla*

La temperatura de remojo de las semillas (4°C y 20°C durante 48 horas), previa a la extracción y establecimiento *in vitro* de embriones de *B. microphylla*, tuvo un efecto significativo sobre los porcentajes de germinación (Tabla 3). Los tratamientos con hidratación a 4°C (tratamientos 1, 2 y 3), mostraron los valores más altos de germinación, superando los reportados en estudios previos. Di Sario et al. (2023) aplicaron pretratamientos con ácido sulfúrico durante 60 min a semillas, las cuales fueron incubadas en medio MS suplementado con ácido ascórbico, obteniendo 4,44% de germinación y una alta contaminación del 62,22%. De forma similar, Mc Leod et al. (2015) evaluaron cinco pretratamientos (control, una semana a baja temperatura, y exposiciones a ácido sulfúrico por 10, 20 y 60 min) en semillas de 10 genotipos de calafate provenientes de distintas localidades. Los porcentajes de germinación oscilaron entre 17% y 83%, evidenciando la presencia de dormancia embrionaria en la mayoría de las líneas, siendo el tratamiento con ácido sulfúrico por 60 min el más efectivo en una de las líneas, bajo condiciones de luz de 16/8 h (día/noche).

Tabla 3. Efecto de diferentes temperaturas de remojo de semillas y medios de cultivo en germinación *in vitro* de semillas de *B. microphylla* luego de 2 semanas.

Tratamientos	Longitud brotes (mm)	Germinación (%)	Contaminación (%)
	Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE
1	17,07 $\pm$ 0,3 a	55,6 $\pm$ 2,2 a	15,6 $\pm$ 2,2 b
2	15,23 $\pm$ 0,4 a	66,7 $\pm$ 3,8 a	6,7 $\pm$ 3,9 b
3	18,33 $\pm$ 0,8 a	71,1 $\pm$ 2,2 a	4,4 $\pm$ 2,2 b
4	16,76 $\pm$ 1,0 a	22,2 $\pm$ 4,4 b	60,0 $\pm$ 3,9 a
5	17,50 $\pm$ 0,5 a	28,9 $\pm$ 2,2 b	66,7 $\pm$ 6,7 a
6	17,09 $\pm$ 1,0 a	31,1 $\pm$ 2,2 b	51,1 $\pm$ 5,9 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

La aplicación de temperaturas bajas como pretratamiento contribuye a romper la latencia fisiológica de las semillas, mediante un proceso conocido como estratificación húmeda fría. Esta técnica simula las condiciones invernales (4-10°C), lo que favorece la ruptura de la latencia en diversas especies vegetales (Varela & Arana, 2011). En *B. microphylla*, este proceso es fundamental ya que sus semillas, en condiciones naturales de crecimiento, requieren una exposición prolongada a bajas temperaturas para superar la dormancia y favorecer la germinación con el aumento de temperatura y humedad en primavera (Radice et al., 2018).

Los medios de cultivo utilizados no influyeron por sí solos en los parámetros evaluados. En cuanto al porcentaje de contaminación, los tratamientos 1, 2 y 3, que incluyeron un pretratamiento de hidratación a 4 °C, presentaron valores significativamente menores en comparación con los tratamientos 4, 5 y 6 a 20°C, lo que sugiere que las bajas temperaturas inhibieron el crecimiento de microorganismos sensibles al frío. En cuanto a la longitud de los brotes obtenidos, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, con promedios que oscilaron entre 15,23 y 18,33 mm. Si bien los medios de cultivo por sí solos no tuvieron un efecto claro sobre la germinación, el tratamiento 3 (Figura 1A y 1B), que combinó el medio WPM con baja temperatura, registró la mayor tasa de germinación (71,1 %) y fue seleccionado para la siguiente etapa experimental. Estos resultados coinciden con lo reportado por Pandey et al. (2013) en *Berberis chitria*, donde el medio WPM favoreció una germinación significativamente mayor (78,89 %) en comparación con el medio MS (50 %), lo cual es coherente con los tratamientos 1 y 3 del presente estudio.

3.2 Multiplicación *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*

Los resultados del efecto del uso de medio WPM, suplementado con diferentes concentraciones de BAP e IBA, sobre la multiplicación de brotes de *B. microphylla* y *L. apiculata* se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de BAP e IBA en la proliferación de brotes *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*.

Especies	Tratamientos	Número de brotes	Longitud de brotes (mm)	Coefficiente de multiplicación
		Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE
<i>Berberis microphylla</i>	1	0,07 $\pm$ 0,1 c	18,6 $\pm$ 0,1 b	1,07 $\pm$ 0,1 c
	2	3,14 $\pm$ 0,0 a	23,4 $\pm$ 0,0 a	4,11 $\pm$ 0,1 a
	3	1,20 $\pm$ 0,0 b	19,3 $\pm$ 0,0 b	2,45 $\pm$ 0,1 b
<i>Luma apiculata</i>	1	0,25 $\pm$ 0,0 c	24,0 $\pm$ 0,1 b	1,35 $\pm$ 0,1 c
	2	3,47 $\pm$ 0,1 a	24,9 $\pm$ 0,0 a	4,37 $\pm$ 0,1 a
	3	2,45 $\pm$ 0,2 b	21,2 $\pm$ 0,0 b	3,45 $\pm$ 0,2 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los brotes cultivados *in vitro* se obtuvieron luego tres subcultivos de 21 días para el análisis.

Ambas especies mostraron resultados similares frente a los tratamientos aplicados. Se observó que los reguladores de crecimiento tuvieron una influencia significativa en el desarrollo y multiplicación de brotes. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otras especies del mismo género como *Luma chequen*, *Berberis asiática* y *Berberis chitria*, en donde la adición de reguladores de crecimiento fue fundamental para estimular la formación y multiplicación de brotes en condiciones *in vitro* (Mancilla et al., 2013; Bisht et al., 2022; Sharma et al., 2023). En nuestro estudio, la combinación de 2,2 μ M de BAP + 0,25 μ M de IBA (tratamiento 2) fue la más efectiva para la multiplicación de brotes en ambas especies (Figura 1C y 1D). De manera similar en Arena et al. (2000) se demostró que el índice de multiplicación de *B. microphylla* cultivado *in vitro* se ve favorecido con la adición de 2,2 μ M de BAP durante tres subcultivos consecutivos. En contraste, el tratamiento control (tratamiento 1, WPM sin hormonas) no indujo la formación de nuevos brotes en ninguna de las especies y en el caso de *B. microphylla*, la mayoría de los explantes presentaron necrosis y murieron.

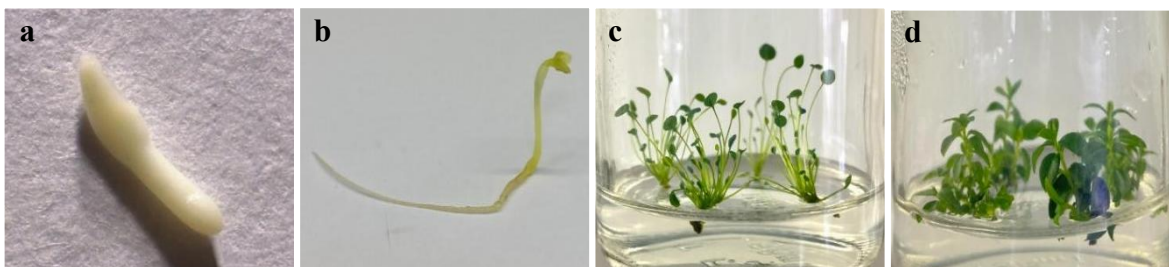


Figura 1. Germinación *in vitro* y multiplicación de brotes de *B. microphylla* y *L. apiculata*. (a): embrión aislado desde semilla de *B. microphylla* previamente remojada a 4°C por 48h, (b): plántula de *B. microphylla* obtenida desde medio WPM durante 2 semanas. (c-d): multiplicación *in vitro* de brotes de *B. microphylla* y *L. apiculata* en medio WPM (2,2 μ M BAP + 0,25 μ M IBA), luego de tres subcultivos de 21 días.

3.3 Contenido de fenoles y antocianinas totales de *B. microphylla* y *L. apiculata*

El contenido de fenoles y antocianinas totales de extractos obtenidos a partir de brotes cultivados *in vitro* y hojas cultivadas *ex vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata* se presentan en la Figura 2. Al analizar el contenido de fenoles solubles (Figura 2A), los extractos de hojas *ex vitro* mostraron concentraciones significativamente mayores en comparación con los brotes cultivados *in vitro* (89,49 mg EAG g⁻¹ PS para *B. microphylla*, seguido de *L. apiculata* 54,59 mg EAG g⁻¹ PS). Para los extractos procedentes del cultivo *in vitro* los mayores contenidos de fenoles solubles se registraron en *B. microphylla* (31,57 mg EAG g⁻¹ PS) con diferencias significativas con los extractos de *L. apiculata in vitro* (23,53 mg EAG g⁻¹ PS).

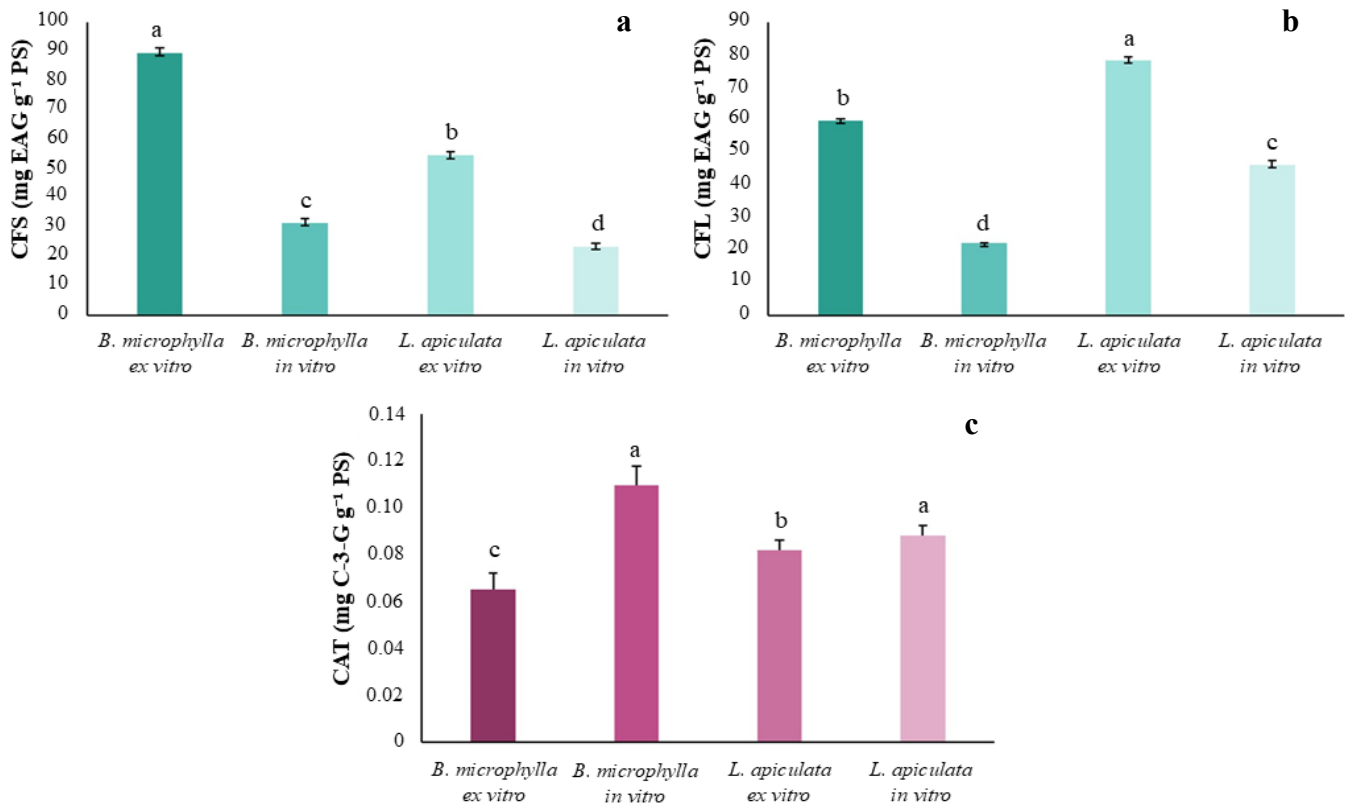


Figura 2. Contenido de compuestos fenólicos en hojas *ex vitro* y brotes *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*. (a): contenido de fenoles solubles (CFS), (b): contenido de fenoles ligados (CFL) y (c): contenido de antocianinas totales (CAT). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

El análisis del contenido de fenoles ligados (Figura 2B) arrojó que las mayores concentraciones se obtuvieron en extractos de hojas *ex vitro* de *L. apiculata* (78,41 mg EAG g⁻¹ PS) seguidos por los extractos de hojas *ex vitro* *B. microphylla* (59,90 mg EAG g⁻¹ PS). Para los extractos procedentes del cultivo *in vitro*, también se cuantificaron mayores contenidos de fenoles ligados en brotes de *L. apiculata* (46,33 mg EAG g⁻¹ PS) que fueron significativamente superiores a los obtenidos en *B. microphylla in vitro* (22,11 mg EAG g⁻¹ PS).

Por otro lado, los contenidos de antocianinas totales (Figura 2C) fueron bajos en todos los extractos analizados. Sin embargo, los brotes *in vitro* presentaron concentraciones significativamente mayores en comparación con las hojas *ex vitro*. En *B. microphylla*, los

brotes *in vitro* alcanzaron 0,108 mg C-3-G g⁻¹ PS, mientras que en *L. apiculata* se registraron 0,104 C-3-G g⁻¹ PS. En contraste, los extractos de hojas *ex vitro* presentaron valores menores, con 0,065 y 0,082 mg C-3-G g⁻¹ PS, respectivamente. Estos valores, si bien son considerablemente inferiores a los reportados en frutos de *B. microphylla* y *L. apiculata* por Ramirez et al., 2015 (22,91 y 15,24 mg C-3-G g⁻¹ PS, respectivamente) y Salehi et al., 2021 (51.62 y 21,03 mg C-3-G g⁻¹ PS, respectivamente), los resultados evidencian que las condiciones de cultivo *in vitro* permitieron la síntesis y acumulación detectable de estos compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos, entre ellos las antocianinas, se producen habitualmente como parte de los mecanismos de defensa de las plantas frente a ataques al tejido vegetal o condiciones ambientales adversas, como temperaturas extremas, variaciones en la intensidad lumínica o desequilibrios de pH (Dias et al., 2016). El alto contenido de fenoles en hojas *ex vitro* puede ser debido a que, en condiciones naturales de crecimiento, las plantas están más expuestas a diferentes factores de estrés, tanto biótico como abiótico. Por lo que, una exposición prolongada a estos factores podría haber inducido una mayor síntesis de estos compuestos, en contraste con brotes *in vitro*, en los que al estar expuestos a condiciones ambientales controladas se podría limitar la síntesis de fenoles. Aun así, la producción de estos metabolitos en estas condiciones puede atribuirse a los distintos tipos de estrés a los que es sometido el tejido vegetal durante la etapa de establecimiento, lo que desencadena respuestas metabólicas de defensa. Factores como la exposición a agentes desinfectantes y el daño mecánico generado durante la preparación de los explantes pueden inducir estrés oxidativo, activando rutas metabólicas secundarias responsables de la biosíntesis de compuestos antioxidantes (Dias et al., 2016).

Estudios previos han informado resultados similares, evidenciando que el tipo de cultivo y la etapa de desarrollo de la planta influyen en la síntesis de compuestos fenólicos, con concentraciones mayores en plantas que crecen en condiciones naturales en comparación con plántulas cultivadas *in vitro* (Nikolova et al., 2013; Mishra et al., 2021). Además, Mariangel et al. (2013), evaluaron la composición fitoquímica de frutos de *B. microphylla* provenientes de distintas áreas geográficas del sur de Chile y encontraron diferencias estadísticamente

significativas en los contenidos de fenoles y antocianinas totales, atribuyendo esta variación a la influencia de la región de crecimiento.

3.4 Análisis LC-MS

Los extractos de fenoles solubles y fenoles ligados fueron analizados mediante espectrometría de masas, utilizando un modo de ion negativo. Los cromatogramas de pico base se muestran en la Figura 3 y Figura 4. Los compuestos fenólicos mayoritarios se caracterizaron tentativamente de acuerdo con la estructura química que se asignó mediante fragmentación *in silico* con el software Sirius, al igual que por comparación de características UV-visible y análisis de espectros MS y MS/MS, con datos previamente publicados. En las tablas 5-8 se muestran las propiedades cromatográficas y espectroscópicas de cada compuesto. Los extractos de ambas especies presentaron dos grupos fenólicos principales: Ácidos fenólicos y flavonoides, entre los de que destacan derivados de ácidos cinámicos y flavonoles.

En *B. microphylla*, los compuestos más abundantes en los extractos de fenoles solubles de hojas *ex vitro* (Figura 3A, Tabla 5) fueron identificados como isocitrato de cafeoil (Peak 9), ácido cafeoilquínico (ácido clorogénico) (Peak 10), ácido dicafeoilquínico (Peak 22), y aglicona de kaempferol (Peak 24). Entre estos, el ácido cafeoilquínico fue el que presentó la mayor intensidad, seguido por el ácido dicafeoilquínico. Estos compuestos han sido identificados previamente en hojas y fruto de *B. microphylla* (Olivares-Caro et al., 2020; Nova-Baza et al., 2022). En los extractos de fenoles solubles de brotes *in vitro* (Figura 3B, Tabla 6), también se detectó ácido cafeoilquínico (Peak 6), junto con ácido glucosíngico (Peak 4), que mostró la mayor intensidad. Ambos compuestos han sido previamente reportados en hojas de *B. microphylla* (Nova-Baza et al., 2022). También, se identificó el alcaloide isocorypalmina (Peak 9), el cual no ha sido reportado anteriormente en la especie. Respecto a los extractos de fenoles ligados de hojas *ex vitro* (Figura 4A, Tabla 5), se detectaron un isómero de irisolidona (Peak 8) y ácido cafeico (Peak 10), ambos compuestos presentaron intensidades muy altas y también han sido reportados en hojas de *B. microphylla* (Nova-Baza et al., 2022). Además, se identificaron tentativamente dos compuestos sin reportes previos (Peak 14 y Peak 18). En brotes *in vitro*, no se logró identificar compuestos en los extractos de fenoles ligados (Figura 4B) posiblemente por el método de extracción

utilizado el cual no fue suficientemente eficaz para liberar estos compuestos, dado que los fenoles ligados suelen estar unidos a polisacáridos de la pared celular o a proteínas mediante enlaces covalentes o interacciones fuertes (Alara et al., 2021).

Respecto a *L. apiculata*, en los extractos de fenoles solubles de hojas *ex vitro* (Figura 3C, Tabla 7) se identificaron cuatro compuestos mayoritarios, un fenol aromático modificado (Peak 6) el cual no ha sido identificado anteriormente en *L. apiculata*, y además compuestos derivados de la miricetina como, miricetin 3-(6"-galloylglucoside) (Peak 9), miricetin 3-galactoside (Peak 10) y miricitrin (Peak 11), este último presentó una intensidad significativamente mayor que el resto de los compuestos. Reportes anteriores demostraron que tanto hojas como fruto de *L. apiculata* presentan un perfil de polifenoles rico en flavonoides derivados de la miricetina asociados a las propiedades bioactivas de la especie (Simirgiotis et al., 2013; Treulen et al., 2019; Viktorová et al., 2020). Al analizar los extractos de fenoles solubles de brotes *in vitro* (Figura 3D, Tabla 8), se identificó tentativamente β -glucogallin (Peak 4), el cual presentó la mayor intensidad de los compuestos, además de dos compuestos no identificados (Peak 6 y Peak 7), donde el que se encuentra en el Peak 7 también se encontró previamente en el fruto de *L. apiculata* (Viktorová et al., 2020). Al igual que en hojas *ex vitro*, se identificó miricitrin (Peak 5) pero en intensidad menor. En extractos de fenoles ligados de hojas *ex vitro* de *L. apiculata* (Figura 4C, Tabla 7), se identificaron dos derivados de ácido benzoico (Peak 8 y Peak 10), sin reportes anteriores en la especie, y también miricitrin (Peak 11) pero en menor intensidad que en el extracto de fenoles solubles. En plántulas *in vitro* (Figura 4D, Tabla 8), sólo se identificó tentativamente un fenol aromático modificado (Peak 6) sin reportes anteriores en la especie.

La detección de fenoles ligados no reportados previamente en hojas *ex vitro* de *B. microphylla* (Peak 14 y 18), así como de fenoles solubles únicos identificados en brotes de *L. apiculata* cultivados *in vitro* (Picos 6 y 7), podría reflejar variantes fenólicas estructuralmente distintas con una bioactividad aún no caracterizada.

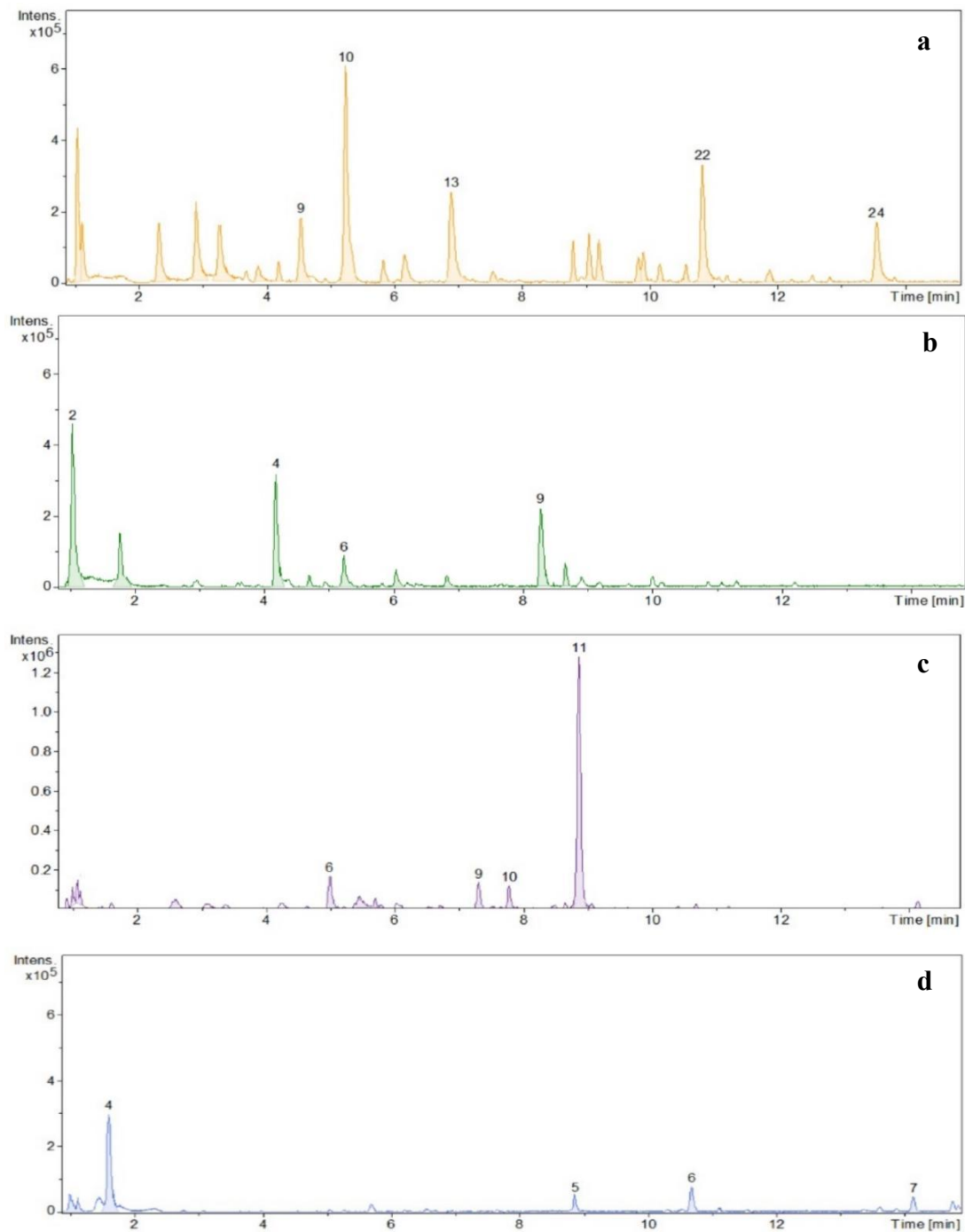


Figura 3. Cromatogramas HPLC-MS de extractos de fenoles solubles desde hojas *ex vitro* y brotes cultivados *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*. (a): hojas *ex vitro* *B. microphylla*, (b): brotes *in vitro* *B. microphylla*, (c): hojas *ex vitro* *L. apiculata* y (d): brotes *in vitro* *L. apiculata*.

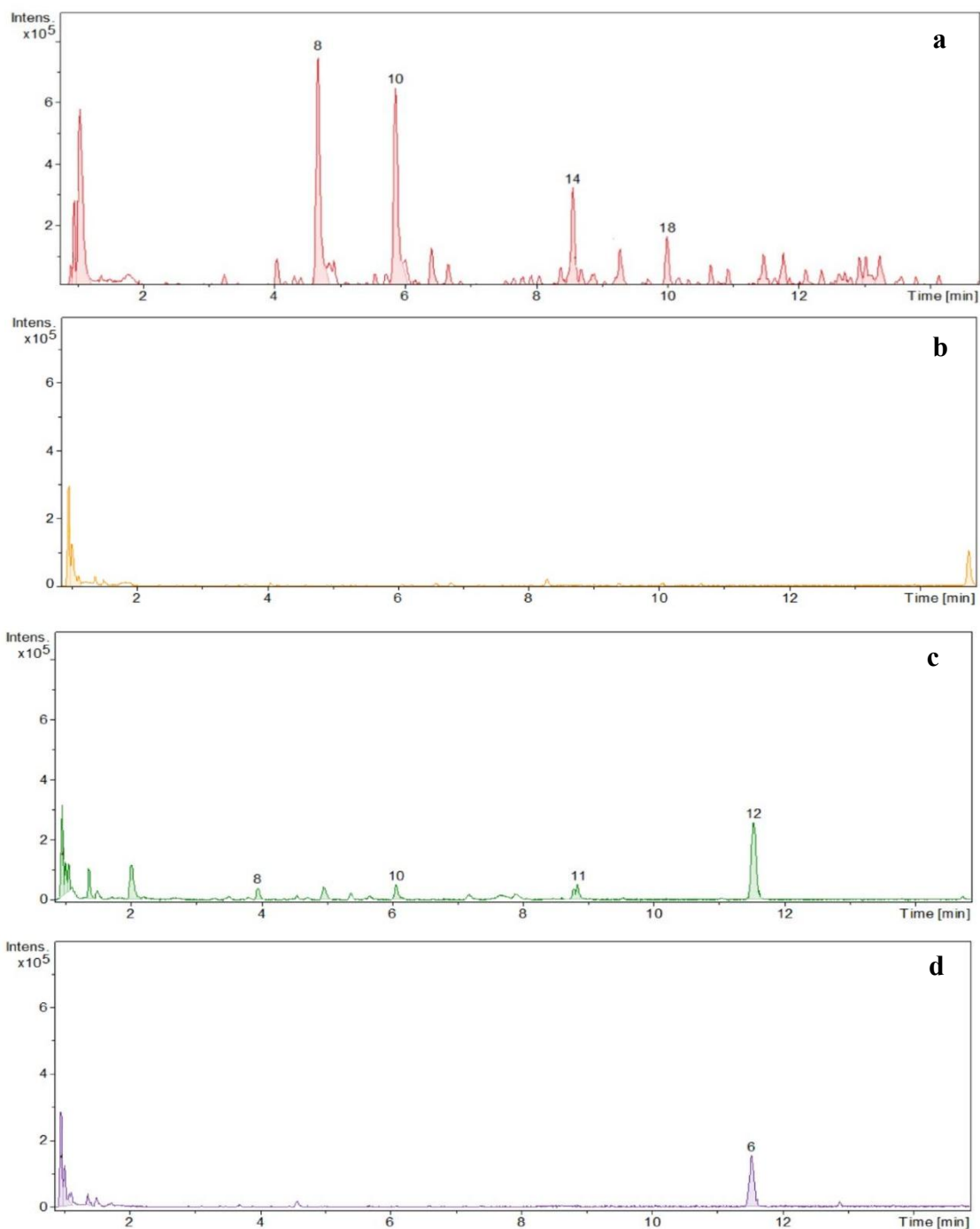


Figura 4. Cromatogramas HPLC-MS de extractos de fenoles ligados desde hojas *ex vitro* y brotes cultivados *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*. (a): hojas *ex vitro* *B. microphylla*, (b): brotes *in vitro* *B. microphylla*, (c): hojas *ex vitro* *L. apiculata* y (d): brotes *in vitro* *L. apiculata*.

Tabla 5. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de hojas *ex vitro* de *B. microphylla* desde HPLC- MS.

Peak	Rt (min)	Compuesto tentativo	Clasificación	Fórmula molecular	ESI (-) teórico <i>m/z</i>	ESI (-) medido <i>m/z</i>	<i>m/z</i> error (ppm)	Fragmentos MS/MS <i>m/z</i> (int. %)	UV/Vis (nm)
<i>Compuestos fenólicos expresados en extractos de fenoles solubles de hojas ex vitro de B. microphylla.</i>									
9	4,5	Cafeoil isocitrato	Derivados del ácido cinámico	C15H14O10	353,0514	353,0517	-0,9	191,02 (100)	328
10	5,3	Ácido cafeoilquínico	Derivados del ácido cinámico	C16H18O9	353,0878	353,0878	-0,1	191,06 (100); 192, 06 (8); 353,09 (1)	325
13	6,9	No identificado	Flavonoide	C24H22O14	533,0937	533,0942	-0,9	209,03 (100); 371,06 (86)	328
22	10,8	Ácido dicafeoilquínico	Derivados del ácido cinámico	C25H24O12	515,1195	515,1186	1,8	173,05 (13); 353,09 (100); 515,12 (22)	328
24	13,5	glicona de kaempferol	Flavonoles	C15H10O6	285,0405	285,0412	-2,5	133,03 (10); 285,04 (100)	222
<i>Compuestos fenólicos expresados en extractos de fenoles ligados de hojas ex vitro de B. microphylla.</i>									
8	4,7	Isómero de irisolidona	Isoflavonoles	C17H14O6	313,0718	313,0709	2,6	203, 04 (30); 269,09 (100); 313,07 (94)	337
10	5,9	Ácido cafeico	Derivados del ácido cinámico	C9H8O4	179,0350	179,0341	4,9	135,04 (100); 179,03 (4)	323
14	8,6	2,4-Bis(4-hydroxyphenyl)-1,3-	Ácido Bisfenólico	C18H16O6	327,0874	327,0845	8,9	143,05 (10) 265,08 (49); 327, 08 (100)	222

		cyclobutanedicarboxylic acid							
18	10,0	4-(3,4-Dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxynaphthalene-2-carboxylic acid	Ácido Fenólico Naphtalénico	C17H12O6	311,0561	311,0540	6,7	267,06 (51); 311,05 (100)	222

Tabla 6. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de brotes *in vitro* de *B. microphylla* desde HPLC- MS.

Peak	Rt (min)	Compuesto tentativo	Clasificación	Fórmula molecular	ESI (-) teórico <i>m/z</i>	ESI (-) medido <i>m/z</i>	Fragmentos MS/MS <i>m/z</i> (int. %)	<i>m/z</i> error (ppm)	UV/Vis (nm)
<i>Compuestos fenólicos expresados en extractos de fenoles solubles de brotes in vitro de B. microphylla.</i>									
4	4,2	Ácido glucosirínico	Derivados de ácido benzoico	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	359,0984	359,0990	197,05 (56); 299, 08 (12); 359,10 (100)	-1,9	282
6	5,2	Ácido cafeoilquínico	Derivados del ácido cinámico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	353,0885	191,06 (100); 192,06 (7); 353,09 (1)	-3,1	326
9	8,3	Isocorypalmina	Alcaloide	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	340,1554	340,1574	149,02 (20); 149,06 (100); 340,16 (14)	-5,9	206

Tabla 7. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de hojas *ex vitro* de *L. apiculata* desde HPLC- MS.

Peak	Rt (min)	Compuesto tentativo	Clasificación	Fórmula molecular	ESI (-) teórico m/z	ESI (-) medido m/z	Fragmentos MS/MS m/z (int. %)	m/z error (ppm)	UV/Vis (nm)
<i>Compuestos fenólicos expresados en extractos de fenoles solubles de hojas ex vitro de L.apiculata.</i>									
6	5,0	2-(4-Methoxyphenyl)ethyl hydrogen sulfate	Fenol aromático modificado	C9H12O5S		231,0326	96,96 (3); 151, 08 (14); 231,03 (100)		216
9	7,3	Miricetin 3-(6"-galloylglucoside)	Flavonoles	C28H24O17	631,0941	631,0923	316,02 (100); 479,08 (14); 631,09 (100)	2,8	220
10	7,8	Miricetin 3-galactoside	Flavonoles	C21H20O13	479,0831	479,0821	271, 02 (39); 316,02 (62); 479,08 (100)	2,2	216
11	8,9	Miricitrin	Flavonoles	C21H20O12	463,0882	463,0870	316,02 (58); 463,09 (100)	2,5	347
<i>Compuestos fenólicos expresados en extractos de fenoles ligados de hojas ex vitro de L. apiculata.</i>									
8	4,0	5-Hydroxy-2,3-bis(methoxycarbonyl) benzoic acid	Derivados de ácido benzoico	C11H10O7	253,0354	253,0361	123,01 (20); 221,01 (100); 253, 03 (25)	-3,0	215
10	6,1	3,4,5-Trihydroxy-2-(2,3,4-trihydroxy-6-methoxy carbonylphenyl) benzoic acid	Derivados de ácido benzoico	C15H12O10	351,0358	351,0358	247,02 (51); 319, 01 (70); 351,04 (100)	0,0	222
11	8,8	Miricitrin	Flavonoles	C21H20O12	463,0882	463,0863	316,02 (65); 463,08 (100)	4,1	220

Tabla 8. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de brotes *in vitro* de *L. apiculata* desde HPLC- MS.

Peak	Rt (min)	Compuesto tentativo	Clasificación	Fórmula molecular	ESI (-) teórico m/z	ESI (-) medido m/z	Fragmentos MS/MS m/z (int. %)	m/z error (ppm)	UV/Vis (nm)
<i>Compuestos fenólicos expresados en extractos de fenoles solubles de brotes in vitro de L. apiculata.</i>									
4	1,6	β -glucogallin	Ácido fenólico simple	C13H16O10	331,0671	331,0666	169,01 (29); 271,04 (24); 331,07 (100)	1,4	279
5	8,9	Miricitrin	Flavonoles	C21H20O12	463,0882	463,0847	316,02 (57); 463,08 (100); 767,33 (3)	7,6	220
6	10,7	No identificado	Flavonoles	C21H22O12	465,1038	465,1037	265,11 (100); 385,15 (25); 465,11 (91)	0,4	220
7	14,1	No identificado	Apocarotenoide Monoterpenoide	C29H42O13	597,2553	597,2530	271,04 (16); 597,25 (100)	3,7	220
<i>Compuestos fenólicos expresados en extractos de fenoles ligados de brotes in vitro de L. apiculata.</i>									
6	11,5	5-(3-Methoxypropyl)benzene-1,3-diol	Fenol aromático modificado	C10H14O3	181,0870	181,0877	113,10 (44); 181,09 (100)	-3,7	219

3.5 Actividad biológica

3.5.1 Actividad antioxidante

Los ensayos ABTS y DPPH son métodos ampliamente utilizados para determinar la capacidad antioxidante en extractos vegetales, basados en la reducción de radicales libres de distinto color: verde en ABTS y púrpura en DPPH, los cuales se decoloran proporcionalmente a la concentración de compuestos antioxidantes presentes (Nimse & Pal, 2015). En la Tabla 9, se muestran los resultados obtenidos en la actividad antioxidante de los extractos fenólicos, mediante ABTS y DPPH. Se observaron diferencias en la actividad antioxidante medida por ambos métodos, obteniéndose mayores valores de actividad en el ensayo ABTS. Esta diferencia podría atribuirse a la naturaleza de los compuestos presentes en los extractos y a los mecanismos de acción de cada método, ya que el ensayo ABTS permite evaluar la actividad antioxidante tanto en compuestos hidrofílicos (solubles en agua) como lipofílicos (solubles en lípidos), mientras que el ensayo DPPH es más eficaz en compuestos lipofílicos (Moo-Huchin et al., 2015).

Tabla 9. Capacidad antioxidante de fenoles solubles, fenoles ligados y antocianinas totales en extractos de hojas *ex vitro* y brotes *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*, determinada por los ensayos ABTS y DPPH.

Especies	Cultivo	Fenoles solubles		Fenoles ligados		Antocianinas totales	
		ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
		Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE
<i>Berberis microphylla</i>	<i>ex vitro</i>	53,0 $\pm$ 2,0 b	10,8 $\pm$ 0,6 b	49,3 $\pm$ 1,8 b	10,3 $\pm$ 0,1 c	2,3 $\pm$ 0,0 d	0,4 $\pm$ 0,0 c
	<i>in vitro</i>	126,2 $\pm$ 2,9 a	27,0 $\pm$ 0,7 a	126,1 $\pm$ 1,5 a	2,1 $\pm$ 0,1 d	15,3 $\pm$ 0,0 a	3,0 $\pm$ 0,02 a
<i>Luma apiculata</i>	<i>ex vitro</i>	66,4 $\pm$ 1,5 b	13,9 $\pm$ 0,6 b	58,7 $\pm$ 1,5 b	11,5 $\pm$ 0,1 b	4,3 $\pm$ 0,0 c	0,8 $\pm$ 0,0 c
	<i>in vitro</i>	122,2 $\pm$ 2,7 a	25,1 $\pm$ 0,6 a	123,9 $\pm$ 2,3 a	12,4 $\pm$ 0,2 a	7,9 $\pm$ 0,0 b	1,5 $\pm$ 0,01 b

Los resultados son expresados como $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ PS. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En general, se observó que los extractos de fenoles y antocianinas totales obtenidos desde brotes cultivados *in vitro* exhibieron una mayor actividad antioxidante en ambos ensayos.

Este resultado es consistente con el mayor contenido de antocianinas en brotes *in vitro*, lo que sugiere que estos compuestos contribuyen a la actividad antioxidante. Sin embargo, a pesar de que hojas *ex vitro* presentaron contenidos significativamente mayores de fenoles solubles y ligados, los extractos *in vitro* mostraron mayor capacidad antioxidante. Este comportamiento podría explicarse por la naturaleza química de los compuestos presentes en los brotes cultivados *in vitro*, que podrían encontrarse en formas más accesibles, favoreciendo su reactividad frente a radicales libres. Este patrón ha sido observado previamente en hojas *in vitro* de *Vaccinium* y *Rubus*, donde se detectaron flavonoles aglicónicos con mayor capacidad antioxidante en comparación con sus formas glicósidas (unidos a azúcares) predominantes en hojas *ex vitro* (Kolarević et al., 2021). Asimismo, brotes *in vitro* de *Eryngium alpinum* presentaron mayor acumulación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante que otros sistemas de cultivo, destacando el potencial funcional de los tejidos juveniles propagados *in vitro* (Kikowska et al., 2020). Respecto con estudios previos en *B. microphylla* y *L. apiculata*, en frutos se ha reportado una correlación lineal con la actividad antioxidante, donde a mayor capacidad antioxidante, mayor contenido de fenoles totales (Mariangel et al., 2013; Simirgiotis et al., 2013; Brito et al., 2014; Carrasco et al., 2022). Sin embargo, de acuerdo con los índices de correlación de Pearson obtenidos en este estudio (Figura 5), se observó correlación significativa ($p < 0,05$) únicamente en los extractos de hojas *ex vitro* en ambas especies. Donde, el contenido de fenoles solubles presentó una correlación lineal negativa con la capacidad antioxidante en ambos ensayos, mientras que los fenoles ligados mostraron una correlación lineal positiva. Por otra parte, en los extractos de brotes *in vitro* no se observaron correlaciones significativas entre la capacidad antioxidante y contenido de fenoles solubles, fenoles ligados ni antocianinas totales. Quiñones et al. (2013), estudiaron extractos fenólicos de diferentes órganos y tejidos de *Theobroma cacao*, respecto a su actividad antioxidante. Al igual que en el presente estudio, indicaron que la actividad antioxidante no depende únicamente de la cantidad total de compuestos fenólicos, sino que también de su composición y estructura química de los compuestos presentes.

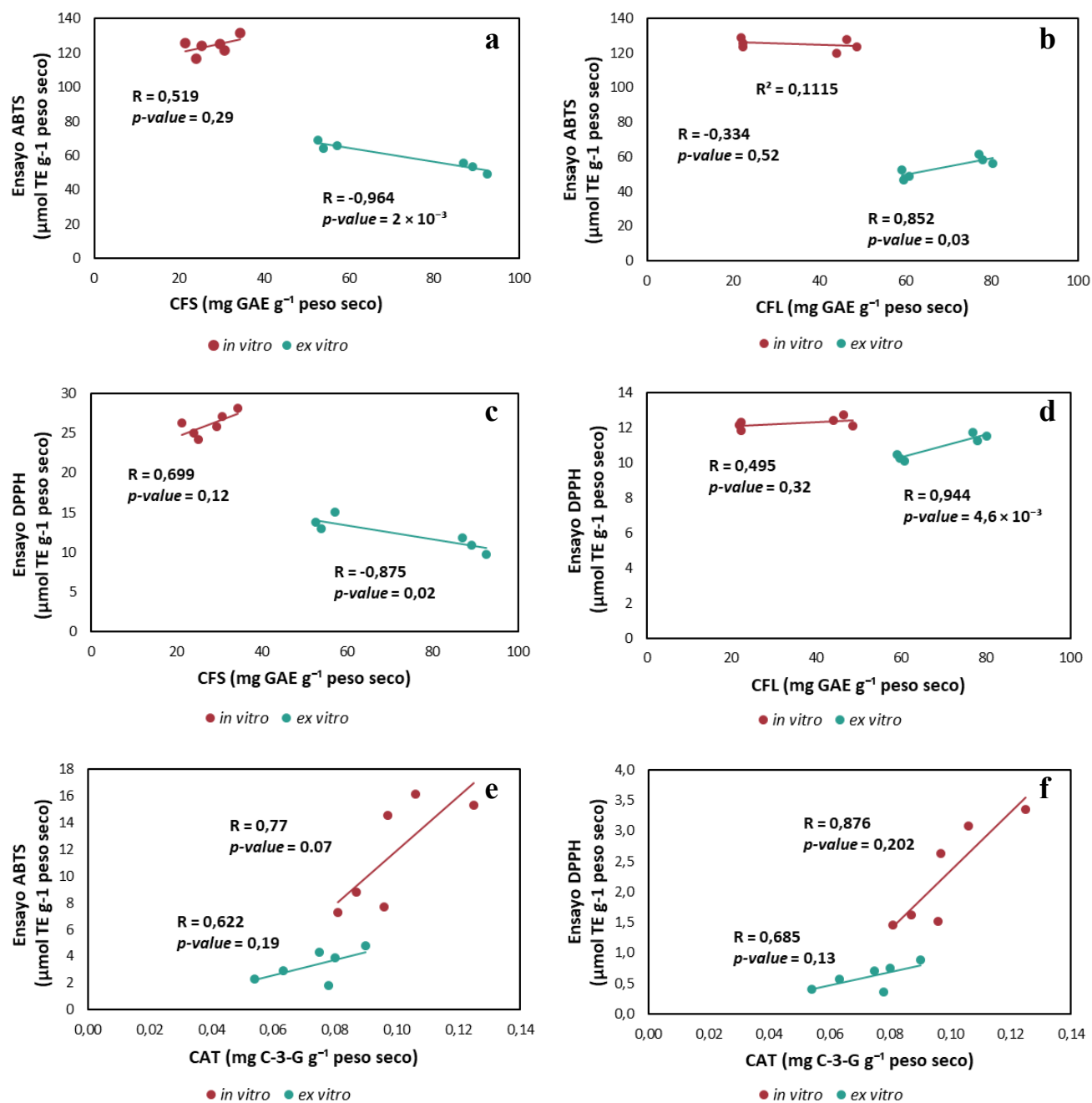


Figura 5. Diagramas de dispersión de correlación de Pearson entre contenido de compuestos fenólicos y ensayos de capacidad antioxidante. (a): Ensayo ABTS y CFS, (b): Ensayo ABTS y CFL, (c): Ensayo DPPH y CFS, (d): Ensayo DPPH y FL, (e): Ensayo ABTS y CAT, y (f): Ensayo DPPH y CAT.

3.5.2 Actividad antimicrobiana

En la Figura 6 y Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos al evaluar la actividad antibacteriana de los extractos fenólicos obtenidos a partir de brotes cultivados *in vitro* y hojas *ex vitro* de *L. apiculata* y *B. microphylla*, frente a cepas bacterianas gramnegativas (*E. coli*, *K. Pneumoniae*, *P. aeruginosa*) y grampositivas (*E. faecalis* y *S. aureus*).

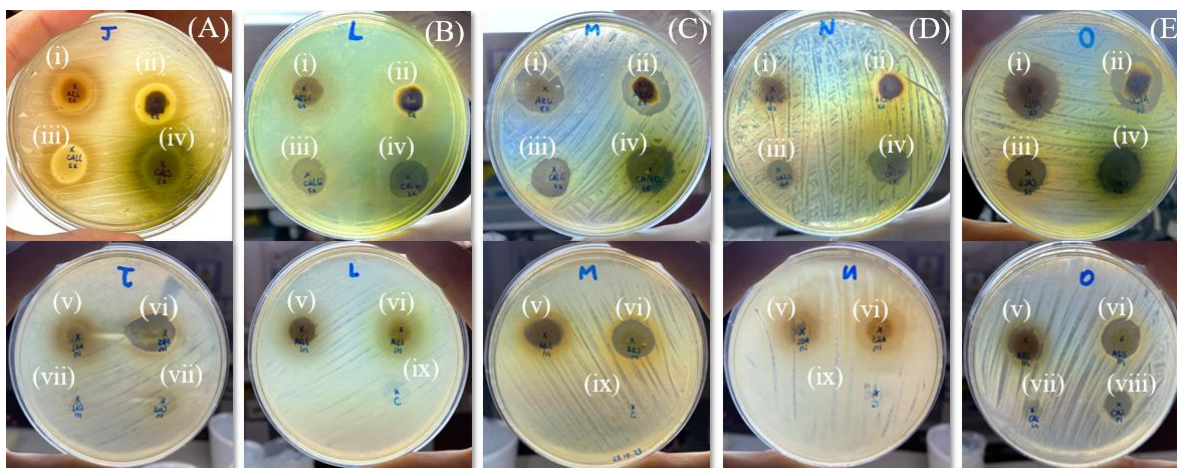


Figura 6. Inhibición del crecimiento bacteriano por extractos fenólicos de hojas *ex vitro* y brotes *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en agar frente a cinco cepas bacterianas: (A) *E. coli*, (B) *P. aeruginosa*, (C) *S. aureus*, (D) *K. pneumoniae* y (E) *E. faecalis*. Los extractos evaluados fueron: (i) fenoles ligados de *L. apiculata* (*ex vitro*), (ii) fenoles solubles de *L. apiculata* (*ex vitro*), (iii) fenoles ligados de *B. microphylla* (*ex vitro*), (iv) fenoles solubles de *B. microphylla* (*ex vitro*), (v) fenoles ligados de *L. apiculata* (*in vitro*), (vi) fenoles solubles de *L. apiculata* (*in vitro*), (vii) fenoles ligados de *B. microphylla* (*in vitro*), (viii) fenoles solubles de *B. microphylla* (*in vitro*) y (ix) control: agua destilada estéril.

De acuerdo con los resultados, los extractos mostraron una mayor actividad inhibitoria contra bacterias grampositiva que contra gramnegativas. Esto podría atribuirse a diferencias estructurales en la membrana celular de ambos grupos. Se ha reportado que las bacterias gramnegativas son más resistentes a los extractos debido a la presencia de una capa externa

compuesta por polisacáridos hidrofílicos, la cual actúa como barrera protectora frente a compuestos antimicrobianos, como extractos y aceites esenciales (Nazzaro et al., 2013).

En el caso de *B. microphylla*, los extractos de hojas *ex vitro* inhibieron todas las cepas bacterianas evaluadas, mientras que los extractos de brotes *in vitro* exhibieron una actividad considerablemente menor. Esta alta actividad en hojas *ex vitro* podría estar asociada a la mayor concentración de compuestos fenólicos en los extractos, así como a la presencia de compuestos mayoritarios identificados como ácidos cafeoilquínico y dicafeoilquínico. Se ha reportado que estos derivados del ácido hidroxicinámico ejercen efectos antimicrobianos contra bacterias grampositivas y gramnegativas al alterar las membranas celulares (Lou et al., 2011). Por el contrario, los extractos de brotes *in vitro* presentaron una actividad muy limitada, donde solo el extracto de fenoles ligados mostró actividad inhibitoria contra *E. faecalis*. Este resultado podría deberse a las concentraciones más bajas de compuestos fenólicos detectadas en brotes *in vitro*, que pueden ser insuficientes para ejercer un efecto antimicrobiano, incluso si los compuestos presentes poseen actividad conocida. Además, en algunas cepas la actividad de los extractos *in vitro* no se pudo determinar debido a la disponibilidad limitada de extracto, lo que impidió su análisis. Estudios previos han demostrado que extractos obtenidos desde las partes aéreas de *B. microphylla* (ramas, espinas y hojas) presentan actividad frente a *S. aureus* (Manosalva et al., 2016; Cuéllar et al., 2024), aunque no se ha observado efecto contra bacterias gramnegativas como *E. coli* (Manosalva et al., 2016).

Tabla 10. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos fenólicos de hojas *ex vitro* y brotes *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*.

Especies	Cultivo	Extracto fenólico	Diámetro de inhibición (mm)				
			Gram (-)			Gram (+)	
			<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Berberis microphylla</i>	<i>ex vitro</i>	Soluble	14	10	14	15	15
		Ligado	17	16	15	17	20
	<i>in vitro</i>	Soluble	0	n. d.	n. d.	12	n. d.
		Ligado	0	n. d.	n. d.	0	n. d.
<i>Luma apiculata</i>	<i>ex vitro</i>	Soluble	17	0	10	21	20
		Ligado	17	0	0	20	17
	<i>in vitro</i>	Soluble	13	0	0	14	15
		Ligado	18,5	0	0	15,5	15

Gram (+): bacterias grampositivas; Gram (-): bacterias gramnegativas; n.d.: no determinado; 0: no se detectó zona de inhibición.

En el caso de *L. apiculata*, los extractos de hojas *ex vitro* y brotes *in vitro* mostraron actividades similares, aunque sólo el extracto de fenoles solubles de hojas *ex vitro* inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa*, posiblemente debido a la alta presencia del flavonoide miricitrina, el cual también se identificó en brotes *in vitro*, pero en menor intensidad, lo que pudo limitar su eficacia frente a ciertas bacterias, en particular *P. aeruginosa*, que requiere concentraciones altas de compuestos antimicrobianos para ser inhibida. Esto coincidiría con lo reportado por Viktorová et al. (2020), quienes observaron que extractos metanólicos de frutos de *L. apiculata* fueron efectivos contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, aunque esta última necesitó mayores concentraciones del extracto para presentar actividad. Así mismo, Araya-Contreras et al. (2019) reportaron que los extractos de hexano de hojas de *L. apiculata* inhibieron a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, siendo *S. aureus* la más susceptible. Además, Treulen et al. (2019) demostraron que extractos alcohólicos de hojas de *L. apiculata* fueron más eficaces contra *S. aureus* que *K. pneumoniae*. También, en brotes *in vitro*, la presencia predominante de β -glucogallin podría explicar la inhibición observada frente a *S. aureus*, ya

que este compuesto ha demostrado potencial antimicrobiano mediante interacción con proteínas reguladoras de la virulencia en dicha bacteria (Bhavyashree et al., 2025).

La actividad antifúngica fue evaluada en tres especies del género *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* (Figura 7, Tabla 11). Los resultados indicaron que *C. glabrata* fue inhibida por extractos fenólicos de ambas especies y condiciones de cultivo (*ex vitro* e *in vitro*). En el caso de *C. albicans*, solo los extractos de fenoles solubles de *L. apiculata* mostraron actividad inhibidora. Por el contrario, el crecimiento de *C. tropicalis* fue inhibido únicamente por los extractos de fenoles solubles de *B. microphylla*. Esta actividad puede estar relacionada con la presencia de ácidos fenólicos como el ácido cafeoilquínico, conocido por su actividad antifúngica frente a especies de *Candida* (Ma & Ma, 2015). La inhibición de *C. albicans* y *C. glabrata* por extractos de *L. apiculata* podría estar relacionada con la presencia de derivados de miricetina, que han demostrado alterar la integridad de la membrana fúngica e inhibir la formación de biopelículas en *C. albicans* (Lee & Kim, 2022) y mostrar alta actividad antifúngica contra *C. glabrata* (Salazar-Aranda et al., 2015).

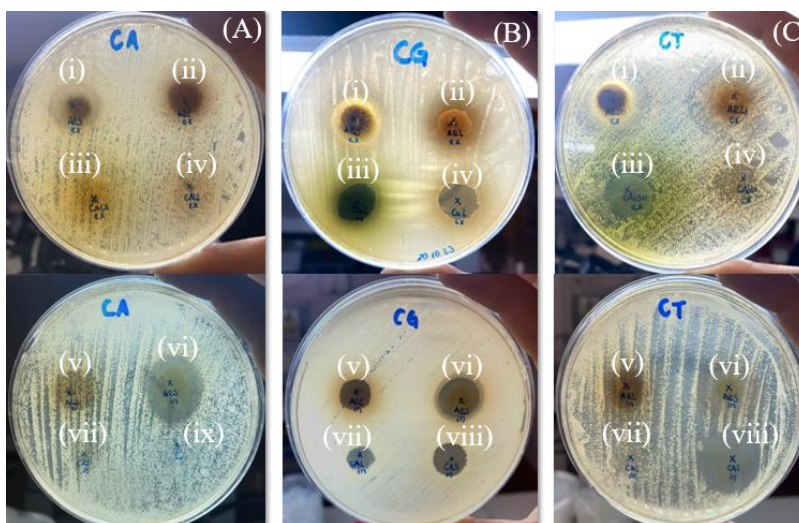


Figura 7. Inhibición del crecimiento fúngico por extractos fenólicos de hojas *ex vitro* y brotes *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*. La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en agar frente a tres cepas fúngicas: (A) *C. albicans*, (B) *C. glabrata* y (C) *C. tropicalis*. Los extractos evaluados fueron: (i) fenoles solubles *L. apiculata*, (ii) fenoles ligados *L. apiculata*, (iii) fenoles solubles *B. microphylla*, (iv) fenoles ligados *B. microphylla*, (v) fenoles ligados *L. apiculata*, (vi) fenoles solubles *L. apiculata*, (vii) fenoles ligados *B. microphylla*, (viii) fenoles solubles *B. microphylla*, (ix) control: agua destilada estéril.

Tabla 11. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos fenólicos de hojas *ex vitro* y brotes *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*.

Especies	Cultivo	Extracto fenólico	Diámetro de inhibición (mm)		
			<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>Berberis microphylla</i>	<i>ex vitro</i>	Soluble	0	14	17
		Ligado	0	14	0
	<i>in vitro</i>	Soluble	0	10	21
		Ligado	n. d.	13	0
<i>Luma apiculata</i>	<i>ex vitro</i>	Soluble	16	12	0
		Ligado	0	16	0
	<i>in vitro</i>	Soluble	21	11,1	0
		Ligado	0	15	0

n.d.: no determinado; 0: no se detectó zona de inhibición

Estos hallazgos sugieren que la actividad antimicrobiana de los extractos está influenciada por la especie vegetal, el tipo y concentración de compuestos fenólicos presentes y las condiciones de cultivo. Además, la presencia del mismo compuesto en los extractos, pero sin actividades similares, podría deberse a su concentración, a la composición del extracto o a la necesidad de sinergismo entre múltiples metabolitos para ejercer un efecto antimicrobiano o antioxidante detectable. Estudios previos demuestran que las combinaciones de compuestos fenólicos pueden actuar sinérgicamente para reducir las concentraciones inhibitorias mínimas hasta 125 veces en comparación con los compuestos individuales (Sanhueza et al., 2017). También, respecto a la concentración de los extractos fenólicos, extractos metanólicos de *L. apiculata* inhibieron a *S. aureus* a dosis de 0,35 a 0,39 mg mL⁻¹, pero fueron en gran medida ineficaces contra *P. aeruginosa* y redujeron la formación de biopelículas de forma dependiente de la concentración (Viktorová et al., 2020). Así mismo, fracciones de otros metabolitos secundarios, alcaloides de raíces, tallos y hojas de *B. microphylla* mostraron concentraciones inhibitorias mínimas que oscilaron entre 83 y 333 µg mL⁻¹, demostrando la potencia antimicrobiana varía según el tejido vegetal y la cepa microbiana (Manosalva et al., 2016).

Cabe destacar que, hasta la fecha, no se han reportado estudios que evalúen la actividad antimicrobiana de extractos de *B. microphylla* y *L. apiculata* frente a algunas de las cepas bacterianas y fúngicas analizadas en el presente estudio, especialmente desde material obtenido mediante cultivo *in vitro*. Por lo tanto, estos resultados aportan información novedosa para ambas especies y destacan el potencial de los brotes obtenidos desde cultivo *in vitro* como fuente de compuestos bioactivos, no solo con capacidad antioxidante, sino también con efecto antimicrobiano.

Los principales resultados obtenidos en esta investigación demuestran que fue posible generar material *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*, así como caracterizar los compuestos fenólicos y la bioactividad de los extractos obtenidos. En la Figura 8, se muestra el esquema de la metodología de proliferación *in vitro* y análisis de compuestos fenólicos en *B. microphylla* y *L. apiculata*, utilizada en la presente investigación. En el caso de *B. microphylla*, se logró la germinación de embriones a partir de semillas que fueron previamente hidratadas en agua durante 4°C durante 48h y el establecimiento de embriones en medio WPM sin hormonas durante dos semanas en oscuridad, lo que permitió establecer una línea de cultivo inicial para su posterior multiplicación. En contraste, *L. apiculata* fue propagado directamente a partir de brotes previamente establecidos *in vitro*. Los brotes de ambas especies fueron cultivados en medio WPM suplementado con 2,2 µM de BAP y 0,25 µM de IBA durante tres subcultivos de 21 días. A partir del material generado en ambas especies, se realizaron análisis comparativos entre brotes cultivados *in vitro* y hojas *ex vitro*, lo que permitió cuantificar fenoles y antocianinas totales mediante métodos colorimétricos. Además, se identificaron tentativamente compuestos fenólicos, como ácidos fenólicos y flavonoides, mediante el análisis por LC-MS/MS, lo que aportó información detallada sobre el perfil químico de los extractos. Finalmente, se evaluó la bioactividad de los extractos fenólicos, mediante la actividad antioxidante con los ensayos DPPH y ABTS, y la actividad antimicrobiana en cepas bacterianas y fúngicas desde el método de difusión en agar. ■

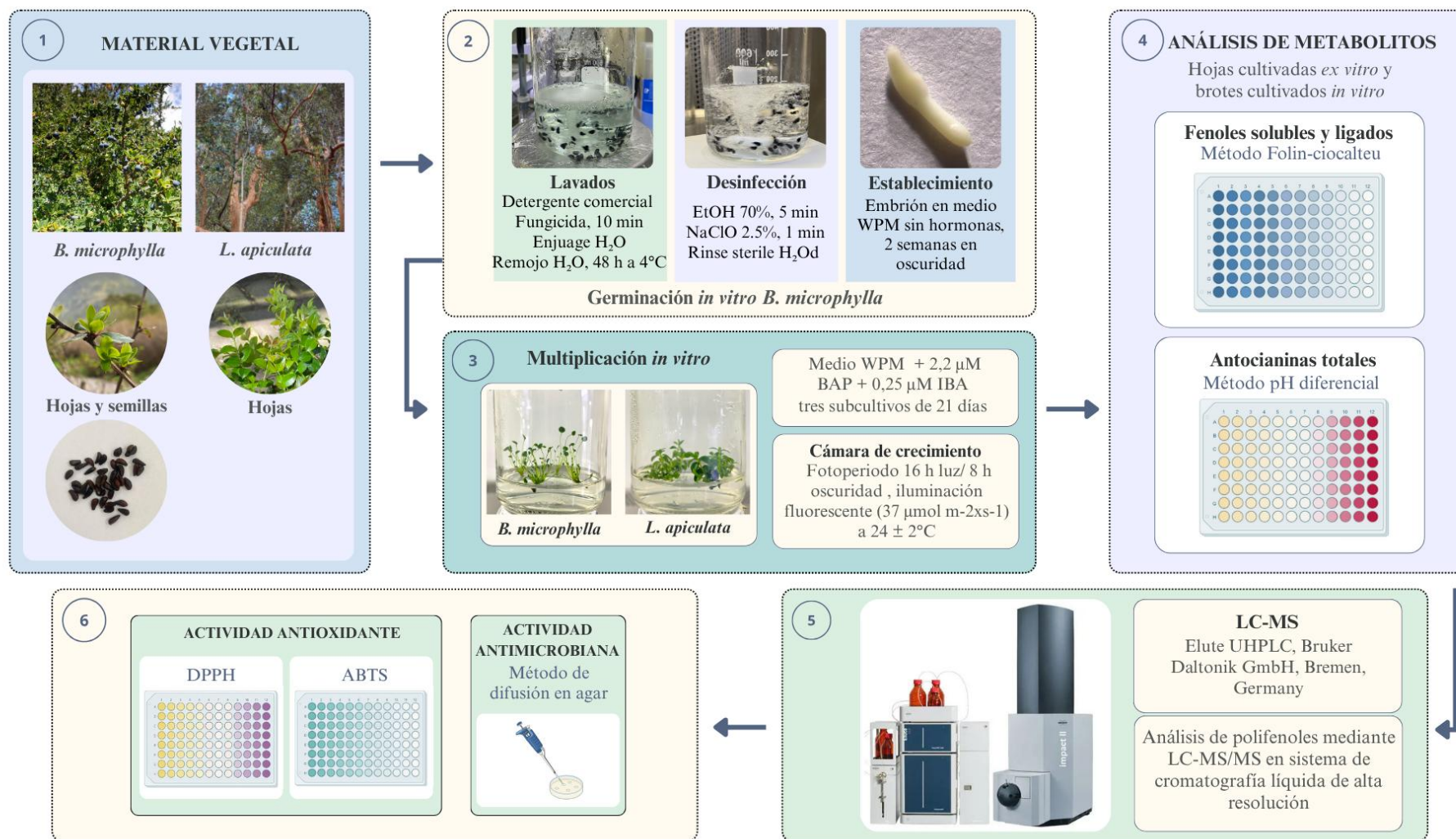


Figura 8. Esquema general de la proliferación *in vitro* y análisis de compuestos fenólicos en extractos de hojas *ex vitro* y brotes cultivados *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*

III. CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo para la propagación *in vitro* de *B. microphylla* y *L. apiculata*. La hidratación de las semillas a 4°C durante dos días favoreció la germinación *in vitro* de *B. microphylla*, lográndose altas tasas de germinación (71,1%). Se optimizó la proliferación de brotes para ambas especies en medio WPM suplementado con 2,2 µM de BAP y 0,25 µM de IBA.
- Se demostró la influencia de las condiciones de cultivo en la acumulación de compuestos bioactivos. Los brotes *in vitro* de *B. microphylla* presentaron mayor contenido de antocianinas totales con una alta capacidad antioxidante, mientras que las hojas *ex vitro* exhibieron niveles más altos de fenoles solubles. Los mayores contenidos de fenoles ligados de *L. apiculata* se detectaron en extractos del material *ex vitro*.
- El análisis por LC-MS permitió identificar compuestos específicos para cada especie, siendo mayoritarios los ácidos cafeoilquínicos en *B. microphylla* y derivados de miricetina en *L. apiculata*, metabolitos no reportados previamente, algunos exclusivos de condiciones *in vitro*. Los resultados refuerzan la capacidad del cultivo *in vitro* para inducir perfiles metabólicos diferenciados.
- Ambas especies presentaron una alta actividad antimicrobiana específica. Los extractos *ex vitro* de *B. microphylla* inhibieron todas las cepas bacterianas evaluadas y los extractos de fenoles solubles (tanto *in vitro* como *ex vitro*) mostraron actividad antifúngica frente a *C. tropicalis*. Todos los extractos de *L. apiculata* presentaron similar actividad antimicrobiana, sólo los extractos de fenoles solubles inhibieron el crecimiento de *C. albicans*. Todos los extractos de ambas especies fueron efectivos frente a *C. glabrata*.
- Los resultados obtenidos destacan el potencial del cultivo *in vitro* como una herramienta sostenible para la producción dirigida de compuestos fenólicos bioactivos, con aplicaciones en las industrias farmacéutica, nutracéutica e incluso como estrategia para la conservación y valorización de especies vegetales nativas.

IV. REFERENCIAS

Alvarado Ojeda, A., Baldini Urrutia, A., & Guajardo Becchi, F. (2012). *Árboles urbanos de Chile: guía de reconocimiento* (p. 212). Corporación Nacional Forestal (CONAF).

Araya-Contreras, T., Veas, R., Escobar, C. A., Machuca, P., & Bittner, M. (2019). Antibacterial effect of *Luma apiculata* (DC.) Burret extracts in clinically important bacteria. *International Journal of Microbiology*, 2019, 7803726.

Arena, M. E., Giordani, E., Bustamante, G. N., & Radice, S. (2021). Variability in fruit traits and anthocyanin content among and within populations of underutilized Patagonian species *Berberis microphylla* G. Forst. *Journal of Berry Research*, 11, 1–18.

Arena, M. E., Martinez-Pastur, G., & Vater, G. (2000). *In vitro* propagation of *Berberis buxifolia* Lam. *Biocell*, 24, 1–8.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4_{ts}), 493–496.

Bhavyashree, N., Vaishnavi, M. S., Shravan, P., & Sabat, S. (2025). Molecular Dynamics Simulation Studies of Beta-Glucogallin and Dihydro Dehydro Coniferyl Alcohol from *Syzygium cumini* for its Antimicrobial Activity on *Staphylococcus aureus*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 83(1), 599-617.

Bisht, A., Giri, L., Belwal, T., Pandey, A., Bahukhandi, A., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2022). *In vitro* propagation and antioxidant potential of *Berberis asiatica* from Western Himalaya. *Plant Biosystems*, 156, 490–496.

Borges, A., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2012). The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*, 28(7), 755–767.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25–30.

- Brito, A., Areche, C., Sepúlveda, B., Kennelly, E. J., & Simirgiotis, M. J. (2014). Anthocyanin characterization, total phenolic quantification and antioxidant features of some Chilean edible berry extracts. *Molecules*, *19*, 10936–10955.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
- Bustamante, G., Mattenet, F., Pal, N., Hernández, C., & Pohjola, K. (2023). El calafate: leyenda, superalimento y protector del ecosistema. *La Lupa. Colección Fueguina de Divulgación Científica*, *23*, 14–19.
- Calderón-Reyes, C., Silva-Pezoa, R., Leal, P., Ribera-Fonseca, A., Cáceres, C., Riquelme, I., Zambrano, T., Peña, D., Alberdi, M., & Reyes-Díaz, M. (2020). Anthocyanin-rich extracts of Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst.) fruits decrease *in vitro* viability and migration of human gastric and gallbladder cancer cell lines. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *20*, 1891–1903.
- Campos, J. V., Riquelme, S., Pecio, Ł., Guedes, L., Mardones, C., Alzamora, R., Arteaga-Pérez, L. E., Rubilar, R., Fiehn, O., & Pérez, A. J. (2022). Constitutive and inducible defense in *Eucalyptus* determines the feeding host of *Gonipterus platensis*, denoting specific plant–insect coevolution and a strategy for resistance improvement. *Industrial Crops and Products*, *189*, 115811.
- Carrasco-Sandoval, J., Falcó, I., Sánchez, G., Fabra, M. J., López-Rubio, A., Rodríguez, A., & Aranda, M. (2022). Multivariable optimization of ultrasound-assisted extraction for the determination of phenolic and antioxidants compounds from arrayan (*Luma apiculata* (DC.) Burret) leaves by microplate-based methods and mass spectrometry. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *28*, 100356.
- de Castro, T. C., da Silva Santos, D., Simões-Gurgel, C., Montiel-Eulefi, E., Honorato, M. P., & Albarello, N. (2023). Morpho-physiological studies on *in vitro* germination of *Berberis empetrifolia* Lam. (Berberidaceae). *Revista Fitos*, *17*, 490–501.

- Cordero, S., Abello, L., & Gálvez, F. (2017). *Plantas silvestres comestibles y medicinales de Chile y otras partes del mundo* (p. 80). Corporación Chilena de la Madera.
- Cotabarren, J., Ozón, B., Claver, S., Geier, F., Rossotti, M., Garcia-Pardo, J., & Obregón, W. D. (2023). A multifunctional trypsin protease inhibitor from yellow bell pepper seeds: Uncovering its dual antifungal and hypoglycemic properties. *Pharmaceutics*, *15*, 781.
- Crisóstomo-Ayala, K. A., Sabater-Jara, A. B., Pérez Manríquez, C., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, Á., Pedreño, M. Á., Hernández de la Torre, M., Sanchez-Olate, M., & Ríos Leal, D. G. (2022). Comparative study of metabolomic profile and antioxidant content of adult and *in vitro* leaves of *Aristotelia chilensis*. *Plants*, *11*, 37.
- Cuéllar, L. M., Escobedo-Avellaneda, Z., & del Valle, J. M. (2024). Effect of supercritical CO₂ modified with ethanol on the extraction yield and antimicrobial activity of bioactive compounds from aerial parts of *Berberis microphylla* G. Forst. *LWT*, *211*, 116885.
- Dalzotto, D., Boeri, P., & Piñuel, L. (2019). *Biodiversidad regional: estrategias de propagación y propiedades de frutos del calafate (Berberis microphylla G. Forst.)*.
- Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C., & Ferreira, I. C. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, *82*, 9–22.
- Di Sario, L., Zubillaga, M. F., & Boeri, P. A. (2023, November 6–8). *Germinación in vitro de Calafate (Berberis microphylla G. Forst.)* [Conference abstract]. 3rd Argentine Meeting on Seed Biology, Bahía Blanca, Argentina.
- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstocks. *HortScience*, *19*, 507.
- Echavarría, B., Franco, A., & Martínez, A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae*, *16*(1), 126–131.

Fernandes de Araújo, F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 127535.

Fredes, C. (2009). Antioxidantes en berries nativos chilenos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8, 469–478.

Furrianca, M. C., Alvear, M., Zambrano, T., Fajardo, V., & Salazar, L. A. (2017). Hypoglycemic effect of *Berberis microphylla* G. Forst root extract. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(9), 2179–2184.

García, N., & Ormazábal, C. (2008). *Árboles nativos de Chile* (p. 14). Enersis S.A.

García-Seco, D., Zhang, Y., Gutiérrez-Mañero, F. J., Martín, C., & Ramos-Solano, B. (2015). Application of *Pseudomonas fluorescens* to blackberry under field conditions improves fruit quality by modifying flavonoid metabolism. *PLoS ONE*, 10(11), e0142639.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current protocols in food analytical chemistry* (pp. F1.2.1–F1.2.13). John Wiley & Sons.

Gurr, S. I., McPherson, J., & Bowles, D. (1992). Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In S. J. Gurr, M. McPherson, & D. J. Bowles (Eds.), *Molecular plant pathology: A practical approach* (Vol. 1, p. 62). Oxford University Press.

Hurrel, J. A., Ulibarri, E. A., Arenas, P. M., & Pochettino, M. L. (2011). *Plantas de herboristería: Plantas medicinales que se comercializan en herboristerías de la Ciudad de Buenos Aires*. Editorial de la Facultad de Filosofía y Letras (UBA).

Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779.

- Kikowska, M., Thiem, B., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). Accumulation of valuable secondary metabolites: phenolic acids and flavonoids in different *in vitro* systems of shoot cultures of the endangered plant species—*Eryngium alpinum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 141, 381–391.
- Kolarević, T., Milinčić, D. D., Vujović, T., Gašić, U. M., Prokić, L., Kostić, A. Ž., ... & Pešić, M. B. (2021). Phenolic compounds and antioxidant properties of field-grown and *in vitro* leaves, and calluses in blackberry and blueberry. *Horticulturae*, 7(11), 420.
- Lee, H. S., & Kim, Y. (2022). Myricetin disturbs the cell wall integrity and increases the membrane permeability of *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(1), 37–45.
- Lee, Y., Moon, S. J., Wang, Y. J., & Montell, C. (2015). A *Drosophila* gustatory receptor required for strychnine sensation. *Chemical Senses*, 40(7), 525–533.
- Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society*, 30, 421–427.
- López, J., Vera, C., Bustos, R., & Florez-Mendez, J. (2021). Native berries of Chile: A comprehensive review on nutritional aspects, functional properties, and potential health benefits. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 1139–1160.
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of Food Science*, 76(6), M398–M403.
- Ma, J. N., & Ma, C. M. (2015). Antifungal inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives. In V. R. Preedy (Ed.), *Coffee in health and disease prevention* (pp. 635–641). Academic Press.

Mancilla, H., Bravo, K. Q., Rodríguez, A. A., Carrasco, B., & Gonzáles, R. G. (2013). In vitro culture of *Luma chequen* from vegetative buds. *Ciencia e Investigación Agraria*, 40(3), 609–615.

Manosalva, L., Mutis, A., Urzúa, A., Fajardo, V., & Quiroz, A. (2016). Antibacterial activity of alkaloid fractions from *Berberis microphylla* G. Forst and study of synergism with ampicillin and cephalothin. *Molecules*, 21(1), 76.

Mariangel, E., Reyes-Díaz, M., Lobos, W., Bensch, E., Schalchli, H., & Ibarra, P. (2013). The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 40(1), 161–170.

Matkowski, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances*, 26(6), 548–560.

McLeod, C., Ojeda, A., Moreno, S., Molina, A., & Pino, M. T. (2015). Seed germination and in vitro propagation of different *Berberis microphylla* G. Forst accessions from Magellan's Region in Chile. In *XIV EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics* (Vol. 1172, pp. 225–230). ISHS.

McLeod, C., Pino, M. T., Aguila, K., & Ojeda, A. (2015). *Calafate (Berberis microphylla): Otro superberry chileno*. Informativo INIA Kampenaike, (38), 1–4.

Mishra, M. K., Pandey, S., Niranjana, A., & Misra, P. (2021). Comparative analysis of phenolic compounds from wild and in vitro propagated plant *Thalictrum foliolosum* and antioxidant activity of various crude extracts. *Chemical Papers*, 75(11), 4873–4885.

Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., & Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 166, 17–22.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474.
- Nikolova, M., Petrova, M., Zayova, E., Vitkova, A., & Evstatieva, L. (2013). Comparative study of in vitro, ex vitro and in vivo grown plants of *Arnica montana* – Polyphenols and free radical scavenging activity. *Acta Botanica Croatica*, 72(1), 13–22.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006.
- Nova-Baza, D., Olivares-Caro, L., Bustamante, L., Pérez, A. J., Vergara, C., Fuentealba, J., & Mardones, C. (2022). Metabolic profile and antioxidant capacity of five *Berberis* leaves species: A comprehensive study to determine their potential as natural food or ingredient. *Food Research International*, 160, 111642.
- Olivares-Caro, L., Radojkovic, C., Chau, S. Y., Nova, D., Bustamante, L., Neira, J. Y., & Mardones, C. (2020). *Berberis microphylla* G. Forst (Calafate) berry extract reduces oxidative stress and lipid peroxidation of human LDL. *Antioxidants*, 9(12), 1171.
- Pérez-Urria Carril, E., & Ávalos García, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3), 119–145.
- Pandey, A., Brijwal, L., & Tamta, S. (2013). *In vitro* propagation and phytochemical assessment of *Berberis chitria*: An important medicinal shrub of Kumaun Himalaya, India. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(16), 930–937.
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- Porrás-Loaiza, A. P., & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121–134.

- Quiñones Gálvez, J., Trujillo Sánchez, R., Capdesuñer Ruiz, Y., Quirós Molina, Y., & Hernández de la Torre, M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L.(cacao). *Revista cubana de plantas medicinales*, 18(2), 201-215.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Radice, S., Arena, M., Sanmartino, L., Vicente, A., Cabana, J., & Curvetto, N. (2018). *Berberis microphylla* G. Forst. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Montevideo, Uruguay.
- Ramírez, J. E., Zambrano, R., Sepúlveda, B., Kennelly, E. J., & Simirgiotis, M. J. (2015). Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC–HR-ESI-ToF-MS. *Food Chemistry*, 176, 106–114.
- Rodríguez, R., Matthei, O., & Quezada, M. (1983). *Flora arbórea de Chile* (pp. 45–46). Editorial Universidad de Concepción.
- Romero-Román, M. E., Noriega-Vásquez, F., Farías-Villagra, M., Jara-Zapata, P., Vera-Flores, B., & Belchi, L. (2019). Nuevas fuentes de antioxidantes naturales: caracterización de compuestos bioactivos en cinco frutos nativos de Chile. *Perfiles*, 2(22), 34–41.
- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., ... von Baer, D. (2010). Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6081–6089.
- Salazar-Aranda, R., Granados-Guzmán, G., Pérez-Meseguer, J., González, G. M., & Waksman de Torres, N. (2015). Activity of polyphenolic compounds against *Candida glabrata*. *Molecules*, 20(10), 17903–17912.

Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Herrera-Bravo, J., Salazar, L. A., Delporte, C., Barra, G. V., & Martorell, M. (2021). Ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities of native Chilean plants. *Current Pharmaceutical Design*, 27(7), 953–970.

Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., & Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 12(2), e0172273.

Seeram, N. P. (2008). Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 627–629.

Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), 1216.

Silva Labbe, F., Arribillaga, G., Domínguez Díaz, E. P., Códova, C., Gómez, N., & Salinas, S. (2020). *Caracterización de las especies del género Berberis y sus propiedades funcionales*. Museo Regional de Aysén. Biblioteca Digital INFOR.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.

Sharma, S., & Pandey, S. K. (2013). Revisiting requirements elicitation techniques. *International Journal of Computer Applications*, 75(12).

Shih, M. L., & Morgan, J. A. (2020). Metabolic flux analysis of secondary metabolism in plants. *Metabolic Engineering Communications*, 10, e00123.

Simirgiotis, M. J., Bórquez, J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2013). Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC–DAD–ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. chequén*. *Food Chemistry*, 139(1–4), 289–299.

Tacón, A. (2017). *Buenas prácticas de recolección sustentable para productos forestales no madereros: calafate (Berberis microphylla G. Forst)*. Fundación para la Innovación Agraria (FIA), Santiago de Chile.

Treulen, F. F., Salcedo, G. E., Garrido, F. I., Morales, C. E., Paz, E., & Felmer, R. (2019). Antimicrobial activity of *Luma apiculata* against resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Pure and Applied Biology*, 8(2), 1962–1974.

Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Classification of phenolic compounds in plants. In R. R. Watson (Ed.), *Polyphenols in plants* (2nd ed., pp. 263–284). Academic Press.

Varela, S. A., & Arana, M. V. (2011). *Latencia y germinación de semillas: tratamientos pregerminativos* (Cuadernillo 3, Serie técnica “Sistemas Forestales Integrados” – Silvicultura en vivero). EEA Bariloche, INTA.

Viktorová, J., Kumar, R., Řehořová, K., Hoang, L., Ruml, T., Figueroa, C. R., Valdenegro, M., & Fuentes, L. (2020). Antimicrobial activity of extracts of two native fruits of Chile: arrayan (*Luma apiculata*) and peumo (*Cryptocarya alba*). *Antibiotics*, 9(8), 444.

