UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Estudio del perfil de ácidos grasos en sistemas biotecnológicos de *Theobroma cacao* L. sometidos a diferentes inductores de estrés.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autores: Andrea Carolina Palacios Rosado
Mateo Patricio Sánchez Sanaguano

Tutor: Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

Ambato – Ecuador

Julio - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova.

CERTIFÍCA:

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

Ambato, 23 de junio del 2025.

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

1803601853

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Andrea Carolina Palacios Rosado y Mateo Patricio Sánchez Sanaguano, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

Andrea Carolina Palacios Rosado

2250045735

AUTOR

Mateo Patricio Sánchez Sanaguano

1850988476

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

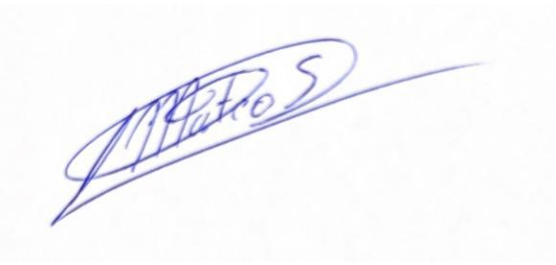
Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

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

Andrea Carolina Palacios Rosado

2250045735

AUTOR



Mateo Patricio Sánchez Sanaguano

1850988476

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
ESTEBAN MAURICIO FUENTES PEREZ
Validar únicamente con FirmaEC

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
MARIO DANIEL GARCIA SOLIS
Validar únicamente con FirmaEC

Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

Firmado electrónicamente por:
LILIANA ALEXANDRA CERDA MEJIA
Validar únicamente con FirmaEC

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

1804148086

Ambato, 02 de Julio de 2025

DEDICATORIA

*A mi madre, **Jaqueline**, por ser mi refugio, guía y fortaleza. Gracias por tu amor infinito, tus abrazos que sanan y por enseñarme con tu ejemplo que la verdadera fuerza nace del amor y la entrega. Tu fe en mí iluminó mis momentos más oscuros, y por eso, este logro también te pertenece.*

*A mi padre, **Carlos**, por ser mi fuerza serena, ejemplo de perseverancia y apoyo incondicional. Gracias por confiar en mis decisiones y por mostrarme, con tu amor firme y tranquilo, que el valor está en el compromiso y el corazón con que se hacen las cosas. Has sido mi pilar en los momentos difíciles y mi impulso cuando más lo necesité. Este logro también es tuyo.*

*A mis hermanas, **Karla, Dulce y Alisson**, por ser más que compañeras de vida: mi sostén, mi aliento constante y mi mayor orgullo. Gracias por estar siempre, por levantarme cuando caí y hacerme sentir que, con ustedes a mi lado, todo es posible. Este logro también les pertenece, porque sin su apoyo el camino habría sido más difícil.*

Y a mí misma, por avanzar aun cuando todo parecía cuesta arriba, por cada noche de estudio y cada duda transformada en aprendizaje. Por no rendirme, por creer en mis sueños y demostrar que la disciplina, el esfuerzo y la pasión pueden llevarnos tan lejos como el corazón lo decida. Este logro es fruto de lo que he sembrado con amor, valentía y convicción.

Andrea Carolina Palacios Rosado

DEDICATORIA

*A **Dios**, quien me ha dado el conocimiento, la sabiduría y la* esperanza *para culminar este arduo proceso. A Él, que me ha regalado más de una oportunidad para seguir adelante, que ha renovado mis fuerzas cuando sentí que no podía más, y que ha guiado mi camino con amor, paciencia y propósito. Sin su presencia constante, nada de esto hubiera sido posible.*

*Asimismo, dedico este logro a la **Ciencia**, que, con su método, lógica y descubrimiento, nos permite transformar la curiosidad en conocimiento, los problemas en soluciones, y los sueños en realidades. A través de ella he aprendido a cuestionar, a investigar, a dudar y a encontrar respuestas que dan sentido a nuestro paso por el mundo.*

*Dedico también este logro a mi amada **Familia**, pilar fundamental en cada etapa de mi vida. Gracias por su amor incondicional, por creer en mí incluso cuando yo dudaba, y por ser mi refugio y mi mayor fuente de fortaleza. Sin ustedes, este camino no habría tenido el mismo sentido*

Esta dedicatoria también es para todas las personas que creen en el poder de la fe y la razón, y que comprenden que ambas, en equilibrio, pueden llevarnos más lejos de lo que imaginamos.

Mateo Patricio Sánchez Sanaguano.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser mi sustento, mi refugio y mi luz en cada paso de este camino. Gracias por darme la fuerza cuando sentí que no podía más, por abrirme puertas y por recordarme que nunca estuve sola. A mis padres, Jaqueline y Carlos, por ser pilares fundamentales en mi vida. Gracias por su amor, sus sacrificios y por creer en mí incluso en los momentos más inciertos.

A mis hermanas, Karla, Dulce y Alisson, por ser mi hogar en los días difíciles y mi risa en los más felices. Gracias por acompañarme con amor, por impulsarme siempre y por recordarme que nunca camino sola. A mi compañero fiel, mi gatito O'Malley. Tus maullidos, tus siestas sobre mis apuntes y tu compañía silenciosa llenaron de ternura, paz y fuerza mi camino. A Andrés, gracias por acompañarme con cariño, paciencia y apoyo incondicional en este proceso. Tu presencia en momentos clave fue un alivio y una fuerza silenciosa que me sostuvo más de lo que imaginas.

A la coincidencia más linda que me regaló la universidad, mi Rebe, gracias por tu dulzura, tu presencia constante y esa capacidad de escuchar incluso lo que yo no sabía decir. Tu amistad llegó sin buscarla, pero se quedó para ser abrigo, fuerza y alegría. Gracias por celebrar cada uno de mis logros como si fueran tuyos y por recordarme que hay lazos que se vuelven familia. A mi Chris, uno de esos amigos que la vida pone en el momento justo, gracias por todas las enseñanzas, por esas palabras que siempre llegaron en el momento justo. Tu apoyo fue una base firme cuando todo parecía moverse. Su amistad es un recordatorio constante de que no todo se pide, hay personas que simplemente llegan y se quedan.

A mi tutora la Dra. Liliana Lalaleo, por haber creído en mí desde el inicio y por acompañarme con compromiso, respeto y dedicación en cada etapa de este proceso. Gracias por exigirme con cariño, por orientarme con paciencia, su confianza y su calidad humana marcaron profundamente mi formación.

Al Dr. William Calero, la Ing. Carla Peñafiel, la Ing. Patricia Dávalos y la Ing. Valeria Flores, gracias por sus enseñanzas, por su paciencia, por ser parte de mi crecimiento y por inspirarme con su pasión por la ciencia. A la Universidad Técnica de Ambato, por brindarme un espacio para soñar, aprender y crecer. Gracias por las oportunidades y por ser el escenario de tantos aprendizajes valiosos.

Gracias por cada instante compartido y por quienes acompañaron este recorrido. Llevo estos años conmigo como un impulso constante para avanzar y mantener viva la esperanza de nuevos sueños.

Andrea Carolina Palacios Rosado

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios, autor de mi vida, por permitirme desarrollar este trabajo y vivir experiencias que, aunque desafiantes, me han formado y fortalecido como persona. A Él, que siempre ha sido fiel y me ha impulsado a seguir adelante para alcanzar cada una de mis metas (Filipenses 4:13). Gracias por enseñarme que, con fe, todo es posible, y por permitirme crecer junto a las personas que amo.

A mis padres, por su incondicional apoyo a lo largo de toda mi carrera. Gracias por alentarme, por brindarme la oportunidad de estudiar y por asegurarse de que nunca me faltara nada. A mis hermanos, que con su ejemplo me han enseñado a tener paciencia y a valorar cada momento, tanto en la alegría como en la dificultad. A toda mi familia, por estar a mi lado cuando más los necesitaba y enseñarme la importancia de la valentía y la unidad.

A mis amigos y amigas, quienes han estado presentes en diferentes etapas, brindándome su apoyo tanto en los buenos como en los malos momentos. Gracias por compartir conmigo momentos inolvidables y por convertirse en parte importante de mi vida. Llevo conmigo los mejores recuerdos de quienes conocí a lo largo de esta carrera, especialmente a John Ibarra, Anthony Mero y Alejandro Sánchez, cuyo apoyo y amistad han sido invaluables.

A mi tutora, Dra. Liliana Lalaleo por guiarme en esta investigación, por su constante acompañamiento y por motivarnos a concluir este exigente proceso. También extiendo mi agradecimiento a los docentes que nos han apoyado con dedicación y compromiso. Extiendo un agradecimiento a Ing. Carla Peñafiel, Ing. Isabel Guerrero, Ing. Patricia Dávalos e Ing. Valeria Flores. A la Universidad Técnica de Ambato, por brindarme los recursos, instalaciones y conocimientos necesarios durante toda mi formación académica.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecerme a mí mismo. Por el esfuerzo, la dedicación y la perseverancia que puse en este trabajo. Por no rendirme en los días difíciles, por renunciar a momentos de ocio en favor del compromiso, y por elegir siempre el camino correcto. Me agradezco por ser quien soy y por todo lo que he logrado ser a través de este proceso.

Mateo Patricio Sánchez Sanaguano

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR....ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN....iii
DERECHOS DE AUTOR....iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO....v
DEDICATORIA....vi
DEDICATORIA....vii
AGRADECIMIENTO....viii
AGRADECIMIENTO....ix
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO....x
ÍNDICE DE TABLAS....xii
ÍNDICE DE FIGURAS....xiii
ÍNDICE DE ANEXOS....xiv
GLOSARIO DE TÉRMINOS....xv
RESUMEN EJECUTIVO....xvi
ABSTRACT....xvii
CAPÍTULO I....1
MARCO TEÓRICO....1
1.1. Antecedentes investigativos....1
1.2. Cacao fino de aroma en Ecuador: desafíos y oportunidades....2
1.3. Taxonomía de Theobroma cacao L....4
1.4. Producción de ácidos grasos en sistemas biotecnológicos....4
1.5. Influencia de los inductores de estrés en la síntesis de ácidos grasos....6
1.6. Desdiferenciación y obtención de sistemas biotecnológicos para la producción de ácidos grasos....7
1.7. Rutas metabólicas y regulación de la síntesis de ácidos grasos....8
1.8. Cuantificación de ácidos grasos....10
1.9. Objetivos....11
1.9.1. Objetivo General....11
1.9.2. Objetivos Específicos....11
CAPÍTULO II....12
METODOLOGÍA....12
2.1. Materiales....12
2.2. Métodos....13

2.2.1. Obtención del material vegetal 13
2.2.2. Subcultivo de sistemas biotecnológicos 14
2.2.3. Optimización de medios de cultivos 14
2.2.4. Aplicación de inductores de estrés 15
2.2.5. Extracción de ácidos grasos 15
2.2.6. Cuantificación de ácidos grasos 16
CAPÍTULO III 17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 17
3.1. Optimización de las condiciones del sistema biotecnológico de *Theobroma cacao* L. 17
3.2. Análisis estadístico 26
3.3. Determinación de la influencia de distintos inductores de estrés en el crecimiento de biomasa para la producción de ácidos grasos 27
3.4. Obtención preliminar del extracto lipídico de callos de *Theobroma cacao* L. sometidos a distintos inductores de estrés 31
3.5. Identificación y cuantificación de ácidos grasos empleando FTIR 32
3.6. Análisis Estadístico 42
CAPÍTULO IV 43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 43
4.1. Conclusiones 43
4.2. Recomendaciones 44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 45
ANEXOS 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de reactivos…… 12
Tabla 2. Listado de material fungible y equipos……...12
Tabla 3. Composición de medios de cultivo para promover el aumento de biomasa de Theobroma cacao L……14
Tabla 4. Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo MS……..18
Tabla 5. Análisis cualitativo del crecimiento del callo en el medio MS después de 28 días……19
Tabla 6. Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo B5……...21
Tabla 7. Análisis cualitativo del crecimiento del callo en el medio B5 después de 28 días……22
Tabla 8. Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo WPM……..24
Tabla 9. Análisis cualitativo del crecimiento del callo en el medio WPM después de 28 días……25
Tabla 10. Peso fresco de callos inducidos a estrés durante el experimento……..28
Tabla 11. Peso fresco de callos inducidos a estrés durante el experimento……..30
Tabla 12. Pesos del extracto lipídico bruto obtenido de callos de Theobroma cacao L……... 31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de transcripción (TFs) y vías de señalización que controlan la síntesis de ácidos grasos. 7
Figura 2. Ruta metabólica del ácido shikímico para la biosíntesis de ácidos en microorganismos. 9
Figura 3. Análisis estadístico del crecimiento de callos de *Theobroma cacao* L. en diferentes medios de cultivo suplementados con combinaciones hormonales. 27
Figura 4. Crecimiento de biomasa (peso fresco) de callos de *Theobroma cacao* L. 28
Figura 5. Curva de calibración del ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico. 33
Figura 6. Espectros de FTIR de cada tratamiento para el ácido oleico. 34
Figura 7. Espectros de FTIR de cada tratamiento para el ácido palmítico. 36
Figura 8. Espectros de FTIR de cada tratamiento para el ácido esteárico. 38
Figura 9. Efecto de los inductores de estrés en la biosíntesis de ácidos grasos saturados (ácido esteárico-ácido palmítico) en callos de *Theobroma cacao* L.. 40
Figura 10. Análisis estadístico de la producción de ácidos grasos en callos de *Theobroma cacao* L. 42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultado de la metodología empleada. 56
Anexo 2. Análisis de varianza de la optimización de las condiciones del sistema biotecnológico 56
Anexo 3. Peso fresco de callos inducidos a estrés durante el experimento. 57
Anexo 4. Proceso de hidrolisis ácida en los callos de *Theobroma cacao L.* 58
Anexo 5. Extracción del producto lipídico posterior a la hidrolisis ácida. 58
Anexo 6. Funcionamiento del espectrómetro FT-IR. 59
Anexo 7. Concentración del extracto de ácidos grasos obtenidos. 59
Anexo 8. Análisis de Varianza de la cuantificación de ácidos grasos. 60

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **MS:** Murashige & Skoog
- **B5:** Gamborg B5 Basal Medium
- **WPM:** Woody Plant Medium
- **AS:** Ácido Salicílico
- **MeJA:** Metil Jasmonato
- **Gro:** Glicerol
- **AG:** Ácidos grasos
- **FTIR:** Espectrometría Infrarroja por la Transformade de Fourier
- **PGRs:** Reguladores de crecimiento de las plantas
- **ANA:** ácido 1- naftalenacético
- **KIN:** Kinetina
- **BAP:** 6-bencilaminopurina

RESUMEN EJECUTIVO

El estudio de perfil de ácidos grasos en sistemas biotecnológicos de *Theobroma cacao* L. es crucial para comprender cómo inductores de estrés pueden mejorar la producción de metabolitos valiosos. El cacao, de la variedad fino de aroma es económicamente significativo para Ecuador, pero su cultivo enfrenta desafíos como el cambio climático y las enfermedades. Los enfoques biotecnológicos ofrecen un entorno controlado para explorar alternativas sostenibles que mejoren la biosíntesis de lípidos, esencial para la calidad de productos derivados del cacao, como el chocolate y los cosméticos. La investigación empleó sistemas *in vitro* para evaluar los efectos de los inductores de estrés (metil jasmonato, ácido salicílico, glicerol y temperatura elevada) en cultivos de callos de cacao. Se probaron tres medios de cultivo (MS, B5 y WPM) para optimizar la producción de biomasa; la combinación de WPM con hormonas específicas obtuvo los mejores resultados. Los ácidos grasos se extrajeron y cuantificaron mediante espectroscopía FTIR, centrándose en componentes principales como ácidos oleico, esteárico y palmítico. Los resultados demostraron que metil jasmonato y ácido salicílico aumentaron significativamente la biomasa y la producción de ácidos grasos, mientras que la temperatura elevada indujo estrés oxidativo, alterando también el perfil lipídico. Estos hallazgos sugieren que los inductores de estrés pueden modular la síntesis de ácidos grasos en cultivos de callos de cacao, lo que ofrece posibles estrategias para mejorar la producción de metabolitos en condiciones controladas. Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones destinadas a optimizar los sistemas biotecnológicos para la producción sostenible de cacao.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., ácidos grasos, estrés biótico, cultivo *in vitro*, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

The study of fatty acid profiling in biotechnological systems of *Theobroma cacao* L. is crucial to understand how stress inducers can enhance the production of valuable metabolites. Cocoa of the fine de aroma variety is economically significant for Ecuador, but its cultivation faces challenges such as climate change and disease. Biotechnological approaches offer a controlled environment to explore sustainable alternatives to improve lipid biosynthesis, essential for the quality of cocoa-derived products such as chocolate and cosmetics. The research employed *in vitro* systems to evaluate the effects of stress inducers (methyl jasmonate, salicylic acid, glycerol, and elevated temperature) on cocoa callus cultures. Three culture media (MS, B5 and WPM) were tested to optimize biomass production; the combination of WPM with specific hormones obtained the best results. Fatty acids were extracted and quantified by FTIR spectroscopy, focusing on major components such as oleic, stearic, and palmitic acids. The results showed that methyl jasmonate and salicylic acid significantly increased biomass and fatty acid production, while elevated temperature induced oxidative stress, also altering the lipid profile. These findings suggest that stress inducers can modulate fatty acid synthesis in cocoa callus cultures, offering possible strategies to enhance metabolite production under controlled conditions. This study lays the foundation for future research aimed at optimizing biotechnological systems for sustainable cocoa production.

Key words: *Theobroma cacao* L., fatty acids, biotic stress, *in vitro* culture, secondary metabolites.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie tropical de gran relevancia agronómica y económica, especialmente en países latinoamericanos como Ecuador, Colombia, Brasil y Perú, donde su cultivo constituye un pilar fundamental para la agricultura y las exportaciones **(Chaustre & Castillo, 2018).** Botánicamente, esta especie se clasifica en tres variedades principales: Forastero, Criollo y Trinitario **(Afoakwa, 2014).** A estas se suma el cacao Nacional, un ecotipo exclusivo de Ecuador, originario de la cuenca amazónica y caracterizado por su perfil genético único y cualidades organolépticas superiores **(Loor *et al.*, 2019).** El cacao Nacional, reconocido como "fino de aroma" por la Organización Internacional del Cacao (ICCO), representa aproximadamente el 60% de la producción total de cacao en Ecuador **(Bermudez *et al.*, 2022).** Su distintivo sabor floral, notas frutales y baja amargura lo han posicionado como uno de los materiales más cotizados en la industria chocolatera mundial, a pesar de que solo contribuye con el 2% de la producción global **(Mora *et al.*, 2022).** Esta escasa producción se debe, en parte, a su histórica susceptibilidad a enfermedades, como la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), que devastaron cultivos a principios del siglo XX **(Jiménez *et al.*, 2022).**

A diferencia del Forastero, variedad predominante en el mercado por su alta productividad y resistencia, pero con perfiles de sabor más amargos y menos complejos, el cacao Nacional es cultivado principalmente por su calidad aromática, un atributo que lo hace indispensable para chocolates premium **(Afoakwa, 2014).** Además de su valor comercial, este cultivo desempeña un rol clave en la conservación de la biodiversidad y en la sostenibilidad socioeconómica de miles de pequeños agricultores, quienes dependen de su producción para sus medios de vida **(Chaustre & Castillo, 2018).**

El cultivo del cacao enfrenta desafíos críticos que comprometen su sostenibilidad y producción a largo plazo. Entre los principales problemas se encuentran los patógenos fúngicos, como *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora spp.*, que pueden reducir los rendimientos hasta en un 50% en áreas sin un manejo fitosanitario adecuado, según lo reportado por **Jiménez *et al.* (2022).** Asimismo, el cambio climático representa una amenaza significativa, ya que el aumento de las temperaturas y la alteración de los patrones de precipitación incrementan el estrés hídrico y afectan las zonas óptimas para el cultivo del cacao, como lo indican **Ceccarelli *et al.* (2024).** Otro factor crítico es la contaminación del suelo por metales pesados, como cadmio y plomo, cuya acumulación en suelos agrícolas, documentada por **Plasencia *et al.* (2022)** y **Varela *et al.* (2023),**

pone en riesgo tanto la productividad del cacao como la seguridad alimentaria de los productos derivados. Estos desafíos requieren la implementación de estrategias integrales que combinen el mejoramiento genético, prácticas agrícolas sostenibles y políticas de conservación para garantizar la preservación del cacao Nacional, un emblema de calidad y patrimonio biocultural de Ecuador, como lo destacan **Bermudez *et al.*, (2022).**

No obstante, el cacao enfrenta desafíos críticos que amenazan su sostenibilidad. Entre ellos destacan los patógenos fúngicos, que reducen rendimientos hasta en un 50 % en zonas sin manejo fitosanitario **(Jiménez *et al.*, 2022);** el cambio climático, ya que según **Ceccarelli *et al.* (2024),** el aumento de temperaturas y la alteración en los patrones de lluvia podrían incrementar el estrés hídrico y afectar la distribución geográfica óptima para el cultivo; y la contaminación del suelo, debido a la acumulación de metales pesados como cadmio y plomo en suelos agrícolas, lo cual pone en riesgo tanto la productividad como la seguridad alimentaria **(Plasencia *et al.*, 2022; Varela *et al.*, 2023).** Estos factores exigen estrategias integrales que combinen mejoramiento genético, prácticas agrícolas sostenibles y políticas de conservación para preservar el legado del cacao Nacional como emblema de calidad y patrimonio biocultural de Ecuador **(Bermúdez *et al.*, 2022).**

Desde una perspectiva genética, el cacao Nacional es una variedad autóctona con alto valor filogenético. Su diversidad genética ha sido objeto de interés para programas de mejoramiento, ya que contiene características únicas relacionadas con el aroma, el sabor y la adaptación a condiciones ecológicas particulares. Esta riqueza genética lo convierte en una base estratégica para enfrentar los retos del cambio climático y la aparición de nuevas enfermedades (**Loor *et al.*, 2019**). En el campo de la investigación, el cacao Nacional ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con la propagación *in vitro*, la caracterización molecular, la respuesta a estrés abiótico y biótico, así como la optimización de técnicas para aumentar su productividad y resiliencia (**Ceccarelli *et al.*, 2024**). Estos avances no solo buscan mejorar su rendimiento, sino también garantizar la conservación de su perfil organoléptico original y su viabilidad frente a las amenazas actuales del sistema agroproductivo.

1.2. Cacao fino de aroma en Ecuador: desafíos y oportunidades

Ecuador se ha consolidado como uno de los principales productores mundiales de cacao fino de aroma, variedad altamente valorada por sus propiedades sensoriales únicas, como su aroma floral, notas frutales y baja acidez. Esta característica ha convertido al país en un referente global en la producción de cacao de alta calidad, con reconocimiento por parte de organismos internacionales como la ICCO (**Morales *et al.*, 2015**). No obstante, esta industria enfrenta diversos retos que

comprometen su sostenibilidad y competitividad. Uno de los principales desafíos agronómicos es el impacto de enfermedades fúngicas como la moniliasis, causada por *M. roreri*, y la escoba de bruja, provocada por *Moniliophthora perniciosa* **(Morato *et al*., 2023).** Estas patologías han demostrado una alta capacidad de diseminación y adaptación, afectando seriamente la productividad y calidad de los frutos, especialmente en zonas con alta humedad y poca renovación genética (**Jaimes *et al*., 2022**). Además, la limitada resistencia genética del cacao Nacional frente a estos patógenos intensifica el problema, lo cual obliga a los agricultores a recurrir a prácticas de manejo intensivas, muchas veces costosas y de difícil acceso para pequeños productores.

El cambio climático se ha sumado como una amenaza creciente, alterando las condiciones edafoclimáticas necesarias para el desarrollo óptimo del *Theobroma cacao* L. Las variaciones en temperatura, el aumento de eventos extremos como sequías o lluvias intensas, y el desplazamiento de zonas agroecológicas aptas han incrementado la incidencia de plagas y enfermedades, además de afectar el rendimiento del cultivo y la calidad del grano (**Carvajal *et al*., 2021**). Estos efectos, además de los altos costos de producción y la volatilidad de los precios internacionales, generan pérdidas económicas considerables y debilitan la posición de Ecuador en el mercado mundial del cacao, impactando principalmente a los pequeños y medianos productores, quienes constituyen la base del sistema cacaotero nacional. A pesar de estas adversidades, el cacao fino de aroma ofrece oportunidades significativas tanto en el plano económico como en el científico. Desde el punto de vista funcional, esta variedad no solo se distingue por su aroma, sino también por su particular composición de lípidos. La manteca obtenida del *Theobroma cacao* L. contiene una mezcla de ácidos grasos que incluye principalmente ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1), los cuales inciden directamente en las propiedades físicas del chocolate como el punto de fusión, la textura y la estabilidad del producto final (**Atanassova & Aayush, 2024**).

El perfil lipídico del cacao ecuatoriano fino de aroma no solo determina atributos sensoriales importantes, sino que también es clave en aplicaciones industriales, particularmente en los sectores alimentario, cosmético y farmacéutico. La calidad y proporción de estos ácidos grasos condiciona la dureza y cremosidad de la manteca de cacao, factor fundamental en la elaboración de chocolates premium y productos cosméticos de alta gama **(Miller & Van, 2022).** Por ello, la caracterización, conservación y mejoramiento del perfil lipídico del cacao Nacional representa una línea prioritaria de investigación para sostener la diferenciación del producto ecuatoriano frente a la oferta global **(Quelal *et al*., 2020)**. En este contexto, se hace indispensable integrar estrategias de innovación biotecnológica, mejora genética, análisis fisiológicos y estudios de composición química, con el objetivo de optimizar la resistencia del cultivo y asegurar la calidad intrínseca del cacao Nacional.

1.3. Taxonomía de Theobroma cacao L.

Theobroma cacao L. es una especie vegetal de notable importancia económica, botánica y cultural. Pertenece a la familia *Malvaceae*, subfamilia *Byttnerioideae*, grupo que incluye plantas predominantemente tropicales **(Bekele *et al.*, 1994)**. El género *Theobroma* abarca alrededor de 22 especies, muchas de las cuales se encuentran distribuidas en zonas húmedas de América del Sur y Central; sin embargo, *Theobroma cacao* L. es la única especie que ha sido domesticada a gran escala debido a su uso alimentario, industrial y su impacto socioeconómico en países productores.

A nivel taxonómico, su clasificación es la siguiente:

- **Reino**: Plantae
- **División**: Magnoliophyta
- **Clase**: Magnoliopsida
- **Orden**: Malvales
- **Familia**: Malvaceae
- **Género**: *Theobroma*
- **Especie**: *Theobroma cacao* L.

Esta especie es originaria de la cuenca del Amazonas, una de las regiones con mayor diversidad genética del planeta. Se presume que su domesticación comenzó hace más de 5.000 años por civilizaciones precolombinas que reconocieron su valor nutricional, medicinal y simbólico **(Bhattacharjee & Akoroda, 2018)**. Posteriormente, su cultivo se extendió hacia Mesoamérica, donde adquirió un rol central en las culturas maya y azteca, siendo utilizado como moneda, bebida ritual y ofrenda ceremonial. Tras la colonización europea, el cacao fue difundido globalmente, iniciando su cultivo comercial intensivo en África, Asia y Sudamérica **(Myers, 2023).** En condiciones naturales, *Theobroma cacao* L. crece como un arbusto o pequeño árbol de sombra, con hojas simples, flores caulifloras y frutos en forma de baya leñosa (mazorca), que contienen las semillas, comúnmente conocidas como granos de cacao **(Wartenberg *et al*., 2020)**. Estas semillas son la principal fuente de manteca de cacao, compuesta en su mayoría por triglicéridos ricos en ácidos grasos como el oleico, palmítico y esteárico, los cuales definen muchas de las propiedades físicas y sensoriales del chocolate **(Kongor *et al.*, 2024)**.

1.4. Producción de ácidos grasos en sistemas biotecnológicos

Los desafíos agronómicos, ecológicos y comerciales que enfrenta el cultivo de *Theobroma cacao* L. han impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles que permitan mejorar su productividad, calidad y resistencia. En este contexto, los sistemas biotecnológicos, como los cultivos *in vitro*, se presentan como una herramienta prometedora para el estudio y producción de metabolitos de

interés, incluyendo los ácidos grasos. Estos enfoques permiten simular condiciones específicas y controlar variables experimentales clave, lo cual favorece una comprensión más precisa de los procesos fisiológicos y bioquímicos que ocurren a nivel celular (**Rodríguez *et al.*, 2022**). El uso de sistemas biotecnológicos ofrece una plataforma eficaz para investigar metabolitos de interés, entre ellos la biosíntesis de lípidos en condiciones controladas, lo que resulta particularmente útil en especies como *Theobroma cacao* L., donde el metabolismo lipídico ha sido poco explorado en comparación con otros compuestos como los alcaloides o los polifenoles (**Nieves *et al.*, 2024**). Esta limitación representa una oportunidad científica para profundizar en los mecanismos que regulan la producción de lípidos y su relación con factores ambientales y fisiológicos, lo cual podría tener aplicaciones prácticas en la mejora del contenido y calidad de la manteca de cacao.

Estudiar la fisiología y bioquímica de los sistemas celulares de cacao permite evaluar cómo ciertos factores de estrés como la temperatura, la disponibilidad de nutrientes o la presencia de reguladores de crecimiento pueden influir directamente en la acumulación de metabolitos secundarios y compuestos lipídicos de interés industrial (**Kulesza *et al.*, 2024**). De acuerdo con **Zaytseva *et al.* (2021)** los cultivos *in vitro* permiten, además, la manipulación de dichos factores para inducir o inhibir rutas metabólicas específicas, lo que contribuye tanto a la comprensión científica como a la optimización de procesos productivos. Los ácidos grasos son componentes esenciales en las plantas, no solo por su papel estructural en las membranas celulares, sino también como reservorios energéticos y precursores de compuestos de señalización **(Villanova *et al.*, 2017)**. Tienen una función clave en la adaptación de las plantas a condiciones adversas, participando en mecanismos de defensa frente a factores bióticos y abióticos (**Winters *et al.*, 2024**). En este sentido, los sistemas de cultivo *in vitro* proporcionan un entorno altamente controlado para estudiar los factores que afectan la síntesis de ácidos grasos, como el tipo y concentración del medio de cultivo, la combinación de hormonas vegetales, o la presencia de inductores de estrés físico o químico (**Bauddh *et al.*, 2020**).

Por esta razón, la aplicación de sistemas biotecnológicos para la investigación del metabolismo lipídico de *Theobroma cacao* L. constituye una vía prometedora para la generación de conocimiento científico y el desarrollo de estrategias productivas más sostenibles. Esto no solo podría beneficiar al sector industrial, sino también contribuir a la conservación genética y la resiliencia de los cultivos frente a un entorno cambiante.

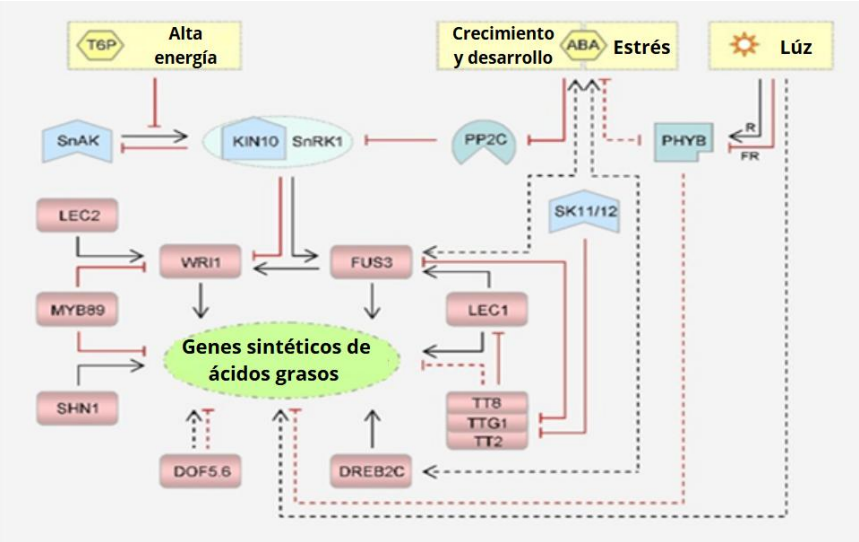
1.5. Influencia de los inductores de estrés en la síntesis de ácidos grasos

Los inductores de estrés modifican significativamente las rutas metabólicas en las plantas, afectando directamente la síntesis de ácidos grasos mediante la activación o represión de genes clave y la modulación de enzimas específicas. En cultivos celulares de *Theobroma cacao* L., estos factores ofrecen una oportunidad para optimizar la producción de lípidos en condiciones controladas.

Como se muestra en la Figura 1, se resume una red de factores de transcripción (TFs) y vías de señalización que modulan genes lipogénicos. Por ejemplo, El gen WRINKLED1 (WRI1) desempeña un papel crucial en la regulación de la síntesis de ácidos grasos al activar genes clave como BCCP2, KASI y FAD2, cuya expresión está modulada por señales energéticas, como el sistema T6P-SnRK1, que responde al estado metabólico de la célula. Por otro lado, los factores de transcripción de respuesta a estrés, como DREB2C y MYB89, regulan la expresión de desaturasas (FAD3, FAD7/8), que son esenciales para la biosíntesis de ácidos grasos insaturados en condiciones de estrés abiótico, adaptando el perfil lipídico de la planta a entornos adversos. Además, la interacción hormonal entre el ácido abscísico (ABA) y el MeJA actúa sinérgicamente para inducir la expresión de enzimas como DGAT y LOX, las cuales son fundamentales en la acumulación de triacilgliceroles (TAGs), un componente clave en el almacenamiento de lípidos, según lo reportado por **He *et al.*, (2020).** Estas regulaciones genéticas y hormonales son esenciales para optimizar la biosíntesis de lípidos en plantas, especialmente en cultivos como el cacao, donde los ácidos grasos determinan la calidad del producto.

Figura 1.

F*actores de transcripción (TFs) y vías de señalización que controlan la síntesis de ácidos grasos.*



Nota. La figura muestra cómo factores como WRII y DREB2C integran señales ambientales (luz, temperatura) y hormonales (ABA, JA) para modular la expresión de enzimas lipogénicas (ej. ACC, FADs), optimizando el perfil de ácidos grasos bajo estrés (adaptado de ***He et al., 2020***).

1.6. Desdiferenciación y obtención de sistemas biotecnológicos para la producción de ácidos grasos

La producción de ácidos grasos en sistemas biotecnológicos de *Theobroma cacao* L. se inicia con la desdiferenciación de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*, un proceso clave para generar callos embriogénicos con capacidad de sintetizar lípidos bajo condiciones controladas **(Henao & Urrea, 2020).** Este enfoque ha demostrado ser eficaz no solo en cacao, sino también en otros cultivos oleaginosos, donde la selección de explantes (hojas jóvenes o cotiledones) y el uso de reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas optimizan la formación de callos ricos en metabolitos lipídicos **(Keita *et al.*, 2022).** Los sistemas biotecnológicos, como los cultivos de callos o suspensiones celulares, ofrecen ventajas significativas al proporcionar plataformas estandarizadas y homogéneas para la producción de compuestos bioactivos, incluyendo ácidos grasos, flavonoides y alcaloides, con aplicaciones en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria **(Kongor *et al.*, 2024).**

En el contexto del cacao, estos sistemas permiten una manipulación precisa de factores ambientales y bioquímicos. Por ejemplo, la adición de inductores de estrés como el metil jasmonato (MeJA) y

el ácido salicílico (AS) ha demostrado incrementar la eficiencia en la producción de metabolitos secundarios. Según **Demirci (2022),** el MeJA estimula la actividad de enzimas clave como la lipoxigenasa (*LOX*) y el diacilglicerol aciltransferasa (*DGAT*), lo que se traduce en una mayor acumulación de triacilglicéridos (TAGs) en callos de cacao. Por otro lado, el AS no solo induce la síntesis de ácidos grasos como mecanismo de defensa, sino que también promueve la producción de antioxidantes fenólicos, mejorando la resiliencia celular frente a estrés oxidativo **(Woch *et al.*, 2023).**

Además de los callos, las plantas *in vitro* de cacao representan una herramienta complementaria para estudios metabólicos. Estos sistemas permiten explorar la biosíntesis de lípidos en tejidos diferenciados (ej. hojas o raíces) bajo condiciones controladas de luz, temperatura y nutrientes, facilitando la identificación de genes y vías reguladoras **(Kongor *et al.*, 2024).** La combinación de estas plataformas con técnicas como la edición genética o la metabolómica abre nuevas posibilidades para optimizar la producción de ácidos grasos de alto valor agregado, reduciendo la dependencia de los cultivos tradicionales y sus limitaciones estacionales.

1.7. Rutas metabólicas y regulación de la síntesis de ácidos grasos

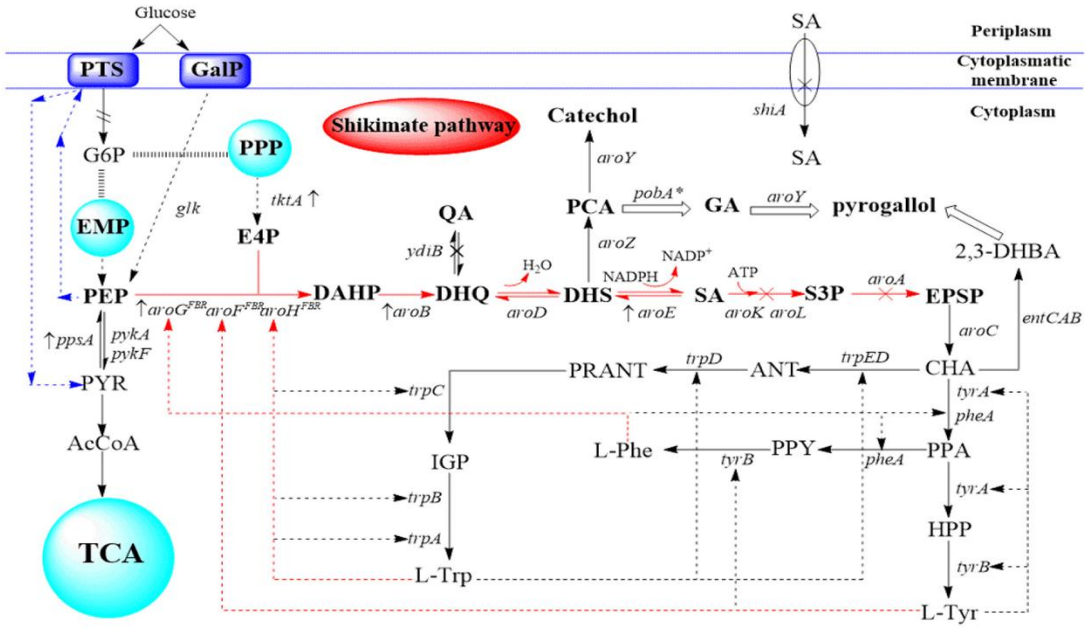
La síntesis de ácidos grasos en cultivos celulares de *Theobroma cacao* L. se lleva a cabo principalmente en los plastidios, donde la acetil-CoA carboxilasa (ACC) cataliza el paso limitante: la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA, iniciando así la formación de ácido palmítico (C16:0) (**Henao & Urrea, 2020**). Esta ruta biosintética depende críticamente de la disponibilidad de sustratos (acetil-CoA, malonil-CoA) y cofactores como el NADPH, generado a través del ciclo de las pentosas fosfato y la fotosíntesis en tejidos fotosintéticos (**Kulesza *et al.*, 2024**). Estudios recientes destacan que factores ambientales, como la temperatura, modulan la actividad de enzimas clave: bajas temperaturas incrementan la expresión de desaturasas (*FAD2*, *FAD3*), favoreciendo ácidos grasos poliinsaturados (ej. linoleico y α-linolénico), mientras que altas temperaturas promueven la elongasa (*KASII*), aumentando la proporción de ácidos grasos saturados (**Das *et al.*, 2024**).

Además de la ruta principal, la elongación de ácidos grasos en el retículo endoplásmico y la vía del ácido shikímico juegan roles complementarios. La primera, mediada por elongasas (*FAE*), produce ácidos grasos de cadena larga (C20–C24), esenciales para ceras y esfingolípidos. La segunda, vinculada al metabolismo secundario, genera precursores para compuestos

fenilpropanoides con actividad antioxidante, que pueden influir en la estabilidad oxidativa de los lípidos (**Su *et al.*, 2021**).

Figura 2.

Ruta metabólica del ácido shikímico para la biosíntesis de ácidos en microorganismos.



Nota. Las flechas rojas indican puntos de regulación transcripcional, las líneas discontinuas representan múltiples pasos enzimáticos, y los óvalos coloreados destacan compartimentos metabólicos específicos **(Wu *et al.*, 2022).**

La aplicación de elicitores como el AS y MeJA ha demostrado ser una estrategia efectiva para manipular estas rutas. En *Cereus hildmannianus*, el AS induce la acetil-CoA carboxilasa y desaturasas, incrementando hasta un 30% la acumulación de ácidos grasos insaturados (**Filippi *et al.*, 2021**). Por su parte, el MeJA activa la lipoxigenasa (*LOX*) y el diacilglicerol aciltransferasa (*DGAT*), y el diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) enzimas clave en la síntesis de triacilglicéridos (**Woch *et al.*, 2023**). Estos hallazgos sugieren que, en cacao, la combinación de elicitores con condiciones de cultivo optimizadas (ej. temperatura controlada y medios enriquecidos con carbono) podría mejorar la producción de lípidos con perfiles específicos, como alto contenido de ácido esteárico (C18:0) u oleico (C18:1), demandados por la industria alimentaria por sus propiedades funcionales y estabilidad. La integración de herramientas ómicas (transcriptómica, lipidómica) permitiría identificar blancos moleculares para ingeniería metabólica. Por ejemplo, la sobreexpresión de *WRINKLED1* (*WRI1*), un regulador maestro de la lipogénesis, o la edición de genes de desaturasas mediante CRISPR/Cas9, podrían diseñar sistemas biotecnológicos de cacao con perfiles lipídicos personalizados.

1.8. Cuantificación de ácidos grasos

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica ampliamente utilizada para la identificación y cuantificación de ácidos grasos en muestras diversas, debido a su rapidez, carácter no destructivo y capacidad para detectar grupos funcionales específicos, como se describe en **Bobroff *et al.*, (2016)**. Esta técnica se basa en la absorción de radiación infrarroja por los enlaces químicos, generando picos característicos en regiones espectrales que permiten diferenciar ácidos grasos ya sean saturados o insaturados, como el ácido palmítico, ácido esteárico (saturados) y el ácido oleico (insaturado).

Para los ácidos grasos saturados, se observan bandas de absorción específicas, como la banda ancha de estiramiento O–H alrededor de 3400 cm^{-1}, los estiramientos de CH_2 alifáticos entre 2850–2920 cm^{-1}, el estiramiento del grupo carbonilo C=O cerca de 1740 cm^{-1} y el movimiento de "rocking" de CH_2 alrededor de 720 cm^{-1}. Por otro lado, los ácidos grasos insaturados presentan estiramientos =C–H de dobles enlaces cerca de 3010 cm^{-1}, estiramientos C=C alrededor de 1650 cm^{-1} y vibraciones de torsión de =CH fuera del plano entre 944–970 cm^{-1}. Estas regiones espectrales permiten una diferenciación clara entre los tipos de ácidos grasos y su cuantificación mediante curvas de calibración, como se reporta en **Lucarini *et al.*, (2020)**. Aunque otras técnicas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), ofrecen alta sensibilidad y especificidad para analizar perfiles lipídicos **(Baere *et al.*, 2013).** No obstante, FTIR se destaca por su simplicidad y capacidad para analizar muestras complejas sin necesidad de derivatización o volatilización, lo que la convierte en una herramienta complementaria esencial en el estudio de lípidos **(Slimon *et al.*, 2017).**

Por tanto, el estudio de diferentes inductores en cultivos *in vitro* de *Theobroma cacao* L. permite un enfoque más preciso para entender cómo se regula la síntesis lipídica en respuesta a condiciones ambientales. La manipulación controlada de factores como la temperatura, el glicerol, el AS y el MeJA no solo mejora la producción de ácidos grasos, sino que también contribuye al diseño de estrategias biotecnológicas sostenibles orientadas a la obtención de compuestos de alto valor industrial.

1.9. Objetivos

1.9.1. Objetivo General

Estudiar el perfil de ácidos grasos en sistemas biotecnológicos de *Theobroma cacao* L. sometidos diferentes inductores de estrés.

1.9.2. Objetivos Específicos

- Optimizar las condiciones de un sistema biotecnológico de *Theobroma cacao* L. para la obtención de mayor biomasa.
- Determinar la influencia de distintos inductores de estrés en la producción de ácidos grasos en sistemas biotecnológicos de *Theobroma cacao* L.
- Extraer y cuantificar los ácidos grasos producidos en los sistemas biotecnológicos de *Theobroma cacao* L. sometidos a distintos inductores de estrés.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

El presente trabajo de titulación tuvo un enfoque experimental y se desarrolló en los laboratorios académicos, así como en el laboratorio de Biología Vegetal perteneciente a la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB) de la Universidad Técnica de Ambato. En la Tabla 1 se detallan los reactivos empleados, mientras que en la Tabla 2 se presenta el listado del material fungible y los equipos utilizados a lo largo de la investigación.

Tabla 1.

Listado de reactivos.

Reactivos	
Medio Murashige y Skoog	2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)
Medio Gamborg B5	6-Benzilaminopurina (BAP)
Medio Woody Plant Medium	Ácido salicílico (SA)
Ácido naftalenoacético (ANA)	Metil jasmonato (MeJA)
Kinetina (KIN)	Glicerol
Sacarosa	Isopropanol
Phytagel	NaOH en metanol
Etanol 70 y 96 %	HCl en metanol
Hidróxido de Sodio	Metanol
Ácido Clorhídrico	Agua destilada
Agua Estéril	Hexano

Tabla 2.

Listado de material fungible y equipos.

Equipos	**Material fungible**
Autoclave	Bisturís
Balanza analítica	Botellas de Vidrio Tapa Azul 100, 250, 500 y 100 mL
Cámara climática	Espátulas
Centrífuga	Filtros de Jeringa de 25 mm

Equipos	Material fungible
Congelador	Bisturís
Destilador de Agua	Jeringas 2 y 3 mL
Espectrómetro FTIR	Filtros de 25 mm
Incubadora	Agitador Magnético Elicrom
Microcentrífuga	Matraces de 250 mL
Microondas	Micropipeta 0,5 – 10, 20 – 200 y 100 – 1000 uL
Refrigerador	Papel Aluminio
Plancha de Calentamiento	Paquete de Fundas Ziploc
Plancha de Agitación	Paquetes de Vasos Plásticos de 16 oz
Potenciómetro	Placas Petri
Vórtex	Pinzas
Ultracongelador	Probeta de 100 y 1000 mL
	Puntas de Micropipetas Azules y Amarillas
	Rollo de Parafilm
	Callos de *Theobroma cacao* L.
	Tubos Eppendorf 1,5 mL
	Tubos Falcon 10 mL y 50 mL
	Viales de 1,5 mL
	Frascos ambar de 500 ml

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención del material vegetal

El material vegetal de *Theobroma cacao* L. fue proporcionado por el Departamento de Calidad del Cacao del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, ubicada en Quevedo, Los Ríos. Se seleccionaron los sistemas con características morfológicas óptimas, como una textura firme y color uniforme, para asegurar un mayor potencial de regeneración, así como, reducir el riesgo de contaminación **(Eibl *et al.*, 2018).**

2.2.2. Subcultivo de sistemas biotecnológicos

Se utilizaron tres medios de cultivo para la micropropagación vegetal: Murashige & Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM) y Gamborg B5, con la finalidad de identificar el medio óptimo que promueva un mejor crecimiento y generar mayor biomasa **(Tsai & Kinsella, 1981; Leathers & Scragg, 1989; Guillou & Verdier, 2022)**. Para evaluar la proliferación de biomasa, se emplearon las combinaciones de medio y reguladores de crecimiento vegetal descritas en la Tabla 3. Las concentraciones de sales minerales se ajustaron según las formulaciones originales de cada medio: 4,4 g/L para MS, 2,41 g/L para WPM y 3,2 g/L para B5. Además, se incorporó sacarosa como fuente de carbono (30 g/L) y phytagel como agente gelificante (7 g/L) para la preparación de medios sólidos **(Guillou & Verdier, 2022).**

Tabla 3.

Composición de medios de cultivo para promover el aumento de biomasa de Theobroma cacao L.

Tratamiento	Medio	Fuente de Carbono	Auxinas	Concentración (mg/L)	Citoquininas	Concentración (mg/L)
1	MS	S	N/A	0	N/A	0
2	MS	S	ANA	1	KIN	0,5
3	MS	S	ANA	2	KIN	0,5
4	MS	S	2,4-D	1	BAP	0,5
5	MS	S	2,4-D	2	BAP	0,5
6	WPM	S	N/A	0	N/A	0
7	WPM	S	ANA	1	KIN	0,5
8	WPM	S	ANA	2	KIN	0,5
9	WPM	S	2,4-D	1	BAP	0,5
10	WPM	S	2,4-D	2	BAP	0,5
11	B5	S	N/A	0	N/A	0
12	B5	S	ANA	1	KIN	0,5
13	B5	S	ANA	2	KIN	0,5
14	B5	S	2,4-D	1	BAP	0,5
15	B5	S	2,4-D	2	BAP	0,5

Nota. *H*ormonas vegetales empeladas: Ácido naftalenacético (ANA), Kinetina (KIN), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (BAP).

2.2.3. Optimización de medios de cultivos

Los sistemas biotecnológicos fueron cultivados, según las condiciones reportadas por **Popova *et al.* (2023),** en la cámara climática BINDER KVWF 720 a condiciones de incubación de 25

± 2 °C, humedad relativa del 40% y oscuridad para favorecer la proliferación celular y la formación de callo somático.

Se realizó un seguimiento cada 7 días, documentando el crecimiento y cualquier cambio morfológico observable en el tejido o el medio. Conforme a la metodología propuesta por **Luz *et al.* (2024)** cada 28 días los sistemas biotecnológicos fueron subcultivos en medios frescos, hasta alcanzar una cantidad de biomasa suficiente para los análisis posteriores.

2.2.4. Aplicación de inductores de estrés

Una vez que se identificó la mejor composición de medio de cultivo para el incremento de biomasa celular. Se seleccionaron callos con características óptimas, color uniforme, alta friabilidad y ausencia de oxidación, y se transfirieron 2 ± 0,08 gramos al medio de cultivo con los inductores de estrés a una concentración y característica determinada: MeJA [150 uM], AS [50 uM], glicerol al 3% y como inductor de estrés térmico, la biomasa celular se incubó a 35 °C **(Leathers & Scragg, 1989).** El estudio fue desarrollado con 3 réplicas y se empleó un control que permitió evaluar el efecto de los diferentes inductores de estrés en intervalos de 7, 14, 21, 28 días. Las condiciones de crecimiento fueron las reportadas anteriormente en la sección 2.2. Los tratamientos sometidos a estrés térmico fueron incubados en una estufa MEMMERT a 35 °C y demás condiciones similares. Los callos fueron extraídos cuidadosamente con pinzas, se retiró el medio de cultivo adherido y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril para eliminar residuos. En base a la metodología empleada por **García *et al*. (2021)** las muestras fueron pesadas y almacenadas en sobres de aluminio a –80 °C, con el fin de preservar su integridad estructural y prevenir la oxidación de metabolitos sensibles, como los lípidos y compuestos fenólicos**.**

2.2.5. Extracción de ácidos grasos

Se empleó la metodología estandarizada descrita por la **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (2016),** con algunas modificaciones. Las 15 muestras obtenidas, (dos por cada uno de los cinco tratamientos) fueron descongeladas y secadas en estufa a 60 °C durante una hora, las cuales fueron tratadas con una hidrólisis ácida y se transfirieron a matraces de 250 mL, donde se adicionó 100 mL de ácido clorhídrico (HCl) 3 N. La mezcla se calentó hasta alcanzar el punto de ebullición y se mantuvo en estas condiciones durante aproximadamente 45 minutos. Finalizada la hidrólisis, el contenido fue filtrado, y el residuo

sólido restante se enjuagó cuidadosamente con agua destilada caliente directamente sobre el mismo filtro, asegurando la eliminación de residuos ácidos.

El residuo sólido se dejó secar a temperatura ambiente y fue sometido a una extracción con 60 mL de hexano en un equipo automático de extracción continua (VELP SER 148) durante 2 horas y 10 minutos. El proceso incluyó tres fases: 40 minutos de inmersión con hexano en ebullición a 135 °C ± 2 a 60 minutos de lavado del sistema y la muestra, y 30 minutos finales para la recuperación parcial del disolvente. De esta manera, se obtuvo la fracción lipídica total, incluyendo los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis.

2.2.6. Cuantificación de ácidos grasos

Para la cuantificación de ácidos grasos, se aplicó la metodología descrita por **Ismail *et al.* (1963)** utilizando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) como una determinación cuantitiva. Inicialmente, se elaboró una curva de calibración para el ácido esteárico, siendo este el ácido graso mayoritario en la manteca de cacao **(Sherazi *et al.*, 2007)**. Para ello, se prepararon soluciones estándar con hexano a concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/mL. Estas soluciones permitieron construir la curva de calibración mediante la obtención de espectros en absorbancia y realizar el ajuste de ecuaciones lineales.

Una vez concluido el proceso de extracción lipídica, cada muestra fue resuspendida en 3 mL de hexano, asegurando el lavado completo del recipiente de extracción para evitar pérdidas de muestra **(Committe, 2022).** Las soluciones resultantes fueron almacenadas en viales estériles, adecuadamente sellados, para su análisis inmediato. Las mediciones fueron realizadas con un espectrofotómetro FTIR modelo Spectrum Two (ATR) de la marca PerkinElmer, utilizando el software Spectrum 10. Para cada muestra se realizaron tres barridos consecutivos, obtenidos en modo de transmitancia, los cuales posteriormente se transformaron a absorbancia para el análisis cuantitativo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Optimización de las condiciones del sistema biotecnológico de *Theobroma cacao* L.

Para la obtención de una mayor cantidad de biomasa de callos de *Theobroma cacao* L., se evaluaron cinco diferentes combinaciones hormonales en tres medios de cultivo: MS, B5 y WPM. Respecto al medio de cultivo MS (Tabla 4), ninguno de los tratamientos evaluados presentó una proliferación eficiente de biomasa de callo de *Teobroma cacao* L. Si bien el tratamiento 3 (ANA 2 mg/L – KIN 0,5 mg/L) mostró una ligera ventaja en comparación con los demás, los resultados siguen siendo limitados **(Bernabé *et al*., 2015).** Como se observa en la Tabla 5, a partir del día 14 se observó una escasa formación de callo, y para el día 21 apenas se evidenció la presencia de una pequeña cantidad de callo friable. Sin embargo, este callo se volvió compacto, indicando una pérdida de crecimiento activo y una consistencia más dura, lo que no resulta favorable para el crecimiento de biomasa. Esto sugiere que, si bien la auxina ANA en mayor concentración combinada con una baja dosis de KIN puede inducir cierto grado de desdiferenciación celular, como lo han señalado diversos estudios **Cabral *et al.*, (2022); González *et al.*, (2024); Yetgin *et al.*, (2025)** las condiciones del medio MS no fueron óptimas para promover una proliferación sostenida y adecuada del callo.

Los tratamientos que contenían 2,4-D combinada con BAP (tratamientos 4 y 5) presentaron resultados aún menos favorables. Durante los primeros 21 días, no se observaron cambios significativos en la morfología del tejido y para el día 28 se evidenció la presencia de oxidación y necrosis en los callos **(Kulesza *et al.*, 2024)**. Este fenómeno ha sido asociado a la acumulación de compuestos fenólicos que, al no ser neutralizados, se oxidan en contacto con el oxígeno, provocando el oscurecimiento progresivo del tejido, como ha sido descrito por **(Sivachandran *et al.*, 2017).** En este contexto, el uso de 2,4-D combinado con BAP no solo resultó ineficaz para la inducción y proliferación de callo, sino que también comprometió la viabilidad del tejido vegetal **(Nurazah *et al.*, 2009).**

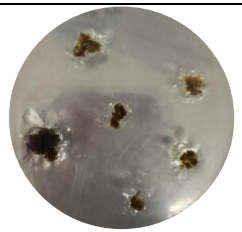
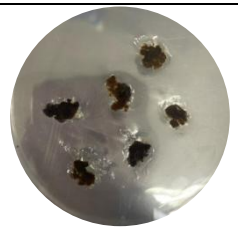
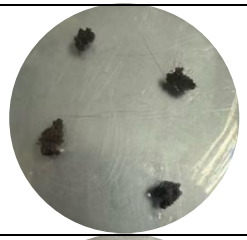
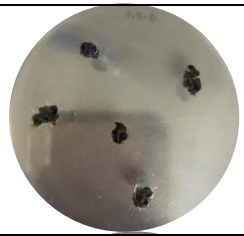
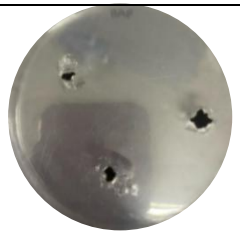
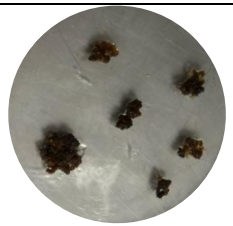
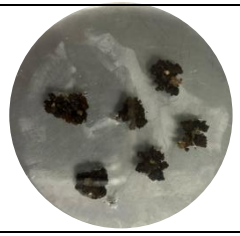
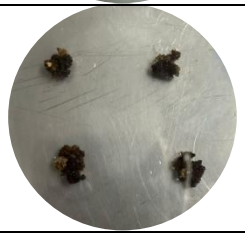
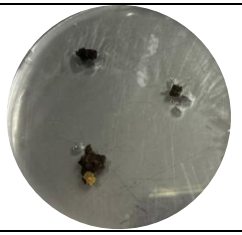
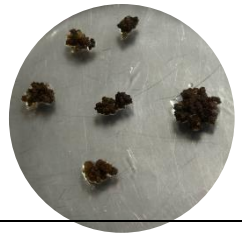
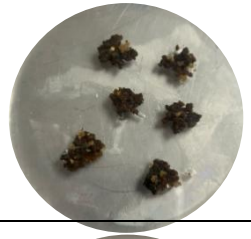
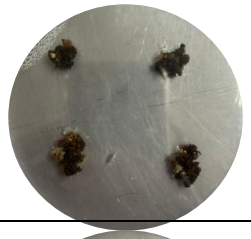
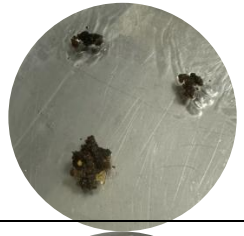
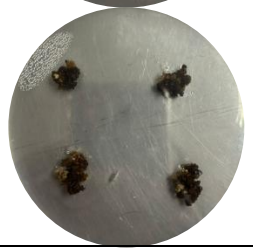
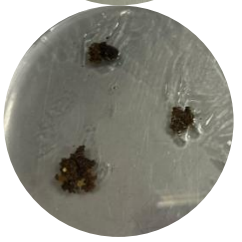
Tabla 4.

Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo MS.

Día	Tratamiento	Auxinas	Concentración (mg/L)	Citoquininas	Concentración (mg/L)	Observaciones
7	1	N/A	0	N/A	0	No se observó cambios.
	2	ANA	1	KIN	0,5	No se observó cambios.
	3	ANA	2	KIN	0,5	No se observó cambios.
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	No se observó cambios.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	No se observó cambios.
14	1	N/A	0	N/A	0	No se observó cambios.
	2	ANA	1	KIN	0,5	Poca formación de callo.
	3	ANA	2	KIN	0,5	Poca formación de callo.
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	No se observó cambios.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	No se observó cambios.
21	1	N/A	0	N/A	0	Poca formación de callo.
	2	ANA	1	KIN	0,5	Poca formación de callo.
	3	ANA	2	KIN	0,5	Poca formación de callo friable.
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	No se observó cambios.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	Cambio de coloración (oxidación).
28	1	N/A	0	N/A	0	Cambio de coloración (oxidación).
	2	ANA	1	KIN	0,5	Cambio de coloración (oxidación).
	3	ANA	2	KIN	0,5	Poca formación de callo compacto.
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	Poca formación de callo oxidado.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	Poca formación de callo oxidado.

Tabla 5.

Análisis cualitativo del crecimiento del callo en el medio MS después de 28 días.

Tiempo	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
7					
14					
21					
28					

En el medio de cultivo B5 (Tabla 6) se evidenció una respuesta ligeramente más favorable en comparación con el medio MS, destacando el tratamiento con ANA 2 mg/L + KIN 0,5 mg/L (Tratamiento 3). Como se observa en la Tabla 7, a partir del día 14 se observó la presencia de nuevo tejido calloso de tonalidad crema-blanquecina, lo que sugiere una respuesta inicial al estímulo hormonal aplicado. No obstante, a partir del día 21, el tejido comenzó a compactarse, un patrón ya observado en el medio MS, lo cual puede indicar una reducción en la actividad meristemática del callo. Aunque este cambio morfológico podría interpretarse como un signo de diferenciación, en el contexto de sistemas orientados a la proliferación de biomasa y la producción de metabolitos secundarios como los ácidos grasos, la formación de callo compacto representa una limitación, ya que está asociada a un menor potencial de crecimiento y posible estrés celular **(Gómez *et al.*, 2021).**

Por su parte, los tratamientos con 2,4-D en combinación con BAP continuaron mostrando respuestas desfavorables. Al igual que en el medio MS, se registró oxidación progresiva de los callos hasta el día 28, lo que indica que la combinación de este tipo de auxina con citoquinina no logró inducir una respuesta morfogénica positiva. La oxidación observada compromete la viabilidad del tejido y ha sido atribuida al exceso de compuestos fenólicos que, al oxidarse en presencia de oxígeno y enzimas como polifenoloxidasa y peroxidasa, generan oscurecimiento y necrosis, tal como lo describe **Dwivedi *et al.*, (2016)** y **Dymarska *et al.*, (2015)**.

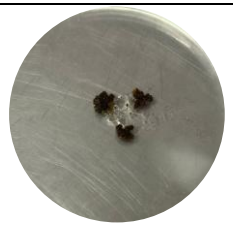
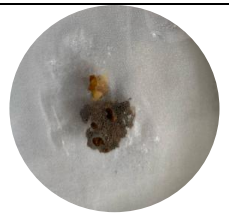
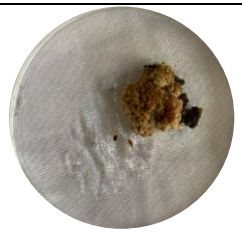
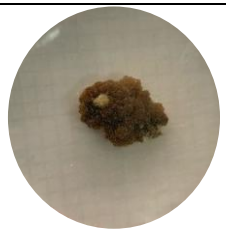
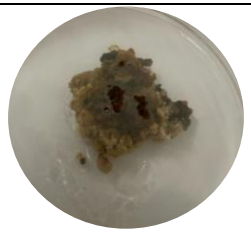
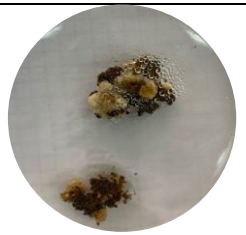
Tabla 6.

Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo B5.

Día	Tratamiento	Auxinas	Concentración (mg/L)	Citoquininas	Concentración (mg/L)	Observaciones
7	1	N/A	0	N/A	0	No se observó cambios.
	2	ANA	1	KIN	0,5	No se observó cambios.
	3	ANA	2	KIN	0,5	Poca formación de callos friables
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	Poca formación de callos friables
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	No se observó cambios.
14	1	N/A	0	N/A	0	Poca formación de callos friables
	2	ANA	1	KIN	0,5	Poca formación de callos friables
	3	ANA	2	KIN	0,5	Cambio en la coloración (color crema)
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	No se observó cambios.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	Poco crecimiento de callos friables.
21	1	N/A	0	N/A	0	Poco crecimiento de callos friables.
	2	ANA	1	KIN	0,5	Crecimiento de callos friables
	3	ANA	2	KIN	0,5	Formación de callos compactos
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	Poco crecimiento de callos friables.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	Poco crecimiento de callos friables.
28	1	N/A	0	N/A	0	La biomasa se comenzó a compactar.
	2	ANA	1	KIN	0,5	Formación de callo con aspecto cremoso.
	3	ANA	2	KIN	0,5	Cambio de coloración (oxidación)
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	Crecimiento de callos oxidados.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	Crecimiento de callos friable.

Tabla 7.

Análisis cualitativo del crecimiento del callo en el medio B5 después de 28 días.

Día	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
7					
14					
21					
28					

En cuanto al medio de cultivo WPM (Tabla 8), resultó ser el más eficiente en la inducción y proliferación de callo friables de *Theobroma cacao* L., en comparación con el medio MS y B5. Específicamente, el tratamiento 3 (ANA 2 mg/L + KIN 0,5 mg/L) mostró una respuesta altamente favorable a partir del día 21, con una mayor formación de callos friables y una mejor coloración, lo cual propone una alta tasa de división celular sin manifestaciones evidentes de estrés oxidativo ni compactación de biomasa **(Jayusman *et al.*, 2022**). Como se observa en la Tabla 9, esta combinación hormonal parece haber logrado un balance optimo entre la proliferación celular y mantenimiento de la estructura friable.

El éxito de este medio puede explicarse por la composición iónica menos concentrada del WPM, particularmente en nitrógeno total, calcio y sulfatos, lo cual lo hace más adecuado para especies leñosas o de crecimiento lento como lo es *Theobroma cacao* L. **(Leathers & Scragg, 1989; Sivachandran *et al.*, 2017)**. **Normanshah *et al.* (2020)** menciona que WPM favorece la formación de callos de cacao debido a su menor fuerza iónica en comparación con medios como MS, lo que permite un desarrollo más controlado y menos agresivo del tejido como sucedió en el tratamiento 1. A esto se suma el rol clave del ANA como auxina promotora de división celular y de la citoquinina KIN en la activación del metabolismo celular, lo cual puede haber contribuido sinérgicamente al éxito observado **(González *et al.*, 2024; Yetgin *et al.*, 2025).**

Además del tratamiento 3, otros tratamientos también evidenciaron resultados positivos. Por ejemplo, el tratamiento 2 (ANA 1 mg/L + KIN 0,5 mg/L) que, aunque mostró una menor formación de callo, este fue friable con buena textura a partir del día 21, indicando que incluso a una menor concentración de auxina, el medio WPM mantiene una eficiencia destacada. Cabe señalar que en este tratamiento no se observó oxidación evidente ni compactación, y se reportó un callo con aspecto cremoso, una característica asociada a tejido metabólicamente activo **(Lakshmaiah *et al.*, 2022)**. En contraste, aunque en el tratamiento 5 (2,4-D 2 mg/L + BAP 0,5 mg/L) también hubo crecimiento, este se tradujo en formación de callos compactos y signos de oxidación. Este fenómeno podría estar relacionado con el tipo de auxina utilizada, ya que, a diferencia del ANA, el 2,4-D tiene un efecto más intenso sobre la inducción de callos, pero también puede favorecer la acumulación de compuestos fenólicos, lo que conlleva a oxidación y menor viabilidad celular **(Fan *et al.*, 2022).**

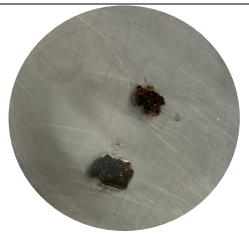
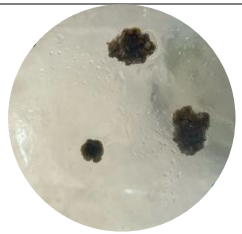
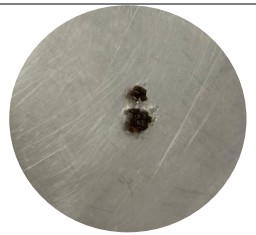
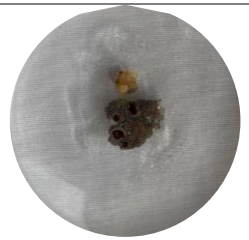
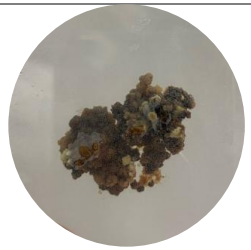
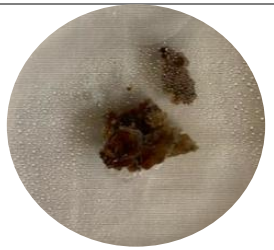
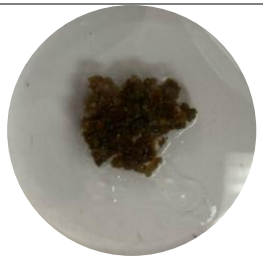
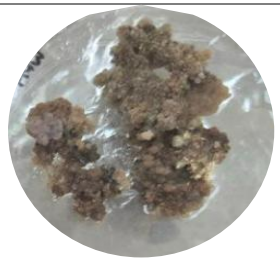
Tabla 8.

Observaciones semanales de la optimización de medio de cultivo WPM.

Tiempo	Tratamiento	Auxinas	Concentración (mg/L)	Citoquininas	Concentración (mg/L)	Observaciones
7	1	N/A	0	N/A	0	No se observó cambios.
	2	ANA	1	KIN	0,5	No se observó cambios.
	3	ANA	2	KIN	0,5	Poco crecimiento de callos friables.
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	No se observó cambios.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	No se observó cambios.
14	1	N/A	0	N/A	0	Poco crecimiento de callos friables.
	2	ANA	1	KIN	0,5	Poco crecimiento de callos friables.
	3	ANA	2	KIN	0,5	Cambio en la coloración (color crema).
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	No se observó cambios.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	Poco crecimiento de callos friables.
21	1	N/A	0	N/A	0	Poco crecimiento de callos friables.
	2	ANA	1	KIN	0,5	Crecimiento de callos friables
	3	ANA	2	KIN	0,5	Mayor formación de callos friables (mejor crecimiento).
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	Poco crecimiento de callos friables.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	Poco crecimiento de callos friables.
28	1	N/A	0	N/A	0	La biomasa se comenzó a compactar.
	2	ANA	1	KIN	0,5	Formación de callo con aspecto cremoso.
	3	ANA	2	KIN	0,5	Cambio en la coloración (poca oxidación), mayor crecimiento de biomasa.
	4	2,4-D	1	BAP	0,5	Poco crecimiento de callos oxidados.
	5	2,4-D	2	BAP	0,5	Poco crecimiento de callos compactos.

Tabla 9.

Análisis cualitativo del crecimiento del callo en el medio WPM después de 28 días.

Tiempo	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
7					
14					
21					
28					

A diferencia de estudios como **Cabral *et al.*, (2022)** y **Jadid *et al.*, (2025),** donde el 2,4-D muestra mejores resultados en la formación de callos, en combinación con BAP no presentó una biomasa tan desarrollada ni con características morfológicas deseables. **Ikeuchi *et al.* (2019),** menciona que el equilibrio entre auxinas y citoquininas es esencial para evitar procesos de diferenciación prematura y asegurar que el metabolismo celular se mantenga orientado hacia la formación de tejidos desdiferenciados. Un exceso relativo de auxina, como el observado en este tratamiento, mantiene las células en un estado de desdiferenciación, pero la presencia moderada de citoquinina actúa como coestimulante del crecimiento al promover divisiones celulares sostenidas **(Konzock *et al.*, 2022).**

Estos resultados en su conjunto demuestran que el medio WPM, particularmente en combinación con ANA y KIN, no solo optimiza la formación de callos friables, sino que también minimiza el estrés oxidativo y la compactación celular, dos problemas comunes en la propagación *in vitro* de *Theobroma cacao* L. Por tanto, este medio representa una plataforma sólida para futuros experimentos orientados a la producción de metabolitos como ácidos grasos o para el establecimiento de suspensiones celulares eficientes.

3.2. Análisis estadístico

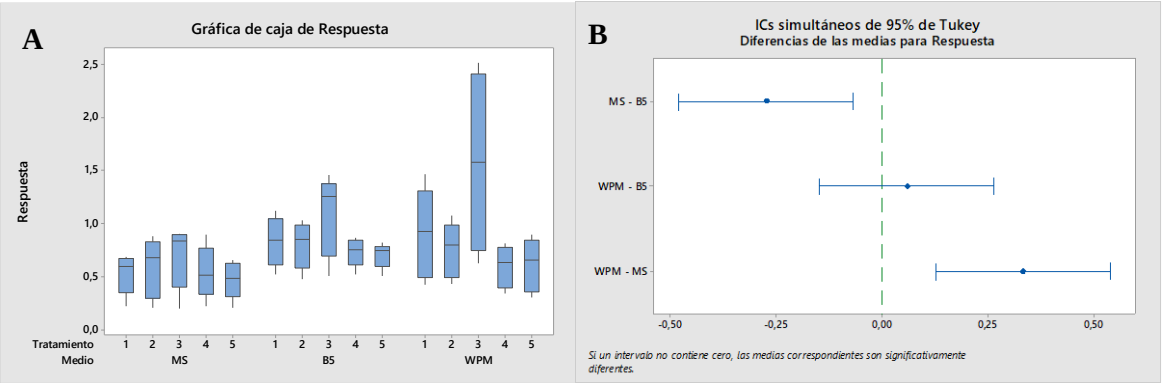
Con base en los pesos registrados durante el seguimiento de cuatro semanas de los callos de *Theobroma cacao* L., se realizó un diseño experimental factorial de tres factores con el objetivo de optimizar el medio de cultivo para el crecimiento de callos de *Theobroma cacao* L., considerando tres tipos de medios básicos (MS, B5 y WPM), cinco combinaciones hormonales (tratamientos) y cuatro semanas de evaluación. El análisis de varianza mostró efectos altamente significativos ($p < 0,001$) tanto para el tipo de medio, el tratamiento hormonal y el tiempo, como para todas sus interacciones (dobles y triples), lo que indica que el crecimiento de los callos depende no solo de cada factor por separado, sino también de cómo interactúan entre sí.

La gráfica de cajas (Figura 3A) evidenció que el medio WPM, en combinación con el tratamiento 3, promovió el mayor desarrollo de biomasa, con valores promedio superiores a 2.5 gramos por callo. Estos resultados se respaldan con la prueba de Tukey (Figura 3B), donde se observan diferencias significativas entre WPM y los demás medios, siendo WPM superior a B5 ($p < 0,05$) y a MS ($p < 0,05$), mientras que MS y B5 no difirieron entre sí. La falta de diferencia entre estos sugiere una capacidad similar en la promoción de la síntesis lipídica bajo las condiciones evaluadas.

.

Figura 3.

Análisis estadístico del crecimiento de callos de Theobroma cacao L. en diferentes medios de cultivo suplementados con combinaciones hormonales.



Nota. A: Ilustra la distribución de biomasa de los callos de *Theobroma cacao* L. por medio de cultivo y tratamiento hormonal. B: Presenta los intervalos de confianza de Tukey al 95% para las diferencias entre las medias de los medios; la ausencia del cero en un intervalo indica una diferencia significativa.

El tratamiento 3, que combinó 2 mg/L de ANA con 0.5 mg/L de KIN, resultó ser el más eficiente dentro del medio WPM, lo que sugiere que esta combinación favorece la proliferación celular en sistemas *in vitro* de *Theobroma cacao* L. **(Osorio *et al.*, 2022).** En conjunto, estos resultados permiten concluir que la formulación hormonal adecuada, junto con un medio nutritivo óptimo como el WPM, y un tiempo de cultivo controlado, son claves para maximizar la producción de biomasa en cultivos de *Theobroma cacao* L.

3.3. Determinación de la influencia de distintos inductores de estrés en el crecimiento de biomasa para la producción de ácidos grasos.

El presente estudio evaluó el impacto de diferentes inductores de estrés sobre el crecimiento de biomasa y la posible biosíntesis de ácidos grasos en callos celulares de *Theobroma cacao* L. a lo largo de cuatro semanas de cultivo *in vitro.* Los tratamientos con glicerol y el control mostraron el mayor incremento de biomasa, alcanzando 3,5402 g y 4,4178 g respectivamente en la semana 4 como se evidencia en la Tabla 10, mientras que los demás tratamientos mostraron un crecimiento limitado. Estos resultados sugieren que las condiciones de estrés pueden restringir la proliferación celular, aunque no necesariamente reducen la capacidad biosintética lipídica en las células **(Mustiga *et al.*, 2019).**

Tabla 10.

Peso fresco de callos inducidos a estrés durante el experimento.

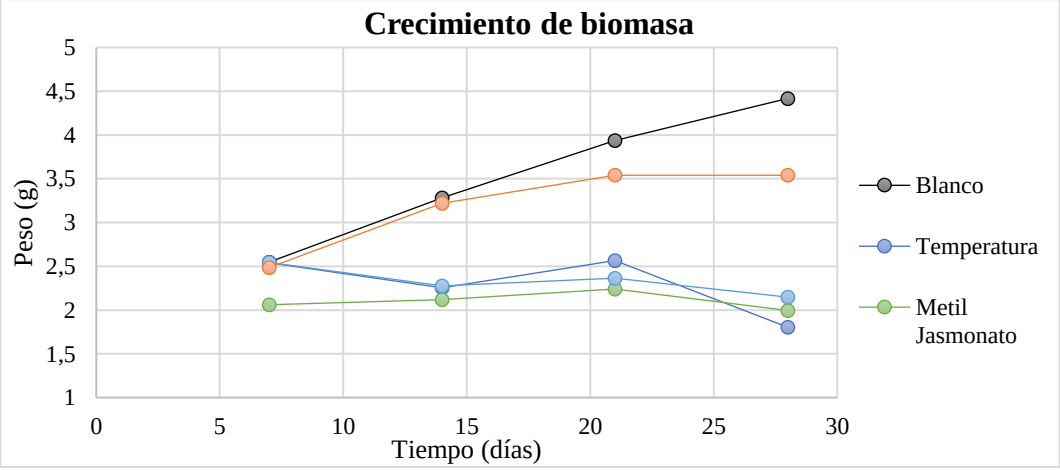
Inductor de estrés	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Control	2,5479 ± 0,013	3,2827 ± 0,457	3,9353 ± 0,584	4,4178 ± 0,718
Temperatura	2,5382 ± 0,001	2,2534 ± 0,107	2,5655 ± 0,065	1,8037 ± 0,090
MEJA	2,0615 ± 0,031	2,1211 ± 0,050	2,2408 ± 0,115	1,9951 ± 0,180
AS	2,5434 ± 0,008	2,2783 ± 0,287	2,3638 ± 0,287	2,1475 ± 0,331
Glicerol	2,4864 ± 0,012	3,2216 ± 0,403	3,5402 ± 0,611	3,5402 ± 0,610

Nota. El peso que se muestra es el promedio de las tres replicas montadas en el experimento.

El control mostró un crecimiento progresivo y constante, alcanzando un peso de 4,4178 ± 0,718 g en la semana 4, lo que indica un desarrollo estable en ausencia de estrés inducido (Figura 4). El inductor temperatura presentó un crecimiento inicial moderado (2,5382 ± 0,001 g), con un aumento notable hasta 1,8037 ± 0,090 g en la semana 4, sugiriendo que el estrés térmico pudo haber limitado la biomasa a largo plazo tras un pico intermedio. El MeJA exhibió una tendencia decreciente tras un inicio exponencial (2,0615 ± 0,031 g en la semana 1), cayendo a 1,9951 ± 0,180 g en la semana 4, lo que podría indicar una inhibición progresiva de la biomasa debido a su efecto en la regulación de desaturasas y la acumulación de triacilgliceroles **(Wang *et al.*, 2025).** El AS mostró un comportamiento fluctuante, con un pico en la semana 2 (2,2783 ± 0,287 g) y un descenso a 2,1475 ± 0,331 g en la semana 4, sugiriendo una respuesta inicial positiva al estrés abiótico que no se sostuvo, posiblemente por agotamiento de recursos. Finalmente, el glicerol presentó un crecimiento sostenido, pasando de 2,4864 ± 0,012 g en la semana 1 a 3,5402 ± 0,610 g en la semana 4 **(Zhu *et al.*, 2021).**

Figura 4.

Crecimiento de biomasa (peso fresco) de callos de Theobroma cacao L.



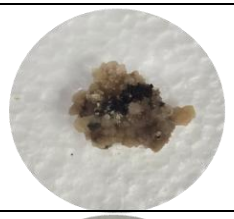
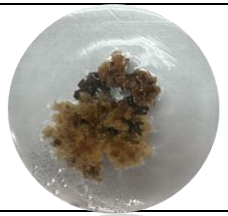
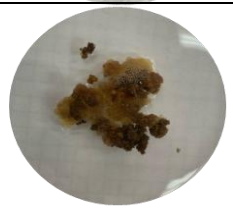
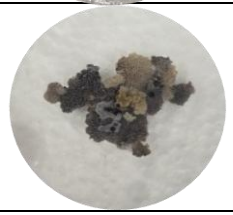
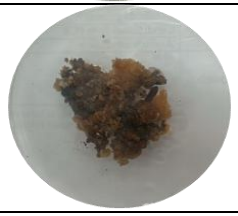
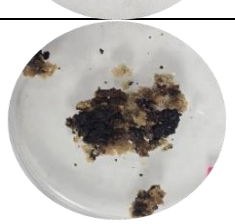
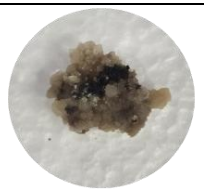
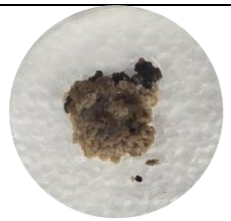
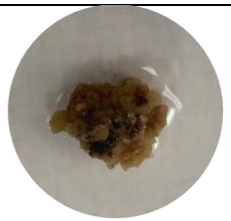
Nota. Los puntos representan los pesos promedio.

Este crecimiento sostenido sugiere una mayor actividad metabólica global, lo que puede asociarse a una mayor síntesis de metabolitos secundarios como los ácidos grasos. En particular, el glicerol actúa como precursor clave en la vía de biosíntesis lipídica, ya que se incorpora como glicerol-3-fosfato y alimenta rutas como la glucólisis y la formación de acetil-CoA **(Villanova *et al.*, 2020)**, esencial para la generación de triacilglicéridos. En contraste, los tratamientos con estrés térmico, MeJA y AS mostraron una reducción progresiva en el crecimiento de los callos a lo largo del experimento (Tabla 11). Sin embargo, esta disminución en biomasa no implica necesariamente una menor biosíntesis lipídica. Diversos estudios como **Ullah *et al.*, (2023) y Xu *et al*., (2017)** en sistemas vegetales y microalgas han demostrado que, bajo condiciones de estrés, las células pueden redirigir su metabolismo hacia la acumulación de lípidos como estrategia de supervivencia. En este contexto, se plantea la hipótesis de que, aunque la biomasa global disminuye, la concentración relativa de ácidos grasos por unidad de biomasa podría incrementarse, particularmente en los tratamientos con MeJA y AS como lo describe **Ramos & Figueroa (2023),** que están implicados en la activación de genes relacionados con la síntesis de lípidos insaturados como el ácido oleico y linoleico. La condición de temperatura elevada podría haber favorecido la síntesis de ácidos grasos saturados como el palmítico, alterando el perfil lipídico sin necesariamente aumentar su cantidad total **(Ahmadizadeh *et al.*, 2020).**

Dichas tendencias evidencian que los distintos inductores de estrés generan respuestas contrastantes en los sistemas biotecnológicos de *Theobroma cacao* L. Mientras el glicerol favorece un crecimiento sostenido y una posible mayor actividad biosintética global, tratamientos como MeJA, AS y temperatura inducen una reducción en la biomasa sin descartar una intensificación en la síntesis de lípidos. Esto sugiere una reorientación metabólica hacia la producción de ácidos grasos como mecanismo adaptativo frente al estrés.

Tabla 11.

Peso fresco de callos inducidos a estrés durante el experimento.

Semana	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Control					
Temperatura					
MEJA (Metil Jasmonato)					
AS (Ácido Salicílico)					
Glicerol					

3.4. Obtención preliminar del extracto lipídico de callos de *Theobroma cacao* L. sometidos a distintos inductores de estrés

El tratamiento previo de los sistemas biotecnológicos consiste en realizar una hidrólisis ácida, que resulta particularmente efectiva para romper las complejas matrices celulares de estos tejidos vegetales como lo demuestran **Kihika *et al.* (2024),** permitiendo liberar hasta un 95% de los lípidos totales, significativamente mayor que el 70-80% reportado para el método Bligh y Dyer en condiciones estándar **(Bligh & Dyer, 1959)**. Esta mejora en el rendimiento se atribuye principalmente a la capacidad de la hidrólisis ácida para degradar eficientemente los componentes estructurales de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas) que pueden encapsular los lípidos y limitar su extracción **(Liu *et al.*, 2020).** El sistema de extracción con hexano en el equipo VELP SCIENTIFICA SER 148 se fundamentó en estudios comparativos como el de **AOAC (2016),** que reporta para el hexano una eficiencia del 89-93% en la recuperación de ácidos grasos de cadena larga (C16-C18), superando a mezclas de cloroformo-metanol en muestras con alta carga de metabolitos secundarios **(Imatoukene *et al.*, 2020).**

Los resultados muestran variaciones significativas en la cantidad de extracto lipídico bruto producido por los callos de *Theobroma cacao* L. bajo diferentes tratamientos (Tabla 12), lo que sugiere una respuesta diferencial a cada inductor de estrés.

Tabla 12.

Pesos del extracto lipídico bruto obtenido de callos de Theobroma cacao L.

Tratamiento	Semana 1 *(mg)*	Semana 2 *(mg)*	Semana 3 *(mg)*	Semana 4 *(mg)*
MEJA	16,7	18,2	25,6	14,2
AS	11,9	13,4	14,6	11,1
Temperatura	6,6	8,6	13,6	12,7
Glicerol	6,9	8,9	9,4	7,1
Control	4,5	8,2	12,4	15,6

Nota. Los valores presentados corresponden al peso del extracto lipídico bruto obtenido de los callos de *Theobroma cacao* L. en cada tratamiento y semana. Estos datos representan el material extraído, que posteriormente requiere cuantificación específica de los ácidos grasos.

El tratamiento con MeJA mostró los mayores rendimientos de extracto lipídico, especialmente en la tercera semana (25,6 mg), seguido de una disminución en la cuarta semana. Este patrón podría indicar una activación temprana de las rutas biosintéticas de lípidos, como se ha reportado en otros sistemas vegetales **(Demirci, 2022).** Sin embargo, sin conocer aún la composición exacta de estos extractos, no podemos descartar que parte de este material corresponda a otros compuestos lipídicos inducidos por el MeJA. El AS produjo cantidades moderadas, pero más constantes de extracto a lo

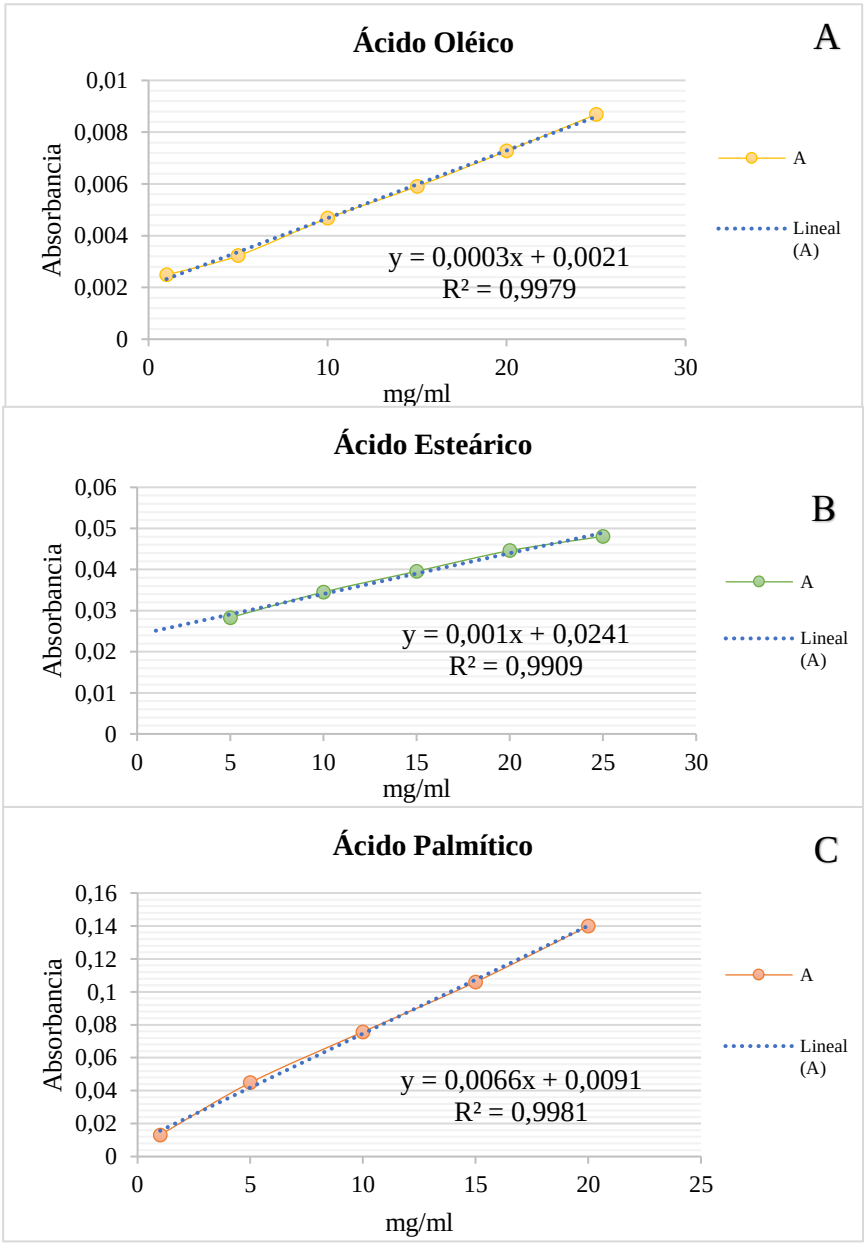
largo del experimento. Estudios previos de **Woch et al., (2023)** sugieren que el AS puede inducir preferentemente ciertos tipos de lípidos, pero esta hipótesis deberá verificarse con los análisis posteriores de composición. Los tratamientos con temperatura y glicerol mostraron comportamientos distintos. La temperatura generó un incremento progresivo hasta la tercera semana, mientras que el glicerol mantuvo niveles relativamente bajos y estables. Estas diferencias podrían reflejar distintos mecanismos de acción: mientras la temperatura afectaría globalmente el metabolismo celular, el glicerol actuaría principalmente como sustrato metabólico **(Villanova *et al.*, 2017).**

3.5. Identificación y cuantificación de ácidos grasos empleando FTIR

Estos hallazgos preliminares subrayan la importancia de integrar datos cuantitativos sobre ácidos grasos en la siguiente fase experimental. El análisis espectroscópico mediante FTIR y la cuantificación mediante curvas de calibración específicas para el ácido esteárico, ácido oleico y ácido palmítico como se visualiza en la Figura 5 permitió confirmar si las tendencias observadas en el crecimiento de biomasa se traducen efectivamente en diferencias significativas en la cantidad y tipo de ácidos grasos producidos. De este modo, se podrá establecer con mayor precisión la relación entre el estrés inducido, la proliferación celular y la capacidad biosintética de ácidos grasos en sistemas biotecnológicos de *Theobroma cacao* L.

Figura 5.

Curva de calibración del ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico.

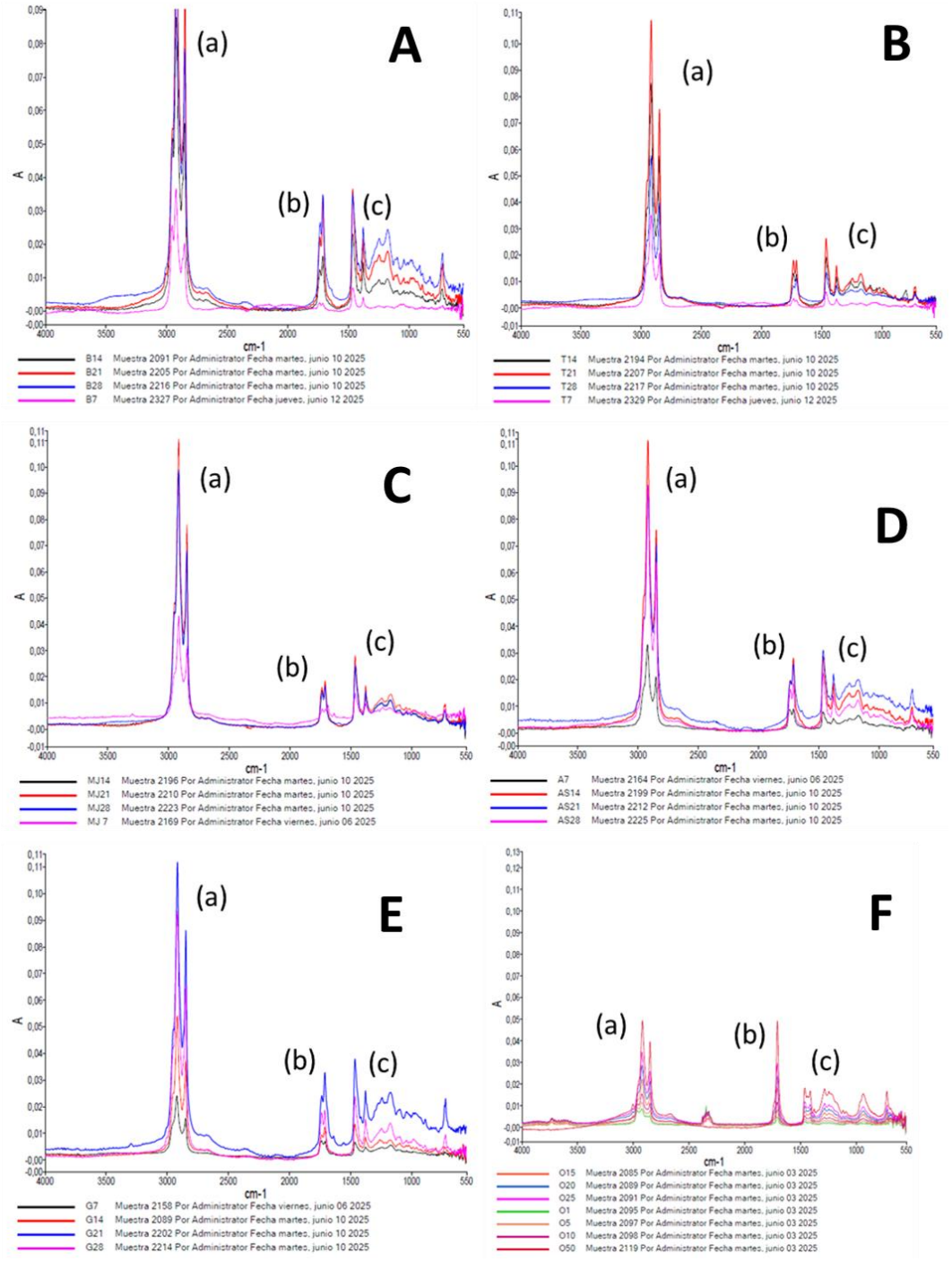


Nota. Se ilustra la relación lineal entre la absorbancia y la concentración (mg/ml) de cada ácido graso, incluyendo sus ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2). **(A)** Ácido Oleico. **(B)** Ácido Esteárico. **(C)** Ácido Palmítico.

Bajo los cinco tratamientos durante el experimento, se mostró bandas características en ~2900 cm^{-1} (estiramiento C-H) pertenecientes a cadenas lipídicas y ~1700 cm^{-1} (estiramiento C=O de esteres), lo cual indico la presencia y variación de lípidos **(Sharma & Uttam, 2016).**

Figura 6.

Espectros de FTIR de cada tratamiento para el ácido oleico.



Nota. Las bandas principales corresponden a: (a) ~2900 cm^{-1} (tensiones C-H de cadenas lipídicas), (b) ~1700 cm^{-1} (carbonilos C=O de ésteres), y (c) 1000–1500 cm^{-1} (región de huella dactilar de grupos funcionales complejos). **(A)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Control. **(B)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas de la Temperatura. **(C)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Glicerol. **(D)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Metil Jasmonato.

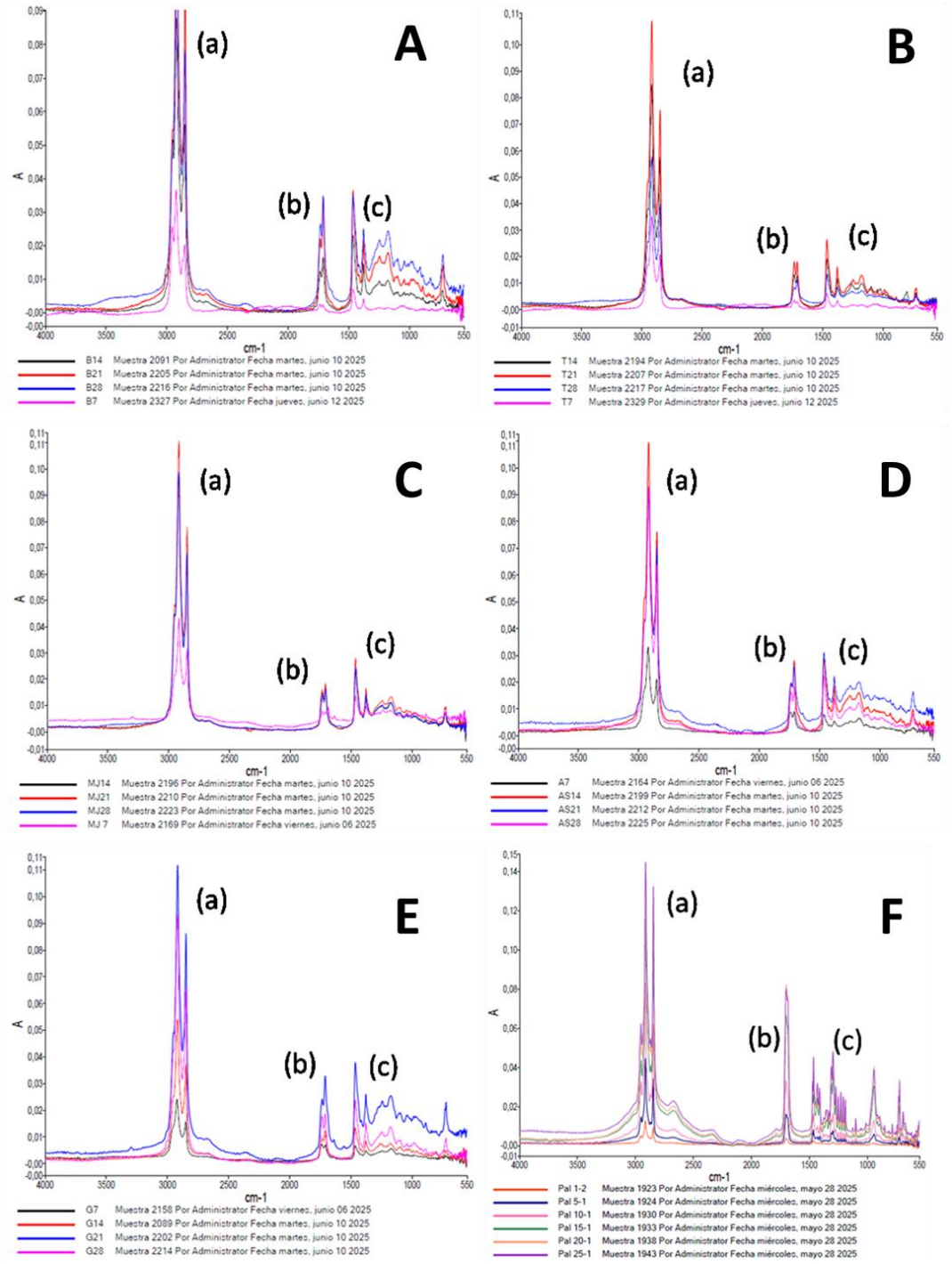
(E) Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Ácido Salicílico. **(F)** Curva de calibración del Ácido Oleico.

El ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado, es un componente clave del perfil lipídico de *Theobroma cacao* L. De acuerdo, con bibliografía el tratamiento con MeJA incrementaría significativamente la acumulación de ácido oleico. Así mismo, en la Figura 6 se muestra una mayor intensidad del pico ~1650 cm^{-1}, específicos de ácidos grasos insaturados, lo cual sugiere una producción de ácido oleico. Este aumento se atribuye a la activación de enzimas desaturasas, como FAD2, que convierten ácidos grasos saturados en insaturados **(He *et al.*, 2020).** Este hallazgo es consistente con estudios en tomates, donde MeJA aumentó los ácidos grasos insaturados, como el linolénico, aunque no afectó directamente el oleico **(Czapski *et al.*, 1992).** Los picos a ~3010 cm^{-1} y ~1650 cm^{-1} son específicos para ácidos grasos insaturados, pero no distinguen entre oleico y otros insaturados como el linoleico. Por otra parte, el AS también promovió que el espectro de FTIR muestre intensidades en los picos de insaturación (~3010 cm^{-1} y ~1650 cm^{-1}). Un estudio en colza demostró que AS incrementó el contenido de oleico bajo estrés por sequía, sugiriendo que AS activa vías de señalización de estrés que modulan la biosíntesis lipídica **(Mabudi *et al*., 2022).** La falta de picos específicos para oleico en FTIR limita la cuantificación precisa, y la superposición con otros insaturados complica la interpretación. De acuerdo con el estudio realizado por **Ibarra *et al*., (2015),** evidencia que el estrés causado por temperatura influye en el incremento de ácidos saturados como el palmítico, sin embargo, en la gráfica se muestra un aumento en el pico ~1650 cm^{-1}. Este comportamiento puede deberse a la adaptación de *Theobroma cacao* L., una planta tropical, al estrés térmico moderado, que induce respuestas oxidativas que favorecen la insaturación. Un estudio en cultivos celulares de cacao encontró que temperaturas bajas incrementaron los ácidos poliinsaturados **(Leathers & Scragg, 1989),** lo que sugiere que el efecto a 35°C podría ser específico del sistema de cultivo *in vitro.* La ausencia de picos diferenciados para oleico frente a otros insaturados requiere análisis adicionales. La literatura indica que el glicerol se incorpora en triacilgliceroles, aumentando la síntesis de ácidos grasos, incluyendo los insaturados **(Hu *et al.*, 2014).** Sin embargo, los picos FTIR a ~3010 cm^{-1} y ~1650 cm^{-1} no son exclusivos del oleico, y la región de huella digital (1000–1500 cm^{-1}) presenta señales superpuestas, lo que dificulta la identificación específica.

Aunque los picos a ~3010 cm^{-1} y ~1650 cm^{-1} son indicativos de insaturación, no permiten diferenciar entre ácido oleico y otros insaturados como el linoleico, linolénico, entre otro. Además, los picos a 2850–2920 cm^{-1} (estiramiento C-H) se superponen con los de los ácidos saturados, y la región de huella digital (1000–1500 cm^{-1}) contiene señales complejas que no son específicas.

Figura 7.

Espectros de FTIR de cada tratamiento para el ácido palmítico.



Nota. Las bandas principales corresponden a: (a) ~2900 cm^{-1} (tensiones C-H de cadenas lipídicas), (b) ~1700 cm^{-1} (carbonilos C=O de ésteres), y (c) 1000–1500 cm^{-1} (región de huella dactilar de grupos funcionales complejos). **(A)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Control. **(B)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas de la Temperatura. **(C)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Glicerol. **(D)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Metil Jasmonato.

(E) Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Ácido Salicílico. **(F)** Curva de calibración del Ácido Palmítico.

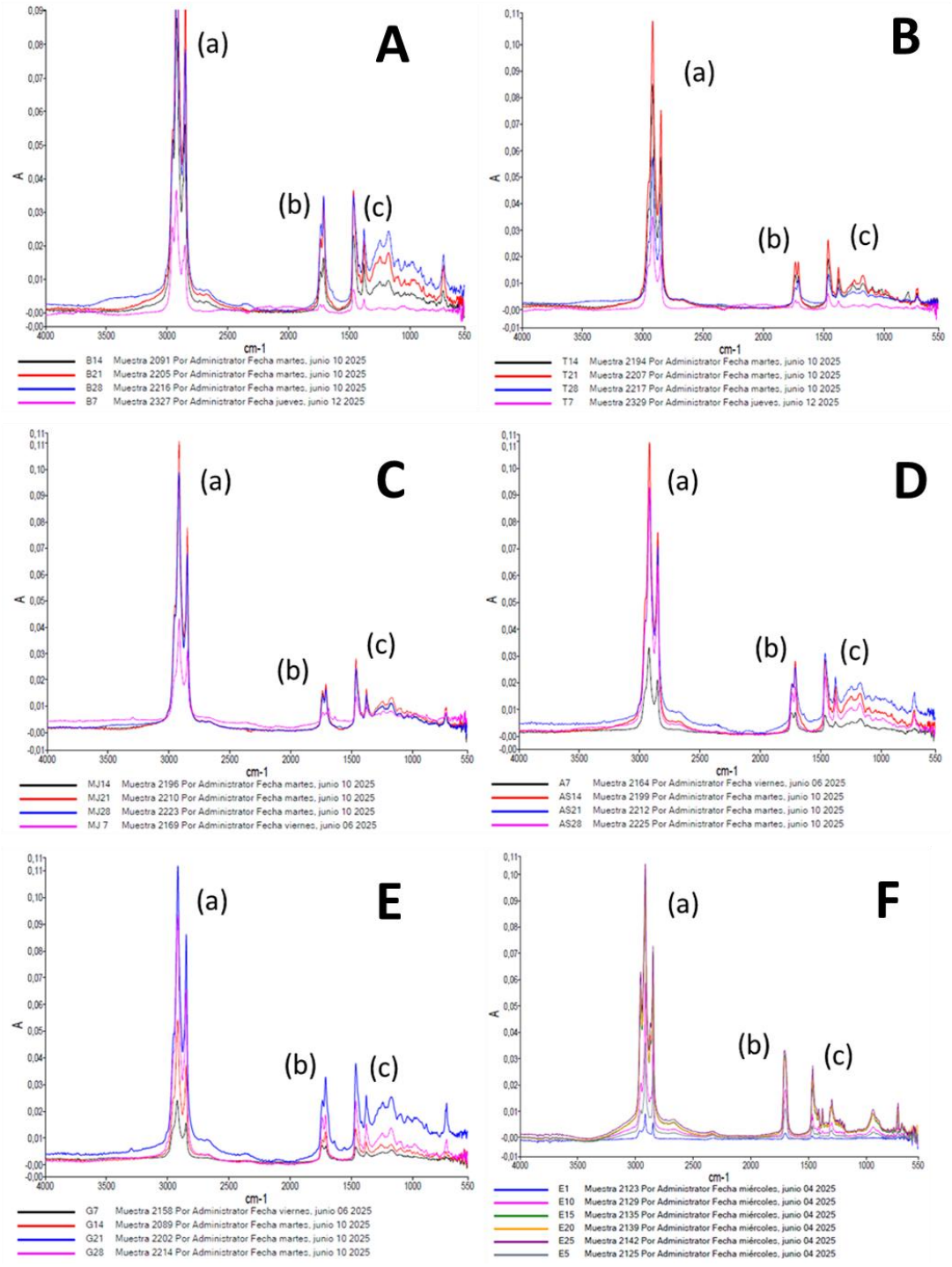
El ácido palmítico, un ácido graso saturado, es esencial para la estabilidad estructural y energética en *Theobroma cacao* L. Los tratamientos mostraron efectos variados en su acumulación. Para el ácido palmítico bajo MeJA, es probable que favorece a la síntesis de ácidos insaturados, por lo que no se incrementen significativamente **(Neag *et al.,* 2022).** Los espectros FTIR mostraron picos a ~2850–2920 cm^{-1} y ~1740 cm^{-1}, comunes a todos los lípidos, pero sin evidencia clara de un aumento específico en palmítico. Estudios en trigo sugieren que MeJA puede reducir los ácidos grasos saturados en favor de los insaturados **(Repkina *et al*., 2023).** La falta de picos específicos para palmítico en FTIR y la superposición con otros saturados limita la interpretación.

Por el contrario, el tratamiento con AS muestra concentraciones específicas como se refleja en los picos FTIR a ~2850–2920 cm^{-1}, ~1740 cm^{-1} y ~720 cm^{-1} (Figura 7), que indican un aumento en ácidos saturados. Este incremento se atribuye a la activación de la vía de la sintasa de ácidos grasos (FAS) como respuesta al estrés. Un estudio en colza también reportó un aumento en palmítico bajo AS **(Mabudi *et al*., 2022).** Sin embargo, los picos FTIR no distinguen entre palmítico y otros saturados como el esteárico, lo que sugiere que la cuantificación específica se basó en una curva de calibración. El tratamiento a 35°C sugiere que el ácido palmítico no se incrementó significativamente. Los picos FTIR a ~2850–2920 cm^{-1} y ~1740 cm^{-1} estaban presentes, pero con menor intensidad para saturados en comparación con AS. Estudios en *Arabidopsis* indican que temperaturas altas suelen incrementar los saturados **(Falcone *et al.,* 2004),** pero en cacao, el aumento en insaturados a 35°C podría reflejar una adaptación tropical. Estudios realizados por **D'souza (1979); Gerber *et al*. (1988); Lu *et al*. (2020),** sugieren que el glicerol incrementa ácidos grasos saturados, incluyendo el palmítico, según los picos FTIR a ~2850–2920 cm^{-1} y ~1740 cm^{-1}.

Como precursor de triacilgliceroles, el glicerol estimula la biosíntesis lipídica general. La literatura confirma que el glicerol actúa como fuente de carbono en la síntesis de lípidos **(Kandoudi *et al,* 2022).** Los picos en FTIR para saturados no distinguen entre palmítico y otros ácidos grasos saturados. Además, la región de huella digital complica la interpretación.

Figura 8.

Espectros de FTIR de cada tratamiento para el ácido esteárico.



Nota. Las bandas principales corresponden a: (a) ~2900 cm^{-1} (tensiones C-H de cadenas lipídicas), (b) ~1700 cm^{-1} (carbonilos C=O de ésteres), y (c) 1000–1500 cm^{-1} (región de huella dactilar de grupos funcionales complejos). **(A)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Control. **(B)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas de la Temperatura. **(C)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Glicerol. **(D)** Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Metil Jasmonato.

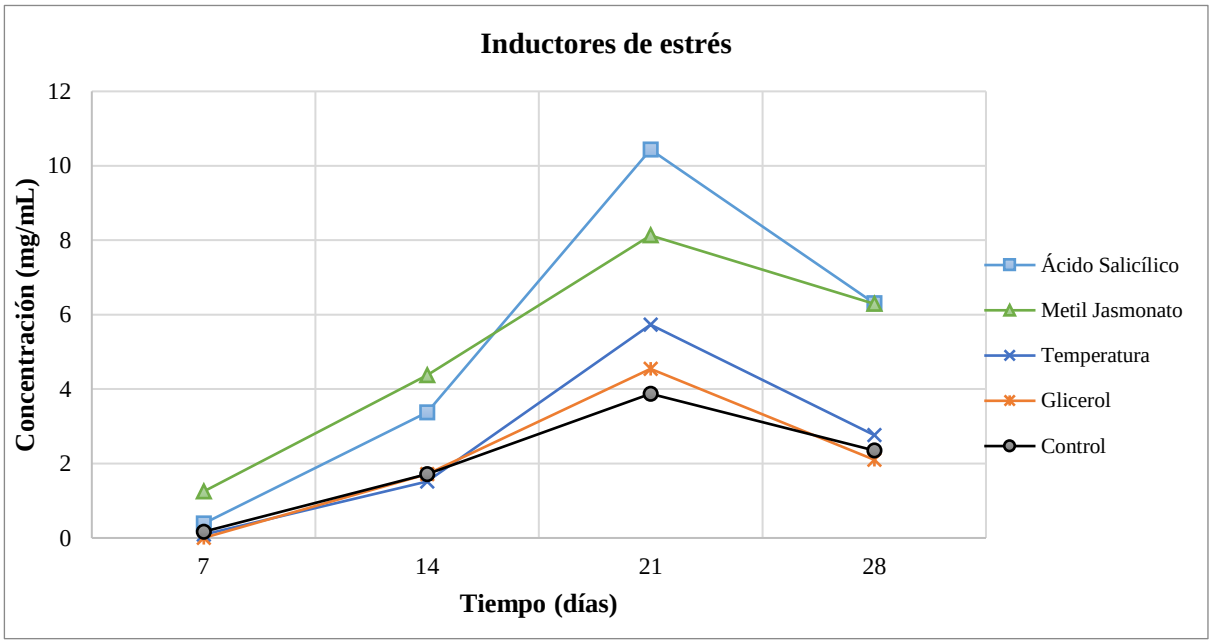
(E) Muestra tomada a lo largo de las 4 semanas del Ácido Salicílico. **(F)** Curva de calibración del Ácido Esteárico.

Con base en los espectros FTIR de la Figura 8 para el ácido esteárico, es posible establecer una relación cualitativa y cuantitativa entre las muestras tratadas y el ácido graso presente. En todos los espectros se identifican bandas características asociadas a lípidos, como el estiramiento del grupo carbonilo C=O (~1740 cm^{-1}), los estiramientos CH_2 alifáticos (~2850–2920 cm^{-1}) y la señal de "rocking" (~720 cm^{-1}), las cuales también se observan con claridad en el espectro patrón del ácido esteárico. La coincidencia en la posición y forma de estas bandas entre los tratamientos y el ácido esteárico sugiere su presencia en los extractos lipídicos analizados, y permite inferir que este ácido graso saturado es uno de los componentes predominantes. Además, al comparar la intensidad de estas bandas a lo largo de las semanas en cada tratamiento, se puede observar un patrón de acumulación del ácido esteárico, particularmente evidente en tratamientos como el MeJA, el cual mostro intensidades aumentadas en los picos FTIR a ~2850–2920 cm^{-1}, ~1740 cm^{-1} y ~720 cm^{-1}. Aunque MeJA favorece los insaturados, también se presume que incrementó los saturados **(Xu *et al.*, 2017).** Esto podría deberse a la activación de vías lipídicas generales. Sin embargo, la falta de picos específicos para esteárico y la superposición con palmítico limitan la interpretación. El AS incrementó significativamente el ácido esteárico, como lo indican los espectros FTIR de la Figura 8, los picos a ~2850–2920 cm^{-1}, ~1740 cm^{-1} y ~720 cm^{-1} fueron intensos, reflejando un aumento en ácidos grasos posiblemente saturados **(Mabudi *et al.*, 2022).** Es probable que el ácido esteárico no se incrementara significativamente, dado el aumento de temperatura a 35°C. Los picos en FTIR para saturados estaban presentes, pero con menor intensidad. Esto contrasta con estudios que asocian temperaturas altas con más saturados **(Hussain *et al.*, 2022).** Por otra parte, se presume que el glicerol incrementó los ácidos saturados, incluyendo el esteárico, según los picos FTIR mostrados. Su rol como precursor lipídico apoya este aumento **(Kim, 2020).**

Si bien los picos en FTIR a ~2850–2920 cm^{-1}, ~1740 cm^{-1} y ~720 cm^{-1} son característicos de ácidos grasos saturados, no se diferencian entre esteárico y palmítico de manera precisa, ya que ambos comparten estructuras similares. Por ende, la falta de picos específicos para ambos ácidos complica la confirmación. De manera global los resultados del experimento con diferentes inductores de estrés evaluados modificaron significativamente tanto el crecimiento de los callos como el perfil de ácidos grasos saturados: A. Esteárico - A. Palmítico, evidenciando respuestas metabólicas como se muestra en las Figuras 7 y 8.

Figura 9.

Efecto de los inductores de estrés en la biosíntesis de ácidos grasos saturados (ácido esteárico-ácido palmítico) en callos de Theobroma cacao L.



Si se analiza desde un enfoque del efecto que genera el inductor de estrés se puede mencionar que los inductores de estrés modulan de manera diferencial la biosíntesis de ácidos grasos en *Theobroma cacao* L.

Al emplear 50 uM de AS se destacó como el mayor inductor de estrés para la estimulación de la biosíntesis de ácidos grasos, logrando un pico de 10,4 mg/mL de ácidos grasos totales en la semana 3. El AS es un componente clave de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y su acción se relaciona con la activación de genes de defensa y la posible influencia en la disponibilidad de precursores de acetil-CoA, como la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) y las desaturasas **(Saxena *et al.*, 2025).** Además, incrementó significativamente los ácidos saturados, especialmente el palmítico (hasta 15.31 mg/mL en el día 21), y probablemente el esteárico, según los picos del FTIR. También aumentó el oleico, aunque en menor medida, como se observa en los picos a ~3010 cm^{-1} y ~1650 cm^{-1}. AS activa la vía de la sintasa de ácidos grasos y señalización de estrés, proporcionando energía y componentes estructurales para la defensa **(Mabudi *et al.*, 2022).**

De manera similar, el MeJA (150 uM) también demostró ser un inductor eficaz, ya que favoreció la producción de ácidos grasos, logrando un pico de 8,1 mg/mL en la semana 3, destacando el aumento de insaturados en la producción de ácidos grasos (picos a ~3010 cm^{-1} y ~1650 cm^{-1}). Su mecanismo de acción implica una compleja ruta de señalización que, al activar factores de transcripción específicos (como los MYC), modula la expresión de genes implicados en la

biosíntesis lipídica. La diferencia en la magnitud del efecto entre el AS y el MeJA podría atribuirse a la especificidad de las vías de señalización activadas por cada compuesto y a la dosis empleada **(Si *et al.*, 2022).** Aunque en menor medida. MeJA puede activar enzimas desaturasas y vías lipídicas, mejorando la fluidez de membranas y la producción de moléculas de señalización **(Hassanpour, 2024),** por lo tanto, se sugiere que incremento parte de ácidos grasos saturados e insaturados.

El glicerol incrementó ambos tipos de ácidos grasos, con un pico de 4,5 mg/mL en la semana 3. La moderación del impacto del glicerol podría explicarse por su baja concentración como menciona **Chen & Liu (2016)**, que al compararse con el grupo control, mantiene una biosíntesis basal de ácidos grasos, lo cual es previsible en un sistema biológico en crecimiento activo. Asimismo, el glicerol puede actuar como precursor de la biosíntesis lipídica, aumentando los picos de FTIR del ácido graso insaturado, así como el de los saturados. Su rol como fuente de carbono es bien documentado por **Hu *et al,* (2014) y Lu *et al*., (2020).**

La temperatura a 35°C incrementó los ácidos grasos, con un pico de 5,7 mg/mL en la semana 3, destacando el oleico. La temperatura elevada, como factor de estrés abiótico, puede inducir la reorganización de membranas y la acumulación de lípidos, aunque su efecto parece ser menos pronunciado que el de los inductores de estrés químicos en este contexto **(Niu & Xiang, 2018).** Esto es contrario a la tendencia general de aumento en saturados a temperaturas altas, posiblemente debido a la adaptación tropical de *Theobroma cacao* L. **(Canvin, 1965).**

Los resultados sugieren que los primeros 14 días existe una baja concentración de ácidos grasos saturados, con valores que oscilan de 1,5 mg/mL hasta 4,4 mg/mL. Sin embargo, a partir del día 21, con todos los inductores de estrés presenta una alta concentración de ácidos grasos destacándose principalmente los tratamientos con AS (10,4 mg/mL) y MeJA (8,1 mg/mL) frente a la Temperatura y Glicerol. Finalmente, se observa que al día 28 de experimentación, la síntesis de ácidos grasos empieza a decaer, mostrando esa sentencia para todos los tratamientos.

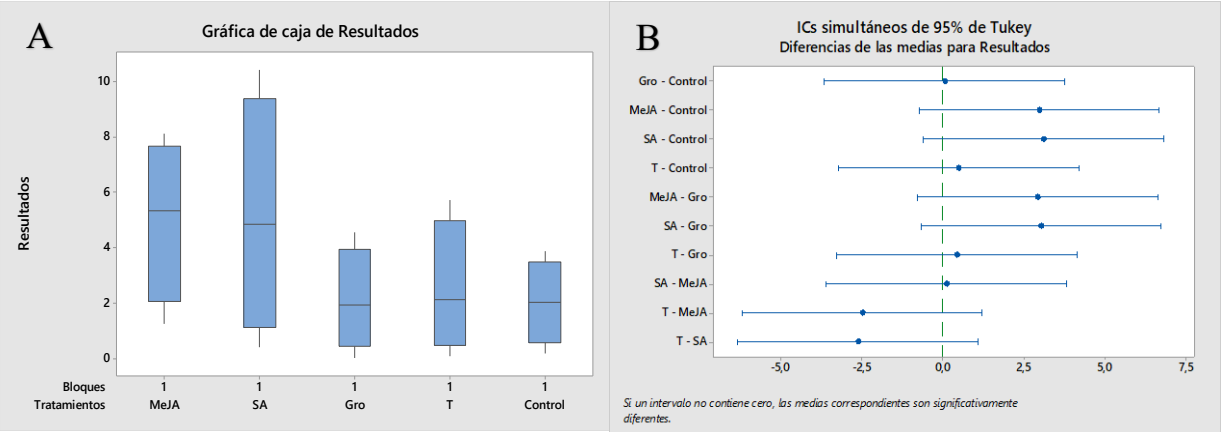
Estos hallazgos no solo profundizan nuestra comprensión de los mecanismos de respuesta de la planta al estrés a nivel metabólico y de señalización, sino que también abren vías para futuras investigaciones biotecnológicas orientadas a la producción de metabolitos lipídicos valiosos

3.6. Análisis Estadístico

Se observa un efecto significativo en el inductor de estrés y el tiempo de exposición, sobre la producción de ácidos grasos en los sistemas celulares de *Theobroma cacao* L. (Figura 10 A). La interacción significativa sugiere que los tratamientos no actúan de forma uniforme en el tiempo: algunos inducen una mayor producción en etapas específicas del cultivo, como ocurrió con el AS y el MeJA en la semana 3.

Figura 10.

Análisis estadístico de la producción de ácidos grasos en callos de Theobroma cacao L.



Nota. A: Se muestra la distribución de la producción de ácidos grasos por tratamiento. B: Se presenta los ICs de Tukey (95%) para las diferencias entre medias, donde un intervalo que no incluya el cero indica una diferencia significativa.

Los resultados demuestran que tanto los tratamientos aplicados como el tiempo de cultivo influyeron significativamente en la concentración de ácidos grasos producidos por los cultivos celulares de *Theobroma cacao* L. El ácido salicílico (SA) y el metil jasmonato (MeJA) destacaron como los tratamientos más efectivos en la inducción de lípidos (Figura 10 B). Durante la semana 3, ambos tratamientos alcanzaron sus máximos valores de producción de grasa, superando significativamente al control ($p < 0,05$ según Tukey HSD).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- La optimización del sistema biotecnológico de *Theobroma cacao* L. permitió establecer condiciones eficientes para la generación de biomasa callosa. El tratamiento con medio WPM suplementado con ANA (2 mg/L) y KIN (0,5 mg/L) mostró los mejores resultados en proliferación y crecimiento, favoreciendo además rutas metabólicas relacionadas con el estado embrioide y la síntesis de compuestos clave. La formación de callos friables, más activos metabólicamente, respalda la eficacia y viabilidad del sistema propuesto.
- El estudio evidenció que los inductores de estrés afectan tanto el crecimiento de biomasa como la posible biosíntesis de ácidos grasos en callos de *Theobroma cacao* L. El control (4,4178 ± 0,718 g) y el glicerol (3,5402 ± 0,610 g) favorecieron una mayor proliferación, mientras que MeJA, AS y temperatura la redujeron (1,9951 ± 0,180 g; 2,1475 ± 0,331 g; y 1,8037 ± 0,090 g, respectivamente). No obstante, a partir del día 21 se observó un aumento en la acumulación de ácidos grasos, destacando MeJA y AS, a pesar de su menor biomasa. Para el día 28, la síntesis disminuyó en todos los tratamientos. Esto sugiere que el estrés no solo limita la biomasa, sino que también puede activar rutas metabólicas asociadas a la síntesis de lípidos como mecanismo adaptativo.
- La hidrólisis ácida y la extracción con hexano permitieron obtener altos rendimientos lipídicos, con MeJA y AS destacándose como los inductores más efectivos. Ambos tratamientos alcanzaron su pico de producción lipídica en la semana 3, superando los 8,1 y 10,4 mg/mL respectivamente con presencia clara de ácidos grasos en los espectros de FTIR. El análisis espectral confirmó estas tendencias al mostrar una mayor intensidad en las bandas características de ácidos grasos. En el caso de los saturados, como el palmítico y el esteárico, se observaron señales destacadas en ~2850–2920 cm^{-1}, ~1740 cm^{-1} y ~720 cm^{-1}, mientras que los insaturados, como el oleico, presentaron bandas más intensas en ~3010 cm^{-1} y ~1650 cm^{-1}.
- El estudio demostró que los inductores de estrés, especialmente el ácido salicílico y el metil jasmonato, modulan la biosíntesis de ácidos grasos en callos de *Theobroma cacao* L. y que el medio WPM suplementado con ANA y KIN favoreció la proliferación de biomasa, confirmando el potencial biotecnológico del sistema para producir lípidos de interés industrial.

4.2. Recomendaciones

- El análisis mediante FTIR representa una herramienta valiosa para la identificación rápida y cualitativa de ácidos grasos en extractos lipídicos, destacándose por su bajo costo, facilidad de uso y capacidad para detectar grupos funcionales característicos. No obstante, para complementar esta técnica y fortalecer la precisión en la caracterización lipídica, se sugiere integrar cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Esta metodología permite una separación eficiente, identificación estructural detallada y cuantificación exacta de ácidos grasos individuales, incluyendo tanto los saturados como los insaturados (como palmítico, oleico, linoleico y esteárico). Su aplicación facilitaría validar si las variaciones observadas en el peso de los extractos corresponden efectivamente a la acumulación de ácidos grasos específicos y permitiría establecer con mayor claridad el impacto de distintos tratamientos sobre el perfil lipídico. Así, la combinación de FTIR y GC-MS ofrece un enfoque robusto y complementario para el estudio integral de lípidos bioactivos.
- Para lograr una caracterización más completa y precisa del metabolismo lipídico inducido por estrés, se recomienda ampliar el estudio del perfil de ácidos grasos más allá de los compuestos comúnmente evaluados (palmítico, esteárico, oleico y linoleico). Es fundamental considerar la inclusión de otros ácidos grasos de interés bioquímico e industrial, como el linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), behénico (C22:0), lignocérico (C24:0), así como aquellos de cadena corta y media (C8–C14), cuya síntesis puede estar asociada a respuestas adaptativas frente a condiciones abióticas. La identificación de estos compuestos permitiría un entendimiento más profundo de las rutas metabólicas implicadas, incluyendo procesos de elongación, desaturación mediada por desaturasas (FADs), y acumulación de lípidos de reserva como los triacilglicéridos, aportando información clave sobre los mecanismos bioquímicos activados por inductores como el ácido salicílico, metil jasmonato, estrés térmico y glicerol.
- Para profundizar en la comprensión del metabolismo inducido por estrés en estos sistemas biotecnológicos, se recomienda ampliar el análisis más allá del perfil lipídico tradicional, incorporando la evaluación de otros grupos de metabolitos de interés, como los compuestos fenólicos y polifenólicos. Estos metabolitos secundarios cumplen funciones clave en la respuesta a condiciones abióticas, actuando como antioxidantes, moduladores de señales celulares y protectores del daño oxidativo. Su caracterización, junto con la de los ácidos grasos, permitiría una visión más integral del reordenamiento metabólico bajo estrés, facilitando la identificación de rutas biosintéticas relevantes. Esta información no solo enriquecería el conocimiento sobre la plasticidad metabólica de los sistemas vegetales o celulares estudiados, sino que también abriría oportunidades para su aplicación en la industria alimentaria como posibles sustitutos funcionales o ingredientes bioactivos con alto valor agregado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afoakwa, E. O. (2014). *Cocoa production and processing technology*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/b16546.

Ahmadizadeh, M., Rezaee, S., & Heidari, P. (2020). Genome-wide characterization and expression analysis of fatty acid desaturase gene family in *Camelina sativa*. *Gene Reports*, *21*, 100894. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100894.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). (2016). Official methods of analysis.off AOAC International. 20 ed. Editor: Dr. George W. Latimer, Jr. Rockville, MD, [s. l.], USA.

Atanassova, M., & Aayush, K. (2024). Chemical Diversity of *Theobroma cacao* L.. En: Mérillon, JM., Riviere, C., Lefèvre, G. (Ed.) Natural Products in Beverages. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-04195-2_3-1

Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., De Maesschalck, C., De Backer, P., Van Immerseel, F., & Croubels, S. (2013). Development of a HPLC-UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during *in vitro* fermentation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *80*, 107–115. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.032

Bauddh, K., Singh, B., & Korstad, J. (2020). Phytoremediation potential of bioenergy plants. Springer. DOI: 10.1007/978-981-10-3084-0

Bekele, F. L., Kennedy, A. J., David, C. M., Lauckner, F. B., & Bekele, I. (1994). Numerical taxonomic studies on cacao (Theobroma cacao L.) in Trinidad. *Euphytica*, *75*, 231-240.

Bermudez, S., Voora, V., Larrea, C., & Luna, E. (2022). *Cocoa prices and sustainability*. Iisd.org. Retrieved June 17, 2025, from https://www.iisd.org/system/files/2022-11/2022-global-market-report-cocoa.pdf

Bernabé, A., Álvarez, L., Salcedo, E., Toral, F. A. L.-D., Anzaldo, J., & Cruz, F. (2015). Fatty acid profile of intact plants of two different sites and callus cultures derived from seed and leaf explants of *Calophyllum brasiliense* Cambess: A new resource of non-edible oil. *Industrial Crops and Products*, *77*, 1014–1019. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.004

Bhattacharjee, R. & Akoroda, M. (2018). Taxonomy and classification of cacao. In: Uma-haran P, editor. Achieving sustainable cultivation of cocoa. Cambridge:Burleigh Dodds Science Publishing Limited. p. 3–18

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–917. https://doi.org/10.1139/o59-099

Bobroff, V., Rubio, C., Vigier, V., & Petibois, C. (2016). FTIR spectroscopy characterization of fatty-acyl-chain conjugates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(1), 319–326. https://doi.org/10.1007/s00216-015-9111-6

Cabral M. J. P., Chávez S. J. A., Pulido D. C., González P. M., & Goche T. J. R. (2022). Propagación *in vitro* de manzano a partir de embriones cigóticos maduros. *Revista Mexicana de Ciencias Agricolas*, *13*(4), 603–616. https://doi.org/10.29312/remexca.v13i4.2164

Canvin, D. T. (1965). The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Canadian Journal of Botany. Journal Canadien de Botanique*, *43*(1), 63–69. https://doi.org/10.1139/b65-008

Carvajal, C. A., Barreto, S. A., & Peña, S. L. (2021). Producción y sostenibilidad en la cadena de valor del cacao fino de aroma en Ecuador. *Journal of Sustainable Agriculture*, *45*(2), 205-220. https://doi.org/10.1007/s12155-020-10212-1

Ceccarelli, V., Fremout, T., Chavez, E., Argüello, D., Loor Solórzano, R. G., Sotomayor Cantos, I. A., & Thomas, E. (2024). Vulnerability to climate change of cultivated and wild cacao in Ecuador. *Climatic Change*, *177*(7). https://doi.org/10.1007/s10584-024-03756-9

Chaustre, R. A. C., & Castillo, P. C. C. (2018). La importancia de la exportación del cacao en Colombia y los países en América Latina. *Revista Investigación & Gestión*, *1*(1), 20-29.

Chen, Z., & Liu, D. (2016). Toward glycerol biorefinery: metabolic engineering for the production of biofuels and chemicals from glycerol. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(1), 205. https://doi.org/10.1186/s13068-016-0625-8

Committee. (2022). *Test method for determination of biodiesel (fatty acid methyl esters) content in diesel fuel oil using mid infrared spectroscopy (FTIR-ATR-PLS method)*. ASTM International.

Czapski, J., Horbowicz, M., & Saniewski, M. (1992). The effect of methyl jasmonate on free fatty acids content in ripening tomato fruits. *Biologia Plantarum*, *34*(1–2), 71–76. https://doi.org/10.1eibl

Das, S., Goswami, M., Yadav, R.N.S. Baruah A. M., & Bandyopadhyay T. (2024). Methyl jasmonate alters expression of enzymes and metabolites of terpenoid biosynthesis in tea cell culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult 159*, 25. https://doi.org/10.1007/s11240-024-02881-8

D'souza, G. B. (1979). The importance of glycerol in the fatty acid industry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *56*(11Part2), 812A-819A. https://doi.org/10.1007/bf02667453

Demirci, T. (2022). Determination of secondary metabolite production efficiency in *Echinacea purpurea* callus, shoot, and root *in vitro* cultures with methyl jasmonate applications. *Acta Physiol Plant 44*, 128. https://doi.org/10.1007/s11738-022-03468-6

Dwivedi, S., Alam, A., & Shekhawat, G. S. (2016). Antioxidant response of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Angiosperms; *Asteraceae*) during developing phase of suspension cell culture. *Plant Science Today*, *3*(2), 115–124. https://doi.org/10.14719/pst.2016.3.2.227

Dymarska, M., Janeczko, T., & Kostrzewa-Suslow, E. (2015). Biotransformations of flavanones in callus cultures. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, *96*(1).

Eibl, R., Meier, P., Stutz, I., Schildberger, D., Hühn, T., & Eibl, D. (2018). Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(20), 8661–8675. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9279-8

Falcone, D. L., Ogas, J. P., & Somerville, C. R. (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biology*, *4*, 17. https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-17

Fan, Y., Tang, Z., Yu, X., Wei, J., Zeng, F., Guo, H., Zhang, L., Li, T., Guo, H., Zhang, C., & Fan, Y. (2022). Dynamic Transcriptome Analysis Reveals Complex Regulatory Pathway Underlying Induction and Dose Effect by Different Exogenous Auxin IAA and 2,4-D During *in vitro* Embryogenic Redifferentiation in Cotton. *Frontiers in Plant Science*, 13. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.931105.

Filippi, B. F., Silveira, S. S., & Moraes, M. G. (2021). "Effects of elicitation on fatty acid bioproduction in *Cereus hildmannianus*." Biotechnology and Applied Biochemistry, 68(1), 68-74. https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-023-02676-3

Gerber, D. W., Byerrum, R. U., Gee, R. W., & Tolbert, N. E. (1988). Glycerol concentrations in crop plants. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, *56*(1), 31–38. https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90182-3

Gómez, A. Y., Cruz-Sosa, F., Muñoz, R., Balch, E., Cabañas-García, E., Areche, C., & Bórquez, J. (2021). Biomass production and secondary metabolite identification in callus cultures of *Coryphantha macromeris* (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae), a traditional medicinal plant. *South African Journal of Botany*, 137, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.002.

González O. V, A., King, E., Patel, M. K., & Pollmann, S. (2024). Plant hormone crosstalk under abiotic stress conditions. *Progress in botany* (Vol. 85). Springer. https://doi.org/10.1007/124_2024_80

Guillou, C., & Verdier, D. (2022). Theobroma cacao: Somatic embryogenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2527*, 69–81. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_6

Hassanpour, H. (2024). Optimized medium composition in *Physalis alkekengi* callus culture altered nitric oxide level for inducing antioxidant enzyme activities and secondary metabolites. *Sci Rep 14*, 16425. https://doi.org/10.1038/s41598-024-67191-7

He, M., & Ding, N.-Z. (2020). Plant unsaturated fatty acids: Multiple roles in stress response. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 562785. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.562785

He, M., Qin, C.-X., Wang, X., & Ding, N.-Z. (2020). Plant unsaturated fatty acids: Biosynthesis and regulation. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 390. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00390

Henao Ramírez, A.M., & Urrea Trujillo, A.I. (2020). Somatic Embryogenesis for Clonal Propagation and Associated Molecular Studies in Cacao (*Theobroma cacao* L.). En: Chong, P., Newman, D., Steinmacher, D. (Ed.) Agricultural, *Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51358-0_5

Hu, J., Zhang, Y., Wang, J., & Zhou, Y. (2014). Glycerol affects root development through regulation of multiple pathways in Arabidopsis. *PloS One*, *9*(1), e86269. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086269

Hussain, T., Abbas, M., Khan, A., Ali, M. A., Ahmad, N., & Aslam, M. (2022). Insights into plant secondary metabolite biosynthesis, molecular genetics, and regulatory mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 820579. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.820579

Ibarra, J., Melendres, J., Almada, M., Burboa, M. G., Taboada, P., Juárez, J., & Valdez, M. A. (2015). Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles. *Materials Research Express*, *2*(9), 095010. https://doi.org/10.1088/2053-1591/2/9/095010

Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Sakamoto, Y., Sugimoto, K., Favero, D., & Coleman, D. (2019). Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annual review of plant biology*, 70, 377-406. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100434.

Imatoukene, N., Koubaa, M., Perdrix, E., Benali, M., & Vorobiev, E. (2020). Combination of cell disruption technologies for lipid recovery from dry and wet biomass of *Yarrowia lipolytica* and using green solvents. *Process Biochemistry (Barking, London, England)*, *90*, 139–147. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.011

Ismail, A. A., van de Voort, F. R., Emo, G., & Sedman, J. (1993). Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *70*(4), 335–341. https://doi.org/10.1007/bf02552703

Jadid, N., Fania, M., Puspaningtyas, I., Alfatikhatunnisa, M., Mukholifah, U., Pratiwi, D., & Asmara, R. (2025). Effects of Combined 2,4-D and BAP Treatments on the Formation of Leaf-Derived Callus in Pogostemon cablin (Blanco) Benth. *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture*. https://doi.org/10.20961/carakatani.v40i2.97331.

Jaimes, S. Y. Y., Carvajal, R. A. S., Galvis, R. D. A., Carvalho, F. E., & Rojas, M. J. (2022). Cacao agroforestry systems beyond the stigmas: Biotic and abiotic stress incidence impact. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 921469.

Jayusman, Hakim, L., & Dalimunthe, A. (2022). Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant *in vitro* propagation: a comprehensive review. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science*, *1115*(1), 012051. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1115/1/012051

Jiménez, D. L., Alvarez, J. C., & Mosquera, S. (2022). Frosty pod rot: a major threat to cacao plantations on the move. *Tropical Plant Pathology*, *47*(2), 187–200. https://doi.org/10.1007/s40858-021-00472-y

Kandoudi, W., Németh-Zámboriné & É. Stimulating (2022). Secondary compound accumulation by elicitation: Is it a realistic tool in medicinal plants in vivo?. *Phytochem Rev* **21**, 2007–2025. https://doi.org/10.1007/s11101-022-09822-3

Keita, K., Darkoh, C. & Okafor, F. (2022). Secondary plant metabolites as potent drug candidates against antimicrobial-resistant pathogens. *SN Appl. Sci. 4*, 209. https://doi.org/10.1007/s42452-022-05084-y

Kihika, J. K., Pearman, J. K., Wood, S. A., Rhodes, L. L., Smith, K. F., Miller, M. R., & Ryan, K. G. (2024). Fatty acid production and associated gene pathways are altered by increased salinity and dimethyl sulfoxide treatments during cryopreservation of *Symbiodinium pilosum* (*Symbiodiniaceae*). *Cryobiology*, *114*, 104855.

Kim, H. U. (2020). Lipid metabolism in plants. *Plants*, *9*(7), 871. https://doi.org/10.3390/plants9070871

Kongor, J. E., Owusu, M., & Oduro Yeboah, C. (2024). Cocoa production in the 2020s: Challenges and solutions. *CABI Agriculture and Bioscience, 5*, 102. https://doi.org/10.1186/s43170-024-00310-6

Kulesza, E., Thomas, P., Prewitt, S. F., Shalit-Kaneh, A., Wafula, E., Knollenberg, B., Winters, N., Esteban, E., Pasha, A., Provart, N., Praul, C., Landherr, L., dePamphilis, C., Maximova, S. N., & Guiltinan, M. J. (2024). The cacao gene atlas: A transcriptome developmental atlas reveals highly tissue-specific and dynamically regulated gene networks in *Theobroma cacao* L. *BMC Plant Biology*, *24*, 601. https://doi.org/10.1186/s12870-024-05171-9

Lakshmaiah, V.V., Banadka, A., Thirumoorthy, G., Naik, P.M., Al-Khayri, J.M., & Nagella, P. (2022). *In Vitro* Production of Bioactive Compounds from Plant Cell Culture. En: Belwal, T., Georgiev, M.I., Al-Khayri, J.M. (Ed.) *Nutraceuticals Production from Plant Cell Factory.* Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-8858-4_2

Leathers, R. R., & Scragg, A. H. (1989). The effect of different temperatures on the growth, lipid content and fatty acid composition of *Theobroma cacao* cell suspension cultures. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, *62*(2), 217–227. https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90084-8

Liu, C., Hao, L. H., Chen, F. S., & Zhu, T. W. (2020). The mechanism of extraction of peanut protein and oil bodies by enzymatic hydrolysis of the cell wall. *Journal of Oleo Science*, *69*(11), 1467–1479. https://doi.org/10.5650/jos.ess20148

Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. *International journal of molecular sciences*, *22*(23), 12824.

Liu, Y., Liu, Q., Krivoruchko, A., Khoomrung, S., & Nielsen, J. (2020). Engineering yeast phospholipid metabolism for de novo oleoylethanolamide production. *Nature Chemical Biology*, *16*(2), 197-205.

Loor, S.R. G., Amores, P. F. M., Vasco, M. S. A., Quiroz, V. J. G., Casanova, M. T. de J., Garzón, C. A. I., Sotomayor, C. I. A., Jiménez, B. J. C., Tarqui, F. O. M., Rodríguez, Z. G. A., Quijano, R. G. C., Plaza, A. L. F., Guerrero, C. H. E., & Zambrano, F. F. G. (2019). INIAP-EETP-800 'Aroma pichilingue', nueva variedad ecuatoriana de cacao fino de alto rendimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *42*(2), 187–189. https://doi.org/10.35196/rfm.2019.2.187-189

Lucarini, M., Durazzo, A., Kiefer, J., Santini, A., Lombardi-Boccia, G., Souto, EB, Romani, A., Lampe, A., Ferrari Nicoli, S., Gabrielli, P., Bevilacqua, N., Campo, M., Morassut, M. & Cecchini, F. (2020). Semillas de Uva: Perfil Cromatográfico de Ácidos Grasos y Compuestos Fenólicos y Análisis Cualitativo mediante Espectroscopía FTIR-ATR. *Alimentos*, *9* (1), 10. https://doi.org/10.3390/foods9010010

Luz, R. F. M., Román, C. M. C., Jorge, C. I., del Mar, R. P. L., Marcos, S. H. R., Lourdes, A. G. M. de, & Israel, C. J. (2024). *In vitro* shoot regeneration and callogenesis of *Sechium compositum*

(Donn. Sm.) C. jeffrey for plant conservation and secondary metabolites product. *Horticulturae*, *10*(6), 537. https://doi.org/10.3390/horticulturae10060537

Mabudi, B. H., Ghassemi, G. K., & Mohammadi, N. A. D. (2022). Seed development, oil accumulation and fatty acid composition of drought stressed rapeseed plants affected by salicylic acid and putrescine. *Gesunde Pflanzen*, *74*(2), 333–345. https://doi.org/10.1007/s10343-021-00612-z

Miller, J. P., & Van, B. C. (Eds.). (2022). *Superfoods: Cultural and scientific perspectives* (2022nd ed.). Springer Nature.

Mora, F. C., Torres, L. A. A., Barzallo, A. A., & Quintanilla, M. O. (2022). Índices de calidad en la comercialización del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Ecuador. *Journal of Science and Research: Revista Ciencia e Investigación*, *7*(1), 42.

Morales, O., Borda, A., Argandoña Martínez, J. A., Farach Cardeña, R., García Naranjo Loayza, L. F., & Mercedes Lazo Galdos, K. J. (2015). La Alianza Cacao Perú y la cadena productiva del cacao fino de aroma.

Morato, L.D.D., González, A.S.Á. & Cardona, M.B.B. (2023). Induction of systemic resistance in *Theobroma cacao* L. for the management of "witches' broom" caused by *Moniliophthora perniciosa*. *Trop. plant pathol. 48*, 463–468. https://doi.org/10.1007/s40858-023-00581-w

Mustiga, G. M., Morrissey, J., Stack, J. C., DuVal, A., Royaert, S., Jansen, J., Bizzotto, C., Villela-Dias, C., Mei, L., Cahoon, E. B., Seguine, E., Marelli, J. P., & Motamayor, J. C. (2019). Identification of climate and genetic factors that control fat content and fatty acid composition of *Theobroma cacao* L. beans. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1159. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01159

Myers, A. (2023). *Cocoa prices slide as ICCO reports on 'growing number of uncertainties' impacting global supply*. William Reed Ltd. https://www.confectionerynews.com/Article/2023/03/06/cocoa-prices-slide-as-icco-reports-on-growing-number-of-uncertainties-impacting-global-supply/?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright

Naderi, M., Mazaheri, Y., Torbati, M., Azadmard Damirchi, S., Rezagholizade Shirvan, A., & Shokri, S. (2024). Evaluation of the qualitative properties of the oil extracted from the mixture of *Helianthus annuus* and *Nigella sativa* seeds during heating. *Scientific Reports*, *14*, 17573. https://doi.org/10.1038/s41598-024-68463-y

Nieves Orduña, H. E., Müller, M., Krutovsky, K. V., & Gailing, O. (2024). Genotyping of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm resources with SNP markers linked to agronomic traits

reveals signs of selection. *Tree Genetics & Genomes, 20*, 13. https://doi.org/10.1007/s11295-024-01646-w

Niu, Y., & Xiang, Y. (2018). An Overview of Biomembrane Functions in Plant Responses to High-Temperature Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00915.

Normanshah, N., Azzeme, A., Shaharuddin, N., Ahmad, S., Ramle, I., Zaman, M., Ramli, S., & Abdullah, S. (2020). Induction, Multiplication, and Evaluation of Antioxidant Activity of *Polyalthia bullata* Callus, a Woody Medicinal Plant. *Plants*, 9. https://doi.org/10.3390/plants9121772.

Nurazah, Z., Radzali, M., Syahida, A., & Maziah, M. (2009). Effects of plant growth regulators on callus induction from Cananga odorata flower petal explant. *African Journal of Biotechnology*, *8*(12).

Osorio Montoya, T., Henao Ramírez, A. M., de la Hoz Vasquez, T., & Urrea Trujillo, A. I. (2022). Propagation of *IMC67* plants, universal cacao (*Theobroma cacao* L.) rootstock via somatic embryogenesis. *International Journal of Fruit Science*, *22*(1), 78–94. https://doi.org/10.1080/15538362.2021.2023067

Plasencia, V. A. H., Vilchez, P. C. R., Ferrer, S. Y., & Veloz, P. C. E. (2022). Efecto del cambio climático sobre la distribución potencial del hongo Moniliophthora roreri y el cultivo de cacao (Theobroma cacao) en Ecuador continental. *Terra Latinoamericana*, *40*.

Popova, E., Kulichenko, I., & Kim, H.-H. (2023). Critical role of regrowth conditions in post-cryopreservation of *in vitro* plant germplasm. *Biology*, *12*(4). https://doi.org/10.3390/biology12040542

Quelal, V. M. A., Lerma, G. M. J., Pérez, E. É., Talens, P., & Barat, J. M. (2020). Roadmap of cocoa quality and authenticity control in the industry: A review of conventional and alternative methods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *19*(2), 448-478.

Ramos, S. H., & Figueroa, P. M. G. (2023). Use of salicylic acid during cultivation of plants as a strategy to improve its metabolite profile and beneficial health effects. *Rivista Italiana Di Scienza Degli Alimenti [Italian Journal of Food Science]*, *35*(1), 79–90. https://doi.org/10.15586/ijfs.v35i1.2332

Repkina, N., Murzina, S. A., Voronin, V. P., & Kaznina, N. (2023). Does methyl jasmonate effectively protect plants under heavy metal contamination? Fatty acid content in wheat leaves exposed to cadmium with or without exogenous methyl jasmonate application. *Biomolecules*, *13*(4). https://doi.org/10.3390/biom13040582

Rodríguez, M., Ortiz, M., & Ramírez, E. (2022). Exploring fatty acid variability in *Theobroma cacao:* Influence of environmental factors. *Plant Lipid Research Journal, 7*(1), 38-51. https://doi.org/10.1080/14512409.2022.126756.1080/14512409.2022.126756

Salimon, J., Omar, T. A., & Salih, N. (2017). An accurate and reliable method for identification and quantification of fatty acids and trans fatty acids in food fats samples using gas chromatography. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, S1875–S1882. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.016

Saxena, S., Ahmad, M., Nandi, A., & Roy, S. (2025). LDL2 and PAO5 genes are essential for systemic acquired resistance in Arabidopsis thaliana. *Physiologia plantarum*, 177 1, e70102. https://doi.org/10.1111/ppl.70102.

Sharma, S., & Uttam, K. N. (2016). Investigation of the manganese stress on wheat plant by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectroscopy Letters*, *49*(8), 520-528.

Sherazi, S. T. H., Mahesar, S. A., Bhanger, M. I., van de Voort, F. R., & Sedman, J. (2007). Rapid determination of free fatty acids in poultry feed lipid extracts by SB-ATR FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(13), 4928–4932. https://doi.org/10.1021/jf063554f

Si, J., Xu, M., Han, Z., Cai, X., Chen, D., & Li, C. (2022). Jasmonate Signaling Pathway Modulates Plant Defense, Growth, and Their Trade-Offs. *International Journal of Molecular Sciences*, 23. https://doi.org/10.3390/ijms23073945.

Sivachandran, R., Gnanam, R., Sudhakar, D., Suresh, J., & Ram, S. G. (2017). Influence of genotypes, stages of microspore, pre-treatments and media factors on induction of callus from anthers of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Plantation Crops*, *45*(3), 162-172.

Su, T., Li, Z., Xin, L., Hu, X., Wang, P., Zhang, Z., & Gao, D. (2021). The role of jasmonates in plant responses to abiotic stress and their crosstalk with other phytohormones. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(6), 2914. https://doi.org/10.3390/ijms22062914

Tsai, C. H., & Kinsella, J. E. (1981). Initiation and growth of callus and cell suspensions of *Theobroma cacao* L. *Annals of Botany*, *48*(4), 549–558. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086160

Ullah, C., Chen, Y.-H., Ortega, M. A., & Tsai, C.-J. (2023). The diversity of salicylic acid biosynthesis and defense signaling in plants: Knowledge gaps and future opportunities. *Current Opinion in Plant Biology*, *72*(102349), 102349. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102349

Varela J., Yesenia C., & Alva, S. H. (2023). *Implicancias de los metales pesados en grano de cacao de los productores de Juanjuí, San Martín 2022*. https://agris.fao.org/search/en/providers/125026/records/674977ff7625988a372214db

Villanova, V., Fortunato, A. E., Singh, D., Bo, D. D., Conte, M., Obata, T., Jouhet, J., Fernie, A. R., Marechal, E., Falciatore, A., Pagliardini, J., Le Monnier, A., Poolman, M., Curien, G., Petroutsos, D., & Finazzi, G. (2017). Investigating mixotrophic metabolism in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *372*(1728). https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0404.

Wang, L., Wang, Y., Mao, J., Zhou, H., Wang, L., Dai, B., Zhou, L., Zhang, S., Shen, S., Zheng, X., & Huan, C. (2025). Methyl jasmonate regulates the glycolytic pathway and the PpbZIP43-PpFAD2 module to enhance cold resistance in peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *228*(113634), 113634. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2025.113634

Wartenberg, A. C., Blaser, W. J., Roshetko, J. M., Van Noordwijk, M., & Six, J. (2020). Soil fertility and *Theobroma cacao* growth and productivity under commonly intercropped shade-tree species in Sulawesi, Indonesia. *Plant and Soil*, *453*, 87-104.

Winters, N. P., Wafula, E. K., Knollenberg, B. J., Hämälä, T., Timilsena, P. R., Perryman, M., Zhang, D., Sheaffer, L. L., Praul, C. A., Ralph, P. E., Prewitt, S., Leandro-Muñoz, M. E., Delgadillo-Duran, D. A., Altman, N. S., Tiffin, P., Maximova, S. N., Pamphilis, C. W., Marden, J. H., & Guiltinan, M. J. (2024). A combination of conserved and diverged responses underlies *Theobroma cacao*'s defense response to *Phytophthora palmivora*. *BMC Biol 22*, 38. https://doi.org/10.1186/s12915-024-01831-2

Woch, N., Laha, S. & Gudipalli, P. (2023). Salicylic acid and jasmonic acid induced enhanced production of total phenolics, flavonoids, and antioxidant metabolism in callus cultures of *Givotia moluccana* (L.) Sreem. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 59*, 227–24. https://doi.org/10.1007/s11627-023-10335-7

Wu, S., Chen, W., Lu, S., Zhang, H., & Yin, L. (2022). Metabolic engineering of shikimic acid biosynthesis pathway for the production of shikimic acid and its branched products in microorganisms: Advances and prospects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(15), 4779. https://doi.org/10.3390/molecules27154779

Xu, J., Fan, X., Li, X., Liu, G., Zhang, Z., Zhu, Y., Fu, Z., & Qian, H. (2017). Effect of salicylic acid on fatty acid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum* during stationary growth phase. *Journal of Applied Phycology*, *29*(6), 2801–2810. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1191-6

Yetgin, A., Srivastava, R. K., & Mandal, N. (2025). Insights into plant hormone signaling networks for environmental responses (Ed.). *Mitigation and adaptation strategies against climate change in natural systems*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-75968-0_26

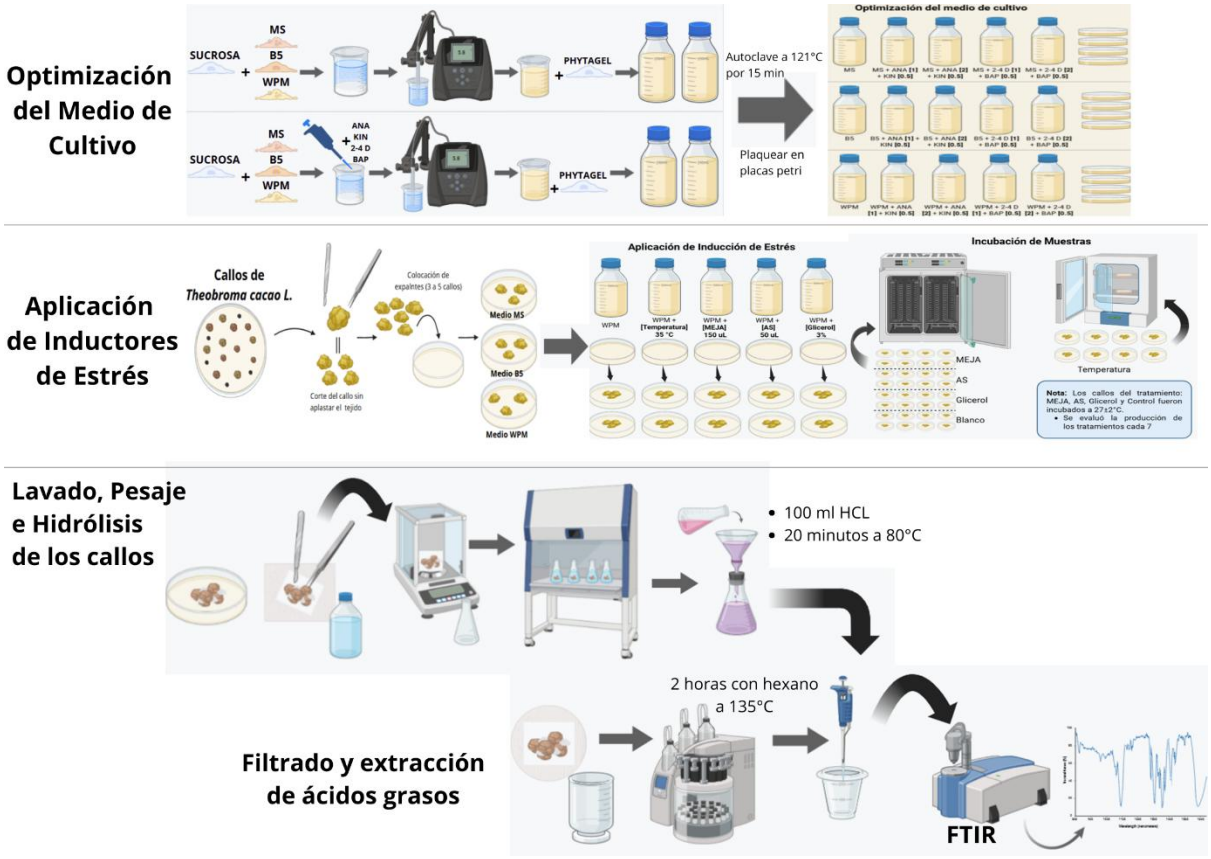
Zaytseva, Y. G., Ambros, E. V., & Novikova, T. I. (2021). Meta-topolin: advantages and disadvantages for *in vitro* propagation. *Meta-topolin: a growth regulator for plant biotechnology and agriculture*, 119-141.

Zhu, L., Li, X., Li, M., Xu, S., Zou, J., & Wu, H. (2021). Fatty acid desaturases: Structures, functions, and regulation in response to environmental stresses. *Plant Cell Reports, 40*, 1383-1395. https://doi.org/10.1007/s00299-021-02754-5.

ANEXOS

Anexo 1.

Resultado de la metodología empleada.



Nota. La imagen fuer generadora en BioRender por los autores **(Palacios & Sanchez, 2025).**

Anexo 2.

Análisis de varianza de la optimización de las condiciones del sistema biotecnológico.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	59	19,7904	0,33543	110,32	0,000
Lineal	9	14,1866	1,57629	518,45	0,000
Medio	2	2,5114	1,25571	413,01	0,000
Tratamiento	4	4,3633	1,09083	358,78	0,000
Semana	3	7,3119	2,43729	801,64	0,000
Interacciones de 2 términos	26	4,4005	0,16925	55,67	0,000
Medio*Tratamiento	8	1,9042	0,23802	78,29	0,000

Medio*Semana	6	1,1073	0,18454	60,70	0,000
Tratamiento*Semana	12	1,3890	0,11575	38,07	0,000
Interacciones de 3 términos	24	1,2033	0,05014	16,49	0,000
Medio*Tratamiento*Semana	24	1,2033	0,05014	16,49	0,000
Error	60	0,1824	0,00304		
Total	119	19,9729			

Nota. Análisis realizado en Minitab 18.

Anexo 3.

Peso fresco de callos inducidos a estrés durante el experimento.

Inductor de estrés	Semana 1	Promedio	Semana 2	Promedio	Semana 3	Promedio	Semana 4	Promedio
Blanco	2,5611 2,5474 2,5351	2,5479 ±0,013	3,1069 2,9396 3,8016	3,2827 ±0,457	3,6286 3,5682 4,6092	3,9353 ±0,584	3,9801 4,0266 5,2466	4,4178 ±0,718
Temperatura	2,5401 2,5369 2,5376	2,5382 ±0,001	2,2948 2,3343 2,1313	2,2534 ±0,107	2,4969 2,6264 2,5734	2,5655 ±0,065	1,7002 1,8645 1,8464	1,8037 ±0,090
MEJA	2,0525 2,0968 2,0354	2,0615 ±0,031	2,1039 2,1781 2,0813	2,1211 ±0,050	2,2026 2,3702 2,1497	2,2408 ±0,115	2,0709 2,1254 1,7891	1,9951 ±0,180
AS	2,5345 2,5435 2,5523	2,5434 ±0,008	2,4491 2,2395 2,1462	2,2783 ±0,287	2,0978 2,3254 2,6683	2,3638 ±0,287	2,5233 2,0248 1,8943	2,1475 ±0,331
Glicerol	2,5635 2,5386 2,5542	2,4864 ±0,012	2,807 2,0332 2,6189	3,2216 ±0,403	3,6535 2,5219 3,4893	3,5402±0.611	2,9772 3,4538 4,1895	3,5402 ±0,610

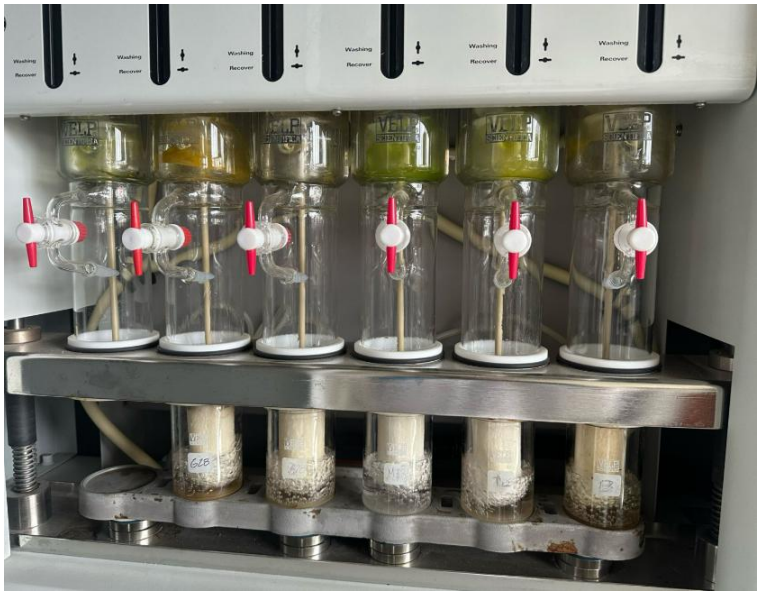
Anexo 4.

Proceso de hidrolisis ácida en los callos de Theobroma cacao L.

Nota. Callos sumergidos en una solución de HCl 3N.

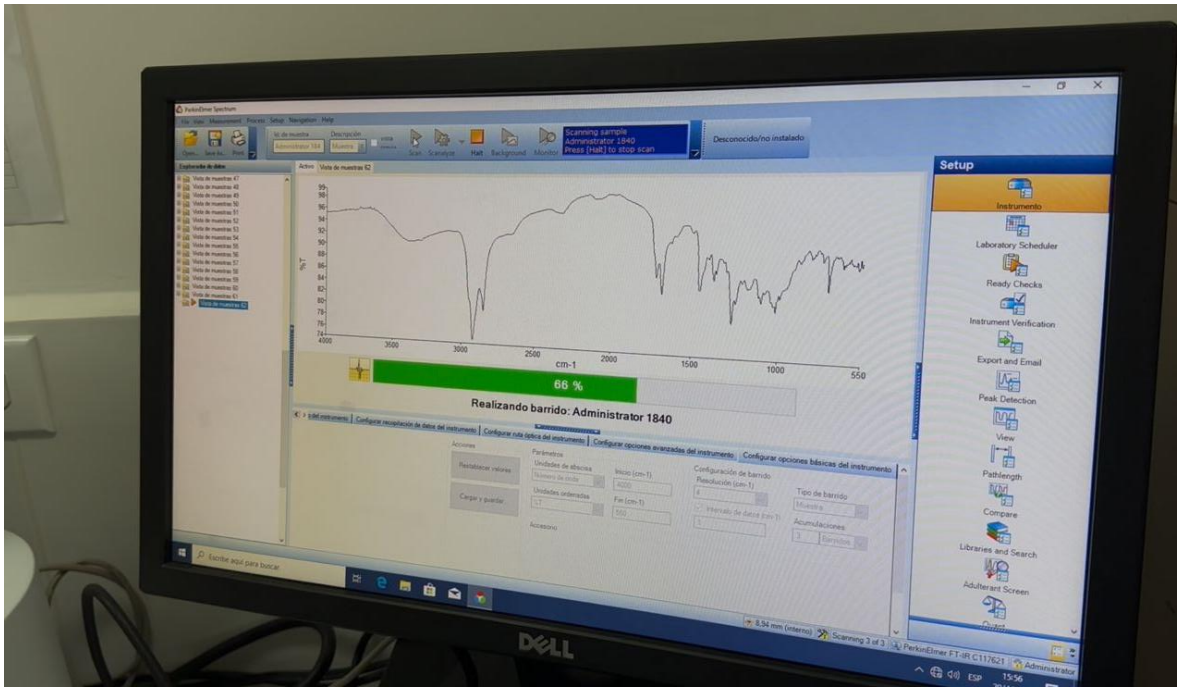
Anexo 5.

Extracción del producto lipídico posterior a la hidrolisis ácida.



Anexo 6.

Funcionamiento del espectrómetro FT-IR.



Anexo 7.

Concentración del extracto de ácidos grasos obtenidos.

Inductor de estrés	Replica	Semana 1 (mg/mL)	Semana 2 (mg/mL)	Semana 3 (mg/mL)	Semana 4 (mg/mL)
Metil Jasmonato (150 uM)	R1	1,2471	4,3712	8,1289	6,2958
	R2	1,2722	4,3503	8,1052	6,3201
Ácido salicílico (50 uM)	R1	0,3870	3,3769	10,4352	6,3110
	R2	0,3839	3,3413	10,4151	6,3334
Temperatura (35ºC)	R1	0,0896	1,5199	5,7310	2,7675
	R2	0,0905	1,5341	5,7172	2,7316
Glicerol (3%)	R1	0,0018	1,7150	4,5419	2,1019
	R2	0,0016	1,7323	4,5282	2,1238
Control	R1	0,1835	1,7286	3,8634	2,3351
	R2	0,1782	1,7117	3,8748	2,3498

Anexo 8.

Análisis de Varianza de la cuantificación de ácidos grasos.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	19	310,536	16,3440	84795,85	0,000
Lineal	7	279,095	39,8708	206857,06	0,000
Tratamientos	4	79,315	19,8288	102875,69	0,000
Días	3	199,780	66,5934	345498,88	0,000
Interacciones de 2 términos	12	31,441	2,6201	13593,48	0,000
Tratamientos*Días	12	31,441	2,6201	13593,48	0,000
Error	20	0,004	0,0002		
Total	39	310,540			

Nota. Análisis realizado en Minitab 18.