

Localización histológica de triterpenos en raíces silvestres e *in-vitro* de *Cecropia angustifolia*

Paula Catherine Muñoz Bonilla

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS

Biología

Santiago de Cali

2024

Localización histológica de triterpenos en raíces silvestres e *in-vitro* de *Cecropia angustifolia*

Paula Catherine Muñoz Bonilla

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TITULO DE
BIOLOGA

Tutor: Juan Esteban Vivas Moncayo, BSc.

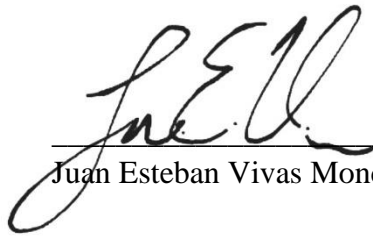
Co-tutor: Guillermo León Montoya Peláez, Ph.D.

Santiago de Cali

2024

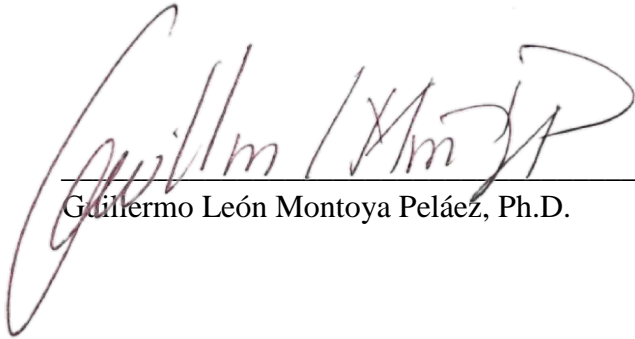
AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

Firma del tutor:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. E. V. M.', written over a horizontal line.

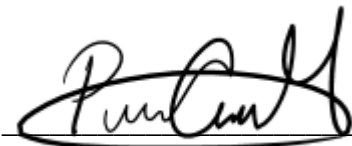
Juan Esteban Vivas Moncayo, BSc .

Firma del co-tutor:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Guillermo León Montoya Peláez', written over a horizontal line.

Guillermo León Montoya Peláez, Ph.D.

Firma del estudiante:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paula C. Muñoz', written over a horizontal line.

Paula Catherine Muñoz

Tabla de contenido

Índice de tablas	6
Índice de figuras	6
Resumen ejecutivo.....	8
Palabras clave	8
Introducción.....	9
Metodología.....	12
1. Revisión bibliográfica.....	12
2. Obtención de las muestras de tejido radicular	13
a. Establecimiento de cultivos <i>in-vitro</i> de <i>Cecropia angustifolia</i>	13
b. Selección del material vegetal	14
3. Procesamiento histológico convencional.....	14
a. Fijación y deshidratación	14
b. Emparafinado.....	15
c. Corte de las muestras en microtomo	15
4. Tinciones generales para la caracterización de la morfología radicular	15
5. Preparación de las muestras para cortes en fresco.....	16
a. Preparación de la matriz de soporte	16
b. Fijación de las raíces a la matriz.....	16
6. Corte histológico del tejido radicular y fijación de muestra.....	16
7. Proceso de tinción de las muestras radiculares.....	17
a. Derivatización de triterpenos pentacíclicos ácidos	17
b. Tinción con Sudan III	17
8. Revisión del tejido radicular teñido	17
a. Observación en microscopio óptico.....	18

b. Observación en microscopio de fluorescencia	18
9. Verificación de zonas derivatizadas	18
a. TLC preparativa de extracto de <i>Cecropia angustifolia</i>	18
b. Aislamiento y extracción de zonas con fluorescencia.....	19
c. Análisis espectrométrico.....	19
10. Obtención muestras de <i>C. angustifolia</i> con diferentes concentraciones de TPAs.....	20
a. Obtención de material vegetal en cultivo hidropónico	20
b. Simulación de condiciones de estrés a partir de jasmonato de metilo.....	20
c. Obtención de muestras con baja presencia de TPAs	21
11. Análisis de las muestras procesadas y comparación de los resultados	21
Resultados y discusión.....	22
Procesamiento histológico convencional.....	22
Identificación morfológica a partir de tinción general de estructuras radiculares y análisis por microscopía óptica y de fluorescencia	23
Realización de cortes histológicos en vibratomo.....	25
Determinación de zonas de acumulación a partir de tinción y derivatización	26
Revisión del protocolo en muestras con diferentes concentraciones de TPAs.....	28
Extracción de TPAs derivatizados y análisis espectrométrico	32
Conclusiones.....	35
Agradecimientos	36
Referencias bibliográficas	37

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo Achiva-2.....	13
Tabla 2. Proporciones y tiempos de las soluciones para deshidratación.	14
Tabla 3. Protocolo de tinción general de tejido vegetal modificado de la bibliografía	15
Tabla 4. Soluciones implementadas para el proceso de derivatización de TPAs	17

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de montaje hidropónico	20
Figura 2. Esquema SIP inducido con jasmonato de metilo	21
Figura 3. Desarrollo de cortes en micrótopo rotatorio de tejido incluido en parafina.....	23
Figura 4. Raíz teñida con Safranina-Fast Green (40x).....	24
Figura 5. Raíz de <i>C. angustifolia</i> teñida con Safranina-Cristal Violeta A. Visualización en microscopio óptico (10x). B. Visualización bajo filtro DAPI (10x). C. Visualización bajo filtro FITC (10x).....	25
Figura 6. Desarrollo de cortes en vibratomo de muestras incluida en matriz de agarosa al 5%.....	26
Figura 7. Raíz de <i>C. angustifolia</i> derivatizada bajo filtro DAPI. A. Identificación de las estructuras radiculares (10x). B. Visualización de zonas con fluorescencia diferencial (10x). C. Visualización bajo filtro FITC (10x).....	27
Figura 8. Raíz teñida con Sudan III. A. Muestra con tinción positiva a lo largo de todo el tejido (10x). B. Muestra con tinción positiva en la zona del córtex (10x).	28
Figura 9. Visualización bajo filtro DAPI de muestras derivatizadas. A. Corte con menor concentración de TPAs (10x). B. Corte obtenido del SIP inducido con MeJa (10x). C. Corte obtenido de cultivo hidropónico (10x). D. Corte obtenido del SIP inducido con MeJa con múltiples puntos de fluorescencia diferenciada (10x).....	32
Figura 10. Análisis de TPAs derivatizados con cumarina. A. Fracciones seleccionadas de TLC preparativa de extracto silvestre. B. Espectro de masas de la F2 en modo ES+. Señalado se encuentra el aducto de sodio de los TPAs derivatizados de masa 706.	33

Figura 11. Espectro de masas de TPAs derivatizados con relaciones m/z entre 690 y 705 en modo ES+. **A.** Muestra obtenida de cultivo hidropónico. **B.** Muestra obtenida de SIP inducido con MeJa. **C.** Muestra obtenida de cultivo *in-vitro*. 34

Figura 12. Espectros de masas de TPAs derivatizados con relaciones m/z entre 713 y 733 en modo ES+. **A.** Muestra obtenida de cultivo hidropónico. **B.** Muestra obtenida de SIP inducido con MeJa. **C.** Muestra obtenida de cultivo *in-vitro*. 35

Resumen ejecutivo

Los triterpenos pentacíclicos ácidos (TPAs) son productos naturales de gran interés debido a su potencial terapéutico en la diabetes mellitus tipo 2. Estos están presentes en la especie *Cecropia angustifolia*, principalmente en sus raíces. Aunque se conoce su capacidad de biosíntesis, hay una falta de conocimiento sobre el almacenamiento y localización de estos compuestos en el tejido vegetal. Es por esto que se diferencié la ubicación de TPA a partir de muestras de tejido radicular *in vitro* y silvestre de *C. Angustifolia*. Este proceso implicó establecer protocolos de tinción, centrados en procesos de análisis morfológico, derivatización de TPAs y tinción comparativa con Sudan III, a partir de la visualización por microscopía óptica y de fluorescencia; verificando por espectrometría de masas las zonas con fluorescencia diferencial. Los protocolos obtenidos fueron desarrollados en muestras radiculares obtenidas de diferentes tratamientos. Se determinaron las principales estructuras radiculares a partir de la observación de la tinción con Safranina y Fast Green, además de localizar las zonas derivatizadas con fluorescencia diferencial, utilizando ambos métodos de microscopía. Se determinó que el córtex radicular era la estructura que presentaba zonas de acumulación de TPAs. La verificación de estas zonas por espectrometría de masas indicó la presencia de moléculas de 706, 713 y 729 m/z, correspondiendo a las masas de los TPAs derivatizados y sus aductos de sodio. Además, la tinción con Sudan III mostró una presencia generalizada de lípidos en el tejido radicular. El protocolo establecido fue exitoso para la determinación de las zonas de acumulación en raíces con diferentes tratamientos a partir de procesos de tinción y derivatización, así como su verificación por espectrometría de masas.

Palabras clave: Triterpenos pentacíclicos ácidos, Histología vegetal, Derivatización, Microscopía de fluorescencia, Metabolitos secundarios.

Introducción

En el ciclo de vida vegetal se da una constante producción de compuestos por las plantas, que presentan variadas composiciones químicas y hacen parte de procesos metabólicos en estos organismos. Entre ellos se presentan los metabolitos primarios y los secundarios, también llamados metabolitos especializados. Los metabolitos primarios son aquellos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, siendo los necesarios para funciones básicas como los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En el caso de los metabolitos secundarios, estos son compuestos que presentan funciones más especializadas, tales como la atracción de polinizadores, defensa frente a depredación, comunicación intercelular, entre muchas otras ¹. Estas moléculas son producidas en bajas concentraciones, y su presencia y cantidad puede cambiar conforme a las condiciones externas. Además, su distribución es restringida en el reino vegetal, por lo que las plantas capaces de sintetizar estas moléculas pueden estar limitadas a grupos taxonómicos, ya sea el género, familia o incluso especie ². Estos compuestos tienen variadas aplicaciones, siendo de gran interés económico, especialmente en el campo farmacéutico, ya que aproximadamente el 25% de todos los medicamentos aprobados por la FDA y la EMA son derivados de productos naturales ³.

Los árboles del género *Cecropia*, conocidos comúnmente como "yarumo", "guarumo" o "guarumbo", presentan una amplia distribución en las selvas tropicales y subtropicales de América, a altitudes inferiores a los 2600 metros sobre el nivel del mar. En Colombia, existen 25 especies nativas de este género, entre las cuales se destaca la especie *Cecropia angustifolia* ⁴. Esta especie, comúnmente conocida como yarumo negro, presenta una distribución accesible en el Valle del Cauca, Colombia, con múltiples individuos en el Parque Nacional Natural Farallones y en zonas aledañas a la ciudad de Cali ^{4,5}. Estos árboles se han estudiado por sus propiedades terapéuticas, atribuidas principalmente a su producción de metabolitos secundarios, entre ellos los triterpenos pentacíclicos ácidos (TPAs), los cuales son de gran interés y potencial terapéutico.

Los TPAs son una clase importante de metabolitos secundarios que poseen un esqueleto de 30 átomos de carbono, formados a partir de unidades de isopreno ⁶. Su biosíntesis ocurre

mediante la ruta del ácido mevalónico, en el citoplasma. Además, la presencia de estas moléculas en el tejido de las plantas es considerablemente baja, debido principalmente a su asociación al metabolismo secundario⁷. Desde una perspectiva farmacéutica, estos metabolitos han mostrado actividades biológicas significativas, incluyendo propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antidiabéticas^{7,8}. Debido a estas características, estos compuestos han demostrado ser de gran utilidad en el tratamiento de diversas enfermedades y desordenes metabólicos. De hecho, se han realizado investigaciones preclínicas que demuestran que extractos de raíces de *Cecropia telenitida* contienen fracciones con propiedades antiinflamatorias y potencial para el tratamiento de la diabetes tipo II y sus patologías, debido a que inhiben la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1^{6,9}.

La extracción de TPAs se ha realizado principalmente a partir de órganos radiculares recolectados en campo o cultivados *in vitro*, buscando reducir el impacto ambiental de esta práctica. Esta metodología presenta la desventaja de producir fracciones con composición variada, bajas concentraciones y no son fácilmente detectables por técnicas comunes de análisis como detectores de UV, de arreglos de fotodiodos o de densidad óptica¹⁰. Actualmente, se desconoce la localización específica de estos metabolitos dentro de las estructuras radiculares, ya sea posibles zonas de producción o acumulación. Debido a este vacío en el conocimiento, los estudios a nivel celular del tejido radicular se muestran como una alternativa a identificar estos metabolitos dentro de las raíces. Por lo tanto, la histolocalización surge como una alternativa que permite caracterizar la organización del tejido vegetal, incluyendo las estructuras de reserva y secreción¹¹.

El estudio de tejido por histolocalización implica protocolos de corte de las muestras para obtener láminas histológicas para microscopía, y tinciones de estos para observar compuestos o grupos celulares específicos. En el caso de tejido vegetal, el grosor de estas láminas se encuentra entre 5 y 50 μm dependiendo del tipo de tejido a procesar y la técnica seleccionada para este proceso^{12, 13}. La inclusión en matrices de soporte, como es el caso de la parafina o resinas, es una técnica comúnmente usada en estudios histológicos, con el fin de obtener pocas capas de células sin comprometer la integridad del tejido¹³. Sus cortes se realizan en micrótomos rotatorios, e implican procesos de fijación y deshidratación del tejido. Estos procesos causan limitaciones para implementar estas técnicas en el análisis de metabolitos

que puedan presentar solubilidad en los compuestos usados en estos procesos o puedan ser degradados por ellos. Una alternativa a este proceso es el corte de material fresco, donde se usan micrótomos manuales, criostatos y vibratomos, los cuales permiten un mínimo procesamiento del tejido a trabajar. El vibratomo es una herramienta comúnmente utilizada en la investigación científica para producir secciones delgadas de órganos o tejidos vegetales con fines de análisis, a partir de la vibración de una cuchilla ¹⁴. Este proceso permite obtener un corte preciso y controlado del material vegetal, minimizando el daño al tejido y preservar la antigenicidad. Debido a esto, produce láminas adecuadas para diversos procedimientos de tinción.

Este último proceso es crucial en el campo de la histología, pues permite la observación de estructuras a partir de la incorporación de diferentes soluciones. Para la visualización por microscopía óptica, la Safranina O, Fast Green FCF, cristal violeta y azul de metileno son algunos de los reactivos comunes para este proceso. La combinación de estos reactivos permite la identificación de estructuras como la pared celular, citoplasma, núcleo, endodermo, entre otros ¹⁵.

En el caso de la microscopía de fluorescencia se usan filtros con longitudes de onda específicas de excitación, aprovechando la capacidad de los fluorocromos para emitir luz ¹⁶. Esta técnica se basa en la autofluorescencia natural de algunos tejidos vegetales, como del marcaje con sondas fluorescentes. Este tipo de sondas en microscopía de fluorescencia permite la histolocalización de genes, proteínas, metabolitos, compuestos químicos, entre otras moléculas ¹⁷. Existe una gran variedad de reactivos y protocolos establecidos que permiten diferenciar metabolitos secundarios, basando las reacciones en sus grupos funcionales. Para este grupo de moléculas se han usado derivados de Rodamina B para medir la actividad antiviral, y ácido fosfomolíbdico para la determinación de zonas de secreción de triterpenos, basado en la tinción que estos compuestos le confieren a los TPAs ^{17,18}.

Para estos metabolitos se han empleado procesos basados en la derivatización de TPAs con derivados de cumarina, con el fin de visualizar estos por fluorescencia ¹⁹. Un ejemplo de estos es el reactivo 4-bromometil-6,7-dimetoxicumarina o BrMDMC, la cual se caracteriza por ser un polvo cristalino amarillo, fotosensible, soluble en compuestos apolares, que

reacciona con el grupo carboxílico de los TPAs, formando ésteres MDMC-derivados que tienen longitud de onda de emisión 425 nm y de excitación 340 nm ^{19,20}.

Debido a la naturaleza de los procesos histológicos, estos son observacionales y cualitativos, por lo que se han incorporado técnicas analíticas en combinación con estos, con el fin de obtener mayor información. Entre estas se encuentran pruebas químicas, tales como el análisis por cromatografía de capa fina (TLC), o también, técnicas analíticas, como la espectrometría de masas (LC-MS) o MALDI-TOF. Estas presentan información relevante para la identificación de moléculas, que ayudan a entender la composición química de las muestras analizadas y, en conjunto con la histología, complementan el entendimiento de estas.

En la bibliografía se presenta un amplio reporte sobre la presencia de TPAs en plantas, pero se desconoce las células encargadas del proceso de biosíntesis de estos y su localización en el tejido vegetal. Esta información sería pertinente para el uso de triterpenos obtenidos de *Cecropia angustifolia*, ya que, se podrían producir cultivos de manera dirigida a incrementar la producción de estos metabolitos, centrándose en el tejido específico para la producción de TPAs. Esto es crucial no solo para la comprensión fundamental de la biología de esta planta, sino también para desarrollar métodos más eficientes de cultivo y utilización de TPAs en aplicaciones farmacéuticas. A través del uso combinado de técnicas histológicas y analíticas, se espera identificar las células clave para la producción de TPAs. Es por esto que el presente proyecto tiene como objetivo diferenciar la ubicación celular de triterpenos a partir de muestras de tejido radicular *in vitro* y silvestre de *Cecropia Angustifolia*.

Metodología

1. Revisión bibliográfica

Para el procesamiento de muestras vegetales radiculares se realizó un proceso de búsqueda bibliográfica exhaustiva para la determinación de las mejores técnicas histológicas para las muestras de tejido radicular trabajadas. Se realizó en bases de datos como ScienceDirect y Nature Portfolio, teniendo como enfoque artículos publicados entre el año 2000 al 2023. Se utilizaron términos de búsqueda específicos como: “Pentacyclic Triterpenes”, “Plant

histology”, “Fluorescent staining”. Como criterio general, se seleccionaron protocolos que hacen uso de compuestos químicos polares, con el fin de retener la mayor cantidad de triterpenos en el tejido.

2. Obtención de las muestras de tejido radicular

a. Establecimiento de cultivos *in-vitro* de *Cecropia angustifolia*

Se empleó tejido radicular de *Cecropia angustifolia in-vitro* proveniente de la colección de tejidos vegetales del laboratorio de biotecnología de la Universidad Icesi. Los cultivos presentes en este laboratorio se obtuvieron de explantes recolectados de individuos silvestres de *C. angustifolia* del Parque Nacional Farallones durante el segundo semestre del año 2022. El protocolo de propagación e inducción del material vegetal fue determinado por Vasquez-Delgado et al. (2023), y se usaron las condiciones de crecimiento establecidas por su investigación. Para la inducción y propagación de cultivos de tejido radicular, los explantes se dispusieron en medios de cultivo Achiva-2, la composición de estos medios se presenta en la tabla 1. La incubación se llevó a cabo en un cuarto de crecimiento a 25°C (± 2) y en ausencia de luz. Además, para la inducción de plántulas se realizó la germinación de semillas que se cultivaron en un medio MS sin hormonas, con un fotoperiodo de 16/8h de luz²¹. El material fue cultivado entre 4 y 6 meses con el fin de obtener cultivos de tamaño considerable y con tejido en mayores estadios del desarrollo.

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo Achiva-2

Componentes	Unidades de concentración	Cantidades
Sales y nutrientes MS (M519)	g/L	4,43
Gellan Gum	g/L	3,0
Sacarosa	g/L	30
Ácido indol-3-butirico (1000 mg/L)	mL/L	2,03

b. Selección del material vegetal

Se seleccionaron raíces a partir de los cultivos previamente establecidos, las cuales presentaran un grosor entre 1.0 y 4.0 mm, un largo de aproximadamente 2 cm y que no presentaran cayos o cúmulos de células indiferenciadas en su estructura para asegurar el desarrollo del tejido.

3. Procesamiento histológico convencional

El protocolo implementado para el procesamiento convencional de las muestras se adaptó el establecido por Ramírez (2023), presente en el repositorio de la Universidad Icesi, con el fin de hacer una revisión morfológica de las muestras radiculares.

a. Fijación y deshidratación

La fijación de las raíces se realizó en una solución de ácido acético 98%, formaldehído 37% y alcohol etílico 75% durante aproximadamente 15 días. Posteriormente, el tejido radicular se sumergió en alcohol etílico 70% durante 24 horas para retirar la solución de fijación. Las muestras fueron expuestas a 7 fases de deshidratación, colocándolas en casetes de histología. Se deshidrataron de manera progresiva por 8 horas aproximadamente, como se presenta en la tabla 5.

Tabla 2. Proporciones y tiempos de las soluciones para deshidratación.

Solución	Etanol 96%	Etanol absoluto	Terbutanol	Agua	Tiempo (h)
1	0.5	-	0.1	0.4	1
2	-	-	0.2	0.3	1
3	-	-	0.35	0.15	1
4	-	-	0.5	-	1
5	-	0.25	0.75	-	1
6	-	-	1.0	-	1.5
7	-	-	1.0	-	1.5

b. Emparafinado

Posterior al proceso de deshidratación, las muestras se sumergieron en parafina de histología Histoplat™ PE (Cat No. 8330, Thermoscientific) a 60°C en moldes metálicos de histología acordes al tamaño de estas. Los bloques resultantes se dejaron a temperatura ambiente hasta su solidificación y se almacenaron a 4°C para su posterior uso.

c. Corte de las muestras en microtomo

Las muestras en parafina fueron cortadas en un micrótopo rotatorio American Optical modelo 820. Los cortes se realizaron a 30 µm de grosor. Cada lámina se colocó en un baño de agua a 50°C y fueron ubicados en portaobjetos. Finalmente, se secaron las muestras en un horno a 60°C por aproximadamente 6 horas.

4. Tinciones generales para la caracterización de la morfología radicular

Con el fin de analizar el tejido radicular y diferenciar los diferentes componentes de la muestra vegetal se realizaron tinciones generales presentes en la bibliografía, principalmente con los reactivos Safranina O 0.1%, Fast Green FCF 0.1% y Cristal violeta 1%. Los protocolos para realizar las tinciones se tomaron del libro de Staining Procedures used by The Biological Stain Commission (1961). Las tinciones se realizaron en recipientes Coplin, sumergiendo los portaobjetos completamente por los tiempos establecidos. El protocolo realizado se lista en la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de tinción general de tejido vegetal modificado de la bibliografía

Etapa	Reactivo	Tiempo (min)	Etapa	Reactivo	Tiempo (min)
1	Xileno	10	10	Agua tipo II	Lavado
2	Xileno	7	11	Etanol 70%	1
3	Etanol absoluto	5	12	Etanol 96%	1
4	Etanol absoluto	5	13	Fast Green FCF 1%	0,5
5	Etanol 96%	1	14	Etanol absoluto	1
6	Etanol 70%	1	15	Etanol absoluto	1

7	Agua tipo II	1	16	Xileno	1
8	Safranina O 1%	30	17	Xileno	1
9	Cristal violeta 1%	10	-	-	-

5. Preparación de las muestras para cortes en fresco

a. Preparación de la matriz de soporte

Con el fin de incluir las muestras en una matriz que facilitara el corte, las raíces se incluyeron en cubos de agarosa y agua destilada al 6%, y de un tamaño aproximado de 0.5 cm x 1 cm x 2 cm. Además, para unir las raíces a la matriz de agarosa se usó como agente pegante una solución de gelatina, con el fin de presentar compuestos poco reactivos para evitar uniones inespecíficas en el proceso de tinción.

b. Fijación de las raíces a la matriz

Por cada muestra se usaron raíces de aproximadamente 1 cm de longitud, tomando como punto de medida su meristemo apical o punta distal. Las raíces se obtuvieron del medio de cultivo en una cabina de flujo laminar y con utensilios estériles con el fin de preservar el tejido original para futuros estudios. Las muestras obtenidas se incluyeron en los cubos de agarosa, con espacios cavados en ellos del tamaño de la raíz, usando la solución de gelatina caliente (>50°C). Estos se enfriaron, para asegurar la fijación de la raíz a la matriz de agarosa, a 4°C aproximadamente y se almacenaron en agua destilada a esta misma temperatura para evitar su deshidratación.

6. Corte histológico del tejido radicular y fijación de muestra

Los cortes histológicos se realizaron en un vibratomo Leica modelo VT 1000S. Los cortes se hicieron a 30 μm , 4 $\mu\text{m/s}$ y frecuencia de 5. Haciendo uso de las muestras radiculares preparadas, estas se fijaron a la base del bloque portamuestras del vibratomo con adhesivo de cianoacrilato y sumergiéndolas en agua destilada. Los cortes obtenidos del vibratomo se almacenaron en placas de ELISA con agua destilada para facilitar el proceso de montaje. Posterior a la obtención de los cortes histológicos, se empleó la solución de gelatina al 10%, a temperaturas entre 60 y 80°C, para fijar el corte al portaobjetos.

7. Proceso de tinción de las muestras radiculares

a. Derivatización de triterpenos pentacíclicos ácidos

La derivatización de los triterpenos se realizó conforme lo establecido por Ramírez (2023), y Perdomo y Salazar (2021), presentes en el repositorio de la Universidad Icesi, las cuales emplean una solución de 4bromometil-6,7-dimetoxicumarina en acetona (S1), que requiere de carbonato de potasio en metanol (S2), y éter corona en acetonitrilo (S3) para promover la reacción. Estas soluciones se dejaron reaccionando con el tejido por 40 minutos a temperatura ambiente. La composición de estas soluciones se lista en la tabla 4.

Tabla 4. Soluciones implementadas para el proceso de derivatización de TPAs

Solución	Reactivo	Concentración p/v
S1	4bromometil-6,7-dimetoxicumarina	0,25
	Acetona	
S2	Carbonato de potasio	0,01
	Metanol	
S3	Éter corona	0,625
	Acetonitrilo	

b. Tinción con Sudan III

Con el fin de analizar el tejido y diferenciar los compuestos grasos que estaban presentes en la muestra vegetal de las marcadas para triterpenos, se realizó una tinción con Sudan III 1% por 1 hora, sumergiendo completamente los portaobjetos con muestras en el reactivo.

8. Revisión del tejido radicular teñido

Todos los cortes procesados se analizaron mediante microscopía óptica y de fluorescencia en el Cuarto de Microscopía de la Universidad Icesi. En el microscopio óptico Leica modelo DM500 se revisó el proceso de tinción general del tejido, buscando identificar las estructuras dentro de los órganos radiculares de acuerdo con la información reportada en la literatura y para verificar la tinción de lípidos con Sudan III. Las tinciones por fluorescencia fueron

evaluadas en un microscopio de fluorescencia Nikon modelo Eclipse55i, que se usó para determinar la presencia de bromo-cumarina unida a triterpenos en el tejido, a partir de las tinciones realizadas, así como la diferenciación de la acumulación de estos conforme a las estructuras del tejido.

a. Observación en microscopio óptico

Para el proceso de observación de las tinciones generales realizadas con reactivos convencionales y Sudan III, se usó un microscopio óptico para analizar los cortes con los objetivos 10x y 40x. Las imágenes observadas se contrastaron con la literatura evaluar el tejido presente y sus partes. Se realizó este mismo proceso para la tinción de Sudan III y se determinaron las zonas con tinción para lípidos.

b. Observación en microscopio de fluorescencia

En la evaluación del tejido por microscopía de fluorescencia se consideró la intensidad de la fluorescencia del tejido, asociando este a una mayor coloración visualizada en comparación con las demás zonas del tejido, con el objetivo 10x. En este proceso se analizaron las muestras obtenidas del proceso de derivatización y por tinción con safranina y Fast Green. En este proceso se usaron filtros de excitación para la emisión en longitudes de onda específicas. Estos filtros de excitación son el filtro DAPI, con emisión de 358 nm, y el filtro FITC, con emisiones de 485 nm. A partir de lo evidenciado en estas imágenes, se asoció la presencia de fluorescencia de triterpenos derivatizados con la acumulación relativa de estos, identificando cuáles son sus zonas de mayor acumulación conforme a las partes identificadas del tejido.

9. Verificación de zonas derivatizadas

Conforme a lo identificado en la visualización por microscopía de fluorescencia para las zonas de acumulación de triterpenos, se realizó una caracterización y análisis de estas zonas con el fin de asegurar la presencia de estos compuestos, descartando falsos positivos de fluorescencia.

a. TLC preparativa de extracto de *Cecropia angustifolia*

Se realizó un proceso de separación por TLC preparativa usando como muestra un extracto de *Cecropia angustifolia* silvestre obtenido con Dicloro metano/Acetato de

etilo (1:1). Se tomaron 20 mg de extracto con 20 mg de K_2CO_3 en 1 ml de metanol. Se tomó 1 ml de la S1 y S3 del numeral 7 de la metodología, respectivamente, los cuales reaccionaron con la muestra por 40 minutos en ausencia de luz. Posteriormente, fueron sembrados 1.5 de los 3 ml en una placa de vidrio TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Cat No. 100390, Merk Millipore) empleando un capilar de vidrio de 5 μ L. Se ubicó la placa en una cámara de separación con 50 ml de fase móvil, compuesta por Cloroformo/Tolueno/Etanol al 96% (4:4:1), y se visualizó con luz UV a 365 nm ²¹. Las fases que presentaron la mayor cantidad de fluorescencia fueron seleccionadas para separar las diferentes fracciones de la sílica, empleando como solvente metanol, y sometiéndolas a agitación de 200 rpms por 12h. Finalmente, los extractos obtenidos fueron filtrados con filtros de nylon de 0,22 mm para separar las fracciones de la sílica.

b. Aislamiento y extracción de zonas con fluorescencia

Posterior al establecimiento de las zonas de acumulación de triterpenos, se realizó un aislamiento de estas secciones del tejido radicular que estaba siendo estudiado, cortando estas zonas con cuchillas quirúrgicas y almacenándolas por 24 horas a 60°C para eliminar la presencia de humedad. Estas secciones se llevaron a una proporción 1:10 de biomasa a solvente, siendo el sistema de solventes una proporción 1:1 de acetato de etilo y dicloro metano. Estos se llevaron a incubación por 72 horas en agitación a 220 rpm y temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró el extracto con filtros de nylon de 0,22 mm y se reposó en campana de extracción hasta que se eliminara la presencia de solvente.

c. Análisis espectrométrico

Los extractos a analizar, obtenidos del subíndice a y b de esta misma sección de la metodología, fueron secados con el fin de eliminar la presencia de solventes. Se resuspendieron en 1 ml de metanol grado LC-MS, con agua tipo I y ácido fórmico al 0.1%. Para el análisis de estos se usó el espectrómetro de masas Waters Acquity SQD2. A partir del extracto derivatizado obtenido de la sección 9.a se establecieron las condiciones de estudio del espectrómetro de masas para visualizar los TPAs derivatizados. Finalmente, el extracto obtenido de las zonas aisladas del tejido

radicular (E1) fue verificado por espectrometría de masas en las condiciones establecidas.

10. Obtención muestras de *C. angustifolia* con diferentes concentraciones de TPAs

Las raíces obtenidas de los tratamientos propuestos fueron procesadas como se estableció en la metodología, desde el apartado 5 hasta el 9.

a. Obtención de material vegetal en cultivo hidropónico

Se realizó un montaje hidropónico con el fin de simular condiciones de crecimiento de campo usando plántulas de *Cecropia angustifolia* cultivadas por más de 6 meses en condiciones *in vitro*. Posteriormente, estas fueron aclimatadas y llevadas al sistema. Estas se ubicaron en una casa de malla, en un montaje el cual es ilustrado en la figura 1. Para este montaje se usaron concentraciones de 4,43 g de sales y nutrientes MS (MS519) por cada litro de medio, sin adición de azúcares para mitigar la propagación de bacterias o patógenos. Pasados 30 días del montaje del sistema hidropónico se recolectaron las raíces que presentaran las condiciones establecidas en el numeral 2 de la metodología. El procesamiento de las muestras se realizó conforme a lo establecido en los numerales previos de la metodología.

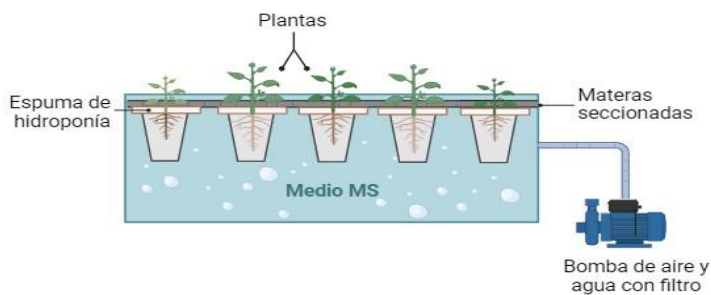


Figura 1. Esquema de montaje hidropónico

Creado en BioRender.com

b. Simulación de condiciones de estrés a partir de jasmonato de metilo

A partir de los cultivos radiculares *in vitro* de *C. angustifolia* se seleccionaron 5 cajas Petri las cuales presentaban raíces con los criterios mencionados en el numeral 2 de la metodología y con un cultivo de dimensiones mayores a 8 cm². Estos se trasladaron a un sistema de inmersión permanente con medio Achiva-2 líquido, al cual se le

agregó jasmonato de metilo a 50 μM para inducir condiciones de estrés en el cultivo, durante aproximadamente 30 días²¹. La incubación de estas se realizó en un cuarto de crecimiento a 25°C (± 2) con agitación a 200 rpm.

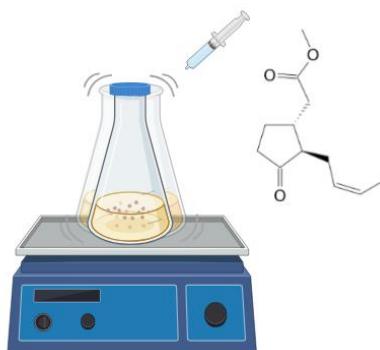


Figura 2. Esquema SIP inducido con jasmonato de metilo

Creado en BioRender.com

c. Obtención de muestras con baja presencia de TPAs

La obtención de las muestras radiculares se realizará de la misma forma como se menciona en el apartado 3, siendo este el procesamiento histológico convencional del tejido vegetal. Esto con el fin de exponer las raíces a solventes apolares, los cuales tienen afinidad con los TPAs, para que estos sean disminuidos o eliminados de las muestras, con el fin de obtener un control negativo en el proceso de derivatización y fluorescencia.

11. Análisis de las muestras procesadas y comparación de los resultados

A partir de la evaluación de los tejidos como es especificado en el numeral 6 de la metodología, se compararon los diferentes registros de fluorescencia que se obtuvieron de los diferentes tipos de muestras. Con esto se relacionaron mayores cantidades de triterpenos con una mayor intensidad de la fluorescencia. Este proceso de revisión y comparación de la intensidad de fluorescencia en las diferentes muestras llevó a una determinación de las diferencias conforme a esta señal, así como sus posibles cambios conforme a las condiciones de crecimiento del cultivo. Además, se asociaron los perfiles obtenidos de la espectrometría de masas con las zonas de fluorescencia diferencial con el fin de verificar la presencia de TPAs derivatizados.

Resultados y discusión

Procesamiento histológico convencional

El procesamiento histológico de las raíces inició con el acondicionamiento de las muestras a partir de fijación química, proceso el cual detiene los procesos celulares y evita la degradación del tejido por muerte celular. La solución empleada, AFA, es usada generalmente en histología vegetal debido a que no es específica hacia algún tejido o componente celular y es estable por lo que la solución podía ser usada a lo largo del tiempo sin presentar degradación ^{12,13}. A partir de este, se realizó la deshidratación progresiva del tejido, como fue establecido en la metodología, con el fin de mantener la integridad física de las estructuras. Además, la inclusión en terbutanol aclara el tejido y permite una difusión uniforme de la parafina en este debido a que este compuesto es un solvente orgánico afín a la matriz. En el tejido se dio un proceso de sustitución del terbutanol por la parafina, obteniendo una matriz de soporte estructural uniforme ¹³.

En el micrótopo rotatorio (Figura 3) se cortaron las muestras radiculares, en donde se obtuvieron cortes de 30 μm , esto con el fin de obtener imágenes en microscopía similares a las que se iban a obtener del proceso de corte por vibratomo. El grosor de los cortes es un factor determinante en cuanto a la facilidad de remoción de parafina y la obtención de imágenes con mejor enfoque en el microscopio. En el caso de los cortes obtenidos a 30 μm , estos presentaron más de una capa de células, dificultando la visualización de estructuras especializadas en el microscopio comparado con cortes a menores grosores, pero conservando la integridad del material y estandarizando un grosor para que se obtuviera la mayor similitud al analizar las muestras obtenidas.



Figura 3. Desarrollo de cortes en micrótopo rotatorio de tejido incluido en parafina.

Identificación morfológica a partir de tinción general de estructuras radiculares y análisis por microscopía óptica y de fluorescencia

Los procesos de tinción se han empleado para identificar y diferenciar componentes de tejido, células y microorganismos. En el campo de la histología, se han desarrollado múltiples protocolos para el tejido vegetal en específico, debido a que muchas de sus estructuras no son diferenciables a simple vista, facilitando la visualización de estos tejidos por microscopía. Para este proceso, el principal reactivo incorporado para la tinción de las muestras radiculares fue Safranina O. Este reactivo se une con la lignina presente en las paredes celulares secundarias de las raíces de las plantas confiriéndoles una coloración rosada (Figura 4). Esto se da debido a interacciones π - π que llevan a la unión de la safranina con el polímero ácido de la lignina²⁵. De esta manera se visualizan las estructuras con crecimiento secundario, como el córtex, diferenciándolas de aquellas que presentan menores concentraciones de lignina, como el haz vascular.

En conjunto con este reactivo, se usó el Fast Green, con el fin de hacer tinciones de contraste generales del tejido para diferenciar las zonas con desarrollo primario de las de secundario al teñir el citoplasma de azul. Se escogió esta como una de las técnicas de tinción para el procesamiento de las muestras radiculares con el fin de visualizar la mayor cantidad posible de tejidos. Al realizar la tinción de contraste con estos reactivos, se pudieron determinar las principales estructuras del tejido radicular, a partir de la observación por microscopio óptico.

De estas muestras se puede identificar que son raíces primarias, con estructuras como la rizodermis, el cortex, y el endodermo y el haz vascular (Figura 4).

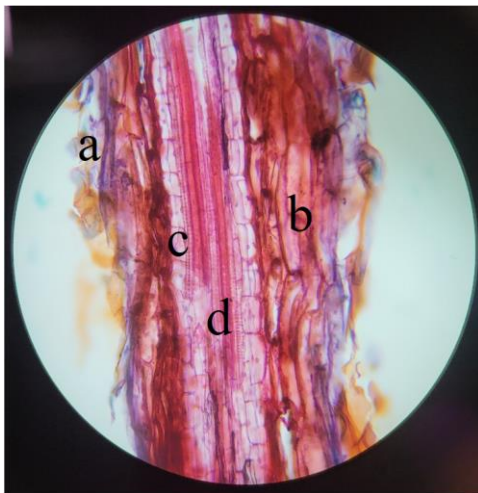


Figura 4. Raíz teñida con Safranina-Fast Green (40x).

Estructuras radiculares: **a.** rizodermis **b.** cortex **c.** endodermo **d.** haz vascular.

De igual forma, las raíces teñidas con estos reactivos fueron observadas por microscopía de fluorescencia, ya que se ha establecido que tejidos con alto contenido de lignina teñidos con safranina presentaban fluorescencia. Su longitud de onda de excitación es, aproximadamente, 488 nm, y su emisión es hasta los 570 nm²⁶. Las raíces teñidas con estos reactivos fueron analizadas con los filtros DAPI ($\lambda_{ex} = 358/\lambda_{max} = 463$) y FITC ($\lambda_{ex} = 495/\lambda_{max} = 517$). En la visualización bajo el filtro DAPI solo se pudo observar fluorescencia proveniente del endodermo, proceso relacionado con la capacidad de autofluorescencia de compuestos como la suberina, ácidos hidroxycinámicos y glicerol, los cuales presentan excitación a 355 nm y emisión a 430 nm²⁷.

En este caso, esta propiedad puede presentarse de manera más intensa debido a los procesos de fijación con reactivos como el formaldehído²⁸. La excitación de la Safranina ronda los 488 nm, y su emisión es hasta los 570 nm, por lo que al estar expuesta a longitudes de onda fuera de este rango, como en el caso del filtro DAPI, no se evidenció fluorescencia en las zonas de las raíces con altos contenidos de lignina (Figura 5B)²⁹. Por otro lado, el filtro FITC fue apto para la revisión del tejido y sus estructuras, ya que las zonas teñidas con Safranina se observaban de un color rojo anaranjado, mientras que el resto del tejido se observaba de un color amarillo. La revisión bajo este filtro fue un apoyo al proceso de análisis de

microscopía tradicional, el cual permitió visualizar el tejido y poder diferenciar sus estructuras presentes (Figura 5C).

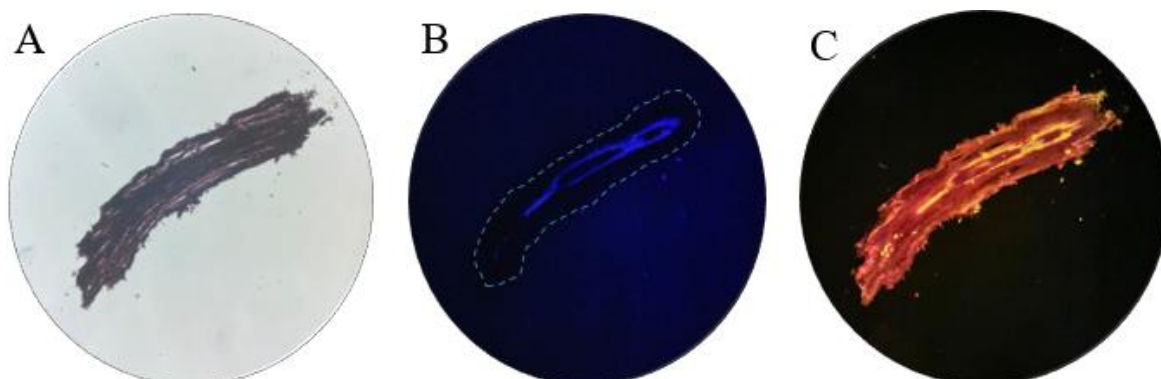


Figura 5. Raíz de *C. angustifolia* teñida con Safranina-Cristal Violeta **A.** Visualización en microscopio óptico (10x). **B.** Visualización bajo filtro DAPI (10x). **C.** Visualización bajo filtro FITC (10x).

La línea punteada indica los bordes de la raíz.

El cristal violeta es un reactivo que también presenta unión hacia la lignina y el material genético, el cual es usado en procesos de tinción de tejido vegetal para tinciones de contraste con reactivos como el Fast Green ²⁶. La tinción de cristal violeta y Fast Green se empleó con el fin de evidenciar estructuras adicionales en la revisión morfológica, pero con este proceso no se obtuvieron resultados favorables. Esto fue debido a que el cristal violeta les daba una coloración oscura a los tejidos y estos no se podían diferenciar correctamente en la revisión por microscopía. Debido a esto, se determinó la tinción con safranina y Fast Green como la más apropiada para la identificación morfológica de las estructuras del tejido, ya que proporcionaba un mejor contraste y visualización.

Realización de cortes histológicos en vibratomo

Los procesos de corte de tejido en fresco con vibratomo son de los más usados en procesos histológicos vegetales más recientes, obteniendo cortes de gran calidad para análisis por microscopía y en condiciones compatibles con gran número de tinciones. La vibración que emplea el equipo al realizar los cortes minimiza el daño del tejido, preservando las estructuras y propiedades del tejido vegetal ¹⁴. Las raíces son estructuras vegetales que pueden ser seccionadas con este método, pero al ser de poco tamaño fue necesaria su inclusión en una matriz de soporte, siendo esta cubos de agarosa al 5%. La agarosa es un polímero lineal que no presenta reacciones espontáneas, siendo una matriz estable para el soporte de las muestras.

Las raíces incluidas en este matriz fueron cortadas en inmersión en agua tipo II (Figura 6) debido a que, por la naturaleza química de los TPAs, estos no se solubilizarían. Para el panorama de este proyecto, la ausencia de reactivos apolares es favorable para mantener la mayor cantidad de TPAs presentes en el tejido. Los cortes se realizaron a un grosor de 30 μm , ya que a que a menores grosores se llegaba a comprometer la integridad del tejido. Posterior al proceso de corte, las secciones obtenidas se fijaron a los portaobjetos con una solución de gelatina al 5%, preparando de esta manera las muestras para los procesos de tinción.

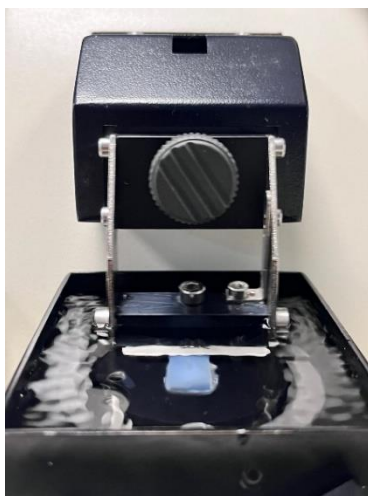


Figura 6. Desarrollo de cortes en vibratomo de muestras incluida en matriz de agarosa al 5%.

Determinación de zonas de acumulación a partir de tinción y derivatización

Con el fin de derivatizar los TPAs con bromo-cumarina, se adaptaron metodologías de derivatización de extractos al tejido completo ²⁴. Para este proceso, las 3 soluciones mencionadas en la sección 7.a de la metodología reaccionaron directamente con el tejido de los cortes radiculares. Este proceso realizó en ausencia de luz, con el fin de evitar la degradación de la BrMDMC, debido a que es un compuesto fotosensible ²¹. Las muestras derivatizadas obtenidas fueron analizadas por microscopía de fluorescencia bajo filtro DAPI debido a que la cumarina presenta emisión a 425 nm¹⁹. Se realizó una revisión morfológica de los cortes, determinando las principales estructuras radiculares, siendo estas el rizodermis, córtex radicular, endodermo y haz vascular (Figura 7A).

A partir de la revisión de las principales propiedades de las estructuras, se determinó el endodermo como el órgano radicular con mayor fluorescencia, facilitando la diferenciación

de las otras estructuras presentes. Esto es debido a su capacidad de autofluorescencia, asociada a su composición química, la cual presenta excitación en las longitudes de onda usadas por el filtro DAPI ($\lambda_{\text{ex}} = 358/\lambda_{\text{max}} = 463$)²⁷. En la revisión morfológica se evidenció la presencia de la autofluorescencia de la lignina, la cual, al no presentar tinción, se visualizaba bajo este filtro, pero de manera tenue. Con lo anterior, la observación de la autofluorescencia de las diferentes estructuras mencionadas, se revisó el tejido de las muestras teñidas con bromo-cumarina. En estas, se encontraron zonas con una acumulación diferencial de fluorescencia, siendo esta mayor que la asociada a los fenómenos de autofluorescencia previamente mencionados. Estas zonas se presentaron principalmente en el córtex radicular (Figura 7B, 7C), donde establecieron puntos de acumulación de fluorescencia que podía estar asociado a una mayor presencia de TPAs derivatizados.

El córtex radicular es un tejido asociado al soporte de la raíz y el almacenamiento de sustancias de reserva, compuesto principalmente por células de parénquima cortical, la cual puede presentar zonas especializadas para la acumulación y almacenamiento de metabolitos secundarios, como los idioplastos³⁰. Esto podría estar relacionado con el proceso de almacenamiento de sustancias de reserva y protección de las raíces, además de una posible presencia de células especializadas^{31,32}. Esto debido a que las zonas de acumulación no estaban presentes en todo el tejido, por lo que su fluorescencia podría estar relacionada a células encargadas de producir y almacenar sustancias como los TPAs, aunque la identificación de idioplastos para el género *Cecropia* no ha sido reportada. Además, la verificación estas células especializadas implicaría una revisión morfológica mucho más detallada y con cortes histológicos de menos de 30 μm .

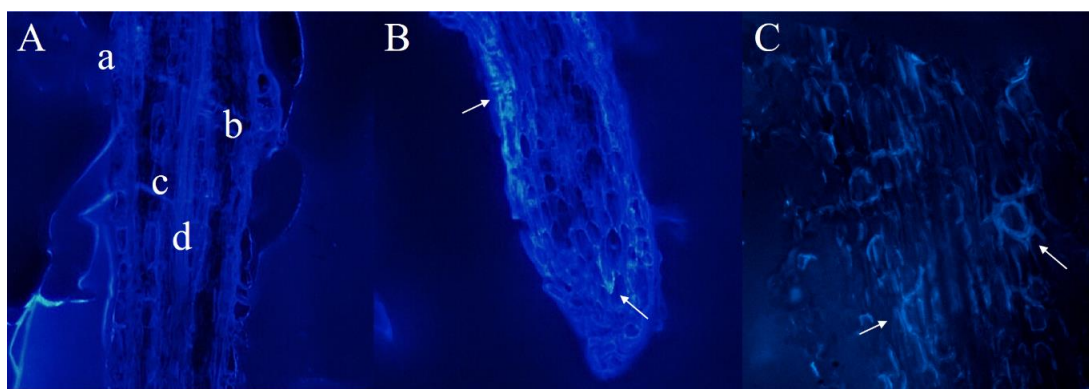


Figura 7. Raíz de *C. angustifolia* derivatizada bajo filtro DAPI. **A.** Identificación de las estructuras radiculares (10x). **B.** Visualización de zonas con fluorescencia diferencial (10x). **C.** Visualización bajo filtro FITC (10x).

Estructuras radiculares: **a.** rizodermiz **b.** córtex **c.** endodermo **d.** haz vascular.

Debido a la naturaleza química de la cumarina, sus derivados también han sido usados para la marcación de ácidos grasos³³. Es por esto que se incorporó una tinción para lípidos con Sudan III. Esta se daba con el fin de teñir los lípidos e identificar su dispersión en las muestras radiculares, haciendo un control hacia la posible derivatización de ácidos grasos y su relación con las zonas con acumulación de fluorescencia que se establecieron. Con la comparación entre el tejido teñido y el derivatizado, se podría determinar si la fluorescencia diferencial en el tejido se atribuye a la presencia de TPAs derivatizados. El sudan III es un reactivo, con tinción de color naranja, usado en histología para la marcación de ácidos grasos debido a que es un compuesto liposoluble³⁴. Este compuesto es afín a medios hidrofóbicos, presentando secciones no polares en su estructura química, y tiñe lípidos a partir de una asociación a través de las fuerzas de Van der Waals entre las secciones no polares del Sudan III y los ácidos grasos³⁵.

La revisión histoquímica usando este reactivo determinó que los lípidos se presentan de manera generalizada en el tejido del córtex radicular, por lo que se descartaría la posibilidad de que las zonas de fluorescencia diferencial estuvieran asociadas a la derivatización de ácidos grasos (Figura 8A). Además, se presentó ausencia de tinción en ciertas muestras del tejido hacia la zona del endodermo y el haz vascular, lo que se podría relacionar a una menor presencia de lípidos en estas estructuras (Figura 8B).

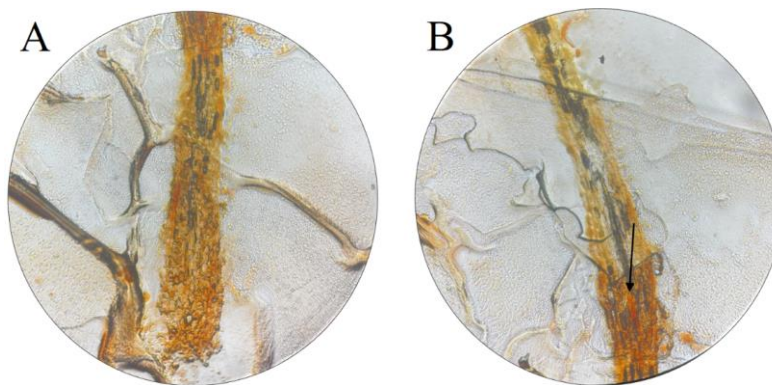


Figura 8. Raíz teñida con Sudan III. **A.** Muestra con tinción positiva a lo largo de todo el tejido (10x). **B.** Muestra con tinción positiva en la zona del córtex (10x).

Revisión del protocolo en muestras con diferentes concentraciones de TPAs

Para obtener material radicular con diferentes características, como las concentraciones de TPAs en el tejido, se desarrollaron los tratamientos previamente establecidos en el numeral

10 de la metodología. Las raíces obtenidas fueron procesadas como se estableció previamente en la metodología y, posterior a su derivatización, se visualizaron los cortes por microscopía de fluorescencia (Figura 9).

A partir del procesamiento convencional del material vegetal se obtuvieron cortes de *C. angustifolia* que presentaban una concentración reducida de TPAs presentes en el tejido. Al realizar la derivatización del tejido con cumarina, no se presenta fluorescencia además de la atribuida a la autofluorescencia del endodermo (Figura 9A) ²⁷. Esto sucede ya que los TPAs son generalmente apolares, teniendo una afinidad hacia los solventes de esta naturaleza, como es el caso del etanol y el terbutanol. Debido a la presencia de grupos hidroxilo y carboxilo en su composición química, estos son parcialmente solubles en solventes polares. Es por esto que, al exponer el tejido a diferentes fases de fijación y deshidratación con compuestos con afinidad a los TPAs, se van extrayendo los triterpenos presentes en las raíces hacia estos solventes. De esta manera, se podría determinar la poca presencia de TPAs en este tejido, funcionando como un control negativo para el proceso de análisis y revisión de los cortes derivatizados.

En el caso del cultivo hidropónico, se recolectaron muestras de las raíces de las plántulas que habían estado en estas condiciones de crecimiento por un periodo de dos semanas. Estas, posterior al proceso de derivatización, presentaron zonas de acumulación similares a las visualizadas previamente en las muestras provenientes de cultivos *in-vitro* (Figura 9C). Se presentaron zonas de acumulación, asociadas principalmente a la zona del córtex radicular. Considerando que este sistema buscaba simular condiciones de campo, donde las plántulas estarían expuestas a mayores condiciones de estrés ambiental, no se presentó un aumento en la cantidad de zonas de acumulación identificadas. Una mayor presencia de estas zonas podría indicar un mayor índice de biosíntesis de TPAs en el tejido, lo cual no pudo ser visualizado en las muestras provenientes de este sistema. Las raíces obtenidas de las plántulas de este montaje se recolectaron previo al tiempo estimado de exposición a estas condiciones, debido a que, posterior a dos semanas, las plántulas presentaron un proceso de clorosis y necrosis de su tejido. Se podría atribuir una presencia reducida de zonas de acumulación a las esperadas debido al temprano estadio de desarrollo de las plántulas.

Los cultivos hidropónicos son sistemas de crecimiento que se usan generalmente en plantas, pero que no se han usado comúnmente con especies leñosas ³⁶. *C. angustifolia* es una especie de árbol que presenta ciclos de vida perennes por lo que presentan diferentes estrategias de adaptación a las condiciones de estrés que se puedan manifestar a lo largo de su ciclo de vida ³⁷. Estos son adaptables a diferentes condiciones ambientales, pero no para medios inundados o con alta presencia de agua, lo que pudo dificultar su proceso de aclimatación a este sistema. Los individuos del cultivo hidropónico estaban expuestos a un medio líquido suplementado con nutrientes, pero este estaba en constante movimiento debido al sistema de aireación del montaje. El movimiento constante del medio se puede considerar como un factor de estrés ambiental para las plantas, siendo un factor físico de consideración para la viabilidad del cultivo hidropónico ³⁸. Adicionalmente, se considera la posible variación de las condiciones del medio de cultivo, como su pH, ya que este no fue monitoreado de manera regular.

Considerando el estadio de crecimiento en el que se encontraban las plántulas, se determinó que estas se encontraban en etapas muy tempranas del desarrollo, haciéndolas más susceptibles a las variaciones en sus condiciones de crecimiento y al estrés ambiental. La presencia de estrés mecánico podría haber sido la causa de la aparición de necrosis en las plántulas en las fases tempranas del establecimiento del cultivo hidropónico ³⁹. Además, las plántulas al provenir de condiciones de crecimiento *in-vitro* presentaban un cambio a condiciones de estrés de manera muy abrupta por lo que esto podría haber agravado el estrés inducido a las plántulas y dificultado su proceso de adaptación ⁴⁰. De esta manera, activando el proceso de muerte celular programada.

Por otra parte, el SIP con MeJa a 50 μM fue establecido con el fin de obtener muestras radiculares de *C. angustifolia* que presentaran una mayor concentración de TPAs en el tejido. El SIP o sistema de inmersión permanente es un sistema basado en sumergir el material vegetal en un medio de cultivo líquido, el cual está en constante agitación con el fin de mejorar la oxigenación del tejido y la distribución de nutrientes ⁴¹. Estos han sido previamente establecidos en otras investigaciones para explantes de tejido radicular de *C. angustifolia* de manera exitosa, determinando la concentración jasmonato de metilo a 50 μM como la concentración óptima para la inducción condiciones de crecimiento y

producción de TPAs aptas para esta especie ²¹. Para este sistema se usó el jasmonato de metilo como elicitador. Este compuesto es un derivado de la fitohormona ácido jasmónico, la cual es un compuesto relacionado al crecimiento y la respuesta de las plantas a factores de estrés. Estos compuestos activan la producción de respuestas de defensa en las plantas, llevando a un aumento en la biosíntesis de metabolitos secundarios ⁴². La producción de TPAs pudo ser observada en las muestras obtenidas del SIP a partir de la presencia de las zonas de acumulación de fluorescencia identificadas en el tejido del cortex, además de presentarse pelos radiculares, los cuales no habían sido visualizados en muestras previas (Figura 9B).

Estos últimos son extensiones de las células epidérmicas pertenecientes al rizodermis, los cuales presentan un mayor crecimiento para la captación de agua y nutrientes ⁴³. Su crecimiento es regulado por fitohormonas, como las auxinas, y factores externos, como la disponibilidad de nutrientes o factores de estrés. Considerando que el medio de cultivo de este sistema presentaba jasmonato de metilo y ácido-3-indolbutírico, siendo este una auxina sintética, se podría relacionar un crecimiento aumentado de los pelos radiculares con la presencia de estas fitohormonas ⁴⁴. Además, se visualizaron múltiples zonas de fluorescencia diferencial siendo estas más que las evidenciadas en cortes previos evaluados. Esto evidencia una mayor producción de TPAs en el tejido, que al derivatizarse resultan en una mayor cantidad de zonas de acumulación o con fluorescencia diferencial (Figura 9D).

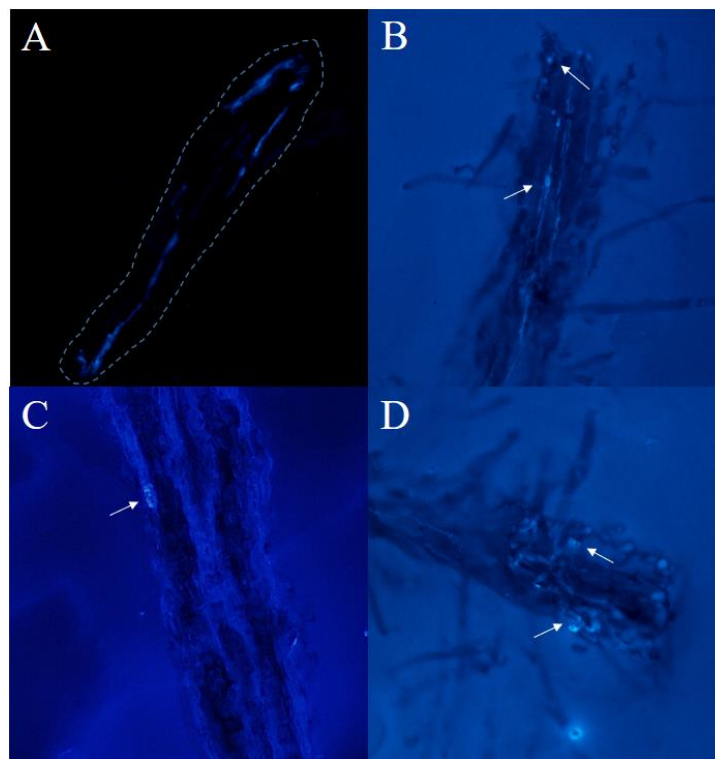


Figura 9. Visualización bajo filtro DAPI de muestras derivatizadas. **A.** Corte con menor concentración de TPAs (10x). **B.** Corte obtenido del SIP inducido con MeJa (10x). **C.** Corte obtenido de cultivo hidropónico (10x). **D.** Corte obtenido del SIP inducido con MeJa con múltiples puntos de fluorescencia diferenciada (10x).

La línea punteada indica los bordes de la raíz.

Extracción de TPAs derivatizados y análisis espectrométrico

A partir de la identificación de las posibles zonas de acumulación presentes en el tejido, se realizó una verificación por análisis espectrométrico con el fin de verificar la presencia de los picos correspondientes a las relaciones m/z de los TPAs derivatizados en las zonas establecidas. El establecimiento de las condiciones de estudio se realizó usando las fracciones obtenidas de la separación del extracto de material silvestre (Figura 10A). En este se dio la selección de las bandas con mayor fluorescencia, pero sin realizar procesos de separación adicionales a TLC. A partir de los extractos de las fracciones obtenidas, la inyección directa en el espectrómetro de masas en modo ESI+ captó una gran cantidad de compuestos. Entre los picos mayoritarios de las fracciones evaluadas, se encontraba el de 729 m/z , correspondiendo al peso de TPAs de masas 488 derivatizados (706 g/mol); este es el aducto

con sodio de estas moléculas, el cual puede estar presente en matrices biológicas (Figura 10B) ⁴⁵.

La presencia de los TPAs de masa 488 derivatizados de manera mayoritaria se da debido a que, al ser un extracto obtenido de un individuo silvestre, presenta TPAs con un mayor número de oxidaciones ⁴⁶. Los otros grupos de TPAs, como aquellos de masas 455 o 472 están presentes en estos extractos, pero su concentración es minoritaria por lo que no se pueden visualizar en el espectro obtenido. En el espectro de masas se presentan compuestos variados, lo cual se relaciona con el modo de ionización positiva, donde se presentan picos mayoritarios como 701 m/z, el cual no se asocia a los TPAs o su derivatización (Figura 10B). Estos han sido visualizados en espectros de masas de TPAs derivatizados de investigaciones previas, donde se ha asociado la presencia de compuestos no identificados a la solvólisis de la bromo-cumarina y el grado de pureza del extracto y los reactivos ^{24,47}.

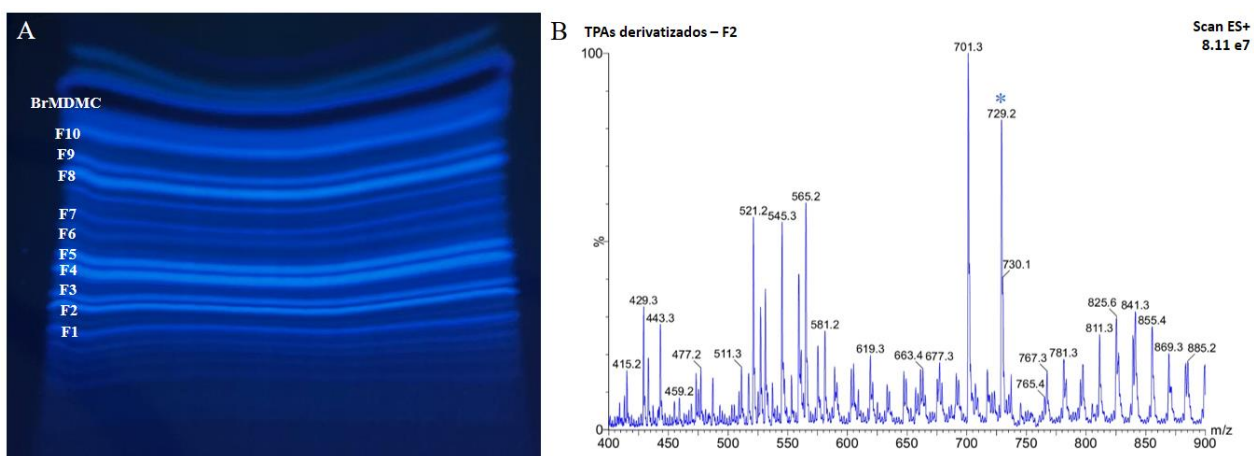


Figura 10. Análisis de TPAs derivatizados con cumarina. **A.** Fracciones seleccionadas de TLC preparativa de extracto silvestre. **B.** Espectro de masas de la F2 en modo ES+. Señalado se encuentra el aducto de sodio de los TPAs derivatizados de masa 706.

A partir de las condiciones establecidas para el espectrómetro de masas para moléculas de TPAs derivatizadas, se realizó la verificación de los extractos obtenidos de las zonas aisladas de las muestras de tejido radicular. En estas se consideraron los diferentes tratamientos establecidos, buscando evidenciar, en los espectros de masas, las relaciones m/z correspondientes para los diferentes TPAs que podían presentarse en las muestras. Estos son los grupos de TPAs que presentan masas nominales de 455, 472 y 488, los cuales al ser derivatizados presentaban pesos de 673, 690 y 706, respectivamente. Estas muestras no estuvieron sujetas a ningún proceso de cromatografía, por lo que se pudieron visualizar gran

variedad de moléculas. La gran mayoría de picos presentes en los espectros no correspondían a nuestras moléculas de interés, pero se podía relacionar con la presencia de otros metabolitos en el tejido radicular que presentaran afinidad con el sistema de solventes usados. Los espectros de masas obtenidos para las relaciones m/z menores a 705 presentaron 2 de las moléculas que se buscaban visualizar, siendo una de estas la ionización de los TPAs derivatizados de masa 690 (691 m/z), y la otra el aducto de sodio de los TPAs derivatizados de masa 673 (696 m/z) (Figura 11). La presencia de estos picos indica que la fluorescencia diferencial evidenciada en las revisiones por microscopía está relacionada con la presencia de los TPAs derivatizados. Los espectros de masas obtenidos indicaban la presencia de los TPAs derivatizados de masas 455 y 472. El primero de estos está relacionado con los precursores de la biosíntesis de TPAs, mientras que el segundo corresponde a compuestos como el ácido hederagénico o el ácido 20-hidroxi-ursólico⁴⁸.

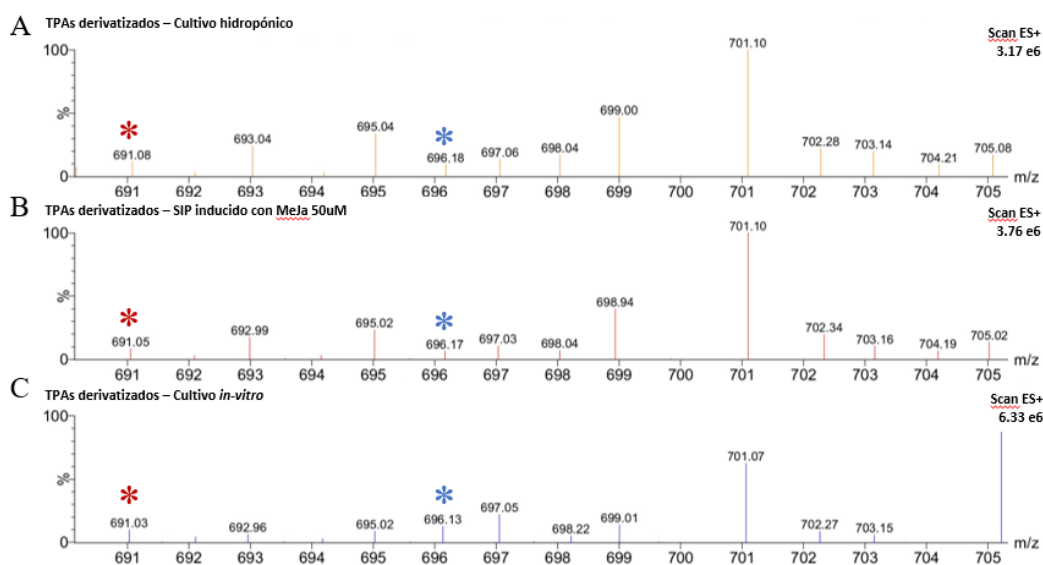


Figura 11. Espectro de masas de TPAs derivatizados con relaciones m/z entre 690 y 705 en modo ES+. **A.** Muestra obtenida de cultivo hidropónico. **B.** Muestra obtenida de SIP inducido con MeJa. **C.** Muestra obtenida de cultivo *in-vitro*.

En rojo, se presenta la relación m/z de la ionización de los TPAs derivatizados de masa 690. En azul, se presenta la relación m/z del aducto de sodio de los TPAs derivatizados de masa 673.

También se revisó el espectro de masa de los compuestos que presentaban relaciones m/z superiores a 700. En esta, se visualizaron picos correspondientes a los aductos de sodio de los TPAs derivatizados de masa 706 (729 m/z), así como el de los TPAs derivatizados de masa 690 (713 m/z) (Figura 12). Estos primeros estuvieron presentes en las 3 muestras analizadas, mientras que los de 729 m/z no pudieron ser visualizados en el espectro de masas para la muestra de cultivo *in-vitro*. Esto se da debido a que los TPAs de masa 488 necesitan

pasar por un proceso oxidativo generado por el estrés sobre el tejido, causado por las condiciones de crecimiento ⁴⁸. Las condiciones *in-vitro* buscan minimizar los procesos de estrés sobre los cultivos, por lo que este grupo de TPAs fue el que tuvo una presencia minoritaria, por lo que no pudieron ser captados de manera significativa por el espectrómetro. A partir de estos resultados, se puede afirmar que en las zonas de fluorescencia diferencial si se presentan TPAs derivatizados, atribuyendo su presencia a la aparición de zonas de acumulación en el tejido.

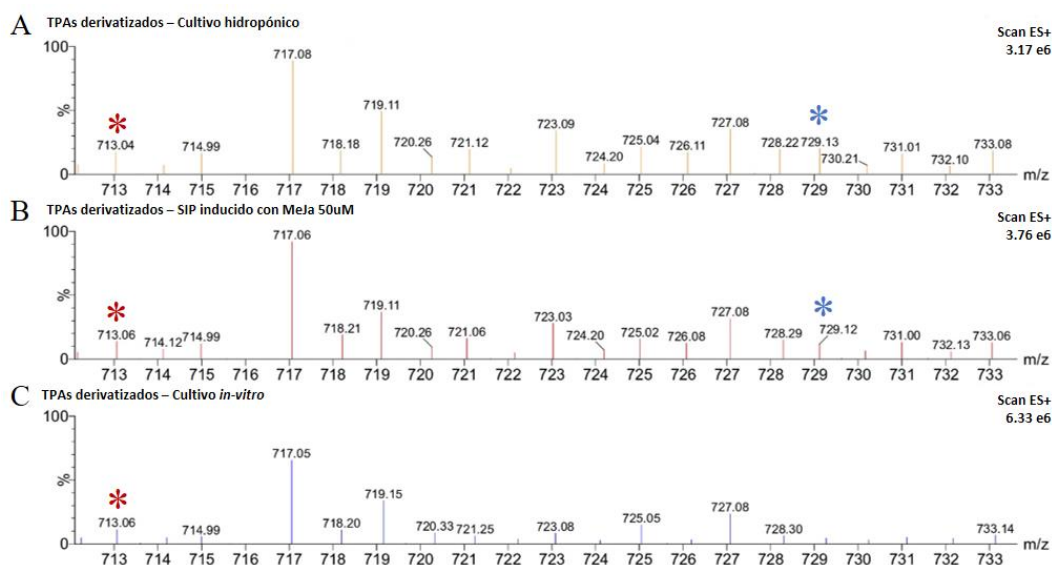


Figura 12. Espectros de masas de TPAs derivatizados con relaciones m/z entre 713 y 733 en modo ES+. **A.** Muestra obtenida de cultivo hidropónico. **B.** Muestra obtenida de SIP inducido con MeJa. **C.** Muestra obtenida de cultivo *in-vitro*.

En rojo, se presenta la relación m/z del aducto de sodio de los TPAs derivatizados de masa 690. En azul, se presenta la relación m/z del aducto de sodio de los TPAs derivatizados de masa 706.

Conclusiones

Se logró establecer un protocolo que combinaba la histología vegetal con técnicas analíticas para el estudio de las raíces de *C. angustifolia*. Este fue exitoso en el proceso de identificación morfológica de las estructuras radiculares, derivatización de TPAs, determinación de las zonas de fluorescencia diferencial y verificación de estas por espectrometría de masas y tinciones comparativas con sudan III. Esta metodología pudo ser implementada en muestras radiculares de *C. angustifolia* sujetas a diferentes tratamientos, demostrando que este es replicable en raíces a diferentes condiciones de crecimiento. A partir de la identificación morfológica, se comprobó que la tinción con Safranina-Fast Green presentaba los mejores

resultados para la visualización del tejido y brindaba la posibilidad del análisis por microscopía óptica y de fluorescencia.

Por otra parte, se determinó que para la especie *C. angustifolia* se da una acumulación de TPAs en el tejido del córtex radicular en zonas puntuales. Las condiciones establecidas para el espectrómetro de masas fueron adecuadas para el análisis de TPAs derivatizados, obteniendo resultados positivos de la presencia de estas moléculas en la verificación de las zonas de acumulación visualizadas. Se obtuvieron espectros de masas acordes a la presencia de TPAs derivatizados esperados, más no se pudo visualizar la relación m/z 706 en las muestras de cultivo *in-vitro* debido a su presencia minoritaria, siendo esto correspondiente a su fundamento biológico.

Se recomienda extender las pruebas del proceso de corte de muestras radiculares con vibratomo, con el fin de poder obtener muestras de menor grosor, cercanas a 20 μm , con el fin de presentar menos capas celulares y facilitar la visualización del tejido por microscopía. Además, se considera un posterior análisis morfológico de las zonas de fluorescencia diferencial con muestras de menores grosores, pudiendo visualizar estructuras más específicas y de menor tamaño en el tejido. Esto con el fin de determinar si las zonas de acumulación se pueden relacionar con la presencia de idioplastos en las raíces de *C. angustifolia*. Finalmente, se propone la variación de las condiciones establecidas para el cultivo hidropónico con el fin de obtener condiciones aptas para el crecimiento a mediano plazo de plantas de esta especie. Se demostró la utilidad de la combinación de técnicas histológicas y analíticas en la obtención de resultados óptimos en el proceso de determinación de la ubicación de TPAs en el tejido radicular de *C. angustifolia*.

Agradecimientos

Me siento profundamente agradecida con un vital grupo de personas, las cuales apoyaron mi proceso y me acompañaron en el proceso del desarrollo de mi trabajo de grado. En primer lugar, agradezco a mis padres, los cuales me brindaron la oportunidad de tener una formación académica universitaria, por su constante apoyo y aliento en esta etapa académica. También agradezco a mi hermana, Danna Sofía Muñoz, por darme su apoyo y ser una de las principales

fuentes de motivación en mi proceso de formación universitaria. Destaco la labor de mi tutor, Juan Esteban Vivas, el cual me brindó su paciencia, apoyo y enseñanza en este proyecto. Él me brindó guía y valiosas enseñanzas, que enriquecieron mi formación, no solo como profesional, sino también como persona. Extiendo mi agradecimiento a mi co-tutor Guillermo Montoya, el cual me abrió las puertas de su grupo de investigación, confió en mí y me brindó un proyecto, el cual desarrollo mis habilidades en investigación, y me retó a aprender cada día más. También agradezco a Isabela Ramírez, por sus valiosas enseñanzas, y por ser la pionera del enfoque histológico de este proyecto. Finalmente, agradezco a Paula Andrea de la Cruz y Andrea Carolina Chamorro, así como a los miembros del grupo de investigación, por ser quienes me brindaron su compañía, ayuda y aliento, me motivaron cada día a seguir intentándolo, y con quienes compartí un proceso lleno de cariño y aprendizaje.

Referencias bibliográficas

1. Fazili, M. A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U. & Geelani, S. N. In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bull Natl Res Cent* **46**, (2022).
2. Motolinía-alcántara, E. A., Castillo-araiza, C. O., Rodríguez-monroy, M., Román-guerrero, A. & Cruz-sosa, F. Engineering Considerations to Produce Bioactive Compounds from Plant Cell Suspension Culture in Bioreactors. *Plants* **2021**, Vol. 10, Page 2762 **10**, 2762 (2021).
3. Thomford, N. E. *et al.* Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
4. Rosselli, P. F. & Berg, C. C. Distributional patterns of cecropia (Cecropiaceae): a panbiogeographic analysis. *Caldasia* **19**, 285–296 (1997).
5. Raz, L. & Agudelo Zamora, H. *Catálogo de Plantas y Líquenes de Colombia*. vol. 1.1 (Universidad Nacional de Colombia, 2020).
6. Haruna, N. H. *et al.* Immunomodulatory effects and structure-activity relationship of botanical pentacyclic triterpenes: A review. *Chinese Herbal Medicines (CHM)* **12**, (2020).

7. Costa, G. M., Schenkel, E. P. & Reginatto, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Nat Prod Commun* **6**, 913–920 (2011).
8. Ortiz, O. O., Rivera-Mondragón, A., Pieters, L., Foubert, K. & Caballero-George, C. *Cecropia telenitida* Cuatrec. (Urticaceae: Cecropieae): Phytochemical diversity, chemophenetic implications and new records from Central America. *Biochem Syst Ecol* **86**, (2019).
9. Mosquera, C., Panay, A. J. & Montoya, G. Pentacyclic Triterpenes from *Cecropia telenitida* Can Function as Inhibitors of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 1444 **23**, 1444 (2018).
10. Xu, C., Wang, B., Pu, Y., Tao, J. & Zhang, T. Techniques for the analysis of pentacyclic triterpenoids in medicinal plants. *J Sep Sci* **41**, 6–19 (2018).
11. El Babili, F., Rey-Rigaud, G., Rozon, H. & Halova-Lajoie, B. State of knowledge: Histolocalisation in phytochemical study of medicinal plants. *Fitoterapia* **150**, 104862 (2021).
12. Ruzin, S. E. Plant microtechnique and microscopy. *Ann Bot* **86**, 708–708 (2000).
13. Suárez, S., Di Palma, M. A., Cardozo, P. & Travaglia, C. Técnicas de histología vegetal: Un abordaje para su utilización en microscopía óptica. **1**, 1–109 (2022).
14. Leroux, O. Vibratome Sectioning of Plant Materials for (Immuno)cytochemical Staining. *Methods in Molecular Biology* **2149**, 339–350 (2020).
15. Falcioni, R., Moriwaki, T., Furlanetto, R. H., Nanni, M. R. & Antunes, W. C. Simple, Fast and Efficient Methods for Analysing the Structural, Ultrastructural and Cellular Components of the Cell Wall. *Plants (Basel)* **11**, (2022).
16. Dey, P. Fluorescence Microscope, Confocal Microscope and Other Advanced Microscopes: Basic Principles and Applications in Pathology. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology* 289–301 (2022) doi:10.1007/978-981-19-6616-3_27.
17. Paës, G. Fluorescent Probes for Exploring Plant Cell Wall Deconstruction: A Review. *Molecules* 2014, Vol. 19, Pages 9380-9402 **19**, 9380–9402 (2014).
18. Li, M. *et al.* Rhodamine B-based fluorescent probes for molecular mechanism study of the anti-influenza activity of pentacyclic triterpenes. *Eur J Med Chem* **205**, (2020).

19. Rodrigues, C. E., Tonial, M., Schäfer, L., Pasquali, G. & Kist, T. B. L. Performance of 3-[4-(bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarin as a derivatization reagent for the analysis of medium and long chain fatty acids using HPLC with LIF detection. *Journal of Chromatography B* **1100–1101**, 50–57 (2018).
20. Toyo'oka, T. Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography. *Anal Chim Acta* **465**, 111–130 (2002).
21. Vasquez-Delgado, J. S., Vivas-Moncayo, J. E., Lopez-Cortes, J. V., Combariza, M. Y. & Montoya, G. Pharmacokinetic assessment and phytochemical triterpene control from *Cecropia angustifolia* using plant biotechnology. *Phytochemical Analysis* **34**, 641–651 (2023).
22. Ramirez Ortiz, I. Caracterización histológica de raíces in vitro de *Cecropia angustifolia*. (Universidad Icesi, 2023).
23. Staining Procedures Used by Biological Stain Commission. *Postgrad Med J* **37**, 798–798 (1961).
24. Perdomo Castillo, E. A. & Salazar Ibarguen, V. E. Estandarización de una metodología analítica que permita valorar la producción de triterpenos pentacíclicos ácidos en matrices vegetales. (Universidad Icesi, 2021).
25. Stockert, J. C., Canete, M. & Colman, O. D. Histochemical mechanism for the orthochromatic staining and fluorescence reaction of lignified tissues. *Cell Mol Biol* **30**, 503–508 (1984).
26. Bond, J., Donaldson, L., Hill, S. & Hitchcock, K. Safranin fluorescent staining of wood cell walls. *Biotechnic & Histochemistry* **83**, 161–171 (2008).
27. Donaldson, L. Autofluorescence in Plants. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 2393 **25**, 2393 (2020).
28. Pegg, T. J., Gladish, D. K. & Baker, R. L. Algae to angiosperms: Autofluorescence for rapid visualization of plant anatomy among diverse taxa. *Appl Plant Sci* **9**, (2021).
29. Baldacci-Cresp, F. *et al.* A rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell wall lignification. *The Plant Journal* **102**, 1074–1089 (2020).

30. Crang, R., Lyons-Sobaski, S. & Wise, R. Parenchyma, Collenchyma, and Sclerenchyma. *Plant Anatomy* 181–213 (2018) doi:10.1007/978-3-319-77315-5_6.
31. Yao, L. *et al.* Subcellular compartmentalization in the biosynthesis and engineering of plant natural products. *Biotechnol Adv* **69**, 108258 (2023).
32. Nakata, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* **164**, 901–909 (2003).
33. Yoshihara, T. *et al.* Visualization of Lipid Droplets in Living Cells and Fatty Livers of Mice Based on the Fluorescence of π -Extended Coumarin Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Anal Chem* **92**, 4996–5003 (2020).
34. Patel, R., Dadida, C., Sarker, K. & Sen, D. SUDAN DYES AS LIPID SOLUBLE ARYL-AZO NAPHTHOLS FOR MICROBIAL STAINING. (2015).
35. Hunter, C. A. van der Waals interactions in non-polar liquids. *Chem Sci* **4**, 834–848 (2013).
36. Nirmal, D., Teraiya, S. & Joshi, P. Liquid Culture System: An Efficient Approach for Sustainable Micropropagation. *Current Agriculture Research Journal* **11**, 28–42 (2023).
37. Chelli-Chaabouni, A. Mechanisms and Adaptation of Plants to Environmental Stress: A Case of Woody Species. *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment* **1**, 1–24 (2014).
38. Okamoto, T., Takatani, S., Motose, H., Iida, H. & Takahashi, T. The root growth reduction in response to mechanical stress involves ethylene-mediated microtubule reorganization and transmembrane receptor-mediated signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell Rep* **40**, 575–582 (2021).
39. Brenya, E. *et al.* Mechanical stress acclimation in plants: Linking hormones and somatic memory to thigmomorphogenesis. *Plant Cell Environ* **45**, 989–1010 (2022).
40. Yadav, N. *et al.* Impacts on Plant Growth and Development Under Stress. *Plant Stress Mitigators: Action and Application* 61–100 (2022) doi:10.1007/978-981-16-7759-5_4.
41. George, E. F., Hall, M. A. & Klerk, G. J. De. Plant propagation by tissue culture 3rd edition. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* **1**, 423–465 (2008).

42. Misra, R. C., Maiti, P., Chanotiya, C. S., Shanker, K. & Ghosh, S. Methyl Jasmonate-Elicited Transcriptional Responses and Pentacyclic Triterpene Biosynthesis in Sweet Basil. *Plant Physiol* **164**, 1028 (2014).
43. Peña, E. M. B., Bucio, J. L., Rodríguez, L. I. M. & Cortés, C. N. M. Regulación genética y fisiológica del desarrollo de los pelos radiculares. *Ciencia Nicolaita* 62–83 (2015) doi:10.35830/CN.VI66.225.
44. Crang, R., Lyons-Sobaski, S. & Wise, R. Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants. *Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants* 319–339 (2018) doi:10.1007/978-3-319-77315-5/COVER.
45. Stricker, T., Bonner, R., Lisacek, F. & Hopfgartner, G. Adduct annotation in liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry to enhance compound identification. *Anal Bioanal Chem* **413**, 503–517 (2021).
46. Vasquez Delgado, S. Análisis metabólico comparativo de extractos de Cecropia sp. de material vegetal y cultivos in vitro con potencial uso en salud humana. (Universidad Icesi, 2022).
47. Ertel, K. D. & Carstensen, J. T. Quantitative determination of octanoic acid by high-performance liquid chromatography following derivatization with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin. *J Chromatogr A* **411**, 297–304 (1987).
48. Gutiérrez, G. *et al.* Pentacyclic Triterpene Profile and Its Biosynthetic Pathway in *Cecropia telenitida* as a Prospective Dietary Supplement. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 1064 **26**, 1064 (2021).