

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Descripción de <i>Bixa orellana</i> L.	3
2.1.1. Clasificación	3
2.1.2. Sinonímias	3
2.1.3. Características morfológicas	4
2.1.4. Variedades	4
2.1.5. Agronomía	5
2.1.6. Distribución	5
2.1.7. Plagas y enfermedades	6
2.1.8. Características de producción	6
2.1.9. Características de la semilla en el mercado	6
2.1.10. Usos	7
2.2. Análisis químico de la semilla	8
2.2.1. Bixina	8
2.3. Carotenoides	9
2.3.1. Definiciones	9
2.3.2. Estructura y clasificación	10
2.3.3. Propiedades físicas	11
2.3.4. Biosíntesis	11
2.3.5. Funciones	12
2.3.6. Procedimiento general y precauciones para la manipulación de los carotenoides	12
2.4. Extracción, preparación y producción del pigmento (Bixina)	14
2.4.1. Producción del pigmento crudo	15
2.4.2. Producción del pigmento para los alimentos	15
2.4.3. Colorantes alimenticios y su regulación en el mercado	16
2.5. Cultivo de tejidos	17
2.5.1. Reguladores del crecimiento vegetal	17
2.5.1.1. Auxinas	18
2.5.1.2. Citocininas	19

2.5.1.3. Etileno	20
2.5.1.4. Giberelinas	20
2.5.1.5. Ácido abscísico	21
2.5.2. Cultivo de raíces	21
2.5.2.1. Nutrición	21
2.5.2.2. Requerimientos de reguladores de crecimiento	22
2.5.2.3. Aplicaciones	22
2.5.3. Cultivo de células en suspensión	22
2.5.3.1. Factores que ejercen influencia en el establecimiento de los cultivos de células y tejidos <i>in vitro</i>	23
2.5.3.2. Tipos de sistemas de cultivo en suspensión	24
2.5.3.3. Establecimiento y desarrollo del cultivo	24
3. OBJETIVOS	25
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	26
5. MATERIALES	27
5.1. Reactivos	27
5.2. Material biológico	27
5.3. Material de vidrio	27
6. METODOLOGIA	28
6.1. Soluciones concentradas para la preparación de los medios de cultivo	28
6.2. Preparación de los medios de cultivo	28
6.3. Asepsia del material	29
6.4. Germinación de las semillas	29
6.5. Cuantificación de carotenoides totales y bixina en semillas de las variedades India, Peruana y Jamaiquina de <i>Bixa orellana</i> L. y en explantes de raíz, tallo y hojas de la variedad India	29

6.6 Separación de pigmentos por cromatografía en capa fina	30
6.7. Inducción del cultivo raíces normales de la variedad India de <i>Bixa orellana</i> L.	31
6.7.1. Evaluación del efecto de la velocidad de agitación	32
6.7.2. Resiembra	32
6.7.3. Incubación	32
6.7.4. Caracterización del crecimiento	32
6.7.4.1. Curva de crecimiento	33
6.8. Inducción de callos a partir de hojas de obtenidas en condiciones asépticas de la variedad India de <i>Bixa orellana</i> L.	34
6.8.1. Incubación del material sembrado en el medio sólido	34
6.8.2. Obtención de callos friables	34
6.8.3. Inducción de células en suspensión a partir de callos	35
6.8.4. Resiembra de las células en suspensión	35
6.8.5. Incubación de los medios con las células en suspensión	35
6.8.6. Caracterización del crecimiento del cultivo en suspensión	35
6.8.6.1 Curva de crecimiento de las células en suspensión	36
6.8.6.1.1. Tratamiento de choque osmótico (sacarosa al 10%)	36
6.8.6.1.2. Tratamiento con sales inorgánicas (CuSO_4 y MgSO_4)	37
7. RESULTADOS Y DISCUSION	38
7.1. Germinación de las semillas de tres variedades India, Peruana y Jamaiquina) de <i>Bixa orellana</i> L.	38
7.1.1. Cuantificación de carotenoides totales y bixina en las semillas	38

7.2. Germinación de las semillas de la variedad India de <i>Bixa orellana</i> L.	40
7.2.1. Cuantificación de carotenoides totales y bixina en explantes de raíces, tallos y hojas	40
7.2.2. Inducción de cultivos de raíces normales a partir de raíces de plántulas obtenidas en condiciones asépticas	41
7.2.2.1. Efecto de las diferentes concentraciones de auxinas	41
7.2.2.2. Efecto de la velocidad de incubación	41
7.2.2.3. Mantenimiento	43
7.2.2.4. Caracterización del crecimiento	43
7.2.2.4.1. Contenido de carotenoides totales y bixina	44
7.2.3. Inducción de callos a partir de hojas de plántulas obtenidas en condiciones asépticas	44
7.2.3.1. Obtención de callos friables	45
7.2.3.1.1. Inducción de células en suspensión a partir de callos de hoja	45
7.2.3.1.1.1. Mantenimiento de las células en suspensión	45
7.2.3.2. Caracterización del crecimiento del cultivo en suspensión	45
7.2.3.2.1. Contenido de carotenoides totales y bixina	48
7.2.3.2.2. Efecto del choque osmótico con sacarosa al 10%	50
7.2.3.2.3. Efecto de las sales inorgánicas (CuSO_4 y MgSO_4)	50
7.3. Separación de los pigmentos obtenidos de semillas, explantes y cultivos de raíces normales y células en suspensión por cromatografía en capa fina	51

8. CONCLUSIONES	54
Apéndice I	56
Apéndice II	62
9. BIBLIOGRAFIA	69

RESUMEN

El achiote (*Bixa orellana*) L. es un árbol productor de semillas, las cuales contienen pigmentos carotenoides (2-3%) en la región superficial (arilo) en forma de fino polvo con carácter resinoide. Está constituido por la orellina (pigmento amarillo) y la bixina (pigmento rojo). Este último, es el principal pigmento presente en la semilla, el cual representa el 80% del pigmento total. Este pigmento presenta una gran demanda en la industria alimenticia.

En éste trabajo se presentan los resultados obtenidos en el establecimiento de cultivos de raíces normales en medio líquido utilizando como regulador de crecimiento ANA y en el cultivo de células en suspensión a partir de callos de hojas de la variedad India de *B. orellana*, en el medio PC utilizando ANA y 6-BAP como reguladores de crecimiento en condiciones de luz continua.

En forma adicional, se cuantificó por el método espectrofotométrico el contenido de carotenoides totales (C.T.) y bixina (B) en las semillas de las variedades India, Peruana y Jamaiquina de *Bixa orellana* L. y en los explantes de raíces, tallos y hojas de plántulas obtenidas bajo condiciones asépticas de la variedad India, así como el contenido de C.T y B. de los cultivos obtenidos a partir de esta variedad. También se determinó el sistema de disolventes más adecuado para la separación de los pigmentos obtenidos de los extractos de semillas, explantes y cultivos por cromatografía en capa fina.