

Evaluación de la aplicación de melatonina como bioestimulante en plantas de copoazú  
(*Theobroma grandiflorum*)

Gabby Alexandra Quintana Luna

Trabajo de Grado para Optar el Título de Químico

Director

Dr. William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en química

Codirector

Dra. Yuly Andrea Prada Vargas

Doctora en química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2026

**Dedicatoria**

*A Dios,*

*quien me ha acompañado en cada etapa de este camino, dándome fortaleza, paciencia y perseverancia en los momentos más difíciles, y guiándome con su amor para no perder el rumbo y continuar hasta alcanzar este logro.*

*A mi madre, Sandra Luna,*

*por ser el pilar fundamental de mi vida, por sus esfuerzos incansables, su amor incondicional y su apoyo constante, que hicieron posible que hoy pueda cumplir esta meta.*

*A mi primo, Alexander Reyes Luna,*

*por su amor, su compañía y su confianza en mí, por estar presente a lo largo de este proceso y hacerme sentir acompañada en cada paso de este camino.*

### **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco a mi director, William Hidalgo, por brindarme la oportunidad de hacer parte de este macroproyecto, así como por su valiosa orientación, disposición y compromiso durante el desarrollo de este trabajo de grado. Su conocimiento y apoyo fueron fundamentales para la realización de esta investigación.

Asimismo, expreso mi agradecimiento al grupo de investigación CODEIM por facilitar los recursos y el espacio necesarios para el desarrollo de este estudio, y a la Universidad Industrial de Santander por brindarme una formación integral y de calidad, junto con las herramientas necesarias para crecer tanto a nivel personal como profesional.

De igual manera, agradezco a mis compañeros de laboratorio por su compañerismo y apoyo constante a lo largo de este proceso. En especial, a Yuliany Guillín, con quien trabajé de la mano en el desarrollo de este proyecto; su colaboración, compromiso y conocimientos fueron esenciales en este camino.

Finalmente, agradezco a mi madre, a mi primo y a todas las personas que, de una u otra forma, me brindaron su apoyo, confianza y motivación en los momentos más difíciles, permitiéndome mantenerme firme hacia la ejecución de este objetivo. A mis hermanos, quienes han sido mi mayor motor, les debo la fuerza para no rendirme y continuar hasta alcanzar esta meta.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN .....	18
1. OBJETIVOS .....	20
1.1 Objetivo General .....	20
1.2 Objetivos Específicos.....	20
2. MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 Bioestimulante .....	21
2.2 Melatonina .....	21
2.2.1 Melatonina en plantas .....	22
2.2.2 Biosíntesis y metabolismo en plantas .....	23
2.2.3 La Melatonina frente al estrés abiótico .....	25
2.2.3.1 Efecto sobre temperatura elevada .....	26
2.2.3.2 Efecto sobre la alta intensidad de luz.....	26
2.2.3.3 Efecto sobre el estrés hídrico .....	27
2.2.3.4 Efecto sobre el estrés salino.....	27
2.2.3.5 Efecto sobre el estrés por radiación UV .....	27
2.3 Copoazú .....	28
2.3.1 Taxonomía .....	28
2.3.2 Origen y distribución geográfica .....	28
2.3.3 Morfología .....	29
2.3.4 Floración y fructificación.....	30
2.3.5 Composición del fruto.....	31

2.3.6 Condiciones de temperatura, precipitación y suelo .....	32
2.3.7 Fertilización y nutrición.....	32
2.3.8 Usos y valor agregado (pulpa y semillas).....	33
2.4 Métodos de extracción química .....	33
2.4.1 Extracción sólido-líquido.....	33
2.4.1.1 Extracción asistida por ultrasonido.....	34
2.5 Técnicas de análisis instrumental.....	34
2.5.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	35
2.5.2 Cromatografía .....	36
2.5.2.1 Cromatografía líquida.....	36
2.5.3 Espectrometría de masas.....	37
2.6 Figuras de mérito analíticas .....	38
2.6.1 Linealidad .....	38
2.6.2 Límite de detección (LOD).....	38
2.6.3 Límite de cuantificación (LOQ).....	38
2.6.4 Sensibilidad.....	39
2.6.5 Robustez.....	39
2.6.6 Precisión interdía .....	39
2.6.7 Precisión intradía .....	40
3. ANTECEDENTES .....	40
4. METODOLOGÍA.....	47
4.1 Material biológico: Plantas de copoazú .....	47
4.1.1 Germinación de semillas.....	47

4.2 Aplicación de tratamientos en plántulas de copoazú .....	47
4.2.1 Aplicación de melatonina exógena .....	47
4.3 Evaluación de parámetros morfológicos.....	50
4.4 Evaluación de parámetros bioquímicos .....	51
4.4.1 Determinación de clorofila y carotenoides .....	51
4.4.2 Determinación de fenoles y flavonoides totales .....	52
4.4.3 Determinación de carbohidratos totales en hojas y raíces .....	55
4.4.4 Determinación de proteínas .....	57
4.5 Identificación de melatonina en extractos de hojas y raíces de plantas de copoazú.....	58
4.6 Método analítico por UPLC-QDa para la determinación de melatonina.....	59
4.6.1 Curva de calibración y rango lineal .....	60
4.6.2 Determinación del límite de detección, del límite de cuantificación y de la sensibilidad del método analítico.....	60
4.6.3 Reproducibilidad interdía.....	60
4.6.4. Precisión intradía .....	60
4.6.5. Evaluación del efecto matriz.....	61
4.6.6. Determinación del porcentaje de recuperación en la extracción y exactitud.....	61
4.7 Análisis estadístico.....	62
5. RESULTADOS.....	63
5.1 Análisis fisicoquímico de sustrato inicial .....	63
5.2 Resultados de la evaluación de parámetros morfológicos .....	63
5.2.1 Parámetros morfológicos para aplicación vía aspersion .....	64
5.2.2 Parámetros morfológicos para aplicación vía drench .....	64

5.2.3 Parámetros morfológicos para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar ...	66
Evaluación de parámetros bioquímicos .....	73
5.3 Contenido de clorofilas a, b y total y carotenoides totales .....	73
5.3.1 Contenido de clorofila y carotenoides para aplicación vía aspersión .....	73
5.3.2 Contenido de clorofila y carotenoides para aplicación vía drench .....	73
5.3.3 Contenido de clorofila y carotenoides para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar .....	74
5.4 Contenido de fenoles totales .....	76
5.4.1 Contenido de fenoles totales para aplicación vía aspersión .....	77
5.4.2 Contenido de fenoles totales para aplicación vía drench .....	77
5.4.3 Contenido de fenoles totales para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar .....	78
5.5 Contenido de flavonoides totales .....	80
5.5.1 Contenido de flavonoides para aplicación vía aspersión .....	80
5.5.2 Contenido de flavonoides para aplicación vía drench .....	81
5.5.3 Contenido de flavonoides totales para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar .....	82
5.6 Contenido de carbohidratos totales .....	84
5.6.1 Contenido de carbohidratos totales para aplicación vía aspersión .....	84
5.6.2 Contenido de carbohidratos totales para aplicación vía drench .....	85
5.6.3 Contenido de carbohidratos totales para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar .....	86
5.7 Contenido de proteínas solubles totales .....	89

5.7.1 Resultados de proteínas solubles totales para aplicación vía aspersión.....	89
5.7.2 Resultados de proteínas solubles totales para aplicación vía drench.....	89
5.7.3 Resultados de proteínas solubles totales para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar .....	90
5.8 Redes de correlación.....	92
5.8.1 Redes de correlación para aplicación vía aspersión.....	92
5.8.2 Redes de correlación para aplicación vía drench.....	93
5.8.3 Redes de correlación para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar.....	94
5.9 Método analítico por UPLC-QDa para la determinación de melatonina.....	96
5.9.1 Curva de calibración y rango lineal .....	96
5.9.2 Determinación del límite de detección, del límite de cuantificación y de la sensibilidad del método analítico.....	98
5.9.3 Reproducibilidad interdía.....	99
5.9.4. Precisión intradía .....	99
5.9.5. Estabilidad cromatográfica .....	99
5.9.6. Evaluación del efecto matriz.....	99
5.9.7. Determinación del porcentaje de recuperación en la extracción y exactitud.....	100
5.9 Contenido de melatonina endógena .....	101
5.9.1 Resultados de melatonina endógena para aplicación vía aspersión, vía drench y para plantas adaptadas a luz solar .....	101
6. DISCUSIÓN .....	102
7. CONCLUSIONES .....	133
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

APÉNDICES..... 159

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b> Factores y niveles del diseño experimental 1 (48 plantas). .....	48
<b>Tabla 2</b> Factores y niveles del diseño experimental 2 (24 plantas). .....	49
<b>Tabla 3</b> Análisis fisicoquímico de sustrato de suelo inicial .....	63
<b>Tabla 4</b> Curva de calibración de melatonina comercial en metanol al 80% .....	96
<b>Tabla 5</b> Determinación del porcentaje de recuperación en la extracción y exactitud.....	100
<b>Tabla 6</b> Cuantificación de melatonina en experimento de adaptación lumínica con aspersión.	102

### Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Estructura química de la melatonina. ....	21
<b>Figura 2</b> Esquema de la ruta de biosíntesis de la melatonina. ....	24
<b>Figura 3</b> Distribución geográfica del cultivo de copoazú ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ). ....	29
<b>Figura 4</b> Plántulas de copoazú ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ) en condiciones de vivero .....	30
<b>Figura 5</b> Fruto de copoazú ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ). ....	31
<b>Figura 6</b> Mapa de calor de parámetros morfológicos de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión. ....	65
<b>Figura 7</b> Redes de correlación de parámetros morfológicos para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión y drench .....	66
<b>Figura 8</b> Diámetro basal y volumen de la raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión..	67
<b>Figura 9</b> Mapa de calor de parámetros morfológicos medidos de forma temporal de copoazú tratadas con melatonina en plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión. ....	68
<b>Figura 10</b> Biomasa seca de tallos, hojas y raíces para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión .....	69
<b>Figura 11</b> Plántulas de <i>Theobroma grandiflorum</i> (copoazú) a condiciones de invernadero y expuestas a radiación solar directa durante un mes .....	71
<b>Figura 12</b> Tallos y raíz de plántulas de <i>Theobroma grandiflorum</i> a condiciones de invernadero y expuestas a radiación solar directa durante un mes .....	72

<b>Figura 13</b> Contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersion .....	75
<b>Figura 14</b> Contenido de fenoles totales en hojas y raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersion .....	79
<b>Figura 15</b> Contenido de flavonoides totales en hojas y raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersion.....	83
<b>Figura 16</b> Contenido de carbohidratos totales en hojas y raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersion.....	87
<b>Figura 17</b> Contenido de proteínas solubles en hojas y raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersion .....	91
<b>Figura 18</b> Redes de correlación para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion .....	93
<b>Figura 19</b> Redes de correlación para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía drench	94
<b>Figura 20</b> Redes de correlación para plántulas de copoazú en experimento de adaptación lumínica en condiciones de sombra tratadas con melatonina vía aspersion .....	95
<b>Figura 21</b> Redes de correlación para plántulas de copoazú estresadas en experimento de adaptación lumínica en tratadas con melatonina vía aspersion .....	95

**Lista de Apéndices**

<b>Apéndice A</b> Diseño experimental 1 para la aplicación de melatonina por drench y aspersion a plántulas de copoazú.....	159
<b>Apéndice B</b> <i>Diseño experimental 2 para la aplicación de melatonina a plántulas de copoazú expuestas a condiciones de estrés lumínico.....</i>	159
<b>Apéndice C</b> <i>Cromatogramas obtenidos por UPLC-MS en modo SIR (ES+) para la detección de melatonina (MET).....</i>	160
<b>Apéndice D</b> <i>Tallos y raíces de plántulas de copoazú tratadas con melatonina (50, 250 y 500 <math>\mu</math>M) vía aspersion.....</i>	161
<b>Apéndice E</b> <i>Mapa de calor de parámetros morfológicos medidos cada 15 días en plántulas de copoazú tratadas con melatonina (50, 250 y 500 <math>\mu</math>M) vía aspersion.....</i>	162
<b>Apéndice F</b> <i>Tallos y raíces de plántulas de copoazú tratadas con melatonina (50, 250 y 500 <math>\mu</math>M) vía drench.....</i>	162
<b>Apéndice G</b> <i>Mapa de calor de parámetros morfológicos medidos cada 15 días en plántulas de copoazú tratadas con melatonina (50, 250 y 500 <math>\mu</math>M) vía drench.....</i>	163
<b>Apéndice H</b> <i>Plántulas de copoazú con al inicio del experimento de adaptación lumínica con dos meses de crecimiento.....</i>	164
<b>Apéndice I</b> <i>Tallos y raíces de plántulas de copoazú pretratadas con melatonina (500 <math>\mu</math>M) vía aspersion y expuestas durante un mes a adaptación lumínica.....</i>	165
<b>Apéndice J</b> <i>Contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica vía aspersion.....</i>	166

<b>Apéndice K</b> <i>Contenido de fenoles totales para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica .....</i>	167
<b>Apéndice L</b> <i>Contenido de flavonoides totales para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica .....</i>	168
<b>Apéndice M</b> <i>Contenido de carbohidratos totales para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica .....</i>	169
<b>Apéndice N</b> <i>Contenido de proteínas solubles totales para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica.....</i>	169
<b>Apéndice O</b> <i>Curva de calibración de melatonina en metanol al 80% en el rango de 2–40 ng/mL .....</i>	170
<b>Apéndice P</b> <i>Resultados significativos de las pruebas ANOVA y Kruskal–Wallis para parámetros morfológicos de plantas de copoazú sometidas a diferentes tratamientos.....</i>	171
<b>Apéndice Q</b> <i>Resultados significativos de las pruebas ANOVA para clorofila a, b y total de plantas de copoazú en experimento de adaptación lumínica .....</i>	172
<b>Apéndice R</b> <i>Resultados significativos del análisis ART ANOVA para el contenido de fenoles totales y flavonoides totales bajo estrés por adaptación lumínica .....</i>	172
<b>Apéndice S</b> <i>Resultados significativos del ANOVA mixto para el contenido de flavonoides totales en los tratamientos de aspersión y drench.....</i>	173
<b>Apéndice T</b> <i>Resultados significativos del análisis ART ANOVA para el contenido de carbohidratos totales en los tratamientos de aspersión y drench .....</i>	174
<b>Apéndice U</b> <i>Resultados significativos del ANOVA mixto para el contenido de carbohidratos totales bajo estrés por adaptación lumínica.....</i>	175

**Apéndice V** *Resultados significativos del ANOVA mixto para el contenido de proteínas totales en el tratamiento de aspersión* ..... 175

**Apéndice W** *Resultados significativos del análisis ART ANOVA para el contenido de proteínas totales bajo condiciones de estrés por adaptación lumínica y aplicación de drench* ..... 176

## Resumen

**Título:** Evaluación de la aplicación de melatonina como bioestimulante en plantas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*)\*

**Autor:** Gabby Alexandra Quintana Luna\*\*

**Palabras Clave:** Bioestimulante, Melatonina, Adaptación lumínica, Copoazú

**Descripción:** El sector agrícola enfrenta actualmente desafíos asociados a factores de estrés abiótico que limitan el crecimiento y la productividad de los cultivos, por lo que la búsqueda de alternativas sostenibles como los bioestimulantes ha sido un tema de interés para la ciencia. En este contexto, la melatonina se ha destacado por ser una molécula pleiotrópica con un papel importante como regulador del crecimiento y modulador de respuestas fisiológicas y bioquímicas en plantas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de melatonina sobre el desarrollo fisiológico de plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*). Para esto, se emplearon plántulas de dos meses de crecimiento, las cuales fueron tratadas con diferentes concentraciones de melatonina (50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ) mediante aspersion foliar y drench, bajo condiciones controladas de invernadero y de adaptación lumínica. Posterior al tratamiento, se evaluaron parámetros morfológicos como diámetro de tallo y raíz, área foliar, volumen de raíz, biomasa seca y parámetros bioquímicos como clorofilas, carotenoides, carbohidratos, fenoles, flavonoides y proteínas. Los resultados evidenciaron que, en condiciones controladas, la melatonina mostró efectos dependientes de la concentración y la vía de aplicación. La aspersion foliar incrementó significativamente el diámetro basal, los flavonoides en raíces y las proteínas solubles en raíz a concentraciones específicas. La aplicación vía drench presentó una respuesta más generalizada, con aumentos en variables morfológicas, clorofilas, flavonoides y proteínas. No obstante, los efectos fueron moderados en ausencia de estrés. Bajo condiciones de estrés, las plantas tratadas con melatonina presentaron incrementos significativos en biomasa seca, diámetro basal, compuestos fenólicos y proteínas solubles en raíz, además de mostrar tendencias positivas en carbohidratos y pigmentos fotosintéticos. En conclusión, la melatonina mostró potencial como bioestimulante en plántulas de copoazú, especialmente bajo estrés, contribuyendo con estrategias agrícolas más sostenibles.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Doctor en Química. Codirector: Yuly Andrea Prada Vargas. Doctora en Química.

### Abstract

**Title:** Evaluation of the application of melatonin as a biostimulant in cupuaçu plants (*Theobroma grandiflorum*)\*

**Author:** Gabby Alexandra Quintana Luna\*\*

**Key Words:** Biostimulant, Melatonin, Light adaptation, Cupuaçu

**Description:** The agricultural sector currently faces challenges associated with abiotic stress factors that limit crop growth and productivity, making the search for sustainable alternatives such as biostimulants a topic of interest for science. In this context, melatonin has stood out as a pleiotropic molecule with an important role as a growth regulator and modulator of physiological and biochemical responses in plants. The objective of this study was to evaluate the effect of melatonin application on the physiological development of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) seedlings. Two-month-old seedlings were treated with different concentrations of melatonin (50, 250, and 500  $\mu\text{M}$ ) via foliar spraying and soaking under controlled greenhouse and light adaptation conditions. Following treatment, morphological parameters such as stem and root diameter, leaf area, root volume, and dry biomass, as well as biochemical parameters such as chlorophylls, carotenoids, carbohydrates, phenols, flavonoids, and proteins, were evaluated. The results showed that, under controlled conditions, melatonin exhibited effects dependent on concentration and application route. Foliar spraying significantly increased basal diameter, root flavonoids, and root-soluble proteins at specific concentrations. Drench application showed a more generalized response, with increases in morphological variables, chlorophylls, flavonoids, and proteins. However, the effects were moderate in the absence of stress. Under stress conditions, plants treated with melatonin showed significant increases in dry biomass, basal diameter, phenolic compounds, and root-soluble proteins, in addition to positive trends in carbohydrates and photosynthetic pigments. In conclusion, melatonin showed potential as a biostimulant in cupuaçu seedlings, especially under stress, contributing to more sustainable agricultural strategies.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Sciences. School of Chemistry. Advisor: William Fernando Hidalgo Bucheli, PhD in Chemistry. Co-advisor: Yuly Andrea Prada Vargas, PhD in Chemistry.

## Introducción

Colombia es un país con alto potencial agrícola debido a la diversidad de climas, suelos y ecosistemas, representando unos de los sectores más importantes de la economía del país, al contribuir con aproximadamente entre el 6 % y 7 % del Producto Interno Bruto (PIB) y generar una fuente significativa de empleo y sustento para las poblaciones rurales. Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), la actividad económica que más ha contribuido recientemente a la dinámica del PIB ha sido la agricultura, ganadería, caza, silvicultura y pesca (Lau et al., 2011; DANE, 2025). Sin embargo, el sector agrícola enfrenta múltiples desafíos asociados a condiciones ambientales variables, como la radiación solar, la temperatura, la disponibilidad hídrica y el desbalance de nutrientes. Estos factores actúan como estresores abióticos que afectan los procesos fisiológicos de las plantas, como la fotosíntesis, la germinación y el crecimiento radicular, repercutiendo en el rendimiento y la productividad de los cultivos (Mandal et al., 2023).

El uso excesivo de fertilizantes y pesticidas sintéticos ha sido una práctica frecuente para mejorar el rendimiento agrícola, generando consecuencias ambientales como la contaminación del suelo y agua, acumulación de metales pesados y pérdida de biodiversidad, además, ocasiona enfermedades en los agricultores y consumidores (González, 2019). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se prevé que la demanda mundial de fertilizantes sintéticos se duplique en los próximos años, generando un panorama desalentador para la conservación de la biodiversidad (Arias et al., 2024).

Por lo anterior, surge la necesidad de encontrar estrategias biotecnológicas sostenibles que permitan incrementar la productividad de los cultivos, reducir el impacto ambiental e incrementar la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés abiótico. En este contexto,

los bioestimulantes naturales surgen como una alternativa eficaz que promueve prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente, al inducir respuestas fisiológicas y bioquímicas que favorecen el crecimiento vegetal, la actividad fotosintética y la síntesis de metabolitos protectores (Du Jardin, 2015).

Entre estos compuestos, la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) una indolamina natural, ha despertado gran interés por su acción multifuncional en la regulación del crecimiento, desarrollo y defensa vegetal. Se ha demostrado que al ser una molécula señalizadora pleiotrópica participa en la germinación, formación de raíces, mejora la eficiencia fotosintética, la actividad enzimática y la resistencia frente a estrés de tipo ambiental (Arnao & Hernández, 2019; Yang et al., 2023). En estudios recientes, se ha reportado que su aplicación ha incrementado el rendimiento de los cultivos hasta en un 20% bajo estrés ambiental y se han mostrado mejoras significativas en la tasa fotosintética de 44, 42 y 48 % bajo condiciones de sequía, salinidad o bajas temperaturas, respectivamente (Mannino et al., 2021).

El potencial de la melatonina como bioestimulante abre la posibilidad de mejorar el desempeño fisiológico, bioquímico y productivo de especies tropicales de interés agrícola, sobre todo aquellas que son más propensas a sufrir los daños debido a las variaciones ambientales y especialmente las que presentan alta sensibilidad a condiciones lumínicas. En este sentido, se considera fundamental explorar su efecto en plantas de ciclo largo, exóticas y con gran importancia para el país, cuyo crecimiento puede verse limitado por la temperatura y exposición a la luz, así como ocurre en diversos cultivos amazónicos de importancia regional, como lo es el *Theobroma grandiflorum* (copoazú), cultivo amazónico de gran relevancia económica y social por sus múltiples usos en las industrias cosmética, alimentaria y chocolatera (Estación Experimental Agraria, S. R. I., 2008).

El presente proyecto evaluó la aplicación de melatonina en plántulas de copoazú, analizando sus efectos morfológicos y bioquímicos bajo diferentes modos de aplicación y condiciones de crecimiento. Se compararon plantas en condiciones normales con aquellas sometidas a adaptación a la luz, considerada un tipo de estrés para este cultivo umbrófilo. El objetivo fue generar conocimiento científico orientado a mejorar el crecimiento y la respuesta al estrés abiótico de este cultivo, contribuyendo a la sostenibilidad del sector agrícola amazónico.

## **1. Objetivos**

### **1.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de la melatonina exógena como posible bioestimulante en plantas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) para determinar la respuesta morfológica y bioquímica de las plantas frente a diferentes tratamientos (concentraciones de melatonina, modos de aplicación y adaptación lumínica).

### **1.2 Objetivos Específicos**

- \* Evaluar el efecto de la melatonina exógena mediante aplicación vía drench y aspersión foliar, sobre el desarrollo morfológico y bioquímico de plántulas de copoazú bajo condiciones controladas de invernadero.
- \* Determinar el efecto de la aplicación de melatonina sobre el desarrollo morfológico y bioquímico en plántulas de copoazú bajo condiciones de adaptación a luz solar.
- \* Identificar y cuantificar el contenido de melatonina en hojas y raíces de plántulas de copoazú expuestas a los diferentes tratamientos.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Bioestimulante

El Consejo Europeo de la Industria de Bioestimulantes (EBIC) dio una definición amplia de los bioestimulantes (Calvo et al., 2014): Los bioestimulantes vegetales contienen sustancias y/o microorganismos cuya función, cuando se aplican a las plantas o la rizosfera, es estimular los procesos naturales para mejorar/beneficiar la absorción de nutrientes, la eficiencia de los nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad de los cultivos.

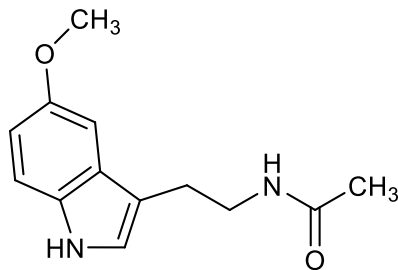
Más recientemente, el nuevo Reglamento (UE) 2019/1009 (Rouphael y Colla, 2020) los ha definido de la siguiente manera: un bioestimulante vegetal será un producto fertilizante cuya función sea estimular los procesos de nutrición vegetal independientemente del contenido de nutrientes del producto con el único objetivo de mejorar una o más de las siguientes características de la planta o de la rizosfera vegetal: i) eficiencia en el uso de nutrientes, ii) tolerancia al estrés abiótico, iii) rasgos de calidad, o iv) disponibilidad de nutrientes confinados en el suelo o la rizosfera (UE, 2019).

### 2.2 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) fue descubierta en 1958 y es una indolamina derivada del triptófano de bajo peso molecular (Figura 1). Esta molécula se encuentra presente en humanos, animales, plantas, hongos, bacterias (Rodríguez, 2021) y es de carácter anfipático, es decir, cuenta con una parte hidrofóbica y otra hidrofílica, por lo cual le permite atravesar con gran facilidad las membranas biológicas y disolverse en soluciones lipofílicas (González, 2000).

#### Figura 1

*Estructura química de la melatonina.*



*Nota.* Elaborada por el autor

### **2.2.1 Melatonina en plantas**

La melatonina en las plantas tiene como función principal, la regulación de los procesos de crecimiento como la germinación de semillas, el crecimiento de la planta, la fotosíntesis y la maduración del fruto. Además, se ha observado que la melatonina actúa como protector y antioxidante en situaciones de estrés tanto biótico como abiótico evitando el daño progresivo en las plantas (Rodríguez, 2021).

Hacia finales de la década de 1970, se descubrió que la melatonina era un subproducto en la descafeinización de los granos de café, lo que supuso el primer indicio de que las plantas o los productos derivados del café contenían esta molécula (Rodríguez, 2020). Años más tarde, en 1995, la presencia de melatonina en plantas vasculares fue confirmada por dos investigaciones de Dubbels et al. y Hattori et al., quienes de forma independiente y con distintas técnicas, detectaron la presencia de esta indolamina en diversas plantas como tabaco, arroz y maíz, entre otras (Dubbels et al., 1995; Hattori et al., 1995). Años después, Murch et al. (1997) encontraron concentraciones elevadas de melatonina (microgramos por gramo) en hierbas medicinales (*Tanacetum parthenium*, *Hypericum perforatum*), sugiriendo un rol fotoprotector (Murch et al., 2000). Debido a que en estudios posteriores se encontraron niveles de melatonina más altos en plantas bajo estrés abiótico (frío, calor, sequía, contaminación) (Tan et al., 2002), se dedujo por

primera vez su función como un mecanismo de defensa primario ante condiciones ambientales adversos, una idea confirmada en estudios posteriores (Murch et al., 2009; Tan et al., 2010a).

La melatonina en plantas superiores, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, puede ser encontrada en varios tejidos, incluyendo hojas, tallos, raíces, frutos y semillas, con concentraciones de picogramos a microgramos por gramo de tejido, no obstante, con grandes diferencias entre especies y entre variedades de la misma planta, e incluso entre sus diferentes órganos en una misma planta (Reiter y Tan, 2002, Martínez, et al., 2024).

### ***2.2.2 Biosíntesis y metabolismo en plantas***

La ruta de síntesis de la melatonina se conoce bien en los vertebrados, esta síntesis comienza con la transformación del aminoácido L-triptófano por medio de la enzima triptófano-5-hidroxilasa, obteniéndose 5-hidroxi-triptófano, este compuesto se convierte en serotonina, donde se genera una descarboxilación por la acción de la enzima aminoácido aromático descarboxilasa. Se sabe que la serotonina es el precursor directo de la melatonina, a partir de este viene una acetilación por una arilalquilamina N-acetiltransferasa, la cual añade un grupo acetilo, para formar N-acetilserotonina. Seguido a esto, se da el último paso de síntesis, ocurriendo una metilación por la hidroxiindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT), para generar la melatonina (Falcón et al, 2009).

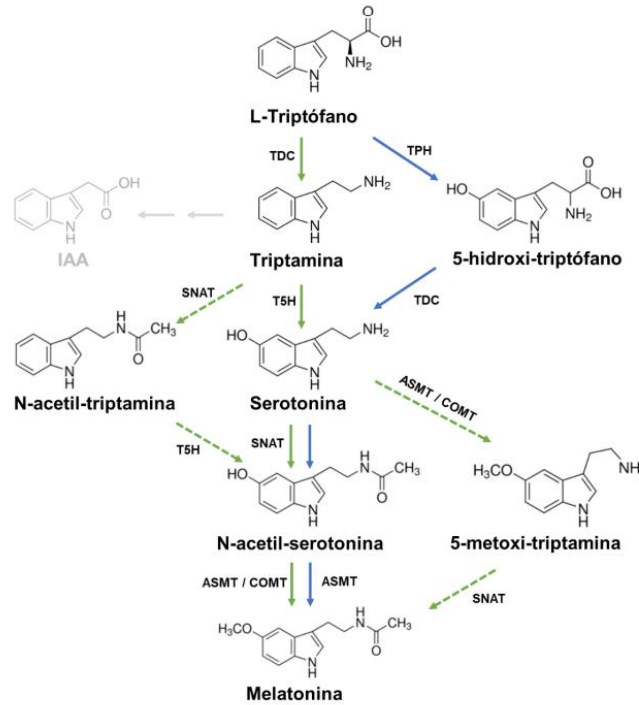
Debido a que la biosíntesis de la melatonina vegetal no es bien conocida como la de los animales, se han sugerido diversas vías que se podrían dar para que esta biosíntesis ocurra (Figura 2). La presencia de HIOMT y los niveles elevados de serotonina en tejidos vegetales han sugerido una posible conservación parcial del mecanismo biosintético observado en vertebrados (Tan et al., 2012).

Una de las principales vías descritas inicia con la descarboxilación del L-triptófano a triptamina, catalizada por la L-triptófano descarboxilasa (TDC) en el citoplasma. La triptamina es posteriormente hidroxilada por la triptamina-5-hidroxilasa (T5H), generando serotonina. En etapas posteriores, la serotonina es acetilada a N-acetilserotonina por la serotonina N-acetiltransferasa (SNAT), proceso que ocurre principalmente en cloroplastos, y finalmente metilada por la N-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT) en el citoplasma, produciendo melatonina (Xie et al., 2022).

Además, se han propuesto rutas alternativas en las que el L-triptófano puede ser hidroxilado o donde la triptamina actúa como intermediario en la formación de otros compuestos, como la 5-metoxitriptamina, cuyo papel aún no está completamente definido (Verde Rodríguez, 2021). De la misma manera, la triptamina puede presentar otra ruta, en donde este se oxida para dar indol-3-acetaldehído, siendo el precursor del ácido-3-indolacético (AIA). Esta fitohormona es una auxina vital para el desarrollo y crecimiento en las plantas. Dado que el triptófano puede ser el precursor de la melatonina y, a la vez, el ácido-3-indolacético, puede sugerir que estas dos moléculas se complementan o incluso se solapan en sus funciones, teniendo papeles fisiológicos similares en plantas (Verde Rodríguez, A., 2021).

## **Figura 2**

*Esquema de la ruta de biosíntesis de la melatonina.*



*Nota.* En el eje del centro (señal verde) se presenta el proceso más usual de síntesis llevado a cabo en plantas, mientras que las señales punteadas laterales indican las rutas alternativas en plantas para la síntesis de esta indolamina. Las señales de color azul apuntan la vía de síntesis de melatonina en vertebrados. TDC: Triptófano descarboxilasa; TPH: L-triptófano hidroxilasa; T5H: Triptamina 5-hidroxilasa; SNAT: Serotonina N-acetiltransferasa; ASMT: Acetil serotonina metiltransferasa; COMT: ácido cafeico o-metil-transferasa. Tomado de Verde Rodríguez, A. (2021).

### 2.2.3 La Melatonina frente al estrés abiótico

En los años recientes, la melatonina debido a su papel como modulador del estrés oxidativo ha generado gran impacto en el ámbito de fisiología vegetal, debido a que esta interviene activamente en los mecanismos de defensa frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), particularmente aquellas formadas como subproductos de la fotosíntesis o del metabolismo celular. Así mismo, la melatonina tiene funciones bioestimulantes en las plantas

que se encuentran bajo estrés bióticos y abióticos, ya que causan *(i)* la acumulación de azúcares solubles y niveles de prolina, *(ii)* modulación de actividad de diversas enzimas antioxidantes encargadas de eliminar radicales libres y *(iii)* la regulación positiva de genes que se encuentran asociados a la tolerancia al estrés (Reiter et al., 2015).

Estudios realizados recientemente, han propuesto que la aplicación exógena de la melatonina podría mejorar la eficiencia fotosintética, además de proporcionar una menor degradación de clorofila e incrementar la actividad de la enzima RuBisCO y aumentar la materia seca y el área foliar en las plantas, esto en condiciones de estrés. Aunque no se tenga exactitud con respecto a los mecanismos moleculares que explican su acción sobre la fotosíntesis, la melatonina se posiciona como una molécula de interés estratégico en el desarrollo de cultivos más productivos (Ren et al., 2019).

#### **2.2.3.1 Efecto sobre temperatura elevada**

El estrés térmico debido a la exposición al calor extremo, representa una amenaza importante para muchos procesos celulares, donde la fotosíntesis se encuentra bastante afectada, interfiere en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La aplicación de la melatonina exógena surge como una estrategia beneficiosa, ya que ha demostrado que promueve la biosíntesis de metabolitos secundario como fenoles y flavonoides. Estos compuestos actúan amortiguando el impacto térmico y protegiendo la integridad de las células vegetales (Altaf et al., 2022).

#### **2.2.3.2 Efecto sobre la alta intensidad de luz**

El exceso de luz puede generar fotoinhibición y daño oxidativo, en *Aradiposis thaliana*, la melatonina al ser distribuida por vía foliar logró una mejor tasa fotosintética neta, además de aumentar los carotenoides y la clorofila, así como una disminución de ROS (Yang et al., 2021).

Todos estos resultados están asociados a una preservación mejorada de las membranas celulares y los pigmentos fotosintéticos (Ksas et al., 2015).

### **2.2.3.3 Efecto sobre el estrés hídrico**

El estrés hídrico es uno de los tipos de estrés abióticos que más amenaza representa en el crecimiento, supervivencia y producción de las plantas. Debido a esta condición de estrés, las plantas muestran respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares adaptativas en modo de supervivencia, un componente en este proceso es la melatonina. La aplicación de melatonina mejora parámetros importantes como apertura estomática y la eficiencia del aparato fotosintético, además de reducir la degradación de pigmentos esenciales como la clorofila, esto cuando las plantas están sometidas al estrés hídrico (Liang et al., 2019, Karaca et al., 2019).

### **2.2.3.4 Efecto sobre el estrés salino**

La abundancia de sales en el medio varía el equilibrio osmótico de las células y perjudica procesos esenciales como la fotosíntesis. En este caso, la melatonina puede contrarrestar los efectos negativos al actuar sobre la maquinaria antioxidante y sobre la estabilidad de los pigmentos fotosintéticos, beneficiando la funcionalidad fisiológica hasta en condiciones de estrés iónico severo (Karumannil et al., 2023).

### **2.2.3.5 Efecto sobre el estrés por radiación UV**

La emisión de rayos ultravioleta-B sobre los cultivos, presenta un desafío enorme para la agricultura, ya que la exposición a este tipo de radiación puede dañar la fisiología vegetal, destruyendo estructuras celulares y aminorando la eficiencia fotosintética. Varios estudios mostraron que el uso de la melatonina ha logrado combatir los efectos negativos del UV-B, disminuyendo el daño en membranas foliares, mejorando la apertura estomática y restaurando niveles óptimos de clorofila, además, también se ha observado un incremento de los niveles

endógenos de la melatonina tras la aplicación exógena de esta, lo que propone un mecanismo de retroalimentación protectora (Wei et al., 2019).

### **2.3 Copoazú**

El copoazú (*Theobroma grandiflorum*) es una planta de carácter umbrófilo, lo que hace posible su explotación en sistemas de policultivo, en una variedad de combinaciones con especies anuales, semi-perennes y perennes, lo que proporciona mayor eficiencia en el uso del suelo y a su vez, permitiendo al productor mejorar su economía e ingresos durante el periodo de crecimiento vegetativo de la especie principal y, entre cosechas, derivados de los productos del cultivo de sombra o asociado. El copoazú es usado con más intensidad como componente de sistemas agroforestales, que buscan simular condiciones semejantes a las del bosque del trópico húmedo, en donde la diversidad ayudará a la reducción de la incidencia de plagas y enfermedades, mejorará el aprovechamiento de la radiación solar, del agua y de los nutrientes (OTCA, 2016).

#### **2.3.1 Taxonomía**

El copoazú (*Theobroma grandiflorum*) pertenece al género *Theobroma* (*Malvaceae*, subfamilia *Byttnerioideae*), el cual comprende varias decenas de especies tropicales (Colli-Silva et al., 2024). Su domesticación y cultivo comercial comenzaron en la década de 1970, siendo la pulpa su producto principal en la industria alimentaria, y las semillas la fuente del “cupulate”, un sustituto del chocolate (OTCA, 2016 y Jean-Marie et al., 2022)

#### **2.3.2 Origen y distribución geográfica**

El género *Theobroma* es de origen neotropical y se encuentra distribuido en los bosques tropicales húmedos del hemisferio occidental (Jean-Marie et al., 2022). La especie *T. grandiflorum* es originaria de la Amazonía brasileña, principalmente de los estados de Pará y

Maranhão, también, se encuentran ubicados en Perú y, se han ido introduciendo en los trópicos húmedos de Colombia, Costa Rica, Ecuador, Perú y Venezuela. Llegó a Colombia a través del río Putumayo desde Manaus en la década de 1970 (Figura 3) (Velásquez-Vasconez et al., 2025). Presenta una baja densidad poblacional en su hábitat natural, con menos de 143 individuos por hectárea, esto coincide con el patrón de muchas especies arbóreas amazónicas (OTCA, 2016).

### Figura 3

*Distribución geográfica del cultivo de copoazú (*Theobroma grandiflorum*).*



*Nota.* Elaborada por el autor y adaptada de Jean-Marie et al., 2022.

#### 2.3.3 Morfología

El árbol de copoazú alcanza una altura de 15–20 m en estado silvestre con ramificación tricotómica. Sin embargo, en plantaciones agroforestales llega a una altura promedio de 10,5 m a los 4 años en determinados ecotipos de copoazú, lo que indica el efecto del manejo agronómico sobre su morfología (Barrera et al., 2023). Su tronco es recto y tiene 25–30 cm de diámetro, es de corteza marrón oscuro, madera de baja densidad sin un valor comercial, posee raíz pivotante profunda (~2 m) y, raíces secundarias abundantes y superficiales que pueden llegar a medir hasta ~6 m (OTCA, 2016). En la Figura 4, se muestra plántulas de copoazú en bolsas de vivero y bajo

condiciones de invernadero, donde se evidencia su crecimiento después de dos meses de germinadas.

Las hojas son simples, alternas, elípticas, de aproximadamente 30–35 cm de largo; las flores son hermafroditas, actinomorfas, agrupadas de 3 a 5 en inflorescencias axilares, con sépalos carnosos y pétalos rojizos (OTCA, 2016).

#### **Figura 4**

*Plántulas de copoazú (Theobroma grandiflorum) en condiciones de vivero*



*Nota.* Elaborada por el autor

#### **2.3.4 Floración y fructificación**

La floración se da principalmente entre los meses de junio a diciembre, con un pico en agosto, coincidiendo con época menos lluviosa (OTCA, 2016). A pesar de la abundancia floral, enfrenta desafíos de fertilidad y por tanto la tasa de fructificación es muy baja (0,16% a 1,08%) debido a limitaciones en la polinización (Jean-Marie et al., 2022). La fructificación ocurre entre diciembre y abril, en la época de lluvias, y su duración puede extenderse hasta siete meses dependiendo del régimen de precipitaciones. Los polinizadores efectivos incluyen coleópteros de los géneros *Plaumannita*, *Enthomochirus* y *Antityphona*, y en menor medida la abeja sin aguijón *Plebeia minima* (OTCA, 2016). Investigaciones recientes indican que en ciertos genotipos

evaluados se observó hasta 42 frutos por planta y entre 7 y 53 semillas por fruto, lo que hace pensar en posibilidades de mejora genética (Velásquez-Vasconez et al., 2025).

### **2.3.5 Composición del fruto**

El fruto está conformado por aproximadamente 44,6% de cáscara (epicarpio + mesocarpio), 37-39% de pulpa (endocarpio) y 17-18% de semillas, lo que representa un rendimiento útil de alrededor de 55% (Figura 5) (OTCA, 2016). La pulpa es la parte con mayor valor económico y las semillas permiten la elaboración de cupulate (Díaz-Viteri, 2024).

**\*Pulpa del copoazú.** Tiene una consistencia pastosa, color blanco a crema y sabor agridulce parecida al de la guanábana, su porcentaje en el fruto va a depender del método de extracción: 39% extracción manual, 36,7% extracción mecanizada (Díaz-Viteri, 2024). Los valores de pH están entre 2,9 y 3,4, acidez total de 1,9–2,5% y sólidos solubles de 10,8–14,4 °Brix y dependerá de la maduración y del genotipo. En 100 g de pulpa se estiman 72 kcal, con contenidos moderados de proteínas, lípidos y carbohidratos, además de minerales como calcio, fósforo y hierro, y vitamina C. Los principales compuestos volátiles responsables del aroma son ésteres como butirato de etilo, acetato de etilo y butirato de butilo (OTCA, 2016).

**\*Semillas del copoazú.** Son oleaginosas, tienen aceites superiores al 50%, ricos en ácidos oleico y esteárico, además contienen proteínas y carbohidratos, lo que le confiere al fruto un alto valor nutricional (OTCA, 2016). En estudios recientes también se han documentado variaciones entre genotipos en el número de semillas por fruto, alrededor de 20 a 50 semillas y peso de frutos, lo cual hace evidente la importancia de la selección genética (Velásquez-Vasconez et al., 2025).

### **Figura 5**

*Fruto de copoazú (Theobroma grandiflorum).*



*Nota.* Elaborada por el autor

### ***2.3.6 Condiciones de temperatura, precipitación y suelo***

Las condiciones ambientales que favorecen el cultivo de copoazú son: temperaturas entre 21–35 °C, humedad relativa de 64–93% y precipitaciones anuales de aproximadamente 1.500–2.000 mm. Prefiere suelos ácidos (pH≈4,5) con contenido de arcilla entre 35-60% y con buen drenaje (OTCA, 2016). Estudios recientes de residuos del fruto como sustrato de vivero revelan que los residuos de semillas contienen concentraciones de macro- y micro-nutrientes superiores al suelo (P, K, Ca y Mg varias veces mayores) lo que abre perspectivas nuevas de manejo y reciclaje (Sousa Filho et al., 2025).

### ***2.3.7 Fertilización y nutrición***

Los suelos donde se instala el copoazú suelen tener buenas propiedades físicas pero baja fertilidad natural, lo que hace que la fertilización sea crítica para aumentar el rendimiento (OTCA, 2016). Estudios recientes confirman la falta de protocolos estandarizados de fertilización y la necesidad de investigaciones agronómicas para definir dosis y esquemas según la etapa fenológica y el sistema de cultivo (da Silva et al., 2024). Ante síntomas de deficiencias, se evidencia disminución de N, K y Ca, así como concentraciones bajas de micronutrientes como B, Fe, Mn y Zn (OTCA, 2016; da Silva et al., 2024). Además, estudios fitoquímicos del copoazú

arrojan que su pulpa y sus semillas contienen flavona, flavan-3-oles y proantocianidina como principales polifenoles (Pugliese et al, 2013; Yang et al, 2003).

### ***2.3.8 Usos y valor agregado (pulpa y semillas)***

La pulpa del copoazú es rica en compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y volátiles aromáticos, y se mantiene como matriz para productos congelados, refrescos y alimentos funcionales (Díaz-Viteri, 2024). Estudios del aceite de semillas han identificado perfiles elevados de ácido oleico y esteárico, lo que recalca su potencial para alimentos (elaboración de cupulate) y cosmética (da Silva et al., 2023). También se ha explorado la valorización de los residuos del fruto como sustrato en viveros y como aditivo en productos alimentarios (Sousa Filho et al., 2025).

## **2.4 Métodos de extracción química**

La extracción es un proceso físico por el cual un analito presente en una mezcla es obtenido por medio de un solvente adecuado, el cual es elegido de acuerdo con la afinidad y la solubilidad de los componentes. De acuerdo con la combinación de los estados de agregación del analito es posible determinar qué tipo de extracción realizar, extracción líquido-líquido (analito en un matriz líquida) y extracción sólido-líquido (analitos en matriz sólida).

### ***2.4.1 Extracción sólido-líquido***

Es un proceso de extracción por el cual se separan uno o varios analitos solubles contenidos en una matriz sólida mediante la utilización de un disolvente adecuado, también llamado proceso de lixiviación sólido-líquido, por ende, el producto resultante es llamado lixiviado. Existen varios métodos de extracción sólido-liquido entre los cuales se encuentran extracción en caliente, extracción con superfluido, extracción avanzada con disolvente y extracción asistida por ultrasonido (Capote, *et al.*, 2007)

#### **2.4.1.1 Extracción asistida por ultrasonido**

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) es una técnica que además de ser rentable, es respetuosa con el ecosistema, permitiendo preparar muestras y extraer analitos de diversas matrices haciendo uso de ultrasonidos en un baño de agua o utilizando otros dispositivos como sondas, sonorreactores o bocinas de microplacas. Una vez se emplea el ultrasonido, este produce energía, la cual genera cavitación acústica, dando formación a microburbujas en líquidos y degradación mecánica de sólidos, dentro de esta, la rotura de partículas. En consecuencia, la UAE provoca una aceleración de la transferencia de masa, debido a que incrementa tanto el desplazamiento de solvente en la matriz sólida, como el contacto entre el solvente y la muestra sólida (Mandal, et al., 2023).

Dicho método de extracción, se considera una técnica eficiente y con ventajas frente a las demás, ya que logra dar resultado con una menor cantidad de solventes orgánicos y un menor tiempo de extracción. Para mejorar el rendimiento de este método, es necesario una selección adecuada del solvente, así como el volumen, polaridad y periodo de extracción (Mandal, et al., 2023).

### **2.5 Técnicas de análisis instrumental**

Las técnicas de análisis instrumental han sido muy importantes a lo largo de la historia ya que con la ayuda de estos ha sido posible obtener información tanto cualitativa como cuantitativa a cerca de la composición y estructura de la materia. Se basa en la interacción entre la materia y la energía por medio de un equipo para evaluar la propiedad del objeto de análisis. Las principales ventajas de estas técnicas brindan información más confiable de los resultados, mayor credibilidad y a su vez, la facilidad análisis para el investigador. A continuación, se hablará acerca de algunas de ellas.

### 2.5.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica analítica que se basa en la absorción de radiación electromagnética en el intervalo aproximado de 200 a 800 nm, es versátil, capaz de analizar compuestos incoloros en el rango UV (400-200 nm) y compuestos coloreados en el rango visible (800-400 nm) (Alaboodi et al., 2025).

La absorción de radiación en la región UV-Visible provoca transiciones electrónicas, principalmente de tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$ , cuando los electrones de una molécula o ion pasan del estado fundamental a un estado excitado. En contraste, los espectros de emisión se originan cuando los electrones retornan al nivel energético inferior. La radiación UV posee la energía suficiente para promover los electrones de valencia hacia orbitales excitados o antienlazantes, fenómeno que se manifiesta experimentalmente como bandas de absorción características en el espectro (Mandru et al., 2023).

El principio cuantitativo de la técnica está sustentado en la ley de Beer-Lambert, la cual establece que la absorbancia (A) de una muestra es directamente proporcional a la concentración del analito (c), a la longitud del trayecto óptico (b) y al coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ), expresándose como en la ecuación 1:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

Esta relación permite cuantificar las concentraciones por medio de soluciones patrón y curvas de calibración, siempre que se trabaja dentro del rango lineal del método (Akash & Rehman, 2020).

El espectrofotómetro UV-Vis consta de componentes esenciales: fuente de luz (lámpara de deuterio para la región ultravioleta y lámpara de tungsteno para la región visible), un

monocromador que selecciona la longitud de onda específica, un compartimiento para la muestra y un detector que transforma la señal luminosa en señal eléctrica. La técnica se emplea tanto para análisis cualitativo, mediante la identificación de máximos de absorción características, como para análisis cuantitativo en campos como el farmacéutico, químico, clínico y ambiental, debido a su simplicidad, rapidez operativa y bajo costo. Por lo anterior, en este trabajo de investigación, fue una técnica útil para la determinación de metabolitos primarios y secundarios en plántulas de copoazú (Alaboodi et al., 2025).

### ***2.5.2 Cromatografía***

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Por tanto, la cromatografía comprende procesos en los que los componentes de una mezcla, disueltos en una fase móvil, se van desplazando con diferente velocidad a través de una fase estacionaria y se separan cuando uno de ellos pasa a una velocidad diferente en la fase estacionaria respecto del resto (Sgariglia, 2010). La separación no ocurre en ninguna de las dos fases, sino que es el resultado de continuos movimientos de las moléculas entre ellas. El tiempo empleado por cualquiera de los componentes en la fase estacionaria depende de su afinidad por esta en las condiciones ensayadas (García-Segura et al., 1996).

A continuación, se mencionarán dos tipos de cromatografía líquida importantes a la hora de separar los componentes de una mezcla o un compuesto.

#### **2.5.2.1 Cromatografía líquida**

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), es una técnica utilizada para la separación de componentes de una mezcla con el fin de identificar, cuantificar y purificar, siendo esta última de gran importancia y confiabilidad. Algunas de sus aplicaciones son, la

determinación de la pureza de sustancias, la detección de metabolitos de interés farmacológico de plantas, la detección de metabolitos de drogas en fluidos biológicos, el aseguramiento de la calidad de productos farmacéuticos, entre otros. Su funcionamiento se basa en que por medio de una bomba pasa la mezcla o analitos en un sistema disolvente, que se conoce como fase móvil, esta fase, pasa por medio de una columna cromatográfica la cual contiene la fase estacionaria a un flujo previamente determinado, la separación de los compuestos ocurre gracias a las interacciones de estos con la fase móvil y la fase estacionaria.

Por otra parte, la cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), es una mejora técnica del HPLC que permite mayor resolución y separación cromatográficas con menores volúmenes de inyección; lo cual reduce el uso de solventes y el tiempo cromatográfico (Guillarme *et al.*, 2007). Esta técnica aprovecha al máximo los principios cromatográficos para realizar la separación, utilizando columnas cortas empaquetadas con un diámetro de partícula inferior a 0.2  $\mu\text{m}$ .

### **2.5.3 Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas (MS) es una técnica avanzada y robusta la cual se fundamenta en la identificación de un compuesto por medio de la medición de su masa haciendo un análisis de su abundancia isotópica. Mediante un espectrómetro de masas se ioniza la muestra en iones gaseosos y luego identifica los iones por sus relaciones masa/carga y abundancia relativa, los procesos que ocurren en estos dispositivos son de naturaleza química. Los espectros de masas brindan información acerca de la estructura de moléculas complejas, relaciones isotópicas en las muestras y la composición cualitativa y cuantitativa de analitos orgánicos e inorgánicos (Llamas, *et al.*, 2007).

## 2.6 Figuras de mérito analíticas

### 2.6.1 Linealidad

La linealidad es el grado de proporcionalidad directa entre dos variables de un método analítico, que normalmente se reporta como la variación de la pendiente. Se usa una curva de calibración con el fin de comprobar la linealidad del método, donde se obtiene la proporcionalidad entre el método analítico y la concentración. Todo esto dado por la ecuación 2.

$$y = mx + b \quad (2)$$

Donde **m** hace referencia a la pendiente, **x** es la concentración del analito, **y** es la respuesta del método y **b** el intercepto con el eje **y** (Miller & Miller, 2008).

### 2.6.2 Límite de detección (LOD)

El límite de detección es la mínima concentración de un elemento que logra ser detectada con un 95% de certeza. Por lo anterior, el límite de detección se puede definir como la concentración que produce una desviación igual a 3,14 veces la desviación estándar de un conjunto de lecturas y se ha definido según la ecuación 3.

$$LOD = \frac{3S_b}{m_{promedio}} \quad (3)$$

Siendo  $S_b$  la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas realizadas y  $m_{promedio}$  el promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas (Eurachem, 2005).

### 2.6.3 Límite de cuantificación (LOQ)

Este límite representa la mínima concentración de analito que puede ser cuantificada con exactitud y precisión bajo las condiciones del método, dada por la ecuación 4.

$$LOQ = \frac{10S_b}{m_{promedio}} \quad (4)$$

Donde  $S_b$  es la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas realizadas y  $m_{promedio}$  el promedio de las pendientes de las curvas de calibración desarrolladas (Miller & Miller, 2008).

#### **2.6.4 Sensibilidad**

La sensibilidad mide la capacidad de un instrumento para detectar pequeñas variaciones de concentración del analito, la cual es representada como la pendiente de la curva de calibración y donde se considerará que, a mayor pendiente mayor es la sensibilidad del método (Castillo & González, 1996).

#### **2.6.5 Robustez**

Muestra la capacidad de un método analítico para mantenerse inalterado ante pequeñas fluctuaciones deliberadas en las condiciones del experimento, mostrando la fiabilidad. La robustez se evalúa realizando cambios controlados en variables como temperatura, pH y composición de los reactivos (Rodríguez et al., 2012).

#### **2.6.6 Precisión interdía**

Es la consistencia de los resultados obtenidos al analizar una misma muestra en diferentes días, bajo las mismas condiciones y se evalúa por medio del coeficiente de variación (CV) de los resultados (Castillo & González, 1996).

### **2.6.7 Precisión intradía**

Es la consistencia de los resultados al evaluar una muestra varias veces el mismo día bajo las mismas condiciones y se mide a través del coeficiente de variación (CV) en un solo día (Castillo & González, 1996).

## **3. Antecedentes**

En la actualidad existe una mayor conciencia para mitigar el uso de los fertilizantes químicos haciendo uso de alternativas más amigables con el medio ambiente, las cuales aporten características positivas a las plantas, además, de ayudar a las adversidades ambientales y mejorar la productividad agrícola. En consecuencia, una alternativa viable puede derivar de la melatonina que puede servir como bioestimulante para cultivos, por lo cual su aplicación exógena es un tema de interés investigativo.

Teniendo en cuenta que también se desea identificar y cuantificar la cantidad de melatonina en las plantas tratadas, en el año 2008, Hernández-Ruiz y Arnao quisieron determinar el contenido de melatonina y conocer la distribución de este compuesto en diferentes órganos y zonas de las plantas, esto lo hicieron en altramuza (*Lupinus albus L.*) y cebada (*Hordeum vulgare L.*) por medio de cromatografía líquida con espectrometría de masas/tiempo de vuelo, combinada con cromatografía líquida con detección de fluorescencia. También, estudiaron los cambios en los niveles de melatonina con la edad y la posible influencia de un fotoperiodo de luz/oscuridad o de la oscuridad constante en sus niveles. Concluyeron que, los niveles de melatonina endógena aumentaron con la edad únicamente en raíces y hojas, con una tendencia hacia un contenido de melatonina de entre 12-14 ng/g de peso fresco. Este estudio podría servir como modelo para la

aplicación a otros alimentos vegetales, con el fin de determinar la cantidad y la distribución de la melatonina en las diferentes zonas de las plantas.

Como se mencionó, es de interés usar la melatonina como bioestimulante, ya que ayuda a las plantas con las diversas adversidades ambientales, para tener una mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos. Al respecto, en 2016, Campos, en su tesis de posgrado de agronomía y fisiología vegetal, estudió el papel de la melatonina exógena en el aumento de la tolerancia en las plántulas de *Coffea arábica L.* de la variedad de café Catuaí 144 al déficit hídrico. Como conclusión, halló que la melatonina causó la tolerancia a la sequía en estas plantas, lo que permitía tener un mejor crecimiento y reducir el estrés oxidativo causado por situaciones de estrés hídrico.

Tres años después, en el 2019, Campos y colaboradores profundizaron la investigación anterior para indagar cómo influye la melatonina exógena en la mejora de la tolerancia al déficit hídrico. En la investigación, se emplearon concentraciones de 300  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  a plántulas de *Coffea arábica L.* De allí se observó, que el efecto de las respuestas a corto plazo a la melatonina podía depender de la concentración de esta. También, se reportó que cantidades más pequeñas de melatonina originan un aumento en el sistema radicular y también, una protección del aparato fotosintético, lo que va a permitir un intercambio gaseoso mayor, una mayor eficiencia de carboxilación y altos contenidos de clorofila. De igual forma, se encontró que la melatonina ayudó a la actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y disminuyó la peroxidación lipídica, que produce el producto final como malondialdehído (MDA). Sin embargo, se mostró que con cantidades muy altas de melatonina (500  $\mu\text{M}$ ) se provocaba efectos negativos sobre la tolerancia al estrés pues tiene un efecto tóxico. Es así, como esta investigación

aporta evidencia del como la melatonina exógena ayuda a proteger el café o los cultivos contra el déficit hídrico (Campos et al., 2019).

Resultados similares se encontraron cuando Cheroni et al. (2021) investigaron la respuesta de *Coffea arabica*, una planta de ciclo largo, la cual nos ayuda a tener un mejor panorama de la respuesta de la melatonina como estimulante en las plantas con un ciclo de vida prolongado y perennes como lo es la planta de interés de este proyecto (copoazú). En este estudio se evaluó la aplicación de melatonina (100  $\mu$ M) bajo 3 meses de tratamiento de estrés hídrico, donde se analizó, que las plantas tratadas exhibieron un mejor desempeño fotosintético, con mayores niveles de clorofila y eficiencia del fotosistema II (PSII), así como menores niveles de MDA y fuga de electrolitos. Paralelamente, la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), la peroxidasa con guayacol (POD) y la superóxido dismutasa (SOD) se incrementó significativamente. También se reportó una regulación positiva de genes relacionados con la respuesta al estrés y la fotosíntesis, como RBCS2 y AREB. Esta investigación mostró que tanto la aplicación foliar como la aplicación directa al suelo de melatonina podrían ayudar a la tolerancia a la sequía al regular la eficiencia fotosintética y el daño oxidativo en plántulas de café, lo que es de gran ayuda, ya que se evidencia que el uso de la melatonina como estimulante es una buena alternativa para mejorar el rendimiento de los cultivos y sobre todo en ambientes secos.

Como ya se ha mencionado, la aplicación exógena de la melatonina ha confirmado contrarrestar los daños causados por los diferentes tipos de estresores abióticos como la salinidad, sequía, calor y toxicidad de metales, así como se ha evidenciado que actúa en la planta y ayuda a mejorar los procesos fisiológicos claves como la fotosíntesis, la germinación y el desarrollo radicular (Arnao & Hernández-Ruiz, 2014). Con el fin de observar el efecto de la

melatonina específicamente bajo condiciones de salinidad, Gutiérrez Jacho (2021) evaluó la aplicación de melatonina en la germinación y crecimiento de seis variedades de pimiento (*Capsicum annuum*) las cuales se encontraban bajo estrés por sal (8 dS/m). Las semillas de pimiento fueron tratadas con concentraciones diferentes de melatonina (0, 10, 50 y 100  $\mu$ M) y una vez finalizado el estudio, se observó que la concentración óptima de melatonina fue de 50  $\mu$ M, ya que, en esta dosis, esta sustancia promovía la germinación, incrementaba la altura del tallo, el contenido de clorofila, contenido relativo de agua y mejoraba la actividad antioxidante. Al mismo tiempo, las plántulas tratadas presentaron una reducción significativa en la fuga de electrolitos y en el contenido de peróxidos lipídicos (MDA), indicadores clásicos del daño celular por estrés oxidativo. Este estudio confirmó que la melatonina puede aliviar el efecto del estrés salino durante las primeras etapas de desarrollo de las plantas de *Capsicum annuum*.

Por otro lado, en este mismo año, Jahan et al. (2021), estudiaron el efecto de la melatonina (100  $\mu$ M) en la tolerancia al calor en plántulas de tomate, para esto, las plantas se expusieron a temperatura elevadas (38/28 °C) durante 5 días. Como es normal, las plantas expuestas a estrés térmico, experimentaron aceleración significativa de la senescencia, aumento en el daño al fotosistema y la regulación positiva de las especies reactivas de oxígeno (ROS), generando la expresión del gen RBOH. Como resultados se obtuvo que la aplicación de melatonina a 100  $\mu$ M, antes de someter las plantas a estrés térmico, consiguió retrasar la senescencia foliar, al conservar altos niveles de clorofila, alto rendimiento fotosintético (Fv/Fm) y estabilidad de membranas. Además, su aplicación suprimió la expresión de genes involucrados en la degradación de clorofila (SGR1, PAO) y del marcador de senescencia SAG12. También, se evidenció una regulación hormonal estratégica: se activaron genes promotores de giberelinas (GA20ox1, GA20ox2) y se inhibió la vía del ABA, tanto en niveles hormonales como en

expresión génica. Con lo anterior, se indica que el tratamiento con melatonina reprimió la senescencia foliar inducida por calor en el tomate, ya sea directa o indirectamente, al rediseñar el metabolismo de GA y ABA o modular las vías catabólicas de la clorofila.

Los investigadores EL-Bauome et al., en el año 2022, estudiaron el impacto que tenía la melatonina, la prolina y la metionina en las plantas de coliflor que estaban bajo estrés debido a la sequía. Encontraron que, en las condiciones de estrés, la fertilización foliar de melatonina, prolina y metionina fue efectiva, ya que, en comparación con las plantas a las que no se les aplicaba dicho biofertilizante, estas mejoraban tanto el área foliar, como el contenido de clorofila y contenido relativo de agua en las hojas. También, aumentaban la vitamina C, los azúcares solubles totales, los azúcares reductores y no reductores. Así mismo, hubo un beneficio en cuanto al crecimiento de la planta, pues se observó un incremento en la altura, el diámetro, la frescura y la materia seca de las plantas de coliflor. Sin embargo, hubo una reducción significativa de las enzimas que tienen relación con los fenólicos, como el polifenol oxidasa, la peroxidasa, la fenilalanina amonio-liasa, los glucosinolatos, el ácido abscísico, el malondialdehído y los fenoles totales, en comparación con las plantas que no habían sido tratadas. De este estudio, se puede deducir que la fertilización foliar de la melatonina, la metionina y la prolina son una estrategia eficaz para lograr un mejor crecimiento y producción de las plantas, en este estudio, específicamente de la coliflor para condiciones de estrés por sequía.

Yara, M., & María, A. en el año 2023, realizaron una revisión bibliográfica con el fin de explorar el papel de los microorganismos en la reducción del estrés, debido al empleo de fertilizantes químicos en el cultivo de café de la especie *Coffea arábica L.*, ya que tenían afectaciones negativas al desarrollo y crecimiento de las plantas. Dicha investigación, proporcionó información para desarrollar opciones que fueran sostenibles y que ayuden a

mejorar la productividad y en un futuro a promover la agro sostenibilidad en el cultivo de café y de otras plantas, por medio de la acción de microorganismos, fitohormonas y biofertilizantes. Para ello, en la revisión se tiene en cuenta la melatonina como una buena alternativa sostenible, ya que mejora los mecanismos de tolerancia y recuperación de plantas con daños de estrés salino, ayuda al rescate de tejidos dañados causado por la tensión abiótica generada y es un bioestimulante de crecimiento en las plantas.

Recientemente, Sharma et al., (2024) realizó una revisión con el fin de explorar las funciones especiales de la melatonina y su impacto en diferentes sistemas vegetales. Concluyó que esta molécula posee numerosos efectos y acciones beneficiosas para las plantas, ya que ejerce un papel significativo en ellas como agente modulador (bioestimulante y regulador del crecimiento vegetal), lo que aumenta la tolerancia de las plantas al estrés biótico y abiótico, causados por diversos factores como, sequía, encharcamiento, temperaturas extremas, sal, alcalinidad, radiación UV o contaminantes químicos en los suelos (metales pesados, pesticidas y otros). En esta revisión, también se evidencia como la melatonina, conserva el equilibrio redox (eliminando las especies reactivas de oxígeno “ROS” y especies reactivas de nitrógeno “RNS”), favorece el crecimiento y desarrollo de las raíces, estimula el desarrollo de las plantas, contribuye en la floración y la maduración de los frutos, previene la senescencia de las hojas, ayuda a la expresión genética y a la actividad de las enzimas, mejora la fotosíntesis, defiende a las plantas del ataque de patógenos; regulando la inmunidad innata de las plantas e iniciando respuestas de defensa, además la melatonina puede influir en otros procesos bioquímicos y fisiológicos. Por medio de esta recopilación se puede deducir que la melatonina al ser un bioestimulante logra ser crucial para mejorar los rendimientos de los cultivos y los valores nutraceuticos convenientes para afrontar los problemas de seguridad alimentaria mundial.

En este sentido, Song et al. (2025) realizaron un estudio proteómico y fisiológicos para mostrar los beneficios de la melatonina en el alivio del daño inducido por estrés térmico en el rendimiento fotosintético de las plantas de *Nicotiana tabacum*. Determinaron que la aplicación foliar de melatonina 50  $\mu$ M mejoró significativamente el rendimiento fotosintético al prevenir la degradación de la clorofila, aumentar la actividad de enzimas clave del ciclo de Calvin como la RuBisCO y la FBPasa, y favorecer la carboxilación y regeneración de RuBP. Asimismo, se evidenció un incremento en la eficiencia fotoquímica y en la acumulación de almidón y azúcares solubles, asociado a una mayor asimilación de carbono y a la reducción de la respiración oscura. A nivel proteómico, la melatonina reguló positivamente proteínas relacionadas con la biosíntesis de clorofila, el funcionamiento del fotosistema II y el metabolismo de carbohidratos, lo que ayudó a mediar el fotodaño inducido por el estrés térmico. Por tanto, estos estudios demuestran que la melatonina actúa como un regulador clave del aparato fotosintético y que su aplicación podría ser una estrategia ecológica para elevar el rendimiento fotosintético y contribuir a la termotolerancia en las plantas.

En conclusión, hay múltiples estudios que indican la eficiencia de la melatonina para incrementar rasgos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en las plantas, gracias a su actividad antioxidante y a la capacidad de ayudar contra diferentes condiciones de estrés. Sin embargo, no se encuentran estudios sobre el impacto de la aplicación de melatonina en plantas del género *Theobroma*, por lo que el presente proyecto de investigación desea evaluar la melatonina exógena en plantas de copoazú, aplicando diferentes tratamientos y sometiendo a estas plantas en condiciones de adaptación a la luz.

## 4. Metodología

### Etapa 1: Evaluación del efecto del tratamiento con melatonina

#### 4.1 Material biológico: Plantas de copoazú

Materia prima: Las semillas de la especie vegetal *T. grandiflorum* fueron provistas por la empresa Puramazonia Zomac SAS desde Florencia, Caquetá (Colombia).

##### 4.1.1 Germinación de semillas

Las semillas de copoazú fueron germinadas en bolsas para vivero las cuales se llenaron con 1,6 Kg de sustrato compuesto por: 40% tierra negra, 15% cascarilla de arroz, 15% de arena y 30% compost (hojarasca), estuvieron dispuestas a condiciones de invernadero y bajo polisombra con 35% de reducción. Las plántulas se regaron día por medio con el propósito de mantener la humedad y asegurar una mayor eficiencia de germinación (Salvador et al.,1998).

Al inicio del experimento se tomó una muestra del sustrato, la cual fue enviada al Laboratorio Químico de Consultas Industriales UIS, donde se realizó un análisis fisicoquímico del suelo. Las características fisicoquímicas que se tuvieron en cuenta fueron: acidez del suelo, contenido de materia orgánica, composición elemental (fósforo, potasio, nitrógeno, etc.) y capacidad de retención de agua (de Carvalho, 1999).

Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo por sextuplicado, bajo condiciones de invernadero con una temperatura entre 27-30°C y una humedad relativa de 68-69% (condiciones monitoreadas diariamente).

#### 4.2 Aplicación de tratamientos en plántulas de copoazú

##### 4.2.1 Aplicación de melatonina exógena

La aplicación de melatonina se llevó a cabo según Campos et al., 2019, con varias modificaciones, según lo que se quería estudiar y evaluar.

**\*Diseño experimental 1: Diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 4x2**

-El primer diseño experimental llevado a cabo, fue la evaluación del efecto de la melatonina (factor principal) en plántulas de copoazú mediante dos estrategias, por drench en suelo y por aspersión en hojas (segundo factor), donde se utilizaron 48 plántulas con dos meses de crecimiento, escogiendo aleatoriamente aquellas con un tamaño similar para realizar un arreglo factorial 4x2, evaluando las concentraciones de 0, 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina por medio de dos vías de aplicación (aspersión y drench) por dos ensayos así: el primer ensayo consistió en aplicar seis dosis de melatonina (en concentraciones de 0 (control), 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ , con dosis de 12 mL por planta) por drench en suelo cada 15 días durante dos meses y medio. El segundo ensayo se llevó a cabo mediante aplicación por aspersión en hojas, siguiendo los mismos parámetros anteriores y con la misma distribución de plántulas (Tabla 1 y Apéndice A). Todos los tratamientos se realizaron por sextuplicado biológico. Una vez aplicados los tratamientos, las plántulas fueron monitoreadas cada 15 días durante un periodo de dos meses y medio. Posterior a este tiempo, se realizó el proceso de destrucción o extracción de las plantas, el cual se llevó a cabo, realizando un corte longitudinal en las bolsas de vivero y retirando cuidadosamente el sustrato con agua con el fin de obtener el sistema radicular completo y minimizar daños mecánicos.

**Tabla 1**

*Factores y niveles del diseño experimental 1 (48 plantas).*

Factor	Niveles
Tipo de aplicación	Drench/ Aspersión
Concentración de melatonina	Control, 50, 250, 500 $\mu\text{M}$

*Nota.* Elaborada por el autor

**\*Diseño experimental 2: Diseño factorial 2x2**

-El segundo diseño experimental es un diseño factorial 2x2, con dos factores, factor A: tratamiento (agua y melatonina), factor B: Exposición a la luz (polisombra, luz directa). Brevemente, se aplicó melatonina (a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ ) en plántulas de copoazú bajo condiciones de invernadero en (i) polisombra y (ii) expuestas directamente a la luz solar, por un periodo de aclimatación de un mes (4 semanas), aplicando por semana una dosis total de 10 mL distribuidos en 2 mL diarios. Como control se utilizó dosis de agua tipo I en lugar del compuesto activo. Todos los tratamientos se realizaron con sextuplicado biológico. Una vez terminado el mes de aplicación de los tratamientos, las plantas bajo condiciones de polisombra fueron expuestas a condiciones de estrés por radiación solar durante un mes con un fotoperiodo de 8-12 horas de día, y las plantas del tratamiento (ii) se dejaron expuestas bajo la situación inicial por un mes adicional, para posteriormente destruirlas de la misma forma que se mencionó en el primer diseño experimental (Tabla 2 y Apéndice B). Todas las plantas se monitorearon, midiendo cada quince días parámetros morfológicos como: el número de hojas, longitud y diámetro del tallo, área foliar, volumen de la raíz, longitud de raíces y biomasa seca. Una vez destruidas todas las plántulas, se midieron parámetros fisicoquímicos los cuales están detallados en las siguientes secciones. Los parámetros anteriores permitieron determinar el efecto de la melatonina sobre las plantas de copoazú.

### Tabla 2

*Factores y niveles del diseño experimental 2 (24 plantas).*

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>
<b>Luz</b>	Sombra/ Luz
<b>Tratamiento</b>	Agua tipo I / Melatonina 500 $\mu\text{M}$

*Nota.* Elaborada por el autor

### 4.3 Evaluación de parámetros morfológicos

El monitoreo experimental sobre las plantas de copoazú (tratadas y control) se realizó cada quince días durante dos meses y medio. Para ello, se midieron parámetros morfológicos como: (i) número de hojas, las cuales se contaron antes y después de finalizar los tratamientos; (ii) longitud del tallo, medido con una regla desde el ápice hasta la parte inferior hasta donde se evidenció cambio de color en el tallo de la planta; (iii) diámetro del tallo, se midió desde el ápice 3 cm hacia abajo con un calibrador pie de rey; (iv) área foliar, la cual se obtuvo midiendo largo y ancho de las hojas de las plantas. El valor de  $k$  para calcular el área foliar específica del copoazú, se determinó a partir de una muestra representativa de hojas (14), cuyos contornos fueron digitalizados mediante escaneo y analizados con el software ImageJ (Rasband, 2018). A partir de estos datos, se calculó  $k$  como la relación entre el área medida y el producto de largo por ancho ( $L \cdot A$ ) para cada hoja, y posteriormente se estimó un valor promedio que fue utilizado en la fórmula general  $k \cdot (L \cdot A)$ . Este procedimiento permitió obtener un factor de corrección ajustado a la morfología específica de las hojas de copoazú, asegurando una mayor precisión en la estimación del área foliar.

Trascurrido el periodo de monitoreo, las plantas fueron destruidas y se tomaron medidas adicionales como: (v) diámetro basal, se midió con un calibrador pie de rey donde comenzaba la raíz; (vi) longitud de las raíces (raíz principal y raíces secundarias) las cuales se midieron con un metro desde el cambio de tonalidad del tallo hasta el largo de la raíz correspondiente; (vii) volumen de la raíz, para ello se usó de una probeta con 80 mL de agua y se procedió a introducir la raíz, observando el incremento de volumen. Esta diferencia correspondió al volumen de la raíz; (viii) biomasa seca, para esto, las plantas de copoazú destruidas se dispusieron en un horno a

70°C durante dos días, para luego dejar en un desecador por 24 h, se pesa en una balanza analítica y se obtuvo el peso seco de hojas, tallo y raíz (González et al., 2020).

#### **4.4 Evaluación de parámetros bioquímicos**

Para la evaluación de parámetros fisicoquímicos, las plantas se destruyeron y seguidamente se usaron sacadiscos foliares metálicos para obtener los discos de las hojas, los cuales fueron consecutivamente sumergidos junto con las raíces en nitrógeno líquido. Posteriormente, fueron almacenados a una temperatura de -80°C hasta su uso. Para el caso de las raíces, estas fueron liofilizadas en un liofilizador marca Infitek-Liofilizador con colector de 8 puertos, liofilizador 0.9L (Shandong, China) por un día, luego se almacenaron para su posterior uso.

Los análisis de parámetros fisicoquímicos se realizaron a partir de distintas extracciones de hojas y raíces. Estas extracciones fueron divididas en cuatro (4): (i) extracción con acetona al 80% v/v; (ii) extracción con metanol al 80% v/v; (iii) extracción acuosa; (iv) extracción con buffer Tris-HCl.

##### ***4.4.1 Determinación de clorofila y carotenoides***

La metodología empleada para esta evaluación fue la reportada por Tiryaki y Gülmez, en 2021. Brevemente, se homogenizó entre 20-40 mg de las muestras de las hojas (2 discos) en mortero, seguidamente se añadió 3 mL de acetona fría (80 % v/v) al homogeneizado. Las muestras se pasaron a tubo Falcon (15 mL), se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se añadió 2 mL de acetona fría (80 % v/v) al pellet, volviendo a centrifugar bajo las mismas condiciones. Los valores de absorbancia de los pigmentos en los extractos se midieron a longitudes de onda de 470, 646 y 663 nm en un espectrofotómetro (UV -1800 SHIMADZU, Kyoto, Japón). Se utilizó acetona como blanco. Los

valores para clorofila a, b y totales, además de los carotenoides se determinó sustituyendo los valores de absorbancia determinados en las siguientes ecuaciones.

$$C_a = 12.25A_{663.2} - 2.79A_{646.8} \quad (5)$$

$$C_b = 21.50A_{646.8} - 5.10A_{663.2} \quad (6)$$

$$C_{a+b} = 7.15A_{663.2} + 18.71A_{646.8} \quad (7)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b}{198} \quad (8)$$

*Nota:* C<sub>a</sub>: Clorofila a, C<sub>b</sub>: Clorofila b, C<sub>(a+b)</sub>: Clorofila total, C<sub>(x+c)</sub>: Carotenoides totales. Los valores mostrados en las ecuaciones son datos establecidos anteriormente (Arnon, 1949), teniendo en cuenta el coeficiente de absorción molar para la clorofila en la acetona al 80% v/v mostrado en las tablas dadas por Lichtenthaler (1987).

Se resalta que todos los experimentos de cuantificación realizados, se harán por duplicado con el fin de obtener reproducibilidad.

#### **4.4.2 Determinación de fenoles y flavonoides totales**

Se realizó una extracción en hojas y raíces frescas con metanol al 80%v/v con el fin de extraer flavonoides y fenoles totales presentes en las muestras. También, este mismo extracto se utilizó para cuantificar melatonina en las plantas tratadas.

Se obtuvieron los extractos basados en el método de extracción por ultrasonido realizado por Kim et al. (2003), con algunas modificaciones. Se pesaron 4 discos de hojas (40-70 mg) y 100 mg de raíz, estos fueron macerados con 1 mL de la solución extractora (metanol: agua 80:20% v/v). Seguidamente, se pasaron a tubo falcon y se completó el volumen a 5 mL con la misma solución extractora, posteriormente, se realizó extracción en un baño de ultrasonido

(Elmasonic Easy 30H, Signen, Alemania) a 60 Hz por 20 min y se procedió a centrifugar a 5000 rpm por 5 min. Finalmente, se sacó el sobrenadante de cada extracción y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación de flavonoides y fenoles totales.

#### **\* Concentración de fenoles totales**

La cuantificación de fenoles totales en las muestras se realizó por medio del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu reportado por Kim et al. (2003), con algunas modificaciones.

##### **-Curva de calibración de ácido gálico**

Se realizó una curva de calibración usando ácido gálico (pureza  $>98\%$ , Merck) ( $0-500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) preparada en metanol  $80\% \text{ v/v}$ . La curva de calibración se construyó con siete puntos de ácido gálico (20, 40, 60, 80, 200, 400,  $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), usando metanol al  $80\% \text{ v/v}$  como blanco. Se tomaron  $200\ \mu\text{L}$  de cada patrón de ácido gálico en tubos falcon y posteriormente se le agregó  $1800\ \mu\text{L}$  de Agua tipo I. Seguidamente,  $200\ \mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu fueron adicionados a la mezcla, se homogenizó en vortex donde inmediatamente se protegió de la luz. Después de 5 min, se agregó 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al  $7\% \text{ m/v}$  y se completó con  $800\ \mu\text{L}$  de Agua tipo I, agitando vigorosamente. Posteriormente, se procedió a incubar por 90 min en un lugar oscuro a temperatura ambiente, para finalmente medir la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS BioMate™ 160 UV-Visible spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

##### **-Cuantificación de fenoles totales**

Se realizó de la misma manera en la que se llevó a cabo la curva de calibración para determinación de fenoles, para ello, se hizo uso de los extractos previamente preparados de cada planta (hojas y raíz) y se utilizó los siguientes parámetros experimentales:  $200\ \mu\text{L}$  de la muestra,  $1800\ \mu\text{L}$  de agua tipo 1,  $200\ \mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al  $7\% \text{ m/v}$  y

se completó un volumen de 5 mL con 800  $\mu$ L de Agua tipo I y se realizó vortex. Posteriormente se incubó durante 90 min, se diluyeron solo las muestras de las raíces en proporción 1:2 para luego medir la absorbancia en hojas y raíces a 750 nm. El contenido de fenoles totales del material vegetal se expresó en mg/gPF de muestra fresca para hojas y mg/gPS de peso seco para raíces (Pérez et al., 2014). La precisión analítica se evaluó mediante las desviaciones estándares relativas (DER) para un total de dos repeticiones por muestra.

#### **\* Concentración de flavonoides totales**

El contenido de flavonoides totales se determinó por medio del método colorimétrico descrito por Pérez et al. (2014), con algunas modificaciones.

##### **-Curva de calibración de catequina**

Se preparó una curva de calibración usando catequina (0-200 mg. L<sup>-1</sup>) preparada en metanol 80% v/v. La curva de calibración se construyó con siete puntos de catequina (20, 40, 60,80, 100, 120, 140 mg.L<sup>-1</sup>), y como blanco se usó metanol al 80% v/v. Una alícuota (500  $\mu$ L) del extracto fenólico se transfirió a un tubo falcon de 15 mL previamente protegido de la luz. A tiempo cero, se agregó 150  $\mu$ L de una solución de NaNO<sub>2</sub> al 5% m/v. Después de 5 min, se añadió 150  $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub> al 10% m/v. A los 6 min, se agregó 1 mL de NaOH 1 M, se diluyó llevando el volumen a 5 mL con Agua tipo I. Seguidamente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro UV-VIS BioMate™ 160 UV-Visible spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

##### **-Cuantificación de flavonoides**

Se realizó de la misma manera en la que se realizó la curva de calibración para determinación de flavonoides, para ello, se hizo uso de los extractos previamente preparados de cada planta (hojas y raíz) y se utilizó los siguientes parámetros experimentales: 500  $\mu$ L de la

muestra, 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  al 5% m/v, 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10% m/v, 1 mL de  $\text{NaOH}$  1 M y se diluirá llevando el volumen a 5 mL con Agua tipo I. Seguidamente, se diluyó 1:5 todas las muestras con Agua tipo I y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro UV-VIS BioMate™ 160 UV-Visible (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), ya que las absorbancias de las muestras sin diluir se encontraban fuera de la curva.

Finalmente, el contenido de flavonoides totales en las plantas de copoazú fue expresado en mg/g muestra fresca (PF) para hojas y mg/g peso seco (PS) para raíces (Pérez et al., 2014). La precisión analítica se evaluó a través de las desviaciones estándares relativas (DER) para un total de dos repeticiones por muestra.

#### ***4.4.3 Determinación de carbohidratos totales en hojas y raíces***

Se realizó una extracción en hojas y raíces con Agua tipo I con el fin de extraer azúcares totales presentes en las muestras, según el método seguido por Arrizón et al en 2010, con algunas modificaciones.

Para ello, se pesó 100 mg de raíz y 4 discos de hojas de copoazú (40-70 mg). Seguidamente, fueron maceradas las muestras por separado con 1 mL de Agua tipo I y se pasó a un tubo falcon, donde se completó 5 mL de volumen. Posteriormente, se realizó extracción en baño de ultrasonido en (Elmasonic Easy 30H, Signen, Alemania) a 60 Hz por 20 min y se procedió a centrifugar a 5000 rpm por 5 min. Finalmente, se sacó el sobrenadante de cada extracción y se conservó en refrigeración para la determinación de carbohidratos totales.

##### **\* Concentración de carbohidratos totales**

-Preparación de reactivo Antrona

La preparación del reactivo Antrona se realizó por el método descrito por David T. Plummer (1990). Inicialmente se disolvieron 0,2 g de Antrona en 100 mL de ácido sulfúrico

concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 95-98%, previamente enfriado en baño de hielo. La mezcla se agitó suavemente hasta obtener una solución homogénea, para posteriormente conservar en refrigeración. Este reactivo se preparó cada vez que se fuese usar.

-Preparación de la curva de calibración de dextrosa para azúcares totales

Se preparó una curva de calibración de seis puntos utilizando dextrosa anhidra como patrón externo. Se usó 30 mg de dextrosa los cuales fueron disueltos en 10 mL con Agua tipo I; para obtener una concentración final de 3 mg/mL, de allí se realizó las respectivas diluciones para todos los puntos de calibración (10, 20, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se usó como blanco Agua tipo I. Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de cada punto de dextrosa dispuestos en tubos de ensayo para luego añadirles 2,5 mL de reactivo Antrona. Seguidamente, se mezcló vigorosamente en vortex y se dejaron enfriar, para después taparlos en la parte superior. Posteriormente, los tubos se incubaron se llevaron a baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se sacaron los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente para finalmente medir su absorbancia. Para ello, se tomó de cada punto solución alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  y se dispusieron en orden ascendente sobre una microplaca de 96 pozos para tomar registro de las medidas de absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, EE. UU.) para posteriormente construir la respectiva curva de calibración.

-Cuantificación de azúcares totales

Se llevó a cabo de la misma forma en la que se realizó la curva de calibración para determinación de carbohidratos totales, para ello, se hizo uso de los extractos acuosos de cada planta (hojas y raíz) y se utilizaron los siguientes parámetros experimentales: 500  $\mu\text{L}$  de muestra (hojas: extractos diluidos 1:5 y raíz: extractos diluidos 1:10), 2,5 mL de reactivo Antrona y se

dispusieron en baño de agua hirviendo por 10 minutos. Finalmente, se midió su absorbancia a 620 nm y se determinaron las concentraciones de los carbohidratos totales presentes en las muestras expresada en mg/g PF de muestra fresca para hojas y mg/g PS de peso seco para raíces.

#### ***4.4.4 Determinación de proteínas***

La extracción de proteína se realizó a partir de 100 mg de material vegetal fresco previamente congelado a -80 °C. Tanto la muestra de hojas y raíces fue macerada en un mortero de porcelana con 1.0 mL de una solución SDT (4% SDS, 50mM DTT; 100 mM Tris-HCl, pH 7.6). El producto macerado fue depositado en un tubo Eppendorf y llevado a un baño de ultrasonido durante 45 min a una temperatura aproximada de 80°C con el fin de extraer la mayor cantidad de proteínas. Una vez concluido el tiempo en el ultrasonido, las muestras fueron centrifugadas a temperatura ambiente durante 15 minutos a 14000 rpm para remover el material vegetal no soluble. Posteriormente, al sobrenadante, se le añadió una solución fría de acetona con ácido tricloroacético (TCA) al 10%v/v para precipitar las proteínas solubles. La mezcla fue dejada durante 12 horas en un congelador de -20°C para facilitar la precipitación. Una vez se formó el pellet de proteínas precipitadas, este fue lavado por centrifugación a 4°C y 10.000 rpm usando acetona fría. Finalmente, el pellet fue resuspendido en buffer Tris-HCl 0.05 M; urea 8.0 M y pH 8.5 con el fin de solubilizar la mayor cantidad de proteína. Las muestras fueron conservadas a -20°C para su posterior cuantificación de proteínas (Li et al., 2018).

#### **\*Concentración de proteínas**

La concentración total de proteína presente en cada muestra se determinó haciendo uso del kit de ensayo de proteínas Pierce BCA de Thermo Scientific™. Este ensayo se basa en la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  por parte de los enlaces peptídicos de las proteínas en medio alcalino (reacción tipo biuret). Posteriormente, el ion cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) forma un complejo estable de color

púrpura con el ácido bicinconínico (BCA), cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra.

El kit incluye dos reactivos principales: el reactivo A, que contiene BCA en solución alcalina, y el reactivo B, que contiene el ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Para la preparación de la solución de trabajo, ambos reactivos se mezclan en una proporción 50:1 (reactivo A: reactivo B) (Thermoscientific, 2024).

La concentración de proteína en la muestra y la curva de calibración se elaboraron utilizando diluciones seriadas de albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de referencia en concentraciones de 0-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se preparó la master mix de BCA y una solución de trabajo compuesta por agente A y agente B, según el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA de Thermo Scientific™. Se dispusieron 25  $\mu\text{L}$  de los puntos y de las muestras (extractos de hojas y raíz) en microplaca, donde se añadió 200  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo a cada pozo y se mezcló por pipeteo o shaker. Seguidamente, se cubrió la microplaca con aluminio e incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos (Thermoscientific, 2024). Posteriormente, se sacó la microplaca y esperó que se enfriara a temperatura ambiente para después medir absorbancia a 562 nm en un lector de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, EE. UU.), mediante la medición espectrofotométrica de la absorbancia del complejo formado, y la concentración de proteína se determina por comparación con la curva de calibración. Finalmente, la concentración total de proteína en las muestras será expresada en  $\text{mg}/\text{g}$  PF de muestra fresca.

## **Etapas 2: Cuantificación de melatonina en extracto de hojas y raíces**

### **4.5 Identificación de melatonina en extractos de hojas y raíces de plantas de copoazú**

Con el fin de medir el contenido de melatonina en hojas y raíces en plantas de copoazú de los experimentos realizados, se utilizó la extracción previamente preparada con metanol 80% v/v.

Los extractos obtenidos, se filtraron con filtro de jeringa con membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

El análisis de melatonina presente en las muestras de tratamientos y controles fue llevado a cabo según Ye et al en 2017, con algunas modificaciones. Se realizó en un cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UPLC) acoplado a un detector de masas y analizador de simple cuadrupolo (QDa). El análisis se llevó a cabo en un equipo Acquity Clase H Plus de marca Waters, equipado con una bomba cuaternaria y automuestreador FTN-H (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Para el análisis de la melatonina, se inyectó entre 1.0  $\mu\text{L}$  de la muestra manteniendo un flujo constante de 0.3  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La separación se llevó a cabo empleando una columna cromatográfica Acquity UPLC BEC C-18 de 1.7  $\mu\text{m}$  (2,1 x 50 mm). El método de elución se realizó por gradiente empleando como fases móviles (A): agua + 0,01 % ácido fórmico y (B): acetonitrilo + 0,01 % ácido fórmico. El cual fue programado de la siguiente manera: 0 min (98% Solvente A); 0 min  $\rightarrow$  1.0 min (98% Solvente A) ;1.0 min  $\rightarrow$  10 min (90% Solvente B); 11 min  $\rightarrow$  12 min requilibrio. El análisis de masas se llevó a cabo en modo de iones positivos en un rango de relaciones masa/carga ( $m/z$ ) entre 70 y 350 Da con un voltaje del capilar de 0,80 kV y voltaje de cono de 10 V. La frecuencia de adquisición de datos espectrales fue fijada a 2.5 Hz en modo de monitoreo (SIR: single-ion-reaction) de los iones  $m/z$  174 (ion secundario) y  $m/z$  233 (ion molecular) característicos para la identificación de melatonina (Apéndice C).

#### **4.6 Método analítico por UPLC-QDa para la determinación de melatonina**

La determinación de la concentración de melatonina presentes en hojas y raíces en las plantas de copozú se llevó a cabo por integración del área bajo la curva de los picos

cromatográficos obtenidos en el análisis por el UPLC correspondiente a la melatonina. El desempeño analítico del método fue evaluado mediante el análisis de curvas de calibración, la determinación de los límites de detección y cuantificación, así como la evaluación de la precisión intra e interdía.

#### ***4.6.1 Curva de calibración y rango lineal***

Las curvas de calibración se construyeron empleando soluciones estándar de melatonina (99% pureza, Merck) preparadas en metanol al 80%, la misma mezcla de extracción, en un rango de concentraciones de 2 a 40 ng/mL, de acuerdo con los niveles de detección reportados para la misma técnica analítica y ensayos de inyecciones a concentraciones superiores (80 ng/mL hasta observar una señal máxima menor de  $10^4$  en la corriente de iones detectada para el ion 233 de la melatonina y de este modo no saturar el detector (Ramakrishna et al., 2012; Patel et al., 2012).

#### ***4.6.2 Determinación del límite de detección, del límite de cuantificación y de la sensibilidad del método analítico.***

Los límites de detección (LOD) se determinó como 3 veces la  $S_b/m$  y el límite de cuantificación (LOQ) como 10 veces  $S_b/m$ , donde  $S_b$  representa la desviación estándar del blanco y  $m$  la pendiente de la recta. Así, se determinaron a partir de la desviación estándar de la señal del blanco y de la pendiente de la curva de calibración de melatonina.

#### ***4.6.3 Reproducibilidad interdía***

La reproducibilidad del método se evaluó mediante la construcción de una curva de calibración adicional en un día diferente bajo las mismas condiciones experimentales.

#### ***4.6.4. Precisión intradía***

La repetibilidad del método se evaluó mediante inyecciones replicadas en cada nivel de concentración.

#### 4.6.5. Evaluación del efecto matriz

Con el fin de evaluar el efecto de la matriz sobre la respuesta analítica de la melatonina, se compararon las curvas de calibración obtenidas con metanol (80% v/v) con las obtenidas con el extracto de la matriz vegetal. Para este experimento, se preparó cada uno de los puntos de la curva en la matriz, la cual se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Los puntos de la curva fueron inyectados por triplicado.

El efecto matriz (EM) se estimó comparando las pendientes de ambas curvas mediante la ecuación 9:

$$\%EM = \frac{\text{Pendiente Matriz}}{\text{Pendiente MeOH}} * 100 \quad (9)$$

#### 4.6.6. Determinación del porcentaje de recuperación en la extracción y exactitud

Para determinar el % de recuperación (%R) de la melatonina durante el proceso de extracción a partir de matrices vegetales. Se llevó a cabo un experimento de dopaje de la muestra (material vegetal de hojas sin tratamiento) y se adicionó una concentración conocida de estándar de melatonina en tres niveles (bajo: 5,0 ng/mL; medio: 25 ng/mL; alto: 40 ng/mL), y se integraron las áreas bajo la curva para un tiempo de retención de  $4,21 \pm 0,03$  min. Las inyecciones de cada concentración estudiada se realizaron por triplicado. El porcentaje de recuperación fue calculado de acuerdo con la ecuación 10, empleando como señal del analito en el solvente puro, las áreas calculadas para la concentración evaluada.

$$\%R = \frac{\text{señal analito en matriz}}{\text{señal del analito solvente puro}} * 100 \quad (10)$$

La exactitud del método se evaluó mediante experimentos de recuperación a tres niveles de concentración (5, 20 y 40 ng/mL<sup>-1</sup>).

#### 4.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los dos diseños experimentales fueron analizados estadísticamente con el fin de determinar el efecto de la melatonina bajo los diferentes factores evaluados. El procesamiento inicial de los datos se llevó a cabo en Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE. UU.), y para el análisis estadístico se utilizó Python versión 3.12.12 (Python Software Foundation, 2025), con apoyo de las librerías NumPy (Harris et al., 2020), SciPy (Virtanen et al., 2020), Matplotlib (Hunter, 2007) y Seaborn (Waskom, 2021). Previo al análisis inferencial, se verificaron los supuestos estadísticos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para normalidad y la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas, así como la prueba M de Box para homogeneidad de matrices de varianza-covarianza. Para la inferencia estadística, se aplicó ANOVA mixto o ART ANOVA en variables fisiológicas según la interacción concentraciones  $\times$  órgano vegetativo, mientras que para variables de morfología, clorofila y carotenoides se empleó ANOVA de Welch o Kruskal-Wallis según el cumplimiento de los supuestos. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante las pruebas t de Welch, Mann-Whitney, t pareado o Wilcoxon, considerando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , en un marco exploratorio sin correcciones post hoc, con el fin de identificar patrones generales en los datos. Los resultados se expresaron como media aritmética  $\pm$  error estándar, y las barras de error en las figuras representan dicha variabilidad. Adicionalmente, se construyeron redes de correlación mediante el coeficiente de Spearman ( $|r| > 0.7$ ), con el propósito de determinar la dirección de las relaciones entre variables y comprender de manera global el tipo de asociación existente entre los distintos parámetros analizados.

## 5. Resultados

### 5.1 Análisis fisicoquímico de sustrato inicial

En la Tabla 3, se muestra el estudio del sustrato que se tomó al empezar el experimento, el cual fue realizado por el Laboratorio Químico de Consultas Industriales UIS, donde se realizó un análisis fisicoquímico del suelo. Las características fisicoquímicas que se tuvieron en cuenta fueron: acidez del suelo, contenido de materia orgánica, composición elemental (fósforo, potasio, nitrógeno, etc.) y capacidad de retención de humedad.

**Tabla 3**

*Análisis fisicoquímico de sustrato de suelo inicial*

Tabla 1. Resultados de ensayos			
Parámetro	Método	Resultado	Unidades
Análisis Físicoquímico			
pH <sup>1</sup>	Potenciométrico, P-DA-39 Determinación capacidad de retención de agua, pH y conductividad eléctrica	6,73	Und. pH
Capacidad de Intercambio Catiónico	Titrimétrico, P-DA-38 Determinación capacidad de intercambio catiónico (CIC)	18,564	meq/100 g
Densidad Real (en base seca)	Gravimétrico, P-DA-36 Determinación densidad	0,9498	g/mL
Humedad	Gravimétrico, P-DA-44 Determinación humedad	0,81	%
Capacidad de Retención de Humedad	Conductivimétrico, P-DA-39 Determinación capacidad de retención de agua, pH y conductividad eléctrica	88,76	%
Cenizas	Gravimétrico, P-DA-35 Determinación cenizas y pérdidas por volatilización	81,98	%
Pérdidas por Volatilización	Gravimétrico, P-DA-35 Determinación cenizas y pérdidas por volatilización	17,20	%
Silicio Total	P-DA-47 Determinación silicio total y soluble	2,69	% SiO <sub>2</sub>
Carbono Orgánico Oxidable Total	Espectrofotométrico, P-DA-43 Determinación carbono orgánico oxidable total	5,60	% C
Nitrógeno Total	Método Kjeldahl, P-DA-46 Determinación nitrógeno total, amoniacal y nítrico	0,559	% N
Nitrógeno Amoniacal	Método Kjeldahl, P-DA-46 Determinación nitrógeno total, amoniacal y nítrico	0,032	% N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Nitrógeno Nítrico	Método Kjeldahl, P-DA-46 Determinación nitrógeno total, amoniacal y nítrico	0,064	% N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Fósforo Total	Espectrofotométrico, P-DA-41 Determinación fósforo total	1,370	% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Sodio Total	Absorción Atómica, P-DA-45 Determinación metales en abonos	0,015	% Na
Potasio Total	Absorción Atómica, P-DA-45 Determinación metales en abonos	0,231	% K <sub>2</sub> O
Relación C/N	Cálculo	10,03	—
Cobre Total	Absorción Atómica, P-DA-45 Determinación metales en abonos	0,001	% Cu
Manganeso Total	Absorción Atómica, P-DA-45 Determinación metales en abonos	0,008	% Mn
Hierro Total	Absorción Atómica, P-DA-45 Determinación metales en abonos	0,642	% Fe
Zinc Total	Absorción Atómica, P-DA-45 Determinación metales en abonos	0,004	% Zn

<sup>1</sup> Temperatura de la lectura de pH: 25,0°C

*Nota.* Proporcionada de Laboratorio Químico de Consultas Industriales UIS

### 5.2 Resultados de la evaluación de parámetros morfológicos

Para evaluar el efecto de la melatonina sobre el crecimiento de plántulas de copoazú tratadas mediante aspersión, drench y estrés por adaptación lumínica se analizaron diversos parámetros morfológicos cada 15 días (Apéndices D-I), entre ellos el área foliar, la cual fue estimada utilizando el factor de corrección específico para hojas de copoazú ( $k = 0,420$ ).

### ***5.2.1 Parámetros morfológicos para aplicación vía aspersión***

Las plántulas tratadas con concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina vía aspersión no generaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los parámetros morfológicos evaluados, incluyendo la longitud y diámetro del tallo, el número de hojas, el volumen de la raíz, la longitud total de raíz, la longitud de raíz principal y la biomasa seca de tallos, hojas y raíces, en comparación con el control. Sin embargo, a las concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$  se evidenció un aumento significativo en el diámetro basal, con valores de  $4,44 \pm 0,27$  mm y  $4,37 \pm 0,25$  mm, respectivamente, lo que indica un efecto puntual de la melatonina sobre este parámetro (Figura 8). También, se apreció aumento significativo en el área foliar solo al inicio del experimento (segunda semana) en las plantas tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de melatonina (Apéndice E)

### ***5.2.2 Parámetros morfológicos para aplicación vía drench***

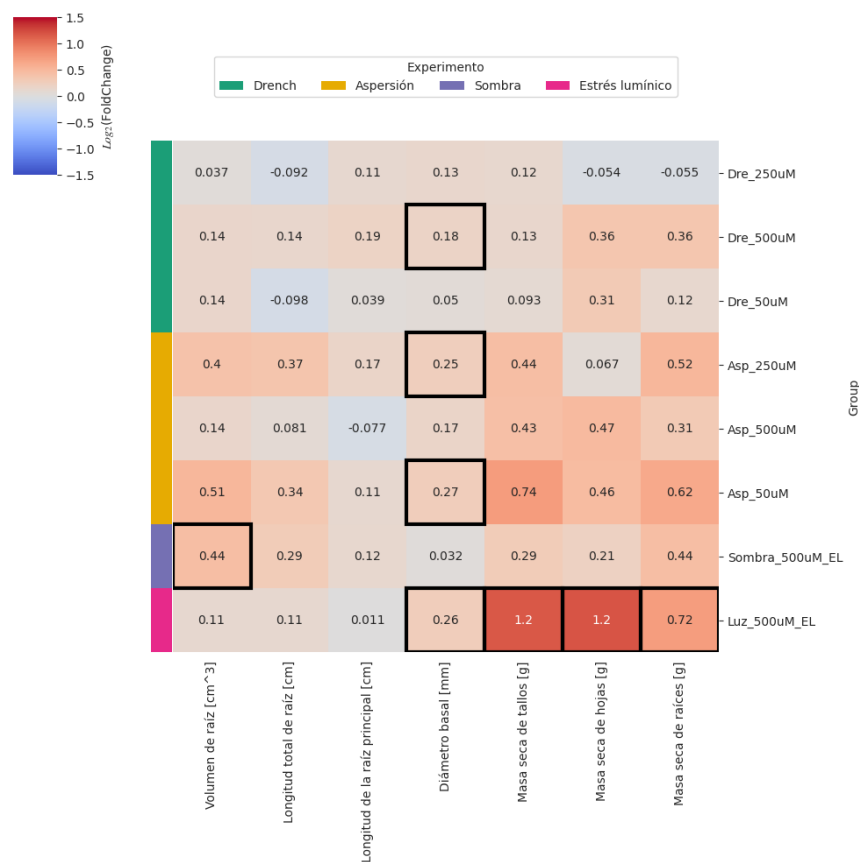
En el experimento de aplicación de melatonina por drench, las concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  no generaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los parámetros morfológicos evaluados, en comparación con el control. No obstante, a la concentración de 500  $\mu\text{M}$  se observó un incremento estadísticamente significativo en el diámetro basal ( $5,52 \pm 0,16$  mm), lo que sugiere que la aplicación radicular tiene efecto específico de la melatonina sobre este parámetro a concentraciones elevadas (Figura 8 y Apéndice G).

Considerando los resultados anteriormente descritos y lo observado en la Figura 6, donde el mapa de calor evidencia una tendencia positiva de la concentración de 500  $\mu\text{M}$  de melatonina sobre los parámetros morfológicos de las plántulas de copoazú, tanto mediante aplicación foliar como vía drench (radicular), se decidió evaluar en el presente estudio el efecto de esta concentración mediante aspersión en plántulas sometidas a condiciones de adaptación lumínica,

ya que el análisis de resultados de las redes de correlación, arrojaron un mayor número de conexiones, principalmente entre variables morfológicas cuando la aplicación se realizaba mediante esta vía (Figura 7).

**Figura 6**

Mapa de calor de parámetros morfológicos de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión.

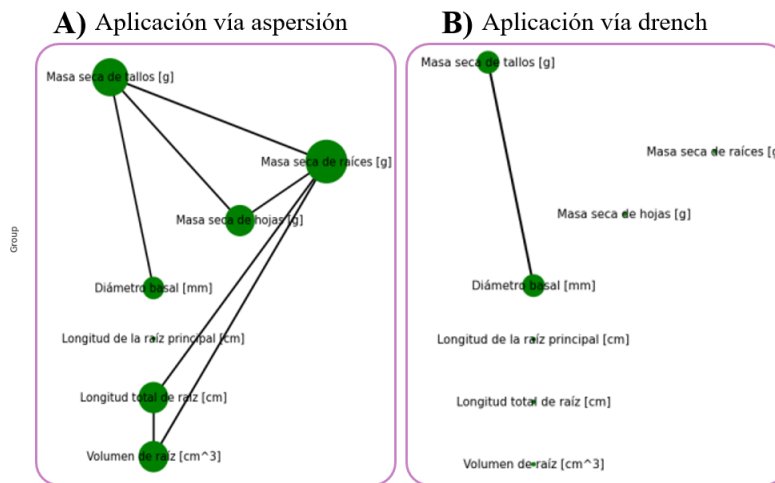


Nota. Mapa de calor para medidas morfológicas tomadas después de la destrucción (Volumen de raíz, longitud de raíz principal y raíz total, biomasa seca de tallo, hojas y raíces) de plántulas de *Theobroma grandiflorum* tratadas con melatonina mediante aspersión foliar y aplicación vía drench (radicular) a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu$ M y para plántulas en adaptación

lumínica 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en sombra (plantas sin estrés, condiciones controladas) y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en luz (plantas en adaptación lumínica durante un mes).

### Figura 7

*Redes de correlación de parámetros morfológicos para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión y drench*



*Nota.* Redes de correlación de parámetros morfológicos para plántulas de copoazú tratadas con melatonina mediante aspersión foliar y drench en suelo a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . Se usó coeficiente de Spearman ( $|p| > 0,7$ ). Todas las correlaciones son positivas.

#### 5.2.3 Parámetros morfológicos para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar

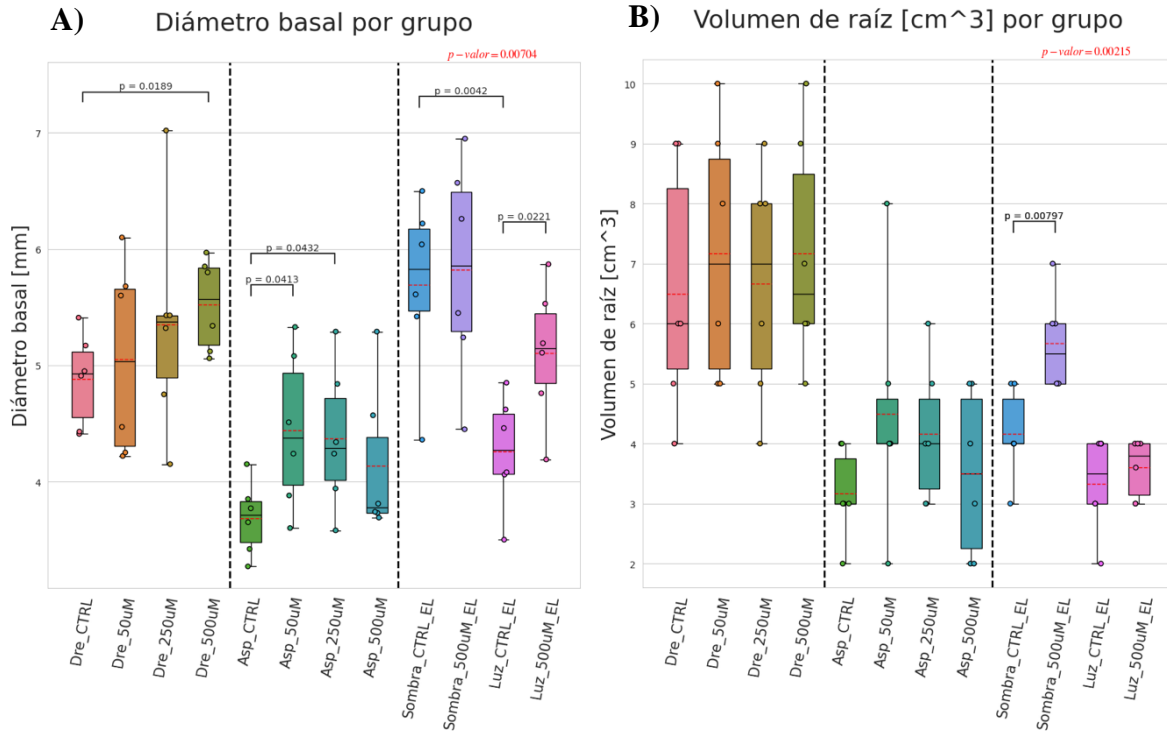
Los resultados para este experimento correspondiente a plantas expuestas a estrés por radiación solar, las plántulas tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en ausencia de estrés (bajo sombra) presentaron un incremento estadísticamente significativo en el volumen radicular ( $5,67 \pm 0,33 \text{ cm}^3$ ) en comparación con el control mantenido en condiciones de sombra (Figura 8). Por otro lado, se observaron aumentos significativos en el número de hojas y área foliar con respecto a control expuesto al estrés (Figura 9).

Tras exponer las plántulas a radiación solar directa, se evidenció el efecto negativo del estrés lumínico en las plantas sin tratamiento con melatonina (Figura 11). En particular, como se observa en las Figuras 8, 9 y 10, las plantas control sometidas a estrés mostraron una disminución estadísticamente significativa en el número de hojas, diámetro basal ( $4,26 \pm 0,20$  mm vs.  $5,69 \pm 0,31$  mm) y en la biomasa seca de tallos, hojas y raíces ( $0,43 \pm 0,03$ ;  $0,56 \pm 0,05$  y  $0,55 \pm 0,04$  g, respectivamente), en comparación con las plantas control en ausencia de estrés.

Por el contrario, cuando las plántulas fueron tratadas con  $500 \mu\text{M}$  de melatonina y posteriormente sometidas a estrés, se registró un incremento en todos los parámetros morfológicos evaluados. Esta tendencia también se aprecia visualmente tanto en las Figuras 11 y 12, como en el Apéndice I, donde las plantas tratadas presentan una morfología más vigorosa en comparación con los controles. No obstante, los aumentos fueron estadísticamente significativos en la longitud del tallo, el diámetro basal ( $4,26 \pm 0,20$  mm) y en la biomasa seca de tallos, hojas y raíces ( $0,97 \pm 0,11$ ;  $1,28 \pm 0,13$  y  $0,91 \pm 0,09$  g, respectivamente) (Apéndice P), en relación con el control expuesto al estrés (Figura 8, 9 y 10). Estos resultados evidencian que la aplicación de melatonina contribuye a mitigar los efectos negativos del estrés lumínico, favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las plántulas de copoazú bajo condiciones adversas.

### **Figura 8**

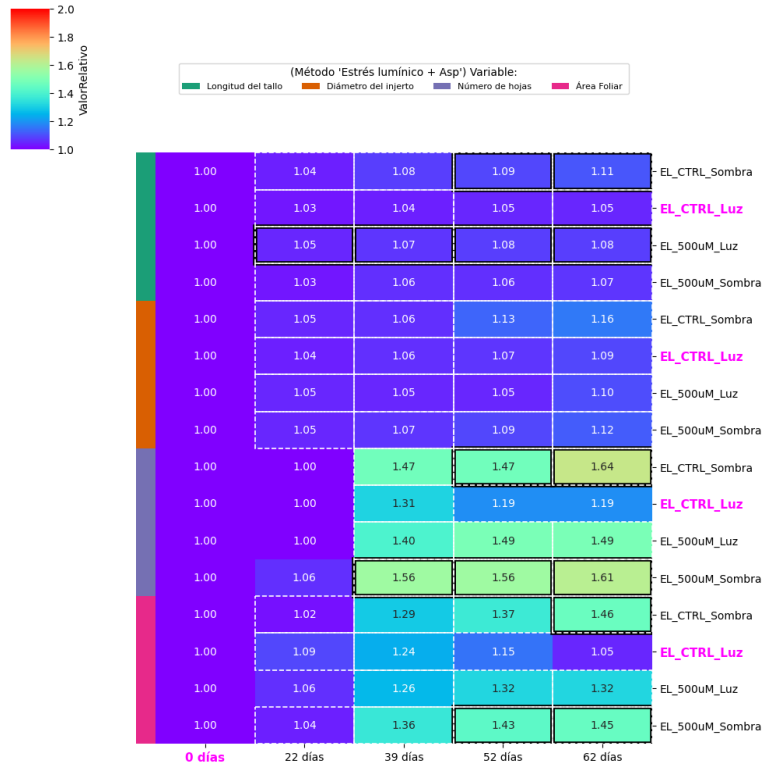
*Diámetro basal y volumen de la raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión*



**Nota.** **A)** Diámetro basal y **B)** volumen de raíz de *Theobroma grandiflorum* tratadas con melatonina mediante aspersión foliar y aplicación vía drench (radicular) a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$  y, en plántulas en adaptación lumínica dispuestas así: control sombra y tratamiento 1 (500  $\mu\text{M}$  de melatonina) en sombra (plantas sin estrés, condiciones controladas), y control luz y tratamiento 2 (500  $\mu\text{M}$  de melatonina) bajo condiciones de iluminación (plantas en adaptación lumínica durante un mes). Los datos corresponden a la media de seis réplicas ( $n = 6$ )  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### Figura 9

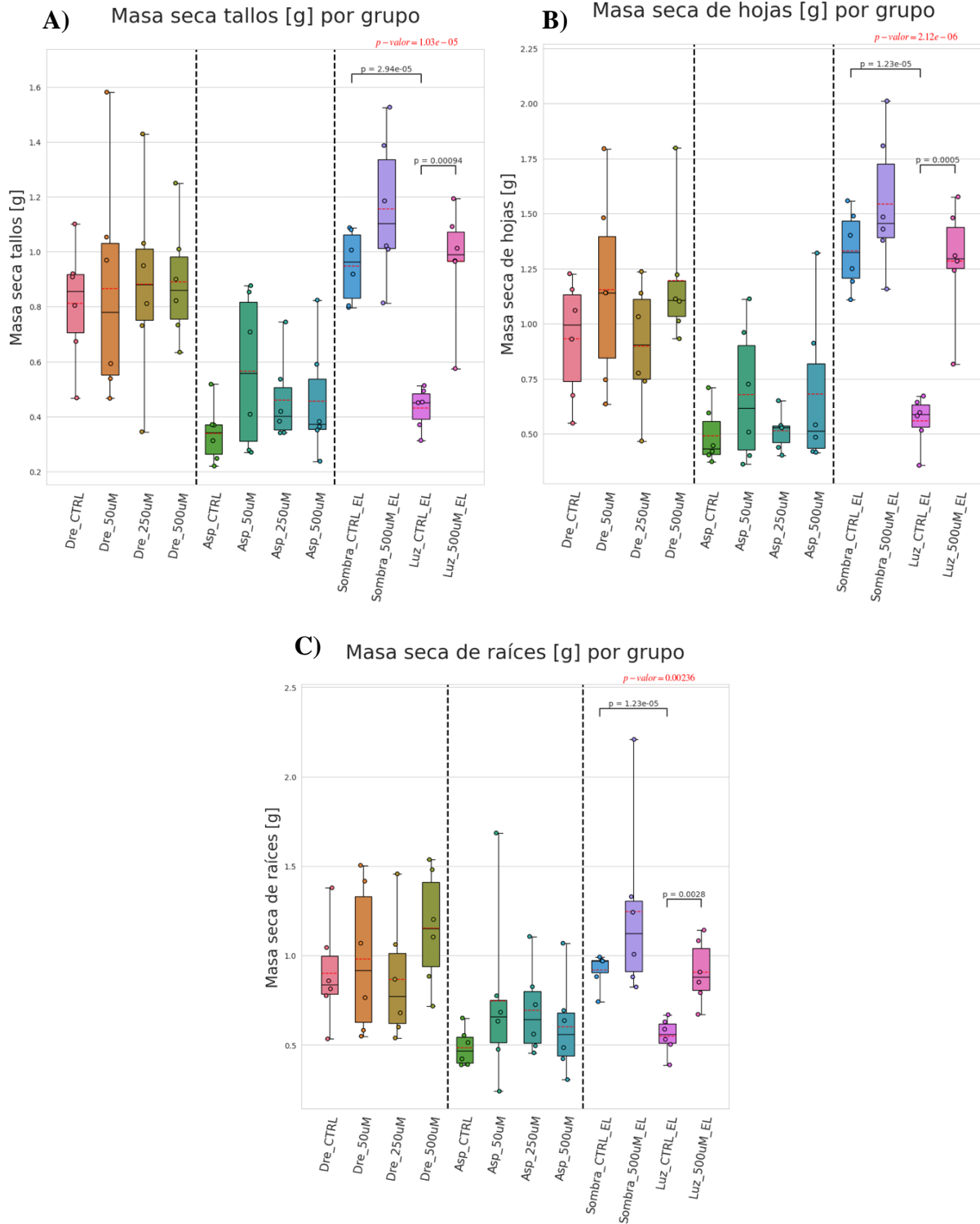
Mapa de calor de parámetros morfológicos medidos de forma temporal de copoazú tratadas con melatonina en plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión.



*Nota.* Mapa de calor para medidas morfológicas tomadas periódicamente hasta la destrucción (Longitud de tallo, diámetro del injerto, número de hojas y área foliar) de plántulas de *Theobroma grandiflorum* tratadas con melatonina en plántulas en adaptación lumínica dispuestas así: control sombra y aplicación de 500  $\mu$ M de melatonina en sombra (plantas sin estrés, condiciones controladas), y control luz y aplicación de 500  $\mu$ M de melatonina en luz (plantas en adaptación lumínica durante un mes). Cuadros con borde a trazos blanco indican casos de relevancia significativa con respecto a t = 0 días. Cuadros con borde negro indican casos de relevancia significativa con respecto a control luz.

**Figura 10**

*Biomasa seca de tallos, hojas y raíces para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión*

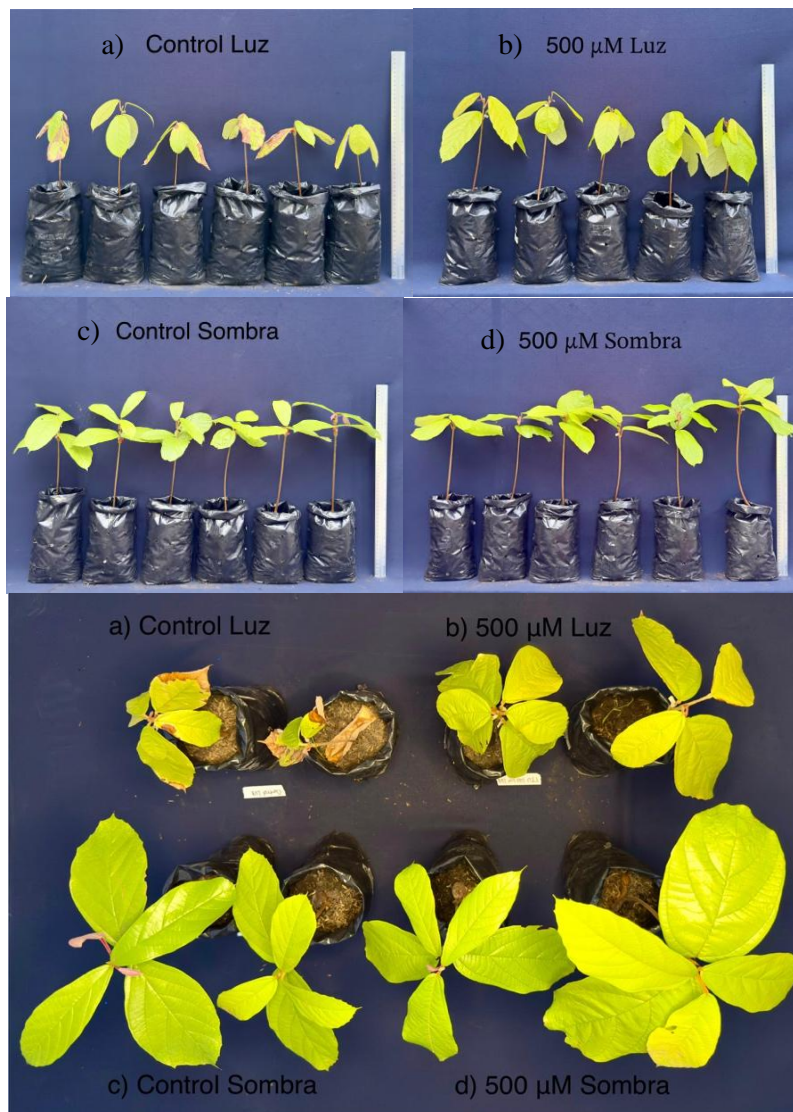


Nota. Biomasa seca de tallos, hojas y raíces de *Theobroma grandiflorum* tratadas con melatonina: **A)** mediante aspersión foliar y **B)** aplicación vía drench (radicular) a

concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$  y, C) plántulas en adaptación lumínica dispuestas así: control sombra y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en sombra (plantas sin estrés, condiciones controladas), y control luz y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en luz (plantas en adaptación lumínica durante un mes). Los datos corresponden a la media de seis réplicas ( $n = 6$ )  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### Figura 11

*Plántulas de Theobroma grandiflorum (copoazú) a condiciones de invernadero y expuestas a radiación solar directa durante un mes*



*Nota.* Plántulas de *Theobroma grandiflorum* evaluadas en un experimento de adaptación a la luz solar durante un periodo de un mes. Los tratamientos se distribuyeron así: a) control en luz y b) melatonina 500  $\mu$ M en luz, correspondientes a plantas sometidas a estrés por alta radiación; c) control en sombra y d) melatonina 500  $\mu$ M en sombra, correspondientes a plantas mantenidas sin estrés bajo condiciones controladas de invernadero. Las plántulas tratadas con melatonina fueron pretratadas previamente a la exposición a las condiciones experimentales.

### Figura 12

*Tallos y raíz de plántulas de Theobroma grandiflorum a condiciones de invernadero y expuestas a radiación solar directa durante un mes*



*Nota.* Tallos y raíces de *Theobroma grandiflorum* al momento de la destrucción, evaluadas en un experimento de adaptación a la luz solar durante un periodo de un mes. Los tratamientos se distribuyeron así: a) control en luz y b) melatonina 500  $\mu$ M en luz, correspondientes a plantas sometidas a estrés por alta radiación; c) control en sombra y d) melatonina 500  $\mu$ M en sombra, correspondientes a plantas mantenidas sin estrés bajo condiciones controladas de invernadero. Las plántulas tratadas con melatonina fueron pretratadas previamente a la exposición a las condiciones experimentales.

## **Evaluación de parámetros bioquímicos**

### **5.3 Contenido de clorofilas a, b y total y carotenoides totales**

#### ***5.3.1 Contenido de clorofila y carotenoides para aplicación vía aspersión***

Las plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) tratadas con melatonina a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$  mediante aplicación foliar (aspersión), bajo condiciones ambientales normales, no mostraron incrementos significativos en los contenidos de clorofila a, clorofila b, clorofila total ni carotenoides totales en comparación con las plantas control. Si bien, se observó un ligero aumento de estos pigmentos a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  (Figura 13 y Apéndice J), no alcanzó a ser estadísticamente significativo, lo que indica que la melatonina aplicada por aspersión no incrementó el contenido de clorofilas y carotenoides en estas condiciones de crecimiento.

#### ***5.3.2 Contenido de clorofila y carotenoides para aplicación vía drench***

A diferencia de la aplicación foliar, la melatonina aplicada por drench provocó variaciones en los contenidos de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides totales en plántulas de *T. grandiflorum* algunos con diferencias estadísticamente significativas (Figura 13 y Apéndice J). Los contenidos de clorofila a, tuvieron respuestas significativas a las concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$  con valores de  $(1,89 \pm 0,15 \text{ mg/g PF})$  y  $(1,85 \pm 0,10 \text{ mg/g PF})$ , respectivamente. Los contenidos de clorofila b y clorofila total tuvieron diferencias significativas con respecto al control a la concentración de 250  $\mu\text{M}$  con valores de  $(0,79 \pm 0,03 \text{ mg/g PF})$  para clorofila b y  $(2,65 \pm 0,13 \text{ mg/g PF})$  para clorofila total. A pesar que 50  $\mu\text{M}$  tuvo contenidos de clorofila a, b y total, sus altas desviaciones no permitieron que tuvieran diferencias significativas como 250  $\mu\text{M}$ . Los carotenoides totales tuvieron ligeros incrementos a las concentraciones evaluadas de melatonina respecto al control, siendo 250  $\mu\text{M}$  la que tuvo mayor

concentración de carotenoides con  $(0,60 \pm 0,02 \text{ mg/g PF})$ , sin embargo, estos aumentos no lograron ser estadísticamente significativos.

### ***5.3.3 Contenido de clorofila y carotenoides para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar***

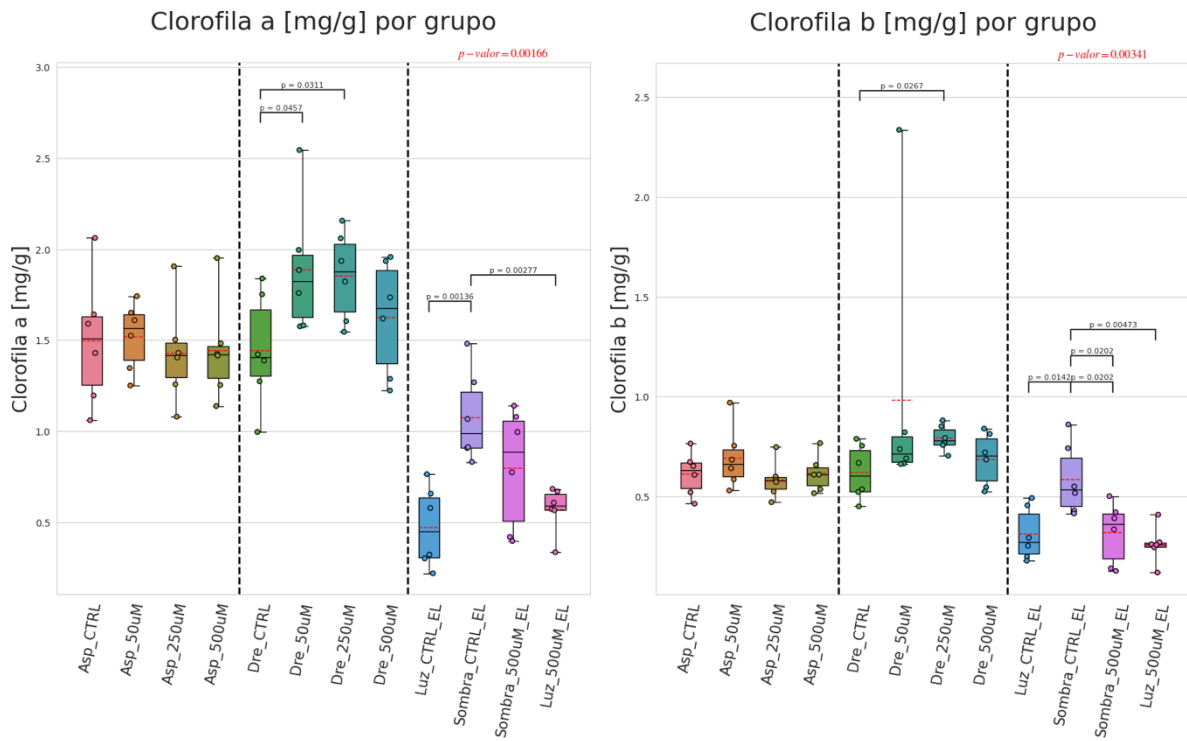
La exposición a luz solar directa durante un mes de plántulas de copoazú tuvo como efecto una disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos, que fue mayor en plantas no tratadas con melatonina. Este resultado se pudo apreciar visiblemente en el aspecto de las hojas (Figura 11).

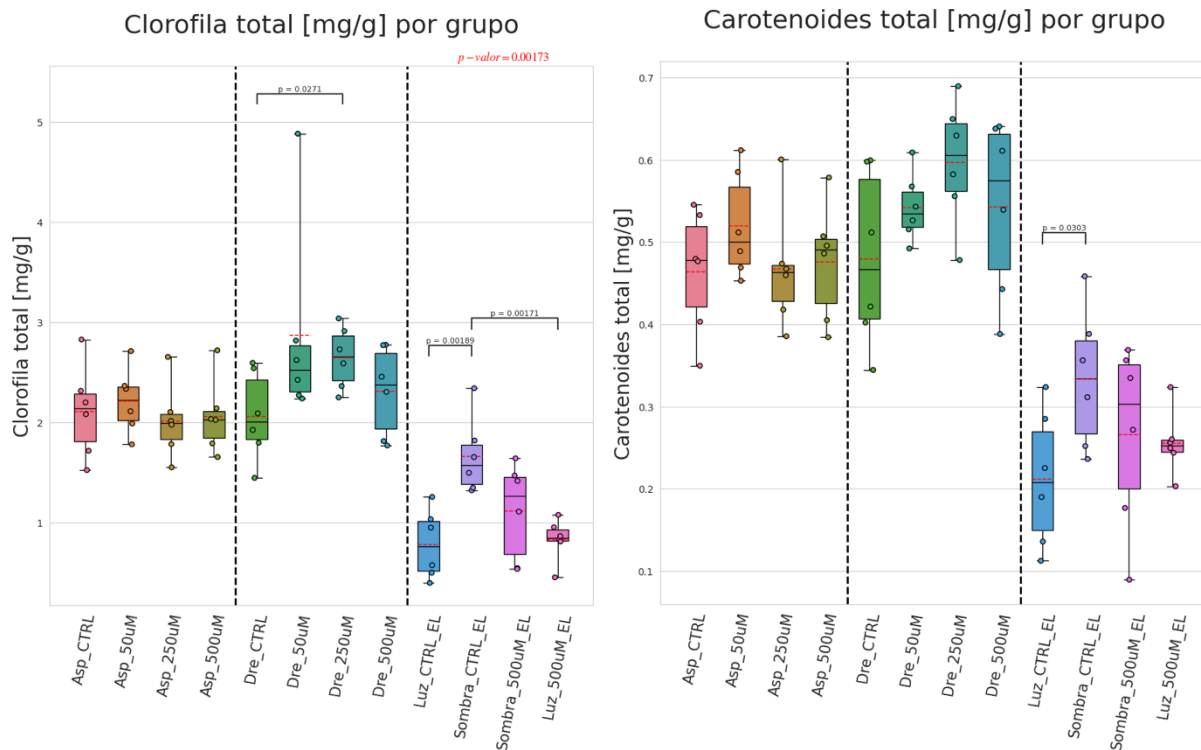
Como se muestra en la Figura 13, las plantas control que estuvieron bajo sombra, con condiciones controladas de invernadero mostraron concentraciones significativamente más altas de clorofilas a, b, total y carotenoides, mientras que las plántulas que habían sido tratadas con melatonina a  $500 \mu\text{M}$  en ausencia de estrés (sombra) no tuvieron incrementos de estos pigmentos. Se pudo observar incluso, que las plantas tratadas y sin estrés tuvieron una disminución significativa de clorofila b respecto a las plantas control sin estrés (Apéndice Q).

Una vez las plantas fueron expuestas a condiciones de luz solar directa, el contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides tuvo disminución evidente en las plantas control, demostrando el daño que causa el exceso de radiación sobre el aparato fotosintético. Por otro lado, cuando las plantas fueron tratadas con melatonina  $500 \mu\text{M}$  y expuestas posteriormente a la adaptación lumínica, las concentraciones de clorofilas y carotenoides fueron ligeramente mayores en comparación con el control (Figura 13 y Apéndice J), sin llegar a ser estadísticamente significativos, lo que posiblemente se deba a un efecto protector de la melatonina cuando la planta se encuentra en condiciones adversas permitiendo que la planta enfrente la degradación de los pigmentos fotosintéticos causados por el estrés abiótico.

**Figura 13**

*Contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersion*





*Nota.* Contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides totales (mg/g de peso fresco) en plántulas de copoazú tratadas con melatonina mediante aspersión foliar y aplicación vía drench (radicular) a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . Para el experimento de adaptación lumínica, se evaluaron los mismos pigmentos en los siguientes tratamientos: control sombra y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en sombra (plantas sin estrés, condiciones controladas), y control luz y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en luz (plantas en adaptación lumínica durante un mes). Los datos corresponden a la media de seis réplicas ( $n = 6$ )  $\pm$  error estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Contenido de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales por medio del método de Folin–Ciocalteu, el cual se basa en la capacidad reductora de los compuestos fenólicos presentes en extractos vegetales (Kim et al., 2003), arrojó los siguientes resultados:

#### **5.4.1 Contenido de fenoles totales para aplicación vía aspersión**

En la aplicación de melatonina vía aspersión a plántulas de copoazú, el mayor contenido de fenoles totales en hojas y raíces se encontró en plantas control, mientras que cuando las plantas fueron tratadas con melatonina, se observó una disminución del contenido fenólico sin llegar a ser estadísticamente significativa (Figura 14 y Apéndice K). Estos resultados pueden estar asociados a una respuesta menos sensible a la melatonina exógena bajo condiciones normales.

#### **5.4.2 Contenido de fenoles totales para aplicación vía drench**

La aplicación de melatonina por drench produjo ligeras variaciones en el contenido de fenoles totales tanto en hojas como en raíces de plántulas de *T. grandiflorum* sin alcanzar significancia estadística (Figura 14 y Apéndice K).

En hojas, los tratamientos con 50  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$  de melatonina mostraron un incremento moderado en el contenido de fenoles totales, alcanzando la concentración más alta a 250  $\mu\text{M}$  ( $20,93 \pm 1,44$  mg/g PF). Sin embargo, a 500  $\mu\text{M}$  se observó una ligera disminución respecto a esta concentración intermedia (250  $\mu\text{M}$ ), aunque manteniéndose por encima del control.

En raíces, se observó una respuesta distinta del contenido fenólico. El tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de melatonina provocó una disminución de fenoles totales ( $16,81 \pm 0,98$  mg/g PS) respecto al control. Por otro lado, se observó que a medida que aumentaba la concentración de melatonina aplicada al suelo, el contenido de fenoles se fue recuperando, alcanzando el mayor contenido en raíces a 500  $\mu\text{M}$  ( $21,30 \pm 2,54$  mg/g PS), superando ligeramente los valores de las plantas control sin tener diferencias estadísticamente significativas.

### ***5.4.3 Contenido de fenoles totales para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar***

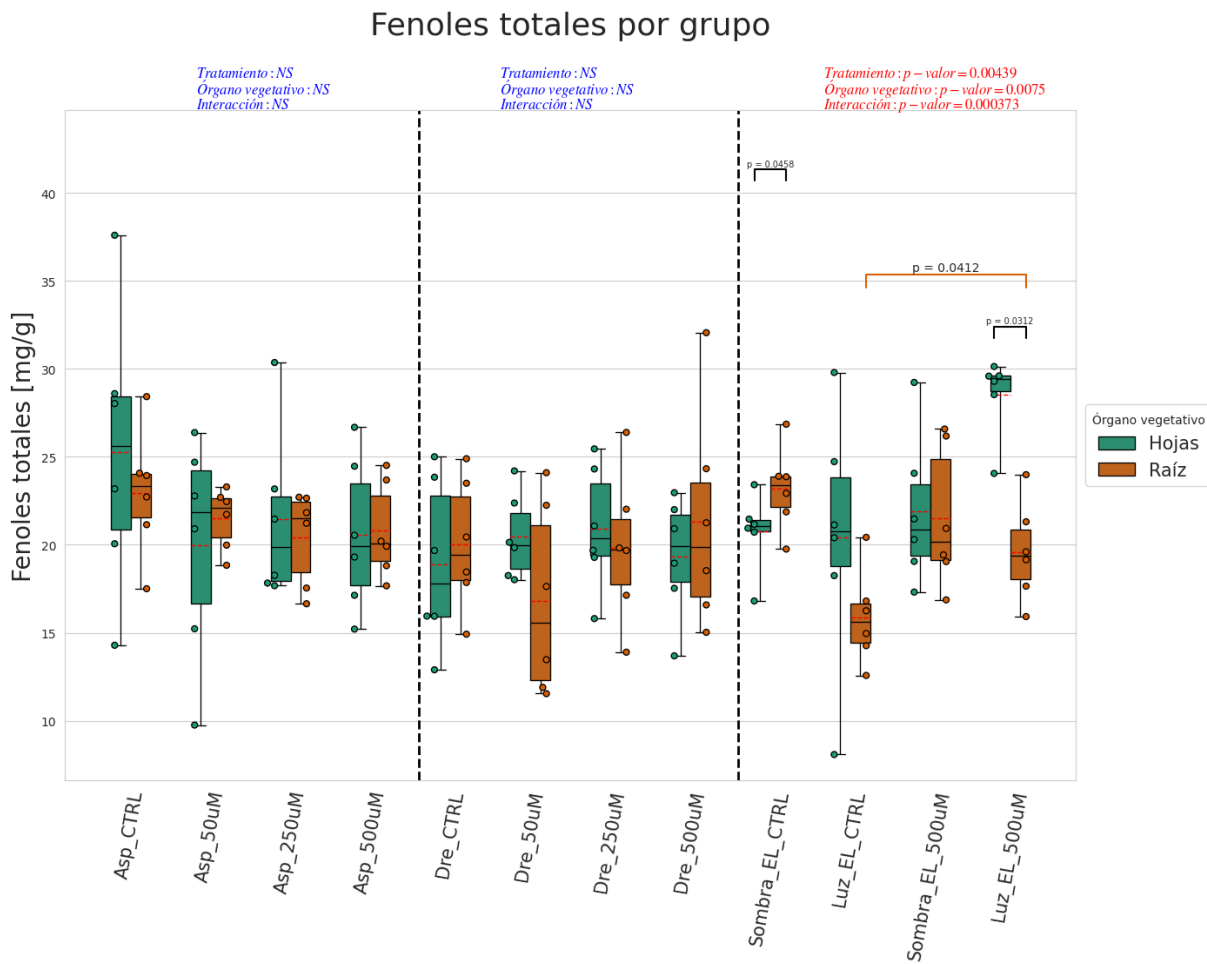
Los resultados obtenidos para este experimento, mostrados en la Figura 14, arrojaron que, bajo condiciones normales, es decir, cuando las plántulas se encontraban bajo sombra en invernadero, el contenido de fenoles totales en hojas fue de  $20,75 \pm 0,88$  mg/g PF para plantas control y  $21,91 \pm 1,73$  mg/g PF para plantas tratadas con melatonina por aspersión y sin estrés, evidenciándose un ligero aumento en las plantas tratadas respecto al control sin llegar a ser estadísticamente significativa. En la raíz, el efecto fue el contrario, pues las plantas control sin estrés tuvieron contenidos de fenoles totales de  $23,19 \pm 0,97$  mg/g PS, mientras que el tratamiento con melatonina por aspersión y sin estrés mostró un valor menor ( $21,51 \pm 1,63$  mg/g PS).

Cuando las plántulas de copoazú son expuestas a luz solar directa, se observa el efecto positivo de la melatonina exógena sobre el contenido de fenoles totales, la cual ayudó a mitigar la disminución de estos metabolitos. Los resultados arrojaron que, en hojas, las plantas control con estrés tuvieron un valor fenoles totales de  $20,40 \pm 2,97$  mg/g PF. Sin embargo, el contenido de estos metabolitos aumentó sin diferencias estadísticamente significativas cuando las plántulas fueron tratadas con  $500 \mu\text{M}$  de melatonina bajo condiciones de estrés, alcanzando valores de  $28,53 \pm 1,13$  mg/g PF. En raíz, las plantas control bajo adaptación a la luz, presentaron contenidos de fenoles totales de  $15,88 \pm 1,10$  mg/g PS, mientras que el tratamiento con melatonina ( $500 \mu\text{M}$ ) en plantas estresadas incrementó el contenido a  $19,60 \pm 1,41$  mg/g logrando diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Figura 14, Apéndice K y R).

Los resultados indican que la aplicación de melatonina cuando la planta se encuentra en estrés por la radiación solar directa, favoreció la acumulación de fenoles totales. Logrando diferencias estadísticamente significativas de fenoles totales en raíces, mientras que cuando hay ausencia de estrés abiótico las variaciones de estos contenidos fueron menos evidentes y sin diferencias estadísticamente significativas.

**Figura 14**

*Contenido de fenoles totales en hojas y raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersion*



*Nota.* Contenido de fenoles totales en hojas (mg/g de peso fresco, PF) y raíces (mg/g de peso seco, PS) en plántulas de copoazú tratadas con melatonina mediante aspersion foliar y aplicación vía drench (radicular) a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . Para el experimento de adaptación lumínica, se evaluó el contenido de fenoles totales en los siguientes tratamientos: control sombra y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en sombra (plantas sin estrés, bajo condiciones controladas de invernadero), y control luz y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en luz (plantas expuestas a estrés lumínico durante un mes). Los valores corresponden a la media de seis réplicas ( $n = 6$ )  $\pm$  error estándar. Se indican los valores de  $p$  ( $p < 0,05$ ), que señalan diferencias estadísticamente significativas y **NS** (no significativo). Se indica: el factor **tratamiento**, evalúa diferencias entre las medias de los tratamientos; el factor **órgano vegetativo**, evalúa diferencias entre hojas y raíces de forma global; y la **interacción tratamiento  $\times$  OG**, indica si el efecto del tratamiento depende del órgano evaluado.

### **5.5 Contenido de flavonoides totales**

El método usado para la determinación de flavonoides por medio del  $\text{AlCl}_3$ , detecta principalmente flavonas y flavonoles, que son tipos de flavonoides muy comunes y detecta solo aquellos que pueden formar el complejo con  $\text{Al}^{3+}$  (Pérez et al., 2014).

#### **5.5.1 Contenido de flavonoides para aplicación vía aspersion**

En hojas, no se observó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, evidenciándose que los contenidos de flavonoides totales, disminuyeron cuando hubo aplicación de melatonina, siendo el valor más bajo a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  ( $29,18 \pm 4,30$  mg/g PF). Los tratamientos con 250 y 500  $\mu\text{M}$  presentaron valores intermedios de  $35,49 \pm 3,28$  y  $34,38 \pm 3,75$  mg/g PF, respectivamente, manteniéndose más bajos que los del control. En las raíces, el comportamiento fue distinto al observado en hojas, donde el tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  fue

el que presentó el mayor contenido de flavonoides ( $31,49 \pm 2,27$  mg/gPS) con una diferencia estadísticamente significativa, seguido del tratamiento con  $250 \mu\text{M}$  y  $500 \mu\text{M}$  con valores de  $27,09 \pm 0,97$  mg/g PS y  $26,11 \pm 1,79$  mg/g PS, respectivamente, sin significancia estadística respecto al control (Figura 15 y Apéndice L).

La aplicación de melatonina por aspersion no incrementó en contenido de fenoles totales ni en hojas ni en raíces, por otro lado, en flavonoides si se observó un aumento estadísticamente significativo en raíces a la concentración de  $50 \mu\text{M}$  de melatonina respecto al control (Apéndice S).

### ***5.5.2 Contenido de flavonoides para aplicación vía drench***

En la Figura 15 se observa que, en hojas, la aplicación de melatonina exógena a plántulas de copoazú incrementó progresivamente los flavonoides totales a ( $31,86 \pm 2,25$  mg/g PF) en el tratamiento de  $50 \mu\text{M}$  y tuvo el contenido máximo de flavonoides a  $250 \mu\text{M}$  ( $36,73 \pm 3,17$  mg/g PF). Cuando las plántulas fueron tratadas  $500 \mu\text{M}$  de melatonina, se observó una ligera disminución ( $33,04 \pm 3,11$  mg/g PF), aunque estos valores estuvieron superiores al control y en ningún caso fue estadísticamente significativo.

En raíces, la concentración de  $50 \mu\text{M}$  disminuyó ligeramente el contenido de flavonoides a ( $24,35 \pm 2,60$  mg/g PS). En contraste, los tratamientos de  $250 \mu\text{M}$  y  $500 \mu\text{M}$  mostraron aumentos en estos metabolitos, con valores de ( $32,55 \pm 2,34$  mg/g PS) y ( $34,66 \pm 1,66$  mg/g PS), respectivamente, siendo el tratamiento de  $500 \mu\text{M}$  de melatonina quien tuvo diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Figura 15, Apéndice L y S).

### ***5.5.3 Contenido de flavonoides totales para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar***

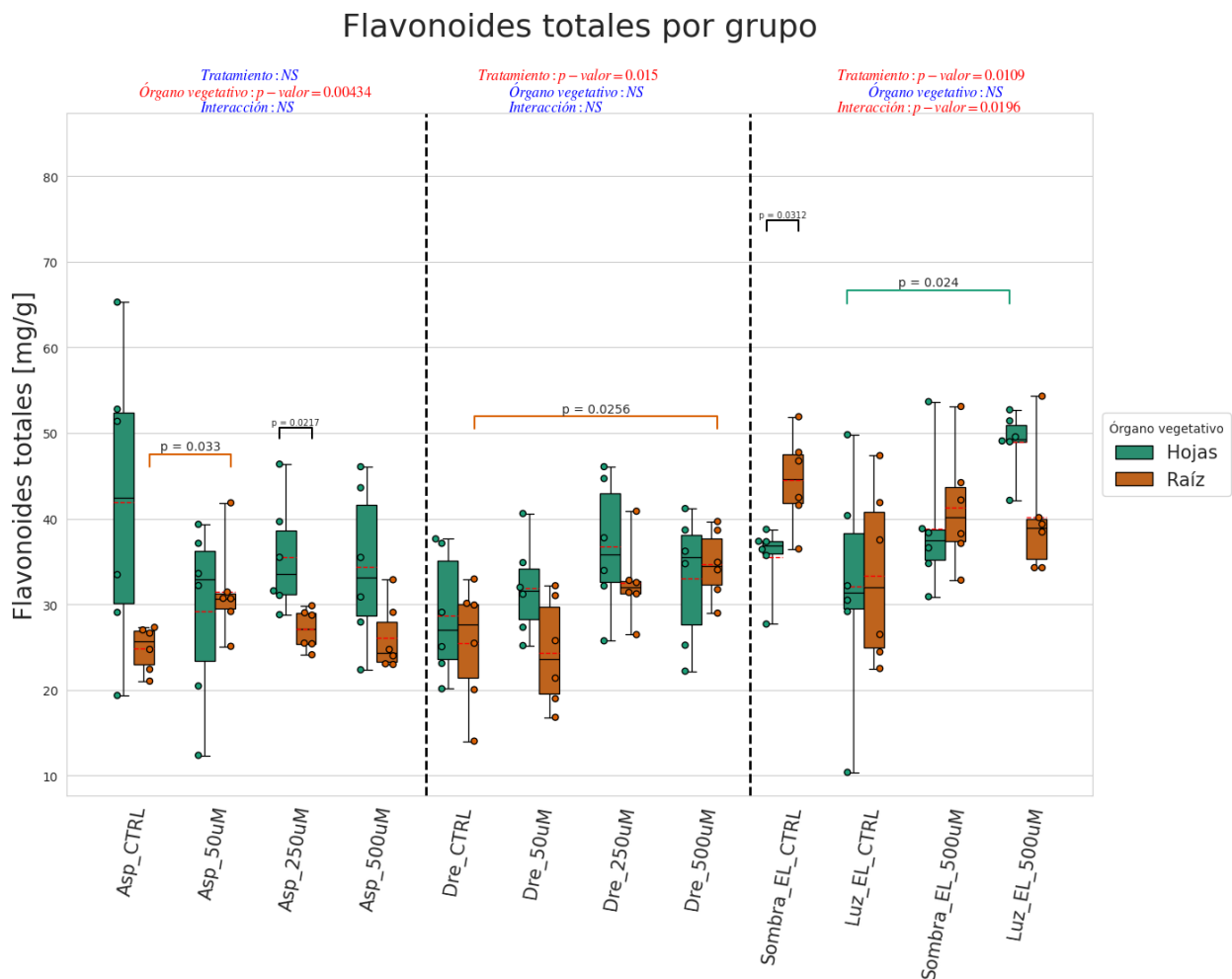
En cuanto a los flavonoides totales en plantas expuestas a estrés abiótico, se observó una tendencia similar a los fenoles totales para plántulas de copoazú, pero con contenidos más altos, evidenciando el carácter beneficioso de la melatonina para la producción de estos metabolitos secundarios (Figura 15 y Apéndice L). Los resultados arrojaron que, para plantas control, el contenido de flavonoides totales en hojas fue de  $35,54 \pm 0,88$  mg/g PF y aumentó a  $38,85 \pm 3,19$  mg/g PF con la aplicación de melatonina ( $500 \mu\text{M}$ ), este valor fue estadísticamente significativo. En raíz, los valores fueron superiores a los de hojas, obteniéndose valores de  $44,49 \pm 2,22$  mg/g PS para plantas control y disminuyendo sin significancia estadística el contenido de flavonoides totales a  $41,28 \pm 2,87$  mg/g PS en plantas con tratamiento de melatonina ( $500 \mu\text{M}$ ).

Los resultados obtenidos cuando las plantas estuvieron bajo estrés lumínico evidenciaron una disminución en el contenido de flavonoides totales en plantas control con estrés abiótico tanto en hojas como raíz con valores de  $32,06 \pm 5,37$  mg/g PF y  $33,37 \pm 4,21$  mg/g PS, respectivamente. La aplicación de melatonina ( $500 \mu\text{M}$ ), incrementó estos metabolitos en hojas y raíz, alcanzando contenidos de  $48,99 \pm 1,83$  mg/g PF y  $40,13 \pm 3,69$  mg/g PS, respectivamente. El contenido de flavonoides en hojas tuvo diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Apéndice R).

Los resultados del contenido de flavonoides totales en plántulas de copoazú bajo condiciones de adaptación lumínica, indican que la aplicación de melatonina aumentó la síntesis de estos compuestos y protegió a la planta, mostrando los mejores resultados en las hojas expuestas a luz solar directa.

**Figura 15**

*Contenido de flavonoides totales en hojas y raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersion*



*Nota.* Contenido de flavonoides totales en hojas (mg/g de peso fresco, PF) y raíces (mg/g de peso seco, PS) en plántulas de copoazú tratadas con melatonina mediante aspersion foliar y aplicación vía drench (radicular) a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu$ M. Para el experimento de adaptación lumínica, se evaluó el contenido de fenoles totales en los siguientes tratamientos: control sombra

y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en sombra (plantas sin estrés, bajo condiciones controladas de invernadero), y control luz y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en luz (plantas expuestas a estrés lumínico durante un mes). Los valores corresponden a la media de seis réplicas ( $n = 6$ )  $\pm$  error estándar. Se indican los valores de  $p$  ( $p < 0,05$ ), que señalan diferencias estadísticamente significativas y **NS** (no significativo). Se indica: el factor **tratamiento**, evalúa diferencias entre las medias de los tratamientos; el factor **órgano vegetativo (OG)**, evalúa diferencias entre hojas y raíces de forma global; y la **interacción tratamiento  $\times$  OG**, indica si el efecto del tratamiento depende del órgano evaluado.

### **5.6 Contenido de carbohidratos totales**

La determinación de carbohidratos totales por el método colorimétrico de antrona descrito por Arrizón et al. (2010), consiste en la deshidratación ácida de los carbohidratos en medio fuertemente ácido, donde los azúcares solubles presentes en la muestra (hojas y raíz) se transforman en derivados furfurálicos, principalmente 5-hidroximetilfurfural (HMF), los cuales reaccionan con la antrona formando un complejo verde-azulado. La intensidad del color fue proporcional al contenido total de carbohidratos en hojas y raíces de copoazú.

#### ***5.6.1 Contenido de carbohidratos totales para aplicación vía aspersión***

La concentración de carbohidratos totales en hojas y raíces en plántulas de copoazú, tratadas por aspersión foliar con diferentes concentraciones de melatonina mostró respuestas sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 16 y Apéndice M).

En hojas, la aplicación de las diferentes concentraciones de melatonina (50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ) no mostraron diferencias con significancia estadística. Sin embargo, al aplicarse una concentración de 250  $\mu\text{M}$  de melatonina, el contenido de carbohidratos totales aumentó

ligeramente hasta  $14,09 \pm 1,39$  mg/g PF, respecto al control y a las demás concentraciones evaluadas.

En raíces, el tratamiento control tuvo el contenido de carbohidratos más alto ( $29,31 \pm 9,53$  mg/g PS). La aplicación de melatonina disminuyó en contenido de carbohidratos totales, lo cual indica que, en la raíz no se observó un patrón claro del efecto de la melatonina vía aspersión.

Por lo anterior, podemos indicar que la aspersión foliar de melatonina no moduló el contenido de carbohidratos totales de manera estadísticamente significativa, a diferentes concentraciones y órgano vegetal.

### ***5.6.2 Contenido de carbohidratos totales para aplicación vía drench***

La aplicación de melatonina a plántulas de copoazú vía radicular (drench) tampoco provocó cambios diferenciales significativos dependientes de la concentración en el contenido de carbohidratos totales en hojas y raíces (Figura 16 y Apéndice M).

En hojas, la aplicación de melatonina vía drench a las diferentes concentraciones (50, 20 y 500  $\mu$ M), no tuvo aumentos significativos en el contenido de carbohidratos respecto al control ( $12,28 \pm 0,87$  mg/g PF). Si bien, a concentraciones de 250  $\mu$ M y 500  $\mu$ M se observaron ligeros aumentos de carbohidratos totales de  $14,87 \pm 0,22$  mg/g PF y  $14,43 \pm 0,27$  mg/g PF, respectivamente, no lograron significancia estadística.

En raíces, el contenido de carbohidratos totales en plantas control fue de  $21,08 \pm 0,44$  mg/g PF, evidenciándose un ligero aumento sin significancia estadística de estos metabolitos cuando las plántulas de copoazú fueron tratadas con 50  $\mu$ M de melatonina, alcanzando valores de  $30,02 \pm 0,24$  mg/g PF. Se observó una disminución de carbohidratos totales respecto al control a concentraciones mayores de melatonina (250  $\mu$ M y 500  $\mu$ M).

En resumen, los resultados para la aplicación de melatonina por drench muestran que no existe una respuesta marcada que logre ser significativa cuando las plántulas se encuentran en condiciones controladas de invernadero y que sus ligeras respuestas en el contenido de carbohidratos totales estuvieron, para raíces a concentraciones bajas, mientras que en hojas se observaron especialmente a concentraciones intermedias de melatonina (250  $\mu$ M).

### ***5.6.3 Contenido de carbohidratos totales para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar***

Los resultados para este experimento, arrojaron que, el contenido de carbohidratos totales en hojas y raíces de plántulas de *copoazú* estuvieron asociados tanto a la condición lumínica (sombra y exposición solar) como a la aplicación de melatonina (Figura 16 y Apéndice M).

Bajo condiciones controladas de invernadero, las plantas control tuvieron en hojas un contenido de carbohidratos totales de  $18,16 \pm 0,91$  mg/g PF y en raíces un contenido de  $30,97 \pm 3,98$  mg/g PS. La aplicación de melatonina a 500  $\mu$ M causó una disminución sin significancia estadística del contenido de carbohidratos totales tanto en hojas como en raíces con valores de  $15,06 \pm 1,09$  mg/g PF y  $30,23 \pm 3,40$  mg/g PS, respectivamente.

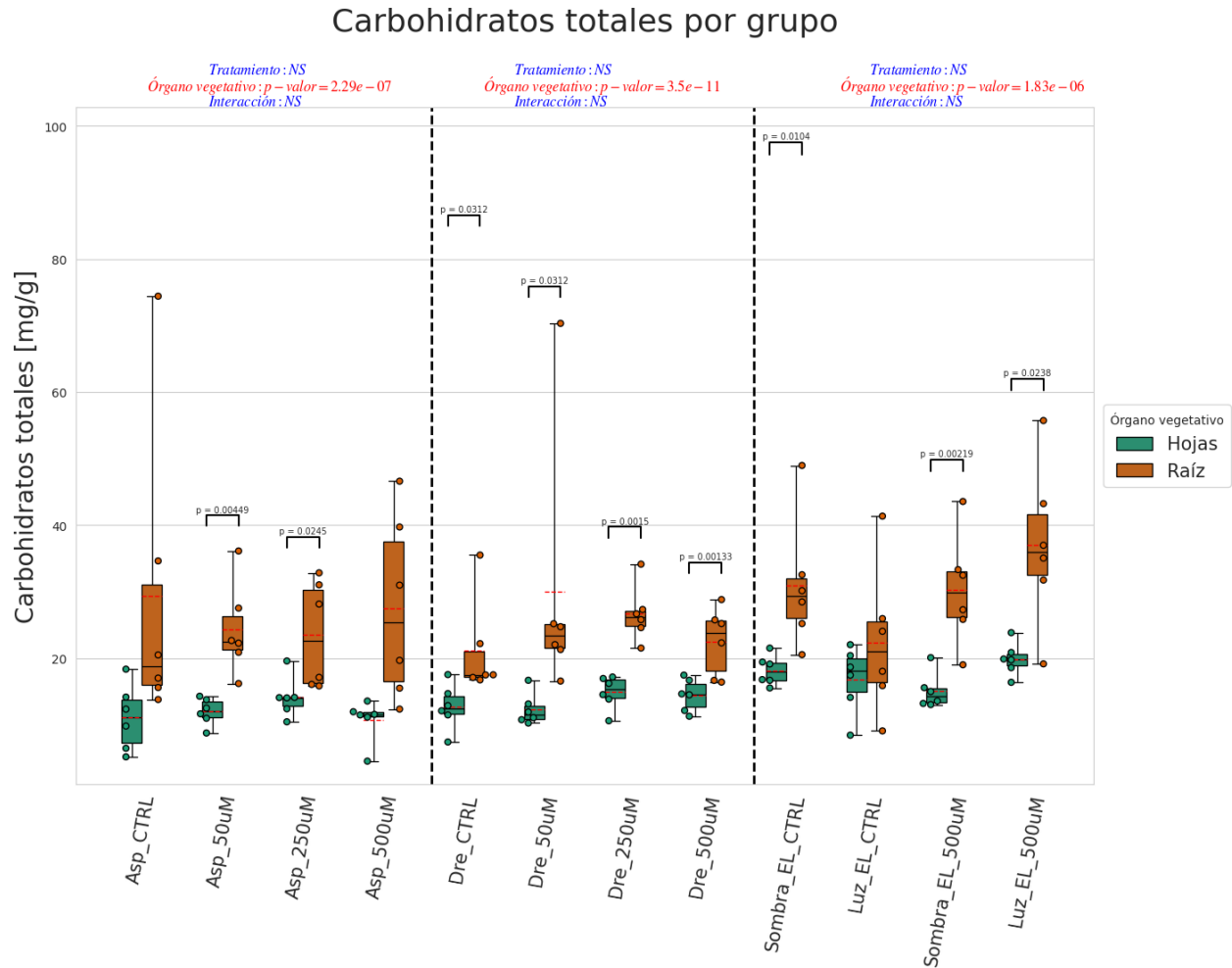
Cuando las plántulas de *copoazú* son expuestas a adaptación lumínica, se observa el efecto positivo de la melatonina exógena sobre los contenidos de carbohidratos totales. Los resultados arrojaron que las plantas control sometidas a estrés, mostraron un contenido de carbohidratos en hojas de  $16,83 \pm 2,01$  mg/g PF, y en raíces de  $22,38 \pm 4,52$  mg/g PS, cuyos resultados estuvieron por debajo de los encontrados para las plantas que no fueron expuestas al estrés abiótico (luz solar directa). La aplicación de melatonina 500  $\mu$ M a plantas sometidas a exposición de luz solar directa incrementó el contenido de carbohidratos tanto en hojas como en

raíces, con valores de  $19,87 \pm 1,13$  mg/g PF y  $36,97 \pm 5,55$  mg/g PS, respectivamente, sin alcanzar significancia estadística.

En consecuencia, los resultados obtenidos muestran que la exposición a radiación solar directa por un periodo prolongado en plántulas de copoazú, disminuyen el contenido de carbohidratos totales en los órganos vegetales, y que el pretatamiento con melatonina 500  $\mu$ M, si bien no arroja una diferencia estadísticamente significativa, si podría ayudar a la acumulación de carbohidratos totales bajo condiciones de estrés abiótico.

### **Figura 16**

*Contenido de carbohidratos totales en hojas y raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión*



*Nota.* Contenido de carbohidratos totales en hojas (mg/g de peso fresco, PF) y raíces (mg/g de peso seco, PS) en plántulas de copoazú tratadas con melatonina mediante aspersión foliar y aplicación vía drench (radicular) a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . Para el experimento de adaptación lumínica, se evaluó el contenido de fenoles totales en los siguientes tratamientos: control sombra y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en sombra (plantas sin estrés, bajo condiciones controladas de invernadero), y control luz y 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en luz (plantas expuestas a estrés lumínico durante un mes). Los valores corresponden a la media de seis réplicas ( $n = 6$ )  $\pm$  error estándar. Se indican los valores de  $p$  ( $p < 0,05$ ), que señalan diferencias estadísticamente significativas y **NS** (no significativo). Se indica: el factor **tratamiento**, evalúa diferencias entre

las medias de los tratamientos; el factor **órgano vegetativo (OG)**, evalúa diferencias entre hojas y raíces de forma global; y la **interacción tratamiento × OG**, indica si el efecto del tratamiento depende del órgano evaluado.

## **5.7 Contenido de proteínas solubles totales**

### ***5.7.1 Resultados de proteínas solubles totales para aplicación vía aspersión***

La aplicación de melatonina a plántulas de copoazú vía aspersión foliar, mostró una respuesta negativa en hojas en el contenido de proteínas solubles totales, mientras que en raíces hubo aumentos significativos a concentraciones altas de melatonina (Figura 17 y Apéndice N).

En hojas, la aplicación foliar de melatonina a diferentes concentraciones (50,250 y 500  $\mu\text{M}$ ) redujo el contenido de proteínas solubles totales en comparación con las plántulas control ( $427,79 \pm 7,31 \mu\text{g/g PF}$ ), observándose una disminución significativa a la concentración de 500  $\mu\text{M}$  con un valor de  $367,77 \pm 10,04 \mu\text{g/g PF}$ . En raíces, el contenido de proteínas solubles totales en las plántulas aumentó respecto al control tras la aplicación de melatonina, encontrándose un incremento significativo a la concentración de 500  $\mu\text{M}$  con un valor de  $262,17 \pm 31,60 \mu\text{g/g PF}$  (Apéndice V).

### ***5.7.2 Resultados de proteínas solubles totales para aplicación vía drench***

La aplicación de melatonina a plántulas de copoazú vía radicular (drench) mostró una respuesta diferente en el contenido de proteínas solubles totales a la aplicación vía aspersión con aumentos significativos en las hojas a aplicaciones bajas y altas de melatonina, mientras que en raíces se observó una disminución significativa a la concentración intermedia de melatonina (Figura 17 y Apéndice N).

En hojas, el contenido de proteínas solubles totales en las plántulas fue ligeramente inferior al control a la concentración de melatonina 250  $\mu\text{M}$ . No obstante, se observó un

incremento significativo en los tratamientos de 50 y 500  $\mu\text{M}$ , con valores de  $279,53 \pm 12,89 \mu\text{g/g}$  PF y  $321,91 \pm 25,54 \mu\text{g/g}$  PF, respectivamente (Apéndice W). En raíces, el contenido proteico en las plántulas mostró un ligero aumento a la concentración 50  $\mu\text{M}$  ( $222,16 \pm 36,14 \mu\text{g/g}$  PF) sin diferencias significativas y una disminución con significancia estadística a la aplicación de melatonina 250  $\mu\text{M}$  con un valor de  $142,82 \pm 6,62 \mu\text{g/g}$  PF.

### ***5.7.3 Resultados de proteínas solubles totales para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar***

En este experimento se observaron respuestas variadas en el contenido de proteínas solubles totales según el órgano de la planta y la condición lumínica en la que se encontraba. La aplicación de melatonina promovió un efecto positivo significativo en hojas de plántulas mantenidas en sombra (sin estrés), mientras que en raíces el efecto beneficioso se evidenció en plántulas expuestas a condiciones de adaptación lumínica y tratadas con melatonina (Figura 17 y Apéndice N).

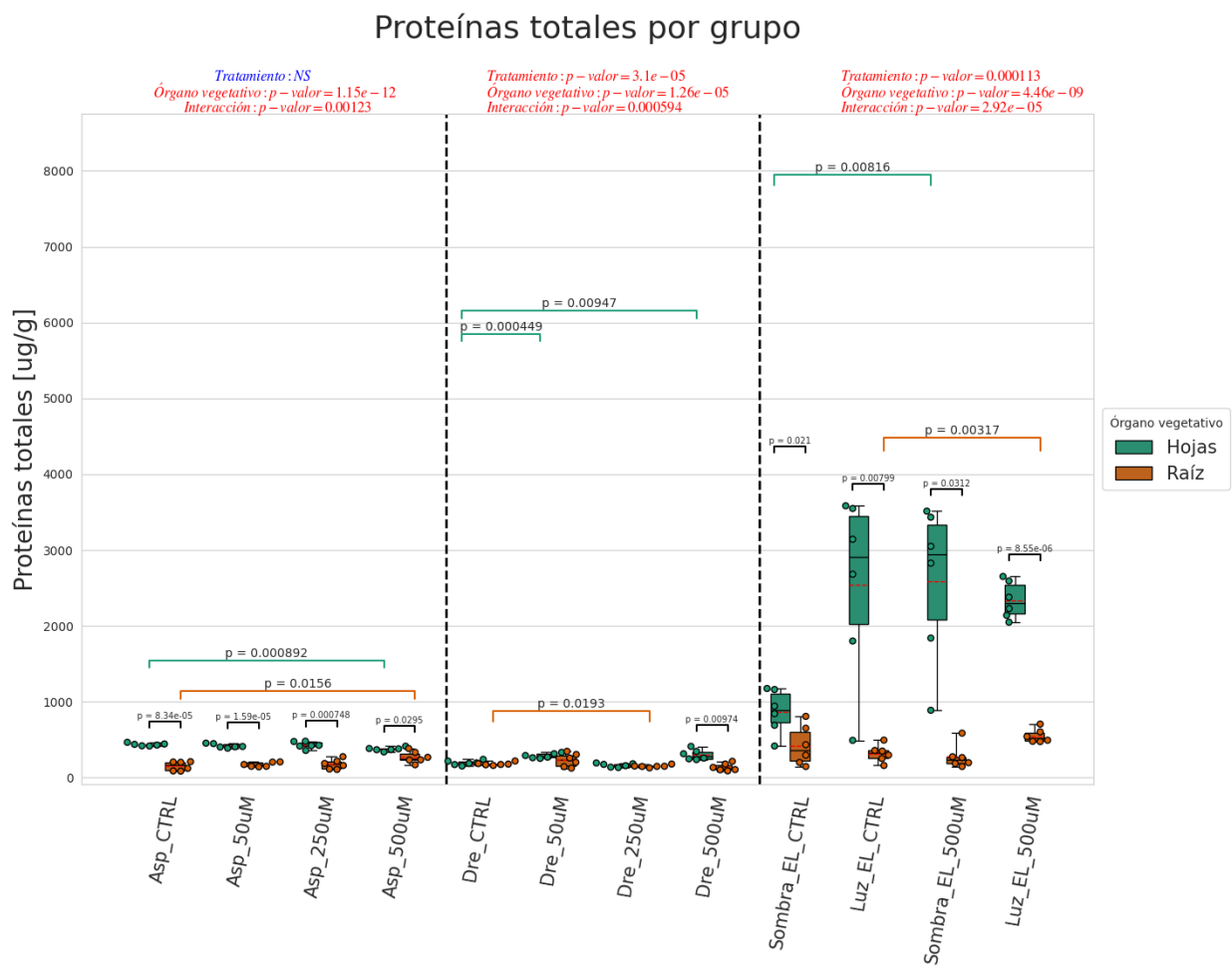
En hojas, las plántulas control en condición sombra (sin estrés) presentaron el menor contenido de proteínas con un valor de  $864,03 \pm 118,78 \mu\text{g/g}$  PF. La aplicación de 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en ausencia de estrés incrementó significativamente este contenido con un valor de  $2779,84 \pm 31,60 \mu\text{g/g}$  PF. Por su parte, las plántulas control expuestas estrés por adaptación lumínica mostraron valores significativamente mayores con un contenido de  $2535,81 \pm 492,00 \mu\text{g/g}$  PF que el control sombra y ligeramente mayores que las plantas tratadas con melatonina bajo condiciones de estrés por adaptación lumínica, quienes tuvieron valores de  $2334,55 \pm 100,11 \mu\text{g/g}$  PF.

En raíces, bajo condiciones sin estrés, el mayor contenido de proteínas solubles totales se determinó en el control sombra, mientras que la aplicación de melatonina en este órgano

evidenció la reducción estos valores, sin diferencias estadísticamente significativas. La exposición a luz solar directa disminuyó el contenido proteico en el control luz respecto al control sombra; sin embargo, la aplicación de la concentración 500  $\mu\text{M}$  de melatonina en plántulas sometidas a estrés incrementó significativamente el contenido de proteínas, alcanzando valores de  $541,89 \pm 37,11 \mu\text{g/g}$  PF (Apéndice W).

**Figura 17**

*Contenido de proteínas solubles en hojas y raíz para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica tratadas vía aspersión*



*Nota.* Contenido de proteínas solubles en hojas (mg/g de peso fresco, PF) y raíces (mg/g de peso seco, PS) en plántulas de copoazú tratadas con melatonina mediante aspersion foliar y aplicación vía drench (radicular) a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu$ M. Para el experimento de adaptación lumínica, se evaluó el contenido de fenoles totales en los siguientes tratamientos: control sombra y 500  $\mu$ M de melatonina en sombra (plantas sin estrés, bajo condiciones controladas de invernadero), y control luz y 500  $\mu$ M de melatonina en luz (plantas expuestas a estrés lumínico durante un mes). Los valores corresponden a la media de seis réplicas ( $n = 6$ )  $\pm$  error estándar. Se indican los valores de  $p$  ( $p < 0,05$ ), que señalan diferencias estadísticamente significativas y **NS** (no significativo). Se indica: el factor **tratamiento**, evalúa diferencias entre las medias de los tratamientos; el factor **órgano vegetativo (OG)**, evalúa diferencias entre hojas y raíces de forma global; y la **interacción tratamiento  $\times$  OG**, indica si el efecto del tratamiento depende del órgano evaluado.

## **5.8 Redes de correlación**

Las redes de correlación se construyeron mediante el coeficiente de correlación de Spearman ( $|p| > 0,7$ ) para comprender de manera global que tipo de relación hay entre los distintos parámetros analizados. En este estudio, todas tuvieron una correlación positiva y se observaron diferencias en el grado de conectividad según la vía de aplicación y las condiciones de crecimiento evaluadas.

### **5.8.1 Redes de correlación para aplicación vía aspersion**

En la aplicación vía aspersion, la red de correlación mostró un mayor número de conexiones, principalmente entre variables morfológicas como masa seca, diámetro basal, longitud y volumen de la raíz, evidenciando asociaciones entre estos parámetros, lo que hace que se tenga un mayor control del comportamiento del sistema. Lo anterior, hizo que fuese la vía de

aplicación más viable para el experimento de adaptación lumínica. Las variables bioquímicas y los pigmentos fotosintéticos tendieron a conectarse según su naturaleza, con menor número de conexiones entre grupos evaluados (Figura 18).

### Figura 18

*Redes de correlación para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión*



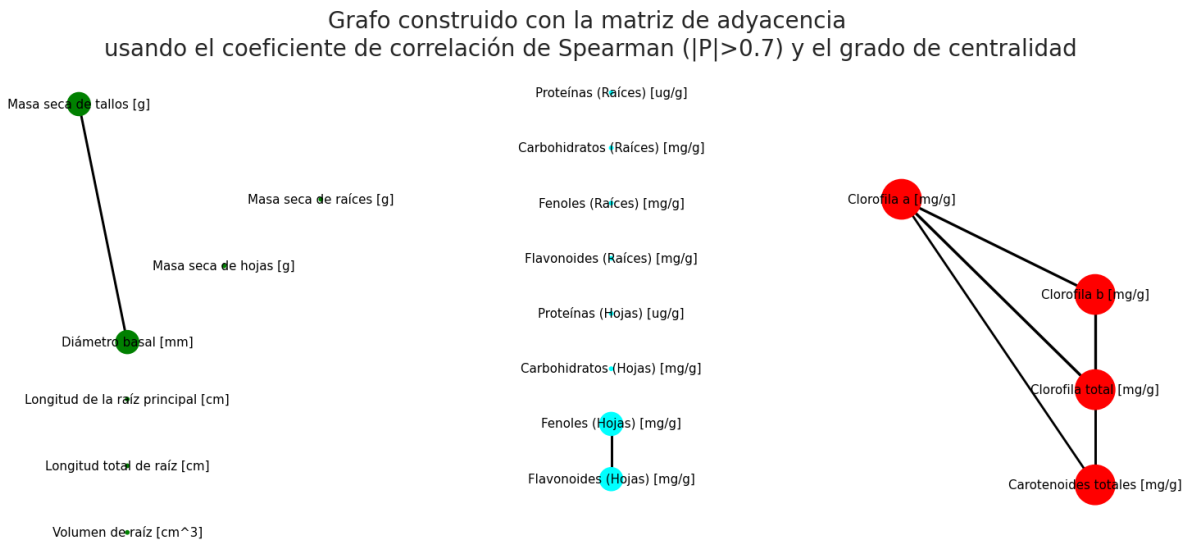
*Nota.* Redes de correlación de plántulas de copoazú tratadas con melatonina mediante aspersión foliar a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . Se usó coeficiente de Spearman ( $|p| > 0.7$ ). Todas las correlaciones son positivas.

#### 5.8.2 Redes de correlación para aplicación vía drench

En la aplicación vía drench, la red mostró una menor conectividad global. Las conexiones entre variables fueron más limitadas, observándose principalmente dentro de los grupos analizados, como los pigmentos fotosintéticos. Sin embargo, las variables morfológicas y bioquímicas tuvieron una menor correlación, lo que sugiere que cada variable y grupo cambia de manera diferente e independiente (Figura 19).

**Figura 19**

*Redes de correlación para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía drench*



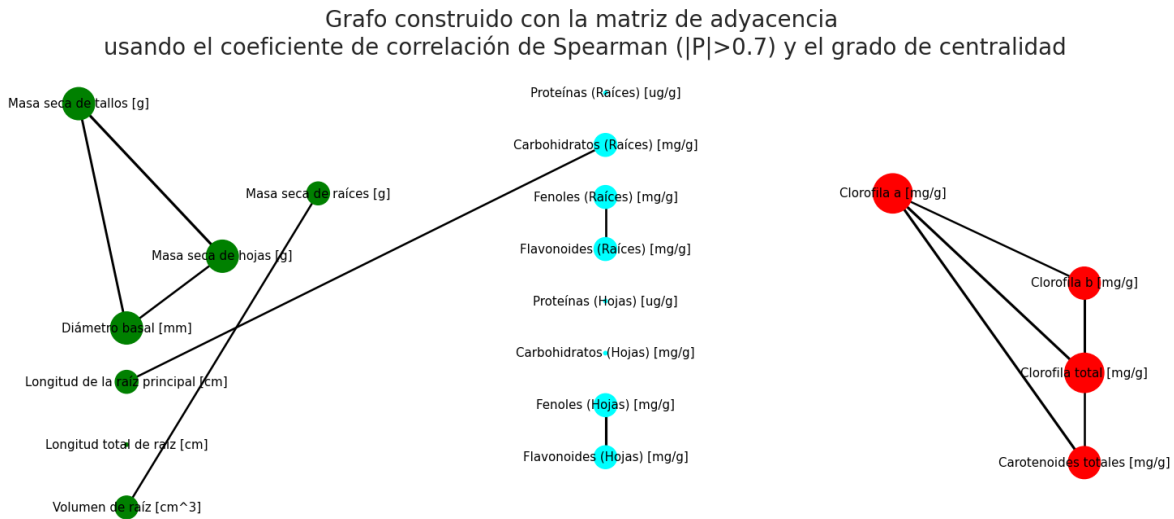
*Nota.* Redes de correlación de plántulas de copoazú tratadas con melatonina mediante drench a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . Se usó coeficiente de Spearman ( $|p| > 0,7$ ). Todas las correlaciones son positivas.

### 5.8.3 *Redes de correlación para aplicación de melatonina a plantas adaptadas a luz solar*

Para el experimento de adaptación lumínica, en condiciones de sombra se observó una red de correlación con una conectividad moderada, sobre todo entre variables del mismo grupo, presentándose mayoritariamente en variables morfológicas, mientras que las variables bioquímicas y pigmentos tuvieron baja conexión (Figura 20). Por el contrario, bajo condiciones de estrés por adaptación a luz solar directa, la red mostró un incremento en la conectividad, observándose correlación entre variables morfológicas, bioquímicas y pigmentos fotosintéticos, lo que indica una mayor integración del sistema (Figura 21).

**Figura 20**

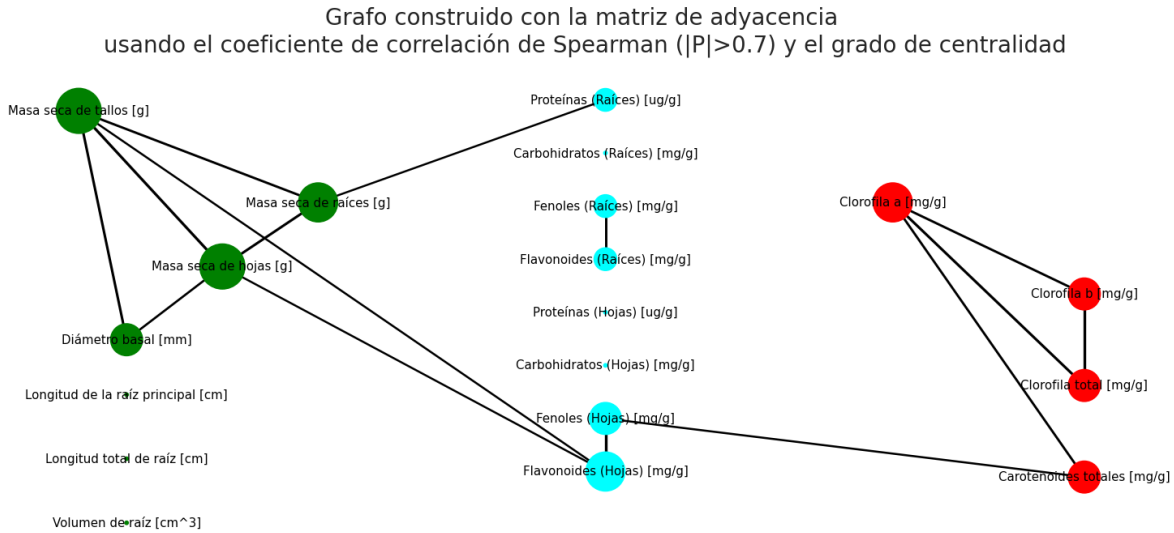
*Redes de correlación para plántulas de copoazú en experimento de adaptación lumínica en condiciones de sombra tratadas con melatonina vía aspersión*



*Nota.* Redes de correlación plántulas de copoazú tratadas con melatonina en experimento de adaptación lumínica. Representa las plántulas en condiciones de sombra (sin estrés, bajo condiciones controladas de invernadero). Se usó coeficiente de Spearman ( $|p| > 0,7$ ). Todas las correlaciones son positivas.

**Figura 21**

*Redes de correlación para plántulas de copoazú estresadas en experimento de adaptación lumínica en tratadas con melatonina vía aspersión*



*Nota.* Redes de correlación plántulas de copoazú tratadas con melatonina en experimento de adaptación lumínica. Representa las plántulas en condiciones de estrés (expuestas durante un mes). Se usó coeficiente de Spearman ( $|p| > 0,7$ ). Todas las correlaciones son positivas.

## 5.9 Método analítico por UPLC-QDa para la determinación de melatonina

### 5.9.1 Curva de calibración y rango lineal

Los datos obtenidos de la respuesta del detector en cada uno de los puntos de la curva de calibración, evaluados en cada una de sus réplicas, y la estadística requerida en este tratamiento de datos se presentan en la tabla 4.

#### Tabla 4

*Curva de calibración de melatonina comercial en metanol al 80%*

Melatonina ng/ml	Réplica 1 Área	Réplica 2 Área	Réplica 3 Área	Prom.	SD	%RSD	Aceptación
blanco	85,321	54,512	82,328	65,32	17,10	20,7	*
2,00	141,319	145,183	148,536	145,18	3,61	2,5	SI
5,00	330,444	321,276	310,891	321,28	9,78	3,1	SI
7,00	478,004	469,380	602,913	478,00	74,73	15,6	NO
10,00	664,453	696,752	677,990	677,99	16,22	2,4	SI
15,00	1035,698	996,581	1175,260	1035,70	93,93	9,1	SI
25,00	1677,021	1756,815	1704,418	1704,42	40,54	2,4	SI
30,00	1955,738	2014,581	2043,798	2014,58	44,85	2,2	SI
40,00	2883,685	2941,657	2897,639	2897,64	30,26	1,0	SI

*Nota.* SD: Desviación estándar; %RDS: Desviación estándar relativa; Prom: Promedio de las réplicas; Aceptación: Nivel de confianza y reproducibilidad de la medición. Blanco: Solvente de metanol al 80%, en el que se prepararon los patrones y se utilizó para los procesos extractivos de melatonina de las matrices vegetales de copoazú.

De acuerdo con los parámetros aceptados para la implementación de métodos analíticos confiables y reproducibles, se observó que, en la estimación del %RDS para todos los niveles de concentración de la curva de calibración, este valor se encuentra por debajo del 15%, excepto en la concentración de 7,0 ng/mL. Este comportamiento en los valores de la desviación estándar relativa se debe principalmente a la heterocedasticidad, evidenciada por la inconstancia de la variabilidad de la señal a lo largo de la curva. En este caso particular de %RSD alto a una única concentración (7,0 ng/mL), puede estar relacionada con la estabilidad del spray, con la disminución de la eficiencia de ionización o con variaciones en el volumen de inyección de esa muestra. En cuando al valor del %RSD > 15% del blanco, se atribuye al fuerte ruido instrumental ocasionado por el continuo flujo iónico, notorio en ausencia de analito.

En el Apéndice O se presenta la gráfica de la curva de calibración de las áreas de los picos cromatográficos para cada concentración, inyectada por triplicado.

Sin embargo, esta curva de calibración mostró una excelente linealidad, con un coeficiente de correlación de  $r^2 = 0,9975$ , descrito por la ecuación de regresión:

$$y = 70,581x - 18,632$$

Donde 'y' corresponde al área del pico cromatográfico y 'x' a la concentración de melatonina expresada en  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### ***5.9.2 Determinación del límite de detección, del límite de cuantificación y de la sensibilidad del método analítico.***

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se determinaron a partir de la desviación estándar de la señal del blanco y de la pendiente de la curva de calibración.

Las señales del blanco obtenidas fueron 85,321, 54,328, 82,328 unidades de área, con una desviación estándar de 17,10.

Aplicando las ecuaciones:

$$LOD = \frac{3 * S_b}{m} = \frac{3 * 17,10}{70,581} = 0,73 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$$

$$LOQ = \frac{10 * S_b}{m} = \frac{3 * 17,10}{70,581} = 2,42 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$$

Donde  $S_b$  corresponde a la desviación estándar del blanco y  $m$  a la pendiente de la curva de calibración. Al sustituir los valores, se obtuvieron valores de LOD de  $0,73 \pm 0,04 \text{ ng/mL}$  y LOQ de  $2,42 \pm 0,03 \text{ ng/mL}$ .

Estos resultados indican una buena sensibilidad analítica para la identificación y cuantificación de la melatonina por UPLC-QDa, con una pendiente de 70,581.

El análisis evidenció que estos se distribuyen aleatoriamente alrededor de cero, lo que indica que el modelo lineal describe adecuadamente la relación entre la señal analítica y la concentración del analito en el rango evaluado.

### **5.9.3 Reproducibilidad interdía**

La curva obtenida presentó una excelente linealidad con  $r^2 = 0.9988$ , descrita por la ecuación:

$$y = 74,927x - 25,86$$

### **5.9.4. Precisión intradía**

La repetibilidad del método se evaluó mediante inyecciones replicadas en cada nivel de concentración. Por ejemplo, para la concentración de  $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , las inyecciones replicadas mostraron una desviación estándar relativa (RSD) de aproximadamente 2,5 %, lo que indica una buena precisión instrumental. Igualmente, se observa que en concentraciones intermedias de  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , el %RSD se mantiene en 2,4, y para los niveles superiores a  $40 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , disminuye a 1,0.

### **5.9.5. Estabilidad cromatográfica**

La melatonina presentó un tiempo de retención constante de aproximadamente  $4,21 \pm 0,03$  minutos en todas las corridas cromatográficas. La baja variabilidad observada en el tiempo de retención demuestra una adecuada estabilidad cromatográfica del método y confirma la reproducibilidad de las condiciones de separación.

### **5.9.6. Evaluación del efecto matriz**

Las dos curvas de calibración construidas en dos días diferentes, usando la matriz vegetal, presentaron las siguientes ecuaciones de regresión:

$$\text{Ecuación Réplica (1): } y = 69,356x + 46,977$$

$$\text{Ecuación Réplica (2): } y = 61,185x + 71,2327$$

Con coeficientes  $r^2$  de 0,9913 y 0,9988, respectivamente, lo que indica una adecuada linealidad en el rango de 2–40 ng mL<sup>-1</sup>.

Como se puede observar, la pendiente entre una respuesta y otra varía; sin embargo, hay una leve disminución de la pendiente de la recta de calibración de la réplica 2 respecto a la réplica 1, lo cual se observa en la respuesta analítica del analito en presencia de componentes de la matriz. De este modo, el efecto matriz (EM) se estimó comparando las pendientes de ambas curvas mediante la ecuación 9, descrita en metodología:

Obteniéndose valores aproximados de 98,2 % (Réplica 1) y 86,6 % (Réplica 2). Este resultado indica una supresión moderada de la ionización, un fenómeno común en el análisis por espectrometría de masas debido a la presencia de compuestos coeluyentes que compiten por la fuente de ionización en el método de *electrospray*.

### 5.9.7. Determinación del porcentaje de recuperación en la extracción y exactitud

El porcentaje de recuperación fue calculado de acuerdo con la ecuación 10, descrita en la metodología, empleando como señal del analito en el solvente puro, las áreas calculadas en la tabla 4 para la concentración evaluada.

**Tabla 5**

#### *Determinación del porcentaje de recuperación en la extracción y exactitud*

Concentración Teórica (ng/mL)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Concentración determinada (ng/mL)	Promedio	%RSD	% Recuperación	Exactitud
5	297,201	288,406	305,603	4,23	297,07	2,9	89,4	0.846
25	1197,509	1208,430	1164,210	17,2	1190,05	1,9	69,8	0,688
40	2432,673	2242,912	2482,832	38,4	2386,14	2,6	82,3	0,96

*Nota.* %RSD: Desviación estándar relativa

La exactitud del método se evaluó mediante experimentos de recuperación en tres niveles de concentración (5, 25 y 40 ng/mL<sup>-1</sup>). Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre 89,4 %,

69,8 % y 82,3, con valores de precisión (RSD) inferiores al 3%, lo que indica una adecuada exactitud y reproducibilidad del método analítico. Estos resultados se encuentran dentro de los rangos aceptados para métodos basados en espectrometría de masas (Huang & Mazza, 2011). La mayor recuperación se observó en un nivel inferior de concentración (5,0 ng/mL) mientras que, para el nivel intermedio (25 ng/mL) hubo una drástica disminución lo que sugiere un fuerte efecto matriz o fenómenos de supresión iónica que afectan significativamente la respuesta del detector al analito.

## **5.9 Contenido de melatonina endógena**

### ***5.9.1 Resultados de melatonina endógena para aplicación vía aspersión, vía drench y para plantas adaptadas a luz solar***

En cuanto a la cuantificación de melatonina tanto en hojas como en raíces en los tratamientos de aplicación de melatonina vía **aspersión** y **drench**, no se logró determinar su concentración en el rango dinámico lineal.

Por otro lado, fue posible identificar y cuantificar melatonina presente en las muestras de material vegetal de hojas en el experimento de aplicación de melatonina 500  $\mu$ M por aspersión a plantas expuestas a adaptación lumínica. Se evidenció presencia de melatonina para algunas plantas expuestas a estrés (control luz y 500  $\mu$ M luz) con valores de desviación estándar más bajo; respecto a estas desviaciones debemos mencionar que, al tratarse de réplicas biológicas, las condiciones del crecimiento y fenómenos intrínsecos cada uno de los individuos del grupo dificultan la uniformidad en los datos. Sin embargo, para este ensayo se identificó la melatonina con un LOD en promedio entre 0,77 y 1,17 ng/mL para los controles y para los de tratamiento 500  $\mu$ M bajo condiciones de iluminación, estuvo entre 0,9 y 1,44 ng/mL. Esta observación no es

concluyente, ya que en promedio la diferencia en la concentración de melatonina entre tratamiento y control no es significativa.

**Tabla 6**

*Cuantificación de melatonina en experimento de adaptación lumínica con aspersión*

Tratamiento Adaptación lumínica Hojas	tR (min)	[ng/mL] Melatonina Réplica 1	[ng/mL] Melatonina Réplica 2	Prom. [Melatonina]	SD	
Control Luz	P1	4,22	0,74*	0,80*	0,77	0,03
	P2	4,23	ND	ND	ND	-
	P3	4,24	ND	ND	ND	-
	P4	4,23	ND	ND	ND	-
	P5	4,23	1,49*	0,86*	1,17	0,31
	P6	4,23	ND	ND	ND	-
500 $\mu$ M Luz	P1	4,23	0,99*	0,82*	0,90	0,08
	P2	4,23	ND	ND	ND	-
	P3	4,23	1,43*	1,44*	1,44	0,01
	P4	4,23	ND	ND	ND	-
	P5	4,23	ND	ND	ND	-
	P6	4,23	ND	ND	ND	-

*Nota.* Cuantificación de melatonina en hojas para experimento de adaptación lumínica pretratado con agua y melatonina 500  $\mu$ M (control luz y 500  $\mu$ M luz) mediante aspersión en 6 plántulas de copoazú. \*Concentración de melatonina identificada (LOD = 0,73 ng/mL) por debajo del LOQ.

## 6. Discusión

Los resultados obtenidos en los tres experimentos confirman que la respuesta morfológica de las plántulas de *Theobroma grandiflorum* (copoazú) a la aplicación exógena de melatonina está en gran medida condicionada por la circunstancia ambiental del entorno en el cual se encuentre la planta, el modo de aplicación y la concentración empleada. En ausencia de estrés abiótico (sin exposición a la luz solar directa), tanto la aplicación foliar como radicular

mostraron efectos limitados sobre el crecimiento de las plántulas, mientras que, en la adaptación a la luz, la melatonina ejerció un papel protector sobre ellas, causando la acumulación de biomasa y la estabilidad estructural.

En condiciones normales, los experimentos de aspersión y drench evidenciaron que las concentraciones evaluadas (50, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ) no generaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los parámetros morfológicos, incluyendo longitud y diámetro del tallo, número de hojas, área foliar, volumen y longitud radicular, así como biomasa seca. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Shi et al. (2015), quienes demostraron que la melatonina no tuvo efectos significativos en el crecimiento y los parámetros fisiológicos de la hierba bermuda cuando las plantas se encontraban en condiciones normales.

En concordancia, Jia et al. (2025) señalaron que la aplicación foliar de melatonina en soja no genera incrementos significativos en varios parámetros de crecimiento en ausencia de estrés, aun cuando se observan tendencias positivas. Asimismo, Jia et al. (2025) reportaron que, en algodón, la aplicación de melatonina vía radicular no promueve cambios morfológicos significativos cuando no existe una condición ambiental limitante. Por otro lado, Fan et al. (2024) reportaron que la aplicación de melatonina exógena por drench mejoró el crecimiento del rizoma de *Leymus chinensis*, con un aumento significativo en el diámetro basal. También indicaron que la melatonina puede aumentar o disminuir simultáneamente rasgos superficiales, sin alcanzar en varios casos significancia estadística, lo que evidencia una respuesta moderada y dependiente de la especie y la dosis.

Así pues, el efecto observado en el diámetro basal, tanto en aspersión (50 y 250  $\mu\text{M}$ ) como en drench (500  $\mu\text{M}$ ), propone que la melatonina puede influir sobre procesos asociados al engrosamiento de la raíz, lo cual coincide con lo descrito por Erland y Saxena (2018), quienes

indican que el efecto de la melatonina sobre la acumulación o inhibición de la morfogénesis varía entre especies, la concentración y el estado ambiental en el que se encuentre la planta.

Con el fin de corroborar lo anterior, se eligió la concentración de 500  $\mu\text{M}$  de melatonina para el experimento de estrés lumínico, debido a que los resultados de los estudios previos arrojaron una respuesta positiva a esta concentración. Si bien, no generó diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los parámetros bajo condiciones normales, mostró una tendencia favorable al incrementar la longitud del tallo, número de hojas, área foliar y biomasa seca de las hojas cuando se aplicó vía foliar, variables que se apreciaron inclusive visiblemente. Por lo anterior, el tratamiento de 500  $\mu\text{M}$  de melatonina, representó una dosis capaz de inducir respuestas morfológicas sin llegar a generar efectos negativos a las plántulas de copoazú, lo que la hizo la concentración adecuada para el uso de plantas bajo condiciones de estrés. Así mismo, la aplicación se realizó vía aspersion, ya que los análisis estadísticos de las redes de correlación arrojaron una mayor conectividad entre sus parámetros morfológicos en comparación con la vía drench.

Una vez realizado el experimento bajo adaptación lumínica, se evidenció que las plántulas bajo sombra en condiciones normales y tratadas con melatonina tenían un incremento significativo en el área foliar y volumen de la raíz. Este resultado concuerda con lo reportado por Tian et al. (2026), quienes señalan que la aplicación exógena de melatonina mejora la arquitectura de las raíces, incrementando la capacidad del sistema radicular para explorar y ocupar un mayor espacio del suelo y mejorar la absorción de agua y nutrientes, lo cual fortalece el soporte estructural y el desarrollo de la planta.

Por otro lado, los resultados revelaron que el estrés causado por la radiación solar directa redujo significativamente el número de hojas, diámetro basal y la biomasa seca de tallos, hojas y

raíces, evidenciando las consecuencias negativas de este estrés abiótico sobre el crecimiento de las plántulas. Este impacto puede deberse a la fotoinhibición del aparato fotosintético, la sobreacumulación de especies reactivas de oxígeno y a la reducción en las actividades de los órganos fuente y sumidero, lo que causa una reducción significativa en el crecimiento y la producción de biomasa (Hassan et al., 2022; Zeng et al., 2022).

Los efectos adversos causados por el estrés sometido fueron contrarrestados por la aplicación de la melatonina vía aspersión, donde las plántulas tratadas y bajo estrés presentaron incrementos significativos en la longitud de tallo, número de hojas, diámetro basal y en la biomasa seca de tallos, hojas y raíces. Este efecto mitigador de estrés concuerda con lo reportado por Shi et al. (2015), quienes demostraron que la melatonina activa redes metabólicas, transcriptómicas y antioxidantes que fortalecen la tolerancia al estrés abiótico.

De manera similar, Tian et al. (2026) reportaron que, bajo estrés hídrico, la melatonina promueve el incremento del diámetro basal y de la biomasa seca. Asimismo, Eisa et al. (2023) señalaron que, en especies perennes como *Ranunculus asiaticus*, la aplicación foliar de melatonina bajo estrés induce mejoras morfológicas, con incrementos marcados en la biomasa y otros parámetros algunos sin significancia estadística. Ambos estudios reportaron el aumento de parámetros morfológicos tras la aplicación de melatonina exógena, lo que concuerda con el presente estudio, señalando que altos niveles de esta indolamina puede hacer que las plantas tengan mayor tolerancia a condiciones de estrés más prolongadas, aumentando de esta manera su rendimiento (Eisa et al., 2023).

Los resultados de estos estudios indican que, el aumento del diámetro basal en las plántulas tratadas con melatonina bajo condiciones de estrés puede atribuirse a su capacidad para estimular procesos de crecimiento endógenos asociados al desarrollo de las raíces. Bajo

condiciones de estrés, la melatonina ayuda a la formación de raíces con un mayor diámetro, lo que favorece la adaptación de las plantas, mejorando la absorción y transporte de agua y nutrientes hacia los órganos aéreos. Este efecto de crecimiento radicular inducido por la melatonina está regulado por procesos fisiológicos modulados por auxinas, las cuales regulan la extensión de la pared celular y la arquitectura radicular.

Aunque la melatonina comparte el triptófano como precursor metabólico con el ácido indol-3-acético, no actúa como una auxina. Su función principal consiste en modular la actividad de diversas fitohormonas, mediante cambios en la expresión génica y en la regulación de factores de transcripción involucrados en las rutas de señalización hormonal, además de ejercer efectos directos sobre los tejidos vegetales (Erland y Saxena, 2018; Eisa et al., 2023). Por lo anterior, se puede señalar que la melatonina cumple un papel clave en el fortalecimiento, crecimiento y la estabilidad fisiológica de plántulas bajo condiciones de estrés (Ahmad et al., 2019).

Por otro lado, el aumento en la biomasa seca observado en plantas pretratadas con melatonina y expuestas al estrés refleja una mayor eficiencia en la asimilación y redistribución del carbono, asociada a la protección del aparato fotosintético, la regulación del metabolismo energético y la reducción del daño oxidativo (Ahmad et al., 2019; Zeng et al., 2022). Bajo condiciones de alto estrés por radiación solar, este compuesto contribuye además al mantenimiento de la actividad fotosintética, a la regulación de la apertura estomática y a la modulación de la síntesis de flavonoides, fortaleciendo los mecanismos de tolerancia al estrés (Zeng et al., 2022).

En síntesis, los resultados obtenidos tras el pretratamiento con melatonina indican que, al considerarse una molécula adaptativa, sus efectos son más evidentes en plantas que se encuentran en situaciones de estrés (Erland y Saxena, 2018). Como se evidenció en este estudio,

cuando las plántulas de copoazú crecieron bajo condiciones normales, su efecto fue limitado. Por tanto, se sugiere que la aplicación de melatonina en copoazú sea aplicada principalmente como una estrategia para el manejo del estrés abiótico. La concentración de 500  $\mu\text{M}$  vía foliar se estableció como una dosis eficaz para mitigar el estrés causado, promoviendo el desarrollo y la mejora morfológica en etapas tempranas del cultivo.

Por lo anterior, puede afirmarse que la melatonina aparte de actuar como una molécula señalizadora capaz de activar cascadas regulatorias que incluyen la modulación transcripcional y la activación de otras vías de señalización, también actúa en la estimulación de procesos de biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios, lo cual se refleja de manera clara a lo largo de esta discusión (Erland y Saxena, 2018).

La clorofila es un pigmento esencial implicado en la fotosíntesis, con un papel importante en la absorción y transmisión de la energía de la luz. En cuanto a los carotenoides, estos constituyen pigmentos con funciones fotoprotectoras, actuando como mecanismos de disipación del exceso de energía y previniendo el daño oxidativo en las células de las plantas (Ahmad et al., 2019).

En ausencia de estrés y bajo condiciones controladas de crecimiento, la melatonina por aspersión no generó incrementos significativos en los contenidos de clorofilas ni carotenoides, por tanto, la respuesta obtenida en los contenidos de estos pigmentos en plántulas de *Theobroma grandiflorum*, está asociada al rol fisiológico de la melatonina, haciendo que actué como regulador y protector del aparato fotosintético en plantas que se encuentran frente a situaciones de estrés, más que a un estimulador directo de la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos (Arnao & Hernández-Ruiz, 2019). En estudios recientes se puede evidenciar que, en ausencia de estrés, la respuesta a la melatonina puede ser nula o muy poca puesto que los sistemas antioxidantes y

fotosintéticos ya funcionan de manera eficiente y no existe necesidad de la planta para activar su papel protector (Yang et al., 2021; Jahan et al., 2021).

La aplicación por drench mostró la influencia entre los métodos de aplicación, al arrojar mayores contenidos de clorofilas y carotenoides a la concentración de 250  $\mu\text{M}$  de melatonina, siendo significativo el aumento de las clorofilas a esta concentración. Lo anterior indica que la absorción radicular puede favorecer a la circulación de la melatonina por toda la planta, permitiéndole actuar como un bioestimulante, ya que al ser una molécula anfipática atraviesa todas las membranas biológicas y las cutículas cerosas, permitiendo que se transporte a través del xilema desde las raíces al resto de los órganos de la planta con eficacia (Arnao & Hernández-Ruiz, 2019). Estos resultados son consistentes a un estudio realizado por Todorova et al. (2024), quienes evaluaron el efecto de la melatonina aplicada al suelo en plantas de trigo, donde se observó que en ausencia de estrés, la melatonina por sí sola no provocó cambios considerables en los contenidos de clorofilas ni en otros parámetros fotosintéticos, sin embargo, en este estudio se puede ver que al inicio del experimento, las plantas sin estrés tratadas con melatonina mantuvieron concentraciones ligeramente superiores de clorofila frente al control, demostrando un efecto protector temprano sobre el aparato fotosintético, por tanto, los datos de este estudio, sostienen la idea de que la melatonina aplicada directamente al suelo puede actuar de manera preparativa y protectora.

Por otro lado, cuando las plántulas de Copoazú fueron expuestas a luz solar directa durante un mes con un fotoperiodo de 8-12 horas de día, se generó una disminución significativa en los contenidos de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides, lo que se traduce en una afectación del aparato fotosintético debido al estrés abiótico al que fue sometido la planta. Este comportamiento es consistente con el carácter umbrófilo del copoazú, una especie arbórea

tropical adaptada a crecer en condiciones de sombra o semisombra y con baja tolerancia a la radiación solar directa durante sus primeras etapas de desarrollo. En cultivos y sistemas agroforestales, se ha observado que altas irradiancias solares pueden limitar su crecimiento y desarrollo, por lo cual el mantenerlas en ambientes de semisombra resulta importante para su adecuado crecimiento (OTCA, 2016). En concordancia, González Pérez (2016) reportó que plántulas de copoazú expuestas a luz directa presentaron una reducción en el contenido de clorofila total respecto a aquellas desarrolladas bajo sombra, acompañada de cambios en la coloración foliar asociados a daño por radiación, lo que confirma que la sombra constituye una condición óptima para su crecimiento en ambientes de alta luminosidad. Este efecto se relaciona con el impacto negativo del exceso de luz sobre el aparato fotosintético, el cual provoca una disminución de la eficiencia fotosintética, un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una degradación acelerada de los pigmentos fotosintéticos (Yang et al., 2021; Jahan et al., 2021).

En consecuencia, la aplicación exógena de melatonina (500  $\mu\text{M}$ ) a plantas de copoazú en esta condición de estrés abiótico, tuvo mayores contenidos de clorofila a, clorofila total y carotenoides respecto a su control con estrés, sin significancia estadística, pero con una tendencia clara a aumentar, lo que permite indicar que el tratamiento con melatonina redujo la degradación de clorofilas y carotenoides causada por la exposición a luz solar directa. Como se ha dicho anteriormente, la melatonina ejerce un efecto protector del aparato fotosintético que se atribuye especialmente a la reducción de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), la minimización del daño celular y la preservación de la integridad de las membranas y los pigmentos fotosintéticos. Además, la mejora de clorofilas y

carotenoides se atribuyeron a la regulación positiva de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de pigmentos (Karumannil et al., 2023).

También, el efecto protector de la melatonina sobre los pigmentos fotosintéticos bajo estrés lumínico podría estar asociado a su influencia sobre la senescencia de las hojas, el cual es uno de los principales síntomas de las lesiones causadas por el calor, esta se caracteriza por la pérdida del contenido de clorofila y de las actividades fotosintéticas de las hojas, debido a ROS/RNS. En especies perennes, se ha reportado que la melatonina inhibe la transcripción de genes relacionados con la senescencia, la síntesis de ácido abscísico ABA y promueve la producción de citoquinina, contribuyendo a mantener la funcionalidad fotosintética durante condiciones ambientales adversas (Zhang et al., 2017).

En conclusión, los resultados demuestran que la melatonina no incrementa los pigmentos fotosintéticos en *Theobroma grandiflorum* bajo condiciones normales de crecimiento, independientemente del método de aplicación usado. Sin embargo, su efecto protector se manifiesta con claridad cuando se encuentra en condiciones de estrés lumínico, donde mitiga la degradación de clorofilas y carotenoides y, ayuda a preservar la funcionalidad del aparato fotosintético.

Por otra parte, los metabolitos secundarios en las plantas desempeñan un papel fundamental en la supervivencia, adaptación y defensa de las plantas frente a condiciones ambientales adversas, depredadores y patógenos, además de actuar como moduladores del equilibrio redox celular. Derivan de las rutas del metabolismo primario (glucólisis, Krebs, shikimato). La biosíntesis de los compuestos fenólicos se origina principalmente a partir de la vía del ácido shikímico, donde la fenilalanina actúa como el precursor fundamental. La enzima clave, fenilalanina amonio liasa (PAL), cataliza la desaminación de la fenilalanina para producir

ácido cinámico, iniciando así la cascada de los fenilpropanoides. A partir de estos intermediarios se producen ácidos fenólicos simples y compuestos más complejos, como flavonoides, lignina y taninos (Bhatla & Lal, 2023).

Estos compuestos desempeñan en las plantas funciones estructurales y defensivas, ayudándolas frente a estreses bióticos y abióticos, incluyendo radiación, altas temperaturas y daño oxidativo. Dentro de estos compuestos, los flavonoides representan la subclase más abundante y diversa, por lo que en muchos tejidos vegetales su concentración puede superar a la de otros fenoles totales (Bhatla & Lal, 2023).

Los flavonoides se distinguen por tener una estructura de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y se sintetizan mediante la integración de precursores provenientes tanto de la vía del shikimato como de la vía acetato-malonato. La diferencia biosintética crucial con los compuestos fenólicos se encuentra en la intervención de la enzima Chalcona Sintasa (CHS), la cual cataliza la condensación de una molécula de *p*-coumaroyl-CoA con tres moléculas de malonil-CoA (Bhatla & Lal, 2023). Funcionalmente, los flavonoides están asociados a la fotoprotección y a la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tejidos fotosintéticos, por lo que se encuentra en mayor proporción en hojas jóvenes y plántulas (Patil et al., 2024; Erb y Kliebenstein, 2020). Lo anterior explica el comportamiento metabólico estrechamente relacionado entre fenoles totales y flavonoides observado experimentalmente.

En los experimentos realizados se obtuvo un mayor contenido de flavonoides totales respecto a los fenoles totales en plántulas de *Theobroma grandiflorum*, lo que puede atribuirse, por una parte, a las diferencias en los métodos analíticos usados para la determinación de ambos metabolitos y, por otra, a los contenidos de estos en el copoazú. La determinación de flavonoides por el método colorimétrico descrito por Pérez et al. (2014), presenta una alta sensibilidad para

esta clase de compuestos. Por el contrario, el método de Folin–Ciocalteu arroja el contenido fenólico total de manera indirecta, teniendo en cuenta la capacidad reductora de la muestra, por lo que puede variar entre los distintos compuestos fenólicos y no contar aquellos con menor reactividad frente al reactivo (Everette et al., 2010). También, un estudio de compuestos fenólicos realizado por (Zeidi et al., 2025) indicó tras un análisis por HPLC, que la melatonina tiene un papel estimulante mayor en la acumulación de flavonoides que en los ácidos fenólicos en las células de *B. vulgaris*.

La melatonina se conoce como una molécula con una elevada capacidad antioxidante en plantas, actuando tanto de manera directa, por medio de la neutralización de ROS y RNS, como de forma indirecta, modulando la actividad de diversas enzimas antioxidantes encargadas del metabolismo secundario y de eliminar radicales libres. La expresión de enzimas antioxidantes (SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; POD, peroxidasas encargadas del exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es inducida por la melatonina para de esta forma restaurar la homeostasis redox y controlar los niveles de ROS (Zeng et al., 2022). Además, el carácter anfifílico de esta molécula hace que tenga una alta movilidad dentro de los tejidos vegetales, permitiendo su translocación y acción sistémica tras aplicaciones exógenas, ya sea por vía foliar (aspersión) o radicular (drench) (Arnao y Hernández-Ruiz, 2019). Esta disponibilidad sistémica es importante para comprender los resultados obtenidos, que muestran efectos tanto en hojas como en raíces, incluso cuando la aplicación se realiza de forma localizada en alguna de ellas.

En la aplicación de melatonina por aspersión foliar en condiciones normales (sin estrés), se observó una disminución en los contenidos de fenoles totales y flavonoides totales en comparación con el control a excepción de la aplicación 50 µM de melatonina que arrojó un aumento estadísticamente significativo en el contenido de flavonoides totales en raíces. La

respuesta de la melatonina al disminuir el contenido de fenoles totales y flavonoides totales concuerda con lo reportado por Meng et al. (2019), quienes evidenciaron que la aplicación exógena de melatonina en bayas de uva en ausencia de estrés generó una disminución en los compuestos fenólicos y flavonoides, junto con modificaciones en la actividad antioxidante. Por lo anterior, se puede indicar de manera general que, bajo condiciones no estresantes, la melatonina puede reducir la necesidad de activar rutas metabólicas que están asociadas a la síntesis de metabolitos fenólicos. También, este comportamiento puede deberse al alto poder antioxidante que tiene la melatonina, la cual ayuda a mantener el equilibrio redox celular, reduciendo la acumulación de ROS, las cuales, además de su efecto dañino, cumplen una función señalizadora en la activación del metabolismo fenólico. Por lo anterior, la planta podría priorizar la homeostasis, haciendo que haya una menor activación de rutas biosintéticas secundarias (Arnao y Hernández-Ruiz, 2014).

En contraste, la aplicación de melatonina por drench evidenció una respuesta dosis-dependiente y órgano-específica. En hojas, las concentraciones intermedias mostraron los mayores contenidos de fenoles y flavonoides, sin llegar a ser estadísticamente significativos. Por otro lado, en raíces el contenido más alto se observó a la mayor concentración evaluada (500  $\mu\text{M}$ ), principalmente para el contenido de flavonoides en raíz, la cual fue la única que tuvo diferencias estadísticamente significativas. Este comportamiento es consistente con lo reportado por Imran et al. (2021) y Dawood y El-Awadi (2015), quienes observaron incrementos de estos metabolitos tras aplicaciones radiculares de melatonina en plantas no sometidas a estrés. Estos resultados sugieren una modulación del metabolismo secundario por medio de la ruta de los fenilpropanoides, a través del aumento de la expresión del gen fenilalanina amonio-liasa (PAL) como parte de mecanismos de señalización, defensa química o regulación del ambiente, ya que

como se mencionó, los compuestos fenólicos desempeñan importantes funciones fisiológicas y tienen un papel esencial en procesos vitales del desarrollo como la división celular, la regulación hormonal, la actividad fotosintética y la reproducción aun cuando no se encuentre en condiciones ambientales adversas (Ahammed et al., 2020; Ahlawat et al., 2024).

La razón por la cual, podemos observar que en ausencia de estrés la melatonina exógena aumenta el contenido de flavonoides totales en la raíz por ambas vías de aplicación a diferentes concentraciones, puede deberse a que estos metabolitos desempeñan un papel importante en la modulación de las interacciones entre las raíces y el entorno del suelo, ya que actúan como señales químicas que la raíz envía al suelo para atraer bacterias beneficiosas e iniciar la simbiosis, por lo que los flavonoides activan la formación de nódulos, donde ocurre la fijación de nitrógeno y regulan el flujo de auxinas para modificar la estructura de la raíz. En concordancia, se ha reportado en varias investigaciones que las sustancias fenólicas se encuentran estrechamente relacionadas con la formación de raíces, la cual muestra que entre mayor sea el contenido de antocianinas y algunos flavonoides en las plántulas, más evidente será el efecto en la formación de raíces (Xu et al., 2025; Patil et al., 2024). Por otro lado, la respuesta observada confirma que la melatonina no solo es absorbida por la planta, sino integrada en su red de señalización sistémica, con efectos diferenciados según el órgano y la concentración aplicada (Arnao y Hernández-Ruiz, 2019; Mannino et al., 2021).

La exposición de *Theobroma grandiflorum* a radiación solar directa por un periodo prolongado, provocó disminución en los contenidos de fenoles totales y flavonoides totales en hojas y raíces, por lo que esta exposición representó un gran desafío fisiológico para la planta, al aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los cloroplastos, como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, los cuales, además de causar daño

oxidativo, actúan como señales que activan rutas metabólicas defensivas, entre ellas la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides (Sadak et al., 2020; Mustafa et al., 2010).

Ante esta condición de estrés por alta radiación solar, la aplicación exógena de melatonina incrementó significativamente los contenidos de fenoles y flavonoides totales en hojas y raíces, lo que indica su papel en la mitigación del daño oxidativo. Aunque existen pocos estudios específicos bajo estrés lumínico, investigaciones en otros tipos de estrés abiótico han mostrado respuestas similares. Jafari & Shahsavari (2021) e Imran et al. (2021) reportaron incrementos de estos metabolitos asociados a una mejora en la capacidad antioxidante y en la homeostasis redox, atribuidos a la activación de enzimas clave de la ruta de los fenilpropanoides, argumentando que el mayor contenido de flavonoides totales bajo situación de estrés abiótico se da por una mayor actividad de la fenilalanina amoníaco liasa (PAL) y niveles más altos de fenilpropanoides que catalizan la producción de ácido cinámico como precursor de los flavonoides. En este sentido, la melatonina puede actuar tanto como antioxidante directo como molécula señalizadora, modulando la expresión génica asociada al metabolismo fenólico y favoreciendo una respuesta metabólica eficiente sin comprometer el estado fisiológico de la planta (Sadak et al., 2020).

En resumen, los resultados indican que la respuesta de los fenoles y flavonoides en *Theobroma grandiflorum* frente a la aplicación de melatonina depende del método de aplicación, la concentración, el órgano evaluado y la presencia de estrés abiótico. Mientras que en condiciones normales la melatonina tiende a modular o reducir la síntesis de estos metabolitos, favoreciendo la homeostasis redox, bajo estrés lumínico actúa como un regulador clave del metabolismo fenólico, contribuyendo a la mitigación del daño oxidativo.

En este contexto, es importante considerar que dichas respuestas del metabolismo secundario están vinculadas al funcionamiento del metabolismo primario. Este último es importante para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas. Estos metabolitos primarios actúan como moléculas de señalización para desencadenar respuestas defensivas por medio de la transducción de señales y reconocimiento de patógenos. El metabolismo primario comprende variedad de sustancias orgánicas, como carbohidratos, proteínas y lípidos, los cuales son esenciales en los procesos fisiológicos de las plantas (Shiade et al., 2024).

Los carbohidratos, como glucosa, fructosa y sacarosa, cumplen funciones fundamentales en las plantas, ya que sirven como la principal fuente de energía para procesos metabólicos clave, como la respiración y la fotosíntesis. Además, la acumulación de estas sustancias ha sido asociada con la tolerancia al estrés osmótico, incluyendo condiciones como estrés oxidativo, salino y déficit hídrico. También, los carbohidratos participan en la síntesis de la pared celular, la regulación osmótica y la transducción de señales. En conclusión, estos compuestos además de actuar como fuentes esenciales de energía para funciones metabólicas críticas también mejoran la capacidad adaptativa y la tolerancia de las plantas frente a condiciones ambientales adversas (Shiade et al., 2024).

La biosíntesis de carbohidratos en plantas inicia en los cloroplastos mediante el ciclo de Calvin, donde el CO<sub>2</sub> es fijado por la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) y convertido en triosas fosfatos. Estos intermediarios pueden convertirse en almidón dentro del cloroplasto o ser exportados al citosol para convertirse en sacarosa, la cual es la forma principal de transporte de carbohidrato a través del floema a toda la planta. En los tejidos “fuente”, como hojas, tallos verdes y vainas, la sacarosa sintetizada se moviliza a larga distancia a través del floema hacia los tejidos “sumidero”, incluyendo órganos en desarrollo, polen, raíces y frutos,

donde es utilizada para el crecimiento, la respiración o el almacenamiento. El metabolismo y la acumulación de sacarosa están regulados por distintas de enzimas clave, entre ellas, la sacarosa fosfato sintasa (SPS), responsable principal de su biosíntesis, la sacarosa sintasa (SS), que cataliza de manera reversible la síntesis de sacarosa e hidrólisis de sacarosa, y las invertasas, que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa (Zhong et al., 2020). Esta información, permite interpretar los cambios observados en el contenido de carbohidratos totales en los experimentos realizados en esta tesis.

En ausencia de estrés ambiental, la aplicación de melatonina por aspersión mostró un ligero incremento de carbohidratos totales en hojas a concentraciones intermedias (250  $\mu\text{M}$ ). En raíz, por el contrario, se observó una disminución de azúcares respecto al control. Lo anterior, concuerda con lo reportado por Jahan et al. (2023), quienes observaron que, en ausencia de estrés, la aplicación de melatonina vía foliar mantuvo los contenidos de almidón, fructuosa y glucosa semejantes al control, al igual que la actividad de enzimas clave como la SPS y SS. De manera similar, Zhong et al. (2020) mostraron que la melatonina induce solo aumentos leves en azúcares solubles a concentraciones moderadas, mientras que dosis elevadas tienden a reducir su acumulación, lo cual coincide con la disminución observada en hojas de copoazú a 500  $\mu\text{M}$ . La tendencia observada indica que, bajo condiciones óptimas, la melatonina no actúa como un estimulador directo de la biosíntesis de carbohidratos, sino como un regulador que mantiene el equilibrio metabólico fuente-sumidero sin promover su acumulación. Por otra parte, la respuesta observada en las raíces puede sugerir una menor redistribución de fotoasimilados hacia este órgano cuando la melatonina se aplica vía foliar.

En contraste, la aplicación de melatonina por drench generó una redistribución un poco más clara de los carbohidratos hacia el sistema radicular. A la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , se

observó un ligero incremento de carbohidratos totales en raíces, sin llegar a ser significativo, mientras que en hojas los aumentos fueron mucho menores y se presentaron principalmente a concentraciones más altas, también sin significancia estadística. Esta respuesta indica que la aplicación vía radicular de melatonina podría favorecer el aumento de carbohidratos en órganos sumidero. Estudios previos han mostrado que la melatonina aplicada al suelo puede estimular la acumulación de azúcares solubles en las raíces, favoreciendo una mayor capacidad metabólica y estructural del sistema radicular. Así, el aumento observado cuando se aplica melatonina vía radicular podría atribuirse a un mayor transporte de carbohidratos desde las hojas hacia las raíces, acompañado de una menor tasa de utilización respiratoria, lo que favorece su acumulación (Sarropoulou et al., 2012).

Por su parte, bajo condiciones de adaptación lumínica, el metabolismo del carbono se ve afectado, ya que este tipo de estrés altera la estructura y funcionalidad de los cloroplastos, reduce la eficiencia del fotosistema II, disminuye la conductancia estomática y la concentración intracelular de CO<sub>2</sub>. Además, este tipo de estrés restringe la translocación de carbohidratos desde los órganos fuente hacia los sumideros y altera la expresión de genes involucrados en el metabolismo de azúcares (Hassan et al., 2022). Sin embargo, la aplicación exógena de melatonina vía foliar en plantas sometidas a alta radiación solar ayudó a mitigar estos efectos del estrés por alta radiación solar, lo que se tradujo en un aumento en los contenidos de carbohidratos totales sin lograr alcanzar significancia estadística tanto en hojas como en raíces. Esta respuesta sostiene el papel de la melatonina como posible modulador positivo sobre el metabolismo del carbono, ayudando a preservar los azúcares totales en plantas bajo condiciones de estrés.

Lo anterior, es sostenido por diversos estudios, los cuales han demostrado que la melatonina puede influir directamente en la biosíntesis y acumulación de carbohidratos por medio de la regulación de enzimas clave del metabolismo del carbono, como RuBisCO, sacarosa sintasa, invertasas y fructoquinasa, así como en la mejora de la eficiencia fotosintética y la protección del aparato fotosintético frente al estrés oxidativo. (Arnao et al., 2021). De igual forma, Iqbal et al. (2021) reportaron que la melatonina incrementa la actividad de la sacarosa sintasa y las invertasas bajo condiciones de estrés, favoreciendo la movilización de carbono desde los órganos fuente hacia los órganos sumidero con mayores demandas energéticas. Asimismo, informaron que la expresión aumentada de genes asociados a la sacarosa fosfato sintasa aumenta la tolerancia al calor.

Además, los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con lo reportado por Jahan et al. (2023), quienes demostraron que la aplicación de melatonina incrementa el contenido total de azúcares solubles y potencia la actividad de enzimas antioxidantes, lo que se traduce en una mayor resistencia de las plantas y una mejor capacidad de adaptación de ellas frente a condiciones ambientales adversas. Estos autores también destacaron el papel de la sacarosa como molécula osmoprotectora y antioxidante, contribuyendo a la eliminación de especies reactivas de oxígeno y al mantenimiento de la integridad celular durante el estrés abiótico. En concordancia, Campos et al. (2019) evidenciaron que, bajo estrés, la melatonina induce una redistribución de azúcares desde las hojas hacia las raíces, favoreciendo la supervivencia de la planta mediante un ajuste del flujo de carbono, lo que coincide con el incremento de carbohidratos totales observado a concentraciones elevadas de melatonina en este estudio.

Entonces, en cuanto a los carbohidratos totales, los resultados obtenidos en *Theobroma grandiflorum* indican que la melatonina no los incrementa de forma significativa cuando las

plantas crecen bajo condiciones normales, independientemente del modo de aplicación. Sin embargo, bajo radiación solar directa, donde las plántulas están en condiciones de adaptación a la luz, su efecto se hace más visible, promoviendo la acumulación y redistribución de carbohidratos a los órganos vegetales, que a pesar que no logró ser estadísticamente significativa en este estudio, refuerzan la idea de que la melatonina actúa principalmente como un regulador del metabolismo del carbono y ayuda a promover la actividad de enzimas claves para su acumulación en situaciones de estrés abiótico.

Por otra parte, las proteínas en las células vegetales son uno de los componentes más importantes, ya que son ejecutores finales de procesos metabólicos, estructurales y reguladores, por lo que tienen un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis celular. Se tiene conocimiento de que los cambios en la expresión o acumulación de proteínas en las plantas suelen ser más sensibles que los cambios en la fisiología vegetal, lo que permite detectar modificaciones en la expresión proteica incluso sin variaciones evidentes en los parámetros fisiológicos (Song et al., 2025).

El nitrógeno es un macronutriente indispensable para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que es una unidad clave en las proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofilas y diversas fitohormonas, por ello, su deficiencia afecta significativamente el rendimiento de los cultivos (Erdal, 2019). Por lo anterior, se ha demostrado que las vías metabólicas del carbono y del nitrógeno trabajan de manera coordinada para regular numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas. Específicamente, la fijación de carbono mediada por la fotosíntesis se encuentra influenciada por factores ambientales como la disponibilidad de nitrógeno (Jahan et al., 2023).

La asimilación de nitrógeno se da principalmente en las raíces en forma de iones inorgánicos, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), absorbidos del suelo. El nitrato, que constituye la fuente predominante en muchos sistemas agrícolas, se reduce inicialmente a nitrito mediante la acción de la nitrato reductasa (NR) en el citosol y posteriormente a amonio por la nitrito reductasa (NiR) en los plástidos. Debido a que los cultivos requieren menos energía para absorber  $\text{NH}_4^+$ , por lo general prefieren usarlo como fuente de nitrógeno. Sin embargo, el amonio puede ser tóxico cuando se acumula en altas concentraciones, este es rápidamente incorporado a esqueletos carbonados para formar glutamina y glutamato a través del sistema enzimático glutamina sintetasa/glutamato oxoglutarato aminotransferasa (GS/GOGAT), o mediante rutas alternativas como la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Erdal, 2019).

Este proceso de asimilación del nitrógeno es fundamental para el crecimiento de las plantas, ya que permite la síntesis de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados necesarios para la formación de proteínas. La biosíntesis de aminoácidos y proteínas requiere energía, poder reductor y esqueletos carbonados derivados de la fotosíntesis y la respiración celular (Erdal, 2019; Jahan et al., 2023).

En los resultados obtenidos en el presente estudio, la aplicación de melatonina vía aspersión a diferentes concentraciones causó una disminución del contenido de proteínas solubles totales en hojas, teniendo el contenido más bajo la concentración de 500  $\mu\text{M}$ , mientras que en raíces se observó un incremento significativo a esta misma concentración. Este comportamiento entre órganos de las plántulas de copoazú podría sugerir que la melatonina estaría modulando la redistribución del metabolismo del nitrógeno dentro de la planta. Resultados similares han sido reportados en plántulas de tomate, donde la aplicación de melatonina vía aspersión bajo condiciones normales no evidenció cambios significativos en la

acumulación de nitrógeno en hojas y tallos, pero sí un aumento significativo de nitrógeno en raíces (Jahan et al., 2023).

También, Duan et al. (2022) confirma este mismo comportamiento, donde observaron que la aplicación de melatonina vía aspersion incrementa significativamente el contenido de proteínas solubles en las raíces de plántulas de algodón incluso cuando las plantas no estaban sometidas a estrés abiótico. Este aumento lo relacionaron con la capacidad de la melatonina para mantener la integridad de las membranas celulares y promover la síntesis de proteínas y otros compuestos solubles en las plantas. De acuerdo a esto, el incremento observado en las raíces de copoazú podría deberse una mayor actividad metabólica en ellas, relacionada con la asimilación de nitrógeno y la producción de aminoácidos para una mayor síntesis proteica.

Por otro lado, la disminución del contenido de proteínas en hojas tras la aplicación foliar de melatonina concuerda con un estudio realizado por Manafi et al. (2022) quienes reportaron que, a temperatura ambiente, las plantas de fresa no presentaron un incremento significativo en el contenido de proteínas solubles en hojas tras la aplicación de melatonina a concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Estos resultados sugieren que la melatonina puede regular enzimas relacionadas con la absorción y el metabolismo del nitrógeno, como la nitrato reductasa y la glutamina sintetasa, favoreciendo la síntesis de aminoácidos y proteínas cuando las condiciones de la planta lo requieren (Manafi et al., 2022).

En contraste con la aspersion foliar, la aplicación de melatonina vía drench promovió incrementos significativos en el contenido de proteínas en hojas a las concentraciones de 50 y 500  $\mu\text{M}$ , mientras que en raíces se observó una disminución significativa a 250  $\mu\text{M}$ . Estas diferencias pueden explicarse por la forma en que la melatonina es absorbida y transportada dentro de la planta. Resultados comparables han sido reportados en hojas de kiwi, donde la

aplicación de melatonina vía radicular incrementó el contenido de proteínas solubles durante las primeras etapas del tratamiento, contribuyendo al mantenimiento del equilibrio metabólico celular y retrasando los procesos de senescencia natural de las hojas (Liang et al., 2018).

Los resultados obtenidos tras la aplicación de melatonina mediante aspersión foliar y drench son consistentes con lo reportado por Li et al. (2017), quienes demostraron que la melatonina puede actuar como una señal sistémica capaz de inducir cambios en la expresión de genes involucrados en cascadas de señalización que incluyen diversas proteínas en órganos distantes de *Citrullus lanatus L.*, a través de transporte de larga distancia. En dicho estudio se observó que la aplicación local de melatonina por aspersión o drench induce la expresión sistémica de genes en raíces u hojas distantes no tratadas, respectivamente. Estos hallazgos indican que la melatonina puede ser transportada desde los tejidos tratados hacia tejidos distantes no tratados a través del sistema vascular de la planta (Li et al., 2017).

Por otra parte, los resultados obtenidos para el experimento en plantas expuestas a adaptación lumínica evidenciaron que el contenido de proteínas solubles totales en plántulas de copoazú está relacionado con el órgano vegetal y con la condición lumínica a la que se encuentra sometida la planta. En hojas, las plantas control expuestas a luz solar tuvieron un aumento significativo en el contenido de proteínas respecto al control sombra, por otro lado, la aplicación de melatonina 500  $\mu\text{M}$  incrementó significativamente este contenido en plantas mantenidas en condiciones de sombra, mientras que bajo condiciones de adaptación lumínica los valores observados en plantas tratadas con melatonina fueron ligeramente menores a los del control expuesto al estrés. En contraste, en raíces el mayor contenido proteico estuvo en el control sombra, y se evidenció que la exposición a alta radiación solar redujo el contenido de proteínas

solubles, sin embargo, la aplicación de melatonina promovió un incremento significativo, revirtiendo esta disminución causada por el estrés abiótico.

La acumulación de proteínas observada en las hojas bajo condiciones de estrés por adaptación lumínica puede estar asociada con la activación de proteínas de choque térmico (HSP) y de factores de transcripción de choque térmico (HSF), los cuales son un mecanismo importante de defensa de las plantas en condiciones ambientales adversas. Cuando las plantas son sometidas a estrés, activan la expresión de genes que se encuentran poco expresados en condiciones ambientales normales, lo que hace que exista un aumento en la síntesis de grupos proteicos. En condiciones de calor se inducen las proteínas HSP, consideradas proteínas inducidas por estrés, las cuales protegen a las células de lesiones y favorecen la recuperación de las plantas cuando regresan a condiciones normales. Algunas de estas proteínas, como las HSps, actúan como chaperonas moleculares, disminuyendo el daño causado por el estrés por calor al evitar la desnaturalización, agregación o degradación de otras proteínas (Thapa & Shrestha, 2022).

Resultados similares han sido reportados por Manafi et al. (2022) y Raza et al. (2022), quienes observaron que, tras exponer las plantas a condiciones de estrés por calor, se incrementó la expresión de HSP y causaron un aumento en el contenido de proteínas solubles. La expresión de estas proteínas se encuentra regulada por factores de transcripción de choque térmico (HSF), los cuales se activan por cambios en las condiciones ambientales y promueven la transcripción de diferentes familias de HSP, como HSP40, HSP70, HSP90, HSP100 y las pequeñas HSP, todas ellas ayudan en el mantenimiento de la homeostasis celular y tienen un papel importante en diferentes procesos de desarrollo (Manafi et al., 2022). La inhibición de HSP90 y HSP70 causa un aumento en la producción de  $H_2O_2$ , generando estrés oxidativo en las plantas e incluso muerte

celular, por lo que la sobreexpresión de estas proteínas incrementa la tolerancia de las plantas a altas temperaturas (Raza et al., 2022). Asimismo, los HSF, como HsfA2, participan en la regulación del sistema antioxidante y en la eliminación de especies reactivas de oxígeno generados durante el estrés. En consecuencia, esto sugiere que la acumulación de proteínas observadas en las hojas de plantas control sometidas a estrés podría estar relacionada con la activación de mecanismos de defensa y con la regulación de factores de transcripción que permiten a las plántulas de copoazú mantener la integridad de las proteínas solubles y mejorar su tolerancia frente a condiciones de estrés ambiental (Imran et al., 2021).

También, se ha reportado que las plantas como estrategia para tolerar el estrés abiótico, produce osmoprotectores, entre ellos, azúcares, proteínas solubles, prolina y aminoácidos libres totales, los cuales contribuyen al ajuste osmótico celular, la estabilización de enzimas y proteínas, la desintoxicación de ROS y la protección de la integridad de las membranas celulares (Ahmad et al., 2019). Por lo tanto, el incremento en el contenido de proteínas en hojas bajo estrés podría deberse también, a una respuesta fisiológica para mantener la estabilidad celular y mitigar el daño inducido por el estrés.

Por el contrario, las hojas de las plantas tratadas con melatonina bajo adaptación lumínica tuvieron un contenido proteico ligeramente menor que el control con estrés, lo cual podría estar relacionado con el papel regulador de esta molécula sobre la homeostasis de proteínas. Resultados similares han sido reportados en plantas de fresa, donde la aplicación de melatonina bajo estrés térmico no arrojó incrementos significativos en el contenido proteico a algunas concentraciones, lo que sugiere que su función puede estar más relacionada con la protección y estabilidad de las proteínas existentes en hojas cuando están sometidas a estrés (Manafi et al., 2022). Además, esta ligera disminución de proteínas podría deberse a que si bien, el estrés

abiótico aumenta las proteínas protectoras, limita la síntesis de proteínas metabólicas, por lo que la aplicación de melatonina evita la acumulación excesiva de estas proteínas protectoras y promueve la asimilación de nitrógeno por medio de la regulación positiva de actividades enzimáticas clave, como nitrato reductasa (NR), glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH), ayudando a mantener el contenido de proteínas solubles en hojas sin llegar a aumentarlo (Cao et al., 2022).

Por otra parte, el aumento significativo del contenido de proteínas en hojas tratadas con melatonina en condiciones normales podría estar relacionado con la regulación del metabolismo del carbono y del nitrógeno. Se ha demostrado que la melatonina puede estimular la actividad de la Rubisco y aumentar los niveles de proteína, lo que implica una mayor eficiencia del ciclo de Calvin y metabolismo del nitrógeno (Jia et al., 2025). Además de su papel en la protección de proteínas, la melatonina puede actuar de forma preventiva preparando a las plantas para antes de que ocurra una situación de estrés, lo que mejora el rendimiento de los cultivos en condiciones favorables y, sobre todo, en condiciones ambientales adversas (Kołodziejczyk et al., 2016).

En cuanto a las raíces, el contenido de proteínas solubles fue significativamente menor que en las hojas, independientemente del tratamiento aplicado. Esta diferencia se relaciona con la función fisiológica específica de cada órgano. Las hojas son el principal órgano fotosintético y metabólicamente activo de la planta, y presentan una elevada abundancia de proteínas asociadas a la fotosíntesis, el metabolismo del carbono y la asimilación de nitrógeno, lo que hace que haya un mayor contenido de proteínas. Por otro lado, las raíces cumplen principalmente funciones en la absorción de agua y nutrientes y su transporte hacia la parte aérea a través del xilema, por esto, su proteoma está dominado por proteínas relacionadas con transporte, metabolismo básico,

señalización y respuesta al estrés, mostrando una actividad metabólica diferente y menor acumulación de proteínas fotosintéticas que en las hojas (Mooney et al., 2006; Liu et al., 2015).

Sin embargo, bajo condiciones de estrés, la melatonina promovió un aumento significativo del contenido de proteínas en raíces expuestas a alta radiación solar, lo que sugiere un efecto protector de esta molécula frente a esta condición. Este comportamiento ha sido reportado por Duan et al. (2022) y Zhang et al. (2025) en plántulas de algodón, donde la aplicación de melatonina favoreció la acumulación de proteínas solubles en las raíces bajo condiciones de estrés salino y de sequía, respectivamente. Ambos estudios argumentan que el tratamiento con melatonina puede aumentar las sustancias reguladoras osmóticas y mantener la integridad de las membranas celulares de las plantas, ayudando a aliviar de manera eficaz el daño radicular causado por el estrés ambiental.

Además, se ha reportado que la melatonina promueve la protección de las proteínas por medio de la estimulación de síntesis y expresión de proteínas de choque térmico (HSP) y genes sensibles al estrés, que, a su vez, puede reducir la acumulación de proteínas desnaturalizadas por medio de mecanismos para su reparación o degradación, lo que permite mantener estables los contenidos de proteínas solubles en condiciones adversas (Xu et al., 2016). En condiciones de estrés, suelen alterarse las relaciones fuente–sumidero debido a la disminución de la asimilación de carbono y a cambios en la partición y distribución de carbono y nitrógeno, lo que afecta negativamente el metabolismo de proteínas y almidón, que causa reducción de la producción y calidad de los cultivos. La melatonina puede mitigar estos efectos protegiendo las proteínas de la oxidación y el plegamiento incorrecto bajo estrés por luz, además de aumentar la biosíntesis de enzimas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, incrementar el contenido de nitrato y

reducir la acumulación de amonio en las plántulas, ayudando así a mantener la estabilidad metabólica de las plantas en condiciones adversas (Hassan et al., 2022).

En resumen, los resultados obtenidos en los tres experimentos indican que la melatonina ejerce un efecto modulador sobre el contenido de proteínas solubles en plántulas de copoazú, lo que contribuye a mejorar la estabilidad metabólica y promover la tolerancia frente a condiciones de estrés abiótico. La melatonina es una indolamina que no solo actúa como un agente protector eficaz frente a condiciones ambientales adversas, sino que también tiene un papel clave como compuesto modulador del metabolismo vegetal, que mejora las respuestas fisiológicas de las plantas, favoreciendo su crecimiento, desarrollo y adaptación a condiciones ambientales cambiantes.

Integrando los resultados obtenidos a lo largo del estudio, se pudo analizar mediante redes de correlación, la conectividad entre todas las variables estudiadas, donde se pudo determinar que la respuesta de las plántulas de copoazú frente a la aplicación de melatonina depende tanto de la vía de aplicación como de las condiciones ambientales.

La aplicación vía aspersión foliar mostró una mayor conectividad entre variables en comparación con la aplicación vía drench, lo que indica una respuesta más integrada del sistema vegetal. Este resultado concuerda con lo reportado por Ahmad et al. (2019), quienes observaron que la pulverización foliar de melatonina promueve mejoras simultáneas en distintas variables fisiológicas y bioquímicas, mientras que su aplicación al suelo puede disminuir los efectos beneficiosos de esta molécula. En consecuencia, la aspersión foliar se seleccionó como la estrategia más adecuada para el experimento de adaptación lumínica, al favorecer una respuesta sistémica más conectada. Por otra parte, la menor conectividad observada entre variables y entre grupos de parámetros evaluados, concuerda con lo descrito por Shi et al. (2015), quienes

reportaron que las plantas en condiciones normales no presentaban efectos marcados en parámetros morfológicos y bioquímicos tras la aplicación de melatonina. De forma similar, en el experimento de adaptación lumínica, las plantas mantenidas en sombra mostraron un comportamiento más independiente entre variables, lo que muestra que, en ausencia de estrés abiótico, los efectos de la melatonina son menos visibles.

En contraste con los resultados obtenidos en condiciones ambientales normales, el experimento de adaptación a la luz en plántulas estresadas mostró un aumento en la conectividad entre variables y entre los diferentes grupos de parámetros evaluados, lo que sugiere una mayor integración funcional del sistema vegetal tras la aplicación de melatonina. En condiciones de estrés abiótico, esta molécula tiende a coordinar procesos fisiológicos y bioquímicos, incluyendo la regulación del crecimiento, la síntesis de metabolitos primarios y secundarios, y la protección del aparato fotosintético, para mantener la homeostasis celular. En este sentido, la melatonina ha sido ampliamente descrita tanto como una molécula señalizadora, capaz de inducir respuestas fisiológicas al estrés mediante la activación de vías biosintéticas, como un modulador que regula la intensidad de estos procesos y contribuye a mantener el equilibrio redox, lo que la convierte en una molécula eficaz en la mitigación del estrés (Sharma et al., 2024; Erland y Saxena, 2018). Además, las conexiones e interacciones entre hojas y raíces en la red de correlación se entienden debido a que la melatonina puede actuar como una señal sistémica permitiendo obtener efectos en órganos distantes (Li et al., 2017).

En conclusión, las redes de correlación evidencian que la melatonina no solo influye en variables individuales, sino que también favorece una mayor coordinación entre procesos morfológicos y bioquímicos, sobre todo en plántulas bajo condiciones de estrés.

Al realizar el método analítico por UPLC-QDa para la determinación de melatonina en hojas y raíces de plántulas de copoazú en los diferentes tratamientos, se pudo apreciar que, aunque se observaron diferencias significativas en la pendiente entre las curvas obtenidas en distintos días, la alta correlación confirma la robustez y la reproducibilidad del método. Sin embargo, dichas variaciones en la pendiente son comunes en métodos basados en espectrometría de masas debido a cambios menores en la eficiencia de ionización.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el método desarrollado para la determinación de melatonina por UPLC-QDa presenta una adecuada linealidad en el rango evaluado, alta sensibilidad analítica, buena precisión instrumental y excelente estabilidad cromatográfica, de acuerdo con el desempeño inherente a la técnica analítica empleada (Pereira et al., 2010; Salem, 2020). Estas características confirman que el método es adecuado para cuantificar melatonina en muestras analíticas.

Además, el método mostró un desempeño adecuado en el nivel bajo y alto de concentración, con valores de recuperación dentro de los rangos comúnmente aceptados para métodos basados en UPLC-QDa. La menor recuperación observada en el nivel intermedio podría atribuirse a interacciones diferenciables entre el analito y los componentes de la matriz, así como a variaciones en la eficiencia de la ionización asociadas a matrices complejas (Pereira et al., 2010; Salem, 2020). En conjunto, el método implementado presenta una precisión y exactitud aceptable para fines cuantitativos; sin embargo, se recomienda considerar el efecto matriz, especialmente en los niveles intermedio de concentración.

Los resultados obtenidos en la aplicación de melatonina vía aspersion y drench en condiciones normales indican que no fue posible la identificación y cuantificación de melatonina en hojas y raíces por UPLC-QDa, ya que no se encontraban dentro de un rango dinámico lineal

confiable. Estos resultados sugieren que la cuantificación de melatonina se ve afectada por diversos factores, como las limitaciones analíticas, la variedad del cultivo y sus características agronómicas, la naturaleza dinámica y transitoria de la melatonina en sistemas vegetales y la influencia por condiciones ambientales. Al respecto, se ha observado que la melatonina endógena podría aumentar en plantas expuestas a diversos tipos de estrés abióticos, presentando niveles más altos en semillas y hojas (Agathokleous et al., 2024).

En concordancia, fue posible detectar melatonina en extractos vegetales de las hojas de algunas plantas de copoazú en el experimento de adaptación lumínica, tanto en plantas control como en aquellas tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de melatonina, con valores de entre 0,77–1,17 ng/mL en el grupo control y 0,9–1,44 ng/mL en el grupo tratado con melatonina, con una superposición que indica que, en promedio, no existen diferencias significativas entre las plantas tratadas y el control. Cabe destacar que, al tratarse de réplicas biológicas, las condiciones del crecimiento y fenómenos intrínsecos cada uno de los individuos del grupo dificultan la uniformidad en los datos. Este comportamiento es consistente con lo reportado por Kun-Nemes et al. (2025), quienes observaron que, tras la aplicación exógena de melatonina, las concentraciones tisulares disminuyen progresivamente hasta alcanzar niveles comparables a los controles a las cuatro semanas de tratamiento.

Entre las limitaciones que no hicieron posible la identificación de melatonina en los diferentes experimentos realizados, se encontró el hecho de que la mayoría de las señales se ubicaron cercanas o por debajo del límite de detección ( $\text{LOD} \approx 0,73 \text{ ng/mL}$ ). Esto indica una limitación en la sensibilidad del método analítico, donde los valores reportados como no detectados (ND) no necesariamente implican ausencia del analito, sino concentraciones

inferiores al límite de detección. Esta restricción puede explicar, en parte, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos (Tan et al., 2015).

Los resultados evidenciaron la detección de melatonina para el experimento de adaptación lumínica en concentraciones cercanas al límite de detección del método, aunque esta no fue consistente en todas las plantas del grupo de tratamiento. Este comportamiento sugiere una variabilidad tanto biológica como analítica en la acumulación de la melatonina aplicada. Es importante considerar que la melatonina fue aplicada mediante aspersión foliar, por lo que la señal detectada podría corresponder, al menos en parte, a residuos exógenos remanentes sobre las hojas o a una absorción diferencial del compuesto, más que a su síntesis endógena, ya que las concentraciones endógenas de melatonina se reportan en rango de pg/mL. En este sentido, la baja concentración detectada y su presencia intermitente entre muestras limitan la capacidad de atribuir inequívocamente su origen a procesos fisiológicos internos, resaltando la necesidad de estrategias adicionales de control, como lavados previos o el uso de marcadores isotópicos, para discriminar entre melatonina endógena y exógena (Irina et al., 1998, Park, 2011).

La presencia de melatonina en las plantas control del experimento de adaptación lumínica podría confirmar su origen endógeno y su papel como una molécula antioxidante inducida por condiciones de estrés, como la alta intensidad lumínica (Tan et al., 2015; Agathokleous et al., 2024). En este sentido, la identificación de melatonina en las plantas control con estrés puede deberse a una respuesta fisiológica de la planta, que está asociada a la regulación del estrés oxidativo derivado de la fotosíntesis, donde se generan ROS y como respuesta se produce más melatonina para proteger la planta contra la toxicidad de estas especies (Tan et al., 2015).

Otras de las razones por las que se cree que no fue posible la identificación de melatonina, es la falta de acumulación en las plantas tratadas. Si bien una estrategia para

aumentar el contenido endógeno de melatonina dentro de la planta es su aplicación exógena (Ramasamy et al., 2023), su baja acumulación puede deberse a la rápida absorción, redistribución y metabolización de la melatonina. Esta molécula participa en una cascada antioxidante, reaccionando con ROS y generando diversos metabolitos bioactivos como N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) y 6-hidroximelatonina, lo que reduce su concentración detectable en tejidos vegetales (Kun-Nemes et al., 2025). Además, su dinámica de absorción y redistribución es rápida y transitoria como fue observado por Kun-Nemes et al. (2025) quienes demostraron que la concentración de melatonina aumenta durante las primeras horas tras la aplicación, pero posteriormente disminuye debido al metabolismo, el transporte o la posible excreción, alcanzando los niveles basales después de cuatro semanas.

En conjunto, aunque no se observaron diferencias cuantitativas significativas entre tratamientos y controles, los resultados no descartan un efecto fisiológico de la melatonina. Por el contrario, su papel como molécula señalizadora, junto con la evidencia en otros parámetros bioquímicos y morfológicos descritos en este trabajo, sugiere un efecto bioestimulante (Murch & Erland, 2021; Ramasamy et al., 2023). Sin embargo, se necesitan más estudios con métodos más sensibles para identificar y cuantificar con mayor precisión su presencia en las plantas de copoazú.

## 7. Conclusiones

En el presente estudio se evaluó el efecto de la aplicación de melatonina sobre el desarrollo morfológico y bioquímico de plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*), evidenciándose que, bajo condiciones controladas de invernadero, la melatonina mostró efectos positivos moderados. La aplicación vía aspersion incrementó significativamente el diámetro basal (50 y

250  $\mu\text{M}$ ), los flavonoides totales en raíces (50  $\mu\text{M}$ ) y las proteínas solubles totales en raíz (500  $\mu\text{M}$ ). Por su parte, la aplicación vía drench mostró una respuesta más generalizada, con aumentos significativos en diámetro basal, flavonoides totales en raíz y proteínas en hojas (500  $\mu\text{M}$ ), así como en clorofilas (50 y 250  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, el análisis de redes de correlación evidenció que la aplicación vía aspersión foliar tuvo mayor interacción entre sus parámetros morfológicos. Lo anterior, indica que la melatonina actuó como modulador del metabolismo vegetal de forma moderada.

En condiciones de adaptación lumínica, se determinó un mayor efecto de la melatonina, ya que el pretratamiento a las plántulas de copoazú bajo condiciones de estrés, promovió incrementos significativos en biomasa, diámetro basal, flavonoides en hojas, fenoles en raíz y proteínas en raíz. Además, se evidenciaron tendencias positivas sin significancia estadística en carbohidratos totales y pigmentos fotosintéticos, lo que demuestra el papel de la melatonina como molécula adaptativa y señalizadora pleiotrópica capaz de inducir respuestas antioxidantes, mejorar la eficiencia fotosintética y aumentar la tolerancia de las plantas frente a condiciones adversas.

Por otro lado, no fue posible identificar ni cuantificar melatonina en los extractos vegetales de hojas y raíces mediante UPLC-QDa, en los tratamientos por aspersión y drench. En el experimento de adaptación lumínica se logró identificar y cuantificar melatonina en hojas de plantas control y tratadas con 500  $\mu\text{M}$ , aunque solo en 2 de las 6 plantas por tratamiento, sin diferencias significativas. Los valores se encontraron cercanos al límite de detección ( $\approx 0,73$  ng/mL) y por debajo del límite de cuantificación (LOQ = 2,42 ng/mL), lo que disminuye la confiabilidad de los resultados y evidencia limitaciones en la sensibilidad del método. En conclusión, estos resultados sugieren que la cuantificación de melatonina puede estar influenciada por limitaciones analíticas, niveles endógenos de melatonina en la especie de

copoazú, las condiciones ambientales y la naturaleza dinámica y transitoria de la melatonina, asociada a su rápida metabolización y redistribución en los tejidos.

Finalmente, se concluye que la melatonina tiene un efecto bioestimulante sobre plántulas de copoazú, especialmente bajo condiciones de estrés, donde mejora el crecimiento, la respuesta fisiológica y bioquímica. Este trabajo aporta evidencia importante sobre el potencial de la melatonina como bioestimulante en cultivos amazónicos de interés agrícola como el copoazú, contribuyendo a una agricultura más sostenible orientada a mejorar la productividad y enfrentar problemas frente a condiciones ambientales adversas. Se recomienda, para futuros estudios, evaluar la aplicación vía drench bajo condiciones de adaptación a la luz, explorar otros tipos de estrés abiótico y emplear técnicas analíticas de mayor sensibilidad para la cuantificación de melatonina en tejidos vegetales.

**Referencias Bibliográficas**

- Agathokleous, E., Zhou, B., Xu, J., Ioannou, A., Feng, Z., Saitanis, C., & Fotopoulos, V. (2024). *Melatonin: A versatile tool for sustaining agricultural productivity and improving food security*. Authorea Preprints. <https://doi.org/10.22541/au.170664777.73495098/v1>
- Ahammed, G. J., Wu, M., Wang, Y., Yan, Y., Mao, Q., Ren, J., & Chen, S. (2020). Melatonin alleviates iron stress by improving iron homeostasis, antioxidant defense, and secondary metabolism in cucumber. *Scientia Horticulturae*, 265, 109205. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109205>
- Ahlawat, Y. K., Singh, M., Manorama, K., Lakra, N., Zaid, A., & Zulfiqar, F. (2024). Plant phenolics: Neglected secondary metabolites in plant stress tolerance. *Brazilian Journal of Botany*, 47(3), 703–721. <https://doi.org/10.1007/s40415-023-00949-x>
- Ahmad, S., Kamran, M., Ding, R., Meng, X., Wang, H., Ahmad, I., Fahad, S., & Han, Q. (2019). Exogenous melatonin confers drought stress by promoting plant growth, photosynthetic capacity and antioxidant defense system of maize seedlings. *PeerJ*, 7, e7793. <https://doi.org/10.7717/peerj.7793>
- Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2020). Ultraviolet-visible (UV-VIS) spectroscopy. En M. S. H. Akash & K. Rehman (Eds.), *Essentials of pharmaceutical analysis* (pp. 29–56). Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7_3)
- Alaboodi, A. S., Kadhim, S. A., & Hussein, A. S. (2025). Ultraviolet-visible spectroscopy: Importance, principle, structure and most important applications: A study review. *International Journal of Novel Research in Physics, Chemistry & Mathematics*, 12, 53–60.

- Altaf, M. A., Shu, H., Hao, Y., Mumtaz, M. A., Lu, X., & Wang, Z. (2022). Melatonin affects photosynthetic performance of pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) under chilling stress. *Antioxidants*, *11*, 2414. <https://doi.org/10.3390/antiox11122414>
- Arias, A., Feijoo, G., & Moreira, M. T. (2024). Macroalgae as a sustainable biostimulant for crop production according to techno-economic and environmental criteria. *Sustainable Production and Consumption*, *48*, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2024.05.019>
- Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2014). Melatonin: Plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends in Plant Science*, *19*(12), 789–797. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.006>
- Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2019). Melatonin as a chemical substance or as phytomelatonin rich-extracts for use as plant protector and/or biostimulant in accordance with EC legislation. *Agronomy*, *9*(10), 570. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100570>
- Arnao, M. B., Hernández-Ruiz, J., Cano, A., & Reiter, R. J. (2021). Melatonin and carbohydrate metabolism in plant cells. *Plants*, *10*(9), 1917. <https://doi.org/10.3390/plants10091917>
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, *24*(1), 1–15.
- Arrizón, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry*, *122*(1), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.028>
- Barrera, J., Sterling, A., Melgarejo, M. S., Hernández, D., Caicedo, O., & Martínez, O. (2023). Ecophysiological responses of cupuassu tree ecotypes (*Theobroma grandiflorum*) in an agroforestry system designed with rubber trees in Colombian Amazon. *Acta Horticulturae*, *1366*, 287–294. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2023.1366.37>

- Bhatla, S. C., & Lal, M. A. (2023). Metabolitos secundarios. En S. C. Bhatla & M. A. Lal (Eds.), *Fisiología, desarrollo y metabolismo vegetal* (pp. 3–26). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1\\_33](https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1_33)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Burgos Montañez, L. J. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Questionar: Investigación Específica*, 7(1), 57–66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383, 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Campos, C. N. (2016). *Melatonina exógena na promoção de tolerância de mudas de Coffea arabica L. ao déficit hídrico* [Tesis de maestría, Universidade Federal de Lavras]. Repositório Institucional UFLA.
- Campos, C. N., Ávila, R. G., de Souza, K. R. D., Azevedo, L. M., & Alves, J. D. (2019). Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young *Coffea arabica* L. plants. *Agricultural Water Management*, 211, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.09.025>
- Cao, L., Qin, B., Gong, Z., Zhao, Y., Li, Y., Zhang, X., & Wang, Y. (2022). Melatonin improves nitrogen metabolism during grain filling under water stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28, 1477–1488. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01219-y>
- Capote, F. P., & De Castro, M. L. (2007). *Analytical applications of ultrasound*. Elsevier.

- Castillo, A. B., & González, H. R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75151996000100009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009)
- da Silva, C. V. A. (2024). Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): A multifunctional fruit rich in bioactive compounds and its potential applications. *Food Research International*, 178, 113349. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.113349>
- Dawood, M. G., & El-Awadi, M. E. (2015). Alleviation of salinity stress on *Vicia faba* L. plants via seed priming with melatonin. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 223–235. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.43291>
- de Carvalho, J. E. U. (1999). *Copoasu (Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum.): Cultivo e utilizacion — manual tecnico*. Tratado de Cooperación Amazónica. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2025). *Cuentas nacionales trimestrales — Producto interno bruto por actividad económica*. <https://www.dane.gov.co>
- Díaz Viteri, J. E. (2024). *Perspectivas de desarrollo del copoazú en Madre de Dios* [Tesis, Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios]. Repositorio Institucional UNAMAD. <https://repositorio.unamad.edu.pe/>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Duan, W., Lu, B., Liu, L., Meng, Y., Ma, X., Li, J., Zhang, K., Sun, H., Zhang, Y., Dong, H., Bai, Z., & Li, C. (2022). Effects of exogenous melatonin on root physiology, transcriptome and metabolome of cotton seedlings under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9456. <https://doi.org/10.3390/ijms23169456>

- Dubbels, R., Reiter, R. J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H. W., & Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pineal Research*, 18(1), 28–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1995.tb00136.x>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Eisa, E. A., Honfi, P., Tilly-Mándy, A., & Mirmazloum, I. (2023). Morphophysiological and biochemical regulations induced by exogenous melatonin application conferring salt tolerance in *Ranunculus asiaticus* L. *Horticulturae*, 9(2), 228. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020228>
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: The blurred functional trichotomy. *Plant Physiology*, 184(1), 39–52. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>
- Erdal, S. (2019). Melatonin promotes plant growth by maintaining integration and coordination between carbon and nitrogen metabolisms. *Plant Cell Reports*, 38, 1001–1012. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02423-z>
- Erland, L. A. E., & Saxena, P. K. (2018). Melatonin in plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant*, 54, 3–24. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9879-5>
- Estación Experimental Agraria San Roque INIA. (2008). *Copoazú* (Hoja Divulgativa N° 4-2008). Instituto Nacional de Innovación Agraria.
- Eurachem. (2005). *Métodos analíticos adecuados a su propósito: Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* (2.ª ed.). Eurachem.

- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- Falcón, J., Besseau, L., Fuentes, M., Sauzet, S., Magnanou, E., & Boeuf, G. (2009). Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163, 101–111. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04435.x>
- Fan, Y., Li, L., Ma, T., & Hou, X. (2024). Melatonin affects the aboveground growth and photosynthesis of *Leymus chinensis* by regulating rhizome growth. *Agronomy*, 14(6), 1151. <https://doi.org/10.3390/agronomy14061151>
- García-Segura, J. M., Gavilanes, J. G., Martínez del Pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M., & Vivanco, F. (Eds.). (1996). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Editorial Síntesis.
- González Pérez, G. A. (2016). *Efecto de la sombra y el riego sobre el crecimiento juvenil del copoazú (Theobroma grandiflorum) en relación con el déficit hídrico del suelo en el piedemonte llanero* [Tesis de maestría, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria — CORPOICA]. Repositorio Institucional CORPOICA.
- González, M. C. (2000). *Estudio del efecto de melatonina exógena en tres momentos diferentes del desarrollo, sobre los contenidos de glutatión y glutatión peroxidasa en diferentes tejidos de Gallus domesticus L.* [Tesis de licenciatura, Universidad de Valladolid].
- González, M., Ríos, D., Peña Rojas, K., García, E., Acevedo, M., Cartes, E., & Sánchez Olate, M. (2020). Efecto de la concentración de fósforo y calcio sobre atributos morfo-

- fisiológicos y potencial de crecimiento radical en plantas de *Aextoxicon punctatum* producidas a raíz cubierta en la etapa de endurecimiento. *Bosque*, 41(2), 137–146. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002020000200137>
- González, P. (2019). *Consecuencias ambientales de la aplicación de fertilizantes*. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. [https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27059/1/Consecuencias\\_ambientales\\_de\\_la\\_aplicacion\\_de\\_fertilizantes.pdf](https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27059/1/Consecuencias_ambientales_de_la_aplicacion_de_fertilizantes.pdf)
- Guillarme, D., Nguyen, D. T.-T., Rudaz, S., & Veuthey, J.-L. (2007). Recent developments in liquid chromatography — Impact on qualitative and quantitative performance. *Journal of Chromatography A*, 1149, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.026>
- Gutiérrez Jacho, J. H. (2021). *Efecto de la melatonina exógena sobre la germinación y crecimiento en plántulas de pimiento (Capsicum annuum) bajo estrés salino* [Trabajo de fin de máster, Universitat Politècnica de València]. RiuNet. <https://riunet.upv.es/handle/10251/173956>
- Harris, C. R., Millman, K. J., van der Walt, S. J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D., Wieser, E., Taylor, J., Berg, S., Smith, N. J., Kern, R., Picus, M., Hoyer, S., van Kerkwijk, M. H., Brett, M., Haldane, A., del Río, J. F., Wiebe, M., Peterson, P., ... Oliphant, T. E. (2020). Array programming with NumPy. *Nature*, 585, 357–362. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>
- Hassan, M. U., Ghareeb, R. Y., Nawaz, M., Mahmood, A., Shah, A. N., Abdel-Megeed, A., Abdelsalam, N. R., Hashem, M., Alamri, S., Thabit, M. A., & Qari, S. H. (2022). Melatonin: A vital protector of crops against heat stress — Mechanisms and perspectives. *Agronomy*, 12(5), 1116. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051116>

- Hattori, A., Migitaka, H., Iigo, M., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T., & Reiter, R. J. (1995). Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 35(3), 627–634.
- Hernández-Ruiz, J., & Arnao, M. B. (2008). Distribution of melatonin in different zones of lupin and barley plants at different ages in the presence and absence of light. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10567–10573. <https://doi.org/10.1021/jf8022063>
- Huang, X., & Mazza, G. (2011). Application of LC and LC-MS to the analysis of melatonin and serotonin in edible plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 269–284. <https://doi.org/10.1080/10408390903586948>
- Hunter, J. D. (2007). Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in Science & Engineering*, 9(3), 90–95. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
- Imran, M., Aaqil Khan, M., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, M., Yun, B.-W., Khan, A. L., & Lee, I.-J. (2021). Melatonin ameliorates thermotolerance in soybean seedling by balancing redox homeostasis and modulating antioxidant defense, phytohormone biosynthesis and polyamines. *Molecules*, 26(17), 5116. <https://doi.org/10.3390/molecules26175116>
- Iqbal, N., Fatma, M., Gautam, H., Umar, S., Sofo, A., D'Ippolito, I., & Khan, N. A. (2021). The crosstalk of melatonin and hydrogen sulfide determines photosynthetic performance by regulation of carbohydrate metabolism in wheat under heat stress. *Plants*, 10(9), 1778. <https://doi.org/10.3390/plants10091778>

- Jafari, M., & Shahsavari, A. (2021). The effect of foliar application of melatonin on changes in secondary metabolite contents in two citrus species under drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 692735. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.692735>
- Jahan, M. S., Guo, S., Sun, J., Shu, S., Wang, Y., Abou El-Yazied, A., Altaf, M. A., Ren, J., & Hasan, M. M. (2021). Melatonin-mediated photosynthetic performance of tomato seedlings under high-temperature stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *167*, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.002>
- Jahan, M. S., Li, G., Xie, D., Ahmed, S., Mushtaq, Z., Farooq, M., & Guo, S. (2023). Melatonin mitigates salt-induced growth inhibition by regulating carbohydrate and nitrogen metabolism in tomato seedlings. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *23*, 4290–4308. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01348-7>
- Jean-Marie, E., Jiang, W., Bereau, D., & Robinson, J.-C. (2022). *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*: Botany, composition and pharmacological activities of pods and seeds. *Foods*, *11*(24), 3966. <https://doi.org/10.3390/foods11243966>
- Jia, D., Meng, Z., Hu, S., Nasar, J., Shao, Z., Zhang, X., Amin, B., Arif, M., & Gitari, H. (2025). Exogenous melatonin application improves shade tolerance and growth of soybean in maize-soybean intercropping systems. *Plants*, *14*(15), 2359. <https://doi.org/10.3390/plants14152359>
- Jia, Y., Zhu, L., Sun, H., Wang, R., Zhang, K., Zhang, Y., & Liu, L. (2025). Growth and physiological response of root-applied melatonin in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar 'Lumian 532' under water stress. *Journal of Agriculture and Food Research*, 102563. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.102563>

- Karumannil, S., Khan, T. A., Kappachery, S., & Gururani, M. A. (2023). Impact of exogenous melatonin application on photosynthetic machinery under abiotic stress conditions. *Plants*, *12*(16), 2948. <https://doi.org/10.3390/plants12162948>
- Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, *81*(3), 321–326. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5)
- Kołodziejczyk, I., Dzitko, K., Szewczyk, R., & Posmyk, M. M. (2016). Exogenous melatonin improves corn (*Zea mays* L.) embryo proteome in seeds subjected to chilling stress. *Journal of Plant Physiology*, *193*, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.012>
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. En R. J. Walker (Ed.), *The protein protocols handbook* (3rd ed., pp. 17–24). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4)
- Ksas, B., Becuwe, N., Chevalier, A., & Havaux, M. (2015). Plant tolerance to excess light energy and photooxidative damage relies on plastoquinone biosynthesis. *Scientific Reports*, *5*, 10919. <https://doi.org/10.1038/srep10919>
- Kun-Nemes, A., Farkas, D., Szilágyi-Tolnai, E., Fazekas, M. É., Paholcsek, M., Stündl, L., Bíróné Molnár, P., Cziáky, Z., Dobránszki, J., & Remenyik, J. G. (2025). Effect of exogenous melatonin supply on potato plants grown in vitro. *Antioxidants*, *14*(8), 917. <https://doi.org/10.3390/antiox14080917>
- Lau, C., Jarvis, A., & Ramírez, J. (2011). *Agricultura colombiana: Adaptación al cambio climático* (Políticas en Síntesis N.º 1). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/54554>

- Li, H., Chang, J., Zheng, J., Dong, Y., Liu, Q., Yang, X., Wei, C., Zhang, Y., Ma, J., & Zhang, X. (2017). Local melatonin application induces cold tolerance in distant organs of *Citrullus lanatus* L. via long-distance transport. *Scientific Reports*, 7, 40858. <https://doi.org/10.1038/srep40858>
- Li, Z., Luo, R., Zhang, Y., Yan, X., & Pang, Q. (2018). Effective protein extraction from mycelium and fruiting body of *Auricularia auricula* for proteomics studies. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2156–2166. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1499111>
- Liang, D., Shen, Y., Ni, Z., Wang, Q., Lei, Z., Xu, N., Deng, Q., Lin, L., Wang, J., Lv, X., & Xia, H. (2018). Exogenous melatonin application delays leaf senescence in kiwifruit by regulating the antioxidant capacity and biosynthesis of flavonoids. *Frontiers in Plant Science*, 9, 426. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00426>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liu, H., Sultan, M. A. R. F., Liu, X. L., Zhang, J., Yu, F., & Zhao, H. X. (2015). Physiological and comparative proteomics analysis reveals different drought responses in roots and leaves of drought-tolerant wild wheat (*Triticum boeoticum*). *PLOS ONE*, 10(4), e0121852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121852>
- Llamas, A. M., Ojeda, C. B., & Rojas, F. S. (2007). Química analítica de procesos: Aplicaciones de la espectrometría de masas al análisis ambiental. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, (3), 36–47.

- Manafi, H., Baninasab, B., Gholami, M., Tafazoli, E., & Sharifi, M. (2022). Exogenous melatonin alleviates heat-induced oxidative damage in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Ventana) plant. *Journal of Plant Growth Regulation*, *41*, 52–64. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10279-x>
- Mandal, S., Anand, U., López-Bucio, J., Radha, Kumar, M., Lal, M. K., Tiwari, R. K., & Dey, A. (2023). Biostimulants and environmental stress mitigation in crops: A novel and emerging approach for agricultural sustainability under climate change. *Environmental Research*, *233*, 116357. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116357>
- Mandal, S., Poi, R., Hazra, D. K., Ansary, I., Bhattacharyya, S., & Karmakar, R. (2023). Review of extraction and detection techniques for the analysis of pesticide residues in fruits to evaluate food safety and make legislative decisions: Challenges and anticipations. *Journal of Chromatography B*, *1215*, 123587. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123587>
- Mandru, A., Mane, J., & Mandapati, R. (2023). A review on UV-visible spectroscopy. *Journal of Pharma Insights and Research*, *1*(2), 091–096.
- Mannino, G., Pernici, C., Serio, G., Gentile, C., & Berteza, C. M. (2021). Melatonin and phytemelatonin: Chemistry, biosynthesis, metabolism, distribution and bioactivity in plants and animals — an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18), 9996. <https://doi.org/10.3390/ijms22189996>
- Martínez, V., Echevarria, C., Escalante, R., Otero, A., Rodriguez, J., Medina, P., & Monforte, L. (2024). La melatonina, compuesto controversial en plantas. *Revista Centro Agrícola*, *16*, 01–04.

- Meng, J. F., Yu, Y., Shi, T. C., Fu, Y. S., Zhao, T., & Zhang, Z. W. (2019). Melatonin treatment of pre-veraison grape berries modifies phenolic components and antioxidant activity of grapes and wine. *Food Science and Technology*, 39, 35–42. <https://doi.org/10.1590/fst.27717>
- Microsoft Corporation. (2016). *Microsoft Excel* (Version 2016) [Software]. Microsoft. <https://www.microsoft.com>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2008). *Estadística y quimiometría para química analítica* (5.<sup>a</sup> ed.). Pearson Educación.
- Mooney, B. P., Miernyk, J. A., Greenlief, C. M., & Thelen, J. J. (2006). Using quantitative proteomics of Arabidopsis roots and leaves to predict metabolic activity. *Physiologia Plantarum*, 128(2), 237–250. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00688.x>
- Moraes, V. D. F., Müller, C. H., De Souza, A. G. C., & Antônio, I. C. (1994). Native fruit species of economic potential from the Brazilian Amazon. *Acta Horticulturae*, 360, 67–76.
- Murch, S. J., & Erland, L. A. (2021). A systematic review of melatonin in plants: An example of evolution of literature. *Frontiers in Plant Science*, 12, 683047. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.683047>
- Murch, S. J., Alan, A. R., Cao, J., & Saxena, P. K. (2009). Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. *Journal of Pineal Research*, 47(3), 277–283. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00711.x>
- Murch, S. J., KrishnaRaj, S., & Saxena, P. K. (2000). Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum*

- L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Reports*, 19(7), 698–704. <https://doi.org/10.1007/s002990000206>
- Murch, S. J., Simmons, C. B., & Saxena, P. K. (1997). Melatonin in feverfew and other medicinal plants. *The Lancet*, 350(9091), 1598–1599. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)64014-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)64014-7)
- Mustafa, R. A., Hamid, A. A., Mohamed, S., & Bakar, F. A. (2010). Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Journal of Food Science*, 75(1), C28–C35. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01401.x>
- Nawaz, M. A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R. J., Niu, M., & Hameed, S. (2016). Melatonin: Current status and future perspectives in plant science. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1230. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01230>
- Organización del Tratado de Cooperación Amazónica (OTCA). (2016). *Manual técnico sobre cultivo y utilización del copoazú*. OTCA. <https://otca.org/wp-content/uploads/2021/02/Manual-Tecnico-sobre-Cultivo-y-Utilizacion-del-Copoasu.pdf>
- Park, W. J. (2011). Melatonin as an endogenous plant regulatory signal: Debates and perspectives. *Journal of Plant Biology*, 54(3), 143–149. <https://doi.org/10.1007/s12374-011-9148-0>
- Park, W. J. (2024). Have all the phytohormonal properties of melatonin been verified? *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), 3550. <https://doi.org/10.3390/ijms25063550>
- Patel, M., Holmes, K., & Abrar, M. (2012). Determination of an endogenous biomarker (melatonin) at picogram levels in human plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(4), 254–259.

- Patil, J. R., Mhatre, K. J., Yadav, K., Yadav, L. S., Srivastava, S., & Nikalje, G. C. (2024). Flavonoids in plant-environment interactions and stress responses. *Discover Plants*, 1(1), 68. <https://doi.org/10.1007/s44372-024-00068-3>
- Pereira, H., Martin, J. F., Joly, C., Sébédio, J. L., & Pujos-Guillot, E. (2010). Development and validation of a UPLC/MS method for a nutritional metabolomic study of human plasma. *Metabolomics*, 6(2), 207–218. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0187-2>
- Pérez Vélez, J. (2014). *Uso de los fertilizantes y su impacto en la producción agrícola*. [Universidad Nacional de Colombia <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/74970> <http://bdigital.unal.edu.co/39459/>].
- Pérez-Pérez, E., Ettiene, G., Marín, M., Casassa-Padron, A., Silva, N., Raga, J., & Medina, D. (2014). Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 31, 60–77.
- Plummer, D. T. (1990). *An introduction to practical biochemistry* (3rd ed.). McGraw-Hill.
- Pugliese, A. G., Tomas-Barberan, F. A., Truchado, P., & Genovese, M. I. (2013). Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (cupuassu) pulp and seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(11), 2720–2728. <https://doi.org/10.1021/jf304349j>
- Python Software Foundation. (2025). *Python* (Version 3.12.12) [Software]. <https://www.python.org/>
- Ramakrishna, A., Giridhar, P., Sankar, K. U., & Ravishankar, G. A. (2012). Melatonin and serotonin profiles in beans of *Coffea* species. *Journal of Pineal Research*, 52, 470–476. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00964.x>

- Ramasamy, K., Karuppasami, K. M., Alagarswamy, S., Shanmugam, K. P., Rathinavelu, S., Vellingiri, G., Muniyappan, U., Kanthan, T., Kuppusamy, A., Rajendran, M., Kathirvel, A., & Kanagarajan, S. (2023). Role of melatonin in directing plant physiology. *Agronomy*, *13*(9), 2405. <https://doi.org/10.3390/agronomy13092405>
- Rasband, W. S. (2018). *ImageJ* [Software]. U.S. National Institutes of Health. <https://imagej.net/ij/>
- Raza, A., Charagh, S., García-Caparrós, P., Rahman, M. A., Ogwugwa, V. H., Saeed, F., & Jin, W. (2022). Melatonin-mediated temperature stress tolerance in plants. *GM Crops & Food*, *13*(1), 196–217. <https://doi.org/10.1080/21645698.2022.2106111>
- Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019, por el que se establecen normas relativas a la comercialización de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) n.º 1069/2009 y (CE) n.º 1107/2009 y se deroga el Reglamento (CE) n.º 2003/2003. (2019). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 170, 1–114. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:32019R1009>
- Reiter, R. J., & Tan, D. X. (2002). Melatonin: An antioxidant in edible plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *957*, 341–344. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02940.x>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Zhou, Z., Cruz, M. H. C., Fuentes-Broto, L., & Galano, A. (2015). Phytomelatonin: Helping plants to survive and thrive. *Molecules*, *20*, 7396–7437. <https://doi.org/10.3390/molecules20047396>
- Ren, S., Jiang, G. L., & Rutto, L. (2019). Melatonin priming enhances symbiotic nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Biotechnology Research*, *10*, 136–144.

- Rodríguez, A. V. (2021). *Presencia de melatonina en frutos de la dieta y bebidas fermentadas: Contribución al potencial antioxidante e implicaciones fisiológicas en el crecimiento y maduración de la manzana como modelo de estudio* [Tesis doctoral, Universidad de Vigo]. Repositorio Institucional UV.
- Rodríguez, S. C. (2012). Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. *Revista Tumbaga*, 1(7). <https://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/383>
- Sadak, M. S., Abdalla, A. M., Abd Elhamid, E. M., Shalaby, M. A., & Tawfik, M. M. (2020). Role of melatonin in improving growth, yield quantity, and quality of *Moringa oleifera* L. plants under water stress. *Bulletin of the National Research Centre*, 44, 18. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-0275-7>
- Salem, M. A., Radwan, R. A., Mostafa, E. S., Alseekh, S., Fernie, A. R., & Ezzat, S. M. (2020). Using an UPLC/MS-based untargeted metabolomics approach for assessing the antioxidant capacity and anti-aging potential of selected herbs. *RSC Advances*, 10(52), 31511–31524. <https://doi.org/10.1039/D0RA05664A>
- Salvador, R., Jorge, Z., & Carlos, C. (1998). *El cultivo de copoazú en el piedemonte amazónico colombiano*. Ejecutivos Gráficos.
- Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., & Koukourikou-Petridou, M. (2012). Melatonin enhances root regeneration, photosynthetic pigments, biomass, total carbohydrates and proline content in the cherry rootstock PHL-C (*Prunus avium* × *Prunus cerasus*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 61, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.10.001>

- Sgariglia, M. A., Soberon, J. R., Sampietro, D. A., & Vattuone, M. A. (2010). Cromatografía: Conceptos y aplicaciones. *Arakuku*, 2(1), 1–6.
- Sharma, P., Thakur, N., Mann, N. A., & Umar, A. (2024). Melatonin as plant growth regulator in sustainable agriculture. *Scientia Horticulturae*, 323, 112421. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112421>
- Shi, H., Jiang, C., Ye, T., Tan, D. X., Reiter, R. J., Zhang, H., Liu, R., & Chan, Z. (2015). Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] by exogenous melatonin. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 681–694. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru373>
- Shiade, S. R. G., Zand-Silakhoor, A., Fathi, A., Rahimi, R., Minkina, T., Rajput, V. D., & Chaudhary, T. (2024). Plant metabolites and signaling pathways in response to biotic and abiotic stress: Exploring biostimulant applications. *Plant Stress*, 12, 100454. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100454>
- Song, X., Liu, Y., Liu, S., Li, J., Wang, Y., Zhang, Y., & Song, W. (2025). Proteomic and physiological analyses reveal the mechanisms by which melatonin improves heat stress-induced photoinhibition in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 221, 109665. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109665>
- Sousa Filho, I. M. R., Oliveira, P. J., & Nascimento, L. A. (2025). Characterization of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) fruit residues and their use as soil fertility enhancers in Amazonian agroecosystems. *Journal of Environmental Management*, 362, 122481. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2025.122481>

- Sun, C., Meng, S., Wang, B., Zhao, S., Liu, Y., Qi, M., Liu, Y., & Li, T. (2023). Exogenous melatonin enhances tomato heat resistance by regulating photosynthetic electron flux and maintaining ROS homeostasis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 196, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.01.043>
- Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Fuentes-Broto, L., & Reiter, R. J. (2010). The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews*, 85(3), 607–623. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x>
- Tan, D. X., Reiter, R. J., Manchester, L. C., Yan, M. T., El-Sawi, M., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Kohen, R., Allegra, M., & Hardeland, R. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2), 181–197. <https://doi.org/10.2174/1568026023394443>
- Tan, D.-X., Manchester, L. C., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and metabolism. *Molecules*, 20(10), 18886–18906. <https://doi.org/10.3390/molecules201018886>
- Tan, H., Qurashi, A., Poidevin, M., Nelson, D. L., Li, H., & Jin, P. (2012). Retrotransposon activation contributes to fragile X premutation rCGG-mediated neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 21(1), 57–65. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr437>
- Thapa, B., & Shrestha, A. (2022). Abiotic stress survival. En R. Lone, R. Shuab & A. N. Kamili (Eds.), *Plant defense mechanisms* (pp. 1–25). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102663>

- Thermo Scientific. (2024). *Pierce® BCA protein assay kit* [Manual de usuario]. Thermo Fisher Scientific. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430\\_Pierce\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf)
- Tian, H., Zhou, M., & Ma, M. (2026). Exogenous melatonin increases root yield and its medicinal value in *Glycyrrhiza glabra* under water stress. *Plants*, *15*(1), 75. <https://doi.org/10.3390/plants15010075>
- Tiryaki, D., & Gülmez, Ö. (2021). Determination of the Effect of Indole Acetic Acid (IAA) Produced from Edible Mushrooms on Plant Growth and Development. *Anatolian Journal of Biology*, *2*(2), 17-20. <https://izlik.org/JA59HA68JN>
- Todorova, D., Anev, S., Iliev, M., Petrakova, M., & Sergiev, I. (2024). Changes in photosynthetic parameters of melatonin-treated wheat subjected to drought. *Plants*, *13*(23), 3414. <https://doi.org/10.3390/plants13233414>
- Velásquez-Vásquez, P. A., Rojas, A. G., & Díaz-Viteri, L. M. (2025). Exploring *Theobroma grandiflorum* diversity to improve sustainability in smallholdings across Caquetá, Colombia. *Italian Journal of Agronomy*, *20*(1), 57–70. <https://doi.org/10.4081/ija.2025.1502>
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., ... SciPy 1.0 Contributors. (2020). SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods*, *17*, 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>

- Waskom, M. L. (2021). Seaborn: Statistical data visualization. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3021. <https://doi.org/10.21105/joss.03021>
- Xie, X., Ding, D., Bai, D., Zhu, Y., Sun, W., Sun, Y., & Zhang, D. (2022). Melatonin biosynthesis pathways in nature and its production in engineered microorganisms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 7(1), 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.12.004>
- Xu, L., Yang, W., Guo, H., Liu, C., Chen, A., Ahmad, S. A., & Wang, X. (2025). Transcriptome analysis of grapevine roots to determine the regulatory network response to melatonin. *Horticultural Plant Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.12.011>
- Xu, W., Cai, S. Y., Zhang, Y., Wang, Y., Ahammed, G. J., Xia, X. J., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q., Reiter, R. J., & Zhou, J. (2016). Melatonin enhances thermotolerance by promoting cellular protein protection in tomato plants. *Journal of Pineal Research*, 61(4), 457–469. <https://doi.org/10.1111/jpi.12359>
- Yang, S. J., Huang, B., Zhao, Y. Q., Hu, D., Chen, T., Ding, C. B., Chen, Y. E., Yuan, S., & Yuan, M. (2021). Melatonin enhanced *Arabidopsis thaliana* tolerance to high-light stress by improving the antioxidant system and photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 12, 752584. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.752584>
- Yang, X., Ren, J., Li, J., Lin, X., Xia, X., Yan, W., Zhang, Y., Deng, X., & Ke, Q. (2023). Meta-analysis of the effect of melatonin application on abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology Reports*, 17(1), 39–52. <https://doi.org/10.1007/s11816-022-00770-0>
- Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., & He, K. (2014). Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, 92, 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.10.010>

- Ye, M., Wang, S., Wan, S., Li, L., & Qiao, Y. (2017). Rapid determination of melatonin in plant tissues by UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS. *Frontiers in Plant Science*, 8, 64. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00064>
- Zeidi, S. H., Sharifi, M., Samari, E., Ghasemi Pirbalouti, A., & Khalili, M. (2025). Dose-dependent effects of melatonin on berberine production, antioxidant activity, and metabolite profiles in *Berberis vulgaris* L. suspension cultures. *Scientific Reports*, 15, 32968. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-17203-x>
- Zeng, W., Mostafa, S., Lu, Z., & Jin, B. (2022). Melatonin-mediated abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 847175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.847175>
- Zhang, H., Guo, C., Sun, H., Zhu, L., Zhang, K., Zhang, Y., Liu, L., & Liu, L. (2025). Exogenous melatonin alleviates drought stress in cotton by improving root cortical activity and metabolic adaptation. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1625757. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1625757>
- Zhang, J., Shi, Y., Zhang, X., Du, H., Xu, B., & Huang, B. (2017). Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 138, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.012>
- Zhdanova, I. V., Wurtman, R. J., Balcioglu, A., Kartashov, A. I., & Lynch, H. J. (1998). Endogenous melatonin levels and the fate of exogenous melatonin: Age effects. *The Journals of Gerontology: Series A*, 53A(4), B293–B298. <https://doi.org/10.1093/gerona/53A.4.B293>

Zhong, L., Lin, L., Yang, L., Liao, M., Wang, X., Wang, J., Zhou, Y., & Lv, X. (2020). Exogenous melatonin promotes growth and sucrose metabolism in grape seedlings. *PLOS ONE*, 15(4), e0232033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232033>

## Apéndices

## Apéndice A

*Diseño experimental 1 para la aplicación de melatonina por drench y aspersión a plántulas de copoazú*

Concentración	Tipo de aplicación		
	Drench	Aspersión	
<b>Control n=6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duración: 2 meses</li> <li>• Volumen por planta: 12 mL</li> <li>• Aplicación: cada 15 días (6 dosis)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duración: 2 meses</li> <li>• Volumen por planta: 12 mL</li> <li>• Aplicación: cada 15 días (6 dosis)</li> </ul>	Cada 15 días se realizó seguimiento de mediciones morfológicas (Área de las hojas, longitud y diámetro del tallo). Transcurrido 2 meses y medio, se destruyen las plantas para realizar análisis bioquímicos (flavonoides, fenoles, clorofilas, carotenoides, carbohidratos y proteínas)
<b>500 µM n=6</b>			
<b>250 µM n=6</b>			
<b>500 µM n=6</b>			

*Nota.* Véase en la página 48

## Apéndice B

*Diseño experimental 2 para la aplicación de melatonina a plántulas de copoazú expuestas a*

Concentración	Estrés lumínico		
	Sombra	Luz solar	
<b>Control n=12 (Control sombra n=6 y Control luz n=6)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duración: 1 mes</li> <li>• Aplicación: aspersión foliar (10 mL por semana, 2 mL diarios) durante 4 semanas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posterior a la aplicación: → Control luz y 500 µM luz se trasladan a exposición solar directa.</li> <li>→ Control sombra y 500 µM sombra permanecen en el invernadero.</li> <li>• Exposición: 1 mes adicional</li> </ul>	Cada 15 días se realiza seguimiento de mediciones morfológicas. Transcurrido 2 meses, se destruyen las plantas para realizar análisis bioquímicos (flavonoides, fenoles, clorofilas, carotenoides, carbohidratos y proteínas)
<b>500 µM n=12 (500 µM sombra n=6 y 500 µM luz n=6)</b>			

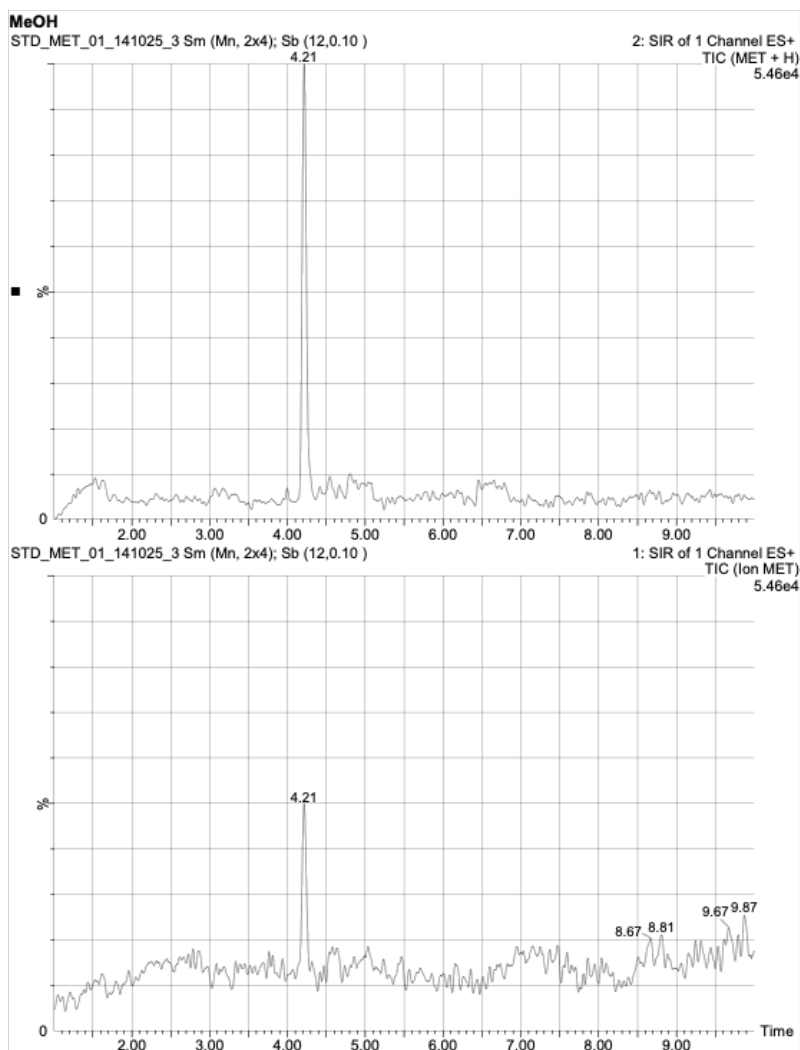
*condiciones de estrés lumínico*

*Nota.* Véase en la página 49

**Apéndice C**

*Cromatogramas obtenidos por UPLC-MS en modo SIR (ES+) para la detección de melatonina*

*(MET)*



*Nota.* El panel superior corresponde al monitoreo del ión precursor  $m/z$  233 (2: SIR), característico de la melatonina protonada  $[M+H]^+$ , en el que se observa un pico bien definido con un tiempo de retención de aproximadamente 4.21 min. El panel inferior muestra el monitoreo del ión fragmento  $m/z$  174 (1: SIR), derivado de la fragmentación de la melatonina, que presenta un pico en el mismo tiempo de retención, lo que confirma la identidad del analito. La coincidencia en el tiempo de retención entre ambos iones respalda la selectividad del método.

En ambos cromatogramas se observa una línea base estable, con señales menores en tiempos de retención más altos (8–10 min), atribuibles al ruido instrumental o a posibles interferencias de baja intensidad. Véase en la página 59

### Apéndice D

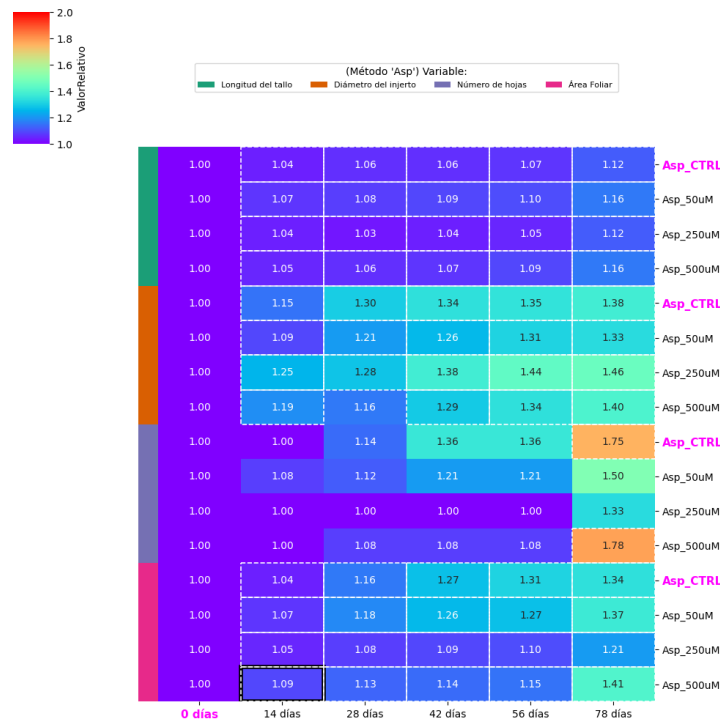
*Tallos y raíces de plántulas de copoazú tratadas con melatonina (50, 250 y 500  $\mu$ M) vía aspersión*



*Nota.* Véase en la página 63

**Apéndice E**

*Mapa de calor de parámetros morfológicos medidos cada 15 días en plántulas de copoazú tratadas con melatonina (50, 250 y 500 µM) vía aspersion*



*Nota.* Mapa de calor para medidas morfológicas tomadas cada 15 días hasta la destrucción (Longitud y diámetro del tallo, número de hojas y área foliar) de Plántulas de *Theobroma Grandiflorum* tratadas con melatonina vía aspersion. Cuadros con borde a trazos blanco indican casos de relevancia significativa con respecto a t = 0 días. Cuadros con borde negro indican casos de relevancia significativa con respecto a Control Luz. Véase en la página 63 y 64.

**Apéndice F**

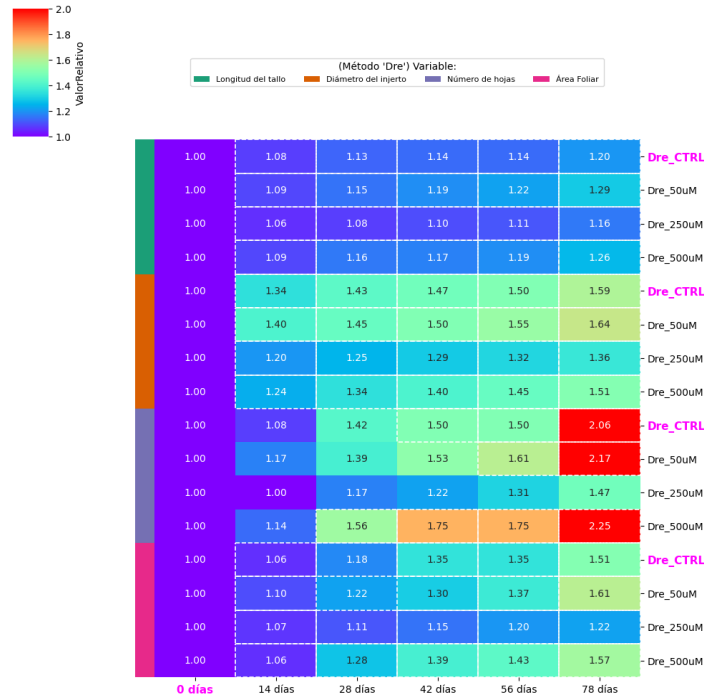
*Tallos y raíces de plántulas de copoazú tratadas con melatonina (50, 250 y 500 µM) vía drench*



*Nota.* Véase en la página 63

### **Apéndice G**

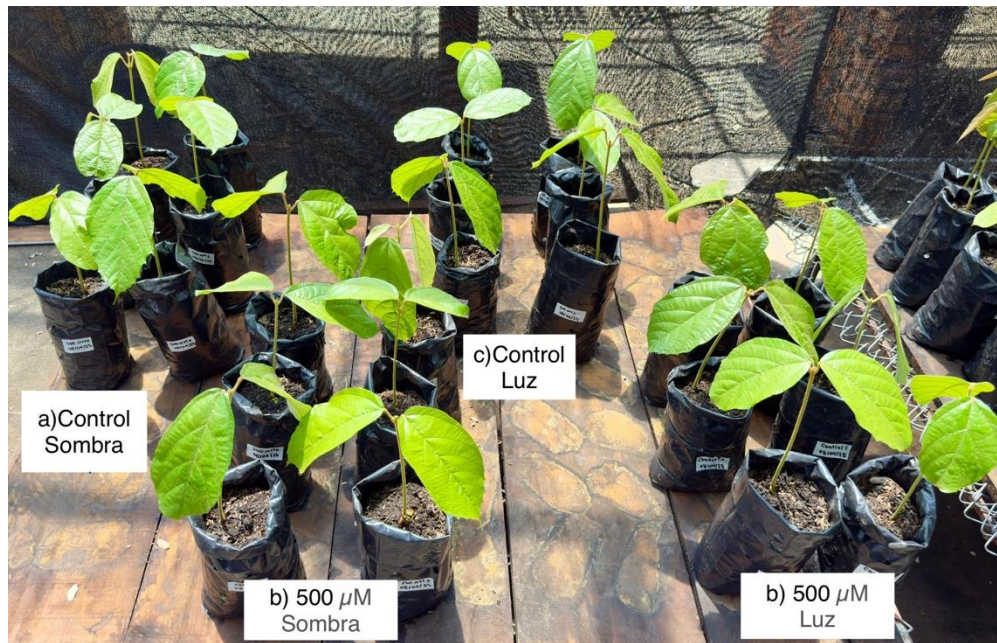
*Mapa de calor de parámetros morfológicos medidos cada 15 días en plántulas de copoazú tratadas con melatonina (50, 250 y 500 µM) vía drench*



Nota. Mapa de calor para medidas morfológicas tomadas cada 15 días hasta la destrucción (Longitud y diámetro del tallo, número de hojas y área foliar) de Plántulas de *Theobroma Grandiflorum* tratadas con melatonina vía drench. Cuadros con borde a trazos blanco indican casos de relevancia significativa con respecto a t = 0 días. Cuadros con borde negro indican casos de relevancia significativa con respecto a Control Luz. Véase en la página 63 y 64.

**Apéndice H**

*Plántulas de copoazú con al inicio del experimento de adaptación lumínica con dos meses de crecimiento*



*Nota.* Véase en la página 63

### **Apéndice I**

*Tallos y raíces de plántulas de copoazú pretratadas con melatonina (500 μM) vía aspersión y expuestas durante un mes a adaptación lumínica*



*Nota.* Véase en la página 63 y 67

## **Apéndice J**

*Contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersion, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica vía aspersion*

---

### **Aspersion**

---

	Clorofila a (mg/g)	Clorofila b (mg/g)	Clorofila Total (mg/g)	Carotenoides Total (mg/g)	Error Estándar Clorofila a	Error Estándar Clorofila b	Error Estándar Clorofila total	Error Estándar Carotenoides
Control	1,50	0,61	2,11	0,46	0,15	0,04	0,19	0,03
50 $\mu$ M	1,52	0,69	2,21	0,52	0,08	0,06	0,13	0,03
250 $\mu$ M	1,43	0,58	2,01	0,47	0,13	0,04	0,17	0,03
500 $\mu$ M	1,44	0,62	2,06	0,48	0,11	0,04	0,15	0,03

**Drench**

	Clorofila a (mg/gPF)	Clorofila b (mg/gPF)	Clorofila Total (mg/gPF)	Carotenoides Total (mg/gPF)	Error Estándar Clorofila a	Error Estándar Clorofila b	Error Estándar Clorofila total	Error Estándar Carotenoides
Control	1,45	0,62	2,06	0,48	0,13	0,06	0,18	0,04
50 $\mu$ M	1,89	0,99	2,88	0,54	0,15	0,27	0,41	0,02
250 $\mu$ M	1,85	0,79	2,65	0,60	0,10	0,03	0,13	0,03
500 $\mu$ M	1,63	0,69	2,31	0,54	0,13	0,05	0,18	0,04

**Estrés**

	Clorofila a (mg/gPF)	Clorofila b (mg/gPF)	Clorofila Total (mg/gPF)	Carotenoides Total (mg/gPF)	Error Estándar Clorofila a	Error Estándar Clorofila b	Error Estándar Clorofila total	Error Estándar Carotenoides
Control sombra	1,08	0,59	1,66	0,33	0,10	0,07	0,16	0,03
500 $\mu$ M sombra	0,80	0,32	1,12	0,27	0,13	0,06	0,20	0,05
Control luz	0,47	0,31	0,78	0,21	0,09	0,05	0,14	0,03
500 $\mu$ M luz	0,57	0,26	0,83	0,26	0,06	0,04	0,10	0,02

*Nota.* Véase en la página 73 y 74

**Apéndice K**

*Contenido de fenoles totales para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica*

<b>Fenoles Aspersión</b>				
	Fenoles Hojas (mg/gPF)	Fenoles Raíz (mg/gPS)	Error Estándar Fenoles Hojas	Error Estándar Fenoles Raíz
Control	25,29	22,97	3,28	1,47
50 $\mu$ M	19,96	21,50	2,58	0,71
250 $\mu$ M	21,46	20,43	2,45	1,08
500 $\mu$ M	20,55	20,80	1,78	1,11
<b>Fenoles Drench</b>				

	Fenoles Hojas (mg/gPF)	Fenoles Raíz (mg/gPS)	Error Estándar Fenoles Hojas	Error Estándar Fenoles Raíz
<b>Control</b>	18,88	20,01	1,96	1,52
<b>50 µM</b>	20,47	16,81	0,98	2,21
<b>250 µM</b>	20,93	19,82	1,44	2,12
<b>500 µM</b>	19,34	21,30	1,39	2,54
<b>Fenoles Estrés</b>				
	Fenoles Hojas (mg/gPF)	Fenoles Raíz (mg/gPS)	Error Estándar Fenoles Hojas	Error Estándar Fenoles Raíz
<b>Control Sombra</b>	20,75	23,19	0,88	0,97
<b>500 µM Sombra</b>	21,91	21,51	1,73	1,63
<b>Control Luz</b>	20,40	15,88	2,97	1,10
<b>500 µM Luz</b>	28,53	19,60	1,13	1,41

*Nota.* Véase en la página 77 y 78

## Apéndice L

*Contenido de flavonoides totales para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica*

<b>Flavonoides Aspersión</b>				
	Flavonoides Hojas (mg/gPF)	Flavonoides Raíz (mg/gPF)	Error Estandar Flavonoides Hojas	Error Estandar Flavonoides Raíz
<b>Control</b>	41,89	24,86	7,07	1,07
<b>50 µM</b>	29,18	31,49	4,30	2,27
<b>250 µM</b>	35,49	27,09	3,28	0,97
<b>500 µM</b>	34,38	26,11	3,75	1,79
<b>Flavonoides Drench</b>				
	Flavonoides Hojas (mg/g)	Flavonoides Raíz (mg/g)	Error Estandar Flavonoides Hojas	Error Estandar Flavonoides Raíz
<b>Control</b>	28,69	25,42	2,99	2,93
<b>50 µM</b>	31,86	24,35	2,25	2,60
<b>250 µM</b>	36,73	32,55	3,17	2,34
<b>500 µM</b>	33,04	34,66	3,11	1,66
<b>Flavonoides Estrés</b>				
	Flavonoides Hojas (mg/g)	Flavonoides Raíz (mg/g)	Error Estandar Flavonoides Hojas	Error Estandar Flavonoides Raíz
<b>Control Sombra</b>	35,54	44,49	1,62	2,22
<b>500 µM Sombra</b>	38,85	41,28	3,19	2,87
<b>Control Luz</b>	32,06	33,37	5,37	4,21
<b>500 µM Luz</b>	48,99	40,13	1,83	3,69

*Nota.* Véase en la página 81 y 82

**Apéndice M**

*Contenido de carbohidratos totales para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica*

<b>Carbohidratos Aspersión</b>				
	<b>Hojas (mg/gPF)</b>	<b>Raíces (mg/gPS)</b>	<b>Error Estándar Hojas</b>	<b>Error Estándar Raíz</b>
<b>Control</b>	11,03	29,31	2,02	9,53
<b>50 µM</b>	11,97	24,26	0,82	2,80
<b>250 µM</b>	14,09	23,49	1,39	3,27
<b>500 µM</b>	10,68	27,46	1,28	5,66
<b>Carbohidratos Drench</b>				
	<b>Hojas (mg/gPF)</b>	<b>Raíces (mg/gPS)</b>	<b>Error Estándar Hojas</b>	<b>Error Estándar Raíz</b>
<b>Control</b>	12,661	21,076	1,382	2,998
<b>50 µM</b>	12,281	30,016	0,969	8,162
<b>250 µM</b>	14,871	26,663	1,015	2,095
<b>500 µM</b>	14,433	22,514	0,991	2,074
<b>Carbohidratos Estrés</b>				
	<b>Hojas (mg/gPF)</b>	<b>Raíces (mg/gPS)</b>	<b>Error Estándar Hojas</b>	<b>Error Estándar Raíz</b>
<b>Control Sombra</b>	18,16	30,97	0,91	3,98
<b>500 µM Sombra</b>	15,06	30,23	1,09	3,40
<b>Control Luz</b>	16,83	22,38	2,01	4,52
<b>500 µM Luz</b>	19,87	36,97	1,13	5,55

*Nota.* Véase en la página 84-86

**Apéndice N**

*Contenido de proteínas solubles totales para plántulas de copoazú tratadas con melatonina vía aspersión, drench y plántulas a condiciones de adaptación lumínica*

<b>Proteínas Aspersión</b>				
	<b>Hojas (µg/gPF)</b>	<b>Raíces (µg/gPF)</b>	<b>Error Estándar Hojas</b>	<b>Error Estándar Raíz</b>
<b>Control</b>	427,79	144,25	7,31	24,64
<b>50 µM</b>	410,77	162,78	10,80	11,85

<b>250 <math>\mu</math>M</b>	421,89	168,63	18,31	26,30
<b>500 <math>\mu</math>M</b>	367,77	262,17	10,04	31,60

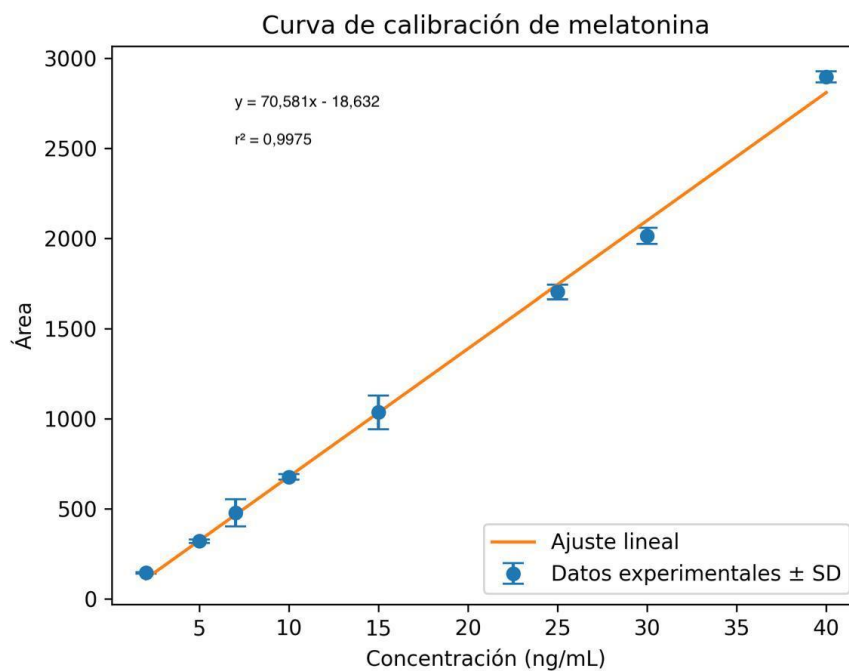
<b>Proteínas Drench</b>				
	<b>Hojas (<math>\mu</math>g/gPF)</b>	<b>Raíces (<math>\mu</math>g/gPF)</b>	<b>Error Estándar Hojas</b>	<b>Error Estándar Raíz</b>
<b>Control</b>	186,32	172,80	12,85	8,36
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	279,53	222,16	12,89	36,14
<b>250 <math>\mu</math>M</b>	155,16	142,82	9,94	6,62
<b>500 <math>\mu</math>M</b>	321,91	129,76	25,54	20,28

<b>Proteínas estrés</b>				
	<b>Hojas (<math>\mu</math>g/gPF)</b>	<b>Raíces (<math>\mu</math>g/gPF)</b>	<b>Error Estándar Hojas</b>	<b>Error Estándar Raíz</b>
<b>Control Sombra</b>	864,03	414,67	118,78	106,91
<b>500 <math>\mu</math>M Sombra</b>	2779,84	268,12	524,74	65,21
<b>Control Luz</b>	2535,81	310,74	492,00	46,03
<b>500 <math>\mu</math>M Luz</b>	2334,55	541,89	100,11	37,11

Nota. Véase en la página 88 y 89

## Apéndice O

Curva de calibración de melatonina en metanol al 80% en el rango de 2–40 ng/mL



*Nota.* Los puntos representan el promedio de tres réplicas y las barras de error corresponden a la desviación estándar (SD). La línea continua indica el ajuste por regresión lineal, obteniéndose la ecuación de la recta ajustada, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.997, lo que evidencia una alta linealidad del método en el rango evaluado. Véase en la página 97

## Apéndice P

*Resultados significativos de las pruebas ANOVA y Kruskal–Wallis para parámetros morfológicos de plantas de copoazú sometidas a diferentes tratamientos*

<b>ANOVA</b>					
<b>Diámetro basal</b>					
<b>Fuente</b>	<b>ddof1</b>	<b>ddof2</b>	<b>F</b>	<b>p_unc</b>	<b>np2</b>
Grupo	3	10,8344	6,9548	0,00704	0,47126
<b>Masa seca hojas</b>					
<b>Fuente</b>	<b>ddof1</b>	<b>ddof2</b>	<b>F</b>	<b>p_unc</b>	<b>np2</b>
Grupo	3	10,3851	37,9046	6,8E-06	0,75941
<b>Masa seca tallos</b>					
<b>Fuente</b>	<b>ddof1</b>	<b>ddof2</b>	<b>F</b>	<b>p_unc</b>	<b>np2</b>
Grupo	3	10,1169	34,0965	1,3E-05	0,71747

<b>KRUSKAL- WALLIS</b>			
<b>Volumen de raíz</b>			
<b>Fuente</b>	<b>ddof1</b>	<b>H</b>	<b>p_unc</b>
Grupo	3	14,6452	0,00215
<b>Masa seca raíz</b>			
<b>Fuente</b>	<b>ddof1</b>	<b>H</b>	<b>p_unc</b>
Grupo	3	14,4467	0,00236

*Nota.* Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para las variables diámetro basal, masa seca de hojas y masa seca de tallos, y la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para volumen de raíz y masa seca de raíz. F corresponde al estadístico de la prueba ANOVA, H al estadístico de la prueba de Kruskal–Wallis, ddof1 y ddof2 a los grados de libertad del modelo y

del error, respectivamente,  $p$  al valor de significancia y  $\eta^2p$  al tamaño del efecto (eta cuadrado parcial). Se consideraron diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ . Véase en la página 67

### Apéndice Q

*Resultados significativos de las pruebas ANOVA para clorofila a, b y total de plantas de copoazú en experimento de adaptación lumínica*

<b>Clorofila estrés adaptación lumínica</b>					
<b>ANOVA</b>					
<b>Clorofila a (Luz)</b>					
<b>Fuente</b>	<b>ddof1</b>	<b>ddof2</b>	<b>F</b>	<b>p_unc</b>	<b>np2</b>
Grupo	3	10,406295	7,3102555	0,0064485	0,5241401
<b>Clorofila b (Luz)</b>					
<b>Fuente</b>	<b>ddof1</b>	<b>ddof2</b>	<b>F</b>	<b>p_unc</b>	<b>np2</b>
Grupo	3	10,763518	4,6913822	0,0247063	0,4869733
<b>Clorofila total (Luz)</b>					
<b>Fuente</b>	<b>ddof1</b>	<b>ddof2</b>	<b>F</b>	<b>p_unc</b>	<b>np2</b>
Grupo	3	10,575679	7,3135207	0,0062249	0,521997
<b>Clorofila total (Sombra)</b>					
<b>Fuente</b>	<b>ddof1</b>	<b>ddof2</b>	<b>F</b>	<b>p_unc</b>	<b>np2</b>
Grupo	1	9,7859198	7,6694671	0,0201906	0,434052

*Nota.* Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para las variables diámetro basal, masa seca de hojas y masa seca de tallos. F corresponde al estadístico de la prueba ANOVA, ddof1 y ddof2 a los grados de libertad del modelo y del error, respectivamente,  $p$  al valor de significancia y  $\eta^2p$  al tamaño del efecto (eta cuadrado parcial). Se consideraron diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ . Véase en la página 74

### Apéndice R

*Resultados significativos del análisis ART ANOVA para el contenido de fenoles totales y flavonoides totales bajo estrés por adaptación lumínica*

**ART ANOVA****Fenoles totales estrés adaptación lumínica**

Fuente	Df	Df.res	Sum Sq	Sum Sq.res	F valor	Pr(>F)
Grupo	3	40	2523,5	6593,25	5,103199	0,0043869
Locación	1	40	1518,75	7658,3333	7,9325354	0,0075044
Grupo: Locación	3	40	3353,4167	5848,3333	7,6452931	0,0003733

**Flavonoides totales estrés adaptación lumínica**

Fuente	Df	Df.res	Sum Sq	Sum Sq.res	F valor	Pr(>F)
Grupo	3	40	2206,5	6948,0833	4,2342612	0,010867
Locación	1	40	8,3333333	9020	0,0369549	0,8485295
Grupo: Locación	3	40	1987,4167	7186,3333	3,6874005	0,0195699

*Nota.* Se aplicó un análisis de varianza mediante la técnica de Transformación Alineada de Rangos (ART ANOVA) para evaluar los efectos de Grupo, Locación y su interacción sobre el contenido de fenoles totales y flavonoides totales. Df corresponde a los grados de libertad del efecto evaluado, Df.res a los grados de libertad residuales, Sum Sq a la suma de cuadrados del efecto, Sum Sq.res a la suma de cuadrados residual, F al estadístico de prueba y p al nivel de significancia. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Véase en la página 78 y 82

**Apéndice S**

*Resultados significativos del ANOVA mixto para el contenido de flavonoides totales en los tratamientos de aspersión y drench*

**ANOVA MIXTO****Flavonoides totales Aspersión**

Fuente	SS	DF1	DF2	MS	F	p_unc	np2	eps
Grupo	75,98800977	3	20	25,329337	0,3249258	0,8073048	0,0464738	
Locación	739,2401498	1	20	739,24015	10,33792	0,0043422	0,340759	1
Interacción	563,9000395	3	20	187,96668	2,6286242	0,0783456	0,282791	

**Flavonoides totales Drench**

Fuente	SS	DF1	DF2	MS	F	p_unc	np2	eps
Grupo	543,6373797	3	20	181,21246	4,448874	0,0150067	0,4002391	
Locación	133,347971	1	20	133,34797	3,1397804	0,09164	0,1356876	1
Interacción	128,0076223	3	20	42,669207	1,0046793	0,4112406	0,1309652	

*Nota.* Se realizó un análisis de varianza mixto (Mixed ANOVA) para evaluar los efectos de Grupo, Locación y su interacción sobre el contenido de flavonoides totales. SS corresponde a la suma de cuadrados, DF1 y DF2 a los grados de libertad del efecto y del error, respectivamente, MS al cuadrado medio, F al estadístico de prueba, p al nivel de significancia,  $\eta^2p$  ( $np^2$ ) al tamaño del efecto (eta cuadrado parcial) y  $\epsilon$  (eps) al factor de corrección de esfericidad. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Véase en la página 81

### Apéndice T

*Resultados significativos del análisis ART ANOVA para el contenido de carbohidratos totales en los tratamientos de aspersión y drench*

<b>ART ANOVA</b>						
<b>Carbohidratos totales Aspersión</b>						
<b>Fuente</b>	<b>Df</b>	<b>Df.res</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Sum Sq.res</b>	<b>F valor</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
Grupo	3	40	62,833333	8739,3333	0,0958629	0,961879
Locación	1	40	4294,0833	4434	38,737784	2,289E-07
Grupo: Locación	3	40	263,83333	8356,6667	0,4209547	0,7389675
<b>Carbohidratos totales Drench</b>						
<b>Fuente</b>	<b>Df</b>	<b>Df.res</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Sum Sq.res</b>	<b>F valor</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
Grupo	3	40	1239,5	6916,6667	2,3893976	0,0830453
Locación	1	40	5808	2857,6667	81,297096	3,502E-11
Grupo: Locación	3	40	547,41667	6984	1,0450872	0,3831381

*Nota.* Se aplicó un análisis de varianza mediante la técnica de Transformación Alineada de Rangos (ART ANOVA) para evaluar los efectos de Grupo, Locación y su interacción sobre el contenido de fenoles totales y flavonoides totales. Df corresponde a los grados de libertad del efecto evaluado, Df.res a los grados de libertad residuales, Sum Sq a la suma de cuadrados del efecto, Sum Sq.res a la suma de cuadrados residual, F al estadístico de prueba y p al nivel de significancia. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

**Apéndice U**

*Resultados significativos del ANOVA mixto para el contenido de carbohidratos totales bajo estrés por adaptación lumínica*

<b>MIXED ANOVA</b>								
<b>Carbohidratos totales estrés adaptación lumínica</b>								
<b>Fuente</b>	<b>SS</b>	<b>DF1</b>	<b>DF2</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p_ unc</b>	<b>np2</b>	<b>eps</b>
Grupo	490,3403	3	20	163,44677	2,156316	0,1250328	0,2443976	
Locación	1922,6589	1	20	1922,6589	44,071022	1,83E-06	0,6878464	1
Interacción	230,21627	3	20	76,738756	1,7589992	0,1873851	0,2087668	

*Nota.* Se realizó un análisis de varianza mixto (Mixed ANOVA) para evaluar los efectos de Grupo, Locación y su interacción sobre el contenido de flavonoides totales. SS corresponde a la suma de cuadrados, DF1 y DF2 a los grados de libertad del efecto y del error, respectivamente, MS al cuadrado medio, F al estadístico de prueba, p al nivel de significancia,  $\eta^2p$  ( $np^2$ ) al tamaño del efecto (eta cuadrado parcial) y  $\epsilon$  (eps) al factor de corrección de esfericidad. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

**Apéndice V**

*Resultados significativos del ANOVA mixto para el contenido de proteínas totales en el tratamiento de aspersión*

<b>MIXED ANOVA</b>								
<b>Proteínas totales Aspersión</b>								
<b>Fuente</b>	<b>SS</b>	<b>DF1</b>	<b>DF2</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p_ unc</b>	<b>np2</b>	<b>eps</b>
Grupo	6537,7912	3	20	2179,2637	1,0244308	0,4028537	0,133197	
Locación	594601,75	1	20	594601,75	243,75099	1,148E-12	0,9241709	1
Interacción	56960,564	3	20	18986,855	7,7834694	0,0012311	0,5386433	

*Nota.* Se realizó un análisis de varianza mixto (Mixed ANOVA) para evaluar los efectos de Grupo, Locación y su interacción sobre el contenido de proteínas totales. SS corresponde a la suma de cuadrados, DF1 y DF2 a los grados de libertad del efecto y del error, respectivamente, MS al cuadrado medio, F al estadístico de prueba, p al nivel de significancia,  $\eta^2p$  ( $np^2$ ) al tamaño

del efecto ( $\eta$  cuadrado parcial) y  $\epsilon$  (eps) al factor de corrección de esfericidad. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Véase en la página 89

### Apéndice W

*Resultados significativos del análisis ART ANOVA para el contenido de proteínas totales bajo condiciones de estrés por adaptación lumínica y aplicación de drench*

<b>ART ANOVA</b>						
<b>Proteínas totales estrés adaptación lumínica</b>						
<b>Fuente</b>	<b>Df</b>	<b>Df.res</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Sum Sq.res</b>	<b>F valor</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
Grupo	3	40	3685,8333	5470,6667	8,9832643	0,0001133
Locación	1	40	5334,0833	3843,6667	55,510363	4,457E-09
Grupo: Locación	3	40	4009,5	5044,3333	10,598031	2,924E-05
<b>Proteínas totales Drench</b>						
<b>Fuente</b>	<b>Df</b>	<b>Df.res</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Sum Sq.res</b>	<b>F valor</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
Grupo	3	40	3993,6667	5059,3333	10,524883	3,103E-05
Locación	1	40	3468	5594	24,797998	1,263E-05
Grupo: Locación	3	40	3153,4167	5885	7,1445294	0,0005937

*Nota.* Se aplicó un análisis de varianza mediante la técnica de Transformación Alineada de Rangos (ART ANOVA) para evaluar los efectos de Grupo, Locación y su interacción sobre el contenido de proteínas totales. Df corresponde a los grados de libertad del efecto evaluado, Df.res a los grados de libertad residuales, Sum Sq a la suma de cuadrados del efecto, Sum Sq.res a la suma de cuadrados residual, F al estadístico de prueba y p al nivel de significancia. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Véase en la página 90 y