

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Producción *in-vitro* de Biomasa de *Uncaria guianensis*  
Gmel., “Uña de Gato” e Identificación de Alcaloides  
Oxindólicos, por Cromatografía en Capa Fina**

Tesis para optar el título profesional de LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Marcela Mora Chió

**LIMA-PERÚ**

**2008**

*Dedicatoria*

***A mis padres...***

*Agradecimiento*

Agradezco a mi asesor el Dr. Mauro Quiñones jefe del Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética por haberme brindado la oportunidad y el apoyo necesario para llevar a cabo esta investigación.

Al Profesor César Puicón por su guía con las estadísticas de la presente investigación.

## RESUMEN

*Uncaria guianensis*, considerada comúnmente como “uña de gato”, es una de las especies más conocidas y exportadas por el Perú debido a sus propiedades medicinales. Para la producción *in vitro* de biomasa de *U. guianensis* se evaluó la influencia del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en distintas concentraciones. El tratamiento con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> permitió el incremento en la obtención de biomasa logrando un 73 % y 82 % más de peso húmedo y peso seco relativo en comparación con las plántulas cultivadas sin GA<sub>3</sub>. En la presente investigación se realizó la cromatografía en capa fina (TLC) de plantas *in vitro* de *U. guianensis* y comparando los factores de retención (R<sub>f</sub>) con los obtenidos en plantas *in situ*, se verificó la síntesis de 7 alcaloides oxindólicos: isopteropodina, pteropodina, isomitrafalina, mitrafalina, rincofilina, especiofilina y uncarina F. La separación y visualización de los alcaloides, se logró utilizando un extracto crudo metanólico, un eluyente de cloroformo: etanol (9,5:0,5) y el revelador vainillina: ácido sulfúrico (0,1:10).

## ABSTRACT

*Uncaria guianensis* commonly known as “cat’s claw” is one of the most known and exported species by Perú because of its medical properties. For the in vitro production of biomass of the *U guianensis* it’s evaluated the influence of giberelic acid (GA<sub>3</sub>) in different concentrations. The treatment with 0.01mg/L of GA<sub>3</sub> permitted the biomass increasement achieving 73 % and 82% more of wet weight and relative dry weight in comparison with the plants that where cultivated without GA<sub>3</sub>. In this research it was realized thin layer cromatography (TLC) of *U. guianensis* vitroplants and comparing the retention factor (Rf) with the obtained *in situ* plants, it was verified the synthesis of 7 oxindoles alkaloids: isopteropodine, pteropodina, isomitraphylline, mitraphylline, rhychnophylline, speciophylline and uncarine F. The separation and detection of alkaloids it’s done using a methanolic extract, a solvent system of chlorophorm: ethanol (9,5: 0,5) and the vainillin: sulfuric acid (0,1:10) reagent.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT .....	5
ÍNDICE.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	13
I. ANTECEDENTES .....	15
2.1 Clasificación taxonómica y distribución geográfica .....	15
1.2 Características morfológicas .....	15
1.3 Micropropagación <i>in vitro</i> .....	16
1.4 Organogénesis directa e indirecta.....	19
1.4.1 Control de la organogénesis <i>in vitro</i> .....	19
1.4.1.1 Efecto del explante .....	20
1.4.1.2 Efecto de las condiciones ambientales .....	21
1.4.1.3 Efecto del medio de cultivo .....	22
1.4.1.4 Giberelinas.....	22
1.5 Variabilidad genética en el cultivo <i>in vitro</i> .....	24
1.6 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i> .....	26
1.7 Cromatografía en capa fina (TLC) de alcaloides.....	28
2.7.1 Cromatografía en capa fina de <i>Uncaria guianensis</i> .....	30
1.8 Alcaloides oxindólicos de <i>Uncaria guianensis</i> .....	33
1.9 Propiedades y usos medicinales .....	35
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1 Materiales .....	39
3.1.1 Material biológico .....	39
2.2 Métodos:.....	39

3.2.1	Elaboración del medio de cultivo para micropropagación .....	39
3.2.2	Preparación de la solución stock de ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) .....	41
3.2.3	Condiciones de cultivo .....	42
3.2.4	Cuantificación de la biomasa obtenida <i>in-vitro</i> .....	42
3.2.5	Determinación de la presencia de alcaloides del grupo oxindólico, por cromatografía en capa fina (TLC) .....	42
3.2.5.1	Obtención del extracto crudo a partir de plántulas producidas <i>in-vitro</i> .....	42
3.2.5.2	Cromatografía en capa fina (TLC) .....	43
3.2.6	Evaluación .....	44
3.2.7	Análisis estadístico .....	44
III.	RESULTADOS .....	45
4.1	Micropropagación.....	45
4.2	Evaluación de la influencia del ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i> .....	45
4.3	Cuantificación de la biomasa obtenida <i>in-vitro</i> .....	47
4.4	Determinación de la presencia de alcaloides del grupo oxindólico por cromatografía en capa fina (TLC) .....	48
IV.	DISCUSIÓN.....	50
5.1	Micropropagación.....	50
5.2	Evaluación de la influencia del ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i> .....	51
5.3	Cuantificación de la biomasa obtenida <i>in-vitro</i> .....	52
5.4	Determinación de la presencia de alcaloides del grupo oxindólico por cromatografía en capa fina (TLC) .....	53
V.	CONCLUSIONES.....	59
VI.	RECOMENDACIONES .....	60
VII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	61
VIII.	ANEXOS .....	67
9.1	Tablas .....	67

9.2 Gráficos .....	74
9.3 Figuras .....	89



# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1:</b> Preparación de la solución stock para 1 litro de medio MS. ....	67
<b>Tabla N° 2:</b> Concentraciones de ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) utilizadas en el medio de crecimiento. ....	68
<b>Tabla N° 3:</b> Crecimiento de longitud de las plántulas <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> en el medio de propagación basal (MPB) por semanas. ....	68
<b>Tabla N° 4:</b> Enraizamiento de plántulas <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> en el medio de propagación basal (MPB). ....	68
<b>Tabla N° 5:</b> Análisis estadístico (ANOVA) del crecimiento de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i> según la concentración de ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). ....	69
<b>Tabla N° 6:</b> Porcentaje de plántulas enraizadas de <i>U. guianensis</i> en relación a la concentración de ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). ....	70
<b>Tabla N° 7:</b> Análisis estadísticos (ANOVA) del tamaño y número de esquejes obtenidos por plántula cultivada <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> en un medio con 0,01 mg/L de GA <sub>3</sub> . ....	70
<b>Tabla N° 8:</b> Análisis estadísticos (ANOVA) del tamaño y número de esquejes por plántula cultivada <i>in vitro</i> en un medio MS sin ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). ....	71
<b>Tabla N° 9:</b> Biomasa obtenida de plántulas <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> cultivadas durante 5, 7 y 9 meses en un medio MS sin ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). ....	71
<b>Tabla N° 10:</b> Biomasa obtenida de plántulas <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> cultivadas durante 5, 7 y 9 meses en un medio MS con 0,01 mg/L de GA <sub>3</sub> . ....	72
<b>Tabla N° 11:</b> Bandas visualizadas correspondientes a alcaloides oxindólicos por cromatografía en capa fina (TLC) de plantas <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i> vs. cromatogramas desarrollados con plantas <i>in situ</i> . ....	73

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Gráfico N° 1:</b> Crecimiento de las plántulas <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i> cultivadas en un medio con diferentes concentraciones de ácido giberélico.....	74
<b>Gráfico N° 2:</b> Crecimiento de plántulas <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> por meses y según la concentración de ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). .....	75
<b>Gráfico N° 3:</b> Enraizamiento de las plántulas de <i>Uncaria guianensis</i> por meses según la concentración de ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ).....	76
<b>Gráfico N° 4:</b> Enraizamiento de las plántulas de <i>Uncaria guianensis</i> por semanas según la concentración de ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). .....	77
<b>Gráfico N° 5:</b> Número de esquejes obtenidos en plántulas cultivadas en un medio con 0,01 mg/L de ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). .....	78
<b>Gráfico N° 6:</b> Número de esquejes obtenidos en plántulas cultivadas en un medio MS en presencia y ausencia de GA <sub>3</sub> .....	79
<b>Gráfico N° 7:</b> Tamaño de la plántula en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). .....	80
<b>Gráfico N° 8:</b> Número de esquejes obtenidos en plántulas cultivadas en un medio sin ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). .....	81
<b>Gráfico N° 9:</b> Tamaño de la plántula en un medio de cultivo sin ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ). .....	82
<b>Gráfico N° 10:</b> Peso húmedo de las plántulas cultivadas en un medio de cultivo sin GA <sub>3</sub> .....	83
<b>Gráfico N° 11:</b> Peso húmedo obtenido de plántulas de <i>U. guianensis</i> cultivadas en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA <sub>3</sub> . .....	84
<b>Gráfico N° 12:</b> Peso seco relativo obtenido de plántulas de <i>U. guianensis</i> cultivadas en un medio de cultivo MS con 0,01 mg/L de GA <sub>3</sub> . .....	85
<b>Gráfico N° 13:</b> Biomasa obtenida de plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> en un medio MS en ausencia y presencia de GA <sub>3</sub> .....	86

<b>Gráfico N° 14:</b> Peso seco obtenido de plántulas de <i>U. guianensis</i> cultivadas en un medio sin GA <sub>3</sub> .	87
<b>Gráfico N° 15:</b> Número de esquejes obtenidos en plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> en ausencia y presencia de GA <sub>3</sub> .	88
<b>Figura N° 1:</b> <i>Uncaria guianensis</i> Gmel. <i>in situ</i> , obsérvese las espinas retorcidas.	89
<b>Figura N° 2:</b> Corte de segmentos nodales para la micropropagación de <i>Uncaria guianensis</i> .	89
<b>Figura N° 3:</b> Esquejes de <i>U. guianensis</i> sembrados de forma vertical en el medio de cultivo MS.	90
<b>Figura N° 4:</b> Plántulas de <i>U. guianensis</i> en el cuarto de crecimiento.	90
<b>Figura 5:</b> Presencia de fenolización en plántulas de <i>U. guianensis</i> cultivadas <i>in vitro</i> .	91
<b>Figura N° 6:</b> Plántulas de <i>U. guianensis</i> de un mes edad, cultivadas en un medio MS con adición de 0; 0.001, 0,01; 0,1; 1; 2; 3 mg/L de GA <sub>3</sub> .	91
<b>Figura N° 7:</b> Plántulas de <i>U. guianensis</i> de dos meses edad, cultivadas en un medio MS con adición de 0; 0.001, 0,01; 0,1; 1; 2; 3 mg/L de GA <sub>3</sub> .	92
<b>Figura N° 8:</b> Plántulas de <i>U. guianensis</i> cultivadas en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA <sub>3</sub> de un mes de edad (izq.) y 0 mg/L de GA <sub>3</sub> de tres meses de edad (der.).	92
<b>Figura N° 9:</b> Plántulas de <i>U. guianensis</i> cultivadas en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA <sub>3</sub> de dos meses de edad (izq.) y 0 mg/L de GA <sub>3</sub> de cinco meses de edad (der.).	93
<b>Figura 11:</b> Plántulas de <i>U. guianensis</i> cultivadas en un medio de cultivo MS con 0, 2, 3 mg/L de GA <sub>3</sub> de tres meses de edad (izq.) y 0 mg/L de GA <sub>3</sub> de nueve meses de edad (der.).	94
<b>Figura 12:</b> Efecto negativo del ácido giberélico en plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> en un medio MS con 2 y 3 mg/L de GA <sub>3</sub> .	94
<b>Figura N° 13:</b> Cromatografía en capa fina de <i>U. guianensis</i> cultivada <i>in vitro</i> ...	95
<b>Figura N° 14:</b> Cromatografía en capa fina de <i>U. guianensis</i> cultivada <i>in vitro</i> .	96

<b>Figura N° 15:</b> Cromatografía en capa fina de raíces de <i>U. guianensis</i> cultivada <i>in vitro</i> .	
.....	97
<b>Figura N° 16:</b> Cromatografía en capa fina de las hojas de <i>U. guianensis</i> cultivada <i>in vitro</i> .	
.....	98
<b>Figura N° 17:</b> Cromatografía en capa fina del tallo de <i>U. guianensis</i> cultivada <i>in vitro</i> .	
.....	99

# I. INTRODUCCIÓN

*Uncaria guianensis*, también considerada y conocida comúnmente como “uña de gato” es una planta trepadora y espinosa que crece en los bosques tropicales húmedos de América Latina. En el Perú es particularmente abundante en la zona de la Selva Central entre los 150 a 800 m.s.n.m.

La corteza de esta planta, es muy buscada como fuente de numerosos compuestos químicos con propiedades medicinales científicamente comprobados y ampliamente publicitados. En los años setenta, esta planta atrajo la atención de investigadores europeos, quienes convivieron por años con la tribu Asháninka, estudiando sus propiedades medicinales y posteriormente patentando los compuestos químicos llamados alcaloides oxindólicos a los que se les atribuyen las propiedades curativas de la planta.

Durante 20 años; alcaloides, terpenos, glicósidos del ácido quinóico, flavonoides y cumarinas vienen siendo aislados del género *Uncaria*, de tal modo que sus propiedades pueden ser aprovechadas mediante la obtención y determinación de los diferentes compuestos, existen investigaciones que plantean diferentes métodos de obtención y aplicación de los mismos, recientemente se vienen realizando pruebas en células vivas y organismos para validar su aplicación en usos farmacológicos. El valor socioeconómico de estos compuestos es alto, puesto que su aplicación en el ámbito de la salud es trascendental, debido a que ayudan en problemas diversos tales como tumorales, virales, fortalecimiento del sistema inmunológico, ayuda en tratamientos de trombosis cerebral, migrañas, y de Alzheimer entre otros. El desarrollo de investigación de las plantas del género *Uncaria* continúa en crecimiento, particularmente en el área de inmunomodulador, antiinflamatorio y problemas relacionados con el sistema vascular.

La intensa demanda de uña de gato ha ocasionado que los extractores usualmente corten plantas jóvenes o al ras del suelo, lo que impide que se restablezcan. Como es de suponerse, este tipo de aprovechamiento no controlado ha reducido drásticamente la abundancia de uña de gato en su hábitat natural (Amazonía Peruana), causando incluso su desaparición. Actualmente en algunos sectores donde se inició la explotación de esta planta sólo es posible encontrar individuos bastante jóvenes o de diámetros reducidos.

Existe abundante bibliografía sobre el estudio fitoquímico desarrollado a nivel nacional e internacional con plantas *in situ* de uña de gato, sin embargo la escasa información encontrada sobre el cultivo *in vitro* e identificación en la misma de principios activos es evidente. Razón por la cual el presente trabajo tiene como finalidad la producción de biomasa *in vitro*, evaluando la influencia de la hormona vegetal GA<sub>3</sub>, y determinar la presencia de alcaloides del grupo oxindólico, hallados en las plantas cultivadas en campo, por cromatografía en capa fina, lo cual permitirá la aplicación de la biotecnología para un aprovechamiento sostenido de esta especie.

# I. ANTECEDENTES

## 2.1 Clasificación taxonómica y distribución geográfica

Según el sistema de clasificación de Adolf Engler, modificado por Hans Melchor en 1964 (Obregón, 1997), su clasificación taxonómica es la siguiente:

División XVII: Angiospermae  
Clase: Dicotiledónea  
Sub-clase: Metachlamydeae  
Orden: Gentianiales  
Familia: Rubiaceae  
Género: *Uncaria*  
Especie: *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.

Geográficamente en nuestro país este género se encuentra circunscrito a la Selva Baja, Ceja de Selva y Selva Alta (Silva y col., 1998).

En el continente americano *Uncaria guianensis* se encuentra en forma natural en: Panamá Nicaragua, Guyanas, Trinidad y Tobago, Surínam, Costa Rica, Belice, Guatemala, Honduras, Venezuela, Colombia y Ecuador (Lombardi y Zevallos, 1999).

## 1.2 Características morfológicas

La familia a la cual pertenece *Uncaria guianensis* es grande y pantropical, se consideran alrededor de 7 000 especies. Hay abundantes especies en el Norte de Sudamérica, en el Perú se conocen 89 géneros (Soukup, 1973).

*Uncaria guianensis* es un arbusto trepador o rastrero, que puede llegar hasta 30 metros de longitud, con un diámetro en sus tallos de 10 a 30 cm en plantas adultas, presenta espinas fuertemente retorcidas desde su inicio en forma de cuernos de carnero; sus hojas poseen un corto peciolo, el limbo oscila entre 6 a 12 cm de longitud, de forma aovada o elíptica, presenta consistencia coriácea y un color verde oscuro brillante en el haz, el envés es glabro, el número de nervios varía de 8 a 9; otros autores refieren que oscila de 5 a 9 (Obregón, 1997).

Los racimos de las cabezuelas son terminales, grandes y con muchos capítulos; las cabezuelas miden aproximadamente 2,5 cm de diámetro y pueden llegar a 3 cm. Las flores son pediceladas, el cáliz es turbinado mide entre 4 a 5 mm de largo, presenta pequeños vellos. La corola es blanca, mide 10 mm de largo aproximadamente, sus lóbulos son obtusos y presenta la característica de ser pilosa (Mac Bride y Francis, 1936).

Los frutos son glabros, dehiscentes, miden de 3,5 a 4 cm de longitud, según Obregón (1997) miden de 2 a 3 cm de largo sin contar el pedicelo, las semillas son fusiformes, numerosas, longitudinales, imbricadas, aladas y llegan a medir hasta 11 mm de largo.

### **1.3 Micropropagación *in vitro***

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro* (Jiménez, 1998).



El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales.

A partir de los avances alcanzados en la regeneración de plantas *in vitro* se ha desarrollado toda una industria de micropropagación, que se inició por los países desarrollados de Europa y Estados Unidos y que en la actualidad se ha extendido al resto del mundo incluyendo a países de América Latina, Asia y África

La multiplicación de plantas es sin duda la más popular de las aplicaciones del cultivo *in vitro*, sus bases fueron establecidas desde los años 50 y 60 y fue realmente en las décadas del 70 y 80 que se estableció una verdadera industria de micropropagación (Kitto, 1997).

La formación de brotes a partir de ápices, yemas o meristemas y la subsecuente regeneración de plantas es el sistema más sencillo de multiplicación *in vitro* y son más de mil especies en las cuales se ha logrado establecer esta técnica (Murashige y Huang, 1987).

Según Jiménez (1998), las principales ventajas de este sistema de propagación se pueden resumir en:

- Altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas en cortos períodos de tiempo.
- Introducción rápida de nuevas variedades o clones.
- Producción independiente de las condiciones ambientales.
- Incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento.
- Uniformidad en las plantas introducidas.
- Mayor facilidad en la comercialización.

Se pueden diferenciar cinco fases críticas para lograr una exitosa multiplicación. Existe un consenso general de que la fase 0 (fase preparativa, Debergh y Maene, 1981) es importante o casi indispensable en el desarrollo de un esquema de micropropagación real y repetible, los objetivos a alcanzar en la fase I (establecimiento) debe ser lograr un cultivo axénico y viable. La Fase II, persigue lograr la proliferación, pero sin sacrificar los objetivos de la fase subsiguiente: Fase III (elongación o inducción de raíces y su desarrollo). La Fase IV (etapa de aclimatización o intermedia), es la última (Orellana, 1998).

La fase II (multiplicación) es la más importante y determinante en la propagación *in vitro*, es en ella que se realiza la verdadera multiplicación o micropropagación de una especie o variedad definiéndose no sólo el número de plantas o propágulos a obtener, sino su calidad genética por ser esta fase en la que se producen las variaciones genéticas.

El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos (vitroplantas, microtubérculos, microbulbillos) a partir de explantes (meristemos apicales o axilares, yemas axilares o adventicias), ya establecidos *in vitro*. Generalmente el proceso se inicia desde plantas donantes seleccionadas sin afectar las características.

La proliferación de los diferentes explantes en el cultivo *in vitro*, puede lograrse con el uso de sustancias reguladoras del crecimiento como componentes principales de un medio de cultivo previamente establecido y un adecuado manejo del proceso *in vitro*.

## **1.4 Organogénesis directa e indirecta**

La organogénesis es un evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, extendiendo siempre una conexión entre los brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos. En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para lograr la formación de una planta completa, ya sea por vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa (Jiménez, 1998).

La organogénesis directa a pesar de no ser el método más rápido, ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido en primer lugar a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y en segundo lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética.

### **1.4.1 Control de la organogénesis *in vitro***

Varios factores afectan la formación de órganos específicos y/o plantas completas como son la posición, tamaño, fenotipo y estado fisiológico de la planta donante del explante; concentración de nutrientes, fitohormonas y

reguladores de crecimiento en el medio de cultivo; y condiciones ambientales como luz, temperatura, y humedad (Phillips y Hubstenberger, 1998).

#### **1.4.1.1 Efecto del explante**

Donde el potencial organogénico de los explantes se encuentra influenciado por:

- a) La edad fisiológica, presentando los tejidos juveniles un mayor grado de actividad meristemática y plasticidad *in vitro*.
- b) La edad ontogénica, influyendo el estado de la planta madre y la estación durante la cual el explante es extraído.
- c) El tamaño, presentando los explantes grandes un potencial regenerador considerablemente mayor (Murashige, 1974 y Narayanaswamy, 1977).
- d) La posición, pudiendo la orientación del explante incrementar la producción de regenerantes (Gosukonda et al., 1995).
- e) El tejido u órgano de procedencia, pudiendo distintos explantes de una misma planta definir en su capacidad de regeneración (Murashige, 1974 y Narayanaswamy, 1977)

#### **1.4.1.2 Efecto de las condiciones ambientales**

La iluminación debe ser considerada en sus tres componentes: intensidad, duración del periodo de exposición y calidad. Debe de estar claro que los requerimientos de luz para plantas cultivadas *in vitro* no son lo mismo que para las vitroplantas desarrolladas de forma autotrófica. En las vitroplantas de cultivo de tejidos la fotosíntesis no es una actividad necesaria, excepto en las etapas del enraizamiento, ya que el medio de cultivo suministra inicialmente la fuente de carbohidratos, sin embargo, la luz es necesaria para regular ciertos procesos morfogénicos (Orellana, 1998).

La intensidad de la luz juega un importante rol en la estimulación del enraizamiento. La mayor intensidad de luz está relacionada al hecho que en la mayoría de las especies, las vitroplantas comienzan a formar las primeras hojas verdaderas y el área foliar dentro del frasco de cultivo. En especies como banano y plátano se debe disminuir el número de vitroplantas por frascos en un 20 % a 30% con respecto al número de explantes que se usarían en la fase de multiplicación (Orellana, 1995).

Un amplio rango de temperatura ha sido evaluado para el cultivo y enraizamiento de vitroplantas. En muchas especies de clima tropical una temperatura de  $26 \pm 2$  °C es suficiente para propiciar un buen inicio y desarrollo radical. En otras especies de clima templado este proceso es favorecido por una alternancia de temperaturas siendo favorables temperaturas diurnas de 26 °C y 15 a 20 °C durante el periodo nocturno (Orellana, 1998).

### **1.4.1.3 Efecto del medio de cultivo**

Un explante aislado *in vitro* e inducido a crecer y desarrollarse necesita agua, macro y micro nutrientes, azúcar, como fuente de carbono, en algunos casos giberelinas y a menudo dos grupos de reguladores de crecimiento auxinas y citoquininas (Thorpe, 1981).

Para el cultivo de meristemos y ápices no existe un medio universal, sin embargo el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado, reportándose su utilización en la mayoría de las especies propagadas *in vitro* (Kantha, 1981).

Un balance apropiado de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante (Jiménez, 1998).

### **1.4.1.4 Giberelinas**

Las giberelinas también pueden tener un papel importante en la organogénesis (Thorpe y Meier, 1973); aunque generalmente inhiben la diferenciación, algunas veces estimulan la elongación de nudos y la formación de yemas y raíces, mejorando el desarrollo de las plantas *in vitro* (Pech y Ake et al., 2007). La giberelina más utilizada en cultivo *in vitro* es el ácido giberílico-3 (GA<sub>3</sub>).

El efecto del GA<sub>3</sub> en la formación de estructuras vasculares organizadas y la inducción de raíces depende de las concentraciones utilizadas. Así, la adición en el medio de cultivo de 1 UM de GA<sub>3</sub>, produce un mayor número de raíces por callo; y su omisión, la ausencia de formación de raíces (Haddon y Northcote, 1976).

El uso de las giberelinas en el cultivo *in vitro* ha sido discutido. Por lo general se sugiere no emplear GA<sub>3</sub> al inicio de los tratamientos, debido a su acción inhibitoria en la acumulación de almidón a nivel celular.

Las giberelinas han sido adicionadas sólo en el 17 % de los casos, al parecer en la mayoría de los explantes se sintetiza suficiente cantidad de estas hormonas (Hu y Wang, 1983).

Yui et al.(1990), trabajaron con manzanas de la variedad Golden Delicious, y reportaron que no hubo diferencia significativa para las concentraciones de 0; 0,01; 0,1 y 1 mg/L de GA<sub>3</sub>, concluyendo que el GA<sub>3</sub> es indispensable en los trabajos de multiplicación de Golden Delicious *in vitro*, lo que ha sido corroborado con las investigaciones realizadas por Melo-Farias et al., (1998); Ochatt y Caso (1983) y George (1996), quienes también observaron que el GA<sub>3</sub> ayuda en la formación de yemas y varía según la interacción existente con otros reguladores de crecimiento, dependiendo de la especie que está siendo micropropagada.

Figueredo et al. (2001), realizaron investigaciones con *Rollinia mucosa* Jacq. y demostraron la necesidad de GA<sub>3</sub> para el mayor desarrollo de yemas.

Mishra et al., (1999), trabajaron con *Emblica officinalis* Gaertn, y demostraron el elongamiento de las plántulas con 1,0 mg/L de GA<sub>3</sub> y el desfollamiento de algunos explantes con 3 mg/L de GA<sub>3</sub>. Por su parte

Decetti (2001) describe el efecto perjudicial de GA<sub>3</sub> como necrosis apical y deformación foliar en el desarrollo de yemas de *Annona glabra* L.

En el 2001, Oliveira et al., trabajaron con *Averrhoa bilimbi* L. en un medio de cultivo enriquecido con 1, mg/L de GA<sub>3</sub>, quienes demostraron que la presencia de giberelina poco o nada contribuye en el crecimiento de los explantes y no causó efectos positivos. Igualmente Pereira et al. (2006), trabajaron con *U. guianensis* y argumentaron que la presencia o ausencia de GA<sub>3</sub> no ejerció efecto positivo en la formación de yemas, excepto cuando los explantes con una única yema fueron cultivados en forma horizontal.

## **1.5 Variabilidad genética en el cultivo *in vitro***

El cultivo de tejidos induce la variación en plantas regeneradas manifestándose de tres maneras diferentes: (a) variación en cultivos celulares, una célula puede variar en morfología y estructura genética; (b) Variación epigenética, los primeros regenerantes no muestran efectos fenotípicos heredables, mostrando inestabilidad somática, se da principalmente en plantas propagadas asexualmente; (C) Variación genética (heredable) transmitida sexualmente a la descendencia (Jain, 2001).

Los efectos de la variación genética pueden resultar beneficiosos para los programas de mejoramiento convencional si es que se consigue un rango de variación genéticamente estable; pero resulta impredecible e indeseable para trabajos de mejoramiento genético (Ingeniería genética).

Para el empleo de técnicas biotecnológicas en la propagación masiva de plantas, también han existido resultados contradictorios que han



cuestionado el empleo de estas técnicas, como por ejemplo en el género *Musa* en el que se reporta valores de 0 - 80% de variabilidad provocada por la micropropagación (Stover, 1987). Los que han obtenido valores bajos recomiendan estas técnicas para la propagación masiva (Smith, 1988; Orellana, 1989; 1995) y los que han encontrado valores altos plantean que estas técnicas de micropropagación deben emplearse en el mejoramiento genético (Stover, 1987; Novack, 1988).

El sistema de cultivo de tejidos actúa como un sistema mutagénico, debido a que las células atraviesan un proceso traumático o de stress a partir del aislamiento, pudiendo reprogramarse bajo condiciones diferentes a las naturales. La reprogramación o reestructuración de eventos puede crear un amplio rango de variación epigenética en plantas regeneradas recientemente (Jain, 2001).

La variación genética se encuentra influenciada por el genotipo, tipo de explante, medio de cultivo, y edad de la planta. Se produce un mayor incremento de variación en plantas con alta ploidía y numeroso pares de cromosomas; en callos viejos - porque presentan inestabilidad cromosómica y en plantas con sucesivos subcultivos.

Las variaciones más comunes en el cultivo *in vitro* reportadas son poliploidía, aneuploidía y aberraciones cromosómicas y en los estudios citológicos en varios cultivos ha quedado demostrado que los cambios aumentan proporcionalmente a la edad de los cultivos *in vitro*. Se ha señalado que esta es la causa fundamental de la pérdida de la totipotencia en las células producto del elevado número de mutaciones, pues sólo regenerarán plantas las células con pequeños cambios y serán viables en menor proporción, en plantas reproducidas sexualmente que en las plantas de multiplicación vegetativa, las cuales son menos afectadas por la ganancia o pérdida de uno o varios cromosomas (Pérez, 1998).

El comportamiento de la variabilidad y la edad de los cultivos *in vitro*, cuando se trata del empleo de esta técnica en el mejoramiento, es muy importante, también la edad de los cultivos *in vitro* hay que tenerla en cuenta en la micropropagación.

En investigaciones realizadas con el cultivo de papa, que es un clásico ejemplo de propagación por esquejes, se ha encontrado que largos periodos de propagación provocan variabilidad genética y se recomienda cambiar los meristemas todos los años.

En los medios de cultivos existen dos formas de causar variabilidad: una es debido a la influencia de las distintas hormonas empleadas sobre el material hereditario y la otra es que los medios de cultivos condicionan la forma de regeneración de las plantas.

## **1.6 Cultivo in vitro de *Uncaria guianensis***

Según Pinedo (2001) el hábito de crecimiento y ciclo vegetativo de *U. guianensis*, induce a buscar técnicas de propagación con altas tasas de regeneración, una alternativa es la utilización de la micropropagación mediante micro estacas obtenidas de vitroplantas, para lo cual utilizó como medio de cultivo el descrito por Murashige y Skoog 1962.

Delgado et al. (1998), trabajó en la propagación y conservación de germoplasma *in vitro*, recomendando para la micropropagación por semilla botánica y parte apical de las plántulas los medios B-5, Mc Cown y Ms.

Hojas de plántulas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC y *Uncaria guianensis* Aubl. cultivadas *in vitro* fueron introducidas en condiciones asépticas al medio de cultivo MS. Se utilizaron diferentes concentraciones hormonales como tratamientos para inducir la formación de callos y raíces y se encontró diferencias en el desarrollo de callos y raíces entre ambas

especies sometidas a los mismos tratamientos. Concentraciones de 5 mg/L de 2-4D diclorofenoxiacético + 0,5 mg/L de kinetina permitieron una mejor inducción de callos en ambas especies, mientras que la concentración de 0,5 mg/L de AIB + 0,1 mg/L de BAP se obtuvo mejor desarrollo de raíces (Tapia y Figueroa y Dominguez ,2001).

Freyre (2004), seleccionó plántulas provenientes de germinación *in vitro* de semilla botánica de las especies: *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa*. Las cuales fueron desinfectadas y colocadas en tubos de ensayo con alícuotas de 5 cc de medio de cultivo MS. De 8 a 10 semanas obtuvo plántulas con buenas características fenotípicas para efectuar la escisión de las yemas, que en promedio poseen un tamaño de 1 cm, de cada plántula en sus diferentes tamaños se aíslan los explantes como: yema apical, yemas medias, yema basal y se inoculan en un medio MS completo para su crecimiento y desarrollo.

Se tuvo en cuenta las condiciones físicas de crecimiento como: Fotoperiodo 16/8 hrs., temperatura  $24 \pm 1$  °C y una humedad relativa de 70%. El medio de cultivo para la proliferación y multiplicación que utilizó fue MS con la adición de 30 UM de ácido giberélico ( $GA_3$ ).

El material vegetal se conservó en un Banco de Germoplasma con 5 accesiones, para esta fase se necesita un medio MS/2.

Fraguas (2003) en su trabajo de micropropagación de *Figueira*, obtuvo el mayor peso de materia fresca de los explantes (43 mg) en ausencia de  $GA_3$ .

Resultados similares fueron encontrados por Pereira et al., (2006) quienes trabajaron en la micropropagación *in vitro* de *Uncaria guianensis* en un medio MS en distintas concentraciones, con la presencia o ausencia de sacarosa y distintas posiciones del explante. Demostrando ejercer influencia en el número medio de brotaciones / explante original, así como el número de yemas iniciales. La presencia o ausencia de  $GA_3$  no ejerce efecto en estas características, excepto cuando un explante con una única yema es inoculado en forma horizontal.

## **1.7 Cromatografía en capa fina (TLC) de alcaloides**

La cromatografía (chromo = color, graphos = escritura), técnica utilizada desde 1910 por el Botánico Ruso Michael Tswett, para la separación de pigmentos de plantas (clorofila), absorbidas por una solución en movimiento por migración diferencial, sobre una superficie de papel. Abbot (1982), explica que en el año 1912 Ismailov y Scraiber, utilizaron por primera vez láminas de vidrio con capas delgadas de alúmina sobre el cual se colocaron extractos vegetales, iniciándose la cromatografía en capa fina; siendo estandarizados los procedimientos, equipos y adsorbentes por Stahl en 1956.

Randerath (1974), reporta que el fundamento del método fisicoquímico, se basa en la separación, identificación y cuantificación de sustancias de interés biológico, las cuales han sido transportadas por una fase móvil y retenida por una fase estacionaria inmóvil. La muestra aplicada es adsorbida en la superficie del material por capilaridad, mediante fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, puentes de Hidrógeno, efectos inductivos, entre otros. Por otro lado, Browning (1971), indica que los compuestos migran a diferentes velocidades en forma independiente, ésta separación se puede realizar por procesos de absorción, reparto, intercambio iónico, o por combinación de éstas; las moléculas que tienen menor peso molecular migran más rápido en dirección de la solución en movimiento, mientras que las de mayor peso molecular demoran en pasar por los poros de celulosa. Al término de la separación de los compuestos, se revelan con sustancias coloreadas o reactivos de comprobación.

Según Lock (1994), debido a la gran diversidad de estructuras que pueden presentar los alcaloides, el tener como referencia la planta (familia y género) del cual ha sido aislado reduce el problema de identificación a un

número menor de posibilidades y clasifica al alcaloide dentro de un determinado tipo; la posterior aplicación de pruebas de cromatografía de capa delgada en combinación con reacciones específicas de coloración hace posible en muchos casos la identificación de un alcaloide conocido; esta asunción puede ser comprobada y complementada con un registro de UV e IR, con mediciones de rotación específica, de dispersión rotatoria óptica o de dicroísmo circular que permitirán confirmar la estereoquímica.

Según Abbot (1982), para la medida de velocidad de desplazamiento de cualquier sustancia desconocida, se utiliza el valor R<sub>f</sub> (Factor de retención), que representa una característica física importante para cada componente de una sustancia; siendo recomendable hacer desplazar en un mismo cromatograma, la sustancia desconocida al lado de un estándar ya conocido.

Dentro de las técnicas cromatográficas, la CCD es la más usual utilizando principalmente sílica gel G, otros adsorbentes usuales son: óxido de aluminio G, poliamida, celulosa o la misma sílica gel G hecha alcalina por preparación de la placa con una solución de KOH 0,5 N o NaOH 0,1N en vez de agua. Los sistemas de solventes son también muy variados, y al igual que las reacciones de coloración y de precipitación, algunos son considerados de uso general y otros han sido aplicados más específicamente (Lock, 1994).

Para la comprobación de la presencia de alcaloides se ha desarrollado también un gran número de reactivos de coloración y de precipitación; algunos de ellos son considerados de aplicación general mientras otros son de uso más específico y pueden servir para clasificaciones parciales de estas sustancia; generalmente se considera que hay presencia de alcaloides si dan reacción positiva a por lo menos 4 de estos reactivos. Son de uso general los reactivos de Dragendorff, Mayer, Wagner, Sonneschein.

El UV, siendo uno de los métodos espectrométricos más antiguos, es aún una herramienta útil de la identificación y elucidación estructural de los alcaloides. Hay grupos de alcaloides que no absorben en esta región como alcaloides de pirrolidina, de piperidina y los estreoalcaloides, al menos que presenten sustituyentes con grupos cromóforos; mientras, que otros debido a su naturaleza aromática presentan absorciones, las que pueden verse modificadas por la presencia de sustituyentes en determinadas posiciones o por cierta variación estructural (Verpoorte, 1986).

### **2.7.1 Cromatografía en capa fina de *Uncaria guianensis***

En estudios realizados con uña de gato reportan la presencia de alcaloides, saponinas, taninos flavónicos y flavonoides para lo cual la solución de ensayo, se preparó con el crudo de alcaloides obtenidos en la prueba de ensayo, en la determinación de la droga cruda disuelta en cloroformo. Sobre el cromatofolio se aplica 10 µl de la solución de ensayo, a 1,5 cm de distancia del borde inferior, luego, se corre 15 cm a partir de la línea de aplicación, utilizando como fase móvil el sistema de acetato de etilo y cloroformo, en la proporción 1:1 v/v (Delgado et al., 1998).

Una vez corrido el cromatofolio, se revela atomizando con el reactivo de Dragendorff. Se miden los Rf de las manchas positivas frente al reactivo revelador. El perfil cromatográfico de alcaloides, presenta 3 manchas con mayor intensidad de coloración naranja, con Rf: 0,25, Rf: 0,4, Rf: 0,53 y una mancha de menor intensidad con Rf: 0,11, frente al reactivo revelador de Dragendorff.

Wagner y Bladt (1996) utilizaron un extracto de amonio de la corteza de *Uncaria tomentosa* en un sistema de acetato de etilo: isopropanol: NH<sub>3</sub> conc.

(100:2:1) y UV 254nm y DRG/10% NaNO<sub>2</sub> para la detección. Reportaron que el extracto es caracterizado por dos zonas marcadas de Rf entre el rango 0,7-0,8 y 0,25 - 0,3. Los oxindoles pentacíclicos, como isomitrafalina, isopteropodina y uncarina A +F, así como los oxindoles tetracíclicos como isorincofilina se encontraron en el rango de Rf 0,7-0,8. El oxindol pentacíclico mitrafalina y el oxindol tetracíclico rincofilina se observan en el rango de Rf: 0,25-0,3.

Para los análisis por CCD Lock y col. (2001), utilizaron el solvente (cloroformo, acetato de etilo) de grado analítico y cromatofolios de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) (20 x 10 cm). Para los análisis por CCD, el material finamente molido o los productos comerciales (1g) se humedecieron con NH<sub>4</sub>OH al 10% y extrajeron con 5 ml de diclorometano, se secaron con sulfato de sodio anhidro, y se aplicaron 25 µl de muestra. Los análisis por CCD se llevaron a cabo por comparación con los estándares Mitrafalina, Isopteropodina y Pteropodina. El sistema de elución fue CHCl<sub>3</sub>: EtOAc en las proporciones 8:2, 7:3 y 6:4 desarrollados en forma consecutiva. Se revelaron con luz UV a 254 nm y reactivo de Dragendorff.

Para los análisis por CCD, los cromatofolios fueron revelados por luz UV 254 nm y reactivo Dragendorff. Con los sistemas de elución se obtuvo una muy buena resolución de los alcaloides mitrafalina (Rf: 0,35), pteropodina (Rf: 0,65) e isopteropodina (Rf: 0,74), permitiendo la identificación inequívoca de estos por CCD.

Valdizán y Maldonado (1985), identificaron los principales alcaloides oxindólicos tetra y pentacíclicos: rincofilina e isorincofilina. Luego los alcaloides secundarios mitrafalina (característico de la familia Rubiaceae), la pureza de mitrafalina fue comprobada por diversas CCD e isomitrafalina hallado sólo en *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.

Montenegro de Matta y col. (1976) obtuvieron 5 alcaloides crudos (pteropodina, especiofilina, isopteropodina, uncarina F e isomitrafalina) por extracción metanólica de las partes de la planta micropulverizadas y sin residuos de grasas, de acuerdo a un procedimiento standard. Para separar los cinco alcaloides, la mezcla fue disuelta en benceno y se extrajeron con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 0,2 molar hasta que la fase orgánica contuviera únicamente el principal alcaloide, en tanto que la fase ácido-acuosa contenía la mezcla original, utilizaron técnicas de espectrometría por medio de los espectros de ultravioleta, infrarrojo y de masa.

Laus y Keplinger (1994), desarrollaron otros dos métodos para la separación y determinación de 8 alcaloides de plantas de *U. tomentosa* recolectadas del campo, estableciendo métodos de extracción en condiciones suaves para evitar la interconversión de los mismos. Con el sistema  $\text{CHCl}_3$ : EtOH (95:5) reportaron los siguientes alcaloides: isopteropodina (0,48), pteropodina (0,47), isomitrafalina (0,47), isorrinchofilina (0,42), mitrafalina (0,39), rinchofilina (0,25).

Valente et al. en el 2006 describió el desarrollo de la metodología analítica cualitativa utilizando cromatografía en capa delgada (CCD), para la determinación del perfil de seis alcaloides oxindólicos pentacíclicos marcadores de *Uncaria guianensis*.

El método desarrollado en CCD mostró ser confiable y selectivo para estos alcaloides, siendo aplicado en análisis de muestras de hojas y tallo de las dos especies *in situ* y también en fitoterapéuticos.



## 1.8 Alcaloides oxindólicos de *Uncaria guianensis*

En 1952 Raymond-Hamet estableció por primera vez la presencia de rincofilina al estudiar las hojas de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel, este estudio fue presentado en la Academia de Ciencias de París, Francia.

En el año 1974, se reportó un estudio de *Uncaria guianensis* con el aislamiento del alcaloide angustina de las hojas, tallos y flores de una especie recolectada en Mato Grosso, Brasil (Phillipson, 1974).

En 1975 Phillipson y Hemingway en Inglaterra examinaron las muestras de hojas y tallos tanto de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. y *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. dentro de un plan de screening en cromatografía en capa delgada, observando que ambas especies de *Uncaria* presentaban alcaloides semejantes. Mediante cromatografía de comparación, los principales alcaloides oxindólicos identificados por estos investigadores fueron; rincofilina e isorincofilina (oxindol tetracíclicos) junto con sus N-Oxidos. Se ubicaron como alcaloides secundarios: mitrafilina (un alcaloide propio de la familia de las Rubiaceas descubierto en el género *Mitragyna*), hirsuteína, hirsutina y dihidrocorinanteína. Analizaron también los alcaloides de otras catorce muestras de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel, de colecciones de herbolarios provenientes de diferentes regiones de Sudamérica, de éstas, doce tuvieron similitud a la muestra descrita y una tuvo como alcaloide principal a mitrafilina.

Montenegro de Matta y col. (1976) obtuvieron alcaloides crudos por extracción metanólica y detectaron cinco alcaloides, a los cuales identificaron como: pteropodina, especiofilina, isopteropodina, uncarina F e isomitrafilina.

En 1983, Lavault et al. y el centro de ORSTOM de Cayena, publican en el Journal of Medicinal Plant Research sus estudios con especímenes de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel., de cuyas hojas obtienen los alcaloides rincofilina e isorincofilina y de sus raíces los alcaloides: pteropodina (40%),

especiofilina (50%) y mitrafilina (10%). Todos los alcaloides hallados fueron del tipo oxindol.

Según análisis precedentes de otros autores como Phillipson y Hemingway (1974), consideraron a mitrafilina e isomitrafilina los alcaloides principales de *Uncaria guianensis*.

En otro estudio realizado en Lima – Perú en 1988, concerniente a *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel., se aisló y caracterizó el alcaloide oxindólico pentacíclico mitrafilina de sus hojas (Álvarez y col.).

Keplinger (2001) afirma que los dos tipos de oxindol alcaloides tienen calidades farmacológicas distintas, un error en el análisis es permisible. Los oxindol alcaloides tetracíclicos son bloqueadores de los canales de calcio ionizado. De esta forma son inhibidores de la agregación de los trombocitos, tienen actividad cronotrópica e inotrópica negativa y en dosificaciones muy altas se ha observado el desarrollo de ataxia y de parálisis de la respiración. Los oxindol alcaloides pentacíclicos por el contrario aumentan la fagocitosis de granulocitos y macrófagos e inducen la liberación de una citokina de las células endoteliales, aumentan la proliferación de linfocitos a un 300% e inhibe la proliferación de linfoblastos en un 90%. La liberación de este factor de crecimiento efectuado por los oxindol alcaloides pentacíclicos es inhibida antagónicamente por los oxindol alcaloides tetracíclicos. Se ha comprobado que el mezclado de cantidades muy pequeñas de oxindol alcaloides tetracíclicos en preparaciones que tienen una mayoría de pentacíclicos se reduce la liberación del factor de crecimiento a un nivel fisiológicamente inactivo.

Chávez-Reyes y Plaza (2001), aislaron e identificaron ocho alcaloides oxindólicos a partir de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*.

Montoro et al. (2004) entre los alcaloides de la corteza de *U. tomentosa*, destacan los alcaloides oxindólicos pentacíclicos pteropodina (o uncarina C), isopteropodina (o Uncarina E), especiofilina, uncarina F, mitrafilina e

isomitrafilina, y los alcaloides oxindólicos tetracíclicos rincofilina, isorrincofilina, corinoxeina e isocorinoxeina. Contiene además sus precursores indólicos (akuammigina, tetrahydroalstonina, isoajmalicina, e hirsutina, dihidrocorinanteina, hirsuteina, corinanteina).

Según la FAO (2008), en *U. guianensis* se encontró: en las hojas; alcaloides (angustina y mitrafilina); flavonoides (kaemferol y dihidrokaemferol); taninos: abundantes; tallo (corteza): alcaloides: (angustina y mitrafilina); flavonoides: 7 compuestos, 2 de ellos kaemferol y dihidrokaemferol; glicósidos: 6 glicósidos del ácido quinóvico y en las flores: alcaloides (angustina).

Al mismo tiempo la revista Botanical (2008), reportó haberse aislado varios alcaloides de la corteza, y en menor medida de la raíz y las hojas: oxindoles pentacíclicos: uncarinas C-F (planta), pteropodina (corteza y raíz), isopteropodina (raíz), especiofilina (corteza), mitrafilina e isomitrafilina y oxindoles tetracíclicos: rincofilina e isorrincofilina (hojas y raíz). Además, fitoesteroides como  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol; polifenoles, triterpenoides y glucósidos del ácido quinóvico. Ácidos: oleanólico, clorogénico, ursólico (planta), quinóvico (corteza) y rutina.

## **1.9 Propiedades y usos medicinales**

A partir de 1970 se empezaron a realizar las primeras investigaciones científicas sobre las propiedades curativas de la “uña de gato”. Desde entonces numerosos estudios se han orientado en la afirmación de que la principal virtud de esta planta es su capacidad para aumentar las defensas e impedir el desarrollo de tumores cancerosos. Entre las propiedades más resaltantes y estudiadas de la uña de gato se tiene (Botanical, 2008):

- Inmunoestimulante
- Antiinflamatoria
- Antiradicales libres
- Antimutágena y citostática
- Antiviral
- Antibacterial
- Desintoxicante y resolutive del tracto digestivo
- Antialérgica
- Desintoxicante de toxinas ambientales
- Antiagregante plaquetario
- Actividad antimicótica
- Actividad antidepresiva

El mayor responsable de su capacidad para aumentar las defensas es el alcaloide isopteropodina junto con otros alcaloides oxindólicos (isomitrafilina, mitrafilina) y el ácido clorogénico.

Lo que hacen estos alcaloides es aumentar la actividad fagocítica de los granulocitos neutrófilos y macrófagos, y estimular la producción de linfoquinas. Aumenta también el número de monocitos en fases activas en la circulación periférica, hasta en un 50%, al cabo de una semana de tratamiento. Los granulocitos incrementan en un 60% su poder fagocitario (test de Brand con partículas Zimosan) en presencia de extractos al 0.01%. No existe alteración en la proliferación de los linfocitos T en condiciones normales, pero hay en aumento en presencia de antígenos. Es útil en cáncer, sida, candidiasis sistémica, herpes varios y sarcoma de Kaposi (Sisa, 2004).

La actividad depurativa de la uña de gato se debe a su poder para eliminar sustancias potencialmente peligrosas para el organismo (contaminación, sustancias químicas ambientales, tóxicos en la alimentación,

etc.). La función antioxidante de los ácidos, especialmente el ácido quinóvico, así como la rutina, las epicatequinas o el  $\beta$ -sitosterol ejercen una función depurativa al eliminar los radicales libres que podrían ser responsables del desarrollo de tumores cancerosos (Botanical, 2008).

Además el uso de esta planta previene el desarrollo de tumores cancerosos, aumentando el poder de los glóbulos rojos en su capacidad para fagocitar o eliminar bacterias, virus o sustancias que podrían favorecer la aparición de cánceres, como por su actividad antioxidante.

En las enfermedades respiratorias ejerce también un efecto antiespasmódico proporcionado por su contenido de rutina. Con respecto a las enfermedades del aparato urinario hay que tener en cuenta que, además de aumentar las defensas, esta planta, por su contenido en ácidos oleanólico, clorogénico y ursólico, posee propiedades diuréticas suaves por lo que, al aumentar el nivel de orina, beneficia la curación de las mismas.

El alcaloide rincofilina tiene propiedades fluidificadoras de la sangre ya que disminuye la capacidad de coagulación de la sangre. Esta propiedad puede ser muy útil en aquellos casos en que exista una mala circulación de la sangre.

La propiedad antiinflamatoria de *U. tomentosa* se le atribuye a los glucósidos quinóvicos. Es un 15% superior a la Indometacina y útil en artritis reumatoide, artritis diversas, bursitis, reumas, lupus y fibromialgias (Sisa 2004).

Snow y Castillo (2005), En sus investigaciones realizadas, indican que la uña de gato podría ser útil en las personas con la enfermedad de Alzheimer, esto podría ser atribuido a los efectos antioxidantes de los compuestos.

Además se ha confirmado, la dilatación de los vasos sanguíneos que rodean al cerebro por los alcaloides estriados de esta planta tal como rincofilina.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Material biológico

El material biológico procedente del Bosque Nacional Alexander Von Humboldt – Pucallpa (Figura N° 1), fue donado por el laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, bajo la forma de 10 plántulas *in vitro* contenidas en tubos de ensayo para su micropropagación.

De las plántulas micropropagadas se utilizaron 105 para la evaluación de la influencia del ácido giberélico ( $GA_3$ ) y 120 plántulas para la cuantificación de la biomasa obtenida *in vitro*. Para las corridas cromatográficas se utilizó 1 g por cada parte de la planta pulverizada (Raíz, tallo y hojas) y 1 g de la planta completa.

### 2.2 Métodos:

#### 3.2.1 Elaboración del medio de cultivo para micropropagación

Para la elaboración del medio de propagación basal (MPB) fue necesario preparar la solución stock (Tabla N°1) de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y de quelato de hierro (Fe-EDTA), haciendo soluciones altamente concentradas de las cantidades establecidas por Murashige y Skoog (1962).

Para la solución stock de macronutrientes (10 X) se multiplicó por 10 cada uno de los macronutrientes y se pesó en una balanza analítica. Cada sal se diluyó por separado con 50 ml de agua destilada, luego se mezclaron y enrazaron a 1 L en un erlenmeyer.

En el caso de los micronutrientes se preparó una solución 100 X, donde cada sal por separado se multiplica por cien y se pesa. De igual forma se repite el proceso de dilución que en los macronutrientes y se enraza a 500 ml. La solución stock de vitaminas se hizo multiplicando cada una por 10, se pesaron, se diluyeron por separado con agua destilada y se enrazaron a 250 ml.

Para la solución concentrada de quelato de hierro (Fe-EDTA), se multiplicó cada sal por cien y se pesaron. Luego se diluyeron las sales en 100 ml de agua destilada cada una, se mezclaron y se calentaron en una hornilla en constante agitación hasta que la mezcla tomó un color amarillo claro (champagne). Las soluciones stock se mantuvieron en frascos de vidrio debidamente rotulados y refrigerados a 4°C.

Para la preparación de 1 litro de solución de trabajo, se realizaron los cálculos con una regla de tres simple y se tomaron las siguientes alícuotas de cada solución stock: 100 ml de macronutrientes, 2,5 ml de micronutrientes, 25 ml de vitaminas, 1 ml de quelato de hierro y se enrazó con agua destilada (Tabla N° 1). Luego se añadió 30 g de sacarosa y se ajustó el pH a 5,6 - 5,8 mediante la adición de NaOH y/o HCl 0.1-1 N.

A continuación, se añadió 3 g del agente gelificante (Gelrite) y se llevó hasta el punto de ebullición, para finalmente servir con un dosificador 10 ml del medio de cultivo en cada tubo de ensayo. Luego los tubos de ensayo se autoclavaron a 121 °C, 15 libras de presión, durante 20 minutos.



Para evitar la fenolización de las plantas, se adicionó antes del autoclavado, 0,5 g de carbón activado por litro de medio de cultivo. Los tubos de ensayo con carbón activado se agitaron constantemente hasta su gelificación, evitando de esta forma su precipitación.

Bajo condiciones totalmente asépticas en una cámara de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 96 % y esterilizada con rayos UV por un periodo de 15 minutos, se cortaron segmentos nodales de aproximadamente 0,7 cm (Figura N° 2) de las plántulas *in vitro* y fueron sembradas de forma vertical en el medio de cultivo (Figura N° 3).

### **3.2.2 Preparación de la solución stock de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)**

Para preparar una solución concentrada de ácido giberélico (1000 mg/L de GA<sub>3</sub>), se pesó 1g de GA<sub>3</sub>, se diluyó en 10 ml de etanol y se enrazó con 1 L de agua destilada estéril. Esta solución se mantuvo refrigerada en un frasco de vidrio a 4 °C.

Para preparar los medios de cultivo con diferentes concentraciones de GA<sub>3</sub>, se trabajó bajo la cámara de flujo laminar y se agregó en el medio de cultivo a 60 °C las cantidades mostradas en la tabla N° 2.

A continuación, se sembraron los esquejes de la misma manera como se realizó en el paso anterior (micropropagación). Se hicieron 15 repeticiones por cada tratamiento y se evaluó semanalmente el crecimiento y enraizamiento de la planta por un periodo de 90 días.

### **3.2.3 Condiciones de cultivo**

Los esquejes fueron incubados en la sala de crecimiento donde se controló la temperatura a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , un fotoperiodo de 16 horas luz a 3000 lux (40  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$ ) y una humedad de 70 %. (Figura N° 4)

### **3.2.4 Cuantificación de la biomasa obtenida *in-vitro***

Para la obtención del peso húmedo, se tomaron 60 plántulas que fueron cultivadas en un medio MS sin  $\text{GA}_3$  y 60 plántulas que fueron cultivadas en un medio MS con 0,01 mg/L de  $\text{GA}_3$ , se retiraron del tubo de ensayo y se lavaron con agua destilada, una vez secas se pesaron.

A continuación las plantas se colocaron en placas petri y secaron a  $40^\circ\text{C}$  por un periodo de 72 horas, luego se pesaron y se calculó el peso seco relativo. Los resultados obtenidos fueron sometidos al programa de estadísticas SPSS 16.0 utilizando el modelo lineal general (ANOVA).

### **3.2.5 Determinación de la presencia de alcaloides del grupo oxindólico, por cromatografía en capa fina (TLC)**

#### **3.2.5.1 Obtención del extracto crudo a partir de plántulas producidas *in-vitro***

Las muestras secas se separaron en hojas, raíz y tallo, se pulverizaron con la ayuda de un mortero y se guardaron en frascos de vidrio color ámbar. Los frascos fueron guardados en la cámara desecadora para evitar la rehidratación de las muestras.

Para la extracción de los alcaloides a 0,2 g de la muestra se le agregó 1 ml de metanol y se calentó a baño maría durante 5 minutos. A continuación se centrifugó por 5 minutos a 9000 RPM, se separó el sobrenadante y se obtuvo 0,5 ml de extracto por cada muestra, de los cuales se utilizó 10 µl para cada corrida cromatográfica. El extracto se guardó en tubos eppendorf a una temperatura de 4 °C.

### **3.2.5.2 Cromatografía en capa fina (TLC)**

Para el desarrollo de la cromatografía, se prepararon bajo la cámara extractora los solventes a utilizar con las siguientes proporciones; cloroformo: etanol (9,5: 0,5) y acetato de etilo: metanol: agua (100: 13,5: 10). Las soluciones se rotularon y se conservaron en frascos de vidrio color ámbar.

A continuación para la saturación de la cámara cromatográfica, se colocó 50 ml del sistema una hora antes de realizar la corrida. Luego las placas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> MERCK, se cortaron con 15 cm. de largo por 15 cm. de ancho, y se activaron en una estufa a 100 °C durante una hora.

En las placas activadas se marcó con un lápiz la línea de inicio de corrida a 1,5 cm de distancia del borde de la placa y otra línea de fin de corrida a 10 cm de la línea inicial. A continuación se marcaron unas rayas de 0,8 cm separadas por una distancia de 1,5 cm, en las cuales se colocó 10 µl de cada muestra.

En seguida, se colocaron las placas en la cámara cromatográfica y se dejó correr hasta que el solvente llegara a la línea final, este proceso duró un periodo aproximado de 15 minutos.

Luego se secaron las placas en una estufa a 100 °C por 10 a 15 minutos y se visualizaron las bandas correspondientes a los alcaloides en una cámara de UV de 254 nm, a continuación las placas

se revelaron en una cámara extractora utilizando el reactivo vainillina - ácido sulfúrico (0,1:10).

Finalmente, se procedió a determinar el Rf (Factor de Retención), utilizando la fórmula de Randerath (1974), la cual consiste en dividir la distancia recorrida por el compuesto sobre la distancia recorrida por el eluyente.

### **3.2.6 Evaluación**

Las plántulas tratadas con GA<sub>3</sub> fueron evaluadas semanalmente durante tres meses. Considerándose los siguientes criterios de evaluación:

- Enraizamiento de la plántula: tiempo, porcentaje.
- Elongación de la plántula: tiempo, apariencia.

El porcentaje de enraizamiento se calculó dividiendo el número de plántulas enraizadas entre el total de esquejes cultivados.

Mientras que para la cuantificación de la biomasa, las plántulas se evaluaron a los 5, 7 y 9 meses de edad, considerándose los siguientes criterios:

- Número de segmentos nodales por plántula
- Crecimiento de la plántula
- Biomasa fresca
- Biomasa seca
- 

### **3.2.7 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 16.0 y los resultados fueron evaluados mediante el modelo lineal general (ANOVA), en el que se comparó la diferencia significativa entre los tratamientos con diferentes concentraciones de GA<sub>3</sub>.

### III. RESULTADOS

#### 4.1 Micropropagación

Las diez plántulas se micropropagaron por segmentos nodales en el medio de cultivo MPB de concentración normal y se obtuvo 93 plántulas con una media de 1,84 cm de altura (Tabla N° 3) en plántulas de 30 días

De las plantas micropropagadas el 27 % enraizó a los 7 días, alcanzando un 80 % de enraizamiento en plántulas de 30 días (Tabla N° 4).

El 1,07% de las plántulas presentaron fenolización (Figura N° 5) y para contrarrestarla se agregó carbón activado al medio MPB.

Las plántulas obtenidas se continuaron micropropagando y se utilizaron en los siguientes pasos, por el contrario las plántulas contaminadas fueron debidamente autoclavadas y desechadas.

#### 4.2 Evaluación de la influencia del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en el cultivo *in vitro* de *Uncaria guianensis*

A los 90 días de edad se evaluaron las plántulas cultivadas en el medio 1 (0 mg/L de GA<sub>3</sub>), y se obtuvo una altura media de 2,07 cm (Tabla N° 5) (Gráfico N° 1 y 2) y el 87 % de plántulas enraizadas (Tabla N° 6) (Gráfico N° 3).

Los plántulas cultivadas en el medio 3 (0,01 mg/L GA<sub>3</sub>) (Figura 6, 7,8, 9 y 10) alcanzaron el mayor índice de crecimiento, logrando una altura media de 6,96 cm y el 100% de enraizamiento en plántulas de 90 días.

El 27% de las plántulas en los 3 primeros tratamientos enraizaron a los 7 días (Gráfico N° 4), mientras que a partir del cuarto tratamiento el enraizamiento disminuye de forma significativa debido a la presencia de una mayor concentración de GA<sub>3</sub>.

Las plántulas cultivadas en el medio 4 y 5 (0,1 y 1 mg/L de GA<sub>3</sub>) presentaron una media de crecimiento de 6,36 y 6,39 cm respectivamente a los 90 días de edad. Además se observó una inhibición del enraizamiento, enraizando sólo el 67% y 47% de las plántulas de 30 días de edad y el 93% y 60% de las plántulas de 90 días enraizaron.

En los medios 6 (2 mg/L de GA<sub>3</sub>) y 7 (3 mg/L de GA<sub>3</sub>) el crecimiento de las plántulas alcanzó una media de 3,26 cm y 3,06 cm a los tres meses de edad (Figura N° 11) y sólo el 27% y 17% de las plántulas de 30 días de edad enraizaron. Además se observó deformaciones foliares, muerte apical, inhibición del enraizamiento y debilitamiento de la misma. Estas características fueron observadas en plántulas que fueron cultivadas en un medio con concentraciones de 2 y 3 mg/L de GA<sub>3</sub> (Figura N° 12).

El número de esquejes promedio obtenido en plántulas cultivadas en un medio de cultivo enriquecido con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> fue de 18,4 en un periodo de 5 meses y 37,1 esquejes a los 9 meses de edad (Gráfico N° 5 y 6), obteniéndose una media total de 26,4 esquejes por vitroplanta cultivada con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> (Tabla N° 7) y una altura de 16 cm (Gráfico N° 7).

Por el contrario en un medio de cultivo sin GA<sub>3</sub>, se obtuvo una media de 12,1 esquejes en plántulas de 5 meses de edad y 30,7 esquejes en plántulas

de 9 meses (Gráfico N° 8). En promedio se obtuvo 19,4 esquejes por plántula (Tabla N° 8) y una altura media de 11,61 cm (Gráfico N° 9).

### **4.3 Cuantificación de la biomasa obtenida *in-vitro***

Se pesaron las plántulas de 5 meses de edad que fueron cultivadas en un medio de cultivo sin GA<sub>3</sub> y se obtuvo un peso húmedo medio de 0,38 g. En las plantas pesadas a los 9 meses de edad, se obtuvo un peso húmedo de 1,79 g (Tabla N° 9) (Gráfico N° 10).

Por el contrario las plántulas que fueron cultivadas en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub>, el peso húmedo medio a los 5 meses de edad fue de 0,68 g mientras que a los 9 meses de edad fue de 2,60 g (Tabla N° 10) (Gráfico N° 11).

El peso seco relativo de las plántulas que se cultivaron en un medio adicionado con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> a los 5 meses de edad fue de 0,13 g mientras que a los 9 meses el peso seco relativo es de 0,38 g (Gráfico N° 12 y 13). En las plántulas que fueron cultivadas sin GA<sub>3</sub>, se obtuvo un peso seco relativo de 0,38 g a los 5 meses y 1,79 g a los 9 meses de edad (Gráfico N° 14).

De las plántulas que fueron cultivadas en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> se pesaron 60 plántulas de distintas edades (5, 7 y 9 meses) y se obtuvo una media total de 26,4 esquejes por plántula, obteniéndose 1589 nuevas plántulas (Gráfico N° 15). También se calculó un peso húmedo total de 93,07 g y un peso seco relativo total de 15,47 g.

Las 60 plántulas que fueron cultivadas en ausencia de GA<sub>3</sub> presentaron un promedio de 19,4 esquejes por plántula, obteniéndose un total de 1164

plántulas. Además las 60 plántulas fueron pesadas, calculándose un peso húmedo total de 53,87 g y un peso seco relativo total de 8,49 g.

En un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> se necesitó entre 8 a 10 plántulas de 5 meses de edad dependiendo del tamaño, para obtener 1 g de masa seca, mientras que en plántulas de 7 meses de edad se necesitó 4 plántulas aproximadamente para obtener 1 g de masa seca y a los 9 meses de edad se necesitó de 2 a 3 plántulas.

A diferencia de las plántulas que fueron cultivadas en un medio de cultivo en ausencia de GA<sub>3</sub> a los 5 meses de edad se utilizó un aproximado de 15 plántulas para la obtención de 1 g de masa seca, mientras que a los 7 meses de edad se utilizó 8 plántulas y a los 9 meses un aproximado de 7 plántulas para la obtención de 1 g de masa seca.

#### **4.4 Determinación de la presencia de alcaloides del grupo oxindólico por cromatografía en capa fina (TLC)**

El extracto metanólico resultó apropiado para la identificación de alcaloides por TLC, para lo cual fue necesario aplicar sólo 10 µl de la muestra debido a la adecuada segmentación y visualización de los principios activos.

Se lograron visualizar 7 alcaloides oxindólicos en plántulas de *Uncaria guianensis* cultivadas *in vitro*, comparando los factores de retención (Rf) con los obtenidos en investigaciones realizadas con plantas *in situ* (Tabla N° 11). Los cromatogramas realizados con el sistema clorofomo: etanol (9,5:0,5) y revelados con vainillina – ácido sulfúrico (0,1:10) (Figura N° 13) presentaron una mejor segmentación de las bandas correspondientes a: isopteropodina (Rf 0,74), pteropodina (Rf 0,66), isomitrafalina (Rf 0,49), uncarina F (Rf 0,40),



mitrafilina (Rf 0,37), especiofilina (Rf 0,06) (alcaloides oxindólicos pentacíclicos) y rincofilina (Rf 0,25) (alcaloide oxindólico tetracíclico). Por otro lado utilizando el sistema acetato de etilo: metanol: agua (100: 13,5: 10) (Figura N° 14) no se observó la banda correspondiente al alcaloide especiofilina y los factores de retención (Rf) variaron en comparación a los encontrados con el sistema cloroformo: etanol (9,5: 0,5).

Para la corrida cromatográfica de las partes de la planta por separado se encontró en el extracto metanólico de las raíces (Figura N° 15) y hojas (Figura N° 16) de *Uncaria guianensis* cultivada *in vitro*, 6 alcaloides pentacíclicos: isopteropodina, pteropodina, isomitrafilina, uncarina F, mitrafilina, especiofilina y un alcaloide tetracíclico: rincofilina.

En las raíces se visualizaron bandas de mayor grosor correspondientes a los alcaloides uncarina F y especiofilina mientras que las hojas presentaron bandas de mayor grosor correspondientes a isomitrafilina y mitrafilina.

Por lo contrario, el tallo fue la única parte de la planta en la que no se visualizó la banda del alcaloide isomitrafilina y las demás bandas correspondientes a los alcaloides: isopteropodina, pteropodina, uncarina F, mitrafilina, especiofilina, rincofilina (Figura N° 17), se visualizaron con dificultad.

## IV. DISCUSIÓN

### 5.1 Micropropagación

Delgado et al. (1998) y Freyre (2004), trabajaron en la micropropagación y conservación de plantas del género *Uncaria*, utilizando los medios de cultivo B-5, Mc Cown y MS obtenidas por semilla botánica y parte apical de las plántulas. De igual manera Pinedo (2001) micropropagó con éxito *U. guianensis* mediante micro estacas, utilizando el medio de cultivo MS y afirmó que esta es una técnica apropiada para la micropropagación con altas tasas de regeneración.

En el presente trabajo realizado en el laboratorio se micropropagó plántulas de *U. guianensis* en el medio de cultivo MS, en el cual se dio el desarrollo normal de las plántulas y se logró que el 27 % enraizaran en 7 días, lo que difiere de los resultados obtenidos por Delgado et al. (1998), quienes reportaron el enraizamiento de las plántulas en 15 días. Por lo que consideramos que el contenido del medio MS es conveniente para la micropropagación e incluso para el enraizamiento.

En el 2004, Freyre obtuvo plántulas con buenas características fenotípicas en un lapso de 8 a 10 semanas que en promedio alcanzaron un tamaño de 1 cm, mientras que los resultados logrados en esta investigación difieren de los resultados expuesto por Freyre (2004), donde se obtuvo plántulas con una altura media de 1,84 cm en un lapso de 4 semanas. Esto demuestra que las plántulas micropropagadas por esquejes tienen un mejor desarrollo en relación a las plántulas obtenidas por germinación de semilla botánica *in vitro*.

## **5.2 Evaluación de la influencia del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en el cultivo *in vitro* de *Uncaria guianensis***

Yui et al.(1990), trabajaron con manzanas de la variedad Golden Delicious, y reportaron que no hubo diferencia significativa para las concentraciones de 0; 0,01; 0,1 y 1 mg/L de GA<sub>3</sub>, concluyendo que el GA<sub>3</sub> es indispensable en los trabajos de multiplicación de Golden Delicious *in vitro*, lo que ha sido corroborado con las investigaciones realizadas por Melo-Farias et al., (1998); Ochatt y Caso (1983) y George (1996), quienes también observaron que el GA<sub>3</sub> ayuda en la formación de yemas y varía según la interacción existente con otros reguladores de crecimiento, dependiendo de la especie que está siendo micropropagada.

En el presente trabajo se utilizó el medio MS enriquecido con diferentes concentraciones: 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 2 y 3 mg/L de GA<sub>3</sub>, en los cuales las concentraciones de 0,01; 0,1 y 1 mg/L de GA<sub>3</sub> presentaron una diferencia significativa en cuanto al crecimiento, enraizamiento y formación de yemas, en comparación a las demás concentraciones, logrando obtener una altura media de 6,96 cm; 6,36 cm y 6,39 cm respectivamente en plántulas de tres meses, esto demuestra que el GA<sub>3</sub> promueve la elongación de la plántula en un 38 %, lo que corrobora los trabajos anteriores realizados por Yui et al. (1990).

Oliveira et al. (2001), trabajaron con *Averrhoa bilimbi* L. en un medio de cultivo enriquecido con 1 mg/L de GA<sub>3</sub>, quienes demostraron que la presencia de giberelina poco o nada contribuye en el crecimiento de los explantes y no causó efectos positivos. Igualmente la investigación realizada por Pereira et al. (2006), trabajaron con *U. guianensis* y argumentaron que la presencia o ausencia de GA<sub>3</sub> no ejerció efecto positivo en la formación de yemas, excepto cuando los explantes con una única yema fueron cultivados en forma horizontal.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no concuerdan con los resultados de Pereira et al. (2006) y Oliveira et al. (2001), puesto que las plántulas cultivadas en un medio enriquecido con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> promueve el crecimiento, enraizamiento y formación de yemas, tal como lo menciona Yui et al. (1990). De igual forma estos resultados coinciden con lo reportado por Figueredo et al. (2001), sobre la necesidad de GA<sub>3</sub> para el mayor desarrollo de yemas de *Rollinia mucosa* Jacq. Por otra parte, en esta investigación demostramos que la concentración de 0,001 mg/L de GA<sub>3</sub> no influencia en el crecimiento de la plántula.

Mishra et al., (1999), en su investigación con *Embllica officinalis* Gaertn, demostraron el elongamiento de las plántulas con 1 mg/L de GA<sub>3</sub> y el desfollamiento de algunos explantes con 3 mg/L de GA<sub>3</sub>. Por su parte Decetti (2001) describe el efecto perjudicial de GA<sub>3</sub> como necrosis apical y deformación foliar en el desarrollo de yemas de *Annona glabra* L.

En la presente investigación, al utilizar concentraciones de 2 y 3 mg/L de GA<sub>3</sub> se observó muerte apical, deformación foliar e inhibición del enraizamiento (27 % y 17 % de plántulas enraizadas en 30 días) en las plántulas de *U. guianensis* cultivadas *in vitro*, lo que corrobora los resultados obtenidos por Mishra et al. (1999) y Decetti (2001).

### **5.3 Cuantificación de la biomasa obtenida *in-vitro***

Pereira et al. (2006), reportaron que la presencia de GA<sub>3</sub> no produce un efecto benéfico en la formación de biomasa de *U. guianensis*. Las plantas con mayor formación de biomasa (30 – 40 mg) fueron observadas en explantes cultivados sin GA<sub>3</sub>.

Resultados similares fueron encontrados por Fraguas (2003) en su trabajo de micropropagación de *Figueira*, donde el mayor peso obtenido de materia fresca de los explantes fue de 43 mg en ausencia de GA<sub>3</sub>.

Sin embargo nuestros resultados demuestran que la presencia de 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> en el medio de cultivo causa un efecto benéfico en la formación de biomasa, obteniéndose un 37 % más de yemas por plántula, lo que nos permitió la obtención de un peso húmedo promedio de 0,68 g; 1,36 g y 2,60 g en plántulas de 5, 7 y 9 meses de edad y un peso seco de 0,13 g; 0,25 g y 0,38 g respectivamente. Además permitió obtener un promedio de 26,4 esquejes por plántula y un total de 1589 plántulas.

#### **5.4 Determinación de la presencia de alcaloides del grupo oxindólico por cromatografía en capa fina (TLC)**

Montenegro de Matta y col. (1976), obtuvieron 5 alcaloides (pteropodina, especiofilina, isopteropodina, uncarina F e isomitrafalina) por extracción metanólica de plantas *in situ*. De igual forma Chávez-Reyes y Plaza (2001) utilizaron un extracto metanólico para la identificación de alcaloides oxindólicos, logrando identificar los siguientes compuestos; mitrafalina, isomitrafalina, pteropodina, isopteropodina, especiofilina, uncarina F, rincofilina e isorincofilina.

En esta investigación hemos trabajado con un extracto metanólico de plántulas *in vitro* de *U. guianensis* y se determinó por comparación de factores de retención (Rf) obtenidos de investigaciones realizadas con plantas *in situ*, la presencia de 7 bandas correspondientes a los alcaloides oxindólicos: isopteropodina, pteropodina, isomitrafalina, uncarina F, mitrafalina, especiofilina, rincofilina.

Wagner y Bladt (1996) utilizaron un extracto de amonio de la corteza de *Uncaria tomentosa* en un sistema de acetato de etilo: isopropanol: NH<sub>3</sub> conc. (100:2:1) y UV 254nm y DRG/10% NaNO<sub>2</sub> para la detección. Reportaron que el extracto es caracterizado por dos zonas marcadas de Rf entre el rango 0,7 - 0,8 y 0,25 - 0,3. Los oxindoles pentacíclicos, como isomitrafalina, isopteropodina y uncarina A + F, así como los oxindoles tetracíclicos como isorincofilina se encontraron en el rango de Rf 0,7 - 0,8. El oxindol pentacíclico mitrafalina y el oxindol tetracíclico rincofilina se observan en el rango de Rf: 0,25 - 0,3.

En la presente investigación utilizando un extracto metanólico de plántulas *in vitro* de *U. guianensis* y un eluyente cloroformo: etanol (9,5:0,5), se corrobora los resultados expuestos por Wagner y Bladt (1996), aunque los rangos no fueron iguales a los citados, se observó los alcaloides oxindólicos caracterizados en dos zonas distintas; los alcaloides rincofilina y mitrafalina se observaron en el rango de Rf: 0,25 - 0,37, mientras que isomitrafalina, pteropodina e isopteropodina en un rango de Rf: 0,49 - 0,74. De igual forma, en los cromatogramas desarrollados con un sistema acetato de etilo: metanol: agua (100: 13,5: 10) se observó dos zonas marcadas con un rango de Rf: 0,22 - 0,37 para rincofilina - mitrafalina y Rf: 0,49 - 0,60 para isomitrafalina, pteropodina e isopteropodina.

Valente et al. (2006), reportaron que los cromatogramas realizados con un extracto metanólico revelaron muchas impurezas en la base, dificultando la visualización de los alcaloides de menor Rf (especiofilina y mitrafalina), sin embargo en los resultados obtenidos en esta investigación con los cromatogramas realizados con un extracto metanólico de plántulas *in vitro* y un eluyente de cloroformo: etanol (9,5: 0,5), se visualizó claramente la especiofilina y mitrafalina.

Testearon cuatro sistemas de solventes como fase móvil, que aseguran un mejor potencial de separación de alcaloides pentacíclicos; acetato de etilo/hexano (95:5), cloroformo/acetona (5:4), cloroformo/metanol (95:5), acetato de etilo/ isopropanol/ hidróxido de amonio (16:3:1). La visualización de las manchas fueron efectuadas por exposición a luz UV 254 nm y la revelación con Dragendorff/nitrito de sodio 10 % (Wagner y Bladt, 1996). Como muestras utilizaron hojas y corteza de plantas *in situ* de *U. guianensis*, *U. tomentosa* y cuatro fitoterapeúticos a base de *U. tomentosa* encontrados en el mercado.

De los cuatro sistemas de fase móvil testeados escogieron el de acetato de etilo/hexano (95: 5) por presentar una mejor separación de los alcaloides. Los análisis en CCD fueron desarrolladas en placas pre elaboradas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm. Las muestras fueron aplicadas manualmente utilizando microjeringas de 25 µl.

Los alcaloides oxindólicos que encontraron fueron los siguientes: especiofilina (0,05-0,06), mitrafilina (0,15-0,16), uncarina F (0,34-0,40), isomitrafalina (0,44-0,49), pteropodina (0,47-0,53), isopteropodina (0,53-0,60) y compararon con las muestras de referencia.

En los cromatogramas del presente trabajo se utilizó 10 µl del extracto metanólico de plántulas de *U. guianensis* cultivadas *in vitro* y un sistema de cloroformo: etanol (9,5: 0,5), y se logró visualizar con rayos UV 254 nm y el revelador vainillina: ác. Sulfúrico (0,1:10), un alcaloide más tal como rincofilina además de los visualizados por Valente et al (2006).

Laus y Keplinger (1994), desarrollaron otros dos métodos para la separación y determinación de 8 alcaloides de plantas de *U. tomentosa* recolectadas del campo, estableciendo métodos de extracción en condiciones suaves para evitar la interconversión de los mismos. Con el sistema CHCl<sub>3</sub>:EtOH (95:5) reportaron los siguientes alcaloides: isopteropodina (0,48),

pteropodina (0,47), isomitrafalina (0,47), isorrincofilina (0,42), mitrafalina (0,39), rincofilina (0,25).

En nuestra investigación en los cromatogramas realizados con el extracto metanólico a partir de plántulas *in vitro* y el sistema cloroformo: etanol (9,5: 0,5) se visualizaron los alcaloides oxindólicos con Rf similares a los reportados por Laus y Keplinger (1994): isopteropodina (0,74), pteropodina (0,66), isomitrafalina (0,49), mitrafalina (0,37), rincofilina (0,25) a excepción de isorrincofilina, el cual no se observó. De igual manera en los cromatogramas realizados con acetato de etilo: metanol: agua (100: 13,5: 10) se observaron algunos alcaloides con Rf similares a los reportados anteriormente: especiofilina (0,06), mitrafalina (0,38), uncarina F (0,40), isomitrafalina (0,49), pteropodina (0,50) e isopteropodina (0,60).

En el 2001, Lock et al., utilizaron un solvente (diclorometano, cloroformo, acetato de etilo) y cromatofolios de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) (20 x 10 cm). Para los análisis por CCD, utilizaron el material finamente molido de plantas *in situ* o los productos comerciales (1g), se humedecieron con NH<sub>2</sub>OH al 10% y extrajeron con 5 ml de diclorometano, se secaron con sulfato de sodio anhidro, y se aplicaron 25 µl de muestra. Los análisis por CCD se llevaron a cabo por comparación con los estándares mitrafalina, isopteropodina y pteropodina, utilizando como sistema de elución CHCl<sub>3</sub>: EtOAc en las proporciones 8:2, 7:3 y 6:4 desarrollados en forma consecutiva, revelando con luz UV 254 nm y reactivo de Dragendorff.

Como resultado de esta investigación obtuvieron una buena resolución de los alcaloides y encontraron mitrafalina (Rf: 0,35), pteropodina (Rf: 0,65) e isopteropodina (Rf: 0,74) - identificación inequívoca de estos por CCD.

Los resultados obtenidos en los cromatogramas realizados con plántulas *in vitro* y utilizando un sistema cloroformo: etanol (9,5:0,5), corrobora lo expuesto por Lock y col. (2001), visualizándose los alcaloides; mitrafalina (Rf:



0,37), pteropodina (Rf: 0,66) e isopteropodina (Rf: 0,74), con un rango mínimo de diferencia.

Montoro et al. (2004) entre los alcaloides de la corteza de *U. tomentosa*, destacan los alcaloides oxindólicos pentacíclicos pteropodina (o uncarina C), isopteropodina (o Uncarina E), especiofilina, uncarina F, mitrafilina e isomitrafilina, y los alcaloides oxindólicos tetracíclicos rincofilina, isorrincofilina, corinoxeina e isocorinoxeina. Contiene además sus precursores indólicos (akuammigina, tetrahydroalstonina, isoajmalicina, e hirsutina, dihidrocorinanteina, hirsuteina, corinanteina).

Raymond-Hamet (1952), analizó hojas de *U. guianensis* cultivadas en el campo, reportando en ellas la presencia de especiofilina y por su parte Álvarez y col. (1998), visualizaron mitrafilina en las hojas de *U. guianensis in situ*.

En la presente investigación se han desarrollado estudios cromatográficos de las plántulas *in vitro* de *U. guianensis* por separado, observándose en las raíces, los alcaloides del grupo oxindólico: isopteropodina, pteropodina, isomitrafilina, uncarina F, mitrafilina, rincofilina y especiofilina y presentando bandas de mayor grosor correspondientes a uncarina F y especiofilina. En las hojas se encontraron los mismos alcaloides que en la raíz pero con bandas de mayor grosor pertenecientes a mitrafilina e isomitrafilina. Lo que corrobora lo mencionado por Álvarez y col. (1988).

En el tallo se determinó la presencia de los siguientes alcaloides oxindólicos: isopteropodina, pteropodina, uncarina F, mitrafilina, rincofilina y especiofilina, pero las bandas visualizadas correspondientes a los alcaloides fueron de menor grosor en comparación a las bandas de las hojas y tallos.

En los cromatogramas realizados no se observó la presencia de corinoxeina e isocorinoxeina en el tallo, lo que difiere de los resultados obtenidos por Montoro et al. (2004).

## V. CONCLUSIONES

- Se demostró que el tratamiento con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> es óptimo para el cultivo *in vitro* de *U. guianensis* (Bosque Nacional Alexander Von Humboldt – Pucallpa), alcanzando el 100 % de enraizamiento e incrementando el elongamiento y la formación de yemas en un 38 % y 37% respectivamente, lográndose obtener un total de 1589 plántulas.
- La micropropagación *in vitro* de *Uncaria guianensis* permitió un incremento en la obtención de biomasa; aumentando un 73 % el peso húmedo y un 82 % del peso seco relativo en plántulas cultivadas con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub>.
- Los cromatogramas desarrollados con el extracto metanólico de plantas de *Uncaria guianensis* cultivadas *in vitro* en el sistema cloroformo: etanol (9,5: 0,5), muestra bandas con factores de retención (Rf) similares a los encontrados en los alcaloides oxindólicos obtenidos en trabajos realizados con plantas cultivadas en campo, lo que demuestra que las plantas cultivadas *in vitro* sintetizan los principios activos.
- La cromatografía en capa fina desarrollada con las muestras por separado de raíces, tallos y hojas de plantas *in vitro* de *U. guianensis*, presentaron 7 bandas correspondientes a los alcaloides del grupo oxindólico (isopteropodina, pteropodina, isomitrafalina, mitrafalina, rincofilina, especiofilina y uncarina F), a excepción de la muestra del tallo que no presentó la banda correspondiente a isomitrafalina.
- Los cromatogramas desarrollados con el extracto de raíces de *U. guianensis in vitro*, presentaron bandas de mayor grosor correspondientes a los alcaloides oxindólicos especiofilina y uncarina F, mientras que los cromatogramas realizados con un extracto de hojas presentaron bandas de mayor grosor correspondientes a mitrafalina e isomitrafalina.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso del cultivo *in vitro* para la producción de biomasa y obtención de principios activos.
- Trabajar en el aislamiento y screening de cada una de las bandas correspondientes a los alcaloides oxindólicos, encontradas en los cromatogramas realizados con plantas *in vitro* de *Uncaria guianensis*.
- Realizar ensayos biológicos con los alcaloides oxindólicos aislados de plántulas *in vitro* para determinar su acción farmacológica específica.

## VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abbot D. 1982. Introducción a la Cromatografía. 4ª ed. Barcelona: Alhambra. p. 49 – 72.
- Alvarez C; Sánchez O; Stilke R.; Lock O. 1988. Algunos constituyentes de *Uncaria guianensis*. Revista de Química, PUCP, 2, 99.
- Botanical. 2008. Uña de Gato.  
<http://www.botanical-online.com/medicinalsunadegato.htm>
- Browning D. 1971. Cromatografía, Ediciones Toray Masson.
- Chávez-Reyes R.; Plaza A. 2001. Estudio químico comparativo de “Uña de Gato” (*Uncaria tomentosa* Willd. DC y *Uncaria guianensis* (Aubl.) (Gmel.). Primera reunión internacional del género *Uncaria* “Uña de gato”. Pág. 122-132. Iquitos-Perú.
- Debergh P.L.; Maene L.J. 1981. A scheme for comercial propagation of ornamental plants by tissue cultura. Scientia Hort. 14:335-345.
- Decetti S. F. C. 2001. Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 101 p
- Delgado H; Donayre R; Herrera J; Cerrutti T; García J; Dávila W; Mestanza M; Ríos F; Nina E.; Nonato L. 1998. Instituto Peruano de Seguridad Social. Instituto de Medicina Tradicional. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Monografía. Iquitos-Perú.
- FAO. 2008. Uña de Gato.  
<http://www.fao.org/ag/agL/agll/rla128/iiap/iiap2/CapituloIII-47.htm#TopOfPage>
- Figueredo S; Albarello N; Viana V. 2001. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Wallingford, v. 37, n. 4, p. 471-475.

- Fraguas C. B. 2003 Micropropagação e aspecto da anatomía foliar da figueira Roxo de Valinhos em diferentes ambientes. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 110 p.
- Freyre S. 2004. Propagación y Conservación In Vitro de la Uña de Gato (*Uncaria spp*). <http://www.inia.gob.pe/boletin/bcit/boletin0001/ntsroque.htm>
- George E. F. 1996. Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology. 2. ed. Edington: Exergetics. 574 p.
- Gosukonda R; Prakash C; Dessai A. 1995. Shoot regeneration *in vitro* from diverse genotypes of sweetpotato and multiple shoot production per explant. Hort science 30: 1074-1077.
- Haddon L; Northcote D. 1976. The influence of giberellic acid and abscisic acid on cell and tissue differentiation of bean callus. Journal cell Sciences 20: 47-55.
- Hu C.V; Wang J.P. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. En: Handbook of plant Cell. Evans, D.A., Ammirato P.V., Yameda Y. (eds) p 256-290.
- Jain S. 2001. Tissue cultura-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153-166.
- Jiménez E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J.N. (ed) Pp 13-24. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara-Cuba.
- Kartha K. 1981. Meristem cultura and cryopreservation: methods and applications. En: Plant tissue Culture, Methods and Aplications in Agriculture. T.A. Thorpe (ed). New York: Academic Press. P 181-211.
- Kitto S.L. 1997. Commercial micropropagation. HortScience. Vol. 32 (6).
- Keplinger K. 2001. El primer producto de *Uncaria tomentosa* con autorización de comercialización como medicamento de uso humano conforme con las directivas farmacológicas de la Unión Europea. Primera reunión internacional del género *Uncaria* "Uña de gato". Pág. 57-66. Iquitos-Perú.

- Laus G; Keplinger D. 1994. Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 662 p. 243-249.
- Lavault M; Moretti C; Bruneton, J. 1983. Alcaloides de l'*Uncaria guianensis*. *Journal of Medicinal Plant Research. Planta Médica*. Vol. 47. p. 224 – 245.
- Lock O. 1994. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú. p. 1 – 288.
- Lock O.; Doroteo V.H.; Álvarez C. 2001. Análisis comparativo por CCD y HPLC de alcaloides presentes en productos comerciales a base de “uña de gato”. Primera reunión internacional del género de *Uncaria* “uña de gato”. Pp 114-120. Perú.
- Lombardi I; Zevallos P. 1999. *Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la uña de gato*. 48 p. Santafé - Bogota.
- Mac. Bride J; Francis. 1936. Flora del Perú. Field Museum of Natural History Botany. Vol. XIII. P. 11-12.
- Melo-Farias P. C; Peters J. A; Nakasu B. H.1998. Micropropagação de porta-enxerto de Pereira Old Home x Farmingdale . *Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas*, v. 2, n. 2, p. 71-78.
- Mishra M.; Saxena R. P.; Pathak R. K.; Srivastava, A. K.1999 Studies on micropropagation of aonla (*Embllica officinalis* Gaertn). *Progressive Horticulture, Chambattia*, v. 31, n. 3/4, p. 116-122.
- Montenegro De Matta S; Delle Monache F; Ferrari F; Marini Bettolo G. B. 1976. “Alkaloids and Procyanidins of *Uncaria sp.* from Perú”. *Estratto dalla Rivista. Anno XXXI. Edizione científica “Iifarmaco”*. Luglio. N° 7. *Fármaco* 31: 527-535.
- Montoro P; Carbone V; Quiroz J; De Simone F; Pizza C. 2004. Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. *Phytochm.*; 15(1):55-64.

- Murashige T; Skoog F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Murashige T. 1974. Plant propagation trough tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiology* 25: 135-165.
- Murashige T; Huang L.C. 1987. Clonning plants by tissue culture: Early years, current status and future prospects. *Acta Hort*. 212:639-643.
- Narayanaswamy S. 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlin. 179-248 pp.
- Novak K.F. 1988. Informe mensual UPEB, Panamá.
- Obregón L. E. 1997. "Uña de Gato" "Cat`s Claw", Género *Uncaria*. Botanical, Estudios Botánicos, Químicos y Farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. Instituto de Fitoterapia Americano, Lima-Perú.
- Ochatt S. J; Caso O. H. 1983 *In vitro* propagation of peach: II. a medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars. *Fruit Varieties Journal*, [S.I.], v. 40, n. 2, p. 39-48.
- Oliveira A; Rocha R; Oliveira O; Camara. 2001. Multiplicação *in vitro* do Bilimbi utilizando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento. *Caatinga*, [S.I.], v. 14, n. 1/2, p. 37- 41.
- Orellana P. 1995. Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de Musa spp. Tesis de Doctorado. IBP-Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
- Orellana P. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J.N. (ED) Pp 125-133. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara-Cuba.
- Orellana P; Pérez Ponce J. 1989. Abstrats of Internt. Congress iberoamericano sobre Biotecnología. Habana. Cuba.
- Pech y Ake A; Maust B; Orozco-Segovia A; Oropeza C. 2007. The effect of Giberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In vitro cell Development Biology Plant* 43:247-253.



- Pereira R; Pereira J; Vilela S; De Castro E; Guimarães F. 2006. Germination, avaluation of giberelic acid and position of explants *in vitro* of *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (cat s claw ). Ciênc. agrotec., Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642.
- Pérez J.N. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas Vol. 1. Santa Clara-Cuba.
- Phillips G; Hubstenberger J. 1998. Plant regeneration by Organogenesis from Callus and Cell Suspension Cultures. Plant tissue and Organ Culture: fundamental Methods.
- Phillipson J.D; Hemingway S.R.1974. Alkaloids from S. American species of *Uncaria* (Rubiaceae). J. Pharm. Pharmacol. 26, pág.. 113.
- Phillipson J.D; Hemingway S.R. 1975. Phytochem. 13, 973-978.
- Pinedo S. 2001. Propagación *in vitro* de la uña de gato *Uncaria guianensis* (Aubl) Gmel. En: I Reunión Internacional del Género *Uncaria*, Iquitos.
- Randerath K. 1974. Enciclopedia de la química industrial. 8<sup>va</sup> ed. Barcelona: Urmo; p. 26 – 73.
- Raymond-Hamet M. 1952. Sur l'alcaloide principale d'une Rubiaceae des regions tropicales de l'Amérique du Sud, l'*Orouparia guianensis Aublet*. Compt. Rend. Hebd. Seanc. Acad. Sci. 235: 547.
- Silva H; Alvarado R; Hidalgo J; Cerrutti T; García J; Dávila W; Mestanza M., Ríos F., Nina E.; Nonato L. 1998. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Monografía. Instituto Peruano de Seguridad Social. Instituto de Medicina Tradicional. Iquitos- Perú.
- Sisa J. 2004. Uña de gato (*Uncaria tomentosa*). <http://www.ecoaldea.com/plmd/uncaria.html>
- Smith N.K. 1988. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. Fruit. 43:219-223.
- Snow A; Castillo G. 2005. Composition and methods for treating Alzheimer's disease and other amyloidoses. United States Patent 6,939,570

- Soukup J.1973. Las Rubiáceas del Perú, sus géneros y listas de Especies. Biota IX, N° 74. Pág. 315-199..
- Stover R.N. 1987. In: Banana and Plantain Breeding Strategies. ACIAR, Proc N° 21: 136-139.
- Tapia y Figueroa M; Dominguez G. 2001. Inducción de callogénesis y rizogénesis "in vitro" en dos especies del género *Uncaria*. Primera reunión internacional del género de *Uncaria* "uña de gato". Pp 73-79. Perú.
- Thorpe T. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic press. Londres. 82-86 pp.
- Thorpe T; Meier D. 1973. The effect of Giberillic acid and abscisic on shoot formation in tobacco callus. Physiologia Plantarum 29: 121-124.
- Valdizán H; Maldonado A. 1985 "La Medicina Popular Peruana" Tomo I p VII Ed. Facsimilar CISA, Lima, Perú. Revista Peruana de Reumatología : Volumen 1 N° 2, Año 1995 LIMA-PERU [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/reuma/v01\\_n2/u%C3%B1a-de-gato.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/reuma/v01_n2/u%C3%B1a-de-gato.htm)
- Valente L; Alves F; Bezerra G; Almeida M; Rosari S; Mazzei J; Avila I; Siani A. 2006. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em capa delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sulamericanas do gênero *Uncaria*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 16(2): 216-223,
- Verpoorte R. 1986. Methods for the structure elucidation of alkaloids. J. of Nat. Prod. 49, 1-25.
- Wagner H; Bladt S. 1996. Plant Drugs Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Second edition-Springer. Germany.
- Yui E; Correa D. M; Pasqual M; Pinto J. 1990. Micropropagação *in vitro* da macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivar Golden Delicious . Ciência e Prática, Lavras, v. 14, n. 1, p. 56-61.

## VIII. ANEXOS

### 9.1 Tablas

**Tabla N° 1:** Preparación de la solución stock para 1 litro de medio MS.

Composición del medio	Concentración	Alícuota
<i>Macroelementos (g/L)</i>		
KNO <sub>3</sub>	19.000	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.500	Tomar 100 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.400	de solución Stock
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.700	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.700	
<i>Microelementos (g/500 ml)</i>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.620	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,860	Tomar 2,5 ml de
KI	0,083	sol. Stock
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0025	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2.230	
<i>Fe-Quelato (g/100 ml)</i>		
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.780	Tomar 1 ml de
Na <sub>2</sub> -EDTA	3.730	sol. Stock
<i>Vitaminas (g/250 ml)</i>		
Tiamina	0.001	
Myoinositol	1.000	Tomar 25 ml de
Ácido nicotínico	0.050	sol. Stock
Piridoxina	0,050	
Glicina	0.020	

**Tabla N° 2:** Concentraciones de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) utilizadas en el medio de crecimiento.

Medio	1	2	3	4	5	6	7
Conc. GA <sub>3</sub> (mg/l)	0	0,001	0,01	0,1	1	2	3
Repeticiones	15	15	15	15	15	15	15

**Tabla N° 3:** Crecimiento de longitud de las plántulas *in vitro* de *U. guianensis* en el medio de propagación basal (MPB) por semanas.

\*Número total de plántulas evaluadas: 93

Crecimiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Crecimiento (cm)	1,18	1,42	1,63	1,84

**Tabla N° 4:** Enraizamiento de plántulas *in vitro* de *U. guianensis* en el medio de propagación basal (MPB).

Enraizamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Enraizamiento (%)	27	33	60	80

\*Número total de plántulas evaluadas: 93

**Tabla N° 5:** Análisis estadístico (ANOVA) del crecimiento de plántulas *in vitro* de *Uncaria guianensis* según la concentración de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

Concentración de hormona (GA <sub>3</sub> )	Mes de observación	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
0 mg/L	primer mes	1,140	,218	,712	1,568
	segundo mes	1,427	,218	,999	1,854
	tercer mes	2,073	,218	1,646	2,501
0.001 mg/L	primer mes	2,520	,218	2,092	2,948
	segundo mes	3,980	,218	3,552	4,408
	tercer mes	5,147	,218	4,719	5,574
0,01 mg/L	primer mes	3,060	,218	2,632	3,488
	segundo mes	5,120	,218	4,692	5,548
	tercer mes	6,960	,218	6,532	7,388
0,1 mg/L	primer mes	2,940	,218	2,512	3,368
	segundo mes	4,747	,218	4,319	5,174
	tercer mes	6,360	,218	5,932	6,788
1 mg/L	primer mes	2,747	,218	2,319	3,174
	segundo mes	4,607	,218	4,179	5,034
	tercer mes	6,393	,218	5,966	6,821
2 mg/L	primer mes	1,760	,218	1,332	2,188
	segundo mes	2,460	,218	2,032	2,888
	tercer mes	3,267	,218	2,839	3,694
3 mg/L	primer mes	1,627	,218	1,199	2,054
	segundo mes	2,387	,218	1,959	2,814
	tercer mes	3,060	,218	2,632	3,488

\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general ANOVA

**Tabla N° 6:** Porcentaje de plántulas enraizadas de *U. guianensis* en relación a la concentración de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

Tratamiento / %	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 11	S 12
0 mg/l GA <sub>3</sub> (1)	27	33	60	80	80	80	80	87	87	87	87	87
0,001 mg/l GA <sub>3</sub> (2)	27	40	67	80	80	87	87	87	87	93	93	93
0,01 mg/l GA <sub>3</sub> (3)	27	40	67	80	80	87	87	87	87	93	93	100
0,1 mg/l GA <sub>3</sub> (4)	0	47	67	67	67	67	87	93	93	93	93	93
1 mg/l GA <sub>3</sub> (5)	20	33	40	47	47	53	53	53	53	60	60	60
2 mg/l GA <sub>3</sub> (6)	7	7	13	27	27	40	40	53	53	53	53	53
3 mg/l GA <sub>3</sub> (7)	0	0	13	17	40	40	40	47	47	60	60	60

\*se analizaron 15 plantas por tratamiento, S=semana

**Tabla N° 7:** Análisis estadísticos (ANOVA) del tamaño y número de esquejes obtenidos por plántula cultivada *in vitro* de *U. guianensis* en un medio con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub>.

Descriptivos									
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
Tamaño de la plántula en cm	5 meses	20	14,1350	1,49922	,33524	13,4333	14,8367	11,90	15,90
	7 meses	20	15,9500	,49895	,11157	15,7165	16,1835	15,00	16,90
	9 meses	20	17,9800	2,05641	,45983	16,9976	18,9224	14,80	22,70
	Total	60	16,0150	2,15586	,27832	15,4581	16,5719	11,90	22,70
Número de esquejes por plántula	5 meses	20	18,4500	4,04547	,90459	16,5567	20,3433	12,00	25,00
	7 meses	20	23,9000	4,33954	,97035	21,8690	25,9310	19,00	34,00
	9 meses	20	37,1000	8,80729	1,86937	32,9781	41,2219	20,00	52,00
	Total	60	26,4833	9,93281	1,28232	23,9174	29,0493	12,00	52,00

\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general ANOVA

**Tabla N° 8:** Análisis estadísticos (ANOVA) del tamaño y número de esquejes por plántula cultivada *in vitro* en un medio MS sin ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

Descriptivos									
		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Tamaño de la plántula en cm	5 meses	20	9,2500	1,39492	,31191	8,5972	9,9028	6,80	11,80
	7 meses	20	11,0150	1,64197	,36716	10,2465	11,7835	7,40	14,10
	9 meses	20	14,5900	2,28010	,50985	13,5229	15,6571	10,30	19,30
	Total	60	11,6183	2,88134	,36940	10,8792	12,3575	6,80	19,30
Número de esquejes por plántula	5 meses	20	12,1000	3,49285	,78102	10,4653	13,7347	6,00	20,00
	7 meses	20	15,4000	6,69957	1,49807	12,2645	18,5355	7,00	31,00
	9 meses	20	30,7000	10,85842	2,42802	25,6181	35,7819	13,00	58,00
	Total	60	19,4000	11,09819	1,43251	16,5338	22,2664	6,00	58,00

\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general ANOVA

**Tabla N° 9:** Biomasa obtenida de plántulas *in vitro* de *U. guianensis* cultivadas durante 5, 7 y 9 meses en un medio MS sin ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

Edad	Peso húmedo	Peso seco	N° esquejes
<i>5 meses</i>			
Total (20 plántulas)	7,71	1,71	242
Por plántula	0,38	0,08	12,1
<i>7 meses</i>			
Total (20 plántulas)	10,34	2,05	308
Por plántula	0,51	0,10	15,4
<i>9 meses</i>			
Total (20 plántulas)	35,82	4,73	614
Por plántula	1,79	0,23	30,7
<b>Total</b>	<b>53,87</b>	<b>8,49</b>	<b>1164</b>

\*Total de plántulas analizadas: 60

**Tabla N° 10:** Biomasa obtenida de plántulas *in vitro* de *U. guianensis* cultivadas

<b>Edad</b>	<b>Peso húmedo</b>	<b>Peso seco</b>	<b>N° esquejes</b>
<i>5 meses</i>			
Total (20 plántulas)	13,66	2,68	369
Por plántula	0,68	0,13	18,45
<i>7 meses</i>			
Total (20 plántulas)	27,24	5,10	478
Por plántula	1,36	0,25	23,9
<i>9 meses</i>			
Total (20 plántulas)	52,13	7,69	742
Por plántula	2,60	0,38	37,1
<b>Total</b>	<b>93,03</b>	<b>15,47</b>	<b>1589</b>

durante 5, 7 y 9 meses en un medio MS con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub>.

\*Total de plántulas analizadas: 60



**Tabla N° 11:** Bandas visualizadas correspondientes a alcaloides oxindólicos por cromatografía en capa fina (TLC) de plantas *in vitro* de *Uncaria guianensis* vs. cromatogramas desarrollados con plantas *in situ*.

Compuesto	Grupo Funcional	Color Revelador	Color UV	Rf <sub>a*</sub>	Rf <sub>b*</sub>	Rf <sub>c*</sub> (Valente et al., 2006)	Rf <sub>d*</sub> (Laus y Keplinger, 1994)	Rf <sub>e*</sub> (Lock y col., 2001)
Especiofilina	Pentacíclico	azul	azul	0,06	----	0,05-0,06	----	----
Rincofilina	Tetracíclico	violáceo	azul	0,25	0,22	----	0,25	----
Mitrafilina	Pentacíclico	azul	turquesa	0,37	0,38	0,15-0,16	0,39	0,35
Uncarina F	Pentacíclico	violáceo	turquesa	0,40	0,40	0,34-0,40	----	----
Isorincofilina	Tetracíclico	violáceo	azul	----	----	----	0,42	----
Isomitrafalina	Pentacíclico	fluxia	turquesa	0,49	0,49	0,44-0,49	0,47	----
Pteropodina	Pentacíclico	azul	azul	0,66	0,50	0,47-0,53	0,47	0,65
Isopteropodina	Pentacíclico	violáceo	azul	0,74	0,60	0,53-0,60	0,48	0,74
		fluxia						
		azul						
		violáceo						
		azul						
		violáceo						

a\* Extracto: metanólico crudo, Sistema: cloroformo: etanol (9,5:0,5), Fase estacionaria: Sílica gel F<sub>254</sub> MERCK (15 x 15 cm), Distancia de desarrollo: 10 cm, Revelador: vainillina: ácido sulfúrico (0,1: 10), Muestra: plantas *in vitro* de *U. guianensis*.

b\* Extracto: metanólico crudo, Sistema: acetato de etilo: metanol: agua (100:13,5:10), Fase estacionaria: Sílica gel F<sub>254</sub> MERCK (15 x 15 cm), Distancia de desarrollo: 10 cm, Revelador: vainillina: ácido sulfúrico (0,1: 10), Muestra: plantas *in vitro* de *U. guianensis*.

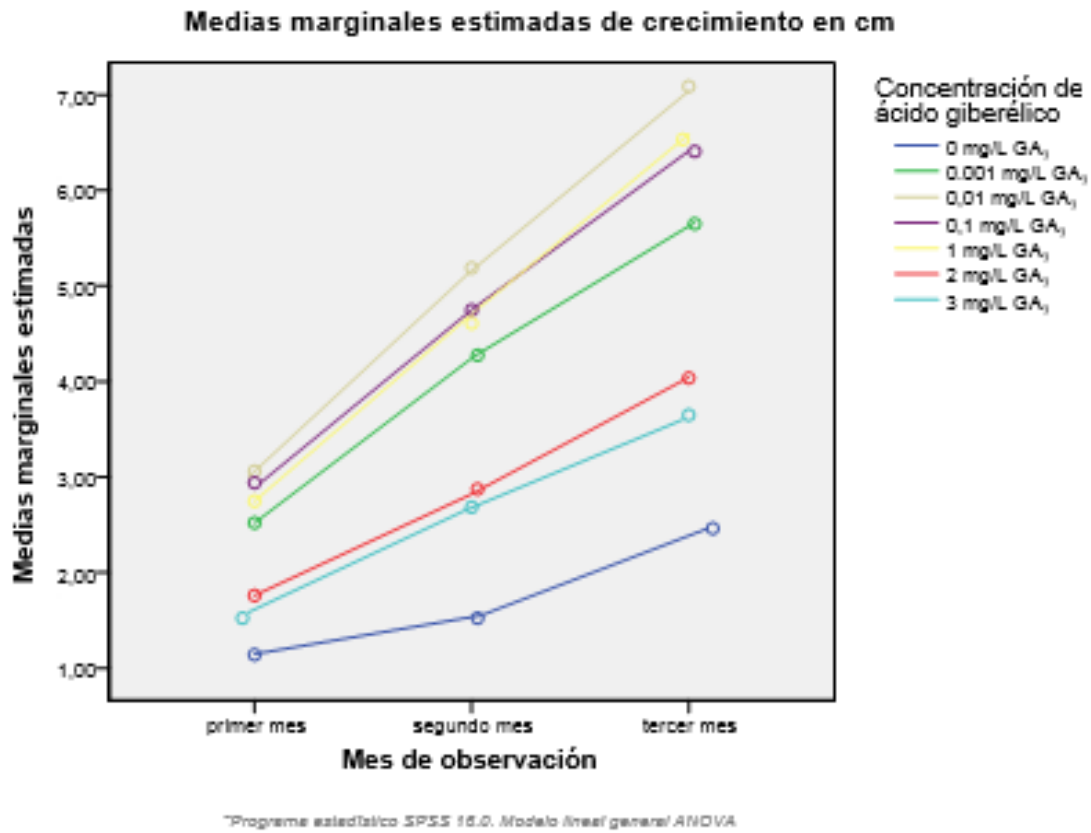
c\* Extracto: metanólico sometido a partición ácido-base, Sistema: acetato de etilo/ hexano (95: 5), Fase estacionaria: sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Revelador: Dragendorff/nitrito de sodio 10 %, Muestras: hojas y corteza de plantas *in situ* de *U. guianensis* y *U. tomentosa*.

d\* Extracto: éter dietílico, Sistema: cloroformo: etanol (95:5), Fase estacionaria: sílica gel, Visualización: UV 283 nm, Muestra: corteza de *U. tomentosa in situ*

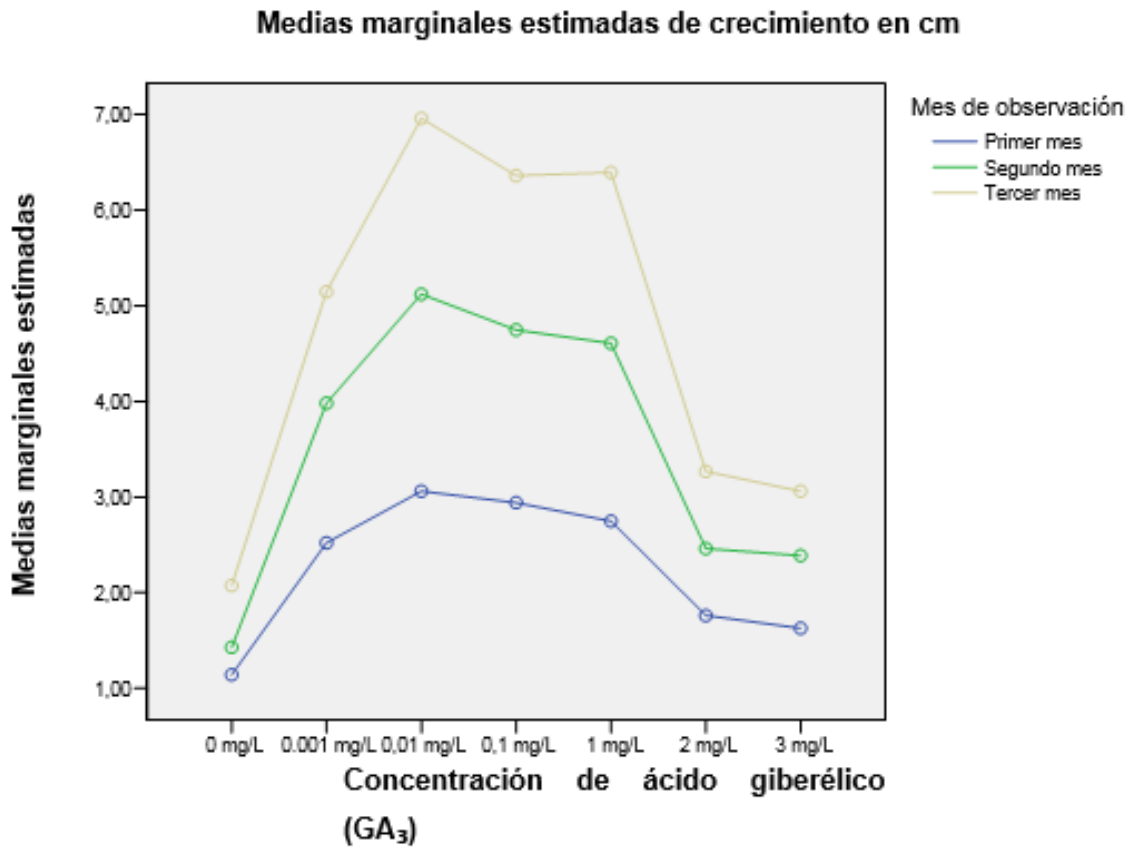
e\* Extracto: NH<sub>4</sub>OH al 10% y diclorometano, Sistema: cloroformo, acetato de etilo (8:2, 7:3 y 6:4), Fase estacionaria: sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) (20 x 10 cm), Revelador: Dragendorff y luz UV a 254 nm, Muestra: fitoterapeúticos de *U. tomentosa*

## 9.2 Gráficos

**Gráfico N° 1:** Crecimiento de las plántulas *in vitro* de *Uncaria guianensis* cultivadas en un medio con diferentes concentraciones de ácido giberélico.

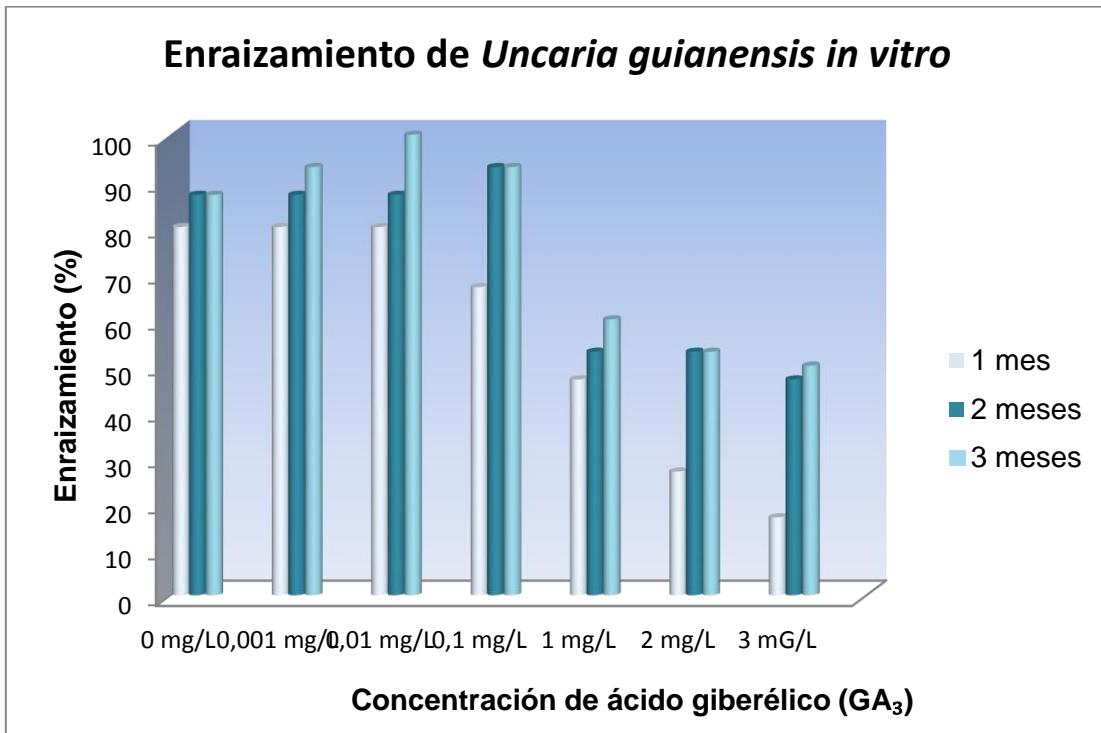


**Gráfico N° 2:** Crecimiento de plántulas in vitro de *U. guianensis* por meses y según la concentración de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

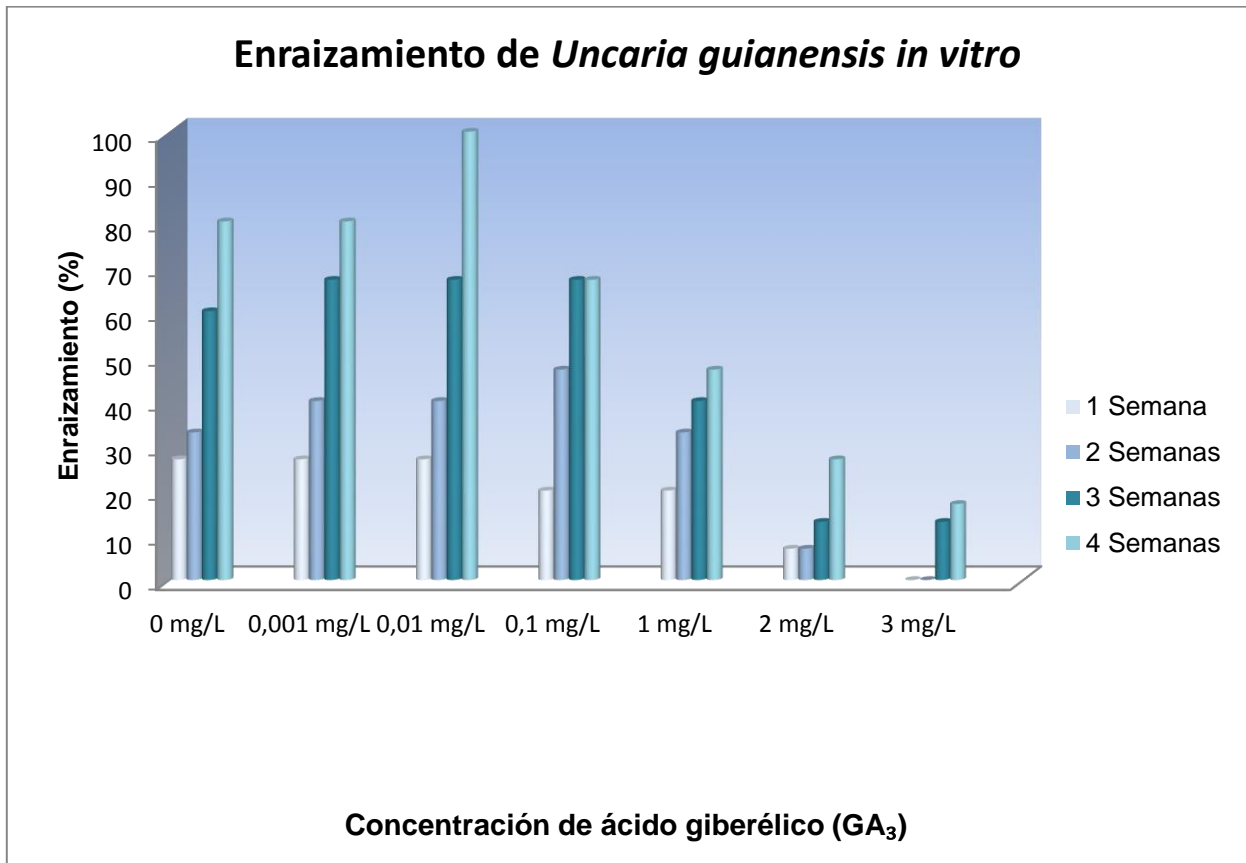


\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general ANOVA

**Gráfico N° 3:** Enraizamiento de las plántulas de *Uncaria guianensis* por meses según la concentración de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

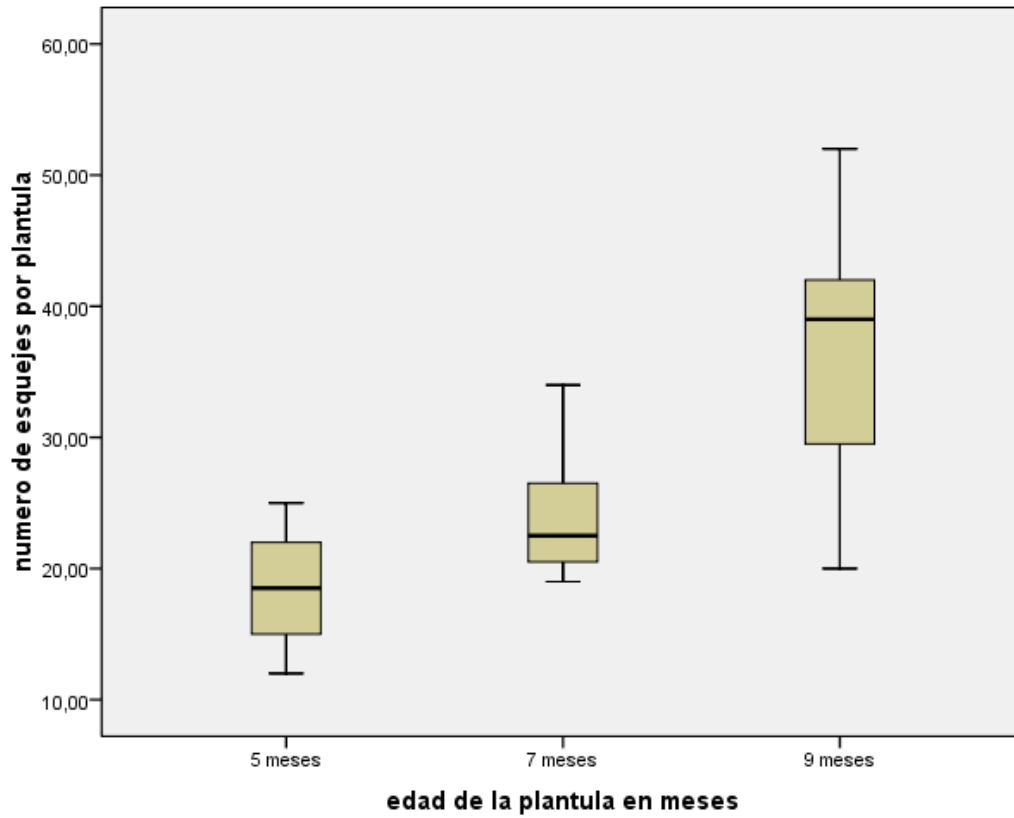


**Gráfico N° 4:** Enraizamiento de las plántulas de *Uncaria guianensis* por semanas según la concentración de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).



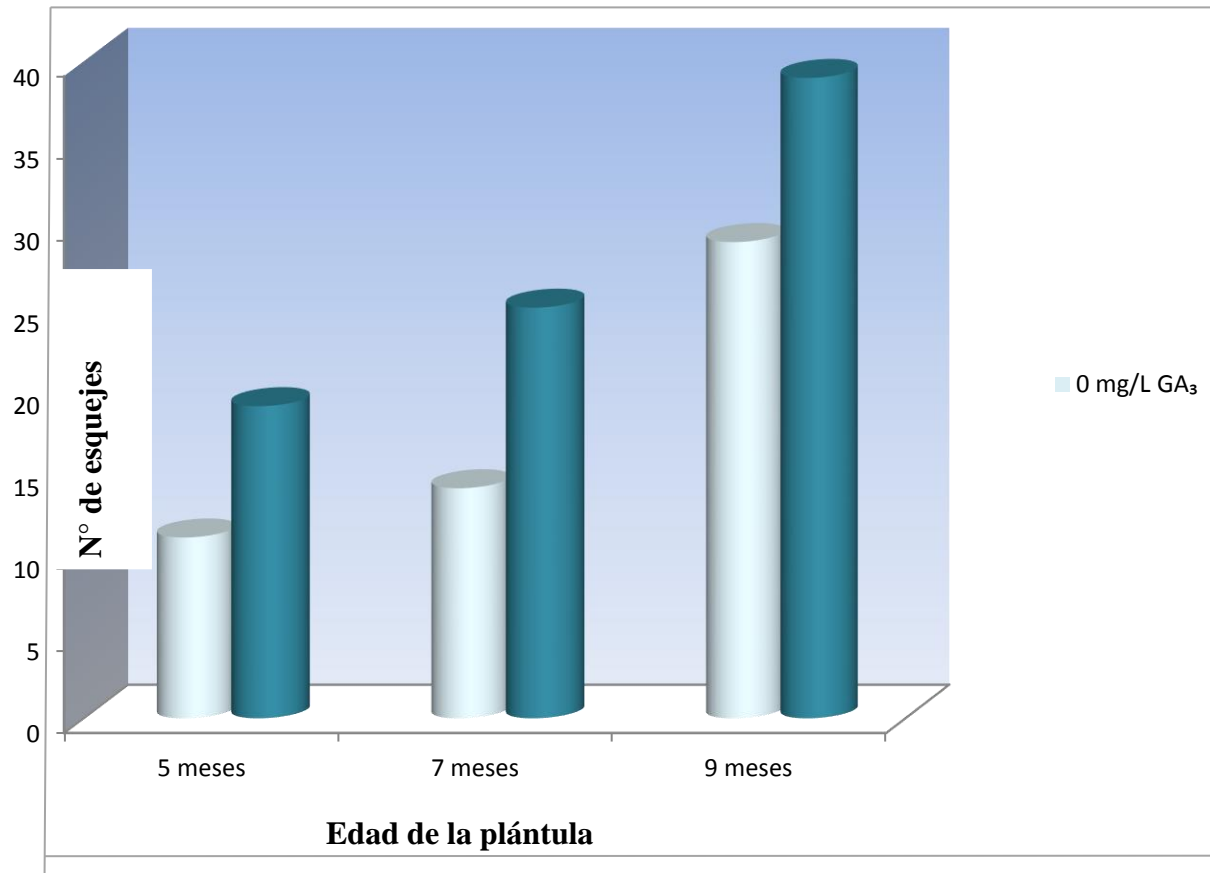
\*Se analizaron 15 plántulas por tratamiento

**Gráfico N° 5:** Número de esquejes obtenidos en plántulas cultivadas en un medio con 0,01 mg/L de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).



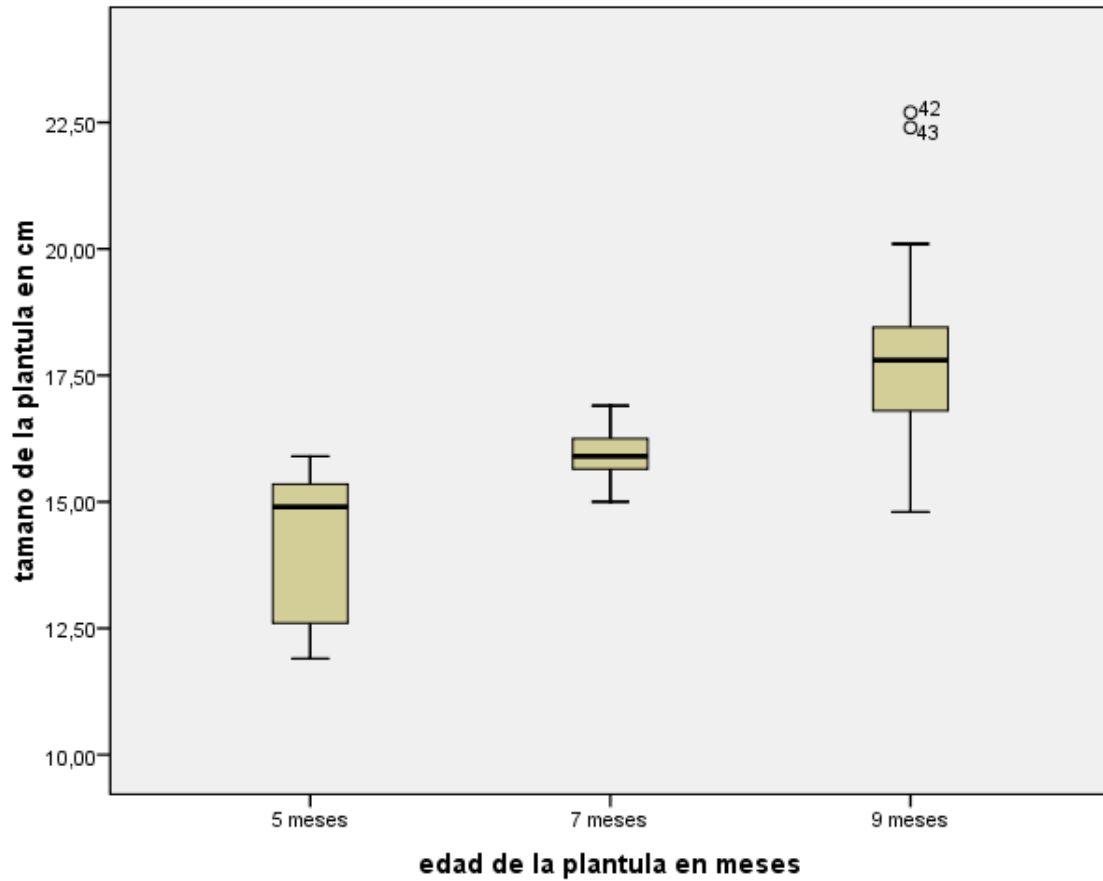
*\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general (ANOVA)*

**Gráfico N° 6:** Número de esquejes obtenidos en plántulas cultivadas en un medio MS en presencia y ausencia de GA<sub>3</sub>.



*\*Se analizaron 60 plántulas por tratamiento*

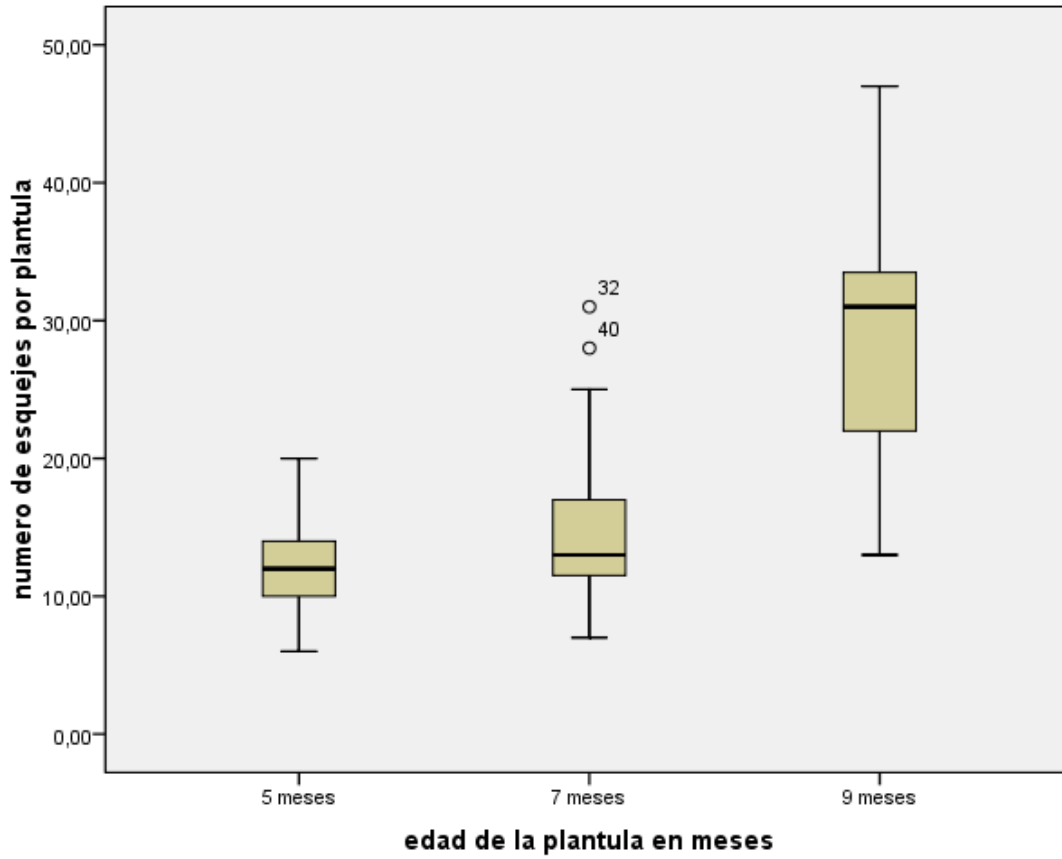
**Gráfico N° 7:** Tamaño de la plántula en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).



*\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general (ANOVA)*

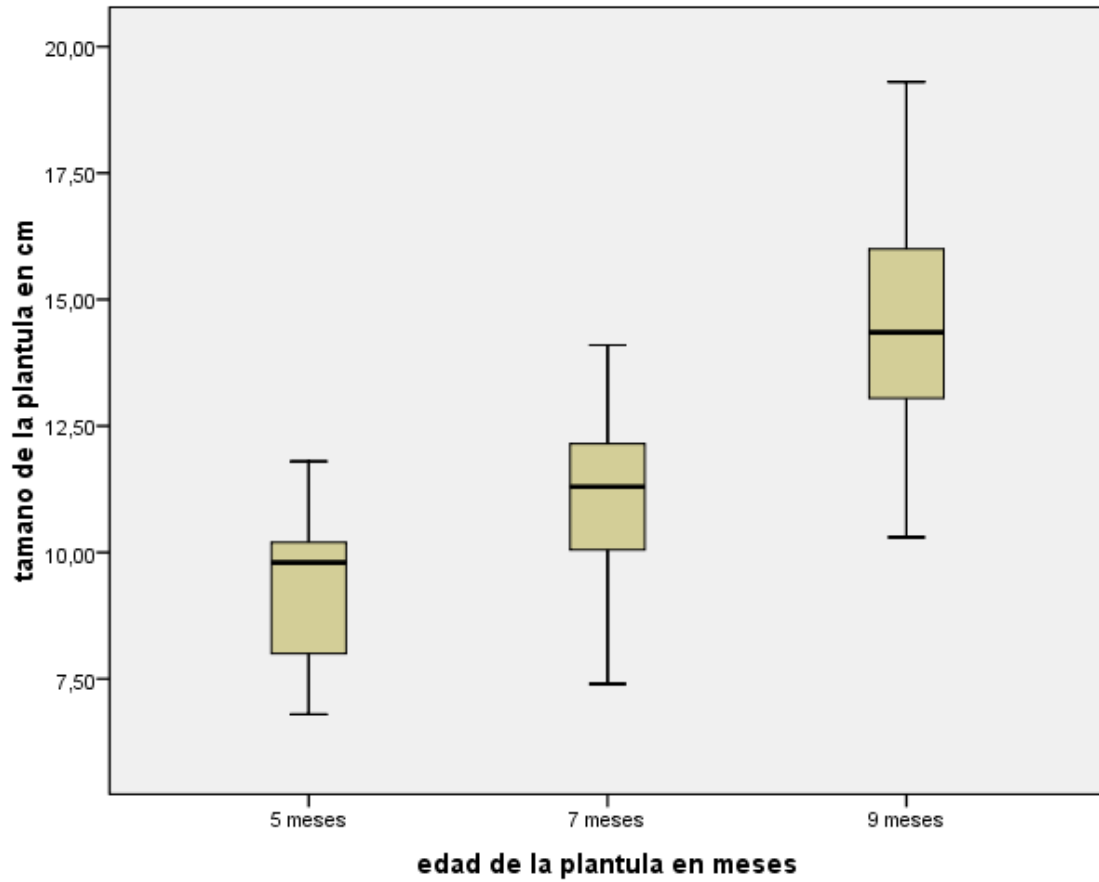


**Gráfico N° 8:** Número de esquejes obtenidos en plántulas cultivadas en un medio sin ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).



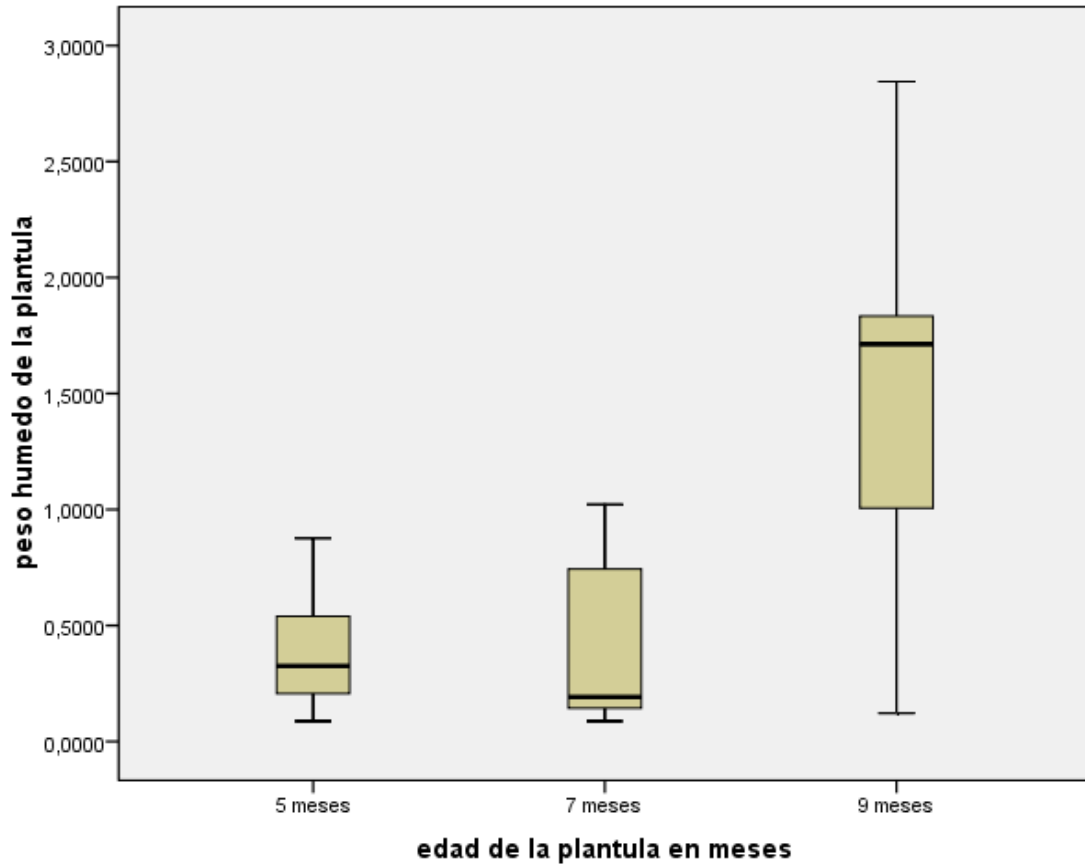
*\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general (ANOVA)*

**Gráfico N° 9:** Tamaño de la plántula en un medio de cultivo sin ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).



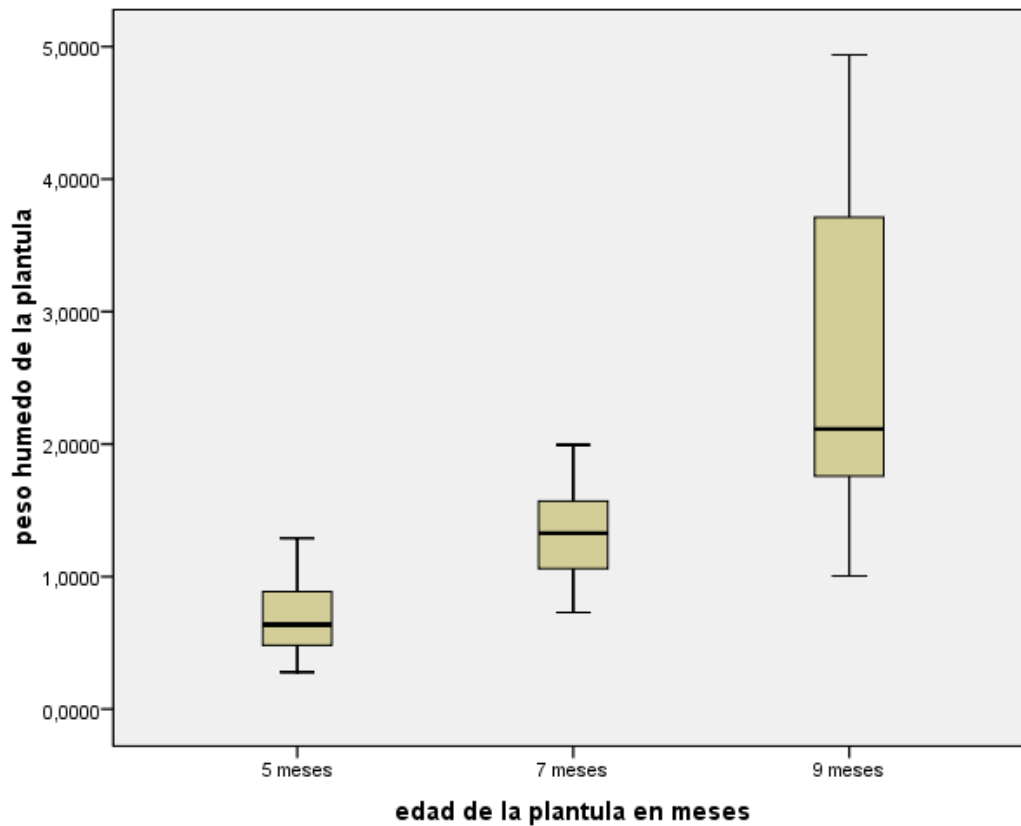
*\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general (ANOVA)*

**Gráfico N° 10:** Peso húmedo de las plántulas cultivadas en un medio de cultivo sin GA<sub>3</sub>.



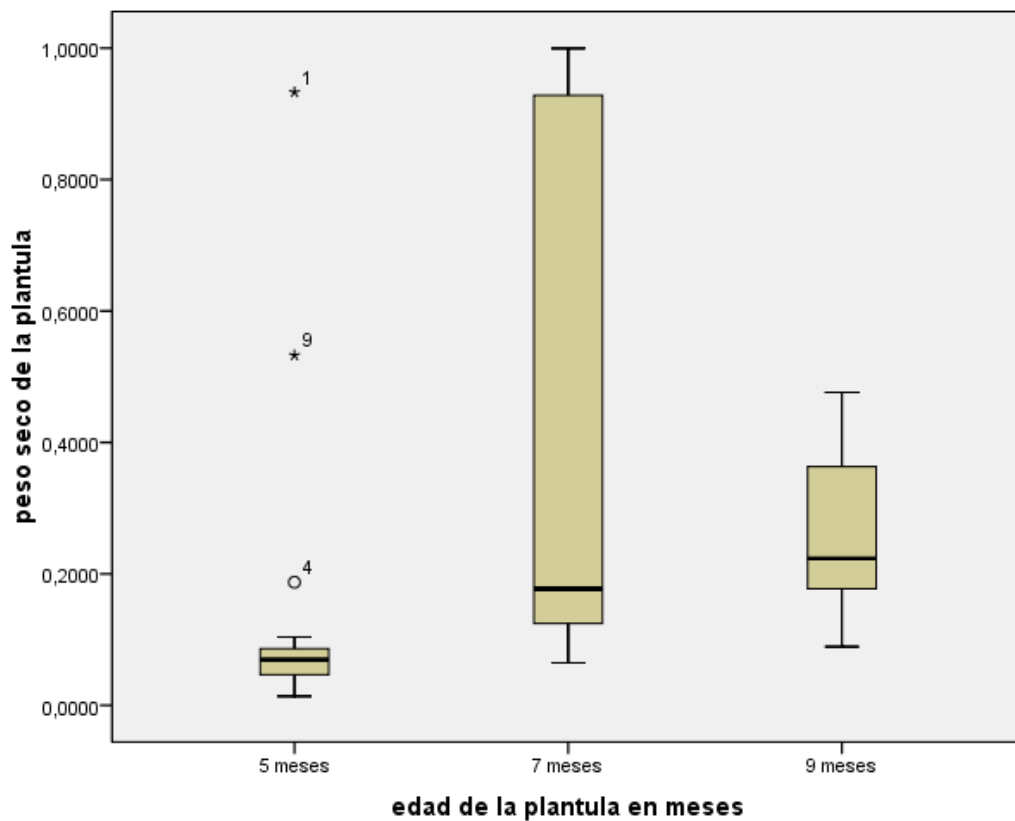
*\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general (ANOVA)*

**Gráfico N° 11:** Peso húmedo obtenido de plántulas de *U. guianensis* cultivadas en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub>.



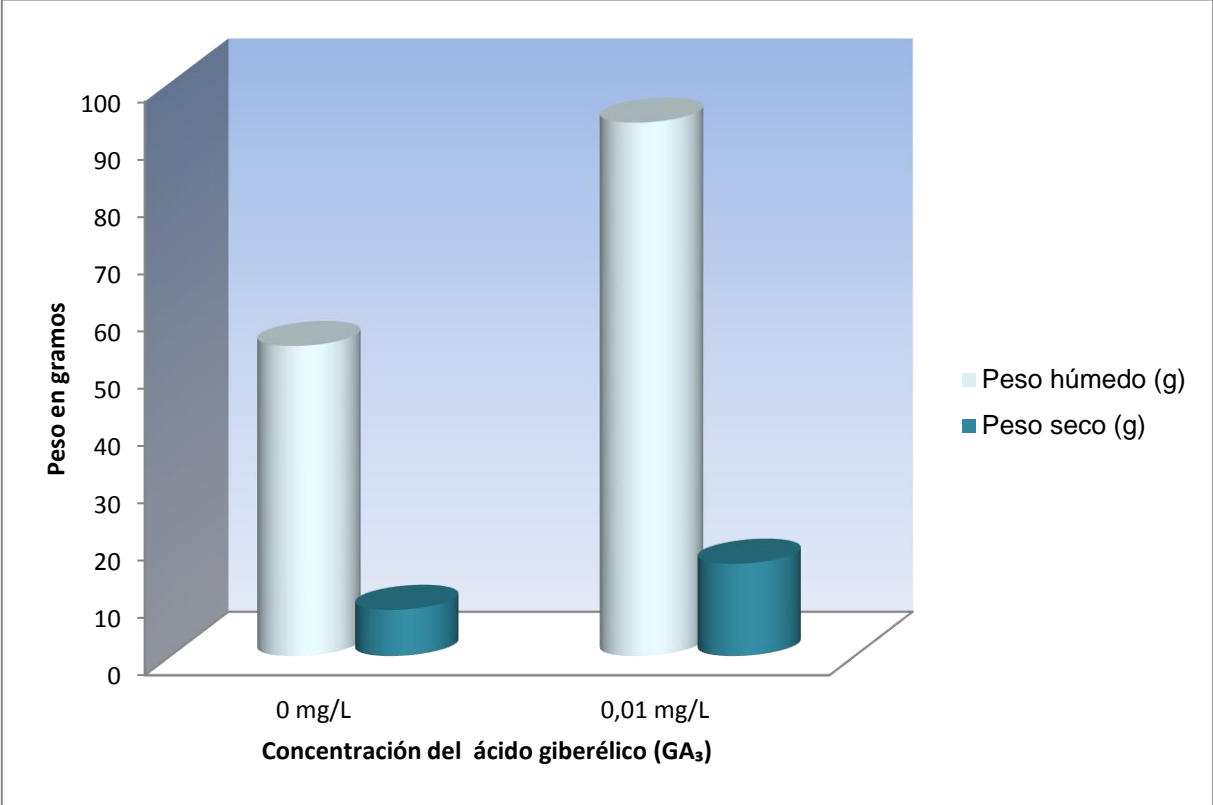
\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general (ANOVA)

**Gráfico N° 12:** Peso seco relativo obtenido de plántulas de *U. guianensis* cultivadas en un medio de cultivo MS con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub>.



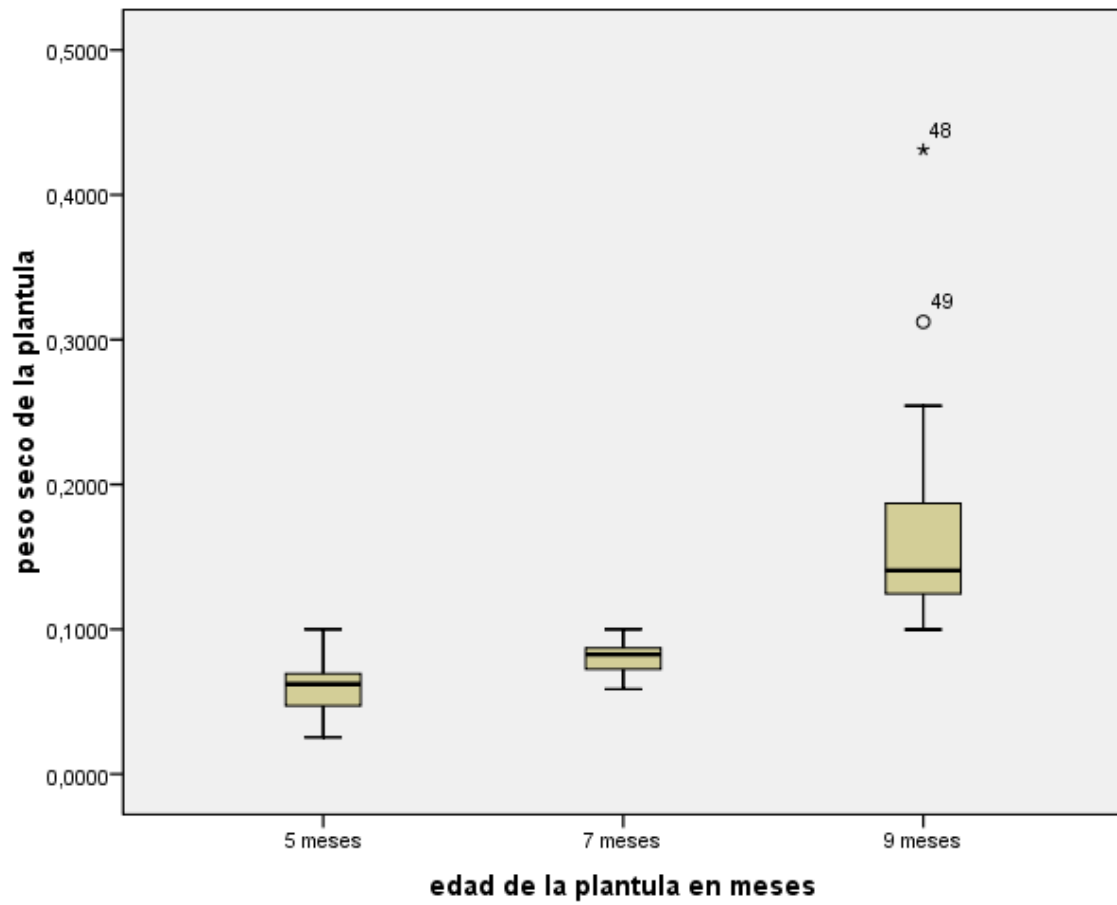
\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general (ANOVA)

**Gráfico N° 13:** Biomasa obtenida de plántulas cultivadas *in vitro* de *U. guianensis* en un medio MS en ausencia y presencia de GA<sub>3</sub>.



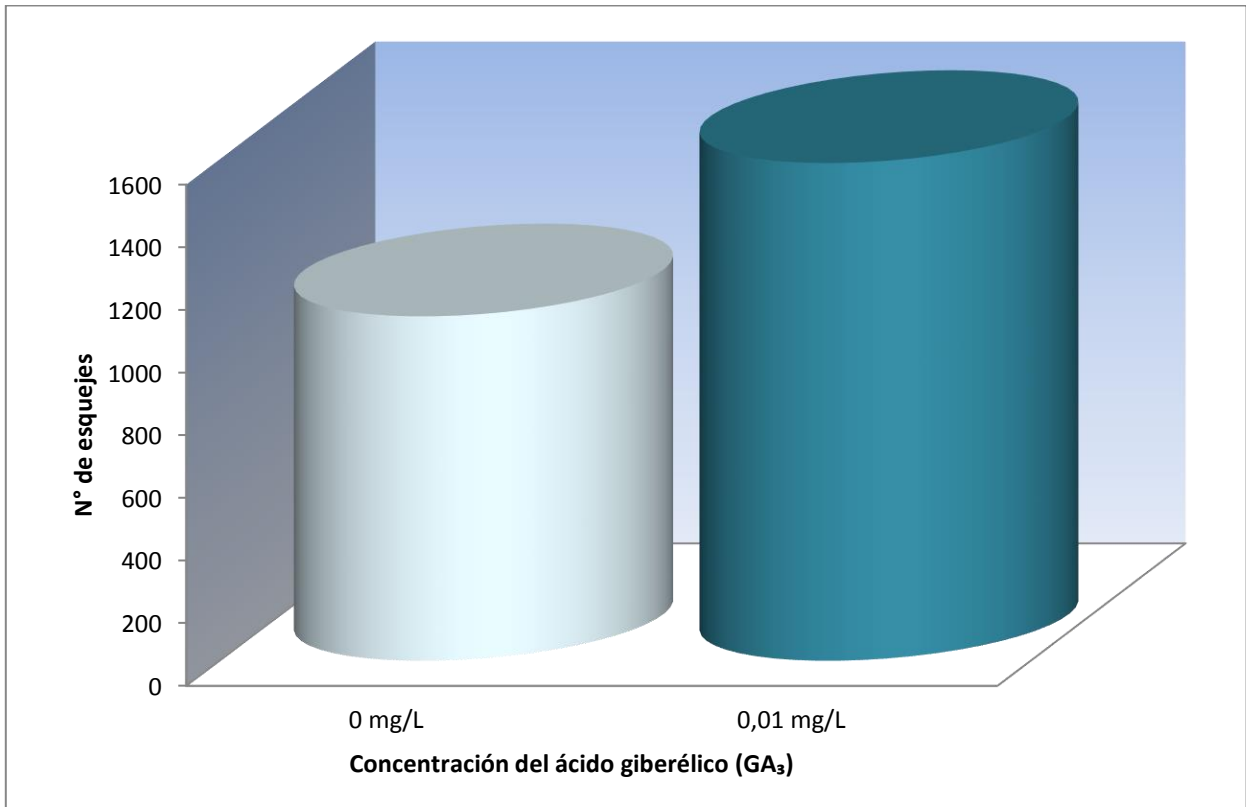
\*Se analizaron 60 plántulas por tratamiento.

**Gráfico N° 14:** Peso seco obtenido de plántulas de *U. guianensis* cultivadas en un medio sin GA<sub>3</sub>.



\*Programa estadístico SPSS 16.0. Modelo lineal general (ANOVA)

**Gráfico N° 15:** Número de esquejes obtenidos en plántulas cultivadas *in vitro* de *U. guianensis* en ausencia y presencia de GA<sub>3</sub>.



\*Se analizaron 60 plántulas por tratamiento.



### 9.3 Figuras

**Figura N° 1:** *Uncaria guianensis* Gmel. *in situ*, obsérvese las espinas retorcidas.



**Figura N° 2:** Corte de segmentos nodales para la micropropagación de *Uncaria guianensis*.



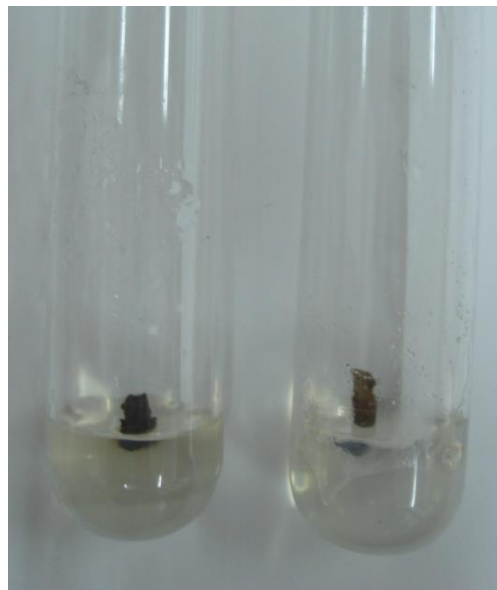
**Figura N° 3:** Esquejes de *U. guianensis* sembrados de forma vertical en el medio de cultivo MS.



**Figura N° 4:** Plántulas de *U. guianensis* en el cuarto de crecimiento.



**Figura 5:** Presencia de fenolización en plántulas de *U. guianensis* cultivadas *in vitro*.



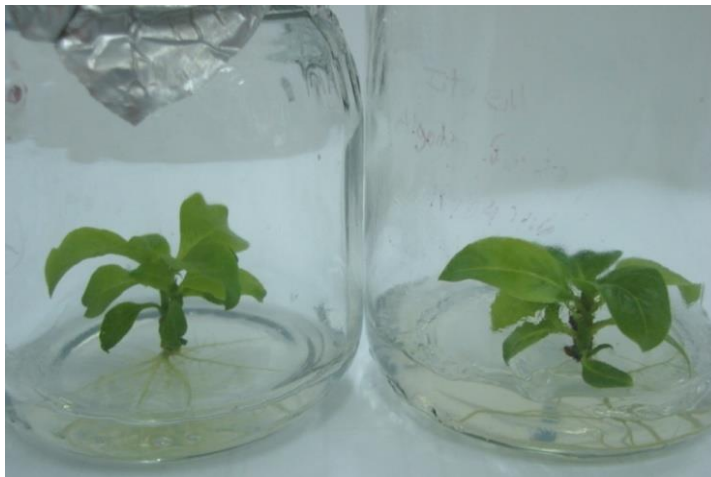
**Figura N° 6:** Plántulas de *U. guianensis* de un mes edad, cultivadas en un medio MS con adición de 0; 0,001, 0,01; 0,1; 1; 2; 3 mg/L de GA<sub>3</sub>.



**Figura N° 7:** Plántulas de *U. guianensis* de dos meses edad, cultivadas en un medio MS con adición de 0; 0,001, 0,01; 0,1; 1; 2; 3 mg/L de GA<sub>3</sub>.



**Figura N° 8:** Plántulas de *U. guianensis* cultivadas en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> de un mes de edad (izq.) y 0 mg/L de GA<sub>3</sub> de tres meses de edad (der.).



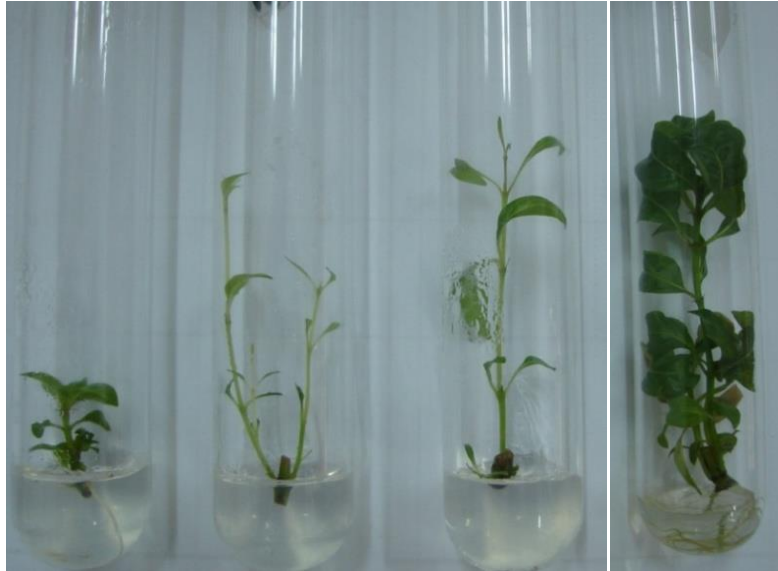
**Figura N° 9:** Plántulas de *U. guianensis* cultivadas en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> de dos meses de edad (izq.) y 0 mg/L de GA<sub>3</sub> de cinco meses de edad (der.).



**Figura 10:** Plántulas de *U. guianensis* cultivadas en un medio de cultivo con 0,01 mg/L de GA<sub>3</sub> de tres meses de edad (izq.) y 0 mg/L de GA<sub>3</sub> de diez meses de edad (der.).



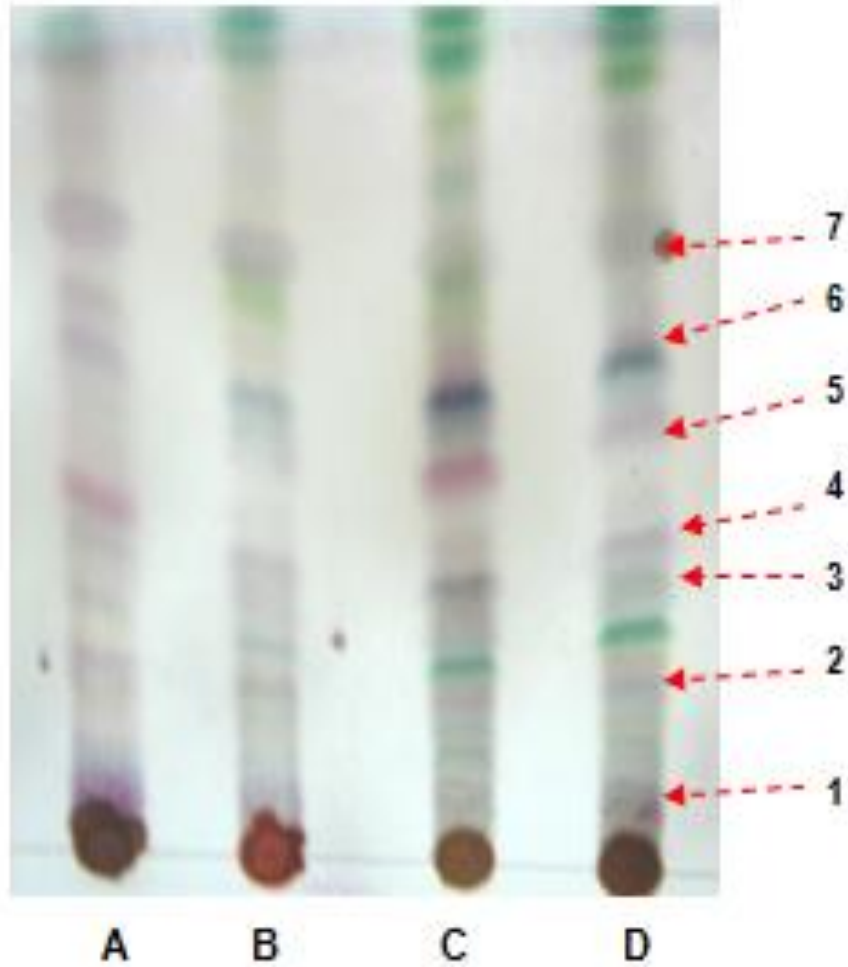
**Figura 11:** Plántulas de *U. guianensis* cultivadas en un medio de cultivo MS con 0, 2, 3 mg/L de GA<sub>3</sub> de tres meses de edad (izq.) y 0 mg/L de GA<sub>3</sub> de nueve meses de edad (der.)



**Figura 12:** Efecto negativo del ácido giberélico en plántulas cultivadas *in vitro* de *U. guianensis* en un medio MS con 2 y 3 mg/L de GA<sub>3</sub>.

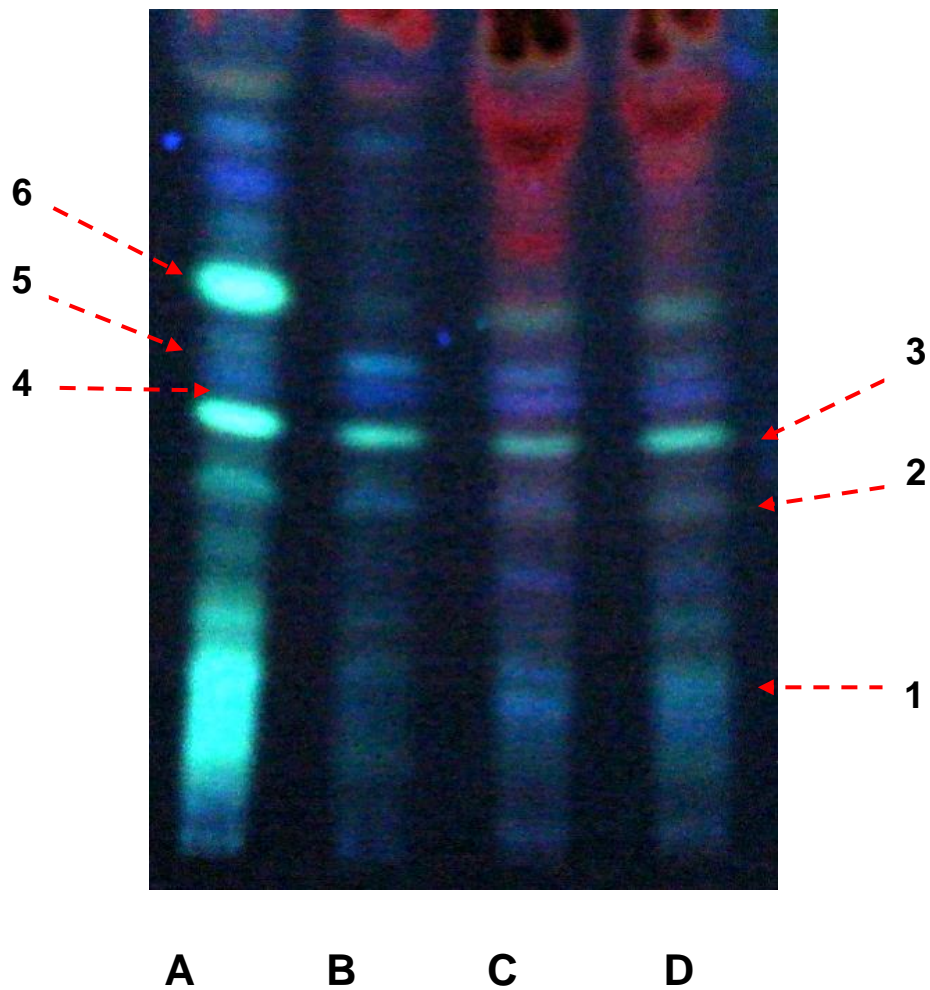


**Figura N° 13:** Cromatografía en capa fina de *U. guianensis* cultivada *in vitro*



1-Especiofilina, 2-Rincofilina F, 3-Mitrafilina 4-Uncarina F, 5-Isomitrafalina, 6-Pteropodina, 7-Isopteropodina. Sistema: cloroformo: etanol (9,5: 0,5), Fase estacionaria: Sílica gel, Distancia de desarrollo: 10 cm, Revelador: vainillina - ácido sulfúrico (0,1:10), Muestra: extracto metanólico de A) raíz B) tallo C) hoja D) planta completa.

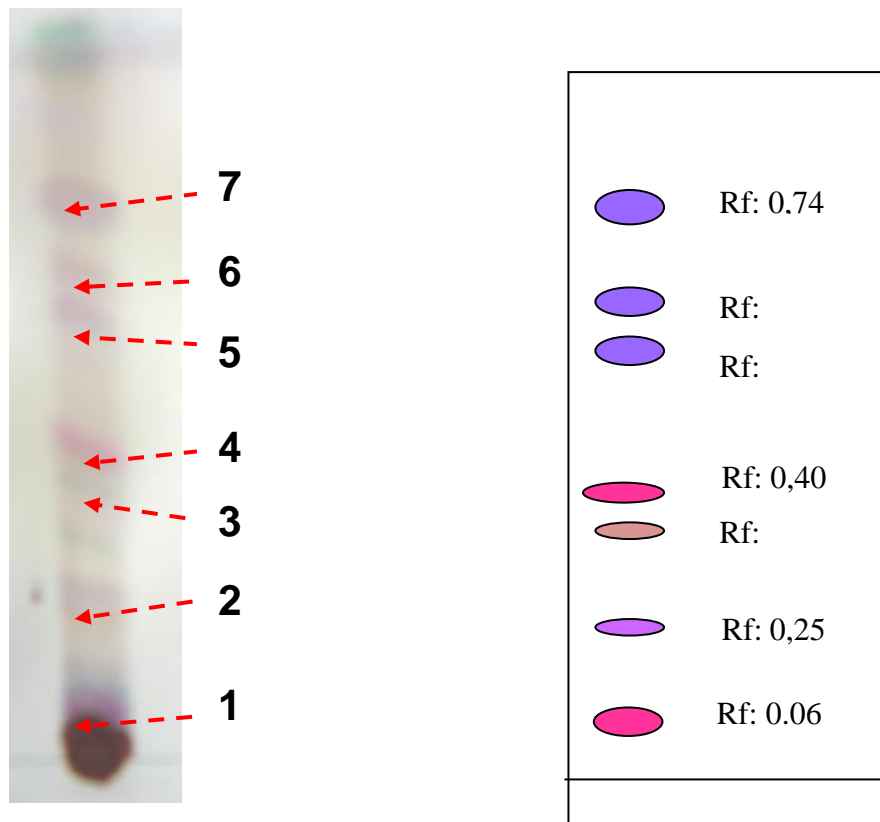
**Figura N° 14:** Cromatografía en capa fina de *U. guianensis* cultivada *in vitro*.



1-Rincofilina F, 2-Mitrafilina 3-Uncarina F, 4- isomitrafilina 5-Pteropodina, 6- Isopteropodina. Sistema: acetato de etilo: metanol: agua (100: 13,5: 10)), Fase estacionaria: Sílica gel F<sub>254</sub>, distancia de desarrollo: 10 cm, Visualización: UV 254 nm, Muestra: extracto metanólico de A) raíz B) tallo, C) hoja, D) planta completa.

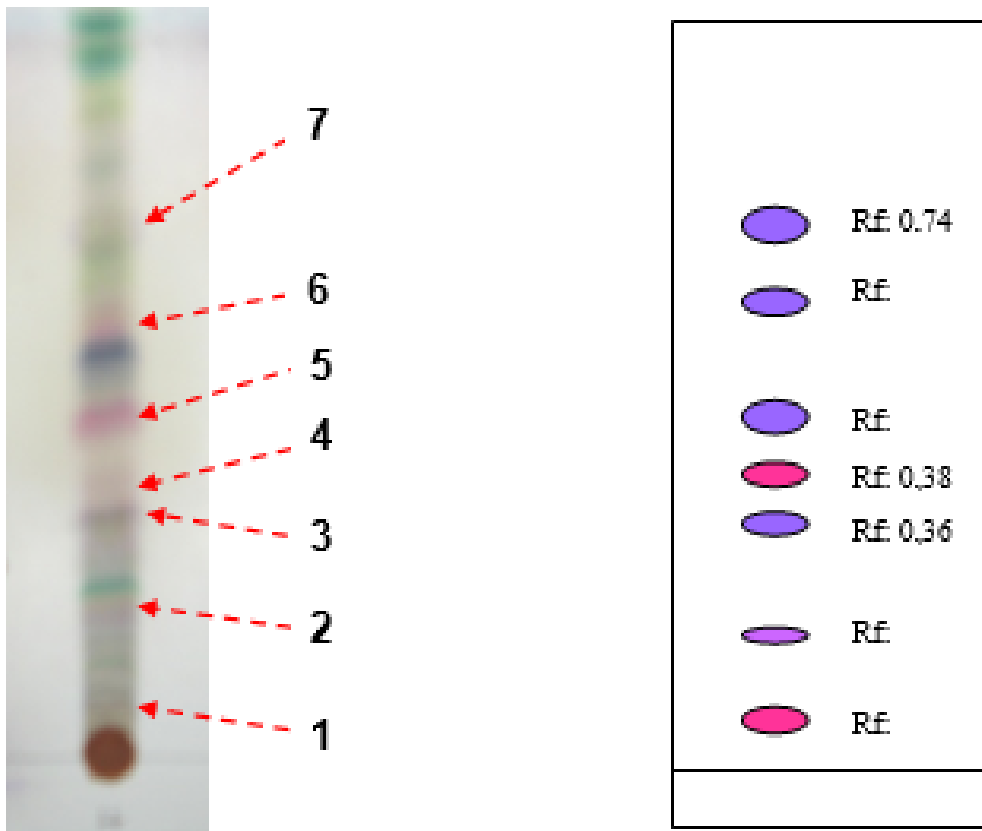


**Figura N° 15:** Cromatografía en capa fina de raíces de *U. guianensis* cultivada *in vitro*.



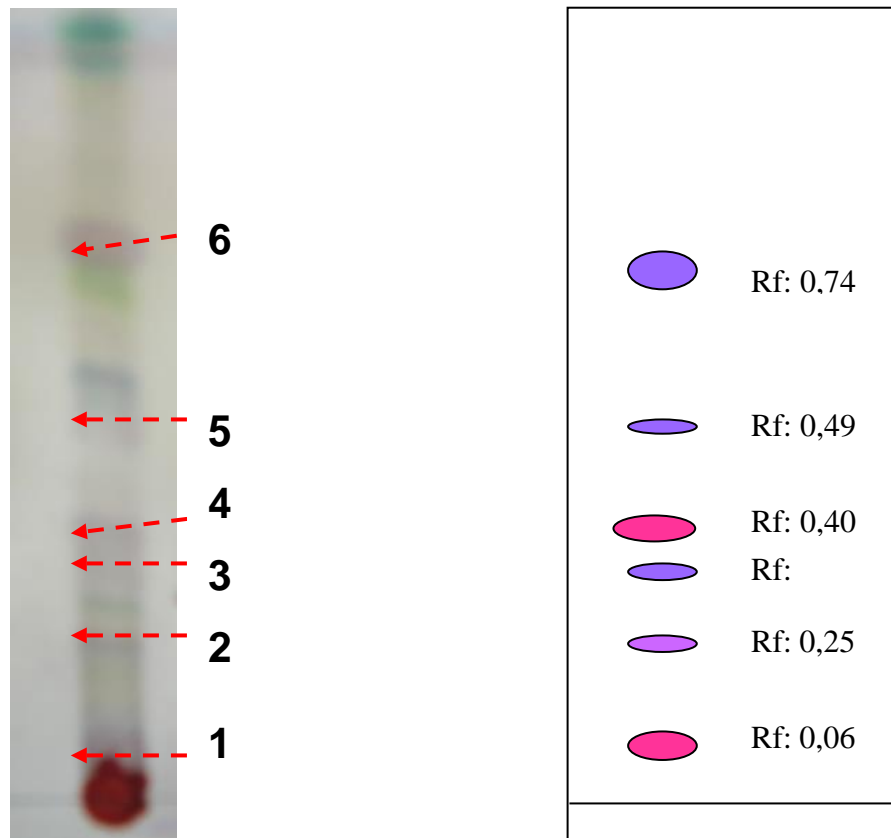
1-Especiofilina, 2-Rincofilina F, 3-Mitrafilina 4-Uncarina F, 5-Isomitrafilina, 6-Pteropodina, 7-Isopteropodina. Sistema: cloroformo: etanol (9,5: 0,5), Fase estacionaria: Sílica gel, Distancia de desarrollo: 10 cm, Revelador: vainillina - ácido sulfúrico (0,1:10), Muestra: extracto metanólico de raíz.

**Figura N° 16:** Cromatografía en capa fina de las hojas de *U. guianensis* cultivada *in vitro*



1-Especiofilina, 2 -Rincofilina F, 3-Mitrafilina 4-Uncarina F, 5-Isomitrafilina, 6-Pteropodina, 7-Isopteropodina. Sistema: cloroformo: etanol (9,5: 0,5), Fase estacionaria: Sílica gel, distancia de desarrollo: 10 cm, Revelador: vainillina - ácido sulfúrico (0,1:10), Muestra: extracto metanólico de hoja.

**Figura N° 17:** Cromatografía en capa fina del tallo de *U. guianensis* cultivada *in vitro*.



1-Especiofilina, 2 -Rincofilina F, 3-Mitrafilina 4-Uncarina F, 5-Isomitrafilina, 6-Pteropodina. Sistema: cloroformo: etanol (9,5: 0,5), Fase estacionaria: Sílica gel, distancia de desarrollo: 10 cm, Revelador: vainillina - ácido sulfúrico (0,1: 10), Muestra: extracto metanólico de tallo.