



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

*Trabajo de Tesis Maestría en Plantas Medicinales*

**“CULTIVO DE CALLOS *IN VITRO* A  
PARTIR DE LAS HOJAS DE *JODINA*  
*RHOMBIFOLIA* HOOK. & ARN. (REISSEK)  
PARA OBTENCIÓN DE  
C-GLICOSILFLAVONAS”**

---

*Tesista: Diana Caraballo de la Peña*

*Director: Ing. Forestal (M. Sc.) Walter Ismael Abedini*

**2015**

## LUGAR DE REALIZACIÓN

**Centro Experimental de Propagación Vegetativa (Ce.Pro.Ve)** en la **Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales** de la **Universidad Nacional de La Plata**, bajo la dirección del **Ing. Forestal (M. Sc.) Walter Ismael Abedini**.



**Cátedra de Farmacognosia-LABRAM** (**Laboratorio de Referencia de Análisis Micrográficos de Origen Vegetal**) en la **Facultad de Ciencias Exactas** de la **Universidad Nacional de La Plata**, bajo la dirección de la **Dra. Mari Rosella**.



Con el apoyo de la **Dra. María Luján Luna**, **Cátedra de Morfología Vegetal** en la **Facultad de Ciencias Naturales y Museo**, y la **Ing. Agr. Marina Sisterna**, **Cátedra de Terapéutica Vegetal** de la **Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales** de la **Universidad Nacional de La Plata**.

**DIRECTOR DE TESIS:** **Ing. Forestal (M. Sc.) Walter Ismael Abedini**.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero iniciar agradeciendo a Dios y a las vueltas de la vida que me permitieron seguir por este camino.

A mis padres, no existen palabras suficientes que puedan expresar mi agradecimiento por toda una vida llena de apoyo, comprensión, paciencia y cariño incondicional, incluso a la distancia. Ha sido un camino muy complicado y sin ustedes no hubiera podido recorérselo.

Al Ing. Forestal (M. Sc.) Walter Ismael Abedini, por abrirme las puertas del Ce.Pro.Ve. y su apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Mari Rosella y M. María Elena del Valle, por abrirme las puertas del LABRAM y compartir sus conocimientos, junto con todo su apoyo y ayuda.

A la Dra. María Luján Luna, por su amistad, apoyo, calidez, conocimientos y experiencias compartidas desde los comienzos de este proyecto.

A la Ing. Agr. Marina Sisterna, por su apoyo brindado para la identificación de los hongos.

A la M. Marta Colares, por todo su cariño, orientación, ayuda, apoyo y enseñanzas a lo largo de este recorrido.

A la Dra. Alicia Consolini, por todo su apoyo y orientación durante estos dos años.

A todos mis profesores, los cuales siempre me apoyaron y me impulsaron a superarme cada día.

A mi hermana Fabiola por todo su apoyo y cariño, a lo largo de mi vida.

A Emmanuel por toda su ayuda, paciencia, motivación, apoyo, cariño y risas compartidas durante esta etapa.

A todo el grupo de trabajo del Ce.Pro.Ve.: Mari, Julieta, Maite, Isabel, Alejandra y Claudia, muchas gracias por su apoyo y compartir sus conocimientos.

A mis compañeros del Magister, gracias por su compañía, apoyo, amistad y todas las experiencias compartidas en estos dos años.

A Caro, Ivonne y Amanda, por todo el apoyo, cariño y experiencias compartidas, esperando que las amistades forjadas perduren aun en tierras distantes.

A mis amigos en México y Bego, los cuales encontraron una forma para estar conmigo y alentarme durante toda esta etapa a pesar de la distancia.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1. Historia del uso de las plantas medicinales	12
2.1.1. Usos de las plantas medicinales en la actualidad	14
2.2. Úlcera péptica	14
2.2.1. Epidemiología de la úlcera péptica	17
2.3. <i>Jodina rhombifolia</i>	18
2.3.1. Descripción de la especie	20
2.3.2. Caracteres Anatómicos y Morfológicos	22
2.3.3. Fenología del cultivo	27
2.3.4. Panorama en el mundo	28
2.3.5. Adaptabilidad ecológica	31
2.3.6. Tecnología del cultivo	32
3. ANTECEDENTES	33
3.1. Historia de la Biotecnología	33
3.2. Biotecnología vegetal	34
3.3. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	35
3.4. Factores que afectan los procesos morfogénicos	37
3.5. Formación de callos	38
3.6. Producción de metabolitos secundarios por cultivo <i>in vitro</i>	40
3.7. Metabolitos Secundarios; Generalidades	43
3.7.1. Heterósidos	44
3.7.2. Flavonoides	46
3.7.3. C-glicosilflavonoides	49
3.7.4. Triterpenos, Esteroides y Saponinas	52
3.7.5. <i>Maytenus ilicifolia</i> , adulterante conocido	55
3.8. Factores ambientales y biológicos que influyen en el contenido de metabolitos secundarios	58
3.9. Experiencias anteriores sobre <i>Jodina rhombifolia</i>	58
3.9.1. Actividades y efectos evaluados	58
3.9.2. Cultivo <i>in vitro</i>	62
4. JUSTIFICACIÓN	63
5. HIPÓTESIS	64
6. OBJETIVOS	65
6.1. Objetivo general	65
6.2. Objetivos específicos	65

7. MATERIALES Y MÉTODOS	66
7.1. Material vegetal	66
7.2. Tipo de explantos y desinfección	67
7.3. Medios de cultivo y condiciones de incubación	71
7.4. Etapas para la formación de callos en cultivo <i>in vitro</i>	74
7.5. Observación Microscópica de callos	74
7.6. Extracción y reacciones de caracterización de flavonoides	74
7.7. Detección de C-glicosilflavonas	76
7.8. Extracción y caracterización de triterpenos/esteroides en <i>Jodina rhombifolia</i> y <i>Maytenus ilicifolia</i>	78
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
8.1. Cultivo <i>in vitro</i>	81
8.1.1. Desinfección e Inducción del material vegetal con un año de crecimiento	81
8.1.2. Desinfección del material vegetal juvenil e intermedio	82
8.1.3. Inducción a callo del material vegetal juvenil desinfectado	84
8.1.4. Observación microscópica de callos	87
8.2. Metabolitos secundarios	87
8.2.1. Reacciones de caracterización de flavonoides	87
8.2.2. Identificación de C-glicosilflavonas en material vegetal maduro	89
8.2.3. Comparación química del material vegetal juvenil con los callos obtenidos por cultivo <i>in vitro</i>	91
8.2.4. Reacciones de caracterización de triterpenos / esteroides en <i>Jodina rhombifolia</i> y <i>Maytenus ilicifolia</i>	94
9. CONCLUSIONES	97
10.PERSPECTIVAS	99
11.ANEXO I	100
12.ANEXO 11	115
13.PÁGINAS WEB CONSULTADAS	116
14.BIBLIOGRAFÍA	116

## ÍNDICE DE TABLAS

1	Parte de la planta, forma en que es empleada y usos populares de "Sombra de toro".	19
2	Plantas cultivadas in-vitro con 2,4-D para cultivo de callos y con estos la obtención de metabolitos secundarios.	41
3	Rutas metabólicas para la obtención de metabolitos secundarios.	43
4	Desinfecciones probadas sobre el material vegetal maduro de <i>Jodina rhombifolia</i> .	68
5	Métodos de desinfección probados con el material vegetal juvenil e intermedio de <i>Jodina rhombifolia</i> .	70
6	Composición de la solución Murashige & Skoog (1962).	71
7	Extractos sembrados del material vegetal adulto para la detección de C- glicosilflavonoides.	77
8	Extractos sembrados para la comparación de C- glicosilflavonoides.	78
9	Resultados para las reacciones de caracterización de flavonoides.	88
10	R <sub>f</sub> de las sustancias de referencia y extractos empleando el sistema de elución acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26).	89
11	R <sub>f</sub> de las sustancias de referencia y extractos empleando el sistema de elución acetato de etilo: metanol: agua (100:13:10).	89
12	Perfiles cromatográficos de los extractos M.J. y callos empleando el sistema de elución acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26).	91
13	Perfiles cromatográficos de los extractos M. J. y callos empleando el sistema de elución acetato de etilo: metanol: agua (100:13:10).	92
14	Resultados obtenidos para las reacciones de caracterización de saponinas sobre los extractos acuosos de <i>Jodina rhombifolia</i> y <i>Maytenus ilicifolia</i> .	95
15	R <sub>f</sub> de los extractos diclorometánicos de <i>Jodina rhombifolia</i> y <i>Maytenus ilicifolia</i> empleando el sistema de elución tolueno: acetato de etilo (8:2).	95
16	R <sub>f</sub> de los extractos diclorometánicos de <i>Jodina rhombifolia</i> y <i>Maytenus ilicifolia</i> empleando el sistema de elución diclorometano: metanol (95:5).	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

1	Clasificación taxonómica de la especie <i>Jodina rhombifolia</i> Hook et Arn.	21
2	Hojas romboidales de <i>Jodina rhombifolia</i> Hook et Arn.	22
3	Estructura del pecíolo y epidermis foliar de <i>J. rhombifolia</i> con MO y MEB.	24
4	Venación y estructura foliar de <i>J. rhombifolia</i> con MO y MEB.	26
5	Flores y frutos de <i>Jodina rhombifolia</i> Hook et Arn.	26
6	Distribución geográfica para la especie <i>Jodina rhombifolia</i> en Argentina	30
7	Callo transparente y acuoso de <i>Musa sp.</i> , cv. Prata añ.	39
8	Estructura de la D-glucosa y D-fructosa empleando las proyecciones de Fisher.	45
9	Glucosa en forma de hemiacetal cíclico.	45
10	Mutarrotación de la glucosa en solución.	46
11	Estructura general C6-C3-C6 de los flavonoides.	47
12	Clasificación de flavonoides.	48
13	Estructura de C-glicosilflavonoides reportados por Montanha, J. A. et al.	50
14	Estructura química general para Isoprenos, Sesquiterpenos y Triterpenos.	53
15	Obtención de esteroides (C <sub>27</sub> ), triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos (C <sub>30</sub> ) a partir del escualeno (C <sub>30</sub> ).	53
16	Hojas y frutos de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	55
17	a) Flujo laminar y b) Cámara de incubación.	73
18	Etapas del cultivo <i>in vitro</i> para la obtención de callos.	74
19	Modo de siembra para las reacciones de toque sobre papel.	75
20	Ejemplos de contaminación obtenida en los explantos de hojas de <i>Jodina rhombifolia</i> .	82
21	Estados vegetativos de los explantos de hojas.	83
22	Ejemplos de la contaminación obtenida a partir de los explantos de hojas en estado intermedio.	83
23	Ejemplos de la contaminación obtenida a para la secciones nodales.	83
24	Etapas de formación de callos a partir de hojas.	84
25	Medios de inducción de callos para hojas.	85
26	Zonas de formación de callos para las secciones nodales sin hojas.	85
27	Zonas y formas de formación de callos para secciones nodales con hojas.	86
28	Explantos a los 7 días en medio MS al 50% libre de hormonas.	86
29	Observación microscópica de callos obtenidos.	87
30	Resultados observados en UV a 366nm para la reacción de toque sobre papel para el extracto acuoso.	88
31	Resultados observados en UV a 366nm para la reacción de toque sobre papel para el extracto diclorometánico.	88

32	Cromatofolios empleados para la identificación de glicosilflavonoides.	90
33	Comparación de perfiles cromatográficos e identificación de C-glicosilflavonoides.	92
34	Resultados obtenidos para la reacción de Liebermann Bouchard con los extractos diclorometánicos.	94
35	Cromatofolios de los extractos diclorometánicos para <i>Jodina rhombifolia</i> y <i>Maytenus ilicifolia</i> con diferentes sistemas de elución.	96



## ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AGE	Productos finales de glicación avanzada
AIA	Ácido indol-3-acético
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ANA	Ácido $\alpha$ -naftalenoacético
BAP	6- bencilaminopurina
C <sub>5</sub>	Isopreno
C <sub>30</sub>	Triterpeno
CC <sub>50</sub>	Concentración citotóxica media
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CCF	Cromatografía en Capa Fina
COX	Ciclooxigenasa
Glu	Glucosa
AIB	Ácido indol-3-butírico
J. B.	Jabón blanco
M. J.	Material juvenil
MEB	Microscópico electrónico de barrido
MO	Microscópico óptico
MS	Murashige & Skoog (1962)
OGM	Organismos genéticamente modificados
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFNM	Producto Forestal No Maderero
PGR	Reguladores de Crecimiento
Ppm	Parte por millón
TLC	Thin Layer Chromatography
UD	Úlcera duodenal
UG	Úlcera gástrica
UICN	Unión Mundial para la Naturaleza
UP	Úlcera péptica
UPC	Úlcera péptica complicada
VSO <sub>4</sub>	Sulfato de vanadio

## 1. RESUMEN

La especie *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. (Reissek), popularmente conocida como “Sombra de Toro”, es un árbol de hasta 8 -10 m de altura con propiedades medicinales, el cual crece exclusivamente en América del Sur. Las hojas de la especie son comúnmente empleadas para el tratamiento de úlceras, asma, problemas gastrointestinales, antialcohólico, entre otros. Sin embargo, esta especie actualmente se encuentra en peligro de extinción en Brasil.

Con el objetivo de obtener los principios activos responsables de la actividad anti-ulcerosa con un menor impacto sobre esta especie es que se emplea la biotécnica de cultivo *in vitro* para la obtención de callos formados a partir de las hojas de *Jodina rhombifolia*. Los experimentos se realizaron con hojas y tallos de la especie en los siguientes estados vegetativos: juvenil, intermedio y maduro. La mayoría de los ensayos realizados con el material vegetal maduro fueron infructuosos debido a la contaminación de los explantos por hongos y bacterias. Mientras que al trabajar con el material vegetal juvenil se logró obtener una buena desinfección para los tres tipos de explantos ensayados (hojas y secciones nodales con y sin hojas), lo cual permitió llegar a la etapa de inducción de callos, empleando el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) suplementado con 2, 4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) como regulador de crecimiento.

La formación de los callos a partir de las hojas juveniles se observó que es un proceso lento, mientras que para las secciones nodales se obtuvo una respuesta considerablemente más rápida, en especial para las secciones nodales con hojas. Asimismo, también se observó que los explantos provenientes de las hojas juveniles tienen una mayor tendencia a oxidarse que las hojas intermedias y maduras, sin embargo la desinfección de estas últimas es compleja debido a la presencia de hongos y bacterias.

Se realizó la identificación de algunas C-glicosilflavonas, compuestos responsables de la actividad anti-ulcerosa de la especie, por medio de cromatografía en capa fina (CCF) para diversos extractos obtenidos a partir de las hojas maduras de la especie, en los cuales se encontró la presencia isovitexina, la cual no había sido descrita para la especie. Adicionalmente, se obtuvieron extractos de los callos obtenidos a partir del cultivo *in vitro*, los cuales fueron comparados por CCF frente a extractos provenientes del material vegetal juvenil de la especie y testigos de C-glicosilflavonas, lo que permitió identificar la presencia de C-glicosilflavonas en los extractos butanólico y acetato de etilo del material vegetal juvenil, y en el extracto de acetato de etilo de callos.

Adicionalmente, la información referente a la constitución química de esta especie es escasa por lo que se realizaron reacciones de caracterización para flavonoides, terpenos y esteroides. En estas se encontró la presencia de esteroides en el extracto diclorometánico, y flavonoides en los extractos hidroalcohólico y diclorometánico. Asimismo, fue posible lograr una clara diferenciación por medio de CCF entre *Jodina rhombifolia* y *Maytenus ilicifolia* (congorosa), conocido adulterante de la especie principalmente cuando esta se presenta triturada o en polvo.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. HISTORIA DEL USO DE LAS PLANTAS MEDICINALES

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha empleado desde tiempos inmemoriales. Los primeros homínidos, al igual que los animales se guiaron por su instinto para distinguir entre los alimentos comestibles de los venenosos y con el paso del tiempo el conocimiento de los efectos que cada vegetal producía en el organismo se fue transmitiendo de generación en generación. Las plantas medicinales han sido el principal recurso del que ha dispuesto el hombre para aliviar sus dolencias, lo que lo llevó a profundizar en el conocimiento de las especies vegetales con propiedades medicinales (San José, C. *et al.*2013).

Se han encontrado tablillas provenientes de la antigua Babilonia, las cuales datan alrededor del año 3000 a.C., en estas se cuenta que sus medicinas estaban formadas a partir de plantas, como: abeto, higuera, mirto, tomillo, entre otras, y minerales mezclados con líquidos como el vino, cerveza, miel o aceites vegetales. En el año 2005, en el actual Irak se encontraron cerca de mil tablillas que cubrían el periodo entre 2000 a.C. y 150 a. C., los cuales resultaron ser restos de un manual de diagnóstico de uso habitual utilizado durante siglos para enseñar e informar a los médicos, así como tratamientos con materiales animales, minerales y cerca de 250 especies vegetales, como por ejemplo: aloe, amapola, belladona, cardamomo y menta.

Alrededor de ese periodo, otras culturas dominantes en China, India y Egipto también dejaron textos escritos sobre hierbas que empleaban como medicinales. La medicina china tradicional comenzó con el texto herbal más importante, el "*Huang Ti Nei Ching*" (*La obra clásica del Emperador Amarillo sobre medicina interna*), supuestamente escrito por el soberano chino Huan Ti alrededor del año 2697 a.C. (Ratera, E. L. & Ratera, M. O., 1980; Farmer-Knowles, H., 2010).

La antigua medicina Egipcia hace referencia a las prácticas curativas habituales en aquella civilización desde alrededor del año 3300 a.C. hasta la invasión persa del 525 a.C. Su texto más famoso es el papiro "*Ebers*", el cual data alrededor del año 1550 a.C. y gracias a este, junto con otros posteriores, se sabe que los egipcios empleaban una vasta variedad de especies vegetales, como por ejemplo: acacia, heno griego, azafrán, amapola, comino, coriandro, entre otras, combinándolas en cataplasmas, aceites e infusiones (Ratera, E. L. & Ratera, M. O., 1980; Farmer-Knowles, H., 2010; San José, C. *et al.*2013).

La medicina tradicional india, el Ayurveda, mencionada por primera vez en las escrituras religiosas alrededor del año 1200 a.C. considera que tanto las hierbas como la dieta tienen una importancia fundamental (Farmer-Knowles, H., 2010).

Los griegos y romanos recogen la tradición de los pueblos de Mesopotamia y Egipto y hacen uso de las plantas para curar las enfermedades y mantener un buen estado de salud. Así, por ejemplo el médico griego Hipócrates, considerado el padre de la medicina, otorga extrema importancia a la medicina preventiva, cumpliendo las plantas un papel muy importante.

El primer escrito de naturaleza científica en la época clásica es "*Materia Médica*", escrita por Dioscórides (40-90 d.C.) en cinco volúmenes. Este médico griego trabajaba con los romanos como botánico y durante sus viajes estudió las propiedades de más de 1000 plantas y de muchos principios químicos, sirviendo su obra de referencia hasta el siglo XV (Ratera, E. L. & Ratera, M. O., 1980).

La medicina herbal siguió siendo importante durante toda la Edad Media, en la que los monasterios y mujeres sabias de las aldeas mantuvieron y desarrollaron la herbología como un arte de curación, empleando: anís, digital, ruda, enebro, jengibre, entre otras. Durante los siglos XVI y XVII fue la época de los tratados de herboristería, los cuales eran libros ilustrados que describían las características de las plantas medicinales, entre los cuales se encuentran "*The Herball or General History of Plants*" de John Gerard (1597) y "*The English Physician Enlarged*" de Nicholas Culpeper (1653) (Ratera, E. L. & Ratera, M. O., 1980; Farmer-Knowles, H., 2010).

En las civilizaciones mesoamericanas, desde el año 2000 a.C. hasta la conquista de México en el año 1519, los médicos del imperio azteca utilizaban muchas hierbas, entre las que se incluían las hojas de cacao, agave, ciprés de Moctezuma, jalapa, papaya, entre otras, y otros recursos naturales, para prevenir, tratar y curar dolencias y enfermedades. El tratado azteca ilustrado conocido como "*Códice Badiano*" fue traducido al latín en el siglo XVI. Muchos años más tarde, a mediados del siglo XVII, los inmigrantes europeos que se asentaron en Norteamérica, descubrieron los remedios medicinales herbales de los nativos y los incorporaron a sus propios métodos curativos antes de regresar a sus países de origen (Farmer-Knowles, H., 2010).

En Argentina, los guaraníes, comechingones, araucanos, entre otros, conocían y empleaban diversas plantas para curar sus dolencias. Entre ellas se encuentran: ambay, canelo, caven, notro, palo pichi, pañil, pehuén, pichi y romaza (Ratera, E. L. & Ratera, M. O., 1980).

Es así, que hasta el S. XIX, las plantas medicinales y sus extractos constituyeron la mayoría de los medicamentos usados en medicina popular. A

---

comienzos del S. XX se produce un cambio en esa postura debido al descubrimiento de antibióticos, anestésicos o sulfamidas que tuvieron un gran impacto en el tratamiento de las enfermedades que afectaban a la población y para las cuales esas plantas y sus extractos exhibían poca eficacia.

### **2.1.1. USOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES EN LA ACTUALIDAD**

A pesar de la gran cantidad de fármacos desarrollados por las industrias farmacéuticas, partiendo en muchos casos de plantas de uso medicinal reconocido por las poblaciones locales, el uso de plantas medicinales sigue siendo de gran importancia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cerca de un 80% de la población mundial utiliza plantas medicinales para el cuidado de la salud (Oliveiras, S. G. D. *et al.* 2012). Esto se puede observar claramente en comunidades rurales, en donde el conocimiento es transferido de generación en generación. Desafortunadamente, muchos de estos conocimientos se han ido perdiendo con el empleo de otras prácticas medicinales.

Argentina, es un país que cuenta tanto con una amplia biodiversidad vegetal como con una gran diversidad cultural. Hasta el 2004, según Goleniowski *et al.* (2006), en Argentina se encontraban reportadas 602 especies de plantas que poseen propiedades terapéuticas, sin embargo su forma de empleo no se encuentra bien descrita para varias de estas.

## **2.2. ÚLCERA PÉPTICA**

El término de úlcera se refiere a la pérdida de sustancia de cualquier parte de la superficie del cuerpo humano. Por lo que, la úlcera péptica es aquella pérdida de sustancia que ocurre en las zonas del aparato digestivo (estómago y duodeno) que están expuestas al ácido y pepsina que se secreta en el estómago. (Ferrer L., I. *et al.*, 2004; Ramakrishnan, K. & Salinas, R., 2007; Diagnóstico y Tratamiento de Úlcera Péptica Aguda Complicada, 2015).

La úlcera péptica (UP) es una enfermedad atribuible a una serie de factores, que de forma aislada o en combinación, actúan produciendo un desequilibrio entre los elementos agresivos y defensivos de la mucosa gastroduodenal que conlleva a la aparición de lesiones en el estómago y/o en el duodeno. Generalmente se la encuentra asociada el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), infección por *Helicobacter pylori*, alteraciones del vaciamiento gástrico y el reflujo biliar duodeno-gástrico (Ferrer L., I. *et al.*, 2004; Regalado V., A. I., *et al.*, 2012).

Los factores que interactúan con la integridad de la mucosa son:

- Factores agresivos: ácido, pepsina, tabaco, alcohol, ácidos biliares, AINEs, isquemia y *Helicobacter pylori*.
- Factores defensivos: bicarbonato, mucus gástrico, flujo sanguíneo, prostaglandinas, regeneración y crecimiento celular.

En general, para el caso de las úlceras gástricas lo que estaría principalmente fallando son los factores defensivos, los cuales involucrarían un retraso en el vaciado gástrico, reflujo biliar, gastritis y disminución de la resistencia de la barrera mucosa (factores anatómicos, calidad del mucus gástrico, estabilidad lisosomal y prostaglandinas); mientras que para el caso de las úlceras duodenales, predominan los fallos en los factores agresivos de la mucosa, lo que involucraría: aumento de la secreción de ácido y pepsina, aumento del número de células G antrales, respuesta exagerada en la liberación de gastrina, liberación selectiva de la gastrina G-17, fallo de los mecanismos de inhibición duodenal de la secreción del ácido, hiperpepsinogenemia, vaciado gástrico rápido, alteración a nivel de los receptores duodenales para el ácido (Ferrer L., I. *et al.*, 2004).

Las dos formas más comunes de UP son:

1. Inducida por *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* es un bacilo espiral flagelado Gram (-) que se adquiere principalmente durante la infancia, es productor de ureasa, que se encuentra en el estómago de cerca del 90 - 95% de los pacientes con úlcera duodenal (UD) y del 60-80% de aquellos con úlceras gástricas (UG).

Este bacilo únicamente coloniza el epitelio gástrico. Su capacidad de adhesión a la superficie del epitelio celular le permite quedar situado por debajo de la capa de mucus gástrico y debido a su actividad ureasa puede crear un microentorno alcalino que le permite sobrevivir en el estómago. Este microorganismo evade el ataque del sistema inmune causando una inflamación crónica e indolente por varios mecanismos: dañando el sistema de defensa de la mucosa y reducir el grosor de la capa de mucus, disminuyendo el flujo de sangre a la mucosa, e interactuando con el epitelio gástrico a través de los estadios de la inflamación. La infección por *Helicobacter pylori* puede también incrementar la secreción de ácido gástrico por la producción de antígenos. Factores de su virulencia, y mediadores solubles, inducen la inflamación aumentando la masa de células parietales y así la capacidad de secretar ácido (Ferrer L., I. *et al.*, 2004; Regalado V., A. I., *et al.*, 2012).

## 2. Causada por antiinflamatorios no esteroidales

Los AINEs son fármacos muy efectivos con efecto antiinflamatorio, antipirético y analgésico, ampliamente utilizados a nivel mundial. Sin embargo, su administración a corto, medio y largo plazo, incluso a bajas dosis, puede ocasionar este tipo de lesiones. Esto es debido a las propiedades fisicoquímicas y el mecanismo de acción de estos fármacos, están directamente implicados en el origen de las lesiones gastrointestinales, al inhibir a la ciclooxigenasa, la cual media la síntesis de prostaglandinas, las cuales tienen un efecto citoprotector de la mucosa gástrica ya que aumentan la secreción de mucus y bicarbonato, el flujo sanguíneo y la restauración epitelial. Por lo que, su inhibición altera los mecanismos de protección y permite que los ácidos biliares, la pepsina y el ácido clorhídrico ataquen a la mucosa. Produciendo de esta manera, un efecto tóxico local dependiente de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, y un efecto tóxico sistémico tras la absorción y activación hepática del fármaco el cual inhibe de la síntesis de prostaglandinas (Ferrer L., I. *et al.* 2004; Regalado V., A. I., *et al.*, 2012).

Las úlceras no asociadas a *Helicobacter pylori* ni al consumo de AINEs, tienen una incidencia menor al 10 % para úlceras gástricas y menor del 5 % de las duodenales, las cuales son causadas por estrés y por el síndrome de hipersecreción gástrica. Este tipo de lesiones son indistinguibles de las anteriores. (Ferrer L., I. *et al.*, 2004; Regalado V., A. I., *et al.*, 2012).

Alrededor de un 35% de los pacientes con úlceras sufre complicaciones, las cuales se presentan según su grado de incidencia: penetración a órganos vecinos, hemorragia, perforación (la cual se produce cuando una úlcera en la pared anterior de estómago o duodeno penetra y accede dentro de la cavidad abdominal) y estenosis del píloro. En general estas complicaciones van a ser más frecuentes en las úlceras gástricas, a excepción de la penetración que va a ser más frecuente en la úlcera duodenal (Ferrer L., I. *et al.*, 2004).



### 2.2.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ÚLCERA PÉPTICA

Las úlceras pépticas (UP) afectan a 4 millones de personas alrededor del mundo anualmente (Thorsen, K. *et al.*, 2013), reportándose en países desarrollados una frecuencia de 36 a 170 casos por 100,000 habitantes (Zepeda, S., 2010). El 70% de los casos se presentan entre los 25 y 64 años (Ramakrishnan, K. & Salinas, R., 2007; Diagnóstico y Tratamiento de Úlcera Péptica Aguda Complicada, 2015).

La prevalencia de UP asociada a la infección de *Helicobacter pylori* es del 10% al 20%. Se calcula que aproximadamente el 50% de la población adulta, 20% de los niños menores de diez años y el 80% de las personas mayores de 70 años, están infectados por *Helicobacter pylori*, siendo la infección por este la más frecuente a nivel mundial. Sin embargo no todos los infectados desarrollarán úlceras o gastritis, la mayoría de las personas pueden estar asintomáticas durante toda su vida. (Ferrer L., I. *et al.*, 2004).

El 25% de usuarios de AINE pueden llegar a presentar alguna alteración. Alrededor de un 50% - 80% de las hemorragias digestivas se deben al uso reciente de antiinflamatorios no esteroideos. (Ferrer L., I. *et al.*, 2004).

La úlcera duodenal, es la más frecuente y se produce entre los 55 y los 65 años, teniendo una mayor incidencia en hombres. Para las úlceras gástricas, no hay una diferencia según el sexo de los pacientes; sin embargo, esta generalmente se produce a los 25 años para hombres y 45 años para las mujeres (Ferrer L., I. *et al.*, 2004).

La úlcera péptica es la causa más frecuente de hospitalización por hemorragia de tubo digestivo alto (Laine, L. & Jensen, D., 2012). A pesar de que la incidencia de complicaciones agudas (sangrado y perforación) ha disminuido en las últimas décadas, el patrón epidemiológico, ha mostrado poco cambio (Thorsen, K., 2014). La introducción de nuevos fármacos para el tratamiento de dispepsia y erradicación de *Helicobacter pylori*, ha contribuido a esta disminución en la incidencia de úlcera péptica no complicada. Sin embargo, existe un repunte en el número de casos de úlcera péptica complicada, esto es debido al incremento en la esperanza de vida, el tabaquismo y el uso de antiinflamatorios no esteroideos (Lau, J., 2011; Diagnóstico y Tratamiento de Úlcera Péptica Aguda Complicada, 2015).

La mortalidad de las úlceras pépticas complicadas (UPC) con sangrado es del 10%. Sin embargo, ésta puede incrementarse o disminuir dependiendo de la población estudiada y de los recursos disponibles en la unidad de atención. Por otro lado, la mortalidad reportada en UPC con perforación se incrementa hasta el 40%, siendo más frecuente en el sexo femenino (Thorsen, K., 2013). Las UPC generan un alto impacto económico en su atención médica,

con costos directos e indirectos calculados derivados de su manejo en Estados Unidos de alrededor de 5.6 billones de dólares anuales (Lau, J., 2011; Diagnóstico y Tratamiento de Úlcera Péptica Aguda Complicada, 2015).

### **2.3. JODINA RHOMBIFOLIA**

*Jodina rhombifolia* Hook et Arn. (Reissek), comúnmente llamada “Sombra de toro”, es un árbol hemiparasitario que crece exclusivamente en América del Sur, en los siguientes países: Bolivia, Brasil (especialmente Rio Grande do Sul), Paraguay, Uruguay y Argentina, encontrándose en este último desde la provincia de Chaco hasta la Provincia de Buenos Aires y la Pampa. Crece sobre distintos tipos de suelo, en zonas secas como lluviosas. Como presuntos hospedadores se han citado tres especies, las cuales son: tala (*Celtis tala* Gillies ex Planch), caldén (*Prosopis caldenia* Burkart) y coronillo (*Scutia buxifolia* Reissek) (Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2005; Luna, M. L. 2001; Luna, M.L. & Sota, E.R., 2003; Luna, M. L. & Giudice, G. E., 2005).<sup>[1,2,4,10]</sup>

Antiguamente, los aborígenes que poblaban estos lugares, lo consideraban sagrado. Creían que era un árbol mágico, cuyo uso era únicamente permitido para los machis, los cuales eran las personas que tenían la función de autoridad religiosa, consejera y protectora del pueblo mapuche. <sup>[4]</sup>

Actualmente, esta planta es de gran importancia para la protección del ganado cuando el resto de la vegetación ha perdido sus hojas, además de los usos populares que se tienen registrados para esta como planta medicinal<sup>[1,2,3,11]</sup> (Fenner, R. *et al.*, 2006; Goleniowski, M. E. *et al.*, 2006; Martínez, G. J. *et al.*, 2005; Oliveiras, S. G. D. *et al.*, 2012; Graham, J. G. *et al.*, 2000), los cuales se muestran en la tabla siguiente:

**Tabla 1.-** Parte de la planta, forma en que es empleada y usos populares de “Sombra de toro”.

<b>Parte estudiada</b>	<b>Forma empleada</b>	<b>Usos populares</b>
Fruto	Extracción de aceite	Tratamiento de llagas venéreas y bubones.
Hojas	Infusión	Tratamiento de resfriados, ronquera, estreñimiento, nefritis, enfermedades del hígado, hidropesía y alcoholismo.
Hojas	Tostadas y pulverizadas	Desinfectante de heridas y úlceras rebeldes. Febrífugo.
Hojas y tallos	Infusión	Tratamiento contra la constipación.
Corteza	Infusión	Tratamiento para la disentería.
Corteza y raíces	Infusión	Tratamiento para la diarrea, disentería y alcoholismo
Frutos, hojas y corteza	Infusión	Antidiarreico, desinflamatorio y tratamiento para la tos.
Hojas	Infusión	Usada para los riñones y vejiga.
Hojas	No especificado	Antialcohólico
Hojas y corteza	No especificado	Tratamiento de úlceras
Hojas	No especificado	Carcinomas

Algunas de las actividades biológicas que han sido evaluadas hasta el momento para esta planta son: inhibición de la proliferación celular y muerte celular de células neoplásicas hematológicas (Leucemia), anti-ulcera, anti-bacterial y contra cierto tipo de carcinomas, teniendo en todos estos casos un efecto benéfico. Sin embargo, como anti-fúngico esta planta no presenta actividad biológica (Nachtigal, G.C., 2011; Montanha, J. A. *et al.*, 2009; Soberón, J.R. *et al.*, 2007; Graham, J. G. *et al.*, 2000; Davicino, R. *et al.*, 2007).

A pesar de sus usos farmacológicos descritos y sustentados, esta planta aún no se encuentra inscrita en la Farmacopea Nacional Argentina, ni en la Brasileira (Farmacopea Brasileira, 2010; Farmacopea Argentina, 2013).

### 2.3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

**Nombres vulgares** (Alonso, J., *et al.* 2005; Lahitte, H. B. & Hurrell, J. A., 1995; Luna, M.L. & Sota, E.R., 2003) [2, 4, 10]

- “Sombra de toro”
- “Quinchilín”
- “Sangre de toro”
- Toro-pisombra”
- “Quirilín”
- “Peje”
- “Quebracho flojo”
- “Quebrachillo flojo”
- “Quichirín”
- “Sombra de toro macho”
- “Pachahua”
- “Quinchillo”
- “Quebrachillo”
- “Quebracho blanco”

Portugués: cancosa, erva cancosa, cancorosa, cancorosa de-três-pontas, iodina, Jodina, espinheira de três-pontas, espinheira santa de três-pontas, cancerosa, sombra de touro (Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2005; Maciel da Silva, V., 2009)<sup>[8]</sup>

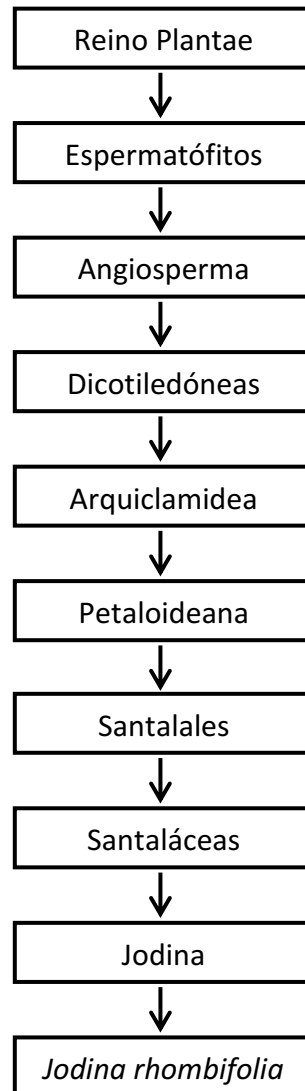
Mapuche: pachahua (Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2005).

**Sinonimia** (Alonso, J., 2005; Romero, R. A., 2014) [9, 10]

- *Celastrus rhombifolius* Hook. & Arn.
- *Celastrus jodina* Steud.
- *Ilex cuneifolia* L. var. *bonariensis* DC.
- *Iodina rhombifolia* Hook. & Arn.
- *Jodina ruscifolia* Hook. & Arn.
- *Jodina cuneifolia* (L.) Miers.
- *Jodina bonariensis* (DC.) Kuntze.

## Ubicación sistemática

La clasificación taxonómica para la especie *Jodina rhombifolia* Hook et Arn., se muestra en el siguiente esquema:



**Figura 1.** Clasificación taxonómica de la especie *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. [5,6]

Las claves sistemáticas se obtuvieron de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa, junto con las siguientes características para cada taxón. [6,7,12]

- **Santalales**<sup>[6]</sup>

- Plantas casi siempre terrestres, autótrofas o hemiparásitas sobre raíces.
  - Plantas casi siempre hemiparásitas sobre raíces. (Pocas veces sobre ramas). Ovario ínfero. (Santaláceas).

- **Santaláceas**<sup>[12]</sup>

- Plantas herbáceas o leñosas, hemiparásitas con haustorios en las raíces de los huéspedes. Presentan hojas simples, habitualmente alternas. Las flores son hermafroditas o unisexuales, actinomorfas, con perianto de tres a seis piezas, ovario ínfero y carpelos abiertos. Los frutos pueden ser drupas.

- **Jodina**<sup>[7]</sup>

- Plantas con hojas enteras, nunca reducidas a escamas, con tallos no fotosintetizantes.

- **Jodina rhombifolia**<sup>[7]</sup>

- Plantas con hojas simples romboidales, coriáceas, provista de espinas en sus vértices.

### 2.3.2. CARACTERES ANATÓMICOS Y MORFOLÓGICOS

Sombra de toro, es un árbol bajo perenne que por lo general mide entre 5 y 10 metros de altura, con un tronco que llega a superar los 35 centímetros de diámetro. Su corteza es muy gruesa de color castaño claro, con profundos surcos longitudinales paralelos. Su follaje es persistente, con hojas simples de color verde azulado, brillantes, duras, gruesas con forma romboidal, de 3-6 cm de largo y 2-3 cm de ancho, las cuales en sus vértices libres presentan una espina, son hojas alternas, apenas pecioladas, glabras y con la nervadura central prominente. Estas son conservadas durante el invierno (Figura 2).<sup>[1, 2,4]</sup>



**Figura 2.** Hojas romboidales de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn.<sup>[3]</sup>

Los trabajos en los cuales se hace mención a la anatomía foliar de *J. rhombifolia* son escasos y debido a que existen diferentes opiniones en cuanto a la estructura de la hoja, la descripción que se presenta a continuación se basa en el último artículo publicado hasta la fecha, el cual fue publicado en el 2003 por Luna, M. L. & Sota, E.R.

## **Pecíolo**

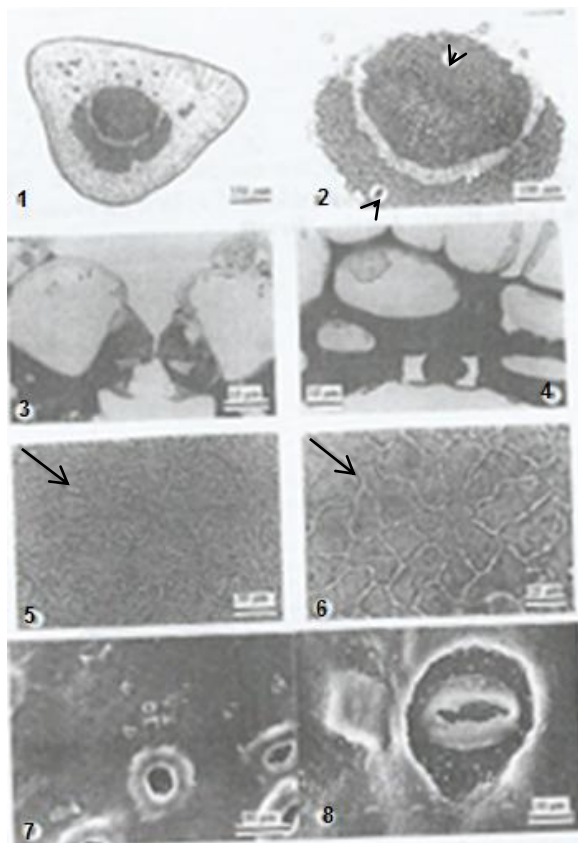
En corte transversal presenta, en las zonas mediana y distal, una sección subtriangular, con ángulos redondeados (Figura 3.1). Se observa que posee un solo haz vascular acompañado de dos casquetes de fibras cuyas paredes tienen un promedio de espesor de 7.9  $\mu\text{m}$  (Figura 3.2). El casquete abaxial cubre los extremos del casquete adaxial y puede aparecer formando tres grupos separados por células parenquimáticas.

Las células epidérmicas poseen las paredes periclinales externas engrosadas (promedio 6  $\mu\text{m}$ ) y contienen drusas de oxalato de calcio en sus lúmenes (Figura 3.4). La cutícula es lisa. Próximo a la base de la lámina el pecíolo lleva tres haces vasculares y la epidermis es múltiple (Luna, M. L. & Sota, E.R.; 2003).

## **Lámina**

### - Cutícula

La cutícula posee un espesor promedio de 1.5  $\mu\text{m}$ . A la altura de los estomas, esta recubre parcialmente a las células oclusivas y se proyecta formando rebordes, los cuales delimitan una cavidad epistomática, llamada "externa" por Metcalf & Chalk (1979) (Figura 3.3). Con MEB se observó que la cutícula es lisa (Figura 3.7) (Luna, M. L. & Sota, E.R.; 2003).



**Figura 3.1 - 3.8.** Estructura del peciolo y epidermis foliar de *J. rhombifolia* con MO y MEB. **3.1, 3.2.** Corte transversal del peciolo. **3.1.** Aspecto general donde se observa el haz vascular único; **3.2.** Detalle del haz vascular con los dos casquetes de fibras (flechas). **3.3, 3.4.** Aspecto de la epidermis múltiple en corte transversal. **3.3.** Detalle de un aparato estomático; **3.4.** Detalle de los cristales de oxalato de calcio de la pared periclinal externa de la epidermis múltiple. **3.5-3.8.** Aspecto de la epidermis en vista superficial. **3.5, 3.6.** Microfotografías con MO. **3.5.** Epidermis abaxial con aparatos estomáticos (flecha); **3.6.** Epidermis adaxial sin estomas desde donde se observan las paredes anticlinales de las células epidérmicas onduladas (flecha). **3.7, 3.8.** Microfotografías con MEB. **3.7.** Detalle de cutícula lisa, aparatos estomáticos hundidos y cristales; **3.8.** Detalle de un aparato estomático

prácticamente cubierto por la cutícula (Luna, M. L. & Sota, E.R.; 2003).

#### - Epidermis

En las hojas jóvenes se registran divisiones periclinales y anticlinales en ambas caras del dermatógeno, indicando de este modo la presencia de una epidermis múltiple (Figura 4.15). Estas divisiones no se producen de forma sincronizada en todas las células.

En cortes transversales de hojas adultas se observó que la epidermis múltiple está constituida por un número variable de capas de células (2-4) (Figura 4.12, 4.13), encontrándose las paredes tangenciales externas de las células de la primera capa considerablemente engrosadas (Figura 3.4). En el interior de dichas paredes se observan cristales solitarios rómbicos de oxalato de calcio (Figura 3.4). Los cristales pueden estar presentes en ambas epidermis o sólo en la epidermis abaxial. En la vista superficial al MO se observó que las paredes de las células epidérmicas, tanto abaxiales como adaxiales, son onduladas, donde la longitud de onda es aproximadamente tres veces mayor que la amplitud (Figuras 3.5, 3.6). El contorno también puede ser tetra-pentagonal, con las paredes anticlinales rectas o subonduladas (Luna, M. L. & Sota, E.R.; 2003).



El aparato estomático es braquiparacítico y se encuentra hundido. Los estomas se disponen en criptas con forma de vasija producidas por el sobre desarrollo de la epidermis múltiple (Figura 4.13). Las células oclusivas presentan rebordes estomáticos, los cuales están más engrosados en los polos. Con MEB se visualizan los estomas hundidos cubiertos parcialmente por la cutícula, así como el contorno de los cristales rómbicos (Figura 4.7, 4.8) (Luna, M. L. & Sota, E.R.; 2003).

- Venación

La venación es pinnada camptódroma, broquidódroma (Figura 4.9). La vena media es prominente, de recorrido recto. Las venas secundarias presentan grosor moderado y recorrido sinuoso y delimitan áreas intercostales. Su ángulo de divergencia es variable: en el tercio superior el ángulo es obtuso, en el tercio medio es recto o casi recto, mientras que el tercio inferior es un ángulo agudo. Las ramificaciones que forman ojales están encerradas por arcos secundarios de tercer o cuarto orden (Figura 4.11).

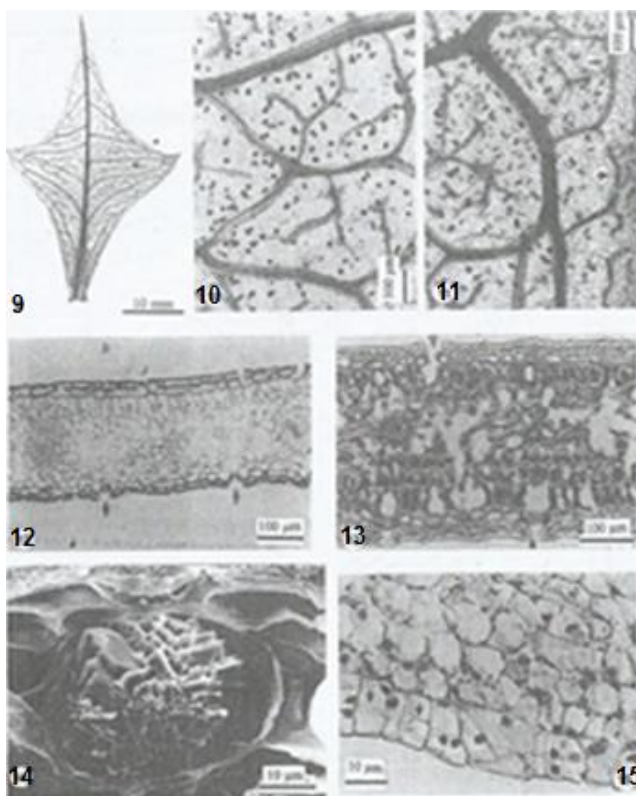
Las venas intersecundarias son de tipo compuesto. Las venas terciarias se disponen según el modelo percurrente bifurcado y en forma aproximadamente paralela oblicua en relación a la vena media. Además se distinguen órdenes de venación mayores. Las venas cuaternarias presentan una trayectoria relativamente orientada al azar. La venación última es ojalada (Figura 4.11). Las vénulas están ramificadas tres veces o más y las areolas presentan desarrollo imperfecto, disposición al azar y forma irregular (Figura 4.10) (Luna, M. L. & Sota, E.R.; 2003).

- Mesófilo

Las hojas pueden ser dorsiventrales e isolaterales (Figuras 4.12, 4.13). El mesófilo en empalizada puede estar constituido por 1 a 3 capas de células y contener, junto con el mesófilo esponjoso, drusas de oxalato de calcio en distintas proporciones (Figura 4.14).

Los haces vasculares son colaterales y están limitados por casquetes de fibras de paredes gruesas de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  de espesor. No se distingue una vaina alrededor de los mismos (Luna, M. L. & Sota, E.R.; 2003).

**Figura 4.9 - 4.15.** Venación y estructura foliar de *J. rhombifolia* con MO y MEB. **4.9 - 4.11.** Venación pinnada-camptódroma-broquidódroma. **4.9.** Aspecto general donde se observa la variación del ángulo de divergencia de las venas secundarias y las venas intersecundarias; **4.10.** Detalle de las areolas con vénulas ramificadas; **4.11.** Detalle de la venación última marginal formando arcos, estos encerrados por arcos secundarios de tercer o cuarto orden. **4.12, 4.13.** Cortes transversales de láminas mostrando los dos patrones estructurales. **4.12.** Patrón A (dorsiventral-hipostomático); **4.13.** Patrón B (isolateral-anfiestomático). **4.14.** Microfotografía con MEB mostrando una drusa de oxalato de calcio en una célula del mesófilo. **4.15.** Origen de la epidermis pluriestratificada mostrando las divisiones periclinales del dermatógeno (Luna, M. L. & Sota, E.R.; 2003).



“Sombra de toro”, tiene una inflorescencia en glomérulos axiales pubescentes. Las flores son perfectas incompletas de aproximadamente cinco milímetros, con un color amarillo verdosas, muy perfumadas, subsésiles, hermafroditas, con perigonioacampanado y carnosos (Figura 5.1). Su periodo de floración se lleva a cabo a finales del otoño y su fructificación en primavera. Los frutos de la especie son globosos, con un tamaño aproximado de siete milímetros, se encuentra cubierto por cinco tépalos, rugosos, al principio son carnosos y rojizos (Figura 5.2), posteriormente se secan y pueden desprenderse; tiene endocarpio leñoso con una sola semilla. <sup>[1, 2,4]</sup>



**Figura 5.** Flores (1) y frutos (2) de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. <sup>[4,5]</sup>

La madera de esta especie es blanda y de buena textura, careciendo de valor industrial. Para lograr endurecerla, usualmente se la deja en agua durante un día y luego se la puede trabajar. Esta ha sido empleada en construcciones rurales poco estables y en la fabricación de yugos. <sup>[10]</sup>

Por su abundante floración invernal, esta es una planta valiosa como melífera, siendo en general muy visitadas por insectos que actúan como polinizadores. Según la creencia popular, esta planta es buena meteoróloga ya que cuando sus hojas se cierran anuncia lluvias. Por la forma en cruz que poseen las hojas, a esta se la considera una planta bendita. Por lo que, cuando hay tormentas eléctricas es buscada para cobijarse bajo ella ya que se cree que no la tocan los rayos ni la arrancan los vientos. <sup>[10]</sup>

### 2.3.3. FENOLOGIA DEL CULTIVO

Su periodo de floración se lleva a cabo a finales del otoño, principio de invierno y su fructificación se da desde mediados de invierno hasta finales de primavera. (Asociación Ribera Norte) <sup>[1, 2, 4, 10]</sup>

#### Vegetación

En un estudio realizado para describir la fenología de la especie, al sudeste de la localidad de Magdalena (Latitud 35° 11' S, longitud 57° 17' O), la cual cuenta con un régimen climático templado – húmedo, con una temperatura media anual de 15°C y precipitaciones anuales que alcanzan los 850 mm con picos de ocurrencia durante otoño y primavera, se encontró que *J. rhombifolia* tiene un corto periodo de foliación durante la primavera, con una baja tasa de renovación de follaje y una duración de expansión foliar mínima. Además de florecer durante el invierno y fructificar durante la primavera, presenta hojas seniles durante todo el año, sin un máximo definido (Murriello, S. *et al.*, 1993).

Otro estudio realizado por Martín, G. O. *et al.* (2014), en las localidades de Tapia, Vipos y Hornillos (Dpto. Trancas) y Piedrabuena (Dpto. Burruyacu), en la Provincia de Tucumán, donde el clima es semiárido-subtropical con precipitaciones entre los meses de Noviembre y Marzo que oscilan entre los 400 y 700 mm anuales, se realizaron las siguientes observaciones:

- Estadio hoja verde (tierna y/o madura), comprende al número de días entre la aparición de los primordios foliares de la estación de crecimiento y la iniciación del estadio “hoja seca”. Para esta especie, los primordios y las hojas tiernas se observan de octubre a noviembre; las hojas tiernas y maduras se mantienen durante los meses de noviembre a febrero,

comprendiendo la duración promedio de estos periodos a  $315 \pm 7.8$  días/año.

- Las hojas maduras se observan de febrero a agosto, con una duración promedio de  $50 \pm 3.9$  días/año.
- La especie no muestra un estadio de hoja seca aparente, debido a que presenta una caída foliar paulatina que permite el reemplazo de hojas senescentes por hojas nuevas, sin un cambio perceptible en la coloración del follaje propio de la planta.

### Reproducción

Su crecimiento es lento y se multiplica por medio de semillas maduras que han sido desprendidas de la planta madre, aunque cuentan con un bajo porcentaje de germinación. También se reproduce de forma vegetativa, a través de ejes gemíferos (Asociación Ribera Norte; Abraham de Noir, F. *et al.* 2002; Luna, M. L., 2001) <sup>[10,11]</sup>

### **2.3.4. PANORAMA EN EL MUNDO**

*Jodina rhombifolia* es un árbol de lento crecimiento, el cual crece exclusivamente en los siguientes países de América del Sur: Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina, el cual se encuentra en peligro de extinción en Brasil (Luna, M.L. & Sota, E.R., 2003; Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015).<sup>[1,2,4]</sup>

Esta especie se reproduce por medio de semillas y se aprovecha de forma silvestre, es decir esta especie no se cultiva. Además de los usos descritos anteriormente, se puede mencionar que se la encuentra como adulterante en la Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) y Congorosa (*Maytenus ilicifolia* Reissek ex. Mart.), principalmente cuando estas se encuentran en polvo. A su vez esta suele verse adulterada por la Congorosa. (Asociación Ribera Norte; Lahitte, H.B. & Hurrell, J. A., 1994; Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015). <sup>[10]</sup>

## **Argentina**

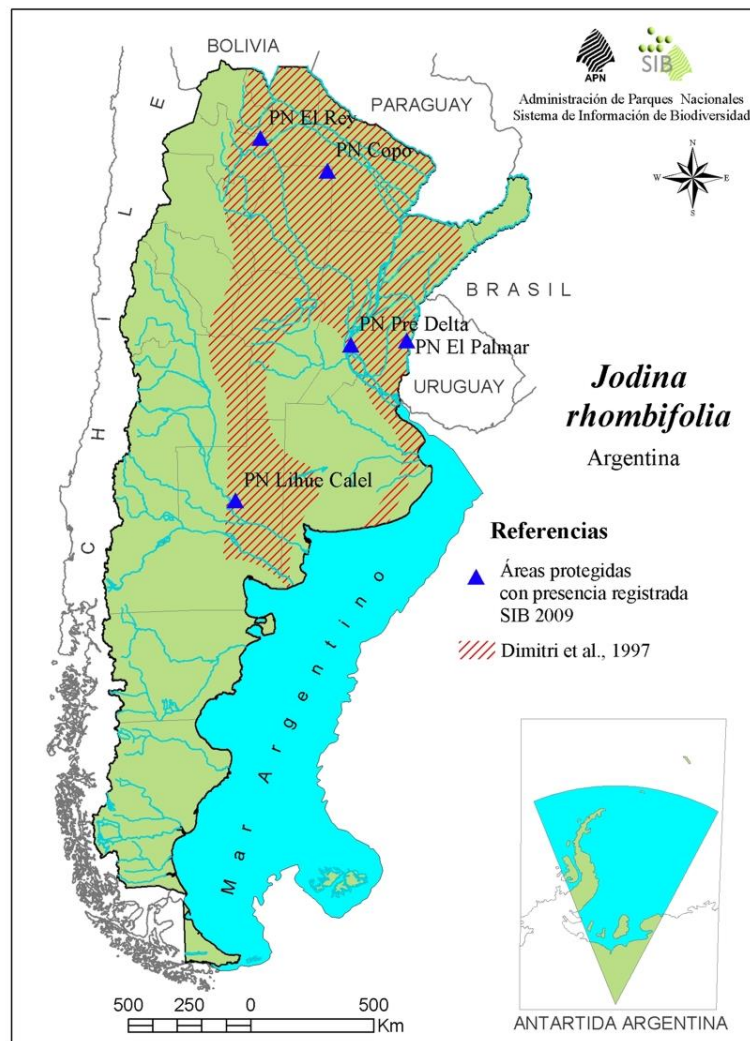
La República Argentina tiene una superficie de 4.025.695 km<sup>2</sup> (2.795.695 km<sup>2</sup> sin la Antártida Argentina), extendiéndose desde los 21° 51' de latitud sur hasta el polo. Su relieve es muy variado ya que cuenta con enormes llanuras, mesetas, serranías y la Cordillera de los Andes, con alturas que superan los 7,000 metros. En tan amplio y variado territorio existen numerosos tipos de climas, desde los subtropicales húmedos hasta los polares, así como múltiples tipos de suelos. Por consiguiente existen también muchos tipos de vegetación, adaptados a las diferentes condiciones ambientales (Morales, J. *et al*; 2001).

En Argentina, *Jodina rhombifolia* posee una amplia distribución (Figura 6) ya que se encuentra en: Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, Mendoza, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán, encontrándose principalmente sobre suelos arenosos y lugares donde la lluvia es escasa, empleándose principalmente como ornamental (Luna, M. L. & Sota, E.R.; 2003).<sup>[5,11]</sup>

Esta especie se tiene considerada como un producto forestal secundario, es decir un producto forestal no maderero (PFNM) y dentro de esta, se encuentra ubicada como una especie productora de cera (hojas).

Debido a que la obtención de los PFNM es básicamente por recolección y que la comercialización se realiza por canales no convencionales ya que no poseen un mercado fijo, que responden a variaciones estacionales y muchas veces a la ocurrencia de determinados eventos, este tipo de productos no se reflejan en las estadísticas (Morales, J. *et al*; 2001).

Se han hecho pocas investigaciones sistemáticas que tengan a los PFNM como punto focal, desconociéndose información básica sobre su manejo, rendimiento, conservación, y otros aspectos relacionados (Morales, J. *et al*; 2001).



**Figura 6.** Distribución geográfica para la especie *Jodina rhombifolia* en Argentina. <sup>[5]</sup>

- Importancia socio-económica de los PFNM (Ceras)

A partir de las hojas de la especie, también se obtienen ceras. Las ceras, en general, tienen múltiples aplicaciones y usos, ya sea en forma directa o formando parte de productos compuestos, las convierten en material valioso e irremplazable. Se las emplea en la elaboración de adhesivos, aislantes, barnices, caucho, cosméticos, lustres, pinturas, textiles, entre otros.

La importancia comercial de las ceras vegetales se basa en sus características físicas y químicas, difíciles de obtener en los productos sintéticos. En ciertos tipos de ceras el punto de fusión elevado, dureza y brillo contribuyen a valorizarlas.

Desde el punto de vista económico merecen atención solamente las exudaciones y las incrustaciones (ceras), advirtiendo que las plantas productoras están en vías de rápida desaparición a causa de la intensa explotación a la que están sometidas por su particularidad de aprovechamiento al estado verde, debido a la presencia de esas sustancias que aumentan extraordinariamente su combustibilidad. Además, el aprovechamiento no sustentable que se efectúa para la extracción de cera ha hecho que peligren algunas especies con dichas características (Morales, J. *et al.*; 2001).

### 2.3.5. ADAPTABILIDAD ECOLÓGICA

#### - Requerimientos climáticos

*Jodina rhombifolia* al encontrarse tan ampliamente distribuida se adapta a un régimen climático amplio. En 1993, Murriello, S. *et al.* describieron su régimen climático, en la zona de los Talaes como templado – húmedo, con una temperatura media anual de 15°C y precipitaciones anuales que alcanzan los 850 mm con picos de ocurrencia durante otoño y primavera. Mientras que Martín, G. O. *et al.* (2014), para la región del Chaco (Tucumán), lo describe como semiárido-subtropical con precipitaciones entre los meses de Noviembre y Marzo que oscilan entre 400 y 700 mm anuales.

En las últimas décadas del siglo XX, algunos árboles nativos, como *Jodina rhombifolia*, probablemente han sido favorecidos por un aumento de las lluvias y han invadido sitios con suelo profundo a lo largo de los alambrados (Sierra, E. M. *et al.*, 2001; Ghera, C. M. & León, R. J. C., 1997).

#### - Biomasa

Esta se encuentra principalmente en ambientes con los siguientes grupos estructurales<sup>[5]</sup>:

- Bosques altos: Vegetación con un estrato abierto o cerrado de especies arbóreas que superan los 15 metros.
- Matorrales: Vegetación densa de arbustos con un estrato superior cerrado de leñosas con una altura de hasta 5 metros.
- Praderas: suelo desnudo ausente o cubriendo menos del 20% de superficie y vegetación leñosa ausente o dispersa con una altura mayor a 0.5 metros.

### 2.3.6. TECNOLOGÍA DEL CULTIVO

Debido a que esta especie es aprovechada de forma silvestre en los países en que se encuentra, es sumamente escasa la información disponible sobre la tecnología del cultivo para esta, ya que no se ha sistematizado (Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015).

Esta especie se ha propuesto por sus características funcionales y por ser nativa de la Provincia de Córdoba como una especie deseable para formar parte de las combinaciones vegetales con beneficios múltiples, como por ejemplo para crear cercos en los caminos y se encuentra recomendada junto con otras especies como prioritarias para investigaciones de germinación, propagación, implantación y producción a mediana o gran escala (Díaz, S. *et al.* 2011).

En Argentina, se ha observado que para la recuperación de pastizales, esta especie puede llegar a ser un problema por lo que es tratada de controlar por medio de controles químicos, como por ejemplo: Picloram, Tryclopirm Clopyralid y 3,6 ADP, sin llegar a ser muy afectada (Martín, A. O.; 2014).



### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1. HISTORIA DE LA BIOTECNOLOGÍA**

La biotecnología es el conjunto de herramientas o técnicas que emplean seres vivos o parte de ellos, ya sean microorganismos, células animales y plantas, y material genético aislado y clonado, con el objetivo de obtener y/o mejorar productos, procesos y/o servicios.

El concepto de biotecnología surgió en 1917 cuando Karl Ereky, economista húngaro, idealizó emplear sistemas biológicos vivos como materia prima para obtener productos en mayor escala a nivel industrial. Hasta ese entonces, se le conocía como el “Estudio de los procesos de fermentación”.

La biotecnología tradicional, comenzó hace miles de años sin un claro entendimiento sobre el cómo se llevaban a cabo los procesos. Esto se inició con la fabricación del vino, pan, queso y yogurt, ya que estas se basan en el empleo de microorganismos o de los productos que ellos fabrican para producir productos fermentados. Esta forma de biotecnología era considerada más un arte que una ciencia.

Posteriormente, surge la biotecnología clásica cuando el hombre comienza a perfeccionar el uso de microorganismos responsables de ciertos procesos para elaborar productos, como por ejemplo: la penicilina y otros antibióticos. Además se define la totipotencialidad celular, la cual es la capacidad que tiene la célula vegetal de regenerar una planta completa cuando son separadas del organismo madre, lo que le abre paso al cultivo de tejidos vegetales en condiciones de laboratorio.

La biotecnología moderna o actual, comienza con el descubrimiento de la estructura de la molécula del ADN, realizado por James Watson y Francis Crick en los años 50. Con esto el hombre avanza en los conocimientos científicos y crea modificaciones en organismos haciendo que estos brinden bienes y servicios, como por ejemplo: clonación de animales, cultivos transgénicos y la producción de insulina humana en bacterias, haciendo de la biotecnología una herramienta productiva que ha impactado prácticamente todas las actividades industriales.

La biotecnología puede aplicarse a todo tipo de organismo vivo, ya sean virus, hongos, bacterias, plantas, animales y humanos, ya que todos estos están conformados por células, las cuales son la unidad básica de la vida. En el núcleo de las células se encuentra el ADN, el cual es una larga molécula que contiene toda la información necesaria para la vida de un organismo, este mismo se asocia a proteínas para formar los cromosomas, lo cuales llevan los genes y estos son los portadores de la información genética, la cual es única y marca el ritmo de la vida para cada especie.

Los campos de aplicación de la biotecnología abarca los ámbitos de la industria, ganadería, agricultura, salud y ambiente, por lo que se puede clasificar en: Biotecnología Vegetal, Biotecnología Humana, Biotecnología Industrial, Biotecnología Animal, Biotecnología Ambiental y Biotecnología Marina (Abedini, W. *et al.* 2014).

### **3.2. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

La biotecnología vegetal es un grupo de técnicas que utilizan organismos, sus partes, sistemas, moléculas o procesos biológicos para elaborar productos, dar servicios o resolver problemas específicos, las cuales se aplican en múltiples áreas de la actividad humana.

Esta se basa en una serie de herramientas, tales como: “Cultivo de Tejidos (clones)”, “Tecnología de ADN Recombinante (Planta Transgénica)”, “Biología Molecular (Huellas digitales)” y “Omicas (Genomas)”, obteniendo de esta forma como productos plantas más resistente a plagas y factores ambientales, agentes de control biológico y plantas con características mejoradas, con la finalidad de resolver problemas en el manejo de plagas, caracterizar variedades vegetales, rescatar especies en peligro de extinción, generar bancos de germoplasma y mejorar la cantidad y calidad de los alimentos disponibles, como por ejemplo maíz, zanahoria, lechuga, tomate, entre otros.

Los cultivos vegetales se mejoran por medio de la selección, la cual comprende a la variabilidad; hibridación o cruzamiento artificial que se dan entre parientes silvestres; y por medio de la mutagénesis ya sea química o por radiación.

Las técnicas de Ingeniería Genética o ADN Recombinante, son el conjunto de metodologías que permiten alterar las características de un organismo mediante la modificación dirigida y controlada del genoma, ya sea añadiendo, eliminando o modificando algunos de genes, obteniendo de esta forma organismos genéticamente modificados (OGM) con nuevas características y algún beneficio como por ejemplo:

- Reducir el uso de pesticidas.
- Reducir pérdidas de cultivos ocasionados por enfermedades y pestes.
- Mejorar la calidad nutritiva.
- Mejorar los rendimientos de la producción.
- Obtener nuevos productos con capacidad de ser asimilados en la agricultura con otros fines como la fabricación de medicamentos, vacunas, biopolímeros o recuperación de suelos contaminados.

Las técnicas de Biología molecular, consisten en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual es una técnica *in vitro* que semeja la habilidad natural de la célula de duplicar el ADN, incluyendo lo que son los marcadores moleculares, un ejemplo de esto serían las pruebas de paternidad (Abedini, W. *et al.* 2014).

### 3.3. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* es una biotécnica, la cual consiste en aislar una porción de una planta (explanto), ya sea una célula, tejido u órgano, para cultivarlo en un medio nutritivo en condiciones artificiales. Esta técnica se basa en lograr expresar la totipotencialidad de las células vegetales.

En general son cuatro las etapas que involucran a la micropropagación vegetal, las cuales son:

- 1) Iniciación: en esta etapa se lleva a cabo la elección y fitoacondicionamiento de la planta madre, la elección del explanto inicial y de la formulación del medio de cultivo, desinfección superficial de los explantos y el establecimientos del cultivo *in vitro*.
- 2) Multiplicación del material vegetal y formación de brotes.
- 3) Enraizamiento de los brotes obtenidos *in vitro*.
- 4) Rustificación: es el pasaje gradual de las plantas crecidas *in vitro* a las condiciones de maceta hasta llegar a condiciones de campo.

Cuando los explantos se cultivan bajo condiciones apropiadas, es posible inducir la formación de estructuras organizadas y la formación de plantas completas. La regeneración es un proceso que incluye distintas etapas que son comunes a los diferentes tipos de cultivo *in vitro*. De Klerk *et al.* (1997) denominaron a estas fases como: fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización. La primera corresponde a la percepción del estímulo tendiente a la desdiferenciación de los tejidos originales; en la segunda fase las células son receptivas al estímulo en relación directa a la calidad y cantidad de componentes del medio de cultivo, por ejemplo: sales minerales, reguladores de crecimiento, entre otros. En la fase de realización las células forman el órgano determinado por medio de la división celular (Abedini, W. *et al.*, 2006).

Como resultado de los fenómenos morfogénicos, se puede obtener un proceso de:

- a) Embriogénesis somática, en la cual la regeneración se obtiene a partir de estructuras complejas semejantes a embriones sexuales, llamados embriones somáticos.
- b) Organogénesis directa, esto es si a partir del explanto original, se logra la formación de brotes o yemas adventicias con un enraizamiento posterior.
- c) Organogénesis indirecta, en el cual se obtiene la formación de un callo, masa de células poco diferenciadas. Este callo puede continuar creciendo indefinidamente como tal o diferenciarse en algún órgano.

Los callos son una masa de células isodiamétricas poco diferenciadas, las cuales tienen una alta tasa de división celular y sin ningún tipo de organización tisular. En el año 2000, Abedini, W. *et al.*, reportaron la micropropagación *in vitro* de las especies forestales *Acacia caven* (espinillo), *Celtis tala* (tala), *Parkinsonia aculeata* (cina-cina) y *Erythrina Crita-galli* (seibo) a partir de material juvenil, pasando por la etapa de callo hasta la rustificación de las plántulas, con el objetivo de la conservación de los recursos genéticos forestales.

Las ventajas que ofrece la micropropagación vegetal sobre la agricultura tradicional son (Karuppusamy, S., 2009; Al-sane, K. O. *et al.*, 2005):

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala.
- Uniformidad seleccionada del material multiplicado.
- Reducción en el tiempo de multiplicación y en el espacio requerido para tal fin.
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado.
- Introducción rápida de nuevos cultivares.
- Conservación de germoplasma.

El aporte de la biotecnología a través de sus diferentes técnicas y aplicaciones, es una herramienta importante para la multiplicación de plantas medicinales, obtención de metabolitos secundarios de alto valor unitario y conservación de las especies vegetales.

### 3.4. FACTORES QUE AFECTAN LOS PROCESOS MORFOGÉNICOS

Los principales factores que condicionan las respuestas morfológicas de los cultivos *in vitro* son (Radice, S. *et al.*, 2010; Al-sane, K. O. *et al.*, 2005):

- 1. Genotipo:** este es un factor determinante, ya que cada especie, variedad o línea tiene una respuesta particular dada por su material genético.
- 2. Tipo de explanto:** se refiere a la determinación sobre qué parte de la planta es la más adecuada como explanto, así como también el estado de la planta madre, lo que involucra el grado de crecimiento y desarrollo, sanidad y estado nutricional de la misma.
- 3. Medios de cultivo y reguladores de crecimiento:** la composición de los medios de cultivo son formulaciones salinas, muchas de las cuales están probadas para determinadas especies y para inducir ciertos procesos morfológicos, como por ejemplo el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) de 1962, aunque en algunos casos es necesario modificar las composiciones según la especie que se está estudiando y la respuesta morfológica deseada.  
Los reguladores de crecimiento (PGR), son compuestos orgánicos no nutrientes, que inducen procesos fisiológicos específicos en concentraciones muy bajas. Su acción depende del tipo de regulador, la concentración del mismo, su balance adecuado cuando se usa en combinación con otro regulador de crecimiento y del propio explanto. Por lo general, los más empleados en cultivo *in vitro* son: auxinas, giberilinas y citoquininas.  
Otros componentes son los hidratos de carbono, el más empleado es la sacarosa. Como componentes opcionales según las necesidades específicas, están los: gelificantes que se adicionan cuando se desea obtener un cultivo semisólido, el más empleado es el agar; antibióticos para eliminar microorganismos contaminantes; y carbón activado, el cual se usa principalmente para absorber compuestos tóxicos y para evitar la oxidación de explantos.
- 4. Condiciones físicas:** estas incluyen los factores de temperatura de incubación, humedad relativa en los envases de cultivo y la posibilidad de intercambio gaseoso con el exterior del envase, y la cantidad y calidad de luz, así como su fotoperíodo.

### 3.5. FORMACIÓN DE CALLOS

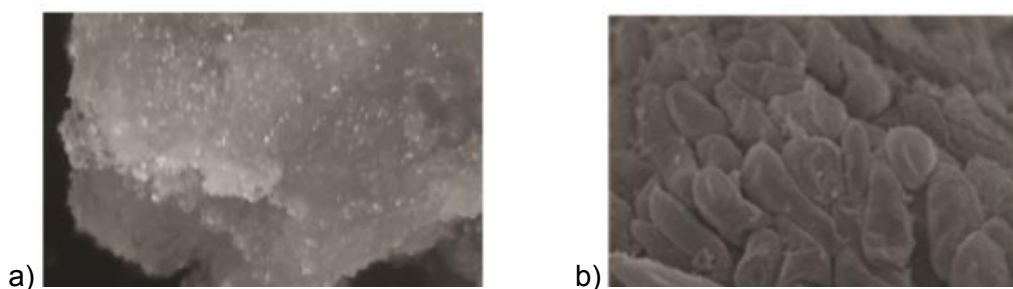
Una vez que se ha establecido el cultivo axénico de los explantos provenientes de la especie vegetal, estos son inducidos con el objetivo de obtener un callo, los cuales son una masa de células isodiamétricas poco diferenciadas, conformadas por células de parénquima, los cuales tienen una alta tasa de división celular y sin ningún tipo de organización tisular. Esta característica varía según la parte de la planta empleada y la especie vegetal probada.

Los cultivos vegetales indiferenciados se obtienen a partir de órganos o tejidos organizados cultivados en un medio nutritivo apropiado (sólido o líquido) que se desdiferencian ante la presencia de auxinas exógenas. En medio sólido se obtienen masas celulares más o menos compactas que constituyen los callos, mientras que en medio líquido se logran las suspensiones celulares formadas por células libres o agregadas. Los cultivos de células vegetales indiferenciadas pueden exhibir una gran variedad estructural, genética y metabólica con respecto a la planta madre.

En los cultivos indiferenciados se encuentran células con gran variedad de tamaños y formas, de citoplasma denso, con vacuolas pequeñas y con alto potencial morfogénico que se pueden homologar a las células meristemáticas de las plantas. También se observan células alargadas y células muy grandes con una gran vacuola central. Sin embargo, debido a que las células en suspensión se dividen en forma asincrónica, los tipos celulares descritos pueden no corresponder a tipos celulares diferentes sino a distintos estadios dentro del ciclo de crecimiento (Ochatt, S. J. & Power, J. B., 1992).

En estudios morfológicos realizados por de Oliveira R., L. *et al.* (2012), sobre callos obtenidos a partir de las fibras de banana (*Musa sp.* cv. Prata anã), se encontró por medio de MEB que las células de los callos transparentes y acuosos tienen una forma elongada (Figura 7). Según Grando, M. F. *et al.* (1993), este tipo de callos son formados por un tejido esponjoso, sensible, translucido y de color blanco. Chaudhury, A. & Qu, R. (2000), observaron que las células no embriogénicas provenientes del cultivo de callos para las inflorescencias juveniles de *Cynodon dactylon*, tenían un aspecto desorganizado con células tubulares y elongadas. Posteriormente en el 2007, Figueiredo, M. A. *et al.*, observaron que las células no embriogénicas de callos translúcidos tenían una forma elongada y una escasa organización. En los callos obtenidos a partir de la *Araucaria angustifolia*, se observó algunas células vacuolizadas y elongadas (Steiner *et al.*, 2005). Adicionalmente, de Oliveira R., L. *et al.* (2012) obtuvieron dos tipos adicionales de callos: 1) callos amarillos con pequeños agregados celulares, los cuales presentaron características citológicas y morfológicas de callos embriogénicos y 2) callos amarillos con grandes agregados celulares, los cuales presentaron aspectos morfológicos embriogénicos, sin embargo citológicamente no presentaron capacidad embriogénica.

---



**Figura 7.-** a) Callo transparente y acuoso de *Musa sp.*, cv. Prata anã. b) Células elongadas del callo transparente y acuoso de *Musa sp.*, cv. Prata anã visto a 10  $\mu\text{m}$  en MEB.

Los reguladores de crecimiento (PGR) comúnmente empleados en cultivo *in vitro* para lograr este tipo de respuesta son las auxinas (AIA (ácido indol-3-acético), ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e IBA (ácido indol-3-butírico)), las cuales son sustancias químicas que tienen la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en cultivo *in vitro*. En las plantas, estas intervienen en el gravitropismo, fototropismo, la dominancia apical, alargamiento celular, crecimiento de tallos, frutos, raíces y yemas, y en la diferenciación de tejidos vasculares. En cuanto a su mecanismo de acción, se sabe que estas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula. La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros. (Cleland, R. E., 1995; Davies, P. J., 1995; Giménez, D. O. & Beltrano, J., 2014; Rück, A. *et al.*, 1993; Leyser, O., 2001). Según Petrášek, J. *et al.* (2002), la división y el crecimiento para la mayoría de las plantas cultivadas *in vitro*, requieren de una fuente externa de auxinas. En los cultivos, la relación entre las concentraciones internas y externas de auxinas, es esencial para la regulación de fases del ciclo de crecimiento. El tipo de auxina empleada en el medio de cultivo influye en la morfología del cultivo (Hofmann, N. *et al.*, 2004).

Las auxinas sintéticas como el 2,4-D, se emplean para la inducción y mantenimiento de callos (Pellegrineschi, A. *et al.*, 2004) o para la inducción de embriogénesis somática aplicándola a altas concentraciones (Vikrant *et al.*, 2003).

Slelak, H. *et al.* (2005) observaron que la formación de callos en las semillas de *Brassica napus*, se originaban sobre o cerca de la zona de corte de los explantos. Así mismo, también observaron que no solo la concentración de 2,4-D empleada influencia el tipo de callo obtenido, si no que el tiempo de exposición a 2,4-D (14, 21 y 28 días) también tiene un papel importante, llegando incluso a inhibir la respuesta morfogénica en casos de exposición a largo plazo. Obteniendo para el día 28, una mayoría de callos amarillos y compactos, sobre callos blancos, acuosos y friables.

Los cultivos de callos son a menudo de crecimiento lento y heterogéneo, debido principalmente a la disponibilidad de los nutrientes. Para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en períodos cortos, variables según la especie (30-45 días). La tasa de crecimiento y las características de friabilidad dependen de la especie, del balance hormonal, de la concentración de agar, calcio y magnesio y de la intensidad luminosa (Ochatt, S. J. & Power, J. B., 1992).

Primero existe una fase de retraso o adaptación (1 a 3 días) seguida de una etapa de rápido crecimiento en donde se produce un aumento constante de la biomasa por incremento tanto del número como del tamaño celular, hasta que finalmente el índice mitótico comienza a declinar por limitación de nutrientes, hasta ser prácticamente nulo en la fase estacionaria. Al inicio de la fase exponencial, el porcentaje de aumento de la biomasa es inferior al que corresponde al aumento en el número de células, pero esta relación luego se invierte debido al incremento del tamaño celular. Además, el peso fresco continúa aumentando después que el peso seco ha alcanzado su máximo, debido a la captación de agua (Ochatt, S. J. & Power, J. B., 1992).

### **3.6. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR CULTIVO *IN VITRO***

El metabolismo secundario de las plantas regula muchas de las relaciones de la planta con sus alrededores. La producción de dichos metabolitos está estrechamente relacionada con el proceso de desarrollo de la planta, generalmente sin estar asociados con el crecimiento de la misma. Depende de las condiciones determinadas de control hormonal y es paralela al desarrollo de tejidos especializados y órganos, tales como: raíces, tallos, hojas y glándulas, y son producidos frente a situaciones de estrés ya sea biótico o abióticos.



Los metabolitos secundarios provenientes de plantas tienen un amplio interés comercial como: insecticidas, herbicidas, saborizantes, colorantes, fragancias, antimicrobianos, obtención de enzimas y medicinas (Karuppusamy, S., 2009).

En la actualidad, por medio del cultivo *in vitro* de callos a partir de células vegetales se obtienen varios metabolitos secundarios con distintas aplicaciones, principalmente farmacológicas como es el caso de la *Calendula sp.*, la cual es comúnmente empleada para tratar afecciones de la piel, fiebre, actividad anti-inflamatoria, además de tener propiedades antivirales, antibacteriales y fungicida (Oliveiras, S. G. D. *et al.*, 2012). En la siguiente tabla (2) se presentan algunos ejemplos del cultivo *in vitro* de callo, en los cuales se emplea como regulador de crecimiento la auxina 2,4-D.

**Tabla 2.-** Plantas cultivadas *in-vitro* con 2,4-D para cultivo de callos y con estos la obtención de metabolitos secundarios:

<b>Especie vegetal</b>	<b>Principio Activo</b>	<b>Medio de cultivo y PGR</b>	<b>Referencia</b>
<i>Aspidosperma ramiflorum</i>	Ramiflorina	MS + 2,4-D + BAP	Olivira, A. J. B. <i>et al.</i> , 2001
<i>Camellia chinensis</i>	Flavonas	MS + 2,4-D + ANA	Nikolaeva, T. N. <i>et al.</i> , 2009
<i>Capsicum annum</i>	Capsiacina	MS + 2,4-D + cinetina	Umamaheswari, A. & Lalitha, V., 2007
<i>Centella asiática</i>	Asiaticosido	MS + 2,4-D + cinetina	Kiong, A. L. <i>et al.</i> , 2005
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Piritrina	MS + 2,4-D + cinetina	Rajasekaran, T. <i>et al.</i> , 1991
<i>Citrus sp.</i>	Limonina	MS + 2,4-D + cinetina	Barthe, G. A. <i>et al.</i> , 1987
<i>Coffea arabica</i>	Cafeína	MS + 2,4-D + cinetina	Waller, G. R. <i>et al.</i> , 1983
<i>Corydalis ophiocarpa</i>	Alcaloides	MS + 2,4-D + cinetina	Iwasa, K. & Takao, N., 1982
<i>Coscinium fenestratum</i>	Coridalina	MS + 2,4-D + BAP	Taha, H. S. <i>et al.</i> , 2008

<i>Coscinium fenestratum</i>	Berberina	MS + 2,4-D + BAP	Khan, T. <i>et al.</i> , 2008
<i>Crataegus sinaica</i>	Flavonoide	MS + 2,4-D + ANA + BAP	Maharik, N. <i>et al.</i> , 2009
<i>Fabiana imbricata</i>	Rutina	MS + ANA + 2,4-D	Schmeda-Hirschmann, G. <i>et al.</i> , 2004
<i>Panax ginseng</i>	Saponinas y sapogeninas	MS + 2,4-D	Asaka, I. <i>et al.</i> , 1993

La acumulación de metabolitos secundarios en las plantas es parte del mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos, el cual es activado y desencadenado por elicitores (Zhao, J. *et al.*, 2005). Por lo que el tratamiento con elicitores bióticos y/o abióticos, ha sido una herramienta útil para mejorar la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares, como es el caso del *Panax ginseng* C. A. Meyer, para la obtención de ginsenósidos (Karuppusamy, S., 2009).

Las ventajas de emplear biotécnicas en la producción de plantas de uso medicinal, respecto a la producción por agricultura tradicional son (Karuppusamy, S., 2009; Al-Sane, K. O. *et al.*, 2005; Balbuena, T. S. *et al.*, 2009):

- El cultivo se torna independiente de las variaciones estacionales, geografía y otros factores ambientales.
- Se obtiene un sistema de producción definido, incluyendo una disponibilidad continua del producto.
- Los principios activos generados pueden ser recuperados eficientemente y con tecnología no contaminante.
- Permite la producción de compuestos nuevos, que normalmente no sintetiza la planta alterando la ruta metabólica establecida o sometiendo al callo a condiciones de estrés.
- Permite incrementar la formación de principios activos, alterando la ruta metabólica establecida.
- Obtención de plantas con sanidad controlada (cultivos de meristemas).
- Conservación de germoplasma y evitar la extinción de especies vegetales.

### 3.7. METABOLITOS SECUNDARIOS; GENERALIDADES

El metabolismo de las plantas se encuentra dividido en dos tipos: metabolismo primario y metabolismo secundario. El metabolismo primario es esencial para la vida y es común para todos los seres vivos. En las plantas se refiere a lo que es la fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, asimilación de nutrientes, diferenciación celular, entre otros. Mediante este se sintetizan los metabolitos primarios, los cuales son: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Por otro lado, el metabolismo secundario no se considera esencial para vida y tienen una distribución más limitada encontrándose en ciertos grupos y partes de los vegetales. En las plantas el metabolismo secundario da lugar a los productos llamados metabolitos secundarios, los cuales están involucrados en la protección y supervivencia de las plantas frente a condiciones de estrés ya sea biótico por ataque de herbívoros, patógenos y/o parásitos, o por estrés abiótico lo que comprende al frío, calor, falta de nutrientes en el suelo, pH del suelo, sequía, presencia de metales pesados en el suelo, luz y humedad. Sin embargo, desde el punto de vista farmacológico estos compuestos son de gran interés, ya que la mayoría de los principios activos que se obtienen de plantas medicinales proceden del metabolismo secundario. Estos poseen características muy variadas y una extrema complejidad química en la gran mayoría de los casos.

En el conjunto de las plantas se pueden diferenciar tres rutas biosintéticas que dan lugar a los metabolitos secundarios, ruta del ácido shikímico, ruta del acetato-mevalonato o ruta de los policétidos y la ruta del acetato-mevalonato (también llamada como ruta del ácido mevalónico o ruta de condensación isoprénica), estos compuestos pueden proceder de una o varias de estas rutas como se muestra a continuación (Dewick, P. M., 2009; Kuklinski, C., 2000):

**Tabla 3.-** Rutas metabólicas para la obtención de metabolitos secundarios.

<b>Tipo de metabolitos secundarios</b>	<b>Ruta metabólica</b>
Ácidos fenólicos	Ácido shikímico
Taninos	Ácido shikímico
Flavonoides	Ácido shikímico y ruta de los policétidos
Alcaloides	Ácido shikímico y ruta del ácido mevalónico
Antraquinonas	Policétidos
Antibióticos	Policétidos
Lignanos y cumarinas	Ácido shikímico
Esteroides	Ácido mevalónico
Terpenos	Ácido mevalónico

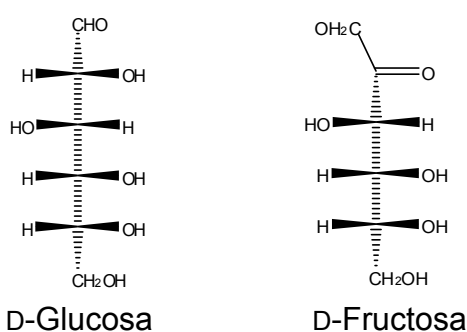
### 3.7.1. HETERÓSIDOS

Los heterósidos son metabolitos secundarios que se obtienen a partir de carbohidratos o glúcidos los cuales se obtienen a partir de los metabolitos primarios, los cuales conforman el grupo más abundante de productos naturales.

Los glúcidos son sustancias biológicas primordiales, de las cuales billones de toneladas se producen cada año por medio de la fotosíntesis de plantas y microorganismos. Casi todas las plantas y animales sintetizan y metabolizan carbohidratos, utilizándolos para almacenar energía solar y repartirla a sus células. Estos son componentes principales del tejido de soporte en plantas (celulosa, hemicelulosa), además de tener funciones de reserva (almidón, inulina), defensa frente a agentes externos (gomas), retención de agua (mucilagos) y están presentes desde en los microbios hasta los mamíferos como parte de todas las membranas celulares (Lindhorst, T. K., 2007; Wade, Jr. L. G., 2006). El término carbohidrato se debe a que la gran mayoría de los azúcares tienen la siguiente fórmula empírica  $(CH_2O)_n$ , a este tipo de compuestos también se les conoce como "hidratos de carbono". Con base en esta definición, el término carbohidrato incluye también a los compuestos polihidroxialdehídos, polihidroxicetonas y a compuestos que se hidrolizan con facilidad a los dos compuestos anteriores. Así mismo algunos carbohidratos contienen átomos de nitrógeno, azufre y fósforo (Nelson, D. L. & Cox, M. M., 2006; Wade, Jr. L. G., 2006).

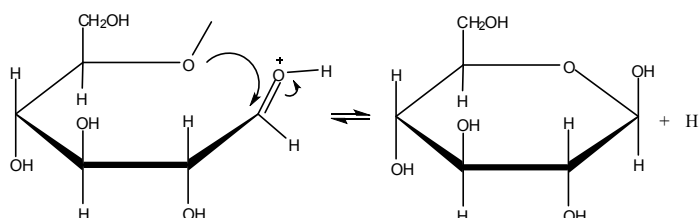
El concepto de glúcido, incluye a los monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos así como también a los heterósidos que son derivados de los monosacáridos. Los carbohidratos existen en una gran variedad tanto conformacional como estereoquímicamente, pudiendo formar monosacáridos de diferentes tipos, oligómeros lineales o ramificados, así como también polisacáridos. Los carbohidratos son compuestos con varios estereocentros, por lo que estos compuestos tienen un gran número de estereoisómeros (Lindhorst, T.K., 2007).

Los monosacáridos, o azúcares simples, son compuestos que no pueden ser hidrolizados a compuestos más simples, como por ejemplo: glucosa y fructosa (Figura 8). La glucosa es un polihidroxialdehído, mientras que la fructosa es una polihidroxicetona. Los polihidroxialdehídos también son conocidos como aldosas y las polihidroxicetonas como cetosas.



**Figura 8.-** Estructura de la D-glucosa y D-fructosa empleando las proyecciones de Fisher.

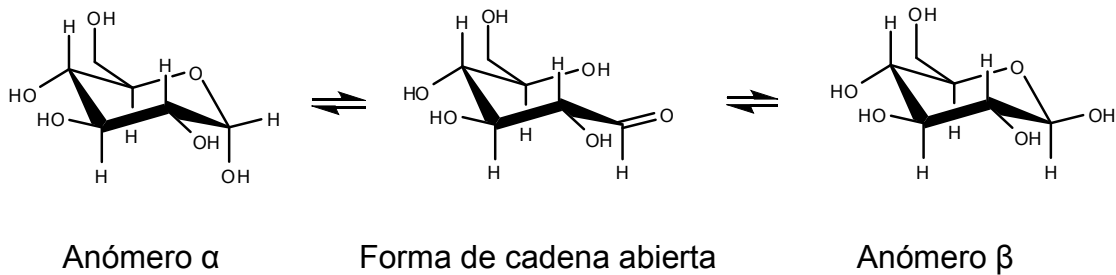
Las aldosas en su forma sólida y cristalina generalmente están en forma de un acetal cíclico, mientras que en solución acuosa se encuentran como una mezcla en equilibrio del hemiacetal cíclico y la forma de cadena abierta. Sin embargo; en la mayoría de los azúcares el equilibrio se encuentra desplazado hacia el hemiacetal cíclico. En el caso de las aldohexosas, como la glucosa pueden formar hemiacetales que contengan anillos de cinco o seis miembros. Aunque en la mayoría de las aldohexosas esta favorecida la formación de anillos de seis miembros con una unión hemiacetalica entre el carbono del grupo aldehído y el grupo hidroxilo del carbono cinco. (Figura 9) Al hemiacetal cíclico de seis miembros se le denomina piranosa.



**Figura 9.-** Glucosa en forma de hemiacetal cíclico.

No todos los azúcares están en su forma hemiacetalica como piranosa, muchas aldopentosas y cetoheptosas forman anillos de cinco miembros a los cuales se les denomina furanosa. La ciclación para estos casos se lleva a cabo de la misma manera que para los anillos de seis miembros.

Cuando el anillo se cierra, el átomo de carbono hemiacetal pasa de ser un grupo carbonilo plano a un carbono asimétrico, y dependiendo del lado del grupo carbonilo protonado al que este unido, el alcohol del hemiacetal se puede orientar hacia arriba ( $\beta$ ) o hacia abajo ( $\alpha$ ), dando lugar a los productos diastereoméricos llamados anómeros. El átomo de carbono hemiacetalico es denominado como carbono anomérico. Cuando uno de estos anillos se encuentra en solución, estos están en un equilibrio entre su forma  $\alpha$  y  $\beta$ , a este equilibrio se le conoce como mutarrotación (Figura 10).



**Figura 10.-** Mutarrotación de la glucosa en solución.

Un disacárido es un azúcar que se puede hidrolizar y así obtener dos monosacáridos, como por ejemplo la sacarosa. Los monosacáridos y los disacáridos son compuestos muy solubles en agua y la mayoría tiene un sabor dulce. Los polisacáridos son carbohidratos que igualmente se pueden hidrolizar, pero en este caso se obtienen muchas unidades de monosacáridos, por ejemplo el almidón.

Los heterósidos, también llamados glucósidos o glicósidos, son metabolitos secundarios los cuales son el resultado de la unión de uno o varios monosacáridos (osas) con una estructura no glucídica llamada aglucón, algicón o genina. Existen cuatro tipos de heterósidos, los cuales se definen según su tipo de enlace, los cuales son (Wade, Jr. L. G., 2006):

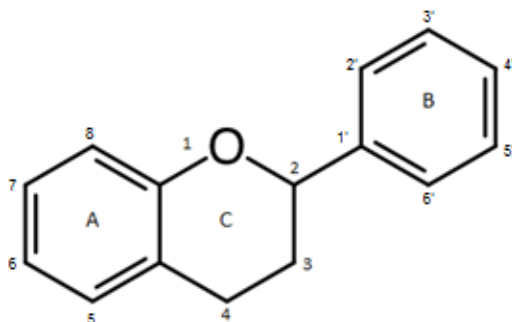
- O-heterósido
- C-heterósido
- N-heterósido
- S-heterósido

Las características estructurales de este tipo de compuestos hacen que la síntesis química de sus derivados sea extremadamente compleja, debido a la gran cantidad de pasos de protección y desprotección que se tendrían que llevar a cabo sobre los grupos hidroxilos, para mantener su configuración.

### 3.7.2. FLAVONOIDES

Los flavonoides se obtienen a partir del metabolismo secundario de las plantas a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos. Tienen un esqueleto básico C6-C3-C6, con dos anillos aromáticos (C6), unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Todos los flavonoides poseen un grupo carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C3 y en el anillo B (Figura 11).

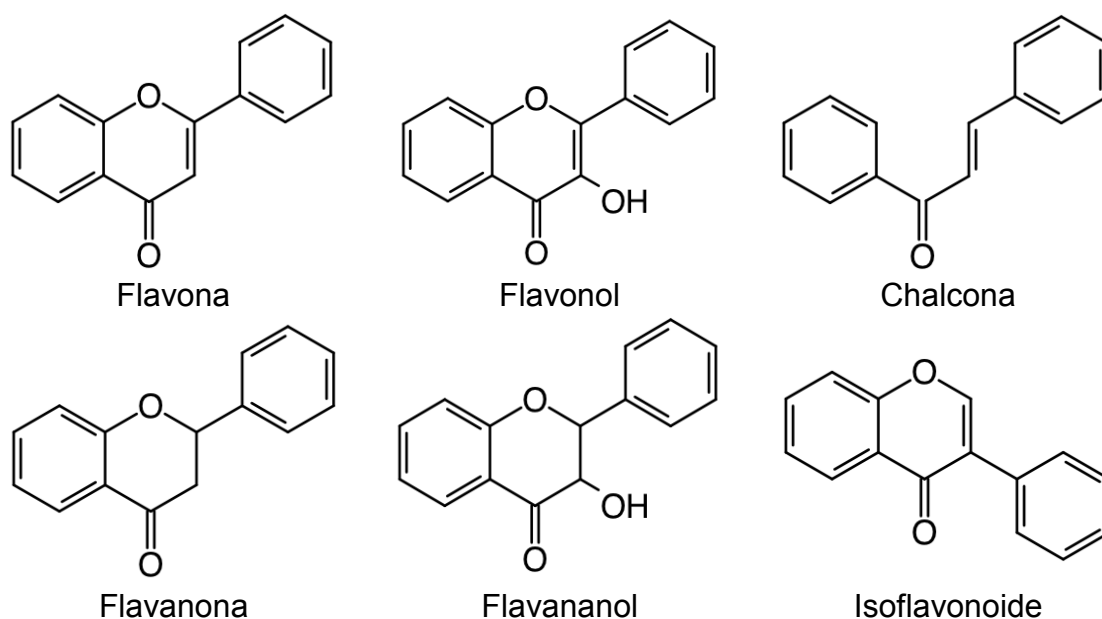
Son compuestos polifenólicos, debido a que tienen estructuras hidroxiladas en el anillo aromático (Kuklinski, C., 2000; Dewick, P. M., 2009).



**Figura 11.-** Estructura general C6-C3-C6 de los flavonoides.

Los flavonoides se clasifican según sus variaciones estructurales (Figura 12):

- a) Con doble enlace entre las posiciones 2 y 3:
  - a. Flavonas: con un hidrógeno en la posición 3.
  - b. Flavonoles: con un grupo hidroxilo en la posición 3.
- b) Sin doble enlace entre las posiciones 2 y 3:
  - a. Flavanonas: con un hidrógeno en la posición 3.
  - b. Flavanoles: con un grupo hidroxilo en la posición 3.
- c) Chalconas: con el anillo C abierto.
- d) Isoflavonoides: con el anillo B en la posición 3
- e) Diflavonoides: dímeros de flavonoides.



**Figura 12.-** Clasificación de flavonoides.

Se pueden encontrar como aglicones libres o en su forma heterosídica como O-heterósido o C-heterósido, unidos generalmente a un monosacárido o un oligosido (disacárido o trisacárido). Siendo los más frecuentes los O-heterósidos, en donde la unión entre la genina y la parte osídica se realiza por los hidroxilos de la genina, principalmente en la posición 3 y 7. Los C-heterósidos son escasos, la unión se realiza entre el carbono anomérico del azúcar y el carbono 6 u 8 de la genina.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, sin embargo en las angiospermas es en donde se encuentra su máxima diversidad estructural, encontrándose principalmente en las hojas, flores y frutos.

Su función en las plantas no se encuentra bien definida, sin embargo algunos de estos son los responsables del color de las flores, antioxidantes, inhibidores enzimáticos y funcionan como pantalla para las radiaciones solares (Rosella, M. *et al.* 2015; Kuklinski, C., 2000; Dewick, P. M., 2009).

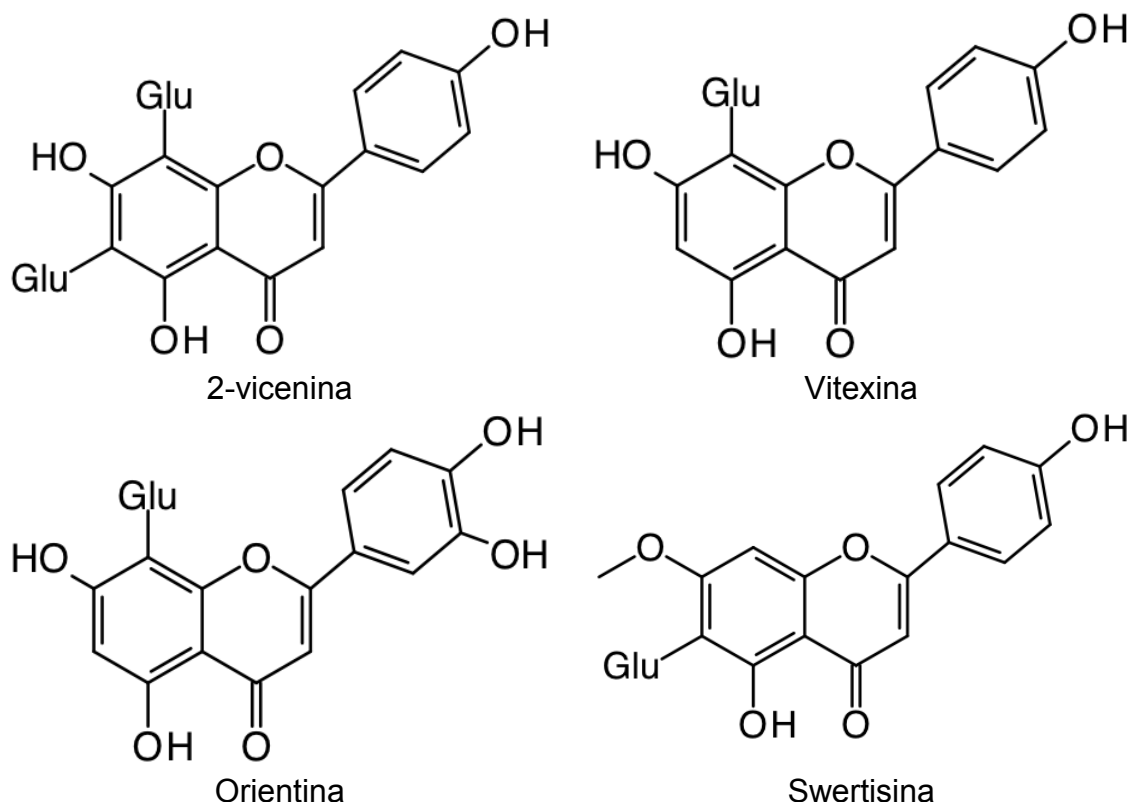
Las diferentes especies que contienen a este grupo de compuestos presentan actividades farmacológicas muy variadas, tales como: acción vitamina P (factor de permeabilidad capilar), antihemorrágicos, antiarrítmicos, protectores de la pared vascular o capilar, antiinflamatorios, captador de radicales libres, antihepatotóxicos, antibacterianos, antivirales, diuréticos, antiurémicos, antihipercolesterolemiantes, antiulcerosos, antitumorales y antiespasmódicos. Algunos ejemplos de las especies que los contienen son: *Sofora japónica*, *Eucalyptus macrorrhyncha*, *Ginkgo biloba*, *Silybum marianum*, *Equisetum arvense*, entre otras (Kuklinski, C., 2000).



### 3.7.3. C-GLICOSILFLAVONOIDES

Los C- glicosilflavonoides encontrados en la fracción obtenida con n-butanol a partir del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jodina rhombifolia* fueron los siguientes C-glicosilflavonoides: vitexina, orientina, swertisina y 2- vicenina (Figura 13), siendo este último el compuesto mayoritario y el posible responsable de la actividad anti-ulcerosa (Montanha, J. A. *et al.*, 2009).

La 2- vicenina es un C-glicosilflavonoide ya que se encuentra glucosilado con el carbono anomérico de la glucosa en las posiciones 6 y 8, además de contar con tres grupos hidroxilo en las posiciones 5, 7 y 4'. Este compuesto fue identificado en la especie *Siphonoglossa sessilis* (Hilsenbeck, R. A. & Mabry, T. J., 1983) y en la *Salvia officinalis* (Lu, Y. & Foo, L. Y., 2000). Además este también se ha encontrado y aislado de la planta *Ocimum Sanctum* Linn, perteneciente a la familia de las Lamiaceae, la cual es ampliamente utilizada en la medicina tradicional india por sus diversas propiedades medicinales. Se ha evaluado su eficacia solo y en combinación con el docetaxol frente a carcinomas de próstata, en el cual se observó que este compuesto solo tiene un efecto antiproliferativo, anti-angiogénico y pro-apoptotico en cierto tipo de células. Co-administrado con el docetaxol se vio que esta combinación es más efectiva que cualquiera de los agentes simples empleados en el tratamiento de cáncer de próstata andrógeno independiente (Nagaprashantha, L. D., *et al.* 2011). Aislados de esta misma especie, la orientina y la 2- vicenina, han mostrado tener un efecto protector sobre linfocitos humanos frente a los efectos clastogénicos de la radiación (Vrinda, B. & Devi, P. U., 2001) Adicionalmente, se ha evaluado su actividad antioxidante y su actividad frente a *Staphylococcus aureus* teniendo una actividad positiva en combinación con otros glicosilflavonoides encontrados en el jugo de *Citrus reticulata* x *Citrus paradisi* (Barreca, D. *et al.*, 2013). En el 2013, Verspohl, E. J. *et al.* estudiaron el efecto antiespasmódico de la 2- vicenina pura y en el extracto acuoso de *Perilla frutescens*, durante este estudio se observó que estos no tiene una actividad antiespasmódica directa si no que estos disminuyen las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de ratas.



**Figura 13.-** Estructura de C-glicosilflavonoides reportados por Montanha, J. A. *et al.* (2009).

En Francia, Bakhriar, A. *et al.* (1990) identificaron a la swertisina y 2-vicenina, junto con otros C-glicosilflavonoides en la corteza de *Galipea Trifoliata*. La swertisina, es un flavonoide que se encuentra C-glucosilado en la posición 6, cuenta con un grupo metoxilo (OCH<sub>3</sub>) en la posición 7 y dos grupos hidroxilos en 5 y 4'. Aquila, S. *et al.* (2009), evaluaron la actividad anti-inflamatoria de la fracción rica en flavonoides, en la cual se identificaron los siguientes compuestos: 2-vicenina, espinosina, isovitexina, swertisina e isoswertisina, obtenida a partir del extracto butanólico de las raíces de *Cayaponia tayuya*, la cual es una especie comúnmente usada en Brasil, Perú y Colombia como anti-inflamatorio y antireumático, durante el experimento se comprobó su actividad inflamatoria por la posible inhibición de las enzimas COX-2 y INOs.

La vitexina se encuentra C-glucosilado únicamente en la posición 8, además de contar con tres grupos hidroxilo en las posiciones 5, 7 y 4'. En el 2013, Can, Ö. D. *et al.* determinaron su efecto a nivel sistema nervioso central y encontraron que la vitexina tiene un comportamiento tipo anti-depresivo mediado por el incremento en los niveles de catecolaminas durante la sinapsis, así mismo por medio de interacciones en los receptores de serotonina, noradrenalina y dopaminérgicos.

La vitexina y la 2-vicenina también se han identificado en el extracto etanólico de la especie *Urtica circularis*, comúnmente empleada para aliviar el dolor en procesos inflamatorios, en donde fueron evaluadas como anti-nociceptivo individualmente y el extracto total con ácido clorogénico y cafeico. En estos ensayos se encontró que el extracto total inhibe la nocicepción, además se encontró cuando fueron evaluados individualmente que la vitexina inhibe en un 91% la nocicepción, mientras que la 2-vicenina mostró una inhibición del 41%, en los modelos evaluados (Gorzalczany, S. *et al.* 2011). En el 2011 en Japón, se identificó la 2-vicenina y vitexina en el extracto etanólico de la especie *Petrosavia sakuraii* (Iwashina, T., *et al.* 2011). Además se ha mostrado que este compuesto tiene una actividad inhibitoria sobre la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés), los cuales al ser acumulados se han visto implicados de forma considerable en los procesos patogénicos de las complicaciones diabéticas, incluyendo neuropatía, nefropatía, retinopatía y cataratas, además de otros desordenes como arteroesclerosis, envejecimiento y Alzheimer (Peng, X. *et al.* 2008), esta misma actividad fue probada para la 2-vicenina aislada de la especie *Artemisia capillaris*, mostrando de igual manera una considerable actividad inhibitoria sobre los AGEs (Islam, M. N., *et al.*, 2014).

La orientina, es un flavonoide que se encuentra C-glucosilado en la posición 8 y tetrahidroxilado en las posiciones 5, 7, 3' y 4'. En el 2007, fue identificado en el jugo de la especie *Saccharum officinarum* por Duarte-Almeida, J. M. *et al.* Posteriormente, Praveena, R. *et al.* (2014) determinaron su actividad antioxidante a partir de la especie *Rhynchosia capitata*. Posteriormente, se evaluó su actividad antitrombótica y antiplaquetaria *in vitro* e *in vivo* junto con la iso-orientina obtenidas a partir de *Vaccinium bracteatum* Thunb, y se encontró que su actividad antitrombótica y en el mejoramiento de la circulación sanguínea se debe a que estas previenen la activación de protein-cinasa C y la movilización de calcio (Lee, W. & Bae, J. S., 2015). En el 2011, se identificó el C-glucosilado orientina en la especie *Potentilla astracana* (Şöhretoğlu, D. & Sterner, O., 2011). Así mismo, se ha encontrado que este compuesto alivia las deficiencias cognitivas y el estrés oxidativo en un modelo *in vivo* con ratones para el Alzheimer (Yu, L., *et al.* 2015). En otro estudio con ratones, se observó que la orientina ejerce un efecto protector sobre las deficiencias cognitivas inducidas por ruido, mejorando el estrés oxidativo central, neurotransmisión e incrementando las sinapsis asociadas a proteínas (Wang, S., *et al.* 2015).

La orientina y vitexina, se han encontrado en las flores de *Trollius chinensis* Bunge perteneciente a las Ranunculaceae, planta utilizada en la medicina china tradicional para el tratamiento de infecciones respiratorias, faringitis, amigdalitis y bronquitis. Se ha evaluado su actividad antiviral frente a la parainfluenza tipo 3, durante este ensayo la orientina mostro tener una actividad potente con una concentración inhibitoria media de 11.7 g/mL y la vitexina una actividad moderada con una concentración inhibitoria media de

---

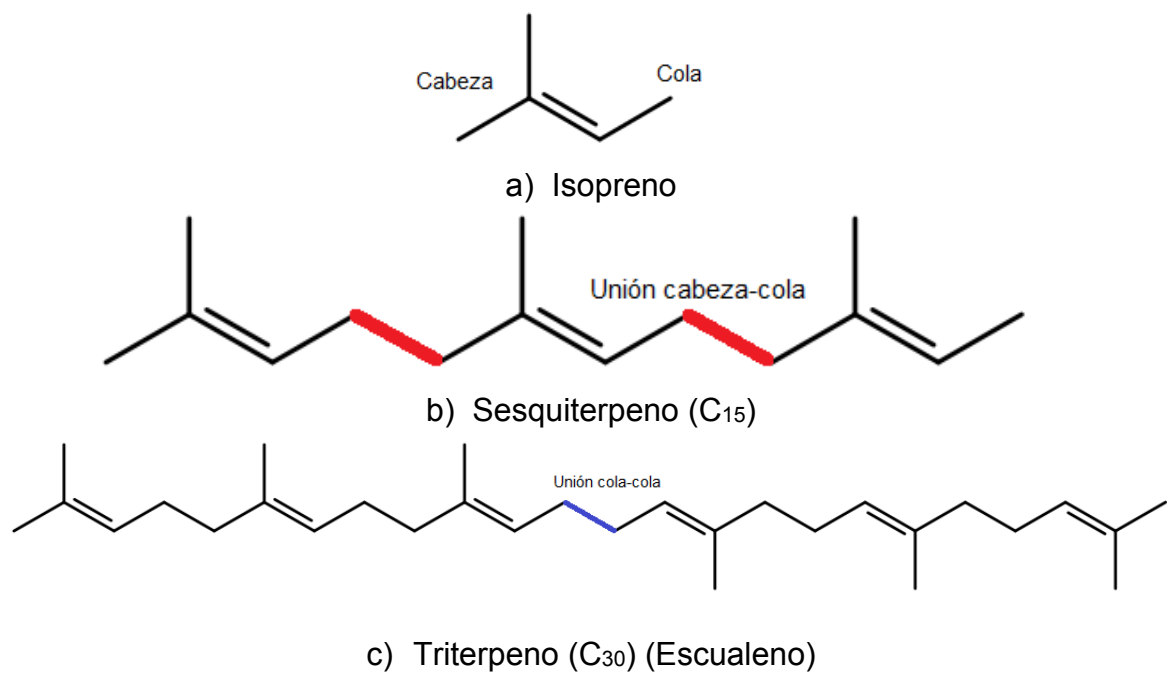
---

20.8 g/mL y valores de SI ( $SI=CC_{50}/CI_{50}$ ) 32.1 y 16.0 respectivamente (Li, Y., *et al.* 2002).

La 2-vicenina, vitexina y orientina también han sido encontrados en las hojas de *Rhynchosia beddomei* (Adinarayana, D., *et al.*, 1980). La 2-vicenina y orientina en combinación han sido estudiadas in-vitro como antimicrobiales contra algunas bacterias que generan infecciones en el tracto urinario en humanos y se encontró un sinergismo activo frente a *Escherichia coli*, *Proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii* y *Klebsiella pneumonia* (Ali, H. & Dixit. S., 2012)

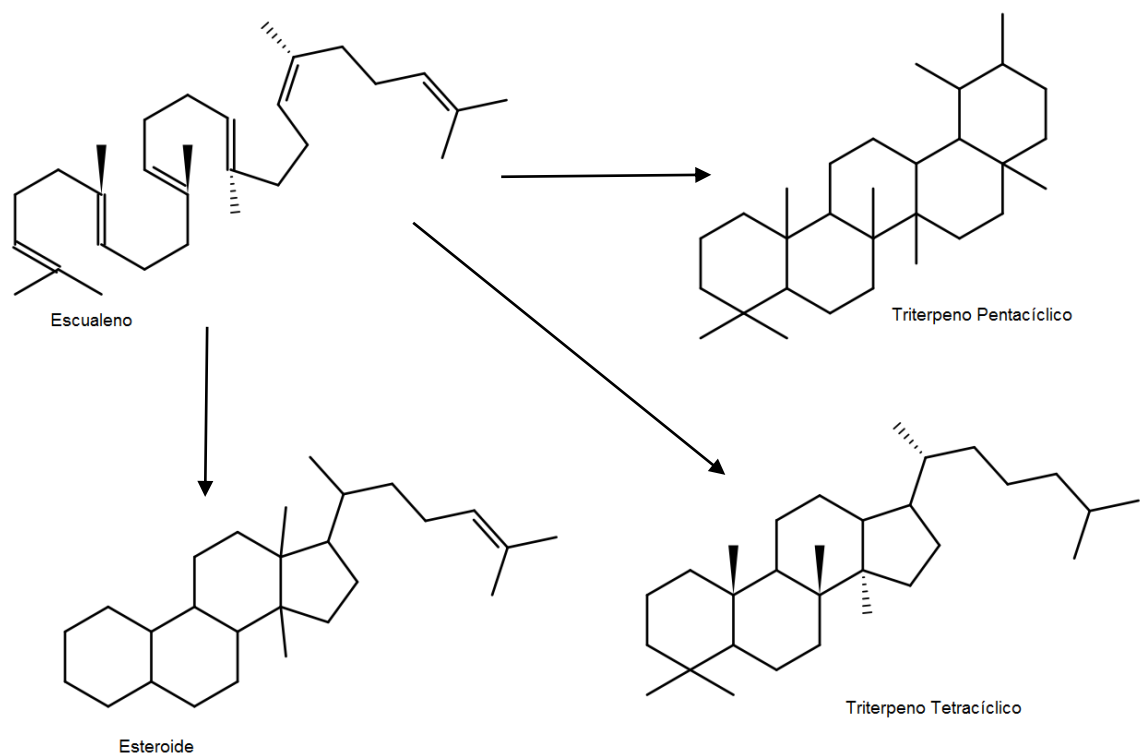
#### 3.7.4. TRITERPENOS, ESTEROIDES Y SAPONINAS

Los triterpenos ( $C_{30}$ ) son moléculas formados a partir de dos sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) por medio de una unión cola-cola, los cuales están compuestos por tres isoprenoides (Figura 14) por medio de uniones cabeza-cola, todos estos son metabolitos secundarios que se forman a partir de la condensación isoprénica o ruta del ácido mevalónico, en la que se incorporan unidades de cinco carbonos ( $C_5$ ). Los compuestos isoprenoides son muy numerosos y de estructuras diversas, se pueden encontrar tal cual o formando estructuras más complejas como por ejemplo saponinas, o en mezclas complejas con aceites esenciales. Algunos compuestos tienen solo una parte de la estructura de naturaleza isoprenoides y se consideran de origen mixto (Kuklinski, C., 2000; Dewick, P. M., 2009).



**Figura 14.-** Estructura química general para: a) Isoprenos, b) Sesquiterpenos, c) Triterpenos.

A partir de la ciclación del escualeno, es que se obtienen los esteroides y triterpenos ya sean tetra- o pentacíclicos (Figura 15).



**Figura 15.-** Obtención de esteroides (C<sub>27</sub>), triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos (C<sub>30</sub>) a partir del escualeno (C<sub>30</sub>).

Las saponinas son heterósidos, estructuras formadas por una parte glucídica y una parte no glucídica también llamado aglicón o sapogenina, que se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se encuentran en una solución acuosa y se agita. La espuma se forma debido a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua, por lo que son tensioactivos naturales.

Según el número de uniones de las unidades glucídicas al aglicón se clasifican en:

- a) Saponinas monodesmosídicas: en donde el o los azúcares se unen únicamente por una posición al aglicón: al hidroxilo de la posición 3.
- b) Saponinas bidesmosídicas: el o los azúcares se unen por dos puntos de unión al aglicón. Estas se clasifican con base a la naturaleza del aglicón en:

- a. Saponinas triterpénicas ( $C_{30}$ ): Se encuentran ampliamente distribuidas principalmente en las raíces y rizomas de las Dicotiledóneas. Tienen diversas actividades farmacológicas como antiinflamatorio, expectorante, antitusivo, cicatrizante, entre otras. Su aglicón está compuesto por 30 átomos de carbono, formado por la unión de seis unidades  $C_5$ . Estas derivan del dammarano y a su vez se subdividen en:

- i. Saponinas triterpénicas pentacíclicas: las cuales son las saponinas más frecuentes, conformadas por cinco anillos de seis átomos de carbono cada uno (Figura 15).
- ii. Saponinas triterpénicas tetracíclicas: las cuales conservan la estructura básica del dammarano con tres anillos de seis átomos de carbono y un anillo con 5 átomos de carbono (Figura 15).

- b. Saponinas esteroídicas ( $C_{27}$ ): son menos comunes que las saponinas triterpénicas pentacíclicas y se emplean como materia prima para la semisíntesis de fármacos esteroídicos, como por ejemplo: hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos) y cortisona. Por lo general se encuentran principalmente en los órganos subterráneos de Monocotiledóneas (Figura 15).

### 3.7.5. *MAYTENUS ILICIFOLIA*, ADULTERANTE CONOCIDO

*Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek, comúnmente conocido como Congorosa, es un árbol perenne, perteneciente a la familia de las Celastráceas. Mide hasta 5 metros de altura, es caracterizado por presentar hojas coriáceas alternas, cortamente pecioladas (1.5 - 5.0 cm), con láminas elípticas de 2 - 7 cm de largo por 1.5 - 3 cm de ancho, con ápice agudo y márgenes dentados espinosos (2 - 7 pares), tiene base redondeada, su haz es de color verde brillante y su envés ligeramente más pálido. Las flores se presentan solas o en fascículos axilares amarillentos, floreciendo en primavera y fructificando en verano. El fruto es una cápsula ovoide rojiza de 1 cm de largo con 1 a 4 semillas rojizas en su interior (Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2005; Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015).



**Figura 16.-** Hojas y frutos de *Maytenus ilicifolia*.<sup>[13]</sup>

Es un árbol originario del sur de Brasil, Uruguay, Bolivia, Paraguay y Argentina, en esta última se encuentra en la región chaqueña, mesopotámica, provincias de la Pampa, Córdoba y nordeste de Buenos Aires. Crece en clima subtropical templado, sobre suelos arcillosos y bien drenados con alto contenido de materia orgánica (mayor de 2%), hasta los 1,200 - 2,000 metros sobre el nivel del mar (Hurrel, J. & Bazzano, D., 2003; Melihno de Magalhaes, P., 2000).

Nombre científico: *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek

Sinonimia: *Maytenus ilicifolia* Reisseck, *Celastrus spinifolium* Larranga, *Maytenus ilicifolia* (Schard.) Planch. (Ratera, E. L. & Ratera, M. O., 1980; Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015).

Nombres populares: congorosa, cangorosa, capororoca, molle espinoso, cancerosa, sombra de toro, quebrachillo, pus.

En portugués: espinheira-santa, cancerosa, cancorosa, sombra-de-touro, erva santa, salva-vidas, coromilho-do-campo (Ratera, E. L. & Ratera, M. O., 1980; Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2005; Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015).

Las hojas poseen diversas aplicaciones en la medicina popular, su infusión se emplea como antiséptica, digestiva, antiespasmódica, antihipertensivo, para dolores articulares, antitumorales, contra el asma, así como también se emplea de forma externa como cicatrizantes y antiséptico. La decocción de las hojas y corteza en Paraguay, son empleadas como anticonceptivo y emenagogo. Aunque su empleo para el tratamiento de la gastritis, dispepsia y úlceras gastroduodenales son las más reconocidas. Actualmente se cuenta con suficiente información clínica y pre-clínica que permite suponer que la congorosa es un agente antiulcerativo de probada eficacia y seguridad terapéutica (de Souza, L. M. *et al.*, 2008; Ratera, E. L. & Ratera, M. O., 1980; Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015).

Debido a las características de la especie, esta ha sido ampliamente estudiada con el paso del tiempo, por lo que en este caso se cuenta con una considerable cantidad de compuestos químicos identificados principalmente en las hojas de la congorosa, algunos de los más destacados de estos son:

- Terpenos: maitenina, isotenginona III, congorosina A y B, 20- $\alpha$ -hidroximaitenina, 22- $\beta$ -hidroximaitenina, celastrol, pristimerina, ácido maitenoico, ácido salasperónico, friedelina y friedelan-3 $\beta$ -ol,  $\alpha$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol, campesterol, colesterol, escualeno, estigmasterol, brasicasterol, simiarenol, lupeol, lupenona, maitenoquinona,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina, cangoronina, ilicifolina, eritrodiol y maitefolinas A, B y C (Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015; Itokawa, H. *et al.*, 1990; Marçal da Costa, P. *et al.*, 2008; Queiroga, C. L. *et al.*, 2000; Vistuba, J. P. *et al.*, 2013).
- Polifenólicos: predominan los derivados de quercetina y kaempferol, leucoantocianidinas, ácido tánico, catequina, epicatequina, 4-O-metilepigalocatequina y 4'-O-metil-entgalocatequina (Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015; Crestani, S. *et al.*, 2009; de Souza, L. M. *et al.*, 2008; de Souza, L. M. *et al.*, 2009; Soares, L. A. L., *et al.*; 2004; Tiberti, L. A. *et al.*, 2007).
- Alcaloides: maitansina, maitanprina y maitanbutina (Ashmed, M. S. *et al.*, 1981).
- Otros compuestos: Ilicifolinosido A, B y C, ácido poligalacturónico y otros glicosilflavonoles (Cipriani, T. R. *et al.*, 2008; Cipriani, T. R. *et al.*, 2009; Zhu, N. *et al.*, 1998). Como compuestos volátiles se han reportado el ácido dodecanoico y geranilacetato (Mossi, A. J. *et al.*, 2004).



Adicionalmente, también se han evaluado diversas de actividades farmacológicas para las hojas de esta misma especie tales como: actividad antiulcerosa (Cipriani, T. R. *et al.*, 2008; Cipriani, T. R. *et al.*, 2009), antiinflamatorio, antiulceroso y antinociceptivo (Jorge, R. M. *et al.*, 2004), actividad hipotensora (Crestani, S. *et al.*, 2009), actividad relajante de musculo liso del cuerpo cavernoso en puercos (Hnatyszyn, O. *et al.*, 2003), antioxidante (Fonseca de Oliveira, J. *et al.*, 2000; Melo, S. F. *et al.*, 2001), actividad uterotónica (Montarani, T. & Bevilacqua, E., 2002), efecto protector de mucosa gástrica (Baggio, C. H. *et al.*, 2007), movilidad gastrointestinal (Baggio, C. H. *et al.*, 2009), vasorelajación en aorta de rata (Rattmann, Y. D. *et al.*, 2006), actividad diurética e hipotensora (Leme, T. S. V. *et al.*, 2013), y sobre algunas líneas tumorales (Graham, J. G. *et al.*, 2000), teniendo en estos casos una actividad farmacológica favorable.

Los estudios clínicos que se han realizado para este especie son para su actividad antiulcerosa y anticancerígena, además de contar con ensayos toxicológicos en animales y humanos (Alonso, J. & Desmarchelier, C. 2015).

Además de las actividades ya descritas, cuando esta se presenta molida o en polvo, suele emplearse como adulterante de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) y esta a su vez se ve adulterada frecuentemente por: *Maytenus aquifolia*, *Maytenus robusta*, *Jodina rhombifolia*, *Sorocea bonplandii*, *Citronella congonha* y *Zollernia ilicifolia* (Henriquez, A. *et al.* 2001; Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015).

El uso de las hojas de esta especie se encuentra inscripta en la Farmacopea Brasileira. Sin embargo, aún no se encuentra en la Farmacopea Argentina; aunque en el 2003, fue aprobada como agente antiulceroso en Atención Primaria de la Salud en la Provincia de Misiones, Argentina (Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015; Farmacopea Brasileira, 2010; Farmacopea Argentina, 2013).

Debido al fuerte incremento en el consumo de las hojas de esta especie en los últimos años, se ha desarrollado de forma importante su cultivo. En el 2000, Melihno de Magalhaes, P. presento una descripción detallada sobre dicho proceso, partiendo de las semillas obtenidas del fruto, la cual es su forma común de multiplicación.

### **3.8. FACTORES AMBIENTALES Y BIOLÓGICOS QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

Los metabolitos secundarios dependen factores tanto ambientales como biológicos a los que está expuesta la planta, entre los cuales se destacan:

- Ritmos de día –noche
- Zona geográfica: Tipo de suelo, altitud
- Edad fisiológica de los tejidos
- Estado de desarrollo de la planta madre
- Genotipo
- Factores externos: Clima, humedad
- Estrés biótico y abiótico

### **3.9. EXPERIENCIAS ANTERIORES SOBRE DE JODINA RHOMBIFOLIA**

#### **3.9.1. ACTIVIDADES Y EFECTOS EVALUADOS**

- Efecto insecticida frente a *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera, Noctuido)

Se evaluó el extracto etanólico (70%) y los extractos acuosos obtenidos por medio de extracción con fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>) a diferentes presiones obtenidos a partir de las hojas de *Jodina rhombifolia*. Para el extracto etanólico se obtuvo un 31% de mortalidad frente a *Spodoptera frugiperda*, mientras que para el extracto acuoso obtenido a 250 bar se obtuvo un 97% de mortalidad con una concentración de 0.00472 g/mL del extracto seco, siendo altamente eficiente para el control de dicha plaga (Soares, P; 2013).

- Efecto antibacterial

Soberón, J. R. *et al.* (2007), evaluaron la actividad antibacterial y citotoxicidad de la infusión, decocción y tintura de las hojas de *Jodina rhombifolia*, esto se evaluó por medio de diluciones con agar en cajas de Petri y caldo nutritivo en platos. La citotoxicidad se evaluó por medio del test de *Artemia salina* y se compararon frente a cinco antibióticos comerciales.

En el ensayo de Macrodilución, la tintura tuvo actividad frente a todas las cepas evaluadas las cuales fueron, Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Morganella morganii*; Gram-positivas: *Staph. aureus*, *Staph. aureus coagulase-negativo meticilin-sensible*, *Enterococcus faecali* y *Enterococcus faecium*. La infusión y decocción, también mostraron un amplio efecto antibacterial con esta prueba, por lo que posteriormente se evaluó con el test de Microdiluciones.

En el test de Microdiluciones, los extractos acuosos se mostraron activos únicamente frente a las siguientes bacterias tipo gram negativo: *Acinetobacter freundii*, *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens*. Mientras que la tintura tuvo una mejor actividad frente a *Acinetobacter freundii* que la cefotaxima, aunque esta también tuvo un espectro antibacterial reducido.

Por medio del ensayo de citotoxicidad se obtuvo la dosis letal media para los diferentes preparados, las cuales fueron: decocción = 816 µg/mL, infusión = 418 µg/mL y para la tintura = 52 µg/mL. La actividad se le atribuyó a la presencia de glicosilflavonas.

En el 2014, Soberón, J. R. *et al.*, evaluaron nuevamente el extracto acuoso de la especie, en esta ocasión frente a *Pseudomonas syringae*, y se determinó su concentración mínima inhibitoria con 312 µg/mL.

Lizarraga, E. *et al.* (2006), evaluaron la actividad antibacterial de los compuestos fenólicos extraídos de las hojas de *Jodina rhombifolia* con 80% y 50% de etanol, frente a las siguientes cepas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y las siguientes bacterias aisladas de muestras clínicas: *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella thiphymurium*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis*, por el medio de difusión radial y producción de biofilm con *S. epidermidis*.

En este caso se encontró que el extracto fue efectivo frente a bacterias tipo Gram-positivo y mostró una actividad inhibitoria en la formación de biofilm de *S. epidermidis* a 20 mg/mL.

- Efecto anti-úlceras

Montanha, J. A. *et al.* (2009), evaluaron la actividad anti-úlceras gástrica *in-vivo* con el modelo de ácido clorhídrico/etanol y analizaron químicamente la fracción del extracto activo obtenido de las hojas de la especie.

Durante el experimento se encontró que la administración oral de los extractos hidroetanólico y acuoso, llevaban a una disminución significativa en el índice de úlceras. Siendo más efectivo el extracto hidroetanólico, para el cual se observó una inhibición en la formación de úlceras en un 25% y 27.5% en ratas tratadas con 250 y 750 mg/kg, respectivamente, teniendo así una actividad similar a la ranitidina.

A partir de la fracción obtenida con n-butanol del extracto hidroetanólico, se obtuvieron las siguientes C-glicosilflavonas: vitexina, orientina, swertisina y 2-vicenina, siendo este último el compuesto mayoritario y el posible responsable de la actividad anti-ulcerosa.

- Actividad anti-proliferativa en Leucemia Mieloide aguda y Linfoma Daudi.

En el 2011, Nachtigal, G. C. evaluó el efecto de los extractos acuoso y metanólico de las hojas de *Jodina rhombifolia*, sobre las líneas hematopoyéticas de proliferación celular responsables de la Leucemia Mieloide aguda y Linfoma Daudi, evaluándolo por medio del control de fibroblastos en cada una de las líneas de estudio.

Para el caso de la Leucemia Mieloide, se encontró que el extracto con mayor inhibición de la proliferación celular y mayor promotor de muerte celular, a menor concentración fue el extracto metanólico, en dicho extracto se encontraron los siguientes compuestos como posibles responsables de dicha actividad: éster de ácido mirístico, éster de ácido esteárico, éter de ácido oleico, éster de ácido linoleico y éter de ácido linolénico. El extracto acuoso también se mostró activo frente a esta línea celular pero a concentraciones más elevadas (600 µg/mL). Mientras que para el caso del Linfoma Daudi el extracto acuoso se mostró más activo inhibiendo la proliferación celular y favoreciendo la muerte celular con una concentración de 41.09 µg/mL, mientras que el extracto metanólico requirió de 55.90 µg/mL para lograr dicho efecto.

- Actividad antitumoral

Maciel da Silva, V. (2009), evaluó la actividad citotóxica de varias fracciones obtenidas del extracto metanólico de las hojas de *Jodina rhombifolia*, sobre la línea celular de tumores mamarios y el aumento de la actividad específica. El análisis químico parcial reveló que los componentes principales de las fracciones con un valor de inhibición significativo contenían esteres metílicos de ácidos grasos (éster de ácido mirístico, éster metílico del ácido esteárico, éster de ácido oleico, éster de ácido linoleico y de éster de ácido linolénico).

El extracto de metanol posee actividad antineoplásica y antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7. Así mismo, también ha mostrado mantener el desarrollo normal y / o promover el crecimiento de las células sanas, el linaje de fibroblastos NH / 3T3 buscado.

Probado en otras líneas de células tumorales, por el mismo autor, el extracto crudo de metanol de *Jodina rhombifolia*, el cual mostró actividad antineoplásica cuando se enfrentan las células tumorales de cáncer oral (KB), pero no presentó resultados interesantes sobre la línea de cáncer de cuello uterino (HT29).

- Reducción en el consumo de alcohol

En el 2015, Teves, M. R. *et al.* evaluaron la actividad antialcohólica del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Jodina rhombifolia* en ratas macho Wistar. Durante el experimento las ratas se mantuvieron en cajas individuales de plástico y tuvieron acceso ilimitado las 24 horas del día por 10 días a agua y a una solución con un 20% de etanol. A las ratas se les administró intragastricamente dos veces al día por 10 días (1mL/200 g), agua destilada (control vehículo) o una de las dosis del extracto acuoso liofilizado (125, 250 y 500 mg/Kg). Se realizaron medidas diarias de peso corporal e ingesta de etanol, agua y alimento.

En este experimento se encontró que hay un efecto reductor del extracto acuoso liofilizado sobre la ingesta de alcohol, el cual fue puesto en evidencia desde el primer día del experimento y se mantuvo a lo largo de este. (Consumo promedio de etanol para las ratas tratadas con agua fue de  $6,74 \pm 0.18$  g/Kg por día, mientras que para las ratas tratadas con 125, 250 y 500 mg/Kg del extracto fue de  $3.55 \pm 0.20$ ,  $2.43 \pm 0.12$  y  $2.38 \pm 0.13$ g/Kg, equivalente a una reducción de ingesta de etanol del 47%, 64% y 65% respectivamente.

También se encontró que el tratamiento no afectó la ingesta diaria de agua ni aumentó el peso corporal. Sin embargo, sí aumentó la ingesta de alimento en las ratas tratadas con el extracto.

### **3.9.2. CULTIVO *IN VITRO***

Existe poca información sobre la especie objeto de éste trabajo y fundamentalmente en lo referido a su propagación vegetativa y conservación. Se encontró únicamente un artículo sobre el uso de técnicas de cultivo *in vitro* de *Jodina rhombifolia*, en el cual fueron empleados como explantos los tallos y los brotes florales y no se logró observar la regeneración de los tejidos bajo las condiciones probadas debido a oxidación y contaminación de los explantos (Kaiper, C., *et al.* 2010).

Sin embargo, esta información reportada y las descripciones tanto sistemáticas como botánicas de la especie, fueron el punto de partida y orientación general para la investigación del cultivo *in vitro* para la obtención de callos.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la incidencia que tienen las úlceras a nivel mundial, las diversas actividades biológicas mostradas por la *Jodina rhombifolia*, la complejidad química de los extractos evaluados, y a que dichas actividades biológicas son resultado de la sinergia de varios compuestos presentes en las hojas de dicha especie, por tal motivo se propone encontrar un medio de cultivo *in vitro* que nos permita la obtención de callos a partir de las hojas de *Jodina rhombifolia* con la finalidad de obtener los principios activos responsables de dicha actividad, de una forma constante, directa y de menor impacto ambiental.

## 5. HIPÓTESIS

De acuerdo a los estudios realizados por Montanha, J. A. *et al.* (2009), para determinar la actividad antiulcerosa de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. (Reissek) junto con la identificación de los compuestos posiblemente responsables de dicha actividad; los estudios realizados por Abedini, W. *et al.* (2000) para la micropropagación *in vitro* de especies forestales y el uso de biotécnicas para la obtención de metabolitos secundarios con actividad farmacológica, se hipotetiza que es posible la obtención de C-glicosilflavonas a partir del cultivo *in vitro* de callos para las hojas de la especie *Jodina rhombifolia* Hook et Arn (Reissek).



## 6. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue la obtención de callos *in vitro* a partir de las hojas de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. y la identificación de C-glicosilflavonas, posibles responsables de la actividad Anti-úlceras de la especie.

### 6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la adecuada selección de material vegetal y su estado vegetativo para emplear como explanto.
- Lograr de una adecuada desinfección del material vegetal para realizar el cultivo *in vitro*.
- Obtener callos a partir de las hojas de *Jodina rhombifolia*.
- Extraer y caracterizar flavonoides en *Jodina rhombifolia*.
- Identificación de C-glicosilflavonas en *Jodina rhombifolia* por medio de Cromatografía en Capa Fina.
- Comparación de perfiles cromatográficos de las hojas de *Jodina rhombifolia* en diferentes estados vegetativos y su comparación con los callos obtenidos.
- Extracción y caracterización de triterpenos, esteroides y saponinas en *Jodina rhombifolia* en comparación con drogas vegetales adulterantes o comercializadas bajo el mismo nombre vulgar (*Maytenus ilicifolia*).
- Establecer un perfil cromatográfico de compuestos triterpénicos para *Jodina rhombifolia* en comparación con drogas vegetales adulterantes o comercializadas bajo el mismo nombre vulgar (*Maytenus ilicifolia*).

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. MATERIAL VEGETAL

#### - Cultivo *in vitro*

Se realizó la recolección del material vegetal con un año de crecimiento de la planta madre de *Jodina rhombifolia* para la obtención de callos del “Jardín Botánico y Arboretum Carlos Spegazzini” de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP, en la ciudad de La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

La recolección del material juvenil e intermedio, se realizó con el inicio de la primavera sobre ramas maduras recolectadas a finales del invierno y principio de la primavera, las cuales generaron nuevos brotes.

#### - Análisis de grupos funcionales

Se realizó la recolección del material vegetal de *Jodina rhombifolia* (hojas maduras) para la obtención de los extractos vegetales a finales de febrero del 2015, del “Jardín Botánico y Arboretum Carlos Spegazzini”. La recolección del material juvenil e intermedio (tallos y hojas) se realizó a mediados de octubre del mismo año. En ambos casos, el material vegetal recolectado fue lavado con agua corriente y secado, estufa DALVO modelo CHRI, a 50°C hasta obtener un peso constante.

Con el material vegetal de *Maytenus ilicifolia*, se realizó el mismo procedimiento ya descrito sin embargo esta fue recolectada a inicios de julio del 2015. Se depositó una muestra de los especímenes en el Herbario LPAG con la clave de referencia Caraballo #1(LPAG 1070) y Caraballo #2(LPAG 1070), para la *Jodina rhombifolia* y *Maytenus ilicifolia*, respectivamente.

Para los callos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de tallos juveniles de *Jodina rhombifolia* fueron secados, estufa DALVO modelo CHRI, a 50°C hasta obtener un peso constante, al tener de 9 a 10 semanas de cultivo.

## 7.2. TIPO DE EXPLANTOS Y DESINFECCIÓN

Se emplearon explantos extraídos de tallos maduros de un año de crecimiento (secciones nodales (1.2 - 2.0 cm)) y hojas (secciones en promedio 1.0 x 1.5 cm) durante los meses de febrero - agosto. Las hojas fueron desinfectadas superficialmente, y posteriormente fueron cortadas en condiciones de aire estéril, en la cámara de flujo laminar (Marca CASIBA), en tiras horizontales con respecto a la nervadura principal, removiendo sus espinas. Se realizaron 34 experimentos probando la desinfección de las hojas (Tabla 4) (1004 explantos, desinfecciones 1-21) y 11 experimentos para la desinfección de tallos (39 explantos, desinfecciones 10-19), durante estos se probaron 21 formas diferentes de desinfección y, las cuales se presentan descritas en la Tabla 4, según el orden en que fueron aplicadas las distintas etapas:

- a) Con y sin lavado manual del material vegetal con jabón blanco. Este comprende 10 pasadas del cepillo con jabón blanco por haz y 10 pasadas por el envés, los cuales se realizan del peciolo hacia el ápice.
- b) Con y sin fungicida líquido Captan Ando Flo, con agitación manual a varias concentraciones y por diferentes tiempos.
- c) Solución de fungicida con y sin gotas adicionales de tensioactivo Dextran.
- d) Con y sin el empleo de antibióticos (Agri-micina y Tetraciclina) dentro y fuera del flujo laminar, con agitación manual.
- e) Con y sin el empleo de disoluciones de alcohol 96° (comercial), a diferentes concentraciones y tiempos, con agitación manual.
- f) Diferentes concentraciones de soluciones de lavandina. Preparadas con lavandina comercial (25 g/L de Cloro activo), con agitación manual.
- g) Condiciones de oscuridad total con papel de aluminio y fotoperiodo tanto natural como artificial en la cámara de incubación, con condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz – 8 horas oscuridad, con una irradiancia próxima de  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$ . Con una temperatura fija de  $20 - 22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  y una humedad al 100%.

En general para todos los métodos de desinfección de hojas y tallos maduros con un año de crecimiento, se aplicaron las siguientes condiciones de uso a menos que se especifique lo contrario:

- Todos los explantos fueron enjuagados tres veces con agua estéril en un ambiente de aire estéril dentro del flujo laminar, sin embargo la duración de este primer lavado por lo general fue de dos minutos.
- Todos los explantos se mantuvieron en agua estéril durante la realización de los cortes y siembra de los mismos en el medio de

aislamiento. La mayoría de los cortes se realizaron en una caja de Petri estéril sin agua.

**Tabla 4.-** Desinfecciones probadas sobre el material vegetal maduro de *Jodina rhombifolia*.

Desinfección	Etapas realizadas fuera del flujo laminar						Etapas realizadas dentro del flujo laminar				Incubación	
	Jabón Blanco	Captan	Antibiótico	Alcohol	Lavandina	2 min con Agua estéril	Antibiótico	Corte	Luz	Temperatura		
1	-	1 noche	-	70% 3 min	20% 20 min	-	-	Seco	No	Ambiente		
2	-	1 noche	-	70% 3 min	25% 20 min	-	-	Seco	No	Ambiente		
3	Si	1 noche	-	70% 3 min	20% 20 min	Si	-	Seco	No	Ambiente		
4	Si	1 noche	-	70% 3 min	25% 20 min	Si	-	Seco	No	Ambiente		
5	Si	1 noche	-	-	15% 20 min	Si	-	Seco	No	Ambiente		
6	Si	1 noche	-	-	20% 20 min	Si	-	Seco	No	Ambiente		
7	Si	1 noche	-	-	25% 20 min	Si	-	Seco	No	Ambiente		
8	Si	4 h	Agrimicina	-	20% 20 min	Si	-	Seco	No	Ambiente		
9	Si	4 h	Agrimicina	-	25% 20 min	Si	-	Seco	No	Ambiente		
10	Si	2 h	Tetraciclina	70% 30 s	15% 20 min	Si	Tetraciclina	Seco	No	Ambiente		
11	Si	2 h	Tetraciclina	70% 30 s	20% 20 min	Si	Tetraciclina	Seco	No	Ambiente		
12	Si	2 h	Tetraciclina	-	15% 20 min	Si	Tetraciclina	Seco	No	Ambiente		
13	Si	2 h	Tetraciclina	-	20% 20 min	Si	Tetraciclina	Seco	No	Ambiente		

Desinfección	Etapas realizadas fuera del flujo laminar						Etapas realizadas dentro del flujo			Incubación	
	Jabón Blanco	Captan	Antibiótico	Alcohol	Lavandina	2 min con Agua estéril	Antibiótico	Corte	Luz	Temperatura	
14	Si	2 h*	Tetraciclina	70% 30 s	15% 20 min	Si	Tetraciclina	Seco	No	Ambiente	
15	Si	2 h*	Tetraciclina	70% 30 s	20% 20 min	Si	Tetraciclina	Seco	No	Ambiente	
16	Si	2 h**	Tetraciclina	70% 30 s	15% 20 min	Si	Tetraciclina	Seco	No	Ambiente	
17	Si	2 h**	Tetraciclina	70% 30 s	20% 20 min	Si	Tetraciclina	Seco	No	Ambiente	
18	-	-	-	-	30% 10 min	-	-	Agua	No	Ambiente	
19	Si	-	-	-	20% 20 min	Si	-	Seco	No	Ambiente	
20	Si	-	-	-	20% 20 min	Si	-	Seco	No	Cámara	
21	Si	-	-	-	20% 20 min	Si	-	Seco	Si	Cámara	

\*Solución de fungicida Captan Ando Flo al 0.01%v/v con 2 gotas de tensioactivo. \*\* Solución de fungicida Captan Ando Flo al 0.006%v/v con 2 gotas de tensioactivo.

Con el inicio de la primavera, se emplearon brotes foliares de tallos con y sin hojas (secciones nodales 1.2 – 2.0 cm), hojas enteras en estado juvenil y hojas cortadas por la mitad en estado intermedio (0.5 – 1.2 cm), para estos el método de desinfección consistió en un enjuague con agua corriente de las ramas cortadas y se mantuvieron en agua corriente por unos días. Posteriormente, se les asperjo con una solución del fungicida Benomyl al 2%. Días después, los brotes foliares fueron cortados y colocados directamente en una solución de agua tridestilada con 10 enjuagues del cepillo con 10 pasadas por jabón blanco, el material vegetal se mantuvo en esta solución por 4 minutos con agitación manual. Posteriormente, se pasan a una solución al 3% de lavandina comercial (25 g/L de cloro activo) con agua tridestilada por 3 minutos con agitación manual. Bajo condiciones de aire estéril dentro del flujo laminar, estas fueron enjuagadas tres veces con agua estéril. El primero de estos enjuagues duró dos minutos con agitación manual. Los explantos se mantuvieron en agua durante la realización de los cortes y siembra. Después de haber sido cortados los explantos, estos se pasaron sobre papel estéril o gasas estériles para eliminar su exceso de agua. Las variables en estos casos fueron:

- Los cortes de las hojas y tallos, se realizaron en cajas de Petri con y sin agua estéril.
- Los explantos sembrados se mantuvieron en la cámara de incubación con calidades y cantidades de luz diferentes: luz y semi-oscuridad.

Quedando con los experimentos mostrados a continuación en la Tabla 5, para hojas, sección nodales provistas y desprovistas de hojas.

**Tabla 5.-** Métodos de desinfección probados con el material vegetal juvenil e intermedio de *Jodina rhombifolia*.

Desinfección	Etapas realizadas fuera del flujo laminar		Etapas realizadas dentro del flujo laminar		Incubación
	Jabón blanco	Lavandina	2 min con Agua estéril	Corte	Luz
1	Si	3% 3 min	Si	Agua	Si
2	Si	3% 3 min	Si	Agua	Semioscuridad
3	Si	3% 3 min	Si	Seco	Si
4	Si	3% 3 min	Si	Seco	Semioscuridad

### 7.3. MEDIOS DE CULTIVOS Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Se empleó el medio de cultivo general de Murashige & Skoog (1962) al 100%, 50% y 25% de su concentración de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y sacarosa, con distintos tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento (auxinas): ANA (1 ppm), 2,4-D (0.5, 1, 2 y 5 ppm), ANA con IBA (cada uno a 1.5 ppm) e IBA (1 ppm).

#### - Solución Madre de Murashige & Skoog (1962) X 10

La solución salina de Murashige & Skoog (1962) se prepara de la siguiente manera:

**Tabla 6.-** Composición de la solución Murashige & Skoog (1962).

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
<b>a) Macronutrientes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nitrato de amonio: 16.50 g/L</li> <li>- Nitrato de potasio: 19.00 g/L</li> <li>- Cloruro de calcio dihidratado: 4.40 g/L</li> <li>- Sulfato de magnesio heptahidratado: 3.70 g/L</li> <li>- Fosfato de potasio: 1.70 g/L</li> </ul>
<b>b) Micronutrientes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido bórico: 0.062 g/L</li> <li>- Sulfato de Manganeso tetrahidratado: 0.223 g/L</li> <li>- Sulfato de zinc tetrahidratado: 0.086 g/L</li> <li>- Yoduro de potasio: 0.0083 g/L</li> <li>- Molibdato de sodio dihidratado: 0.0025 g/L</li> <li>- Sulfato de cobre hexahidratado: 0.00025 g/L</li> <li>- Cloruro de cobalto hexahidratado: 0.00025 g/L</li> </ul>
<b>c) Quelato de hierro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0.373 g de EDTA disódico</li> <li>- 0.278 g de Sulfato de hierro heptasódico</li> </ul>
<b>d) Vitaminas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glicina 0.020 g/L</li> <li>- Ácido Nicotínico 0.005 g/L</li> <li>- Tiamina 0.001 g/L</li> <li>- Piridoxina 0.005 g/L</li> </ul>

\*Las soluciones se conservan en la heladera. \*\*El *myo*-inositol se agrega directamente al preparar el medio de cultivo 1 g/L.

- **Soluciones de Reguladores de Crecimiento**

**a) Solución de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 20 ppm**

Se pesó 20 mg de 2,4-D y se disolvió con unas gotas de dimetilsulfóxido. Posteriormente, este se diluyó con 1 L de agua bidestilada. Finalmente, se envasó, rotuló y colocó en la heladera.

**b) Solución de Ácido indol-3-butírico 20 ppm**

Se pesó 20 mg de IBA y se disolvió con unas gotas de alcohol 96°. Posteriormente, este se diluyó con 1 L de agua bidestilada. Finalmente, se envasó, rotuló y colocó en la heladera.

**c) Solución de Ácido Naftalenoacético (ANA) 20 ppm**

Se pesó 20 mg de ANA y se disolvió con unas gotas de alcohol 96°. Posteriormente, este se diluyó con 1 L de agua bidestilada. Finalmente, se envasó, rotuló y colocó en la heladera.

- **Medios de Cultivo**

**a) Medio de aislamiento**

En un frasco de 600 mL se adicionaron 450 mL de agua tridestilada y 15 g de D(+) sacarosa de la marca Biopack Higroscópico. Posteriormente, se aforó a 500 mL y se agitó con una varilla de vidrio hasta que la sacarosa se disolvió completamente. A continuación, se agregó 3.25 g de Agar Soriano, el cual se disolvió por agitación y calentamiento en un microondas Daenyx en dos ciclos de dos minutos y un ciclo de un minuto.

Una vez disuelto el agar, el medio se dispuso en frascos y/o tubos. Los cuales posteriormente fueron cubiertos con papel de aluminio y ligas de plástico y son colocados dentro del autoclave a 120°C y 1 atm de presión por 20 minutos.

**b) Medio para inducir la formación de callo**

En un frasco de 600 mL se adicionaron 50 mL de agua tridestilada y 15 g de D(+) sacarosa de la marca Biopack Higroscópico y se mezcló con una varilla de vidrio. Posteriormente, se adicionaron: 50 mL de la solución de macronutrientes, 50 mL de la solución de micronutrientes, 50 mL de la solución de vitaminas, 50 mL de la solución de quelato de hierro. Se incorporaron 0.0001 g de *myo*-inositol y el volumen necesario de la solución de hormonas a 20 ppm que se quiso emplear, agitando con una varilla de vidrio. Se aforó a



500 mL con agua tridestilada y se ajustó el pH entre 5.8 - 6.2, con gotas de la solución de hidróxido de sodio 1N.

Una vez ajustado el pH, se agregaron 3.25 g de Agar Soriano, el cual se disolvió por agitación y calentamiento en un microondas Daenyx en dos ciclos de dos minutos y un ciclo de un minuto.

Posteriormente, el medio se dispuso en frascos y/o tubos. Los cuales finalmente fueron cubiertos con papel de aluminio y ligas de plástico para ser colocados dentro del autoclave a 120°C y 1 atm de presión por 20 minutos.

### - CONDICIONES DE INCUBACIÓN

La condición de luz en la cámara de incubación consistió en un fotoperíodo de 16 horas luz – 8 horas oscuridad, con una irradiancia próxima de 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$ . Las condiciones de semi-oscuridad consistieron en un fotoperíodo de 16 horas luz – 8 horas oscuridad, con una irradiancia próxima entre 0.003 y 0.012  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$ . Estas se emplearon principalmente durante la etapa de aislamiento de tallos y hojas en estado juvenil e intermedio.

Mientras que para la condición de oscuridad, los frascos y cajas fueron cubiertos con papel de aluminio. Esto fue realizado para el aislamiento de las hojas maduras y explantos en medio de inducción con 2,4-D en todas las concentraciones probadas.

En todos estos casos se mantuvo la temperatura fija entre a 20 - 22°C  $\pm$  2°C, con una humedad del 100%.



a)

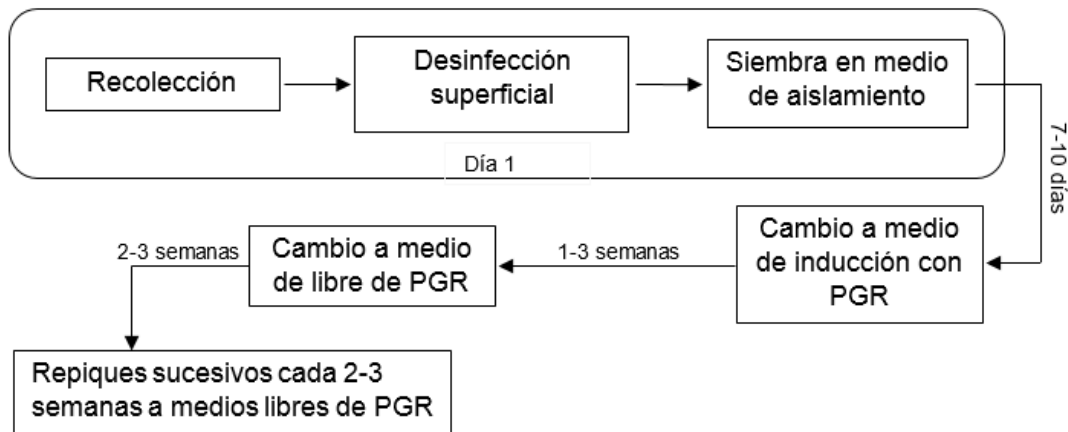


b)

**Figura 17.-** a) Flujo laminar (Marca CASIBA) y b) Cámara de incubación.

#### 7.4. ETAPAS PARA LA FORMACION DE CALLOS EN CULTIVO *IN VITRO*

A modo general, en la siguiente figura se presentan las diferentes etapas que sigue el material vegetal para la formación de callos por medio del cultivo *in vitro*:



**Figura 18.-** Etapas del cultivo *in vitro* para la obtención de callos.

#### 7.5. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE CALLOS

Se observaron los callos obtenidos a partir de las secciones nodales en un microscopio electrónico Micros – Olympus (modelo CX22led) con los siguientes aumentos: 40x, 100x y 400x. Para esto se cortó una pequeña fracción de un callo obtenido y se colocó sobre un portaobjetos, en donde se le agregó 1 - 2 gotas de agua, se cubrió con un cubreobjeto y se observó con el equipo.

#### 7.6. EXTRACCIÓN Y REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOIDES

##### - Obtención de extractos

Se trituraron 11 g del material vegetal seco. Se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se cubrió con 75 mL del sistema etanol: agua (80:20). Se realizó una decocción durante 40 minutos, a reflujo con tubo pararrayos para reducir la evaporación. A continuación se dejó el material vegetal con el sistema en

maceración por 4 días. El extractivo hidroalcohólico se filtra, y se descarta el marco.

El extracto hidroalcohólico se colocó en una ampolla de decantación y se extrajo con diclorometano con 55 mL y 30 mL para la primera y segunda extracción, respectivamente. Sobre alícuotas de estos se realizaron las reacciones de caracterización.

- Reacciones de caracterización de Flavonoides

**a) Reacción de Shinoda**

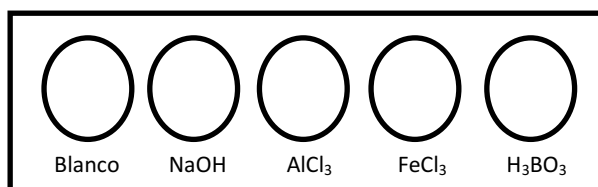
Se colocó en un tubo de ensayo 1 mL del extracto hidroalcohólico. Se agregaron granallas de magnesio y se adiciono gota a gota HCl concentrado. Observar la transformación a color rojo, indicando la reducción a antocianidinas solubles en alcohol amílico, lo que nos permite realizar la detección de flavonas, flavonoles y flavanonas, por medio de un cambio en la coloración a rojo.

Se repite este procedimiento para el extracto diclorometánico.

**b) Reacción de toque sobre papel**

En un papel filtro, se sembraron 5 gotas del extracto hidroalcohólico. Posteriormente, sobre la segunda siembra, se sembró una gota de NaOH 2 N. Esto se realiza igualmente con ácido bórico, cloruro de aluminio y cloruro de hierro (III), cada uno sobre un punto de siembra diferente del extracto (Figura 19). Se secó y observó al UV a 366 nm.

Se repite este procedimiento para el extracto diclorometánico.



**Figura 19.-** Modo de siembra para las reacciones de toque sobre papel.

Estas reacciones nos permiten detectar distintos compuestos, las cuales se desglosan a continuación:

- Hidróxido de sodio: se da la formación de un color amarillo intenso en presencia de flavonas, flavanoles e isoflavonas.
- Cloruro de aluminio: Se observa la formación de complejos con O-hidroxilos y/o hidroxilcetonas, por medio de una intensa fluorescencia amarillo verdosa.
- Cloruro de hierro (III): Esta reacción es inespecífica. Nos permite detectar flavonoides, alcoholes fenólicos, taninos, entre otros. El color varía según el número de los grupos hidroxilos al ocurrir la formación de un complejo con el hierro.
  - o 1 hidroxilo: coloración amarillo
  - o 2 hidroxilos: coloración verde
  - o 3 hidroxilos: coloración azul o negro.
- Ácido bórico: Esta reacción nos permite la detección de flavonas y flavanoles, por medio de una coloración amarilla con una fluorescencia verde en el UV. En medio alcalino forma quelatos con hidroxilos fenólicos en posición relativa en orto. Así mismo, también da positivo para flavonoides con un grupo carbonilo en la posición cuatro y un grupo hidroxilo en posición cinco.

## 7.7. DETECCIÓN DE C-GLICOSILFLAVONAS

### - Obtención de extractos

Se siguió la metodología empleada por Montanha, J. A. *et al.* (2009), en el cual se maceró por un día, una relación de material vegetal seco y triturado/solvente 1:10 p/v en el sistema etanol: agua (60:40). Posteriormente, se filtró el extracto hidroalcohólico por medio de filtración al vacío por medio de una bomba de agua, descartando el marco.

Posteriormente, se evaporó a presión reducida el extracto hidroalcohólico obtenido, para obtener el extracto acuoso, el cual por medio de una ampolla de decantación fue extraído con éter de petróleo (3x15 mL) para obtener el extracto con éter. Sobre el remanente extracto acuoso, se realizó la extracción con acetato de etilo (3x15 mL) y finalmente la extracción con n-butanol.

Para el análisis con el material vegetal juvenil y los callos, se evaporó el extracto hidroalcohólico por medio de calentamiento a baño maría, para obtener el extracto acuoso, el cual posteriormente fue extraído con los solventes ya mencionados, pero con menor volumen (3x0.5 mL), debido a la menor cantidad de material vegetal proveniente de callos (222 mg).

#### a) Cromatografía en capa fina (CCF)

Se emplearon las metodologías sugeridas para glicosilflavonoides por el TLC Drug Analysis Atlas (Wagner, H. & Bladt, S, 2001), en el cual se emplean como fases estacionarias cromatofolios de Silicagel 60 F<sub>254</sub>; 0.2 mm (Merck) y las siguientes fases móvil:

- 1.- Acetato de etilo: ácido fórmico; ácido acético glacial: agua (100:11:11:26)
- 2.- Acetato de etilo: metanol: agua (100:13:10)

Se realizó la siembra de las siguientes sustancias de referencia y extractos:

**Tabla 7.-** Extractos sembrados del material vegetal adulto para la detección de C-glicosilflavonoides.

Carril	Estándar	Carril	Extracto
1	Orientina	5	Éter de petróleo
2	Apigenina	6	Acetato de etilo
3	Isovitexina	7	Butanólico
4	Vitexina	8	Acuoso

Las placas cromatográficas fueron observadas a 254 y 366 nm, y finalmente reveladas con el Reactivo de Productos Naturales.

Con base a los resultados obtenidos para la detección con el material vegetal maduro, la comparación del material vegetal juvenil con el de callos se realizó empleando únicamente los extractos de acetato de etilo y butanólico de cada uno (Tabla 8), ya que en estos se observaron los compuestos de interés, empleando los sistemas de elución ya descritos.

**Tabla 8.-** Extractos sembrados para la comparación de C-glicosilflavonoides.

Carril	Estándar	Carril	Extracto
1	Orientina	4	Butanólico de callo
2	Vitexina	6	Butanólico de material juvenil
3	Isovitexina	7	Acetato de etilo de callo
		8	Acetato de etilo de material juvenil

Las placas cromatográficas, de igual forma fueron observadas a 254 y 366 nm, y finalmente reveladas con el Reactivo de Productos Naturales.

### 7.8. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRITERPENOS / ESTEROIDES EN *JODINA RHOMBIFOLIA* Y *MAYTENUS ILICIFOLIA*.

#### - Extracto diclorometánico

Se pulverizo finamente 2 g del material vegetal seco botánicamente identificado y se transfirieron a un tubo de ensayo. Se agregó 10 mL de cloruro de metileno y se dejó en maceración durante media hora, calentado cuidadosamente a baño maría (37°C) para favorecer la extracción. Finalmente el extracto se filtró y se conservó tapado a temperatura ambiente.

Esto se realizó para ambas drogas vegetales.

#### - Extracto acuoso y acetato de etilo

Se pulverizo finamente 2 g del material vegetal seco botánicamente identificado y se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 20 mL de agua destilada para realizar un cocimiento por 20 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar. Se filtró y repuso el volumen original de 20 mL con agua destilada. Se reservaron 14 mL del cocimiento acuoso. El extracto se conservó tapado en la heladera.

Los 6 mL remanentes del extracto acuoso se extrajeron con 3 mL de acetato de etilo (3 veces con 1 mL), reuniendo los extractivos. El extracto de acetato de etilo se secó con sulfato de sodio anhidro. El extracto se conservó tapado a temperatura ambiente.

Esto se realizó para ambas drogas vegetales.

- Reacciones de Caracterización

**a) Reacción de Liebermann Bouchard**

Esta reacción se llevó a cabo sobre los extractos diclorometánico y acetato de etilo obtenidos. Se tomaron 2 mL del extracto (diclorometánico o acetato de etilo), los cuales se evaporaron a sequedad en un vidrio de reloj. Se retomaron con gotas de cloroformo y se agregó 1.8 mL de anhídrido acético y 0.2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se observó la coloración al minuto.

La reacción de Liebermann Bouchard en medio anhidro, nos permite caracterizar por medio de cambios en la coloración la presencia de: saponinas triperpénicas (coloración rosa) y saponinas esteroideas (coloración verde).

**b) Reacciones de caracterización de saponinas**

Estas reacciones se llevaron a cabo sobre los extractos acuosos.

b.1) Capacidad afrógena

Se colocaron 2 mL del extracto acuoso en un tubo de ensayo, el cual se agitó enérgicamente por 30 segundos. Observar la aparición de espuma persistente, la cual es indicador de la presencia de saponinas.

b.2) Poder emulgente

Se colocaron 2 mL del extracto acuoso en un tubo de ensayo. Se le agregó gota a gota y agitando energéticamente 1 mL de aceite vegetal. Observar la formación de una emulsión inestable, que permita confirmar la ausencia de saponinas.

b.3) Reacciones de precipitación

- a. 2 mL del extracto acuoso se le agregaron gotas de la solución de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  al 10%. Observar la formación de un precipitado. Esta reacción nos permite detectar la presencia de triterpenos pentacíclicos.
- b. 2 mL del extracto acuoso se le agregaron gotas de la solución de subacetato de plomo al 10%. Observar la formación de un precipitado.

b.4) Reacción de Fehling indirecta

A 5 mL del extracto acuoso se le agregaron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado. Este se llevó a ebullición por tres minutos. Se dejó enfriar, se filtró y sobre el filtrado, se le agregó NaOH al 20% hasta alcalinizar el sistema al tornasol. Posteriormente, se le agregó el mismo volumen del reactivo de Fehling que el empleado con NaOH. Se calentó nuevamente a ebullición. Observar la formación de un precipitado rojo. La reacción de Fehling indirecta, nos permite determinar la presencia de azúcares reductores por medio de una hidrólisis previa de los mismos.

- Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Como fase estacionaria se emplearon cromatofolios de silicagel 60 F<sub>254</sub>; 0.2 mm (Merck) (5 cm). Empleando los siguientes sistemas de elución como fases móvil:

Fase 1.- Tolueno: acetato de etilo (8:2)

Fase 2.- Diclorometano: metanol (95:5)

Las muestras analizadas, fueron los extractos diclorometánicos de ambas especies vegetales botánicamente identificadas. La siembra se realizó empleando 20 µL de los extractos diclorometánicos sembrando en bandas de aproximadamente 1 cm. Las placas fueron reveladas con p-anisaldehído sulfúrico y calentamiento.



## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos y la discusión de los mismos por secciones.

### 8.1. CULTIVO *IN VITRO*

Se recolectó material vegetal durante todas las épocas del año. Sin embargo, la formación de callos se observó únicamente con el material juvenil recolectado a finales de invierno - principio de primavera, esto se debe a que en esta etapa el tejido vegetal se encuentra menos diferenciado y con un tiempo menor de exposición a contaminantes ambientales de la planta a campo.

#### 8.1.1. DESINFECCIÓN E INDUCCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL CON UN AÑO DE CRECIMIENTO

##### a) Desinfección

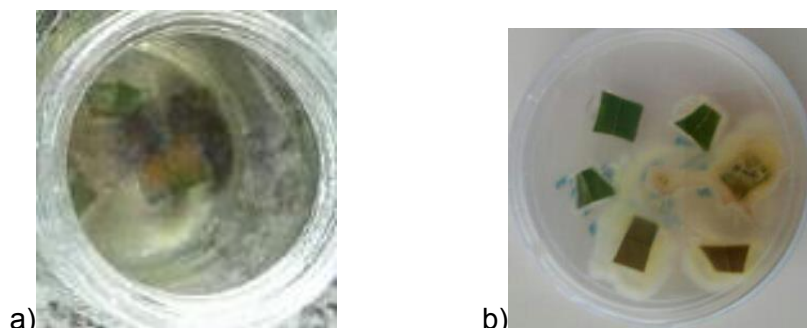
Para las hojas, en general se realizaron 34 experimentos, en los cuales se probaron 21 métodos de desinfección diferentes. La desinfección con el mayor porcentaje de supervivencia obtenido para las hojas maduras fue el método de desinfección 6 (Tabla 4), con el cual se obtuvo un 91.67% de supervivencia y un 8.33% de contaminación por hongos y/o bacterias (Figura 20.a).

Para las secciones nodales, la única desinfección con supervivencia se obtuvo con el método de desinfección 11 (Tabla 4), con el lavado inicial de estos con agua corriente, obteniendo un 100% de supervivencia.

##### b) Inducción

En esta etapa se realizaron 23 experimentos, con los explantos sobrevivientes a las distintas desinfecciones probadas (Tabla 4), en estas se ensayaron diversos tipos y concentraciones de PGR. Todos estos experimentos fueron infructíferos ya que no se logró la inducción del callo debido a la contaminación de los explantos por hongos y bacterias (Figura 20.b). Varios de los hongos se determinaron pertenecientes al grupo de las

Dematiaceas, por tener un micelio oscuro, y además se observó la presencia de hongos del género *Ascochyta* por la aparición de esporas bicelulares. Estos fueron determinados en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales por la Ing. Agrónoma Marina Sisterna, Cátedra de Terapéutica Vegetal.



**Figura 20.-** Ejemplos de contaminación obtenida en los explantos de hojas de *Jodina rhombifolia*. a) Etapa de aislamiento, b) Etapa de inducción

En general, la obtención de callos a partir del material vegetal con un año de crecimiento, no fue viable debido a la alta contaminación de hongos y bacterias que la especie presenta, lo que coincide con lo descrito por Kaiper, C. *et al.* (2010) para esta especie. Sin embargo, durante estos experimentos se observó una poca oxidación por parte de los explantos.

### 8.1.2. DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL JUVENIL E INTERMEDIO

#### a) Hojas y secciones nodales desprovistas de hojas

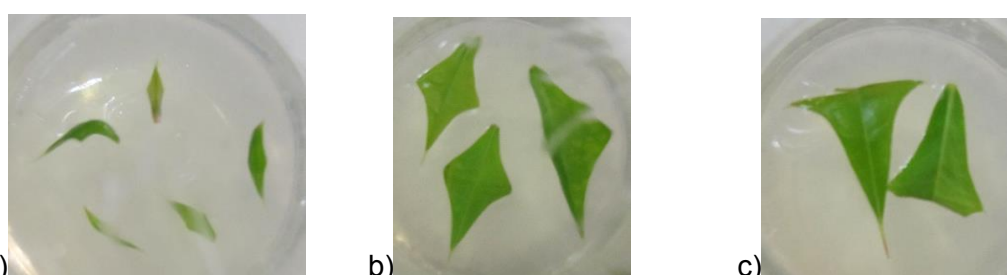
En general, con base a todos los métodos de desinfección ensayados (Tabla 5) para las hojas en estado juvenil (Figura 21 a y b), se observa que dichos explantos tienen una mayor tendencia a oxidarse, especialmente si son incubadas con luz, lo que coincide con lo descrito por Kaiper, C. *et al.* (2010) para esta especie. Mientras que para las secciones nodales desprovistas de hojas incubadas bajo condiciones de luz, se observa crecimiento por parte del explanto.

El método de desinfección 4 (Tabla 5), fue el que permitió obtener la mayor supervivencia con un 90.91% para la hojas juveniles y un 85.72% para las secciones nodales desprovistas de sus hojas. En esta metodología los explantos se cortan sin agua estéril en una caja de Petri y se incuban en condiciones de semi-oscuridad.

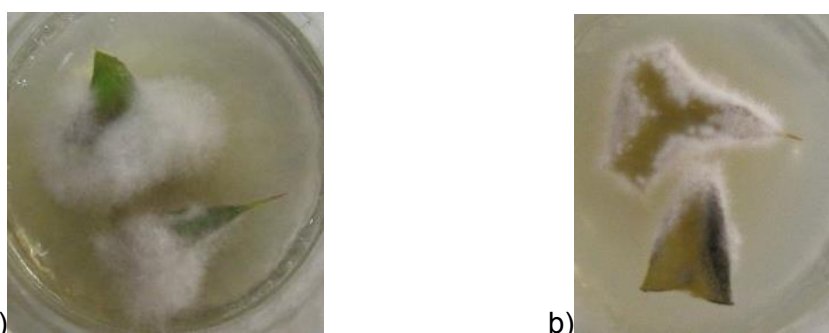
Los explantos provenientes de hojas en estado vegetativo intermedio tuvieron una alta tasa de contaminación por hongos y bacterias, tal como se describe para el material maduro (Figura 22).

b) Secciones nodales con hojas

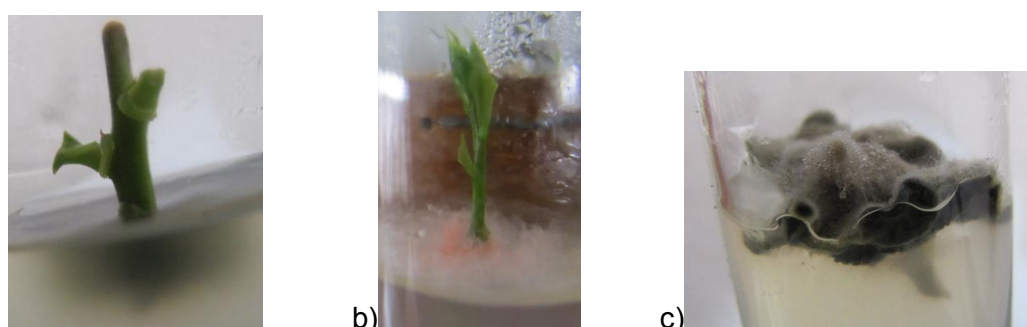
Para este tipo de explantos, la mayor supervivencia obtenida fue del 77.78% con el método de desinfección 1 (Tabla 5), el cual consiste en realizar los cortes del explanto en agua estéril y dejándolo con condiciones de luz para la incubación.



**Figura 21.-** Estados vegetativos de los explantos de hojas. a-b) Juvenil, c) Intermedio



**Figura 22.-** Ejemplos de la contaminación obtenida a partir de los explantos de hojas en estado intermedio.



**Figura 23.-** Ejemplos de la contaminación obtenida a para la secciones nodales. a) sin hojas, b) con hojas, c) sin hojas en la etapa de inducción a callo.

En general, se logró obtener una mejor desinfección, con metodologías menos agresivas para el material vegetal juvenil, que para el adulto. Esto es debido a que el material juvenil tuvo una menor exposición a los contaminantes ambientales. Adicionalmente, con las hojas en estado juvenil se observó que estas manifiestan de una alta oxidación, en especial cuando se incuban a condiciones de luz, lo cual concuerda con lo reportado en el 2010 por Kaiper, C., *et al.* para esta especie.

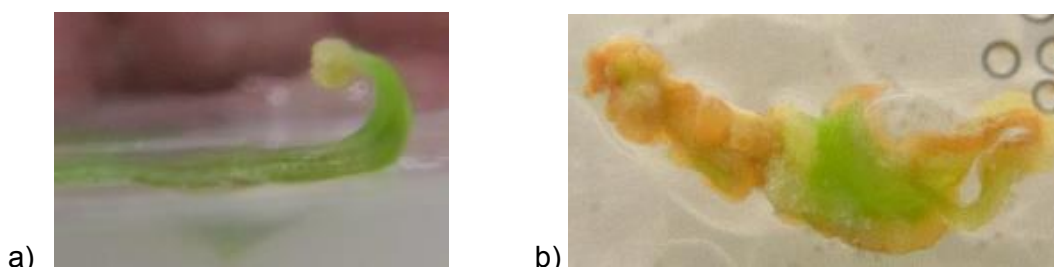
### 8.1.3. INDUCCIÓN A CALLO DEL MATERIAL VEGETAL JUVENIL DESINFECTADO

#### a) Hojas

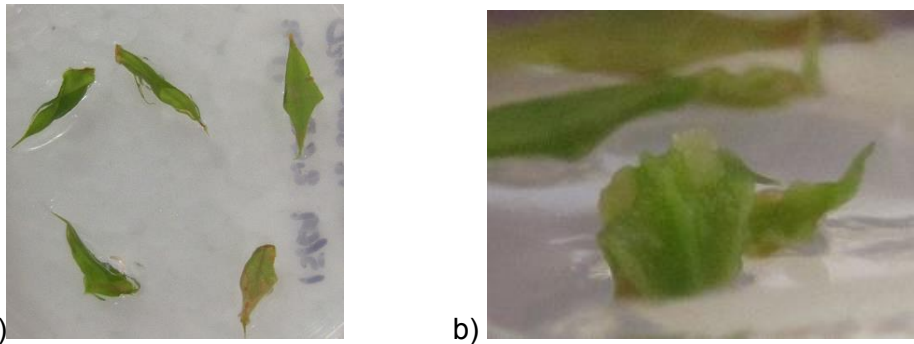
Se realizaron 11 experimentos de inducción con los explantos de hojas sobrevivientes de las distintas desinfecciones (Tabla 5), en estos se probaron diversas concentraciones de 2, 4-D (0.5 ppm y 1ppm) en medios MS al 25%, 50% y 100% de micronutrientes, macronutrientes, vitaminas, quelato de hierro y sacarosa.

En general, se observó que la formación de callos en las hojas, aparecen en la base de la hoja y sus bordes, con una coloración blanquecina-amarillenta y con una textura acuosa. A los 37 días, los callos comienzan a compactarse y una vez, repicados a un medio libre de hormonas, se observa una mayor compactación por parte de estos con una coloración ámbar (Figura 24).

Para el caso de las hojas se observó una respuesta más rápida en la formación de callos empleando el medio MS al 50% con 1 ppm de 2,4-D (Figura 25).



**Figura 24.-** Etapas de formación de callos a partir de hojas. a) Explanto a los 7 días en medio de inducción MS al 50% con 1 ppm de 2,4-D. b) Explanto en medio MS al 50% libre de PGR, a los 37 días de haber comenzado la fase de inducción.

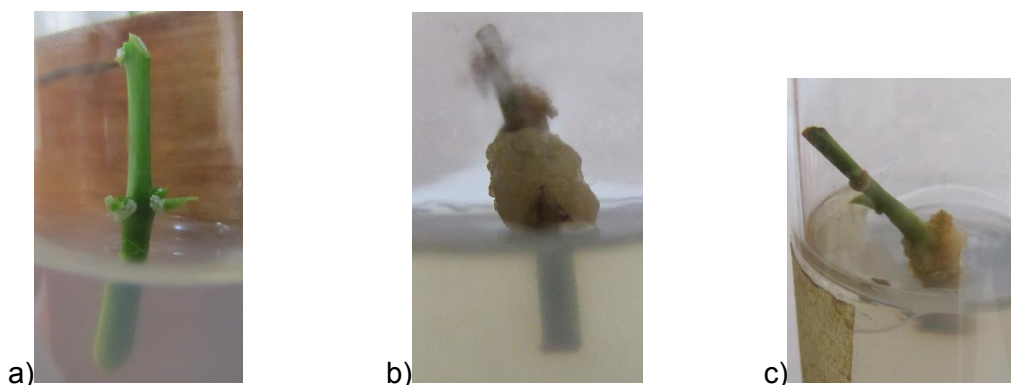


**Figura 25.-** Medios de inducción de callos para hojas. a) MS al 100% a los 30 días en la fase de inducción. b) MS al 50% a los 23 días en la fase de inducción.

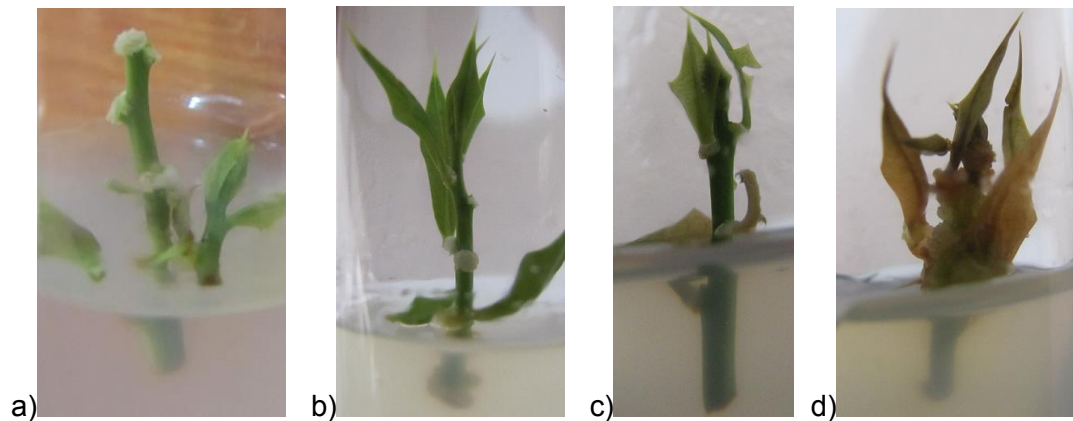
#### b) Secciones nodales

Para las secciones nodales con y sin hojas, se realizaron cinco experimentos de inducción, para cada uno de estos, probando el medio MS al 100% con 1ppm de IBA y cuatro ensayando con los medios MS al 25% y 50% con 0.5 ppm y 1 ppm de 2,4-D, teniendo una respuesta bastante favorable por parte de los mismos, en todos los casos, excepto con IBA. Sin embargo, para este tipo de explantos en varios casos se obtuvo una formación de callos en medios libres de PGR y repicados a un medio con el agregado de PGR, se observó que la masa de callos comenzó a crecer a los pocos días del repique.

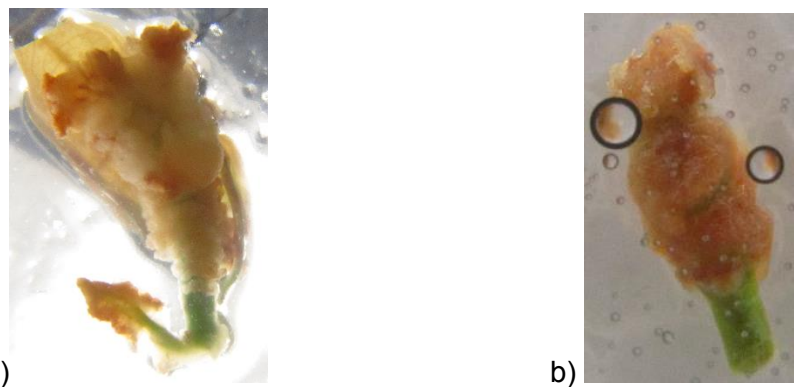
La formación de callos en las secciones nodales con hojas, aparecen en la base del pecíolo, mientras que para las secciones nodales desprovistas de hojas se originan principalmente sobre el punto de corte en la zona proximal del explanto (Figuras 26 y 27). Al igual que los callos obtenidos a partir de las hojas, con el tiempo estos también muestran mayor compactación y un cambio en su coloración (de blanco-amarillento a marrón) en un medio libre de PGR.



**Figura 26.-** Zonas de formación de callos para las secciones nodales sin hojas.



**Figura 27.-** Zonas y formas de formación de callos para secciones nodales con hojas.



**Figura 28.-** Explantos a los 7 días en medio MS al 50% libre de hormonas (37 días en inducción en medio MS al 50% con 1 ppm de 2, 4-D). a) Explanto de secciones nodales con hojas, b) Explanto de secciones nodales desprovisto de hojas.

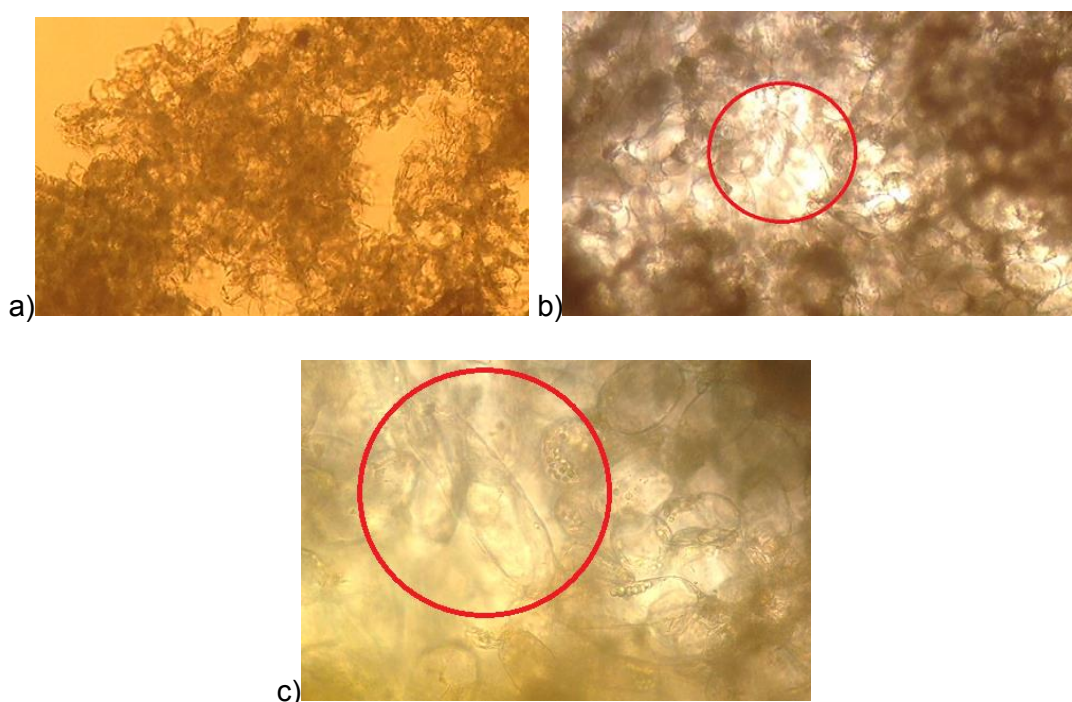
La formación de callos con el material vegetal juvenil, se puede atribuir a que el tejido vegetal en esta etapa se encuentra menos diferenciado y en activo crecimiento, por lo que la inducción es más sencilla. Adicionalmente, la formación de los callos a partir de las hojas juveniles se ha observado que es un proceso lento, mientras que para las secciones nodales se ha obtenido una respuesta considerablemente más rápida, en especial para las secciones nodales con hojas.

Se observa la formación de los callos en la zona del corte de los explantos, junto con la compactación y los cambios de coloración observados en los mismos, esto coincide con lo reportado por Szelak, H. *et al.* (2005) para las semillas de *Brassica napus*, empleando como regulador de crecimiento 2,4-D.



#### 8.1.4. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE CALLOS

Se observaron al microscopio (40x, 100x y 400x) los callos obtenidos a partir de hojas y secciones nodales, con 6 – 7 semanas desde su siembra en medio de aislamiento, previo a su traspaso al medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento. En estos se observó una escasa organización tisular con células elongadas de distintos tamaños y formas, tal como se muestra en la Figura 29 (b y c), lo que coincide con lo descrito por Figueiredo, M. A. *et al.* (2007) y Oliveira R., L. *et al.* (2012) en las fibras de la banana (*Musa sp.* cv. Prata anã).



**Figura 29.-** Observación microscópica de callos obtenidos vistos a: a) 40x, b) 100x y c) 400x.

## 8.2. METABOLITOS SECUNDARIOS

### 8.2.1. REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOIDES

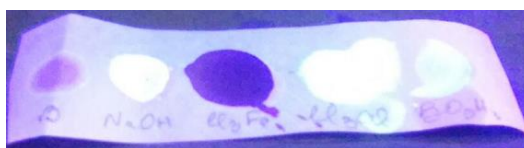
Por medio de las pruebas realizadas se observa que tanto el extracto hidroalcohólico como el diclorometánico contienen a los flavonoides presentes en esta especie, dando positivo para la reacción de Shinoda, la cual nos permite detectar la presencia de flavonoles, flavanonas y flavonas, siendo estos últimos los compuestos de interés debido a su actividad con antiulcerosa, por medio de una reducción de estos compuestos a antocianidinas. Para el resto

de las reacciones de caracterización (Toque sobre papel), se observan al UV a 366nm, dando lo siguiente: Reacción positiva con hidróxido de sodio para ambos extractos, lo que nos indica la presencia flavonas, flavanoles e isoflavonas. De igual forma, la reacción con ácido bórico da positiva, lo que nos permite detectar la presencia de flavonas y flavonoles, con hidroxilos en posición orto o carbonilo e hidroxilo vecinos en posición 4 y 5 (Figura 13). Por medio de la reacción con cloruro de aluminio se observa la formación de complejos con O-hidroxilos y/o hidroxilcetonas, nuevamente sobre ambos extractos. Para la reacción con cloruro de hierro, la cual es una reacción inespecífica, que únicamente nos permite detectar el número de grupos hidroxilos al ocurrir la formación de un complejo con el hierro, ambos extractos dan positivo, con una coloración negra sugiriendo la presencia tres grupos hidroxilos (Figuras 30 y 31).

Por medio de estos resultados para las reacciones de caracterización y de acuerdo a su polaridad, se puede confirmar la presencia de flavonoides glucosilados en el extracto hidroalcohólico, mientras que los resultados para el extracto diclorometánico confirman la presencia de aglicones de flavona o flavanonas. Los resultados para las reacciones de caracterización de flavonoides se muestran a continuación resumidos en la siguiente tabla:

**Tabla 9.-** Resultados para las reacciones de caracterización de flavonoides.

Reacción	Extracto hidroalcohólico	Extracto diclorometánico
Shinoda	Positivo	Positivo
NaOH	Positivo (amarillo intenso)	Positivo (amarillo intenso)
AlCl <sub>3</sub>	Positivo (amarillo-verdoso)	Positivo (amarillo-verdoso)
FeCl <sub>3</sub>	Positivo (3 hidroxilos) (negro-azulado)	Positivo (3 hidroxilos) (negro)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Positivo (verde)	Positivo (verde)



**Figura 30.-** Resultados observados en UV a 366nm, para la reacción de toque sobre papel para el extracto hidroalcohólico.



**Figura 31.-** Resultados observados en UV a 366nm, para la reacción de toque sobre papel para el extracto diclorometánico.



### 8.2.2. IDENTIFICACIÓN DE C-GLICOSILFLAVONOIDES EN MATERIAL VEGETAL MADURO

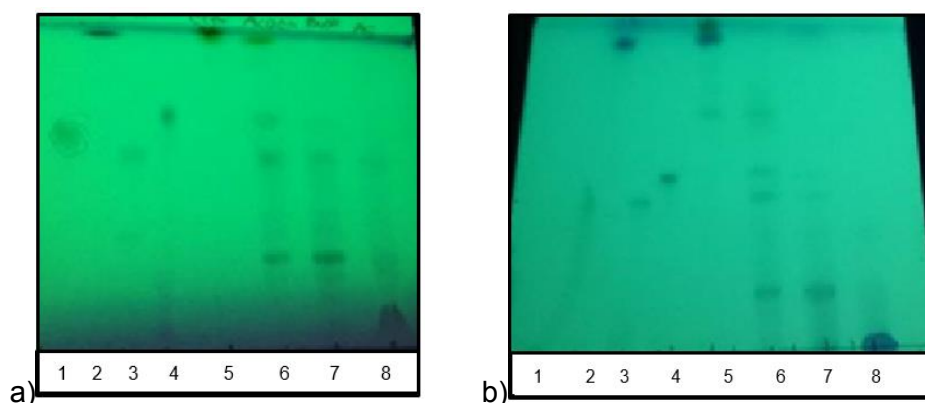
Se analizaron los diferentes extractos obtenidos y se compararon frente a los estándares de orientina, apigenina, vitexina e isovitexina (glicosilflavonoides), con dos fases móvil diferentes y revelando con el Reactivo de Productos Naturales. Los  $R_f$  de las muestra se muestran a continuación en las siguientes tablas (10 y 11).

**Tabla 10.-**  $R_f$  de las sustancias de referencia y extractos empleando el sistema de elución acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26).

Carril	Estándar/ Extracto	$R_f \approx$ (UV 254 nm)	$R_f \approx$ TLC Atlas
1	Orientina	0.6	0.58
2	Apigenina	0.94	-
3	Isovitexina	0.56	0.56
4	Vitexina	0.68	0.63
5	Éter de petróleo	0.94; 0.98	-
6	Acetato de etilo	0.26; 0.56; 0.68; 0.94; 0.98	-
7	Butanólico	0.2; 0.26; 0.56; 0.6	-
8	Acuoso	0.05; 0.26; 0.56; 0.6	-

**Tabla 11.-**  $R_f$  de las sustancias de referencia y extractos empleando el sistema de elución acetato de etilo: metanol: agua (100:13:10).

Carril	Estándar/ Extracto	$R_f \approx$ (UV 254 nm)
1	Orientina	0.43
2	Apigenina	0.88
3	Isovitexina	0.4
4	Vitexina	0.45
5	Éter de petróleo	0.65; 0.69; 0.73; 0.9; 0.94; 0.98
6	Acetato de etilo	0.14; 0.29; 0.41; 0.47; 0.62; 0.66; 0.69; 0.73; 0.95
7	Butanólico	0.14; 0.3; 0.4
8	Acuoso	0.02; 0.14; 0.31



**Figura 32.-** Cromatofolios empleados para la identificación de glicosilflavonoides. Sustancias de referencia (carriles 1-4) y diversos extractos (carriles 5-8). a) Fase móvil 1.- Acetato de etilo: ácido fórmico; ácido acético glacial: agua (100:11:11:26). b) Fase móvil 2.- Acetato de etilo: metanol: agua (100:13:10).

Al observar los cromatofolios al UV (254 nm), se identificó el estándar de orientina en la fase móvil 1 con un  $R_f \approx 0.6$ , el cual también se encuentra en los extractos butanólico y acuoso. En la fase móvil 2, este se presenta con un  $R_f \approx 0.43$  observándose únicamente en el extracto butanólico, lo cual se corrobora con el Reactivo revelador de Productos Naturales. Sin embargo; la orientina a 366 nm no fue visible. El estándar de apigenina, se observa a 254 nm, en la fase móvil 1 con un  $R_f \approx 0.94$ , presentándose también en los extractos éter y acetato de etilo con una ligera sombra. En el caso de la fase móvil 2, la apigenina muestra un  $R_f \approx 0.88$ , observándose una banda con un  $R_f$  similar únicamente en el extracto éter. Sin embargo, al observarlo a 366 nm, los colores de ambas bandas no coinciden, lo cual se corrobora en el revelado ya que no se observa en ninguna de las fases (Figura 32 a y b).

La isovitexina, se observa en la fase móvil 1 con un  $R_f \approx 0.56$ , el cual coincide con el valor reportado en la literatura, y se muestra presente en los extractos de acetato de etilo, butanólico y como una ligera mancha en el extracto acuoso. En la fase móvil 2, esta se observa con un  $R_f \approx 0.4$ , mostrándose presente en los extractos de acetato de etilo y butanólico. Lo cual se corrobora con el revelado, empleando el Reactivo de Productos Naturales. Para el caso de la sustancia de referencia vitexina, en la fase móvil 1 presenta un  $R_f \approx 0.68$  y con la fase móvil 2  $R_f \approx 0.45$ , en ambas fases esta sustancia se observa en el extracto de acetato de etilo, lo cual se corrobora con el revelado (Figura 32 a y b). En todos los extractos se observan más bandas las cuales se encuentran en las Tablas 10 y 11, dichas bandas posiblemente corresponden a otros glicosil flavonoides, de acuerdo con los resultados obtenidos para las reacciones de caracterización y a la polaridad de los compuestos en los extractos obtenidos.

Por medio del fraccionamiento descrito para la especie por Montanha, J. A. *et al.* (2009) y CCF contra testigos, se identificó orientina en el extracto

butanólico. Sobre este mismo extracto reportan a la vitexina, la cual en este trabajo fue obtenida en el extracto de acetato de etilo.

Adicionalmente se verificó la presencia de isovitexina en los extractos de acetato de etilo y butanol. Este compuesto no había sido reportado anteriormente para esta especie. Sin embargo, sería necesario realizar más ensayos de purificación y caracterización para corroborarlo.

### 8.2.3. COMPARACIÓN QUÍMICA DEL MATERIAL VEGETAL JUVENIL CON LOS CALLOS OBTENIDOS POR CULTIVO *IN VITRO*

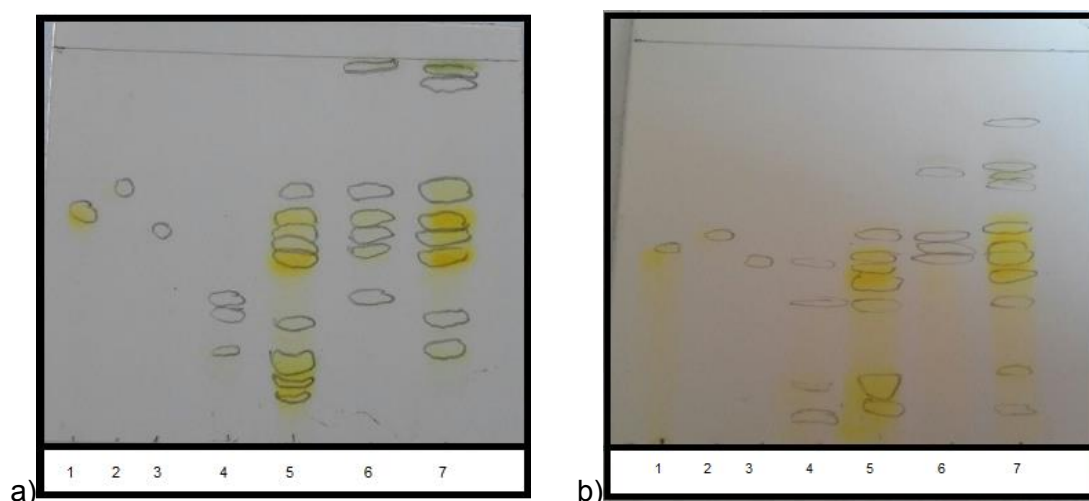
La identificación de C-glicosilflavonas y la comparación de los perfiles cromatográficos para los extractos provenientes del material juvenil (M. J.) y callos, se realizó con base a los resultados obtenidos para la detección de C-glicosilflavonas con el material vegetal maduro. Debido a esto, se sembraron únicamente tres sustancias de referencia y los extractos de acetato de etilo y butanólico de cada uno (Tabla 8), ya que son los extractos en donde se encuentran los compuestos de interés, empleando los mismos sistemas de elución y el revelado con el Reactivo de Productos Naturales. En las siguientes tablas (Tablas 12 y 13) se muestran los  $R_f$  obtenidos.

**Tabla 12.-** Perfiles cromatográficos de los extractos de M.J. y callos, empleando el sistema de elución acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26).

Carril	Estándar/ Extracto	$R_f \approx$ (UV 254 nm)	$R_f \approx$ TLC Atlas
1	Orientina	0.57	0.58
2	Vitexina	0.64	0.63
3	Isovitexina	0.53	0.56
4	Butanólico callo	0.22; 0.32; 0.36	-
5	Butanólico M. J.	0.11; 0.15; 0.20; 0.31; 0.46; 0.49; 0.53; 0.57; 0.64	-
6	Acetato de etilo callo	0.36; 0.49; 0.53; 0.57; 0.64; 0.98	-
7	Acetato de etilo M. J.	0.24; 0.32; 0.48; 0.53; 0.57; 0.64; 0.93; 0.97	-

**Tabla 13.-** Perfiles cromatográficos de los extractos de M.J. y callos, empleando el sistema de elución acetato de etilo: metanol: agua (100:13:10).

Carril	Estándar/ Extracto	$R_f \approx$ (UV 254 nm)
1	Orientina	0.46
2	Vitexina	0.49
3	Isovitexina	0.43
4	Butanólico callo	0.07; 0.14; 0.33; 0.43
5	Butanólico M. J.	0.10; 0.14; 0.33; 0.39; 0.43; 0.46; 0.49
6	Acetato de etilo callo	0.43; 0.46; 0.49; 0.67 (verde)
7	Acetato de etilo M. J.	0.09; 0.19; 0.33; 0.4; 0.43; 0.46; 0.49; 0.53; 0.64; 0.66 (verde); 0.68; 0.79



**Figura 33.-** Comparación de perfiles cromatográficos e identificación de C-glicosilflavonoides. Sustancias de referencia (carriles 1-3) y extractos butanólicos y de acetato de etilo para el M. J. y callos (carriles 4 - 7). a) Fase móvil 1.- Acetato de etilo: ácido fórmico; ácido acético glacial: agua (100:11:11:26). b) Fase móvil 2.- Acetato de etilo: metanol: agua (100:13:10).

En la fase móvil 1, se observó el estándar de orientina con un  $R_f \approx 0.57$ , presentándose en ambos extractos provenientes del material vegetal juvenil y en el extracto de acetato de etilo de callos. Empleando la fase móvil 2, la orientina presenta un  $R_f \approx 0.46$ , mostrándose nuevamente sobre los mismos extractos que con la fase 1 y para ambos cromatofolios esto se corrobora con el relevado con el Reactivo de Productos Naturales. Para el vegetal adulto, la orientina se observó únicamente en el extracto butanólico (Figuras 32 y 33). El estándar de vitexina se obtuvo con un  $R_f \approx 0.64$  y  $R_f \approx 0.49$ , en los sistemas de elución 1 y 2, respectivamente. La vitexina, se presenta en el extracto butanólico del material vegetal juvenil y en los extractos de acetato de etilo de

callos y M. J. en ambas fases, lo cual se confirma con el revelado y con lo obtenido por parte del material vegetal adulto en el cual también se observa la vitexina en el extracto de acetato de etilo (Figuras 32 y 33).

Finalmente, el estándar de isovitexina se obtuvo un  $R_f \approx 0.53$  con la fase móvil 1 y un  $R_f \approx 0.43$  para la fase móvil 2, mostrándose nuevamente en ambos casos, en los extractos de acetato de etilo para callos y material juvenil y sobre el extracto butanólico de M. J. Sin embargo, al emplear la fase móvil 2, la isovitexina alcanza a ser identificada en el extracto butanólico de callos. Estos resultados son confirmados por el revelado y por la comparación con el material vegetal adulto, en donde también se observa presente en ambos extractos (Figuras 32 y 33). Para todos los extractos se observan más bandas, para las cuales sus respectivos  $R_f$  se muestran en las Tablas 12 y 13, las cuales posiblemente pertenecen a otros glicosil flavonoides.

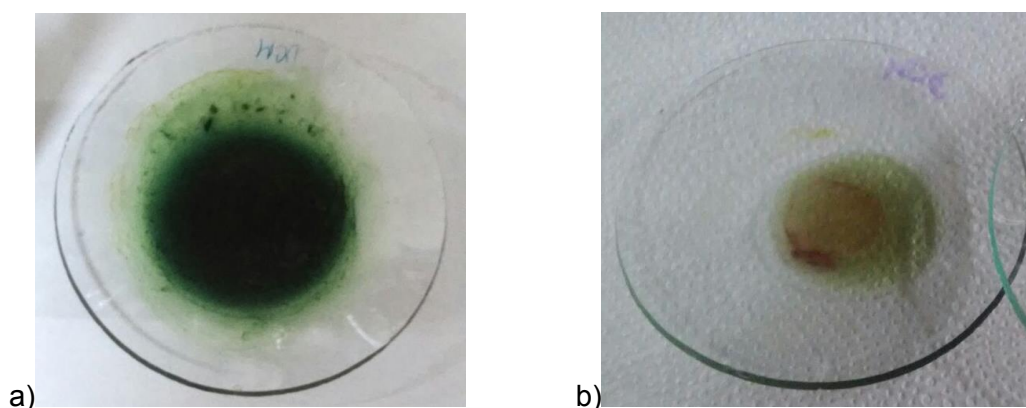
Las diferencias encontradas entre estos extractos con los extractos provenientes de material vegetal adulto, se puede deber a la cantidad de material vegetal empleado en el punto partida, ya que al tener una mayor cantidad de materia seca, se trabaja con un mayor volumen con lo que se puede llevar acabo una separación más fina durante el proceso de extracción. Adicionalmente, es importante notar que los extractos provenientes de callos muestran una menor cantidad de bandas, esto puede atribuirse a que los compuestos presentes en los extractos se encuentren a concentraciones por debajo del límite de detección para esta técnica, esto se podría sugerir en especial al observar los perfiles cromatográficos del extracto butanólico de callo en ambas fases.

La identificación de estos metabolitos secundarios (orientina, vitexina e isovitexina), en el extracto acetato de etilo de callos obtenidos a partir del cultivo *in vitro*, concuerda con la viabilidad descrita por Kiong, A. L. *et al.* (2005) y Asaka, I. *et al.* (1993) para la obtención de principios activos glucosilados (asiaticósidos y ginsenósidos, respectivamente) por medio del cultivo *in vitro* de callos empleando 2,4-D como PGR y con lo reportado por Schmeda-Hirschmann, G. *et al.* (2004) para la obtención de flavonoides glucosilados (rutina).

#### 8.2.4. REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN DE TRITERPENOS / ESTEROIDES EN *JODINA RHOMBIFOLIA* Y *MAYTENUS ILICIFOLIA*.

##### a) Reacción de Liebermann Bouchard

Las reacciones realizadas con los extractos diclorometánicos se observa un cambio de coloración. Para *Jodina rhombifolia*, el extracto se torna a un color verde intenso (Figura 34.a), mientras que para *Maytenus ilicifolia*, el extracto se torna a un color verde de menor intensidad junto con una mancha rosa oscura-rojiza, la cual se pierde casi instantáneamente (Figura 34.b), con lo cual se determina la presencia de esteroides en el extracto diclorometánico para ambas especies. Los ensayos con el extracto de acetato de etilo para ambas drogas vegetales no presentaron un cambio en la coloración del mismo.



**Figura 34.-** Resultados obtenidos para la reacción de Liebermann Bouchard con los extractos diclorometánicos. a) *Jodina rhombifolia* y b) *Maytenus ilicifolia*.

La caracterización de esteroides triterpénicos en el extracto diclorometánico, es algo no esperado y novedoso para esta especie ya que esta es una especie dicotiledónea y este tipo de compuestos se presentan principalmente en plantas monocotiledóneas (Kuklinski, 2000).

##### b) Reacciones de caracterización de saponinas

Las reacciones de caracterización de saponinas, se llevan a cabo con los extractos acuosos de ambas especies, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 14):

**Tabla 14.-** Resultados obtenidos para las reacciones de caracterización de saponinas sobre los extractos acuosos de *Jodina rhombifolia* y *Maytenus ilicifolia*.

Reacción	<i>Jodina rhombifolia</i>	<i>Maytenus ilicifolia</i>
Capacidad afrógena	Negativo	Negativo
Poder emulgente	Positivo	Positivo
Ca(OH) <sub>2</sub>	Negativo	Negativo
Subacetato de plomo	Positivo	Positivo
Fehling indirecta	Positivo	Positivo

Con base a los resultados obtenidos de capacidad afrógena, poder emulgente, Fehling indirecta y la precipitación con el hidróxido de calcio, se puede determinar la ausencia de saponinas en los extractos acuosos para ambas especies. Así mismo se puede suponer que el resultado obtenido para la reacción precipitación con el subacetato de plomo en estos casos este dando un falso positivo debido probablemente la presencia de algún flavonoide en el extracto.

Los resultados obtenidos para dichos extractos no nos permiten diferenciar cada una de estas especies, ya que las dos exhiben el mismo comportamiento ante las reacciones realizadas (Tabla 14), por lo que se recurre a CCF con el objetivo de lograr una correcta diferenciación entre ambas especies cuando se presentan en polvo.

#### - Cromatografía en Capa Fina (CCF)

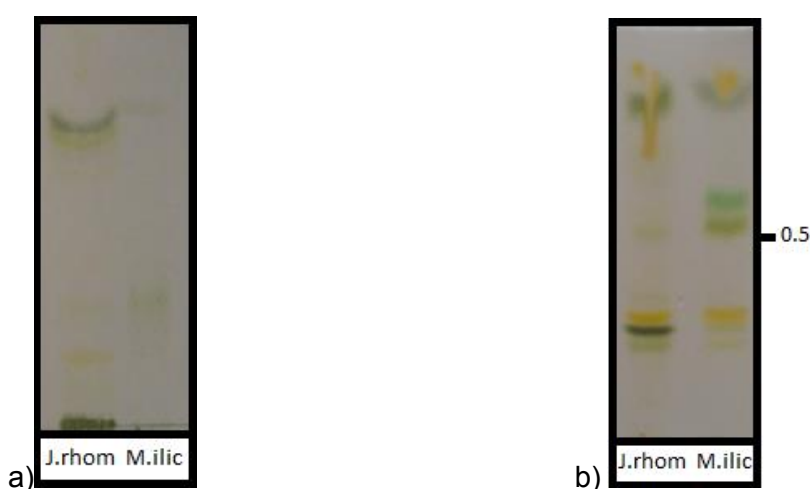
La correcta diferenciación de estas especies por la parte analítica, se obtuvo mediante los perfiles cromatográficos mostrados para los extractos diclorometánicos de ambas especies (Figura 35). Los R<sub>f</sub> obtenidos para dichos extractos con diferentes sistemas de elución se encuentran en las Tablas 15 y 16.

**Tabla 15.-** R<sub>f</sub> de los extractos diclorometánicos de *Jodina rhombifolia* y *Maytenus ilicifolia* empleando el sistema de elución tolueno: acetato de etilo (8:2).

Carril	Estándar/ Extracto	R <sub>f</sub> en visible
1	<i>J. rhombifolia</i>	≈ 0.18 (Amarillo), ≈ 0.29 (Verde claro), ≈ 0.63 (Verde claro), ≈ 0.66 (Gris), ≈ 0.70 (Verde-amarillo), ≈ 0.75 (Verde oscuro) y mancha amarilla con el frente de solvente.
2	<i>M. ilicifolia</i>	≈ 0.32 (Verde claro), ≈ 0.79 (Verde claro)

**Tabla 16.-**  $R_f$  de los extractos diclorometánicos de *Jodina rhombifolia* y *Maytenus ilicifolia* empleando el sistema de elución diclorometano: metanol (95:5).

Carril	Estándar/ Extracto	$R_f$ en visible
1	<i>J. rhombifolia</i>	$\approx 0.15$ (Verde claro), $\approx 0.20$ (Verde claro), $\approx 0.29$ (Verde oscuro), $\approx 0.35$ (Amarillo), $\approx 0.38$ (Verde claro), $\approx 0.51$ (Verde claro), $\approx 0.89$ (Amarillo-verde)
2	<i>M. ilicifolia</i>	$\approx 0.31$ (Verde claro), $\approx 0.37$ (Amarillo), $\approx 0.40$ (Verde claro), $\approx 0.62$ (Verde oscuro), $\approx 0.91$ (Verde claro-gris)



**Figura 35.-** Cromatofolios de los extractos diclorometánicos para *Jodina rhombifolia* y *Maytenus ilicifolia* con diferentes sistemas de elución. a) Fase móvil.- tolueno: acetato de etilo (8:2). b) Fase móvil.- diclorometano: metanol (95:5).

Con los sistemas de elución empleados se logra establecer diferencias en los extractos diclorometánicos de las especies evaluadas. Con la fase móvil tolueno: acetato de etilo (8:2), para el extracto de *Jodina rhombifolia*, se observaron seis bandas con colores diferentes, más una mancha amarilla que corre con el frente de solvente. Mientras que para el extracto de *Maytenus ilicifolia*, con el mismo sistema de elución únicamente se distinguen dos bandas de color verde claro, con una considerable separación entre ellas.

Al emplear el sistema de elución diclorometano: metanol (95:5), se corrobora la diferencia entre ambas especies, encontrándose para *Jodina rhombifolia* siete bandas y para *Maytenus ilicifolia* solo se observan 5 bandas.

Con los resultados obtenidos para la CCF, se puede determinar que esta podría ser una herramienta para obtener una adecuada diferenciación cuando el material vegetal se presente en polvo, ya que estas especies se emplean como adulterantes mutuos (Asociación Ribera Norte; Lahitte, H.B. & Hurrell, J. A., 1994; Alonso, J. & Desmarchelier, C., 2015; Henríquez, A. *et al.* 2001).



## 9. CONCLUSIONES

En base a los ensayos realizados y resultados obtenidos, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- ✓ El material vegetal con un año de crecimiento, no fue viable para el cultivo *in vitro* debido a la alta contaminación producida por hongos y bacterias que la especie presenta.
- ✓ El cultivo *in vitro* de callos para *Jodina rhombifolia*, es viable a partir de las hojas y secciones nodales juveniles, ya que el tejido juvenil tiene un menor tiempo de exposición a los contaminantes ambientales y se encuentra menos diferenciado.
- ✓ Las hojas de la especie sufren de una alta oxidación al incubarse a condiciones de luz.
- ✓ La formación de callos con el material juvenil es más rápida para las secciones nodales que para las hojas de la especie.
- ✓ La zona de formación de callos, se da sobre o cerca de la zona de corte de los explantos.
- ✓ El tiempo de exposición de los callos a la auxina 2,4-D, aumenta la compactación y el cambio de coloración a ámbar de estos.
- ✓ Los callos tienen una escasa organización tisular y células elongadas con distintos tamaños y formas.
- ✓ Con base a las diferentes reacciones de caracterización, se puede concluir que las hojas adultas de la especie contienen flavonoides glucosilados, aglicones de flavona o flavanonas y esteroides triterpénicos.
- ✓ La presencia de isovitexina en los extractos de acetato de etilo y butanólico, es descrita por primera vez para esta especie; aunque esto debe ser corroborado con más ensayos de purificación de los extractos y caracterización.
- ✓ La identificación de las C-glicosilflavonas (orientina, vitexina e isovitexina), en el extracto acetato de etilo de los callos obtenidos, nos lleva a concluir que esta biotécnica puede ser una buena alternativa para

la obtención de los compuestos con actividad antiulcerosa presentes en *Jodina rhombifolia*.

- ✓ La observación de los perfiles cromatográficos obtenidos por CCF, permite diferenciar claramente a las especies *Jodina rhombifolia* y *Maytenus ilicifolia*, por lo que esta podría ser una herramienta para obtener una adecuada diferenciación cuando el material vegetal se presenta en polvo.

## 10.PERSPECTIVAS

- Determinar la presencia de 2-vicenina, compuesto mayoritario y principal responsable de la actividad antiulcerosa descrito por Montanha, J. A. *et al.* (2009).
- Purificación e identificación del compuesto isovitexina en los extractos acetato de etilo y butanólico.
- Determinar el rendimiento de los principios activos obtenidos.
- Optimizar la técnica de multiplicación de callos obtenidos de *Jodina rhombifolia* para producir una mayor cantidad de masa.
- Mejorar la técnica de micropropagación por organogénesis indirecta para la obtención de un gran número de plantas.
- Optimizar con el uso de precursores en el cultivo *in vitro* de callos para obtener una mayor cantidad de principios activos.

## 11.ANEXO I

A continuación se presentan las siguientes tablas mostrando el número de explantos sembrados y su supervivencia en cada una de las etapas del cultivo *in vitro*.

**Tabla 17.-** Experimentos realizados para hojas con un año de crecimiento.

Desinfección	Aislamiento			Inducción			
	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia	Medio de inducción	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia
1	23	6	26,09	ANA 1 ppm y 2,4-D 1 ppm (MS 100%)	6	0	0,00
2	22	0	0,00	-	-	-	-
3	14	3	21,43	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	3	0	0,00
4	14	0	0,00	-	-	-	-
5	29	0	0,00	-	-	-	-
6.a	12	11	91,67	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	11	0	0,00
6.b*	76	0	0,00	-	-	-	-
7.a	14	7	50,00	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	7	0	0,00
7.b*	43	0	0,00	-	-	-	-
8	20	9	45,00	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	9	0	0,00
9	15	6	40,00	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	5	0	0,00
10	11	2	18,18	2,4-D 5 ppm (MS 100%)	2	0	0,00
11	14	6	42,86	2,4-D 5 ppm (MS 100%)	6	0	0,00
12	21	8	38,10	2,4-D 5 ppm (MS 100%)	8	0	0,00
13	19	11	57,89	2,4-D 5 ppm (MS 100%)	11	0	0,00
14	27	11	40,74	2,4-D 2 ppm (MS 100%)	10	0	0,00
15	27	16	59,26	2,4-D 2 ppm (MS 100%)	16	0	0,00
16	24	5	20,83	2,4-D 2 ppm (MS 100%)	5	0	0,00
17	23	2	8,70	2,4-D 2 ppm (MS 100%)	2	0	0,00
18	35	1	2,86	-	-	-	-
19.a	77	49	63,64	2,4-D 2 ppm (MS 100%)	43	1	2,33
19.b	59	3	5,08	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	3	0	0,00
20.a	33	2	6,06	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	2	0	0,00
20.b	30	11	36,67	-	-	-	-
20.c	42	0	0,00	-	-	-	-
21.a	29	10	34,48	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	10	0	0,00
21.b	48	11	22,92	2,4-D 1 ppm / ANA 1.5 ppm + IBA 1.5 ppm (MS 100%)	11	0	0,00
21.c	49	3	6,12	-	-	-	-
21.d*	154	0	0,00	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>1004</b>	<b>193</b>			<b>170</b>	<b>1</b>	

**Tabla 18.-** Experimentos realizados para las secciones nodales verdes con un año de crecimiento

Desinfección	Aislamiento			Medio de inducción	Inducción		
	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia		Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia
10	2	0	0,00	-	-	-	-
11	2	2	100,00	MS 100%	2	0	0,00
12	4	0	0,00	-	-	-	-
13	4	0	0,00	-	-	-	-
14	2	0	0,00	-	-	-	-
15	2	0	0,00	-	-	-	-
16	7	0	0,00	-	-	-	-
17	6	0	0,00	-	-	-	-
18	2	0	0,00	-	-	-	-
19	2	0	0,00	-	-	-	-
20	6	0	0,00	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>2</b>			<b>2</b>	<b>0</b>	

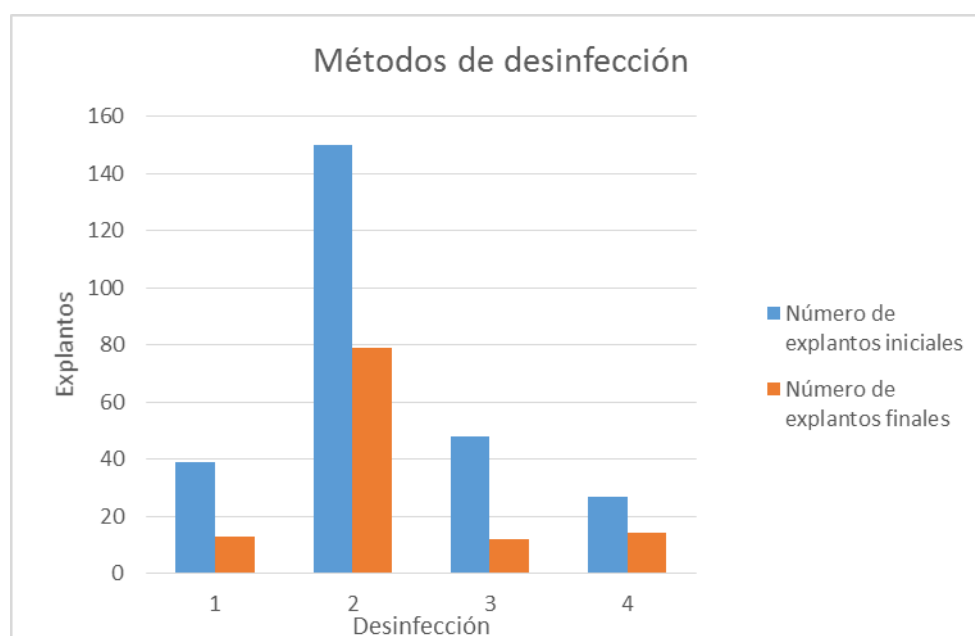
Tabla 19.- Experimentos realizados con las hojas juveniles e intermedias.

Desinfección	Aislamiento			Inducción			Crecimiento					
	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia	Medio de inducción	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia	Medio	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia	Callos en formación
1.a	16	8	50,00	2,4-D 1 ppm (MS 100%)**	13	3	23,08	-	-	-	-	-
1.b	23	5	21,74	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	5	3	60,00	MS 50%	3	2	66,67	2
2.a	13	9	69,23	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	9	8	88,89	MS 50%	8	6	75,00	6
2.b	22	9	40,91	2,4-D 1 ppm (MS 50%)**	10	6	60,00	MS 50%	5	5	100,00	5
2.c	18	12	66,67	2,4-D 1 ppm (MS 25%)	12	0	0,00	-	-	-	-	-
2.d	46	24	52,17	2,4-D 1 ppm (MS 25%)	4	0	0,00	-	-	-	-	-
				2,4-D 0.5 ppm (MS 25%)	20	6	30,00	MS 25%	6	0	0,00	-
2.e	51	25	49,02	2,4-D 0.5 ppm (MS 50%)	25	9	36,00	MS 50%	9	0	0,00	-
3.a	19	12	63,16	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	12	0	0,00	-	-	-	-	-
3.b	29	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.a	4	4	100,00	2,4-D 1 ppm (MS 100%)	4	3	75,00	MS 50%	3	3	100,00	3
4.b	11	10	90,91	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	9	2	22,22	MS 50%	2	2	100,00	2
4.c	12	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>T total</b>	<b>264</b>	<b>118</b>			<b>123</b>	<b>40</b>			<b>36</b>	<b>18</b>		<b>18</b>

\*Siguen en desarrollo. \*\* Se recuperaron hojas caídas de secciones nodales con hojas

**Tabla 20.-** Explantos totales iniciales y finales para cada desinfección probada en hojas juveniles e intermedias.

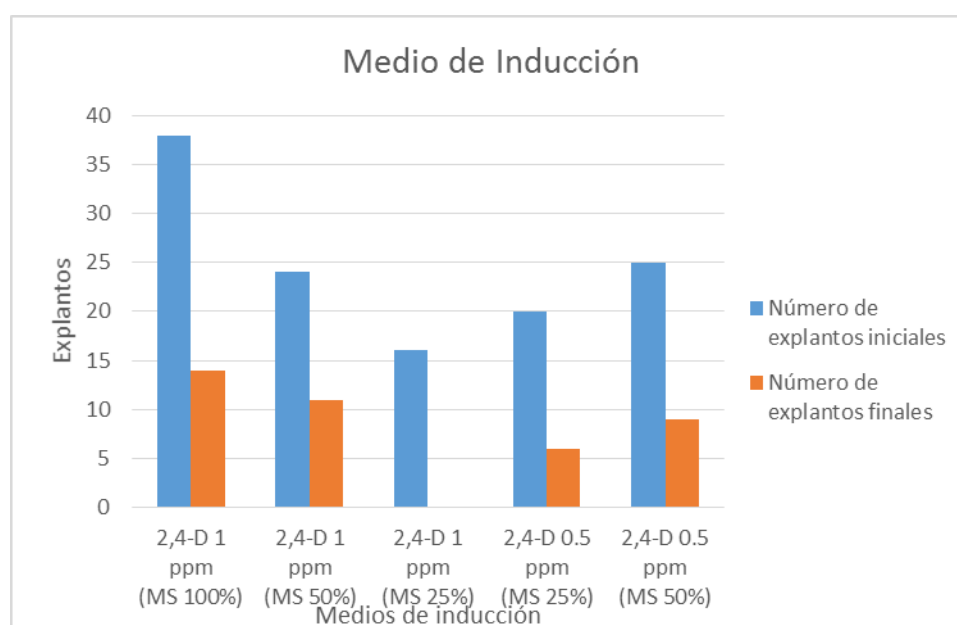
Desinfección	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales
1	39	13
2	150	79
3	48	12
4	27	14
<b>Total</b>	<b>264</b>	<b>118</b>



**Gráfico 1.-** Explantos totales iniciales y finales para cada desinfección probada en hojas juveniles e intermedias.

**Tabla 21.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de inducción probado con hojas juveniles.

Medio de inducción	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales
2,4-D 1 ppm (MS 100%)	38	14
2,4-D 1 ppm (MS 50%)	24	11
2,4-D 1 ppm (MS 25%)	16	0
2,4-D 0.5 ppm (MS 25%)	20	6
2,4-D 0.5 ppm (MS 50%)	25	9
<b>Total</b>	<b>123</b>	<b>40</b>

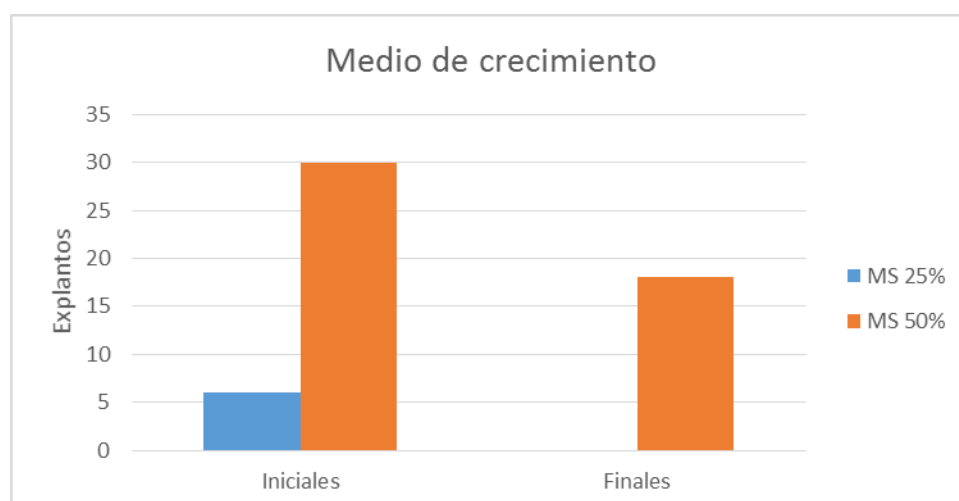


**Gráfico 2.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de inducción probado con hojas juveniles.



**Tabla 22.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de crecimiento probado con hojas juveniles.

Medio de crecimiento	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales
MS 25%	6	0
MS 50%	30	18
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>18</b>



**Gráfico 3.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de crecimiento probado con hojas juveniles.



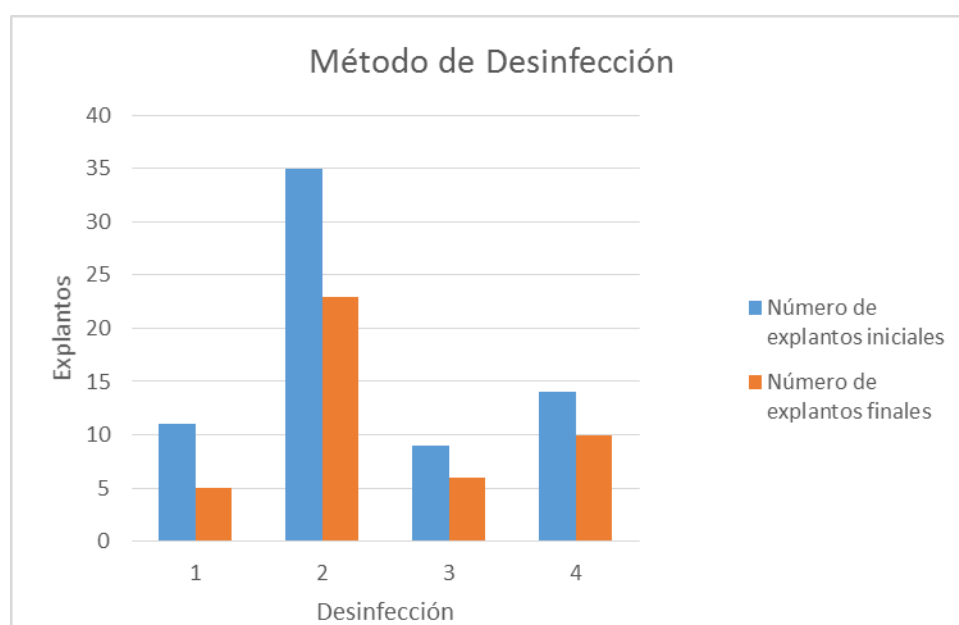
Tabla 23.- Experimentos realizados con las secciones nodales juveniles desprovistas de hojas.

Desinfección	Aislamiento			Inducción			Crecimiento							
	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia	Medio de inducción	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia	Medio	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales	% Supervivencia	Explantos con callos	Peso fresco promedio (g)	Peso seco promedio (g)
1.a	3	3	100,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	3	2	66,67	MS 50%	2	2	100,00	1	0,216	0,009
1.b	3	2	66,67	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	2	2	100,00	MS 50%	2	2	100,00	2	0,389	0,016
1.c	5	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.a	4	1	25,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	1	1	100,00	MS 50%	1	1	100,00	1	0,164	0,007
2.b	6	4	66,67	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	4	4	100,00	MS 50%	4	4	100,00	3	0,421	0,017
2.c	5	5	100,00	2,4-D 1 ppm (MS 25%)*	8	8	100,00	MS 25%	8	7	87,50	6	**	**
2.d	16	10	62,50	2,4-D 0.5 ppm (MS 25%)	7	6	85,71	MS 25%	6	6	100,00	3	**	**
				IBA 1 ppm (MS 100%)*	4	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-
2.e	4	3	75,00	2,4-D 0.5 ppm (MS 50%)*	5	4	80,00	MS 50%	4	4	100,00	4	**	**
3.a	1	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.b	8	6	75,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)*	8	7	87,50	MS 50%	7	4	57,14	2	0,365	0,015
4.a	4	4	100,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	4	2	50,00	MS 50%	2	2	100,00	2	0,334	0,013
4.b	7	6	85,71	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	6	4	66,67	MS 50%	4	4	100,00	3	0,554	0,022
4.c	3	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>44</b>			<b>52</b>	<b>40</b>			<b>40</b>	<b>36</b>		<b>27</b>	<b>2,443</b>	<b>0,098</b>

\*Se partieron al repicar. \*\*Siguen en curso

**Tabla 24.-** Explantos totales iniciales y finales para cada desinfección probada para las secciones nodales desprovistas de hojas.

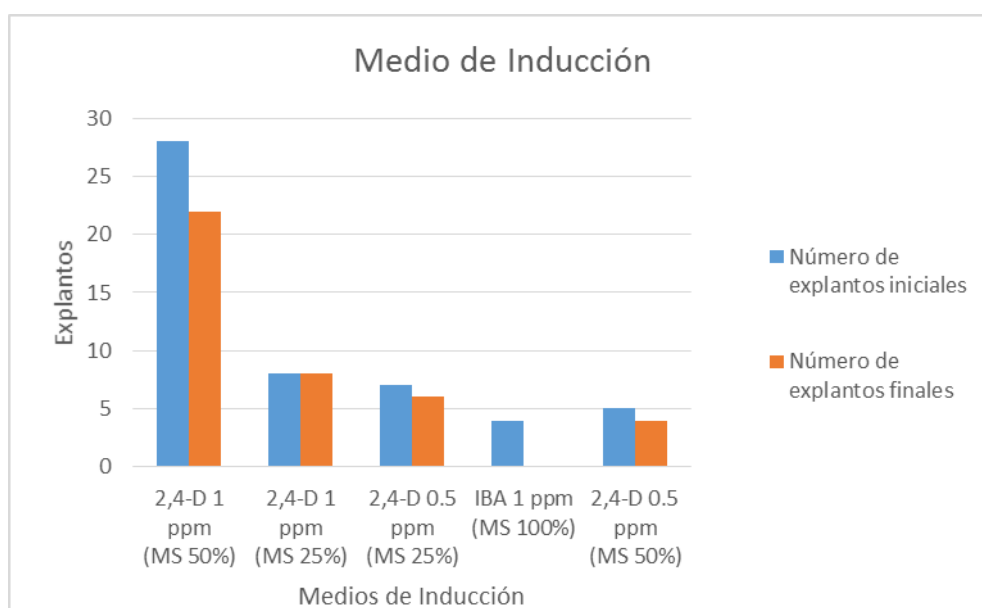
Desinfección	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales
1	11	5
2	35	23
3	9	6
4	14	10
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>44</b>



**Gráfico 4.-** Explantos totales iniciales y finales para cada método de desinfección probado para las secciones nodales desprovistas de hojas.

**Tabla 25.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de inducción probado para las secciones nodales desprovistas de hojas.

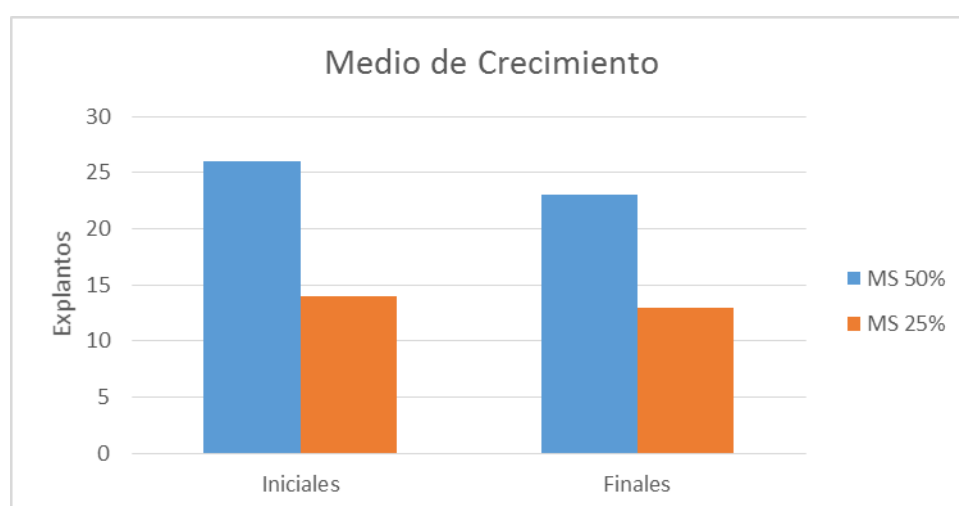
Medio de inducción	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales
2,4-D 1 ppm (MS 50%)	28	22
2,4-D 1 ppm (MS 25%)	8	8
2,4-D 0.5 ppm (MS 25%)	7	6
IBA 1 ppm (MS 100%)	4	0
2,4-D 0.5 ppm (MS 50%)	5	4
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>40</b>



**Gráfico 5.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de inducción probado para las secciones nodales desprovistas de hojas.

**Tabla 26.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de crecimiento probado para las secciones nodales desprovistas de hojas.

Medio de crecimiento	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales
MS 50%	26	23
MS 25%	14	13
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>36</b>



**Gráfico 6.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de crecimiento probado para las secciones nodales desprovistas de hojas.

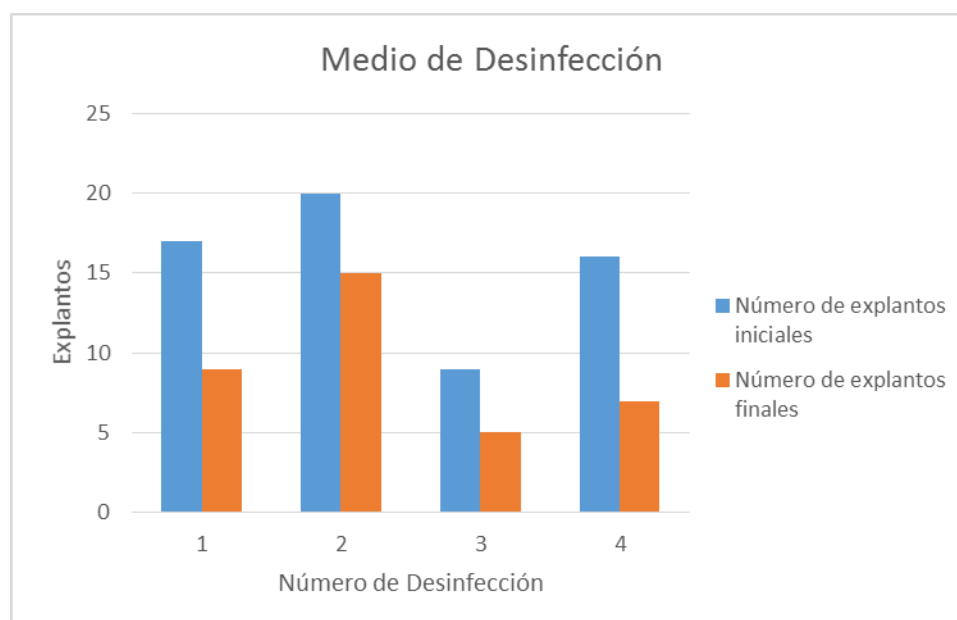
**Tabla 27.- Experimentos realizados con las secciones nodales juveniles con hojas.**

Desintencion	explantos		Supervivencia	inducción	explantos		Supervivencia	Medio	explantos		% Supervivencia	Explantos con callos	Peso fresco promedio	Peso seco promedio
	iniciales	finales			iniciales	finales			iniciales	finales				
1.a	9	7	77,78	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	7	6	85,71	MS 50%***	6	6	100,00	6	0,554	0,022
1.b	2	2	100,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	2	1	50,00	MS 50%	1	1	100,00	1	0,206	0,008
1.c	6	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.a	4	1	25,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	1	1	100,00	MS 50%	1	1	100,00	1	0,201	0,008
2.b	4	3	75,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	3	2	66,67	MS 50%	2	2	100,00	2	0,368	0,015
2.c	3	2	66,67	2,4-D 1 ppm (MS 25%)	2	1	50,00	MS 25%	1	1	100,00	1	**	**
2.d	6	6	100,00	2,4-D 0.5 ppm (MS 25%)*	3	1	33,33	MS 25%	1	1	100,00	1	**	**
				MS 50%*	2	2	100,00	MS 50%	2	2	100,00	2	0,484	0,019
2.e	3	3	100,00	IBA 1 ppm (MS 100%)*	3	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-
				2,4-D 0.5 ppm (MS 50%)	2	2	100,00	MS 50%	2	1	50,00	1	**	**
3.a	4	2	50,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	2	1	50,00	MS 50%	1	1	100,00	1	0,190	0,008
3.b	5	3	60,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	3	1	33,33	MS 50%	1	0	0,00	-	-	-
4.a	7	4	57,14	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	4	3	75,00	MS 50%	3	3	100,00	3	0,601	0,024
4.b	5	3	60,00	2,4-D 1 ppm (MS 50%)	3	3	100,00	MS 50%	3	3	100,00	3	0,564	0,023
4.c	4	0	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>62</b>	<b>36</b>			<b>37</b>	<b>24</b>			<b>24</b>	<b>22</b>		<b>22</b>	<b>3,168</b>	<b>0,127</b>

\*Se parten al repicarse. \*\*Siguen en curso. \*\*\* Solo el 50% de los explantos fueron pesados y

**Tabla 28.-** Explantos totales iniciales y finales para cada desinfección probada para las secciones nodales con hojas.

Desinfección	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales
1	17	9
2	20	15
3	9	5
4	16	7
<b>Total</b>	<b>62</b>	<b>36</b>

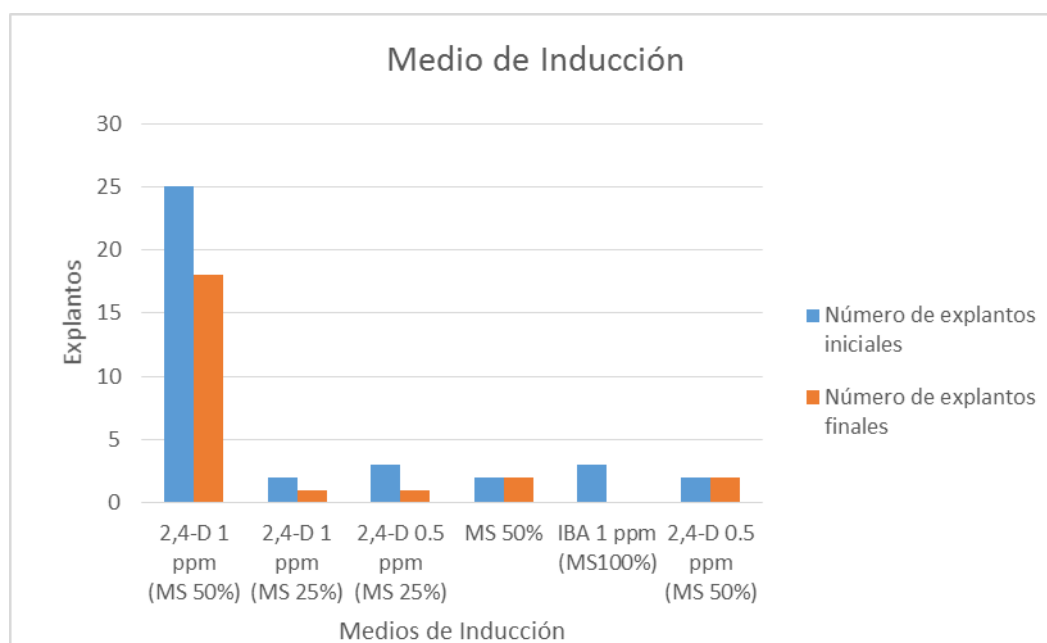


**Gráfico 7.-** Explantos totales iniciales y finales para cada método de desinfección probado para las secciones nodales con hojas.



**Tabla 29.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de inducción probado para las secciones nodales con hojas.

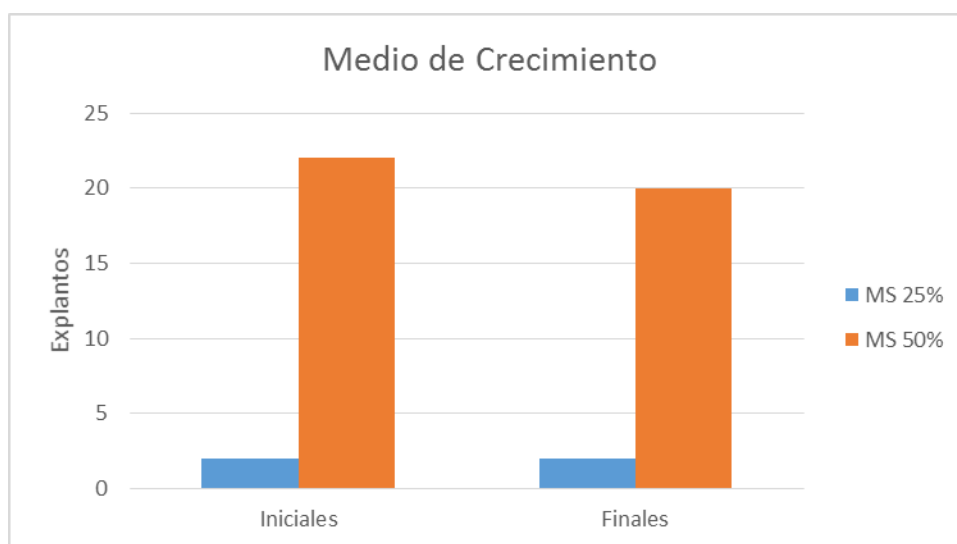
Medio de inducción	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales
2,4-D 1 ppm (MS 50%)	25	18
2,4-D 1 ppm (MS 25%)	2	1
2,4-D 0.5 ppm (MS 25%)	3	1
MS 50%	2	2
IBA 1 ppm (MS 100%)	3	0
2,4-D 0.5 ppm (MS 50%)	2	2
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>24</b>



**Gráfico 8.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de inducción probado para las secciones nodales con hojas.

**Tabla 30.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de crecimiento probado para las secciones nodales con hojas.

Medio	Número de explantos iniciales	Número de explantos finales
MS 25%	2	2
MS 50%	22	20
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>22</b>



**Gráfico 9.-** Explantos totales iniciales y finales para cada medio de crecimiento probado para las secciones nodales con hojas.

## 12. ANEXO II

## - Presentaciones en Reuniones Científicas

Abstract presentado en el XXIV Congreso SILAE. Punta Cana, Septiembre 2015.

[http://www.silae.it/docs/eventi/sl24/sl24\\_abstracts\\_book.pdf](http://www.silae.it/docs/eventi/sl24/sl24_abstracts_book.pdf)

XXIV  
CONGRESS  
SILAE

CHEMICAL DIFFERENCES BETWEEN MAYTENUS ILICIFOLIA  
MART. EX REISSEK (CELASTRACEAE) AND JODINA  
RHOMBIFOLIA HOOK ET ARN. (SANTALACEAE)

D. Caraballo, M. E. del Valle, O. Barrios,  
W. Abedini, and M.A. Rosella

Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.  
(dicaraballo@gmail.com)

Congorosa (*M. ilicifolia*) and Sombra de toro (*J. rhombifolia*) are both native species of Argentina, Brazil, Paraguay, Bolivia and Uruguay. The leaves of both species are widely used in folk medicine for different kinds of treatments. *M. ilicifolia* leaves are mainly used as a gastric antiulcerous, antitumor, antiasthmatic, slimming and for birth control. On the other hand, *J. rhombifolia* leaves are commonly used for bowel disorders, cough and ulcers treatment, antiinflammatory, antialcoholic, kidney and bladder disorders. However, since these two species have similar looks, and are also commonly named "sombra de toro" they tend to be commonly mistaken between them. The aim of the current work was to demonstrate the chemical differences between *J. rhombifolia* and *M. ilicifolia* extracts, through characterization reactions and TLC profiles. We analyzed the aqueous, ethyl acetate and dichloromethane extracts obtained from *J. rhombifolia* and *M. ilicifolia*. For the Liebermann Bouchard reaction we obtained the same response from both species for the ethyl acetate and dichloromethane extracts, being positive for steroidal saponins in the dichloromethane extracts. The results of the characterization reactions of saponins for the aqueous extracts (afrogénus capacity, emulsifying power, indirect Fehling and precipitation reactions with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and lead subacetate) once again show the same profile for both species. For the TLC analysis for the dichloromethane extract, employing two different solvent systems (toluene:ethyl acetate (8:2) and dichloromethane:methanol (95:5), we were able to obtain different elution profiles for both species. Thus we conclude that TLC analysis may be a helpful tool for the correct identification and differentiation of *J. rhombifolia* and *M. ilicifolia*.

**Bibliography**

1. Barboza, G. E. et al. *Kurtziana* 34 (1-2), 2009.
2. Furlan, V. et al. *Bonplandia*; 20 (2): 285-307, 2011.
3. Oliveira, S. G. D. et al. *J Ethnopharmacol* 140: 428-437, 2012.

**Biography**

B.S. in Chemistry, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (México), currently completing her Master in Science in Medicinal Plants at the Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

### 13. PÁGINAS WEB CONSULTADAS

1. <http://www.reservasanmartin.org.ar/Flora/Aut%C3%B3ctona/Sombra+de+Toro/29>
2. <http://www.herbotecnia.com.ar/aut-sombratoro.html>
3. <http://gonzaloantinwo.wordpress.com/2010/06/16/sombra-de-toro/>
4. <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/arboles-autoctonos/arboles-centro-y-norte/sombra-de-toro.htm>
5. [http://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE\\*jodina\\*rhombifolia](http://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE*jodina*rhombifolia)
6. <http://www.agro.unlpam.edu.ar/ingenieria/botanica/bot-CLAVES%20SISTEMATICAS.pdf>
7. <http://www.members.tripod.com/aromaticas/Identif.htm>
8. [http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=1093](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1093)
9. <http://www.tropicos.org/Name/28500360>
10. <http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/PBVyAP/File/A3/PIARFON%20MyE/Etnobotanica.pdf>
11. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Core%20Eudicotiled%F3neas%20Basales/Santalaceae.pdf>
12. <http://buscon.rae.es/drae>
13. [http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=713](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=713)

### 14. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Abedini, W.; Boeri, P.; Marinucci, L.; Ruscitti, M.; Scelzo, L.; (2000); "*Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas*"; Invest. Agr.: Sist. Recur. For.; 9 (1); 31-43.
- Abedini, W.; Sharry, S.; Rivas, M.C.; Molina, M. del C.; (2014); Curso: *Bioteología*; Universidad Nacional de La Plata.
- Abraham de Noir, F; Bravo, S.; Abdala, R.; (2002); "Mecanismos de dispersión de algunas especies de leñosas nativas del Chaco Occidental y Serrano"; Revista de Ciencias Forestales – Quebracho; 9; 140-150.
- Adinarayana, D.; Gunasekar, D.; Seligmann, O.; Wagner, H.; (1980); "Flavone O- and C-glycosides of *Rhynchosia beddomei*"; Phytochemistry; 19; 480-481.

- 
- Ahmad, N.; Faisal, M.; Anis, M.; Aref, I. M.; (2010); "*In vitro callus induction and plant regeneration from leaves explants of Ruta graveolens L.*"; South African Journal of Botany; 76; 597-600.
  - Al-Sane, K. O.; Shibli, R. A.; Freihat, N.M.; Hammouri, M.K.; (2005); "*Cell Suspension Culture and Secondary Metabolites Production in African Violet (Saintpaulia ionantha Wendl.)*"; Jordan Journal of Agricultural Sciences; 1 (1); 84-92.
  - Ali, H.; Dixit, S.; (2012); "*In vitro antimicrobial activity of flavonoids of Ocimum sanctum with synergistic effect of their combined form*"; Asian Pacific Journal of Tropical Disease; S396-S398.
  - Alonso, J., Desmarchelier, C.; (2005); "Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina"; 1ª Edición; LOLA; Buenos Aires; 533-535.
  - Alonso, J., Desmarchelier, C.; (2015); "Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina. Bases Científicas para su Aplicación en Atención Primaria de la Salud"; 1ª Edición; Corpus Libros Médicos y Científicos; Buenos Aires; 207-219, 605-607.
  - Asaka, I.; Li, I.; Hirotani, M.; Asada, Y.; Furuya, T.; (1993); "*Production of ginsenoside saponins by culturing ginseng (Panax ginseng) embryonic tissue in bioreactors*"; Biotechnol. Lett.; 15; 1259-1264.
  - Ashmed, M. S.; Fong, H. H.; Soejarto, D. D.; Doberstein, R. H.; Waller, D. P.; (1981); "*High-performance liquid chromatographic separation and quantification of maytansinoids in Maytenus ilicifolia*"; Journal of Chromatography; 213; 340-344.
  - Asociación Ribera Norte; (2015); "Programa de Conservación de la Flora Nativa, *Jodina rhombifolia*"; www.arn.org.ar.
  - Balbuena, T. S.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V.; Kato, M. J.; Floh, E. I. S.; (2009); "*In vitro morphogenesis and cell suspension culture establishment in Piper solmsianum C. DC. (Piperaceae)*"; Acta bot. bras.; 23(1); 274-281.
  - Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; de Martini Otofui, C.; Cipriani, T. R.; de Souza, L. M.; Sasaki, G. L.; Iacomini, M.; Marques, M. C. A.; Mesia-Vela, S.; (2007); "*Flavonoid-rich fraction of Maytenus ilicifolia Mart. Ex Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both*
-

- 
- H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and formation of nitric oxide*"; Journal of Ethnopharmacology; 113; 433-440.
- Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Mayer, B.; dos Santos, A. C.; Twardowschy, A.; Potrich, F. B.; Cipriani, T. R.; de Souza, L. M.; Sasaki, G. L.; Iacomini, M.; Marques, M. C. A.; Mesia-Vela, S.; (2009); "*Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of Maytenus ilicifolia Mart ex. Reissek*"; Journal of Ethnopharmacology; 123; 385-391.
  - Bakhriar, A.; Gleye, J.; Moulis, C.; Fouraste, I.; Stanislas, E.; (1990); "C-glycosylflavones from *Galipea Trifoliata*"; Phytochemistry; 29 (4); 1339-1340.
  - Barreca, D.; Bisignano, C.; Ginestra, G.; Bisignano, G.; Bellocco, E.; Leuzzi, U.; Gattuso, G.; (2013); "Polymethoxylated, C- and O-glycosyl flavonoids in tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) juice and their influence on antioxidant properties"; Food Chem; 19; 141 (2); 1481-1488.
  - Barthe, G. A.; Jourdan, P. S.; McIntosh, C.A.; Mansell, R. L.; (1987); "*Naringin and limonin production in callus culture and regenerated shoots from Citrus sp*"; J. Plant Physiol.; 127; 55-65.
  - Can, Ö. D.; Özkay, Ü. D.; Üçel; (2013); "Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms"; European Journal of Pharmacology; 2013; 699; 250-257.
  - Chaudhury, A.; Qu, R.; (2000); "*Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: effect of 6benzyladenine in callus induction médium*"; Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 60 (2); 113-120.
  - Cirpiani, T.R.; Mellinger, C.G.; de Souza, L. M.; Baggio, C.H.; Freitas, C.S.; Marques M. C. A.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L.; Iacomini, M.; (2008); "*Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity*"; Carbohydrate Polymers; 74; 274–278.
  - Cirpiani, T.R.; Mellinger, C.G.; de Souza, L. M.; Baggio, C.H.; Freitas, C.S.; Marques M. C. A.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L.; Iacomini, M.; (2009); "*Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant Maytenus ilicifolia*"; Carbohydrate Polymers; 78; 361–363.
-

- 
- Cleland, R. E.; (1995); "Auxin and cell elongation"; Plant Hormones; Kluwer Academic Publishers; Dordrecht; The Netherlands; 214–227.
  - Crestani, S.; Rattman, Y. D.; Cipriani, T. R.; De Souza, L. M.; Iacomini, M.; Kassuya, C. A. L.; Marques, M. C. A.; da Silva-Santos, J. E.; (2009); "A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induce in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*"; Vascular Pharmacology; 51; 57–63.
  - Davicino R.; Mattar, M. A.; Casali, Y. A.; Correa, S. G.; Pettenati, E. M.; Micalizzi, B.; (2007); "Actividad antifungica de extractos de planta usadas en medicina popular en Argentina"; Revista Peruana de Biología; 14 (2); 247-251.
  - Davies, P. J.; (1995); "Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology"; Kluwer Academic Publishers; London.
  - de Klerk, G. J., Arnhold-Schmith, B.; Lieberei, R.; Neumann, K. H.; (1997); "Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects"; Biología Platarum; 39 (1); 53-66.
  - de Oliveira Ribeiro, L.; Vilela Paiva, L.; Souza Padúa, M.; Régis Santos, B.; Alves, E.; Stein, V. C.; (2012); "Morphological and ultrastructural analysis of various types of banana callus, cv. Prata anã"; Acta Scientiarum Agronomy; Maringá; 34 (4); 423-429.
  - de Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Serrato, R. V.; da Costa, D. E.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L.; (2008); "Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performan liquid chromatography-electrospray mass spectrometry"; Journal of Chromatography A; 1207; 101–109.
  - de Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L.; (2008); "HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*"; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 47; 59–67.
  - de Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Sant'Ana, C. F.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L.; (2009); "Heart-cutting two-dimensional (size exclusion reversed phase) liquid chromatography-mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*"; Journal of Chromatography A; 1216; 99-105.
-

- Dewick, P. M.; (2009); "Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach"; Ed. Wiley; 3ª Edición; Reino Unido.
- **Diagnóstico y Tratamiento de Úlcera Péptica Aguda Complicada.** México: Secretaría de Salud; **5 de octubre de 2015.**
- Díaz, S.; Enrico, L.; Cáceres, D.; Chebel, A.; Cingolani, A. M.; Cuchiatti, A.; Gurvich, D.; Kopta, F.; Kopta, R.; Menna, J. M.; Navarro, J. L.; Re, G. E.; Tecco, P.; Urcelay, C.; Vidallé, E.; (2011); "Propuesta de Franjas Forestales de Caminos para Múltiples Beneficios Ecosistémicos en la Provincia de Córdoba" Contribución del Núcleo DiverSus al manejo integrado de las rutas de la Provincia de Córdoba coordinada por el Foro Ambiental Córdoba; 3-14.
- Duarte-Almeida J. M.; Negri, G.; Salatino, A.; de Carvalho, J. E.; Lajolo, F. M.; (2007); "Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylates glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice"; Phytochemistry; 68; 1165-1171.
- Farmacopea Argentina; (2013); Ministerio de Salud de la Nación, Secretaria de Políticas, Regulación e Institutos; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Instituto Nacional de Medicamentos; Octava Edición; Tercer Volumen.
- Farmacopea Brasileira; (2010); Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria; Quinta Edición; Volumen 2; Brasilia.
- Farmer-Knowles, H.; (2010); "La Biblia de las Plantas Medicinales"; Gaia; 1ª Edición; Gran Bretaña; 8-13.
- Fenner, R.; Betti, A. H.; Mentz, L. A.; Rates, S. M. K.; (2006); "*Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica*"; Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences; 42 (3); 369-394.
- Ferrer L., I.; Pérez P., J. M.; Herrerías G., J. M.; (2004); "*Guía de Seguimiento Farmacoterapéutico sobre Úlcera Péptica*"; Universidad de Granada; 5-11.
- Figueiredo, M. A.; Paiva, R.; Souza, A. C.; Porto, J. M. P.; Nogueira, G. F.; Soares, F. P.; (2007); "*Indução in vitro de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo*"; Revista Brasileira de Biociências; 5 (2); 288-290.



- 
- Fonseca de Oliveira, J.; Braga, A. C. S.; Nunes de Oliveira, M.; Ávila, A. S.; Caldeira-de-Araujo, A.; Cardoso, V. N.; Bezerra, R. J. A. C.; Bernardo-Filho, M.; (2000); “*Assessment of the effect of Maytenus ilicifolia (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium.99m*”; Journal of Ethnopharmacology; 72; 179-184.
  - Ghera, C. M.; León, R. J. C.; (1987); “Successional changes in the agroecosystems of the rolling pampas”; L. Walker; Ecosystems of disturbed grounds.
  - Giménez, D. O.; Beltrano, J.; (2014); Curso de Fisiología Vegetal “Reguladores Vegetales y Herbicidas”; Catedra de Fisiología Vegetal; Universidad Nacional de la Plata.
  - Giménez, J. E.; Hurtado, M. A.; Matrinez, O. R.; (2008); “Characterization of abiotic conditions affecting vegetation distribution in the river Plate coastal plain, Argentina”; Acta Scientiarum. Biological Science; 30 (4); 423-430.
  - Goleniowski. M. E.; Bongiovanni, G. A.; Palacio, L.; Nuñez, C. O.; Cantero, J. J.; (2006); “*Medicinal plants from the “Sierra Comechingones”, Argentina*”; Journal of Ethnopharmacology; 107; 324-341.
  - Gorzalczany, S.; Marrassini, C.; Miño, J.; Acevedo, C.; Ferraro, G.; (2011); “Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*”; Journal of Ehtnopharmacology; 2011; 134; 733-738.
  - Graham, J. G.; Quinn, M. L.; Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R.; (2000) “*Plants used against cancer- an extension of the work of Jonathan Hartwell*”; Journal of Ethnopharmacology; 73; 347-377.
  - Grando, M. F.; Eichler, L.; Tanabe, C. R.; Santos, J. F.; Santos, C. M.; (1993); “*Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia*”; Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal; 5 (2); 139-144.
  - Henriquez, A.; Zuanazzi, J.; Mentz, L.; Vignoli da Silva, M.; (2001); “*Maytenus ilicifolia (espinheira santa)*”; Monografía Riprofito-CYTED. Informe Personal.
-

- 
- Hilsenbeck, R. A.; Mabry, T. J.; (1983); "C-glycosylflavones from *Siphonoglossa sessilis*"; *Phytochemistry*; 22 (10); 2215-2217.
  - Hnatyszyn, O.; Moscatelli, V.; García, J.; Rondina, R.; Costa, M.; Arranz, C.; Balaszczuk, A.; Ferraro, G.; Coussio, J. D.; (2003); "*Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the corpus cavernosum of Guinea pig*"; *Phytomedicine*; 10; 669-674.
  - Hofmann, N.; Nelson, R. L.; Korban S. S.; (2004); "*Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean*"; *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 77; 157–163.
  - Hurrel, J; Bazzano, D.; (2003); "Arbustos I. Biota Rioplatense VIII"; *LOLA*; Buenos Aires; 68-69.
  - Islam, M. N.; Ishita, I. J.; Jung, H. A.; Choi, J. S.; (2014); "Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaris* exhibited potent anti-glycation properties"; *Food and Chemical Toxicology*; 69; 55-62.
  - Itokawa, H.; Shiota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Tomioka, N.; Itai, A.; (1990); "*New triterpene dimers from Maytenus ilicifolia*"; *Tetraedron Letters*; 31 (47); 6881-6882.
  - Itokawa, H.; Shiota, O.; Ikuta, H.; Morita, H.; Takeya, K.; Itaka, Y.; (1991); "*Triterpenes from Maytenus ilicifolia*"; *Phytochemistry*; 30 (11); 3713-3716.
  - Iwasa, K.; Takao, N.; (1982); "*Formation of alkaloids in Corydalis ophiocarpa callus cultures*"; *Phytochemistry*; 21; 611-614.
  - Iwashina, T.; Tobe, H.; Takahashi, H.; Tomohisa, Y.; (2011); "Flavonoids from achlorophyllous plants, *Petrosavia sakurai*"; *Biochemical Systematics and Biology*; 39; 883-884.
  - Jaina, S. C.; Pancholia, B.; Jainb, R.; (2012); "*In-vitro Callus Propagation and Secondary Metabolite Quantification in Sericostoma pauciflorum*"; *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*; 11 (4); 1103-1109.
  - Jorge, R. M.; Leite, J. P. V.; Oliveira, A. B.; Tagliati, C. A.; (2004); "*Evaluation on antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of Maytenus ilicifolia*"; *Journal of Ethnopharmacology*; 94; 93.100.
-

- 
- Kaiper, C.; Messchmidt, A. A.; Montagner, D. F.; Nascimento, A. C. A.; Garlet, T. M. B.; (2010); “DADOS PRELIMINARES DA MICROPROPAGAÇÃO DE CANCOROSA-DE-TRÊS-PONTAS (*Jodina rhombifolia* Hook. & Arn.)”; Seminario Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão; XIII Mostra de Iniciação Científica.
  - Karuppusamy, S.; (2009); “*A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures*”; Journal of Medicinal Plants Research; 3 (13); 1222-1239.
  - Khan, T.; Krupadanam, D.; Anwar, Y.; (2008); “*The role of phytohormone on the production of berberine in the calli culture of an endangered medicinal plant, turmeric (Cosciniium fenustratum L.)*”; Afr. J. Biotechnol.; 7; 3244-3246.
  - Kiong, A. L.; Mahmood, M.; Fodzillan, N. M.; Daud, S. K.; (2005); “*Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by Centella asiatica callus culture*”; Pak. J. Biol. Sci.; 8; 1160-1169.
  - Kuklinski, C.; (2000); “FARMACOGNOSIA. ESTUDIO DE LAS DROGAS Y SUSTANCIAS MEDICAMENTOSAS DE ORIGEN NATURAL”; OMEGA; España.
  - Lahitte, H. B.; Hurrell, J. A.; (1994); “Modelos etnobotánicos en etnomedicina. Reflexiones en ecología biocultural sobre la base de un estudio en el noroeste de la Argentina”; Est. Div. Etnogr.; 7 (1); 1-18. FCNM.UNLP.
  - Lahitte, H. B.; Hurrell, J. A.; (1994); “Flora arbórea y arborescente de la Isla Martín García”; Comisión de Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aires (CIC). Serie Informe No. 47.
  - Lahitte, H. B.; Hurrell, J. A.; (1995-1996); “Las Plantas de la Medicina Popular de la Isla Martín Garcia (Nativas y Naturalizadas); Ministerio de la Producción de la Provincia de Buenos Aires. Comisión de Investigación Científica; Serie Informe N°50; pg. 60-61.
  - Laine, L.; Jensen, D.; (2012); “*Management of Patients With Ulcer Bleeding*”. Am J Gastroenterol; 107; 345– 360.
  - Lau, J.; Sung, J.; Hill, C.; Henderson, C.; Howden, C.; Metz, D.; (2011); “*Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer*”
-

- 
- disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality”; *Digestion*; 84; 102–113.
- Leal, F.; Matos, M.; Coelho, A.C.; Pinto-Carnide, O.; (2012); “*In vitro* Multiplication of Aromatic and Medicinal Plants and Fungicide Activity”; *Fungicides for Plant and Animal Diseases*; January; 119-138.
  - Lee, W.; Bae, J. S.; (2015); “Antithrombotic and antiplatelet activities of orientin *in vitro* and *in vivo*”; *Journal of Functional Foods*; 17; 388-398.
  - Leme, T. S. V.; Prando, T. B. L.; Gasparotto, F. M.; de Souza, P.; Crestani, S.; de Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Lourenço, E. L. B.; Junior, A. G.; (2013); “*Role of prostaglandine/cAMP pathway in diuretic and hypotensive effects of purified fraction of Maytenus ilicifolia Mart ex Reissek (Celastraceae)*”; *Journal of Ethnopharmacology*; 150; 154–161.
  - Leyser, O.; (2001); “*Auxin signalling: the beginning, the middle and the end*”; *Current Opinion in Plant Biology*; 4; 382–386.
  - Li, Y.; Ma, S.; Yang, Y.; Ye, S.; But, P. P.; (2002); “Anitviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge”; *Journal of Ethnopharmacology*; 79; 365-368.
  - Lindhorst, T. K.; (2007); “*Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*”; Wiley-VCH; 3ª Edición.
  - Lu, Y.; Foo, L. Y.; (2000); “Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*”; *Phytochemistry*; 55; 263-267.
  - Luna, M. L.; (2001); Tesis Doctoral “Estudio morfo-estructurales en *Jodina rhombifolia* [Hook. & Arn.] Reissek [Santalaceae]”; Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
  - Luna, M. L.; Sota, E. R.; (2003); “*Estructura foliar de Jodina rhombifolia (Santalaceae) y sus variaciones en relación al área de distribución*”; *Ineringia Serie Botánica*; 58; 3-12.
  - Luna, M. L.; Giudice, G. E.; (2005); “Anatomy of the haustorium of *Jodina rhombifolia* (Santalaceae)”; *Nordic Journal of Botany*; 24 (5); 1-7.
  - Maciel da Silva, V.; (2009); Tesis de Maestría: “Avaliação da Actividade Antitumoral, e Caracterização Parcial dos Extractos Metanólicos da *Jodina rhombifolia* Hook. & Arn.”; Universidad Federal de Pelotas; Pelotas; Brasil.
-

- 
- Maharik, N.; Elgengaihi, S.; Taha, H.; (2009); “*Anthocyanin production in callus cultures of Crataegus sinaica Bioss*”; *Intrn. J. Academic Res.*; 1; 30-34.
  - Marçal da Costa, P.; Ferreira, P. M. P.; Bolzani, V. S.; Furlan, M; Macedo dos Santos, V. A. F. F.; Corsino, J; Odorico de Moraes, M.; Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Pessoa, C.; (2008); “*Antiproliferative activity of pristimerin isolated from Maytenus ilicifolia (Celastraceae) in human HL-60 cells*”; *Toxicology in vitro*; 22; 854–863.
  - Martín, A. O.; (2014); “Técnicas de Refinamiento y Recuperación de Pastizales”; Serie didáctica N°85; Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Agronomía y Zootecnia; 9-16.
  - Martín, G. O.; Nicosia, M. G.; Lagomarsino, E.D.; (2014); “Fenología foliar en leñosas nativas del Chaco semiárido de Tucumán y algunas consideraciones para su aprovechamiento forrajero”; Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán; Departamento de Producción Animal.
  - Martínez, G. J.; (2005); “Recolección y Comercialización de Plantas Medicinales en el Departamento de Santa María, Provincia de Córdoba, Argentina”; *Acta Farm. Bonaerense*; 24 (4); 575-584.
  - Melihno de Magalhaes, P.; (2000); “Agrotecnología para el cultivo de espinheira santa o sombra de toro” en: Martínez, J.; Bernal, H.; Cáceres, A.; “Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales en Iberoamérica”; Convenio Andrés Bello: CYDET.
  - Melo, S. F.; Soares, S.F.; da Costa, R. F.; da Silva, C. R.; de Oliveira, M. B. N.; Bezerra, R. J. A. C.; Calderia-de-Araújo, A.; Bernanrdo-Filho, M.; (2001); “*Effect of the Cymbopogon citratus, Maytenus ilicifolia and Baccharis genistelloides extracts against the stannous chloride oxidative damage in Escherichia coli*”; *Mutation Research*; 496; 33–38.
  - Montanha, J. A.; Schenkel, E. P.; Cardoso-Taketa, A. T.; Dresch, A. P.; Langeloh, A.; Dallegrove, E.; (2009); “*Chemical and anti-ulcer evaluation of Jodina rhombifolia (Hook. & Arn.) Ressek extracts*”; *Brazilian Journal of Pharmacognosy*; 19 (1A); 29-32.
  - Montarani, T; Bevilacqua, E.; (2002); “*Effect of Maytenus ilicifolia Mart. on pregnant mice*”; *Elsevier Science Inc. Contraception*; 65; 171-175.
-

- 
- Morales, J.; Carneiro, C. M.; Serrano, O.; (2001); "Estado de la Información Forestal en Argentina"; Monografías de Países; Volumen 1; Capítulo VIII. 211-255.
  - Mossi, A. J.; Cansian, R. L.; Carvalho, A. Z.; Dariva, C.; Oliveira, J. V.; Mazutti, M.; Filho, I. N.; Echeverrigaray, S.; (2004); "*Extraction and characterization of volatile compounds in Maytenus ilicifolia, using high-pressure CO<sub>2</sub>*"; Fitoterapia; 75; 168-178.
  - Murriello, S.; Arturi, M.; Brown, A. D.; (1993); "Fenología de las especies arbóreas de los talares del este de la Provincia de Buenos Aires"; Ecología Austral; 3; 25-31.
  - Nachtigal, G. C.; (2011); Tesis de Maestría: "Avaliação *in vitro* da actividade antiproliferativa de extractos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook. & Arn. e *Carapa gianensis* Aubl sobre células HL-60, Linfoma Daudi e Fibroblastos NIH-3T3"; Universidad Católica de Pelotas; Pelotas; Brasil.
  - Nagaprashantha, L. D.; Vatsyayan, R.; Singhal, J.; Fast, S.; Roby, R.; Awasthi, S.; Singhal, S. S.; (2011); "Anti-cancer effect of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer"; Biochemical Pharmacology; 82; 1100-1109.
  - Nelson, D. L.; Cox, M. M.; (2006); "*Lehninger- Principios de Bioquímica*"; Omega; 4<sup>a</sup> Edición.
  - Nickrent, D. L.; Malécot, V.; Vidal-Russel, R.; Der, J. P.; (2010); "A revised classification of Santales"; Taxon; 59 (2); 538-558.
  - Nikolaeva, T. N.; Zagoskina, N. V.; Zaprometov, M. N.; (2009); "*Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2,4-D and NAA*"; Russian Journal of Plant Physiology; 56; 45-49.
  - Ochatt, S. J.; Power, J. B.; (1992); "Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants"; Plant biotechnology, Comprehensive biotechnology; Segundo suplemento; 99-127.
  - Oliveiras, S. G. D.; de Moura, F. R. R.; Demarco, F. F.; Nascente, P. S.; del Pino, F. A. B.; Lund, R. G.; (2012); "*An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in*
-

- 
- the Brazilian Unified Health System*"; Journal of Ethnopharmacology; 140; 428-437.
- Olivira, A. J. B.; Koika, L.; Reis, F. A. M.; Shepherd, S. L.; (2001); "*Callus culture of Aspidosperma ramiflorum Muell.-Arg. Growth and alkaloid production*"; Acta Scientia; 23; 609-612.
  - Pellegrineschi, A.; Brito, R. M.; McLean, S.; Hoisington, D.; (2004); "*Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat*"; Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 77; 245–250.
  - Peng, X.; Zheng, Z.; Cheng, K. W.; Shan, F.; Ren, G. X.; Chen, F.; Wang, M.; (2008); "*Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation end products*"; Food Chemistry; 106; 475-481.
  - Petrášek, J.; Elčknér, M.; Morris, D. A.; Zažimalová, E.; (2002); "*Auxin efflux carrier activity and auxin accumulation regulate cell division and polarity in tobacco cells*"; Planta; 216; 302–308.
  - Praveena, R.; Sadasivam, K.; Deepha, V.; Sivakumar, R.; (2014); "*Antioxidant potential of orientin: A combined experimental and DFT approach*"; Journal of Molecular Structure; 1061; 114-123.
  - Radice, S.; "*Morfogénesis in vitro*" En: Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L.; (2004); "*Bioteconología y Mejoramiento Vegetal*"; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); 27-33.
  - Rajasekaran, T.; Rajendran, L.; Ravishankar, G. A.; Venkataraman, L. V.; (1991); "*Influence of nutrient stress on pyrethrin production by cultured cells of pyrethrum (Chrysanthemum cinerariaefolium)*"; Curr. Sci.; 60; 705-707.
  - Ramakrishnan, K.; Salinas, R.; (2007); "*Peptic Ulcer Disease*"; Am Fam Physician; 76; 1005-1012.
  - Ratera, E. L.; Ratera, M. O.; (1980); "*Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular*"; Ed. Hemisferio Sur; 1ª Ed.; 12-20, 107, 148-149.
  - Rattmann, Y. D.; Cipriani, T. R.; Sasaki, G. L.; Iacomini, M.; Reick, L.; Marques, M. C. A.; da Silva-Santos, J.; (2006); "*Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of Maytenus*
-

- 
- ilicifolia* Mart ex Resissek /Celastraceae) leaves”, Journal of Ethnopharmacology; 104; 328-335.
- Regalado V., A. I.; Sánchez P., L. M.; Mancebo D., B.; (2012); “*Tratamientos convencionales y medicina alternativa de la úlcera péptica*”; Farmacodivulgación; Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA); Rev. Cubana Farm.; 46 (1); 127-137.
  - Romero, R. A.; (2014) Tesis doctoral “Relevamiento de plantas empleadas en medicina popular en la Provincia de Jujuy, con especial referencia al Departamento Capital y Alrededores”; Universidad de Buenos Aires; Facultad de Farmacia y Bioquímica.
  - Rück, A.; Palme, K.; Venis, M. A.; Napier, R. M.; Felle, H. H.; (1993); “*Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in Zea mays protoplasts*”; The Plant Journal; 1993; 4; 41–46.
  - San José, C; (2013); “Herbario Natural, Todas las especies y usos medicinales”; LIBSA; Madrid; 3-6.
  - Schmeda-Hirschmann, G.; Jordan, M.; Gertn, A.; Wilken, D.; Hormazabal, E.; Tapia, A. A.; (2004); “*Secondary metabolite content in Fabiana imbricata plants and in vitro cultures*”; Z. Naturforsch.; 5; 48 -54.
  - Sen, M. K.; Nasrin, S.; Rahman, S.; Jamal, A. H. M.; (2014); “*In vitro callus induction and plantlet regeneration of Achyranthes aspera L., a high value medicinal plant*”; Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine; 4(1); 40-46.
  - Sharry, S.; Abedini, W; Basiglio Cordal, M.A.; Briones, V.; Roussy, L.; Stevani, R.; Galarco, S.; Adema, M.; (2011); “Food and medicinal value of some forest species from Buenos Aires (Argentina)”; Emir. Journal of Foods Agriculture; 23(3); 222-236.
  - Sierra, E.M.; Hurtado, R.H.; Spescha, L.; (2001); “Corrimiento de las isoyetas anuales medias decenales en la Región Pampeana 1941-1990”; Revista Argentina de Agrometeorología; 1; 95-99.
  - Silvia, A; Giner, R. M.; Recio, M. R.; Spegazzini, E. D.; Ríos, J. L.; (2009); “Anti-inflammatory activity of flavonoids from Cayaponia tayuya roots”; Journal of Ethnopharmacology; 121; 333-337.
-



- 
- Sleslak, H.; Popielarska, M.; Góralski, G.; (2005); "Morphological and Histological Aspects of 2,4-D Effects on Rape Explants (*Brassica napus* L. cv. Kana) Cultured In Vitro"; Acta Biológica Cracoviensia Series Botánica; 47/1; 219-226.
  - Steiner, N.; Viera, F. N.; Maldonado, S.; Guerra, M. P.; (2005); "Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures"; Brazilian Archives of Biology and Technology; 48 (6); 895-903.
  - Soares, L. A. L.; Oliveira, A. L.; Ortega, G. G.; Petrovick, P.R.; (2004); "Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*"; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 36; 787-790.
  - Soares, P.; (2013); Tesis de Maestria "Toxicidade de extratos de plantas medicinais obtidos com dióxido de carbono supercrítico à *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae)"; Universidad del Valle del Río de las Campanas. San Leopoldo.
  - Soberón, J. R.; Sgariglia, M. A.; Sampietro, D. A.; Quiroga, E. N.; Vattuone, M. A.; (2007); "Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina"; Journal of Applied Microbiology; 102; 1450-1461.
  - Spitzer, V.; De, L.; Bordignon, S. A.; Schenkel, E. P.; Marx, F.; (1994); "Identification of nine acetylenic fatty acids, 9-hydroxystearic acid and 9,10-epoxystearic acid in the seed oil of *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. (Santalaceae)"; Journal of the American Oil Chemists Society; 71; 1343–1348.
  - Şöhretoğlu, D.; Sterner, O.; (2011); "Isoflavonoids, flavonoids and flavans form *Potentilla astracanic*"; Biochemical Systematics and Ecology; 39; 666-668.
  - Taha, H. S.; El-Rahman, A.; Fathalla, M.; Kareem, A. E.; Aly, N. E.; (2008); "Successful application for enhancement and production of anthocyanin pigment from calli cultures of some ornamental plants"; Aust. J. Basic and Appl. Sci.; 2; 1148-1156.
  - Teves, M. R.; Wendel, G. H.; Pelzer, L. E.; (2015); "Reduction in voluntary ethanol intake following repeated oral administration of *Jodina*
-

- 
- rhombifolia* lyophilized aqueous extract in male Wistar rats”; Journal of Ethnopharmacology; 161; 170-174.
- Thorsen, K.; Søreide, J. A.; Kvaløy, J. T.; Glomsaker, T.; Søreide, K.; (2013); “*Epidemiology of perforated peptic ulcer: Age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality*”; World J Gastroenterol; 19 (3); 347-354.
  - Thorsen, K.; Søreide, J.; Soreide, K.; (2014); “*What Is the Best Predictor of Mortality in Perforated Peptic Ulcer Disease? A Population-Based, Multivariable Regression Analysis Including Three Clinical Scoring Systems*”; J Gastrointest Surg; 18; 1261–1268.
  - Tiberti, L. A.; Yariwake, J. H.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K.; (2007); “*Identification of flavonols in leaves of Maytenus ilicifolia y M.aquifolium (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis*”; Journal of Chromatography B; 846; 378-384.
  - Umamaheswai, A.; Lalitha, V.; (2007); “*In vitro effect of various growth hormones in Capsicum annum L. on the callus induction and production of Capsiacin*”; J. Plant Sci.; 2; 545-551.
  - Unión Mundial para la Naturaleza: <http://www.iucnredlist.org/> (2014).
  - Velloso, J .C. R.; Khalil, N. M.; Formenton, V. A. F.; Ximenes, V. F.; Fonseca, L. M.; Furlan, M.; Brunetti, I. L.; Oliveira, O. M. M. F.; (2006); “*Antioxidant activity of Maytenus ilicifolia root bark*”; Fitoterapia; 77; 243-244.
  - Verspohl, E. J.; Fujii, H.; Homma, K.; Buchwald-Werner, S.; (2013); “*Testing of Perilla frutescens extract and vicenin-2 for their antispasmodic effect*”; Phytomedicine; 20; 427-431.
  - Vikrant; Rashid, A.; (2003); “*Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4-D pulse – treatment of mature embryos of Paspalum scrobiculatum*”; Biologia Plantarum; 46; 297–300.
  - Vistuba, J. P.; Piovezan, M.; Pizzolatti, M. G.; Rebelo, A. M.; Azevedo, M. S.; Vitali, L.; Costa, A. C. O.; Micke, G. A.; (2013); “*Increasing the instrumental throughput of gas chromatography method using multiple injections in a single experimental run: Application in determination of friedelan-3-ol and friedelin in Maytenus ilicifolia*”; Journal of Chromatography A; 1274; 159-164.
-

- Vrinda, B.; Devi, P. U.; (2001); "Radiation protection of human lymphocyte chromosomes *in vitro* by orientin and vicenin"; Mutation Research; 498; 39-46.
- Wade, Jr. L. G.; (2006); "Química Orgánica"; Ed. Pearson; 5ª Edición; Madrid.
- Wagner, H.; Blatt, S.; (2001); "Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas"; Springer; 2ª Edición; 230-231.
- Waller, G. R.; Mac Vean, C. D.; Suzuki, T.; (1983); "*High production of caffeine and related enzyme activities in callus cultures of Coffea arabica L.*"; Plant Cell Rep.; 2; 109-112.
- Wang, S.; Yu, Y.; Feng, Y.; Zou, F.; Zhang, X.; Huang, J.; Zhang, Y.; Zheng, X.; Huang, X. F.; Zhu, Y.; Liu, Y.; (2015); "*Protective effect of the orientin on noise-induced cognitive impairments in mice*"; Behavioural Brain Research; 296; 290-300.
- Yu, L.; Wang, S.; Chen, X.; Yang, H.; Li, X.; Xu, Y.; Zhu, X.; (2015); "*Orientin alleviates cognitive deficits and oxidative stress in A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced mouse model of Alzheimer's disease*"; Life Sciences; 2015; 121; 104-109.
- Zepeda, S.; (2010); "*Hemorragia de tubo digestivo alto no variceal*"; Rev Gastroenterol Mex; 75 (2); 31-34.
- Zhao, J.; Davis, L. C.; Verpoorte, R.; (2005); "*Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites*"; Biotechnol. Adv.; 23; 283-333.
- Zhu, N.; Sharapin, N.; Zhang, J.; (1998); "*Three glucosides from Maytenus ilicifolia*"; Phytochemistry; 47 (2); 265-268.