

50524
66



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

INVESTIGACION DE LABORATORIO SOBRE EL
CULTIVO *in vitro* DE *Anredera scandens* E
IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARTINEZ CHAVANDO JUANA ITZE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JULIO 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
P R E S E N T E .

Comunico a usted que a la alumna MARTINEZ CHAVANDO JUANA ITZE
con número de cuenta 9658509-8 de la carrera de Q. F. B.
se le ha fijado el día 07 del mes de Julio de 2003 a las 11:00 hrs
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado

PRESIDENTE	Q. F. LEONOR AGUILAR SANTELISES	
VOCAL	Q. F. B. JOSE OSCAR LOPEZ MORENO	
SECRETARIO	Q. F. B. ALICIA CABRERA AGUILAR	
SUPLENTE	Q. F. B. MAURO ARRIETA SAICHED	
SUPLENTE	Q. F. B. SUSANA MENDEZ VAZQUEZ	

El título de la tesis que se presenta es Investigación de laboratorio sobre
el cultivo *in vitro* de Anredera scandens e identificación de metabolitos secundarios.

Opción de titulación Tesis experimental

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Mexico, D.F. a. 16 de junio de 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres *Lupita y Román*

por ser las columnas más sólidas en mi vida,
por su comprensión, por su apoyo,
por sus ánimos y
por darme la opción de "SER" sin cuestionar.

TONA:

por tu cariño, por tu ejemplo y
por sacarme de infinidad de apuros.

Gloria:

por tu alegría, y por estar siempre
allí en el momento preciso.

Ariel y Jacob:

por iluminar mi vida con una sonrisa.

Gaby:

por tu entusiasmo, por confiar y
tener la seguridad que éste sueño se haría realidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Nicky:

por tu apego y tus desvelos

A MIS PROFESORES

A:

Ivonne Rivera, Marcela Santiago, Laura Ramírez
Paty Oliva, Thalia Torres, Haydeé De Jesús,
Yedith Mendoza, Erika García, Juan Carlos Jarillo,
Roberto de Anda Pineda, Biol. Aida Leal Robles.

Por su apoyo incondicional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Capítulo 1 LA PLANTA MEDICINAL	3
Estudio multidisciplinario de plantas medicinales	4
Capítulo 2 BIOTECNOLOGÍA VEGETAL	5
Cronología de la biotecnología	5
Capítulo 3 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	7
Importancia del cultivo <i>in vitro</i>	8
El entorno del cultivo <i>in vitro</i>	9
Ambiente químico	10
Ambiente físico	14
Capítulo 4 MÉTODOS GENERALES DE MICROPROPAGACIÓN	16
Tipos de respuesta del cultivo <i>in vitro</i>	18
Tipos de cultivos, utilidades y características	21
Capítulo 5 CARÁCTER QUÍMICO DE LOS PRODUCTOS NATURALES	23
Aplicaciones de la Fitoquímica	24
Pruebas químicas preliminares	25
Metabolitos secundarios	25
Capítulo 6 GENERALIDADES SOBRE <i>Anredera scandens</i>	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
OBJETIVOS	36
HIPÓTESIS	37
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	38

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

MATERIAL	39
MÉTODO	41
RESULTADOS	50
ANÁLISIS DE RESULTADOS	91
CONCLUSIONES Y PROPUESTAS	93
ANEXOS	94
BIBLIOGRAFÍA	99

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN:

Ya que la Biotecnología, y siendo más específicos, por medio del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es posible obtener un gran número de individuos genéticamente iguales a la planta madre, en espacios reducidos, en un menor tiempo al que proporciona la naturaleza y libres de contaminantes inherentes al sitio de colecta; debido a que se lleva a cabo un estricto control de los factores físico - químicos como reguladores del crecimiento vegetal (auxinas y citocininas), nutrimentos, temperatura, fotoperíodo, y tiempo de incubación en condiciones totalmente asépticas; asegurando la consistencia de principios activos en cantidad y calidad. Es posible hacer investigaciones sobre: fitoquímica, de fisiología y bioquímica vegetal, mejoramiento genético de especies, producción de sustancias naturales de interés industrial, así como la reproducción y protección de especies en extinción.

Considerando que *Anredera scandens* se encuentra dentro de las especies vegetales que contienen saponinas, a las se les atribuyen propiedades farmacológicas, y un variado uso terapéutico (como antibacterianos, antifúngicos, coadyuvantes en tratamientos de insuficiencia venosa periférica, etc.), además de ser muy utilizadas tanto en la industria farmacéutica como a nivel popular. Se propagó por medio de cultivos *in vitro*, con la siguiente serie de combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal:

	AIA	ANA	IBA	Testigo
Kin	1	2	3	
BAP	4	5	6	
	7	8	9	10

Donde:

AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido indolbutírico
IBA	Ácido naftalenacético
Kin	6-furfurilamino purina
BAP	6-bencilamino purina

Con el fin de obtener ejemplares en condiciones óptimas, para identificar metabolitos secundarios a partir de pruebas fitoquímicas preliminares; observándose que sí existe estimulación en la producción de saponinas en el factorial 3 (Kin-IBA) de reguladores del crecimiento vegetal, siendo evidente al medir su índice de espuma.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

El reino vegetal representa un depósito extraordinario de nuevas moléculas, de los cuales se estima que existen de 250,000 - 500,000 especies vegetales alrededor del mundo, debido a su diversidad climática, geográfica, etc., y sólo un pequeño porcentaje se ha investigado fitoquímicamente y el fragmento expuesto a la investigación microbiológica, biotecnológica o farmacológica es incluso baja.

Debido a que las plantas pueden contener centenares o incluso miles de metabolitos secundarios con actividad farmacológica o de importancia industrial, actualmente hay un resurgimiento del interés por el reino vegetal como la posible fuente de nuevos compuestos. Promoviendo así, programas de investigación terapéutica.^{1, 2, 5}

Sin embargo, para la obtención de metabolitos de calidad a partir de cultivos crecidos en el campo o provenientes de plantas silvestres depende de factores que muchas veces son difíciles de controlar, por ejemplo, el clima, el tipo de suelo, la época del año, etc. Y considerando la rápida desaparición de las especies vegetales y su hábitat, por la explotación selectiva de las plantas más allá de su tasa de reproducción, como es el caso de las plantas productoras de saponinas; hace notar que es esencial proteger y reproducir las especies vegetales, así como tener el acceso a métodos que llevan al rápido aislamiento e identificación de principios activos de los productos naturales, ya que el porvenir de las industrias farmacéuticas, químicas y alimenticias, dependen de la habilidad para conservar la diversidad biológica y genética que contienen las especies vegetales silvestres.^{1, 3, 4}

Esta problemática promueve el desarrollo de la biotecnología vegetal, en particular del cultivo *in vitro*, ya que permite asegurar la reproducción y protección de especies en extinción, tanto la consistencia en la calidad y cantidad de las sustancias producidas por éstas. Así como la investigación de otras especies que produzcan los mismos metabolitos de interés.^{3, 4}

De aquí, la necesidad de encontrar y reproducir masivamente plantas medicinales productoras de saponinas por sus propiedades: tensoactivas, emulsionantes, hemolíticas, como coadyuvantes en tratamientos de insuficiencia venosa periférica, etc. ha llevado al estudio de la familia *Basellaceae* y muy en particular de la especie *Anredera scandens*, que es ampliamente utilizada por 4 grupos étnicos mexicanos: Maya, Nahua, Zapoteca y Mixe (Yucatán, Veracruz, y Oaxaca), formando un elemento importante en los sistemas médicos indígenas de México. Citando además que en la Huasteca Potosina es utilizada como alimento. Asimismo, se utiliza con fines similares en Guatemala, Ecuador, y Perú.^{5, 6, 7, 8, 9}

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

CAPÍTULO 1 LA PLANTA MEDICINAL

Los productos naturales de origen vegetal son recursos renovables de múltiple uso para el hombre. Le proporcionan alimentos para la subsistencia, fibras textiles para vestirse y material para construir casas; le deleitan por su aroma y colorido; le curan o intoxican, según sus propiedades; y regeneran el aire que respira. Por su participación en los ecológicos, las plantas son indispensables para la supervivencia del hombre.

La información obtenida de la investigación de compuestos de origen vegetal ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen y lograr su mejor aprovechamiento con fines científicos y económicos. 20

Planta medicinal es todo vegetal que, por poseer principios activos curativos se utiliza en terapéutica. La acción benéfica de estas plantas sobre un organismo enfermo se debe a que contienen ciertas sustancias o principios activos tales como alcaloides, saponinas, resinas, glucósidos, aceites esenciales, etc., que son de gran importancia terapéutica.

La cantidad de esos principios activos depende especialmente de los factores ecológicos (suelo, temperatura, humedad, etc.) propios del lugar donde el vegetal se ha desarrollado. Estas características pueden observarse, específicamente, en especies difundidas en áreas muy amplias, que abarcan diferentes regiones fitogeográficas.

Con respecto a la cantidad, hay que recordar que una planta benéfica puede resultar tóxica o perjudicial si aplica en dosis excesivas.

Un fármaco vegetal está constituido por material fisiológicamente activo e inactivo; este último incluye compuestos y estructuras celulares. En el caso más simple, las plantas contienen un solo componente activo, lo que casi no se presenta, lo más frecuente es que contenga una serie de compuestos de estructuras parecidas y con propiedades farmacológicas similares. También pueden estar presentes compuestos sinérgicos o antagonísticos, o sustancias que presenten otros efectos farmacológicos.

Hay compuestos puros que se han aislado de plantas que tienen menor valor terapéutico que cuando formaban parte del extracto total.

Los fármacos crudos vegetales son productos naturales que únicamente han pasado por los procesos de recolección y secado. El término productos naturales se refiere a aquellos productos que se encuentran en la naturaleza, y comprende tanto a plantas superiores como inferiores, sus extractos y otros constituyentes que no han tenido cambios en su estructura molecular.

TESIS CON
PALABRAS DE ORIGEN

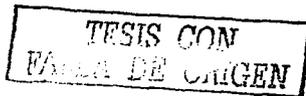
Para no tener dificultad en la conservación de las plantas, sólo se cosecha al día la cantidad tratada inmediatamente, y se conservan los principios activos en forma de tinturas, de extractos fluidos o secos en porcentajes conocidos, que entrarán en las preparaciones galénicas (con base vegetal), como jarabes, grageas o supositorios. ^{2,10, 33,34}

Estudio Multidisciplinario de Plantas Medicinales

La gran riqueza y variedad de la flora mexicana, así como la tradición sobre el uso de vegetales con fines curativos, la crisis económica actual, las condiciones de los servicios de salud entre otros hacen necesarios los estudios sistemáticos y multidisciplinarios sobre las plantas medicinales mexicanas para proporcionar una alternativa viable que resuelva algunos de los problemas de salud en México.

El estudio de la medicina tradicional para obtener a un activo puro y disponible de la planta, involucra el trabajo multidisciplinario en la Botánica, Etnobotánica, Biotecnología, Farmacognosia y Fitoquímica, Microbiología, Farmacología, Toxicología, Química, etc. y comprende, varios aspectos:

- o La selección, colección, e identificación botánica, de la especie a estudiar;
- o Preparación del material vegetal, y reproducción del mismo bajo condiciones controladas por medio del cultivo *in vitro*, obteniendo especies sanas, en un espacio y tiempo reducido;
- o La extracción con los disolventes convenientes y el análisis fitoquímico preliminar;
- o Bioensayos con organismos específicos para cada metabolito, de los extractos crudos.
- o La separación de los activos puros por medio de la cromatografía de constituyentes;
- o Determinación de la estructura química de los constituyentes;
- o Análisis y perfil farmacológico de los compuestos puros;
- o Control toxicológico;
- o La síntesis parcial o total;
- o Preparación del derivado para el estudio de las relaciones estructura-actividad. ^{1, 11}



CAPÍTULO 2 BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

La Biotecnología es toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos de usos específicos.

Durante siglos la humanidad ha introducido mejoras en las plantas que cultiva a través de la selección y mejora de vegetales y la hibridación — la polinización controlada de las plantas.

La biotecnología vegetal es una extensión de esta tradición de modificar las plantas, con una diferencia muy importante — la biotecnología vegetal permite la transferencia de una mayor variedad de información genética de una manera más precisa y controlada.

Al contrario de la manera tradicional de modificar las plantas que incluía el cruce incontrolado de cientos o miles de genes, la biotecnología vegetal permite la transferencia selectiva de un gen o unos pocos genes deseables. Con su mayor precisión, esta técnica permite que los mejoradores puedan desarrollar variedades con caracteres específicos deseables y sin incorporar aquellos que no lo son.

Estas mejoras en los cultivos pueden contribuir a producir una abundante y saludable oferta de plantas, además de proteger nuestro medio ambiente para las futuras generaciones.

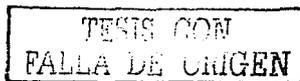
Los expertos aseguran que las innovaciones de la biotecnología van a triplicar el rendimiento de las cosechas sin requerir tierras de cultivo adicionales, salvando así los bosques naturales y el hábitat de los animales. Otras innovaciones pueden reducir o eliminar la dependencia en agroquímicos que pueden contribuir a la degradación del medio ambiente, mientras otras preservarán el suelo y los recursos hídricos.

En este contexto se encuentran métodos biotecnológicos para el aislamiento de células, tejidos y órganos de plantas y el crecimiento de estos bajo condiciones controladas (cultivo *in vitro*). Logrando: la propagación masiva de plantas en peligro de extinción y de importancia ecológica y económica, obteniendo plantas libres de patógenos (bacterias, virus, etc.).

Una Breve Cronología de la Biotecnología

Siglo XVIII

Los naturalistas comenzaron a identificar muchas clases de plantas híbridas — el primer paso que llevó a cruzar dos variedades diferentes de plantas.



1856

Gregor Mendel comenzó un estudio meticuloso de las características específicas presentes en varias plantas, las cuales fueron heredadas por las siguientes generaciones.

1860

Sacz y Knops, prepararon la primera solución nutritiva para plantas de manera sintética.

1898

Haberlandt realizó el primer intento de cultivo *in vitro* de células aisladas en 3 géneros de monocotiledóneas, si obtener éxito. Proponiendo que para cultivos posteriores se encausaran hacia el estudio de las condiciones bajo las cuales las células "sufren" división. Introdujo el concepto de totipotencialidad.

1900

Los botánicos de Europa usan las Leyes de Mendel para mejorar especies de plantas: este es el comienzo de la selección y mejoras clásicas.

1952

Primera generación de plantas procedentes de un cultivo *in vitro*, libres de virus.

1975

Se realizaron estudios de organogénesis, fitopatología, aislamiento y cultivo de protoplastos, así como la producción de metabolitos secundarios.

Entre los años 1979 a 1983, la mayoría de los trabajos se enfocaron hacia estudios de morfogénesis y embriogénesis, además de darle una gran importancia a la detección, identificación, síntesis y producción de metabolitos secundarios, así como al uso de la técnica para la selección y mejoramiento de plantas.

1979

Knauss y Knauss sugirieron que uno de los mayores problemas es la contaminación bacteriana durante el periodo de multiplicación y / o enraizamiento.

1981

Kuthey, y colaboradores, a partir del cultivo *in vitro* de *Catharanthus roseus*, llevaron a cabo la producción de los alcaloides: yohimbina, isositisiricina, horhammericina, horhammerinina, vindolinina, 19-epividolinina, ajmalacina, lochnericina, velsiachotamina, streictosidina, lactam y N, N-dimetiltriptamina, discutiendo las posibles aplicaciones farmacéuticas de los alcaloides que produjeron.

1982

Se inicia la aplicación del cultivo *in vitro* de árboles de importancia económica, entre éstos se desarrollaron plantas bien establecidas de sándalo en una área forestal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta breve reseña es un bosquejo en general acerca de las aplicaciones del cultivo *in vitro*, y podemos observar desde los primeros ensayos, tentativas, avances y logros de la propagación de especies por medio de ésta técnica.

Conjuntamente las plantas medicinales producidas por cultivo *in vitro* son ampliamente utilizadas en estudios científicos sobre fisiología vegetal, bioquímica, fitoquímica de metabolitos secundarios, y biología molecular. Dando un mayor énfasis a la potencial producción comercial de metabolitos secundarios; además de emplearse el potencial enzimático casi ilimitado de células de la planta obtenida por cultivo *in vitro*, básicamente para los propósitos de bioconversión. Ya que las enzimas de la planta pueden catalizar reacciones específicas y puede aplicarse por consiguiente a la producción de compuestos de interés farmacéutico. De manera análoga se pueden obtener precursores de principios activos farmacéuticos. 41, 50, 51, 52, 53

CAPÍTULO 3 CULTIVO *IN VITRO*

El término cultivo *in vitro* es un término muy genérico que se refiere más bien a la metodología usada que al propio objetivo de ese método. En sentido estricto, *in vitro* quiere decir "dentro de vidrio", es decir, el cultivo de plantas o de alguna de sus partes (pero también de células y tejidos animales) dentro de recipientes de vidrio en condiciones de ambiente controlado. ¹²

De una manera más formal se define como:

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre (clon), cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo. ¹³

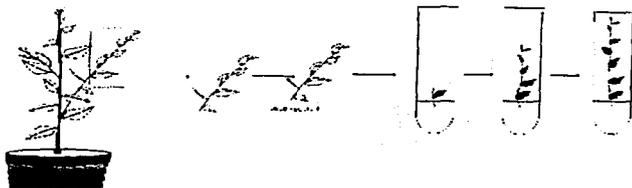


Figura 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta técnica se basa en el principio de la totipotencia celular, la cual establece que a partir de una célula vegetativa de una planta que contiene toda la información genética necesaria, se puede generar un individuo.^{4, 13, 14, 16}

Esto se logra mediante el control de los factores físico-químicos, como los fitorreguladores (auxinas, citocinas), nutrimentos, temperatura, humedad, luz y fotoperíodo.

En las siguientes secciones nos referiremos siempre al cultivo *in vitro* aplicado a las plantas, omitiendo otros usos de esa técnica.

Existen otros términos cuyo significado es similar con el significado de cultivo *in vitro*:

- Cultivo de tejidos vegetales: se refiere al cultivo *in vitro* de partes de la planta (tejidos o frecuentemente órganos)
- Micropropagación: se usa para referirse a la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas a la propagación vegetativa de plantas.¹²

Importancia del cultivo *in vitro*

Un punto importante que cabe resaltar, es que en su mayoría, el material utilizado procede de colectas de ejemplares silvestres, son pocas especies que cuentan con sistemas de producción bien controlados, esto tiene diversas consecuencias muy graves, de las cuales señalaremos las siguientes:

- a. Sobre explotación de las especies
- b. Daño ecológico en las zonas de colecta
- c. Los activos obtenidos de ejemplares silvestres, son inevitablemente "inconstantes", dado que su composición y estandarización, están influenciados por factores como edad y origen del material vegetal, lo que se traduce en una gran heterogeneidad respecto al contenido del principio activo.
- d. Nulo control fitosanitario, por lo que no se garantiza un ejemplar de buena calidad, del que se hayan eliminado sustancias extrañas y patógenos como bacterias, hongos, virus, etc.

De aquí la importancia del cultivo *in vitro*, ya que por medio de la micropropagación masiva de tejidos vegetales, es posible conservar a un pequeño

grupo de células de un individuo para obtener de éstas (después de meses), cualquier cantidad de embriones, recuperando de esta manera, el número requerido de plantas sanas, capaces de producir metabolitos de cantidad y calidad constante, además de salvar a la especie amenazada.^{11, 15}

A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos; plantas homocigotas, en la producción de plantas en peligro de extinción, preservación de plantas medicinales sanas, la producción de sustancias naturales de interés industrial, en estudios de ingeniería genética, etc.¹³

El enorme potencial que posee esta metodología ha propiciado que en los últimos 25 años se haya incrementado el número de laboratorios de cultivo de tejidos en el país para la producción comercial de plantas ornamentales y frutales a lo que ha motivado que algunos floricultores la estén utilizando como una alternativa viable en sus programas de producción.

El entorno del cultivo *in vitro*

El estudio de cualquier fenómeno biológico en condiciones de laboratorio exige reproducir de la forma más aproximada posible todos los factores que puedan incidir en el fenómeno estudiado cuando este sucede en la naturaleza. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas.^{11, 15}

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el biotipo de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados.

Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con sólo una parte de él (explanto), a la dificultad de reproducir las condiciones naturales se debe añadir la dificultad de suministrar a la parte todo aquello que antes obtenía del sistema completo.¹²

En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas superiores es una técnica que exige un control absoluto del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explanto. Conviene, por tanto, conocer cuales son los principales factores que conforman el ambiente del explanto y que deberán ser controlados.

Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectarán al desarrollo del cultivo *in vitro* como:

- AMBIENTE QUÍMICO
 - Composición del medio
 - Reguladores de crecimiento
 - pH
- AMBIENTE FÍSICO
 - Temperatura
 - Luz y fotoperíodo ^{11,12,13,14,15}

AMBIENTE QUÍMICO

MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo es la combinación sólida por medio de agar o líquida, de nutrientes y agua que reúnan todos los componentes indispensables para el óptimo desarrollo de la planta. Usualmente incluye sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes), carbohidratos y vitaminas. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y si fuese necesario, antibióticos para prevenir posibles infecciones.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*.

También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones: ^{4,11, 12}

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales

Agua		
Sustancias orgánicas	Macro	Micro
	nutrientes	
Azúcares	N	Fe
Aminoácidos	P	Zn
Auxinas	K	B
Citoquininas	Ca	Mn
Giberlinas	Mg	Cu
Acido absclísico	S	Ni
		Co
		Al
		Mo
		I

Mezclas de sustancias poco definidas:

Extracto de levadura, Leche de coco, Extractos vegetales, Hidrolizados de caseína
Peptona y triptona.

El medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas; existen numerosas variaciones comerciales de este medio. El medio B5 o de Gamborg et al. (1968), o sus varios derivados, ha sido de un gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en regeneración de plantas. La diferencia principal entre los medios MS y B5 es la menor concentración de nitratos en B5. El medio WPM (1980) de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas.^{12, 14}

REGULADORES DE CRECIMIENTO

Para distinguir entre hormonas vegetales y sustancias que regulan el crecimiento vegetal, puede decirse que todas las hormonas regulan el crecimiento; pero que no todas las sustancias reguladoras del crecimiento son hormonas.

Se define como regulador del crecimiento vegetal, a los compuestos sintéticos u hormonas vegetales, distintos de los nutrientes, que a bajas concentraciones estimulan, inhiben, o modifican cualquier proceso fisiológico en las plantas, imitando la acción de las hormonas vegetales.

Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores del crecimiento vegetal divididos en tres grupos principales:

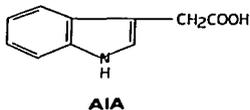
1. Promotores del crecimiento: Auxinas, citocininas y girbelinas
2. Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
3. Etileno

AUXINAS

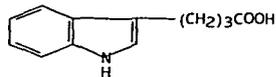
El nombre auxina del griego *auxein*, crecer, provocan el crecimiento de las plantas. Afectando el alargamiento y la división celular. Participan en la organización de los procesos vegetales, incluyendo el crecimiento del tallo, la formación de raíces, formación de tejido calloso, para la aparición de nuevos brotes, reguladoras de la floración, como herbicida, etc.

Entre las auxinas más importantes se encuentran:

- o ácido indol-3-acético (**AIA**)



- o ácido indolbutírico (**IBA**)

**IBA**

- o ácido naftalenacético (**ANA**)

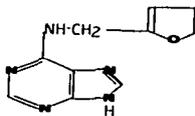
**ANA**

CITOCININAS O CITOKININAS

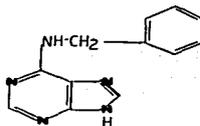
Estimulan principalmente la división celular o citocinesis, e intervienen en el crecimiento y diferenciación de las células. Son derivados de la adenina. Se utilizan principalmente para la inhibición de raíces y producción de yemas. Producen un crecimiento rápido pero temporal, de tejido calloso proveniente del cultivo de tallo.

Entre las citocininas más importantes se encuentran:

- o 6-furfurilamino purina (**KIN**)

**KIN**

o 6-bencilamino purina (BAP)



BAP

14, 18, 19

Es importante recordar que cada especie responderá de manera diferente a los distintos reguladores de crecimiento. Por lo tanto, al aplicar las diversas técnicas del cultivo de tejidos vegetales, el investigador deberá realizar una serie de experimentos que llevarán a determinar cuáles son los reguladores del crecimiento que darán la respuesta buscada, en la especie que esté cultivando *in vitro*.

Esta serie de experimentos se conoce como: diseño factorial.

Posteriormente, se determinarán las concentraciones adecuadas de cada regulador, siempre con miras de obtener determinada respuesta en una especie en particular.

El primer paso de un diseño, consiste en determinar cuáles son los reguladores de crecimiento que conviene utilizar, para ello se aplican distintas combinaciones de reguladores a una serie de cultivos, donde conviene utilizar inóculos provenientes de distintos individuos.

Siempre se conservan en un diseño factorial sujetos a los cuales no se les aplica alguno de los reguladores de crecimiento y como resultado de estas combinaciones, uno de los sujetos del experimento no recibirá ninguno de los reguladores de crecimiento, estos son los que denominamos sujetos de control.

Una vez realizado el experimento, se obtendrá un determinado resultado, pero deberemos repetirlo "n" veces para confirmar la respuesta esperada de manera estadística.^{11, 15}

pH

El pH final del medio de cultivo es un factor importante por diversas razones:

- Valores bajos, inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos
- Si la evolución del pH del medio lo hace bajar por debajo de 3.5 se puede producir su licuación.
- El valor del pH puede afectar a la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo
- El valor del pH puede afectar a la absorción de determinados nutrientes por parte del explanto (por ejemplo la absorción de iones NO_3^- aumenta con la acidez del medio)
- El valor del pH del medio puede afectar al pH del citoplasma y como consecuencia a la actividad de muchas enzimas
- A mayor pH, disminuye el tamaño de callo (masa irregular de células), y viceversa.

Por todas estas razones conviene optimizar el pH del medio para cada caso en concreto. En general, no obstante, en la mayoría de situaciones se trabaja a pH entre 5.2 y 5.8.^{12, 14, 16}

Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera acidificación progresiva como resultado de la absorción diferencial de algunos componentes del medio de cultivo, así como de la excreción de exudados por parte del explanto.

El control del pH inicial del medio y de su dinámica durante el cultivo tiene una gran importancia en el desarrollo de cualquier proyecto de cultivo *in vitro*. A pesar de su importancia, en muchos experimentos este control se limita a fijar su valor inicial sin reparar en los posibles efectos de su dinámica.¹²

AMBIENTE FÍSICO

LA TEMPERATURA

La temperatura a la que está expuesto el explanto cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar.¹¹

En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que se ha obtenido el explanto, de la época del año, y área geográfica de donde proviene la planta madre.¹²

Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo *in vitro* puede ser un proceso muy laborioso, que además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladas de forma diferente. Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28°C.^{12, 15}

El control de la temperatura no es solamente importante porque pueda afectar al crecimiento del cultivo sino también porque puede ser un factor que induzca determinados procesos fisiológicos. Así, temperaturas bajas (del orden de 4-5^oC) permiten superar los periodos de letargo de algunas especies y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que una temperatura constante de 20^o C induce la formación de raíces.¹²

¿Cómo se controla?

El cultivo *in vitro* se realiza dentro de espacios denominados cámaras de cultivo o cuartos de incubación, diseñados para permitir el control del ambiente físico al que será expuesto el cultivo.

CÁMARAS DE CULTIVO O INCUBACIÓN

Una cámara de cultivo o cuarto de incubación, es un área diseñada para permitir el control de algunas variables del ambiente físico. Habitualmente se pueden controlar la temperatura, la iluminación y el fotoperiodo y en algunos casos, menos frecuentes, la humedad del aire y su composición.

El control de la temperatura a la que se desarrolla el cultivo *in vitro* se efectúa mediante un sistema de refrigeración-calefacción controlado a través de un termostato. El sistema de refrigeración-calefacción debe estar correctamente dimensionado a fin de conseguir que la temperatura de la zona de cultivo se mantenga dentro de los límites deseados.

Para poder caracterizar adecuadamente el funcionamiento respecto de la temperatura de una cámara de cultivo conviene conocer:

- La homogeneidad de temperatura: es decir la variación de la temperatura en diferentes zonas de la cámara. Se puede aumentar la homogeneidad haciendo circular el aire dentro de la cámara mediante un sistema de ventilación
- La estabilidad de la temperatura: es decir, una medida de la variación de la temperatura de la cámara de cultivo a lo largo del tiempo

Todas las cámaras disponen de un programador que permite regular la temperatura a la que está la cámara en cada momento.^{12, 14, 15}

LUZ

La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*.

Se asume que las necesidades de luz de los cultivos *in vitro* son inferiores a las de la planta *in vivo*, dado que el medio de cultivo contiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos *in vitro* se comportan sólo parcialmente de forma autotrófica. Además, una irradiación excesiva produciría un aumento notable de la temperatura dentro del recipiente de cultivo debido al efecto invernadero.

Las lámparas fluorescentes son las fuentes de luz más usadas en las cámaras de cultivo o cuartos de incubación.

FOTOPERIODO

Horas en las que la planta recibe luz y horas en las que la planta se encuentra en oscuridad.^{11, 12}

Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización,...) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explanto cultivado *in vitro* puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor fotoperiodo *in vivo* será también el mejor fotoperiodo *in vitro*.^{12, 14}

CAPÍTULO 4 MÉTODOS GENERALES DE MICROPROPAGACIÓN

Selección del Material Vegetal

La selección cuidadosa de material vegetal es muy importante para llegar a los metabolitos secundarios al menor tiempo posible. La colección aleatoria es un buen método pero es más juicioso basar la selección en cierto criterio. De ésta manera se puede elegir el material vegetal por medio de los conocimientos de las plantas usadas en la medicina tradicional, siendo más fácil proporcionar los compuestos farmacológicamente activos; o bien otra posibilidad es seguir las consideraciones quimiotaxonómicas del ejemplar. Por ejemplo, si se requiere de una búsqueda para saponinas, es aconsejable empezar investigando a las familias conocidas que contengan esta clase de productos naturales.^{1, 40}

MANEJO DE LAS PLANTAS DONADORAS

Las observaciones de campo pueden ser muy importantes, ya que si el ejemplar a estudiar no presenta ninguna muestra de ser parasitado por microorganismos, o depredado por insectos, ni decoloramientos en las hojas, entonces existe la oportunidad de encontrar metabolitos presentes que fungan como insecticidas o agentes antimicrobianos.^{1, 14, 40}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para ello se habrá de seleccionar la especie que queremos cultivar así como aquellas plantas donadoras, que por sus características sean las más adecuadas para desarrollar los cultivos, es decir se tratará de plantas jóvenes, y saludables. Esa planta se habrá obtenido el inóculo o explante en condiciones, que garanticen que se encuentra libre de contaminación microbiana. ^{11, 40}

SELECCIÓN DEL EXPLANTE

El tipo de explante y su ubicación, en la planta donadora, varían con el objetivo del cultivo, así como con las especies. En ausencia de información definida, acerca de una especie se puede usar la información sobre una especie afin o bien o hacerse experimentos con la especie que se tenga. ^{14, 40}

El material vegetal con el que se inicia un cultivo *in vitro* puede ser cualquier célula, tejido u órgano de la planta. Se puede partir de fragmentos llamados "estacas" de: tallo, raíz, hoja, meristemos, embriones, secciones nodales, etc., es decir de tejidos somáticos, pero también se puede iniciar a partir de células o tejidos no somáticos: anteras, polen, microesporas, óvulos, etc. Según sea el explanto utilizado se hablará de cultivo de secciones nodales, cultivo de hoja, de meristemo, de polen, de embriones, etc.

12, 14, 40

Después de haber seleccionado a aquellos tejidos de la planta donadora que se usarán como inóculos, se aplicarán las técnicas de desinfectación adecuadas para eliminar la contaminación externa en la especie que se planea cultivar *in vitro*.

11

DESINFESTACIÓN:

La propagación de plantas, puede verse afectada de manera adversa por diversos organismos patógenos, como hongos, bacterias, nemátodos, virus y organismos de tipo micoplásmico insectos y ácaros. Y para lograr el éxito en la misma se necesita controlarlos.

1, 14, 40

Ya que ciertos organismos patógenos pueden ser diseminados junto con el material de propagación, ya sea en la superficie de la planta o en el interior de la misma. En consecuencia, se deben incluir procedimientos que eliminen la presencia del organismo patógeno si está presente a simple vista o que se detecten aquellas plantas o sus partes que estén libres de patógenos, que entonces puede ser utilizado como material de propagación.

Los desinfectantes primarios son alcoholes (etílico, metílico o isopropílico) y los hipocloritos de calcio o de sodio, vendidos como blanqueadores caseros con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5 o 6 % de ingrediente activo. A éstos últimos se les deben de añadir unas gotas de surfactante o detergente para mejorar el cubrimiento superficial. La efectividad de estos materiales es esencialmente una respuesta tiempo-dosis, en la cual la efectividad para desinfectar aumenta con ambos factores, pero la capacidad para dañar tejidos también aumenta. En consecuencia, se debe buscar un equilibrio según el tipo de explante que se trate.

Desinfectantes Superficiales Para Explantes

Agente	Concentración	Tiempo de tratamiento (min.)	Observaciones
Hipoclorito de calcio	9 a 10 %	5 a 30	Muy efectivo
Hipoclorito de sodio *	20 %	5 a 30	Muy efectivo
Agua de bromo	1 a 2 %	2 a 10	Muy efectivo, pero puede ser tóxico para los tejidos vegetales.
Peróxido de hidrógeno	10 a 12 %	5 a 15	Moderadamente efectivo.
Cloruro de mercurio	0.1 a 1.0 %	2 a 10	Efectivo, pero puede ser tóxico para los tejidos vegetales.

- Disponible como blanqueador comercial, usualmente con 5 a 6% de ingrediente activo. La dosis común de uso es de 20 % v/v (1 parte de blanqueador por 4 partes de agua), pero también se debe probar una gama de concentraciones.

14 40

Tipos de respuesta del cultivo *in vitro*

El desarrollo de una planta a partir de una célula o de un segmento de planta pasa por una serie de etapas. Algunas plantas, como la vainilla tienen células o tejidos que al ponerlos en un medio de cultivo desarrollan de manera directa raíces, hojas y estructuras florales. Otros en cambio, como la biznaga, pasan por una etapa en la que las células deben desdiferenciarse y formar una masa de células llamada "callo". Más tarde este callo desarrolla raíces y brotes a partir de los cuales se origina una nueva planta.

13. 17 40

Si no hay contaminación, el inóculo se desarrollará en el cultivo y después de un tiempo que puede variar de algunos días hasta varias semanas, dará una respuesta que puede ser de tres tipos:

- o callogénesis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- o organogénesis
- o embriogénesis.

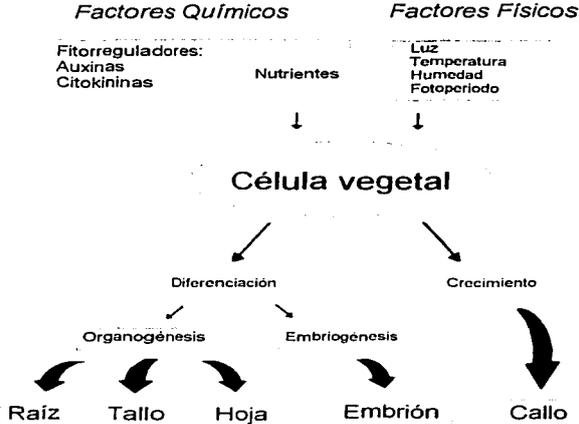


Figura 2. Manejo de la célula vegetal en cultivos *in vitro*

La callogénesis o formación de tejido calloso, es la respuesta que consiste en la generación de un callo, el cual es una estructura cuyo crecimiento no sigue un patrón morfogénético definido, por lo que se le conoce como una estructura desorganizada. Los callos se caracterizan por ser fácilmente disgregables, presentándose en ocasiones más compactos y en otras más friables (término que en cultivo de tejidos se emplea para designar a un callo que se disgrega con facilidad al ser colocado en medio líquido).

Los callos pueden presentar diversos colores o bien carecer de color y tener una apariencia blanquecina o cremosa, en general, los callos son muy heterogéneos en tamaño y forma y varían en apariencia según la especie a la cual pertenecen.

La callogénesis se logra mediante algunos reguladores de crecimiento, que varían según las especies es decir, una combinación de fitohormonas que en

TESIS CON
VALOR DE ORIGEN

cierta especie vegetal induce formación de callo, posiblemente no lo induzca en otra especie, por lo tanto el tipo y la concentración de reguladores de crecimiento presentes en un medio de cultivo son un factor determinante para inducir la formación de callo en un cultivo.

La producción de callo es deseable en las siguientes aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales:

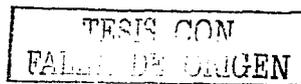
- o Para obtener ciertos productos de metabolismo vegetal, que se conocen como metabolitos secundarios. Como es el caso de algunos compuestos muy importantes en la industria, tales como la manteca de cacao, o algunos colorantes y aromatizantes.
- o En el estudio de la proliferación celular y de las cinéticas de crecimiento de los cultivos en suspensión
- o En los estudios de transformación genética de células vegetales . En los procesos de obtención de protoplastos (Si se elimina la pared celular de las células vegetales se obtiene un cultivo de protoplastos).^{11,12}

La segunda forma de respuesta que se puede obtener es la organogénesis, la cual consiste en la formación de órganos de la planta en los cultivos *in vitro*, que pueden ser hojas, tallos, o raíces a partir del inóculo que se sembró la respuesta de organogénesis puede ser directa: cuando a partir del inóculo surge el órgano buscado, o bien, puede ser indirecta, si antes de producirse el órgano, se obtiene un callo y sólo a partir de éste se llega a la organogénesis.

Dentro de las aplicaciones importantes de la organogénesis que se puede inducir en cultivo de tejidos a través de la aplicación de las combinaciones adecuadas de reguladores de crecimiento tanto cualitativamente (tipo de hormonas), como cuantitativamente (niveles de concentración), en los medios de cultivo y de la elección de las condiciones de incubación adecuadas, se pueden mencionar:

- o El estudio de la morfogénesis de los órganos, cuando resulta necesario trabajar con algún órgano especializado de la planta.
- o Para la producción de metabolitos secundarios cuando estos se producen exclusivamente en tejidos diferenciados.

El tercer tipo de respuesta que se puede obtener en el cultivo de tejidos vegetales, es la embriogénesis somática, es decir la formación de una estructura



análoga al embrión de la planta, con la diferencia de que no es producto de fusión gamética.

Los estudios actuales de investigación en cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, y en particular referentes a la respuesta de embriogénesis somática están fundamentalmente dirigidos hacia:

Determinar los factores y compuestos que participan en la inducción de la embriogénesis.

Desarrollar la tecnología para la producción de semillas artificiales.

Estudiar los procesos de escalamiento, es decir llevar a cabo el diseño, construcción de bio-reactores para la producción masiva.

El desarrollo de parámetros de producción de semillas artificiales como son: el establecimiento de criterios de calidad, los estudios de encapsulación y las condiciones de secado.

11. 14

Tipos de cultivos, utilidades y características

- Cultivo de hojas**
- Este cultivo tiene el propósito de obtener callosidades para obtener de ellas tallos adventicios o embriones somáticos: al igual que el de raíces, puede ser considerado como fuente potencial de compuestos medicinales.
- Este tipo de inóculo se emplea generalmente para obtener plantas libres de virus. Consta del meristemo y de 2 o 3 primordios de hoja.
- Cultivo de ápice de tallo**
- Cuando se emplea un inóculo más grande que éste, la finalidad es la propagación clonal. El cultivo del meristemo requiere gran destreza para su aislamiento y principalmente es usado con fines de investigación.
- Generalmente los ápices se emplean para la formación de tallos adventicios. El medio consta de un balance de auxinas-citocininas en una concentración aproximada de 3 mg/l.
- Cultivo de callo**
- Es el tipo de cultivo más ampliamente usado. Se obtiene a partir de casi cualquier planta u órgano. Contiene auxina y/o citocinina. Este tipo de cultivo se puede mantener indefinidamente, trasplantando periódicamente secciones

TESIS CON
FALSO ORIGEN

de callo a medio de cultivo nuevo.

El fenómeno más significativo observado en el cultivo de callos ha sido la regeneración de plantas, ya sea por el proceso que involucra la formación de tallo seguida del enraizamiento o por la iniciación de la embriogénesis somática.

Cultivo de células

Para obtener un cultivo de células basta con pasar un cultivo de callos a medio líquido. La disociación de las células se logra por agitación vigorosa del medio de cultivo. Algunas veces es recomendable aumentar la concentración de sales y auxina o agregar complejos naturales como caseína o levadura.

Los protoplastos quedan liberados de las células de cultivo en suspensión tratando éstas con una enzima para liberarlas de la pared celular.

Cultivo de protoplastos

El medio para estos protoplastos difiere principalmente en el contenido de un osmótico, que se administra hasta que la nueva pared celular se haya regenerado completamente.

La razón principal para las manipulaciones con protoplastos es la de aumentar la diversidad genética en los cultivos.

Cultivo de raíz

A este cultivo nos referimos cuando hablamos del primer cultivo con éxito en el cultivo de tejidos. El principal problema en este tipo de cultivos es obtener el inóculo adecuado, pues siempre se encuentra gran contaminación en las raíces. En la práctica, el inóculo generalmente se obtiene de semillas germinadas asépticamente.

El cultivo sumergido ha tenido más éxito para raíces que el de agar. El medio utilizado es relativamente simple y la única parte importante es la formación del quelato entre el hierro y la vitamina B (tiamina).

Cultivo de embriones

Fue el primer cultivo con el que se tuvo éxito (1904). Los embriones generalmente se obtienen de semillas maduras. El cultivo de embriones requiere de mezcla salina, azúcar y una o más vitaminas B.

Cultivo de óvulos

No se ha estudiado mucho acerca de este cultivo; es muy

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

difícil obtener un solo óvulo y sembrarlo. Generalmente se hace el cultivo del ovario completo; puede estar ya polinizado o hacerse la polinización *in vitro*.

Cultivo de anteras

El cultivo de anteras inmaduras y, en pocos casos, de microsporas aisladas, ha producido plantas haploides o diploides homocigóticas en aproximadamente 100 especies. Las plantas haploides reducen el tiempo requerido para desarrollar nuevos variedades; también son útiles en investigaciones de mutaciones.

40. 15

CAPÍTULO 5 CARÁCTER QUÍMICO DE LOS PRODUCTOS NATURALES

El objetivo principal de la Fitoquímica es el estudio de los constituyentes químicos de las plantas; dicho estudio abarca su biosíntesis, metabolismo, función biológica, aislamiento, purificación y estructura química.

Las sustancias que las plantas elaboran y acumulan en sus tejidos son importantes desde el punto de vista farmacéutico, porque muchas poseen propiedades farmacológicas y pueden utilizarse en la preparación de los medicamentos. En algunos casos, los medicamentos se preparan a partir de los extractos crudos de las plantas debido a que el principio activo no ha sido aislado, o bien, porque el extracto total tiene una mayor actividad en relación con otras sustancias que se encuentran asociadas al principio activo.

Muchos de los constituyentes orgánicos de las plantas que se usan terapéuticamente, también se utilizan para la preparación de bebidas, condimentos para alimentos, colorantes y aromatizantes u odorizantes; por ejemplo, las hojas de té y los granos de café que producen la cafeína, alcaloide de aplicación medicinal, se usan en la dieta alimenticia como bebidas; en el mismo caso está el ginger, que además de su uso farmacéutico se emplea en grandes cantidades en la fabricación de bebidas refrescantes.

La separación de los constituyentes es una tarea bastante ardua debido a que las plantas producen una gran cantidad de sustancias de todos tipos de estructuras, por lo que, para llevarla a cabo, es necesario investigar previamente los metabolitos secundarios que tiene la especie a estudiar.

Uno de los desafíos de la fitoquímica es llevar a cabo procedimientos con pequeñas cantidades de muestra. Frecuentemente, la solución de un problema biológico como: la investigación de sustancias que promueven el crecimiento de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

planta; en las interacciones bioquímicas planta-animal, o investigación del origen de plantas fósiles; depende de la cantidad de la muestra problema.

Aplicaciones de la fitoquímica

Los procedimientos fitoquímicos tienen un papel establecido en ciencias tales como: química, farmacología, bioquímica, biología, e incluso en las disciplinas de áreas diferentes a la química como en la fitogeografía, ecología, paleobotánica, y etnobotánica, donde los métodos fitoquímicos son importantes para resolver cierto tipo de problemas.

Algunas aplicaciones de la Fitoquímica son obvias como: en la agricultura, en la nutrición y la industria de alimenticia, la industria cosmética y en la investigación de farmacéutica.

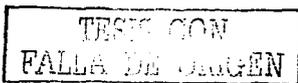
Otras contribuciones fitoquímicas se relacionan con la fisiología vegetal determinando las estructuras químicas, biosíntesis y formas de acción de las hormonas de crecimiento vegetal.

En la Patología vegetal, se contribuye caracterizando fitotóxicas y fitoalexinas (productos del metabolismo vegetal como respuesta a un ataque microbiano)

Taxonomía química. Hasta la fecha se han propuesto muchos sistemas de clasificación vegetal, los más modernos intentan utilizar la mayor parte de caracteres presentes en las plantas y los resultados de las investigaciones en otros campos científicos, como por ejemplo su anatomía, citología, genética, palinología, paleontología geográfica, geología y química. La clasificación basada en la composición química de las plantas, agrupa a éstas de acuerdo con los componentes químicos presentes y recibe el nombre de quimiotaxonomía.

La taxonomía molecular se basa en la fitoquímica, ya que ésta se ocupa de aislar y elucidar las estructuras y la conformación de los constituyentes que se encuentran en las plantas sin tomar en cuenta su posición sistemática. La fitoquímica ha sido y va a seguir siendo de gran importancia en el desarrollo de la química orgánica de productos naturales.

Recientemente se han hecho investigaciones para demostrar que las plantas relacionadas por la clasificación botánica producen compuestos similares. Estos estudios quimiotaxonómicos pueden ser de valor farmacéutico porque siempre existe la posibilidad de aislar materiales activos.



Pruebas químicas preliminares

En la búsqueda de plantas con principios activos se requiere conocer de antemano la especie, familia o género que va a coleccionar, y tiene que decidirse cuál va a recoger en mayor cantidad. También puede estar interesado sólo en algunos de sus constituyentes, como pueden ser: alcaloides, saponinas, colorantes, aceites esenciales, etc. Además, tiene que decidir qué parte o partes de la planta debe recolectar, por ser las más ricas en principios activos. En dichas situaciones, la fitoquímica, cuenta con muchas técnicas sencillas, veraces, específicas, rápidas y que requieran equipo mínimo. Si se considera la gran cantidad de material vegetal que se puede recibir en un laboratorio para investigación química y el tiempo y costo requerido en cada estudio, resulta conveniente efectuar pruebas preliminares que permitan dar preferencia a las plantas de mayor provecho. En estudios preliminares se pueden utilizar muestras de 1 a 1000 g, y orientarse a localizar uno o varios principios activos (flavonoides, saponinas, sesquiterpenlactonas, etc). Los métodos pueden ser:

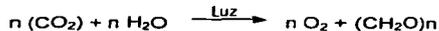
- Histológicos, o sea, observación del comportamiento de cortes de tejidos frente a ciertos reactivos que formen colores, den precipitados, etc.
- Químicos, tratamiento de extractos con agentes cromógenos, sustancias que forman precipitados, etc.
- Físicoquímicos, uso de cromatografía, localización de ciertas bandas de absorción en el infrarrojo, etc.
- Biológico, ver el efecto de extractos sobre cultivos de microorganismos, grupos de ratones, embriones, órganos aislados, tejidos, etc.

20, 33, 35, 37

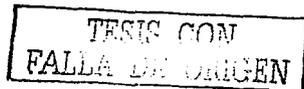
Metabolitos Secundarios

Las plantas verdes son esenciales en la vida del hombre y de los animales, debido a que convierten la energía solar en compuestos de carbono que a su vez producen otros alimentos importantes; a partir de moléculas de agua, dióxido de carbono y energía solar, elaboran carbohidratos, grasas y proteínas, considerados como metabolitos primarios.

La reacción fotosintética general se representa por la siguiente ecuación:



Los productos pueden ser diferentes, oligosacáridos y polisacáridos (la reducción del dióxido de carbono a grasas, implica otras reacciones químicas).



De ésta manera se puede decir que los metabolitos primarios, son casi universales en su distribución; ya que ellos son participantes y productores de las actividades celulares de casi todos los seres vivientes.

Sin embargo las plantas no nada más dan estas sustancias, también producen otros miles de compuestos a los que se les llama metabolitos secundarios, muchos de los cuales los utiliza el hombre para diversos propósitos.

Los metabolitos secundarios son las sustancias cuya producción despierta mayor interés económico a través del cultivo *in vitro*. Los metabolitos secundarios son compuestos que por definición no forman parte del metabolismo básico de las células y solamente los producen grupos restringidos de plantas y son característicos de la especie, y se encuentran físicamente ya sea en estructuras muy específicas (raíces, cortezas, etc.) o en estructuras desdiferenciadas (callo); su producción se relaciona con funciones de adaptación ecológica, como atrayentes de polinizadores, compuestos anti-alimenticios, para predadores, como sustancias antimicrobianas o antifúngicas, etc.

Y aunque que los metabolitos secundarios parecen no jugar ningún papel esencial en la actividad celular ni son indispensables a la planta de la que provienen; es impropio, decir que son productos finales del metabolismo. El hecho de no atribuir una función metabólica a estos compuestos sólo puede significar que no ha sido descubierta todavía.

Los metabolitos secundarios responsables de efectos terapéuticos se conocen como constituyentes activos, que son diferentes a los constituyentes inertes que también se encuentran en las plantas; entre estos últimos están la celulosa, lignina y suberina, además el almidón, y algunas materias colorantes que no tienen una actividad farmacológica definida.

Los constituyentes farmacológicamente activos son aquellos a los que se les atribuye la actividad terapéutica del fármaco; pueden ser una sustancia aislada o una mezcla de principios. En este último caso, la separación de ellos no se considera ni práctica ni ventajosa. Constituyentes aislados pueden ser alcaloides, glicósidos, enzimas, hormonas, vitaminas, etcétera, y las mezclas incluyen aceites fijos: grasas, ceras, aceites volátiles, resinas, oleorresinas, gomorresinas, bálsamos, etc. Estas mezclas no sólo tienen usos terapéuticos; también son importantes porque se usan en la industria farmacéutica, de cosméticos, en perfumería y como lubricantes.

2. 4. 20, 21, 33, 35, 37

En el caso de éste estudio se enfocará a la presencia de saponinas, por medio de pruebas preliminares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SAPONINAS

Se le da el nombre de saponinas (del latín *sapon* = jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta; por lo tanto, al agitar sus soluciones, se forma una espuma abundante, y relativamente estable.

Las propiedades detergentes de las plantas con saponinas han sido muy aprovechadas por la humanidad a lo largo de los siglos para hacer soluciones de limpieza, en todos los continentes. Esta habilidad de producir espuma se ha usado en la identificación de extractos de la planta.

Las saponinas tienen elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro ofrece ciertas dificultades, por las diferencias pequeñas entre el peso molecular de éstas y de los constituyentes heterosídicos.

Las saponinas son solubles en agua e insolubles en disolventes apolares. Se extraen con alcoholes o soluciones hidroalcohólicas, tras una deslipidación previa. La concentración de las soluciones se dificulta por la tendencia que tiene éstas de formar espuma.

La caracterización de los saponósidos en una muestra vegetal puede hacerse sencillamente, poniendo de manifiesto las consecuencias de la acción tensoactiva proveniente de una decocción acuosa observando el poder espumante y el poder hemolítico, por el incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática. Así como, por medio de pruebas fitoquímicas preliminares.

Como heterósidos que son, se hidrolizan por ácidos, dando una genina (sapogenina) y diversos azúcares y ácidos urónicos relacionados. Según la estructura de la genina o sapogenina, se conocen dos grupos de saponinas; los tipos esteroide, y triterpenoide pentacíclico.

2. 6. 7. 20, 21. 37, 48

Generalmente, las saponinas de tipo esteroide son características de las plantas monocotiledóneas, mientras que las saponinas triterpénicas se encuentran ampliamente distribuidas en las dicotiledóneas, como en la familia *Basellaceae*. En algunas plantas pueden contener cantidades excepcionalmente altas de saponinas (mayores del 10%).

6. 7. 38

PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Muchos saponósidos tienen propiedades antibacterianas y antifúngicas. Debido a que la actividad fisiológica de saponósidos se basa en su habilidad actuar principalmente con los esteroides que comprenden la estructura de las biomembranas. Causando alteración en la permeabilidad selectiva en las membranas plasmáticas, permitiendo la salida de los constituyentes celulares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los saponósidos tienen propiedades hemolíticas, por lo tanto por vía intravenosa son muy tóxicas. Y suele atribuirse a su interacción con el colesterol de la membrana eritrocitaria.

En los mamíferos presenta una ligera toxicidad por vía oral. Sin embargo, las saponinas son relativamente seguras cuando se toman oralmente, de hecho se encuentran presentes en algunos alimentos como por ejemplo en los frijoles, las lentejas, soya, espinacas, espárragos, tomates, y avena, contienen igualmente saponinas que facilitan la digestión. Por ejemplo, la Zarzaparrilla es rica en saponinas esteroidales pero se usa ampliamente en la fabricación de bebidas no alcohólicas; no obstante la toxicidad se minimiza durante la ingestión por la baja absorción, y por la hidrólisis. La hidrólisis por catálisis ácida de las saponinas libera el azúcar (es) y agliconas (sapogeninas) que pueden ser de naturaleza triterpenoide o esteroide.

6.7, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 33, 34, 38, 48, 49

Tienen la propiedad de ser tensoactivas, por lo que desempeñan un papel importante en la nutrición animal, ya que, debido a su fuerte poder surfactante, al contacto con las mismas las membranas de las células de la pared intestinal se hacen más permeables y permiten una mejor absorción de los nutrientes.³⁰

Algunos saponósidos son antiinflamatorios, ya que aumentan la relajación muscular.^{6, 28, 30}

Tiene propiedades expectorantes y antitusivas, ya que incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales.^{6, 30}

Tiene propiedades cicatrizantes de heridas superficiales e internas (úlceras gástricas).^{6, 9, 29}

Tiene propiedades emulsionantes, se emplean también como diuréticos y desinfectantes de las vías urinarias, efecto hipocolesterolémico, acción cardiovascular, son utilizados como materias primas para sintetizar hormonas esteroideas (cortisona, hormonas sexuales, esteroideos diuréticos, vitamina D y heterósidos cardiacos); como el endulzantes, en cosméticos como detergentes y emulsionantes, para igualar el color de la tez y hacer desaparecer las impurezas de la piel.

Se emplean también en fotografía, como humectantes, y en técnica, añadiéndolos a la gasolina para impedir la inflamación espontánea o bien agregándolos en líquidos de extinción de incendios, como adyuvantes en vacunas veterinarias. Comercialmente se usan en formulaciones contra la rabia, fiebre aftosa, leucemia en felinos, mastitis bovina, etc.

Algunas de las ventajas que presentan las plantas que contienen saponinas, es que éstas protegen a los reguladores del crecimiento vegetal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

además pueden inhibir algunas enfermedades producidas, por virus, bacterias, insectos, etc.)

Las técnicas de cultivo celular in vitro permiten el aislamiento y caracterización de saponinas, por lo que su investigación está aumentando, ya que ofrece un recurso renovable que proporciona un práctico suministro fidedigno de material crudo y estable.

6, 7, 30, 33, 34, 48

ALCALOIDES

El nitrógeno es el factor más importante en el crecimiento de las partes verdes, pues les permite formar grandes hojas que servirán a la vez para la respiración y para la asimilación de nutrientes.

En las plantas con alcaloides, el nitrógeno disponible no se transforma totalmente en prótidos vegetales, sino que continúa su circula en la savia o se fija en algunas partes de la planta. Asimismo, puede combinarse con el azufre y dar heterósidos sulfurados, o con el cianuro y dar heterósidos cianogenéticos.

Este fenómeno se produce sobre todo en las familias de las dicotiledóneas, raramente entre las monocotiledóneas. Por otra parte, las plantas de las regiones cálidas son más ricas en alcaloides que las de los países nórdicos.

Ya hacia 1925 R. Steiner y W. Pelikan descubrieron que los vegetales alcaloidíferos producían sustancias metabólicas específicas, sobre todo cuando crecen rápidamente, como si el metabolismo de la planta no lograra seguir.

En la Antigüedad ya se había observado que ciertas plantas producían efectos «heroicos» sobre los enfermos y los animales. El problema que no se había resuelto era el de la dosificación; no se conocía el límite entre lo que curaba y lo que mataba. No fue hasta principios del pasado siglo cuando el farmacéutico alemán Serthürmer logró aislar químicamente los alcaloides para definir mejor la dosificación necesaria para su acción terapéutica. Fue el primero en cristalizar un alcaloide, la morfina. En Francia, en 1803, Derosne publicaba un método de extracción de estos mismos alcaloides. Para otras plantas productoras de alcaloides a escala industrial se han obtenido por selección o hibridación variedades de alto contenido.

Contrariamente a lo que hizo Serthürmer, que llamó a la sustancia que descubrió «morfina», de Morfeo, dios de los sueños, los alcaloides se denominan hoy con derivados del nombre de la planta que los proporciona, como por ejemplo la papaverina (de *Papaver*, adormidera) y algunas veces también con nombres derivados de su acción, como de narcosis ha salido narcotina, luego cotarnina y tarcosina, siempre con la terminación característica en ina.

El nombre de alcaloide se debe al farmacéutico alemán Meissner (1792-1853), Derosne y Serthürmer lo denominaban álcali vegetal, y a las plantas de las cuales provenían les llamaban alcaloidíferas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los alcaloides se conservan bien en las plantas secas y son responsables de la toxicidad de ciertos fármacos, pero la acción de éstas no es necesariamente la misma que la del alcaloide aislado puro.

Pocos alcaloides actúan sobre el corazón, pero algunos se emplean para elevar y otros para bajar la presión sanguínea, pues la acción fisiológica sobre el sistema nervioso central se ejerce sobre la circulación y sobre la respiración, como depresivo y excitante.

Muchos fármacos actúan sobre el nervioso autónomo como excitante y luego como paralizante del nervio simpático.

La acción sobre el sistema nervioso puede ir hasta una acción antiespasmódica y midriática, anestésica local o analgésica y narcótica.

Por fin, se conocen alcaloides, sobre todo de origen tropical (quinina), que actúan como antiparasitarios o como quimioterapéuticos.

De un modo general, los alcaloides son amargos y se utilizan como aperitivos.

20. 33. 34

FLAVONOIDES

La industria tintorera utiliza desde hace más de 150 años compuestos fenólicos vegetales (polifenoles naturales) para tinter de amarillo la lana, la seda y el algodón. Estos compuestos han sido denominados flavonas por el color que producen (en latín *flavus* = amarillo).

Las decocciones de estas plantas son a menudo amargas y se conservan largo tiempo.

Los ensayos con sustancias medicamentosas de este género han de mostrado que actúan sobre el corazón y sobre la circulación de la sangre. Disminuyen también la fragilidad de los capilares sanguíneos. De una manera general se emplean sobre todo como espasmolíticos y diuréticos.

En resumen, los flavonósidos se dividen como sigue:

Flavonas:	Apigenina Luteolina
Flavonoles:	Kaempferol Quercetina
Flavonas:	Eriodictiol
Isoflavonas:	Genisteína
Calconas:	Buteína
Auronas:	Sulfuretina

20. 33. 34

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

QUINONAS

Las quinonas son pigmentos que se encuentran en las plantas ya sea en forma libre o combinada con azúcares formando glicósidos. Las quinonas naturales varían en su color desde el amarillo pálido hasta el color casi negro.

Se conocen más de 450 estructuras quinoideas, y aunque están ampliamente distribuidas en la naturaleza, contribuyen poco a la coloración de las plantas superiores debido a que se encuentran enmascaradas por otros pigmentos; en cambio, en bacterias, hongos y líquenes, son las sustancias que les dan color. Algunas antraquinonas que se encuentran en la hoja sen y en la corteza de cáscara sagrada, tienen acción catártica, por lo que estas drogas se encuentran incluidas en las farmacopeas de varios países en donde tienen uso como purgantes.

Todas son coloridas y presentan el mismo cromóforo básico que es la benzoquinona.

Las quinonas se clasifican de acuerdo con su estructura en cuatro grupos: benzoquinonas, naftaquinonas, antraquinona e isoprenoquinonas.

20, 33

BETALAINAS

El término betalainas corresponde un grupo de moléculas que se subdividen en las betacianinas, de color rojo a rojo-violeta, y las betaxantinas, de color amarillo, así como productos de degradación de las betalainas (marrón claro), son solubles en agua, y actúan como zwitteriones. Las betalainas son usadas como colorantes naturales para productos: alimenticios, farmacéuticos cosméticos; algunas de sus aplicaciones en alimentos comprenden la elaboración (de helados, productos lácteos, embutidos, conservas, gelatinas y dulces. Sin embargo, su sensibilidad a temperatura, a la luz y a pH's alcalinos limita su empleo en otros productos.

Las betalainas se encuentran confinadas ciertos grupos taxonómicos y, debido a la complejidad de sus moléculas, difícil obtenerlas por síntesis química.

Estos compuestos tienen importancia por su actividad biológica. Ellos pueden tener actividad antiviral y antibacterianas. Las betalainas están involucradas como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas, además son potenciales pigmentos naturales de alimentos.

Estos pigmentos son abundantes en muchas plantas, como la remolacha roja, los cactus, bayas, etc.

4, 20, 36, 47

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 6 GENERALIDADES SOBRE Anredera scandens

CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Reino	<u>Plantae</u> - Plantas
Subreino	Tracheobionta- plantas vasculares
División	<u>Magnoliophyta</u> - plantas florecientes
Clase	<u>Magnoliopsida</u> - Dicotiledóneas
Familia	<u>Basellaceae</u> - familia <i>Basellaceae</i>
Género	<u>Anredera juss-</u> madieravine
Especie	<u>scandens</u> < <u>Anredera</u> (L.) Moq

SINÓNIMOS DEL NOMBRE CIENTÍFICO.

Anredera vesicaria (Lam.) Moq.

Basella vesicaria Lam.

Boussingaultia leptostachys Moq.

Anredera leptostachys (Moq.) Steenis

Basella vesicaria Lam.

Boussingaultia leptostachys Moq.

NOMBRES COMUNES: Cuamecate, gusano (Dgo.), ix tuyuum (lengua huasteca), raíz de camotillo, sacasil, suelda con suelda, Diego.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Planta herbácea, trepadora sobre arbustos, a veces sobre árboles relativamente altos, de hasta 8 m de alto; jugoso-mucilaginoso; con tubérculos subterráneos y a menudo también al ras del suelo, así como en las axilas de las hojas inferiores; tallos hasta de 2.5 cm de grosor en la base, ramificados; hojas sobre peciolos de 3 a 5 mm como mínimo y de 15 a 20 mm como máximo de largo; inflorescencias axilares o terminales, erectas o algo colgantes, en forma de racimos espiciformes, simples o ramificados; inflorescencias en forma de racimos cilíndricos muy densos, de 2 a 16 cm de largo y de alrededor de 1 cm de ancho, flores blancas o blanquecinas fragantes, que no ennegrecen al secarse. Se ha

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

colectado en flor en octubre y noviembre.

HÁBITAT: Crece en las selvas bajas caducifolias en ecotonía con bosques de *Quercus-Juniperus*, entre los 800 y los 1,650 m snm.

USOS:

Comestible: En la Huasteca Potosina se consume como verdura, pero en exceso puede ser perjudicial.

Medicinal: Se le emplea en la medicina tradicional latinoamericana como antiinflamatorio, antitusivo, expectorante, antibacteriano, antifúngico, cicatrizante, para soldar huesos rotos, infecciones gangrenosas.

Ornamental: Se cultiva como ornamental.

Uso Doméstico: Como jabón.

De los tubérculos se obtiene un pegamento

Forma de Preparación:

Para infecciones bacterianas, micóticas, gangrenosas, para heridas externas y para soldar huesos; se trituran las raíces y se colocan como cataplasma en el área afectada.

Para heridas internas, como antitusivo y expectorante, se utiliza la

decocción de las raíces secas. Se toma como té.

ETNOBOTÁNICA:

Las plantas medicinales son un elemento importante de sistemas médicos indígenas en México así como en otros países. Estos recursos normalmente se consideran como la parte del conocimiento "tradicional" de la cultura mexicana.

Según los datos inéditos de las autoridades de salud locales de las comunidades indígenas más marginadas del sur de México: Maya, Mixe, Zapoteca y Nahuatl. Está claro que los mayores problemas de salud en todas las regiones anteriores son:

- o gastrointestinales (frecuentemente la diarrea, sobre todo en niños pequeños - y deshidratación como resultado de la misma),
- o enfermedades respiratorias
- o heridas infectadas y otras enfermedades de las dermatológicas inflamatorias también son comunes.
- o Así como problemas ginecológicos y del andrológicas.

Encontrándose que la especie *Anredera scandens*, es ampliamente utilizada por éstos grupos étnicos, y por lo tanto es un elemento importante en las prácticas médicas para los indígenas del sur de México.

Por ello la etnobotánica está particularmente interesada en entender e investigar científicamente

el uso de plantas medicinales, en éste caso sobre *Anredera scandens*, así como las metodologías en vías de desarrollo, para propagar las especies vegetales con metabolitos de interés económico. Adicionalmente se ocupa por los conceptos indígenas sobre las plantas medicinales, la selección y el procesamiento de éstas.

9, 29, 32, 39, 42

FITOQUÍMICA: No cianogénica. Proantocianidinas ausentes. Saponinas presentes. Quinonas ausentes. Alcaloides presentes. Flavonoides ausentes o presentes como quercetina (flavonoles). Betalainas presentes. Ácido Ellágico ausente.

FARMACOLOGÍA:

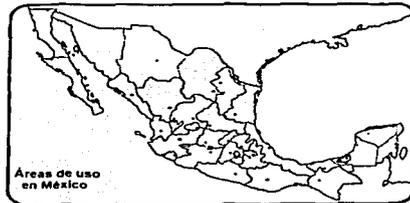
Se usan los tubérculos de *Anredera scandens* para evaluar su capacidad como antinociceptivo y antiinflamatorio. La actividad del antinociceptivo se ensayó en ratones, por medio de un extracto metanólico, con una dosis de 250 y 500 mg/kg reduciendo la nocicepción. La relajación muscular sólo disminuyó con las dosis más altas ensayadas. El instinto de escape también se redujo significativamente siendo más eficaz que la morfina y el diazepam.

Se evaluó la actividad herida-curativa en las heridas superficiales e interiores (las úlceras gástricas). Obteniendo respuestas positivas, encontrándose también que no exhibe actividad mutagénica

9, 28

DISTRIBUCIÓN MUNDIAL: México, Ecuador, Guatemala, Perú.

DISTRIBUCIÓN EN MÉXICO:



Durango: Mezquital.

Jalisco: La Huerta, Chamela.

Oaxaca: Mpio. Concepción Buenavista, Mpio. Santos Reyes, Mpio. Tepejillo, Dto. Juxtlahuaca.

San Luis Potosí: Las guapas y los Gomotes (Mpio. Rayón), Huasteca Potosina

Nayarit: Acafoneta

Tamaulipas: Tampico

Coahuila
Sinaloa.

Herbarios:
E.N.C.B. MEXU.

Referencias: 5, 8, 9, 28, 29, 31, 32, 34, 36, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A un gran número de especies vegetales se les ha reconocido un valor terapéutico y se debe básicamente a las propiedades de sus principios activos, algunos de los cuales aislados y purificados se utilizan como medicamentos, coadyuvantes, etc.

Sin embargo:

1. La rápida desaparición de las especies vegetales y su hábitat, por la depredación selectiva de las plantas por sus características químicas más allá de su tasa de reproducción;
2. La obtención de metabolitos afectados por contaminantes inherentes al sitio de colecta por el nulo control fitosanitario,
3. Factores ecológicos difíciles de controlar por el humano como: el clima, el tipo de suelo, la época del año, agua de riego, etc. ^{1, 3, 4, 5, 29}

Lo anterior hace notar que es imprescindible proteger y reproducir especies vegetales como *Anredera scandens* planta productora de saponinas, utilizada por la medicina tradicional latinoamericana; por medio del cultivo *in vitro* para garantizar el control fitosanitario, la conservación y la recuperación masiva de la especie; así como el desarrollo de un diseño factorial por medio de reguladores del crecimiento vegetal a concentraciones constantes, que inducen a la formación de callo. Y finalmente, para observar hasta que grado los reguladores de crecimiento vegetal modifican la producción del metabolito de interés (saponinas) a partir del índice de espuma.

OBJETIVOS:

- o Obtener la especie Anredera scandens bajo control fitosanitario, para garantizar la producción de ejemplares de buena calidad, del que se hayan eliminado: microorganismos patógenos como bacterias, hongos, virus, ó insectos, ó contaminación por el riego con aguas negras, etc.
- o Desarrollar un método biotecnológico, por cultivo *in vitro* para la propagación masiva de Anredera scandens.
- o Implementar un diseño factorial por medio de reguladores del crecimiento vegetal para obtener saponinas como producto de metabolismo vegetal, que se conocen como metabolitos secundarios.
- o Observar hasta que grado los reguladores de crecimiento vegetal modifican la producción del metabolito de interés (saponinas) a partir de medir el índice de espuma.
- o Determinar la presencia de otros metabolitos secundarios como: alcaloides, quinonas, y flavonoides, por medio de pruebas fitoquímicas preliminares.

HIPÓTESIS:

A partir del cultivo *in vitro*, se obtendrán masivamente ejemplares de *Anredera scandens* libres de contaminantes inherentes al sitio de la colecta silvestre. Igualmente se espera definir un diseño factorial de reguladores de crecimiento vegetal que incremente la producción de saponinas, midiéndolas por el índice de espuma.

Asimismo, si se obtienen en condiciones óptimas se podrá determinar la presencia de otros metabolitos secundarios como: alcaloides, quinonas, y flavonoides, por medio de pruebas fitoquímicas preliminares.

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Población de estudio:

Especie donadora: Anredera scandens. Planta herbácea, trepadora con tubérculos subterráneos y a menudo también al ras del suelo; hojas lisas y brillantes sobre peciolo de (3)5 a 15(20) mm. de largo. Proveniente de Ecuador. De nombres comunes: Sacasil, suelda con suelda, cuamecate, raíz de camotillo.

Criterios de inclusión:

Se requiere de ejemplares de Anredera scandens, como plantas donadoras del inóculo o explante. No deberá presentar ninguna muestra de ser parasitado por microorganismos, o depredado por insectos, ni decoloramientos en las hojas. Para ello se habrá de seleccionar de manera que sus características sean las más adecuadas para desarrollar los cultivos, es decir se tratará de plantas jóvenes, y saludables. Deberán ser tratadas por métodos de desinfección.

Criterios de exclusión:

Ejemplares de diferente familia, género, y/o especie. Ejemplares enfermos o contaminados. Ejemplares no desinfectados.

Variables:

Diseño factorial de reguladores del crecimiento vegetal.
 Porcentaje de humedad.
 Índice de espuma.

Diseño estadístico:

A partir de los resultados que se obtengan del factorial:

	AIA	ANA	IBA	Testigo
Kin	1	2	3	
BAP	4	5	6	
	7	8	9	10

Se aplicó: Estadística descriptiva
 Estadística inferencial
 ANDEVA de 1 factor

MATERIAL.**Material biológico:**

Planta entera, joven y sana de *Anredera scandens*, proveniente de Ecuador. Identificada por el Laboratorio de Etnobotánica del Departamento de Botánica, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Del cuál se tomarán estacas o fragmentos de tallo, hojas y raíz.

Material de laboratorio:

Agitadores de vidrio	Mechero fisher
Agitadores magnéticos	Papel aluminio, filtro y plástico
Anillo metálico	Perilla de seguridad
Aspersor de vidrio	Pinzas con nuez
Bisturí	Pinzas de disección
Cajas petri	Pipetas graduadas
Cápsulas de porcelana	Pipetas Pasteur
Cuerpos de ebullición	Pipetas volumétricas
Embudo de vidrio	Placa de muescas
Espátulas de acero inoxidable.	Probetas
Frascos gerber con tapa de plástico	Refrigerante
Gradilla	Soporte universal
Lámparas de alcohol	Termómetro
Matraces aforados de 100, 1000 mL	Tubos de ensayo
Matraces Erlenmeyer 250 y 500 mL	Tubos de ensayo con tapa de (16 x 16)
Matraz balón 1000 mL	Vasos de precipitado 100, 500 y 1000 mL

Reactivos y soluciones:

Ácido clorhídrico	Kin
Ácido sulfúrico	Peróxido de hidrógeno
Agua destilada	Reactivo de ácido silicotúngstico
Alcohol etílico	Reactivo de Dragendoff
Alcohol metílico	Reactivo de Lieberman Bouchard
Agar	Reactivo de Mayer
Agar base para AS	Reactivo de Rosenthaler
AIA	Reactivo de Shinoda
ANA	Reactivo de Sonnenschain
Anhidrido acético	Reactivo de Wagner
BAP	Sacarosa

Cloroformo
Cloruro de calcio - H₂O
EDTA disódico
Hidróxido de amonio
Hidróxido de sodio
Hipoclorito de sodio
IBA

Sangre de carnero
Solución Buffer pH 4
Solución Buffer pH 7
Stock MS mayor
Stock MS menor
Stock Ms vitaminas

Equipo:

Autoclave AESA, Modelo CV/250, Serie: Nom-1-10644
Balanza Analítica Mettler
Balanza Granataria cap. 2160 g. Ohaus
Balanza Semianalítica Ohaus
Campana de flujo laminar AESA, Modelo FD950, Serie: 1-0134
Calibrador de acero Scala, mod. 222-A
Estufa Riossa modelo EC
Horno de microondas Panasonic mod. NN 7360
Placa de agitación y calentamiento hotplate st.
Potenciómetro Orión- research Modelo 601^a Serie 75117

MÉTODO**METODOLOGÍA PARA CULTIVO *IN VITRO*:**

- a. Búsqueda bibliográfica
- b. Adquisición e identificación del material biológico.
- c. Preparar soluciones Stock MS mayor, menor y vitaminas. Ver anexo
- d. Preparar soluciones de reguladores del crecimiento vegetal a las siguientes concentraciones: Auxinas (AIA, ANA, IBA) 2 mg / mL
Citocininas (Kin, BAP) 0.2 mg /mL.
- e. Preparar y esterilizar * medio de cultivo MS. Ver Anexo
- f. Esterilizar material en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in² (121°C).*
- g. Lavar el material biológico con detergente comercial.
- h. Disección de material biológico, para obtener estacas de tallo, hoja, y raíz.
- i. Desinfestación del material biológico, sometiéndolo a los siguientes desinfectantes y tiempos:

Agente	Concentración	Tiempo de tratamiento (min.)
Hipoclorito de sodio *	20 %	30
Etanol	70 %	10

* Disponible como blanqueador comercial, usualmente con 5 a 6% de ingrediente activo. La dosis común de uso es de 20 % v/v (1 parte de blanqueador por 4 partes de agua)

- j. Preparar de manera aséptica la campana de flujo laminar, previo lavado con detergente. Con las siguientes soluciones, rotándolas de manera cíclica cada vez que se use ésta área:

Etanol	70 %
Peróxido de hidrógeno	30 %
Hipoclorito de sodio	20 %

- k. Inoculación del material biológico (estacas de tallo, hoja y raíz) en medio basal. Para observar que tipo de estaca tiene mayor porcentaje de respuesta.
- l. Transferir los cultivos a la cámara de incubación. Bajo los siguientes lineamientos para todos los cultivos y resiembras:

Luz	Blanca (lámparas fluorescentes).
Fotoperíodo	16 horas de luz / 8 horas de oscuridad
Temperatura	26°C ± 2°C
Tiempo	1.5 meses para medir respuesta

- m. Primera resiembra en medio basal, a partir de la obtención de callo, hojas, tallos y raíces. Para observar que tipo de estaca tiene mayor porcentaje de respuesta.
- n. Segunda resiembra a partir de la estaca que proporcioné mayor porcentaje de respuesta. Utilizando el siguiente diseño factorial:

	AIA	ANA	IBA	Testigo
Kin	1	2	3	
BAP	4	5	6	
	7	8	9	10

Donde:

AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido indolbutírico
IBA	Ácido naftalenacético
Kin	6-furfurilamino purina
BAP	6-bencilamino purina

- o. Tercera resiembra, a partir del factorial (1, 2, 3, etc.) que proporcione mayor índice de espuma. Previo análisis fitoquímico preliminar.
- p. Trasplante a tierra

Diagrama de Flujo para Cultivo *in vitro*

Búsqueda bibliográfica



Adquisición e identificación del material biológico

Preparación de soluciones (stock MS y reguladores de crecimiento)

Preparación y esterilización de medios de cultivo

Disección y desinfección del material biológico

Inoculación del material biológico

Primera resiembra en medio basal a partir de la obtención de callo, hojas, raíz.

Transplante a tierra del material vegetal proveniente de la cuarta resiembra.

Cuarta resiembra a partir del factorial que proporcione mayor índice de espuma

Tercera resiembra, en diseño factorial, a partir del material con mayor % de respuesta

Segunda resiembra a partir del material con mayor % de respuesta



METODOLOGÍA PARA PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES:

- a. Secar el material biológico formado por hojas, raíces y callos, obtenidos por medio de cultivo *in vitro*. Durante 6 minutos en High en el horno de microondas (6 min. por cada gramo), y 12 horas en estufa a 35°C.
- b. Obtener extracto etanólico, acuoso y clorofórmico. Para hoja, raíz y callo. Realizar pruebas fitoquímicas preliminares, con el fin de identificar la presencia o ausencia de alcaloides, saponinas, quinonas y flavonoides.

Para extracto etanólico:

- o Colocar el material biológico seco, previamente fragmentado o molido, en un matraz balón de fondo plano de boca esmerilada y adicionarle etanol de 96° hasta cubrir dicho material. Colocar el refrigerante y mantener en reflujo por una hora. Pasado ese tiempo filtrar y concentrar ± 10 mL por destilación simple. Transferir a una cápsula de porcelana previamente pesada y terminar de concentrar a sequedad a baja temperatura, hasta obtener un residuo syruposo. Pesarlo y tomar 0.5 mL y diluirlo con 50 mL de etanol, para utilizarlo en las siguientes reacciones de identificación:

ALCALOIDES:

- ↪ Tomar 5 mL del extracto etanólico y adicionarle de 5 a 10 mL de ácido clorhídrico al 10% calentar a ebullición hasta que desaparezca el olor al etanol, enfriar y adicionar 2 gotas de cloruro de sodio al 1%. Filtrar. Dividir el filtrado claro, transparente (no incoloro) y colocar 1 mL de extracto en seis tubos de ensayo uno de los cuales servirá como testigo entre los cambios producidos por el extracto ácido original y los tubos en los que se realicen las reacciones:

Tubo 1. Adicionar una gota de reactivo Dragendorff, si el extracto contiene alcaloides se formará un precipitado naranja.

Tubo 2. Adicionar 1 gota del reactivo de Mayer, se formará un precipitado blanco o amarillento que indica la presencia de alcaloides.

Tubo 3. Adicionar una gota del reactivo silicotúngstico, si hay alcaloides se formará un precipitado blanco amarillento.

Tubo 4. La adición de una gota del reactivo Sonnenschain da un precipitado amarillo o azul verde, e indica la presencia de alcaloides.

Tubo 5. Añadir una gota del reactivo de Wagner, se formará un precipitado café naranja si se encuentran alcaloides presentes.

SAPONINAS:

- ✦ Reacción de Liebermann Burchard. Tomar 1 alícuota de 0.5 mL y concentrar hasta ver consistencia de caramelo (syruposa). Adicionar 1 mL de cloroformo – metanol 1:1 hasta solubilizar, tomar 2 gotas de extracto y colocarlas en la placa de muesca, adicionar 1 gota de anhídrido acético, mezclar con agitador. Dejar resbalar por las paredes 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. Las saponinas triterpenoides dan coloraciones rosa, rojo, magenta o violeta.
- ✦ Reacción de Rosenthaler. Llevar 1 alícuota de 0.5 mL a una placa de muesca y concentrar. Adicionar 2 gotas del reactivo de Rosenthaler y 2 gotas de ácido sulfúrico caliente, concentrado. Si se encuentran saponinas de tipo triterpenoide se forma una coloración violeta.
- ✦ Prueba de altura y estabilidad de la espuma. En un tubo de ensayo colocar 1 mL del extracto etanólico y agregarle 1 mL de agua, agitar vigorosamente, medir a altura de la espuma, si mide de 8 a 10 mm y es estable por 30 min. se considera positivo.

QUINONAS:

- ✦ En dos cápsulas de porcelana colocar 2 mL del extracto etanólico en cada una y concentrar a sequedad.

Cápsula 1. Dejar resbalar por la pared de la cápsula, 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. La presencia de quinonas da una coloración roja.
Cápsula 2. Dejar resbalar por la pared de la cápsula, 1 gota de hidróxido de sodio al 10 %. La formación de una coloración roja indica la presencia de quinonas.

FLAVONOIDES:

- ✦ Reacción de Shinoda. Tomar 1 mL de extracto + 2 mL de ácido clorhídrico concentrado y un trocito de magnesio metálico; observar cambio de color contra un tubo testigo. Si se observa coloración naranja a rojo se trata de flavonas, roja se encuentran flavonoles o magenta de flavonas.

**Diagrama de flujo para pruebas fitoquímicas
preliminares para extracto etanólico**

Extracto Etanólico
Planta + Etanol
Reflujo por 1 hr.

Alcaloides	Saponinas	Quinonas	Flavonoides
Extracto. + 2 ml HCl al 10 % ebullir 5'	Extracto. + Liebermann Burchard	Extracto. + H ₂ SO ₄	Extracto, 1 mL + 2 mL HCl concentrado + Mg metálico
Extracto. + Ac. Silicotúngstico	Extracto. + Rosenthaler	Extracto. + NaOH al 10%	
Extracto. + Dragendorff	Altura y estabilidad de espuma		
Extracto. + Mayer			
Extracto. + Wagner			
Extracto. + Sonnenschein			

Para extracto acuoso:

- o Colocar el material biológico seco, previamente fragmentado o molido, en un matraz Erlenmeyer que contenga cuerpos de ebullición y adicionarle agua hasta cubrir dicho material, mantener a ebullición suave durante 20 minutos, con agitación constante, teniendo precaución por la formación de espuma. Dejar enfriar y filtrar. Realizar los ensayos para:

ALCALOIDES:

- ◇ Seguir la metodología que se indica para el extracto etanólico.

SAPONINAS:

- ◇ Índice de Espuma. Reducir a polvo 1 gramo de material vegetal y transferir a un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenga 100 mL de agua en ebullición. Mantener a ebullición suave durante 30 minutos. Enfriar y filtrar la muestra en un matraz volumétrico de 100 mL. Adicionar suficiente agua a través del filtro para llevar al aforo.

Colocar la decocción en 10 tubos de ensayo con tapa (16 x 16) en porciones sucesivas desde 1 mL hasta 10 mL y ajustar el volumen del líquido en cada tubo con agua hasta 10 mL. Tapar los tubos y agitar en el sentido del largo del tubo durante 15 segundos (dos agitaciones por segundo). Dejar reposar las muestras durante 15 minutos y medir la altura de la espuma.

- ≈ Si la altura de la espuma en cada tubo es menor de 1 cm, el índice de espuma es menor que 100.
- ≈ Si se puede medir la altura de la espuma de 1 cm en algún tubo, el volumen de la decocción del material vegetal en ese tubo (α) se usa para determinar el índice. Calcular el índice de espuma usando la siguiente fórmula: $1000 \div \alpha$, donde " α " es el volumen en mililitros de la decocción usada para preparar la dilución en el tubo donde la espuma tiene la altura de 1 cm.
- ◇ Hemólisis: En 10 placas de agar sangre de carnero (5 placas al 5% y 5 placas al 10%), colocar 5 discos de papel filtro de 5 mm de diámetro en cada una de las placas; impregnados previamente en el extracto acuoso concentrado. Incubar a una temperatura aproximada a los 25°C. Observar si existen zonas hemolizadas, y tipo de hemólisis a las 24 y 48 horas. Realizar ésta prueba 2 veces más.

Diagrama de flujo para pruebas fitoquímicas
preliminares para extracto acuoso

Extracto Acuoso
Planta + agua
Ebullición por 30'

Alcaloides

Extracto. +
2 mL HCl
al 10 %
ebullir 5'

Extracto. + Ac.
Silicotúngstico

Extracto. +
Dragendorff

Extracto. +
Mayer

Extracto. +
Wagner

Extracto. +
Sonnenschain

Saponinas

Índice de
Espuma, según
FHEUM

Prueba de
hemólisis en
placa

Para extracto clorofórmico:

- o Colocar el material biológico seco, previamente fragmentado o molido, en un matraz balón de fondo plano de boca esmerilada y adicionarle cloroformo hasta cubrir dicho material. Colocar el refrigerante y mantener en reflujo por una hora. Pasado ese tiempo filtrar y concentrar \pm 10 mL por destilación simple.

SAPONINAS:

- ✦ Reacción de Liebermann Burchard. Tomar 1 alícuota de 1 mL del extracto y colocarlo en la placa de muesca, adicionar 3 gotas de anhídrido acético, mezclar con agitador. Dejar resbalar por las paredes 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. Las saponinas triterpenoides dan coloraciones rosa, rojo, magenta o violeta.

**Diagrama de flujo para pruebas fitoquímicas
preliminares para extracto clorofórmico**

Extracto Clorofórmico
Planta + cloroformo
Reflujar 1 hr.

Saponinas

Liebermann
Burchard

Extracto. + 3 gotas de
anhídrido acético + 1
gota de H_2SO_4 .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 1 (KIN - AIA)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	1 de 2	--	Callo pequeño café oscuro, sin raíz, sin tallo. (Sólo crecimiento del cultivo inicial proveniente de callo). El que no presento respuesta fue inóculo de hoja (horizontal).
3	2	1 de 2	--	Callo pequeño café oscuro, raíz escasa blanca, sin tallo. (Sólo crecimiento del cultivo inicial proveniente de callo). El que no presento respuesta fue inóculo de hoja (horizontal).
4	5	5 de 5	--	5 callos pequeños café oscuro provenientes de hoja (vertical) de los cuales: 2 presentaron raíz adventicia escasa, sin tallo. 3 presentaron raíz café escasa, sin tallo.
5	5	4 de 5	--	4 callos pequeños provenientes de la siembra de hoja (vertical) de los cuales: 3 presentaron raíz abundante tallo grande y hoja mediana abundante. 1 presento raíz blanca escasa sin tallo
6	5	5 de 5	1 de 5	3 callos pequeños café oscuro, tallo mediano, raíz blanca abundante y hojas medianas abundantes. 1 callo mediano, tallo mediano abundante, hojas medianas abundantes, raíz blanca abundante.

TESIS CON
 FALLA DE CHEGEM

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

7	5	5 de 5	--	<p>3 callos medianos, café oscuro de los cuales: 2 presentaron raíz gruesa café oscuro sin tallo. 1 presento raíz adventicia, tallo grande, hojas medianas abundantes. 2 callos oscuros pequeños, suficiente raíz adventicia de los cuales: 1 con hoja grande abundante 1 con hoja pequeña escasa.</p>
8	5	4 de 5	--	<p>2 callos medianos, café oscuro, con gránulos claros de los cuales: 1 presento raíz blanca escasa sin tallo 1 no presento ni raíz ni callo. 2 callos pequeños oscuro de los cuales: 1 presento suficiente raíz adventicia, tallo grande, hojas grandes abundantes 1 presento raíz blanca escasa sin tallo</p>
	$\Sigma = 31$	25 de 31 80.6451 %	1 de 31 3.2259 %	

TRESTA CON
 FALDA DE CIGÜEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 2 (KIN - ANA)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	1 de 2	--	Callo pequeño café oscuro, presento raíz blanca suficiente sin tallo. El que no presento respuesta fue inóculo de callo.
3	2	1 de 2	1 de 2	
4	5	5 de 5	--	5 callos pequeños café oscuro provenientes de hoja (vertical) de los cuales: 2 presentaron escasa raíz adventicia, sin tallo. 3 presentaron escasa raíz café sin tallo.
5	5	5 de 5	--	4 callos grandes provenientes de la siembra de hoja (vertical) de los cuales: 2 presentaron raíz abundante tallo grande y hoja mediana abundante. 1 presento sólo callo abundante. 2 presentaron raíz blanca abundante sin callo, tallo y hojas medianas abundantes y ligera coloración magenta en el medio (+).
6	5	5 de 5	--	4 callos pequeños café oscuro, tallo mediano, raíz blanca abundante y hojas medianas abundantes de los cuales: 2 presentaron ligero color magenta en el medio (+). 1 callo mediano, tallo pequeño abundante, hojas pequeñas escasas, raíz blanca escasa.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

7	5	5 de 5	--	<p>3 callos pequeños, café oscuro y raíz adventicia de los cuales: 2 presentaron raíz escasa, tallo mediano suficiente y hoja mediana abundante. 1 presento raíz abundante, tallo grande, hojas grandes abundantes. 2 callos medianos oscuros raíz suficiente pelú ida de los cuales: 1 con tallo mediano suficiente, hoja mediana abundante 1 con tallo mediano escaso, hoja pequeña escasa.</p>
8	5	5 de 5	--	<p>2 callos medianos, café oscuro, con gránulos claros de los cuales: 1 presento abundante raíz adventicia, sin tallo 1 presento escasa raíz adventicia, sin tallo. 4 callos pequeños oscuro de los cuales: 3 presentaron gránulos claros: 2 no presentaron raíz, ni tallo (1 presento color en el medio) 1 presento abundante raíz adventicia, tallo mediano y hojas grandes abundantes 1 presento abundante raíz adventicia, sin gránulos claros tallo abundante y hojas muy grandes abundantes</p>
		$\Sigma = 31$	27 de 31 87.0967 %	1 de 31 3.2259 %

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 3 (KIN - IBA)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	1 de 2	--	Callo pequeño café oscuro, sin raíz, sin tallo. (Sólo crecimiento del cultivo inicial proveniente de callo). El que no presento respuesta fue inóculo de hoja (vertical).
3	2	1 de 2	--	Callo pequeño café oscuro, escasa raíz café oscuro, sin tallo. (Sólo crecimiento del cultivo inicial proveniente de callo). El que no presento respuesta fue inóculo de hoja (vertical).
4	5	4 de 5	--	3 callos pequeños café oscuro (provenientes de la siembra de hoja (vertical)), con tallo pequeño de los cuales: 1 presento raíz abundante blanca y hojas pequeñas abundantes. 1 presento suficiente raíz blanca y hoja mediana abundante. 1 presento raíz blanca escasa, y hojas medianas escasas. 1 con ausencia de callo, raíz café oscuro abundante y tallo suficiente con hojas medianas suficientes.
5	5	4 de 5	--	3 callos grandes, café oscuro de los cuales: 2 presentaron abundante raíz gruesa café oscuro, abundante tallo pequeño: 1 con hoja pequeña abundantes 1 con hoja mediana escasa 1 presento tallo grande, hojas medianas escasas. 1 callo mediano oscuro, abundante raíz café oscuro con hoja grande abundante y tallo grande

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

6	5	5 de 5	2 de 5	<p>3 callos medianos café oscuro de las cuales</p> <p>2 presentaron: tallo grande, raíz blanca escasa y hojas medianas escasas.</p> <p>1 presento tallo grande, hojas medianas abundantes, suficiente raíz blanca.</p>
7	5	5 de 5	--	<p>2 callos grandes café oscuro de los cuales:</p> <p>1 presento abundante raíz gruesa café oscuro, sin tallo.</p> <p>1 presento abundante raíz adventicia, tallo mediano y hojas pequeñas y escasas.</p> <p>1 callo mediano, con abundante raíz adventicia, tallo grande y hojas medianas abundantes.</p> <p>2 callos pequeños café oscuro, con abundante raíz adventicia y hoja mediana suficiente.</p>
	5			<p>1 callo grande con abundante raíz gruesa café oscuro y abundante raíz adventicia, tallo grande y hojas medianas abundantes.</p> <p>2 callos medianos café oscuro con abundante raíz gruesa blanca de los cuales:</p>
8		5 de 5	--	<p>1 no presento tallo</p> <p>1 presenta tallo mediano, hojas pequeñas escasas.</p> <p>2 callos pequeños café oscuro de los cuales:</p> <p>1 no presento raíz, ni tallo</p> <p>1 presento escasa raíz adventicia, tallo mediano y hojas pequeñas y escasas.</p>
	$\Sigma = 31$	25 de 31 80,6451 %	2 de 31 6,4516 %	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 4 (BAP - AIA)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	1 de 2	--	Callo pequeño café oscuro, presento raíz blanca suficiente sin tallo y con ligero color magenta en el medio (+). El que no presento respuesta fue inóculo de callo.
3	2	2 de 2	--	2 callos pequeños café oscuro, con escasa raíz adventicia sin tallo, y con ligero color magenta en el medio (+). 2 callos medianos café oscuro provenientes de hoja (vertical) de los cuales: 1 presento raíz café escasa, tallo grande, hojas medianas abundantes y color magenta en el medio (++) 1 no presento raíz, tallo pequeño, hojas medianas suficientes y color magenta en el medio (++)
4	5	4 de 5	--	1 Callo pequeño café oscuro, presento raíz café oscuro, tallo pequeño, hojas medianas suficientes y color magenta en el medio (++) 1 con ausencia de callo, raíz café oscuro abundante y tallo mediano con hojas medianas suficientes y color magenta en el medio (++) 2 callos grandes con tallo grande, hoja mediana abundante color magenta en el medio (+++), provenientes de la siembra de hoja y callo.
5	5	5 de 5	--	1 callo mediano, suficiente raíz gruesa café oscuro, hoja mediana abundante, tallo mediano. Color magenta en el medio (++) 2 frascos perdidos.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

6	5	5 de 5	--
7	5	5 de 5	--
8	5	4 de 5	--
$\Sigma = 31$		26 de 31	0 de 31
		83.8709 %	0 %

Los resultados anteriores provienen de medio líquido

2 callos grandes café claro, tallo mediano, hojas medianas abundantes y ligero color magenta en el medio (+).

1 callo mediano café claro sin raíz y Color magenta en el medio (++)

7 callos café oscuro, pequeños, algunos con escasa raíz color café oscuro, sin tallo, color del medio café claro por la presencia e partículas de callo.

1 no se le tomo lectura.

Los resultados anteriores provienen de medio líquido

3 callos medianos café oscuro de los cuales:

2 presentaron abundante raíz gruesa café oscuro sin tallo.

1 presento abundante raíz adventicia, tallo grande y hoja grande abundante.

2 callos pequeños, café oscuro, abundante raíz adventicia, tallo mediano de los cuales:

1 presento hoja mediana abundante

1 presento hoja pequeña suficiente

4 callos grandes café oscuro, con gránulos claros, de los cuales:

2 presentaron suficiente raíz gruesa blanca sin tallo

2 no presentaron raíz ni tallo

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 5 (BAP - ANA)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	1 de 2	--	2 Callos pequeños café oscuro, sin raíz, sin tallo. Ambos con color magenta en el medio (++)
3	2	2 de 2	--	2 callos pequeños café oscuro, Sólo crecimiento del cultivo inicial proveniente de callo.
4	5	5 de 5	--	2 callos grandes, sin raíz, sin tallo, color magenta en el medio (+++), provenientes de la siembra de hoja y callo. 1 callo mediano, sin raíz, sin tallo, color magenta en el medio (++) 2 callos pequeños café oscuro, color magenta en el medio (++) de los cuales: 1 no presento raíz ni tallo 1 presento escasa raíz adventicia sin tallo.
5	5	5 de 5	--	2 callos grandes con tallo grande, hoja mediana abundante sin color en el medio y abundante raíz adventicia. 2 callos medianos, suficiente raíz adventicia, hoja mediana abundante, tallo mediano. Color magenta en el medio (++) 1 Callo pequeño café oscuro, presento raíz café oscuro, tallo pequeño, hojas medianas suficientes Los resultados anteriores provienen de medio líquido

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de Anredera scandens obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

6	5	5 de 5	--	<p>1 callo grande café claro, tallo mediano, hojas medianas abundantes y ligero color magenta en el medio (+).</p> <p>4 callos pequeños, café oscuro con ausencia de tallo y raíz</p> <p>Los resultados anteriores provienen de medio líquido</p>
7	5	5 de 5	--	<p>4 callos medianos café oscuro con gránulos blancos de los cuales:</p> <p>1 presente abundante raíz gruesa café oscuro sin tallo y raíz adventicia.</p> <p>1 presente abundante raíz adventicia, tallo grande y hoja grande abundante.</p> <p>1 presente escasa raíz adventicia, sin tallo</p> <p>1 presente abundante raíz gruesa blanca con hojas pequeñas y abundantes</p> <p>1 callo pequeño café oscuro sin tallo, color en el medio (++) , escasa raíz gruesa café oscuro.</p>
8	5	4 de 5	--	<p>3 callos medianos café oscuro, con gránulos claros, sin raíz ni tallo</p> <p>2 callos café oscuro con gránulos claros, con suficiente raíz gruesa blanca, sin tallo.</p> <p>1 ejemplar presente ausencia de callo, con raíz blanca adventicia, tallo y hojas medianos.</p>
	$\Sigma = 31$	27 de 31 87.0967 %	0 de 31 0 %	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 6 (BAP - IBA)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición vertical) y callo.
3	2	2 de 2	--	2 Callos pequeños café oscuro, raíz escasa blanca, sin tallo.
4	5	4 de 5	2 de 5	2 callos café oscuro medianos, con tallo pequeño, raíz blanca suficiente hojas pequeñas abundantes. 1 callo pequeño con raíz blanca escasa, tallo pequeño con hojas pequeñas escasas.
5	5	4 de 5	1 de 5	4 callos grandes café oscuro, con raíz abundante, de los cuales: 2 presentaron tallo pequeño y hoja mediana 2 presentaron tallo grande y abundante, hoja grande. 2 callos medianos, con abundante raíz grande, de los cuales: 2 callos son café oscuro, con tallo mediano y hojas grandes abundantes, raíz suficiente.
6	5	5 de 5	1 de 5	2 calos café claro, con gránulos claros, con raíz escasa, tallo pequeño y hojas chicas escasas.

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

7	5	5 de 5	1 de 5	<p>3 callos grandes café oscuro con gránulos blancos, raíz gruesa café, raíz gruesa blanca y abundante raíz adventicia. Tallo mediano con hojas chicas y medianas abundantes.</p> <p>1 callo mediano café oscuro, raíz blanca abundante y raíz adventicia, tallo grande y hoja grande suficiente.</p> <p>3 callo grandes con abundantes gránulos blancos, de los cuales:</p> <p>1 no presento raíz, ni tallo</p> <p>1 presento escasa raíz adventicia, no presento tallo</p> <p>1 presenta tallo mediano, hojas pequeñas escasas y escasa raíz adventicia.</p> <p>1 callo mediano con abundantes gránulos blancos y raíz blanca escasa.</p> <p>1 callos pequeños café oscuro con abundantes gránulos blancos, con un <u>tubérculo verde</u>, abundante raíz adventicia, tallo pequeño y hoja grande escasa</p>
	$\Sigma = 31$	25 de 31 80,6451 %	5 de 31 16,1290 %	

TESIS CON
 FALLA DE
 CIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 7 (AIA)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	2 de 2	--	2 Callos pequeños café oscuro, sin raíz, sin tallo. (Sólo crecimiento del cultivo inicial proveniente de callo).
3	2	0 de 2	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal y vertical) y callo. 3 callos medianos café oscuro provenientes de hoja (vertical) de los cuales:
4	5	4 de 5	1 de 5	2 presentaron raíz café escasa, tallo grande, hojas medianas abundantes. 1 presento raíz escasa, tallo mediano, hojas medianas suficientes. 1 callo grande, no presento raíz, ni tallo y ligero color magenta en el medio (+).
5	5	5 de 5	--	2 callos grandes con tallo grande, hoja grande abundante, raíz blanca gruesa abundante. 1 callo grande color café oscuro, con ligero color magenta en el medio (+), sin raíz, con tallo mediano y hojas medianas suficientes. 2 callos medianos, abundante raíz gruesa café oscuro, hoja grande abundante, tallo grande abundante.
6	5	5 de 5	1 de 5	3 callos medianos café oscuro, tallo pequeño, hojas medianas abundantes, escasa raíz café oscuro gruesa. 5 callos medianos café claro sin raíz ni tallo (provenientes del inóculo de hoja vertical).

TERCER COPIA
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

7	5	5 de 5	--
8	5	5 de 5	--
$\Sigma = 31$		26 de 31	2 de 31
		83,8709 %	6,4516 %

1 callo café oscuro grande con gránulos blancos y 1 tubérculo verde que a su vez presenta brotes verdes. Hojas grandes abundantes, raíz adventicia y blanca abundante.

1 callo grande hojas abundantes grandes, tallo grande raíz adventicia y abundante.

2 callos medianos café oscuro, abundante raíz, hojas medianas suficientes.

1 callo pequeño café oscuro, raíz gruesa escasa, sin tallo.

4 callos medianos café oscuro, de los cuales:

1 presento gránulos blancos, raíz blanca suficiente, sin tallo.

1 presento raíz blanca suficiente, hojas medianas suficientes

1 no presento raíz ni tallo.

1 escasa raíz pelú ida, hojas pequeñas suficientes, tallo pequeño.

2 callos pequeños café oscuro no presentaron raíz ni tallo .

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 8 (ANA)

Intervención	No. de cultivo	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) que se encontró seca.
3	2	2 de 2	--	2 callos pequeños café oscuro, con escasa raíz adventicia. Sin tallo.
4	5	5 de 5	1 de 5	1 callo muy grande café oscuro, con gránulos claros, tallo grande abundante raíz gruesa blanca y hoja mediana escasa. 2 callos grandes, con raíz blanca escasa, s/ tallo. 1 callo mediano, con tallo pequeño, hojas pequeñas y raíz blanca escasa.
5	5	5 de 5	1 de 5	2 callos grandes café oscuro con gránulos claros, raíz blanca abundante, tallo grande, hojas medianas abundantes. 2 callos medianos café oscuro con gránulos claros, tallo mediano raíz blanca abundante, hojas medianas escasas.
7	5	5 de 5	1 de 5	3 callos medianos, con raíz blanca escasa, tallo pequeño, hojas pequeñas escasas. 1 callo pequeño, raíz escasa, tallo pequeño y hojas grandes abundantes.
7	5	5 de 5	--	4 callos medianos café oscuro con gránulos blancos de los cuales: 1 presento abundante raíz gruesa café oscuro sin tallo y raíz 1 callo grande café oscuro abundante raíz adventicia y raíz blanca gruesa, hojas medianas abundantes.

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de Anredera scandens obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

8	5	5 de 5	--	5 callos pequeños café oscuro, de los cuales: 4 presentaron ligero color magenta en el medio (+), y no presentaron raíz, ni tallo 1 presentó escasa raíz adventicia tallo mediano y hojas muy grandes abundantes. 3 callos medianos café oscuro, con gránulos claros, de los cuales 2 presentaron abundante raíz adventicia, tallo mediano y hojas grandes abundantes. 1 uno con escasa raíz blanca, tallo pequeño y hojas pequeñas suficientes. 1 callo pequeño café oscuro con abundante raíz gruesa blanca, hojas medianas abundantes. 1 callo grande café oscuro, abundante raíz adventicia, tallo pequeño, hojas pequeñas. Suficientes.
	$\Sigma = 31$	27 de 31 87.0967 %	3 de 31 09.6774%	

TESIS COM
 FALTA DE CALLEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 9 (IBA)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	--	--	2 Callos medianos café oscuro de los cuales: 1 presente: raíz escasa blanca, sin tallo. 1 no presente raíz ni callo.
3	2	2 de 2	--	2 Callos pequeños café oscuro, sin raíz, sin tallo. (Sólo crecimiento del cultivo inicial proveniente de callo.)
4	5	5 de 5	--	3 callos café oscuro medianos, con tallo pequeño, raíz blanca abundante hojas medianas abundantes. 1 callo grande, con raíz blanca escasa, sin tallo 1 callo muy grande con abundante raíz blanca gruesa, sin tallo.
5	5	5 de 5	--	3 callos café oscuro medianos, con tallo mediano, de los cuales: 1 presente raíz pelu ida escasa, y hojas medianas suficientes. 2 presentaron hojas medianas escasas y raíz blanca abundante.
6	5	2 de 5	--	2 callos grandes café oscuro, raíz blanca escasa, tallo pequeño, y hojas pequeñas escasas.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

7	5	5 de 5	--	2 callos grandes café oscuro con gránulos blancos, suficiente raíz adventicia. Tallo mediano con hojas medianas abundantes. 2 callo grande sin raíz ni tallo.
8	5	5 de 5	--	1 callo mediano café oscuro con abundantes gránulos blancos, y presencia de un <u>tubérculo con protuberancias verdes</u> , abundante raíz adventicia, tallo grande y hoja grande suficiente.
	$\Sigma = 31$	22 de 31	0 de 31	2 callos grandes con abundantes gránulos blancos, de los cuales: 1 presento abundante raíz gruesa café oscuro, sin tallo. 1 presenta tallo mediano, hojas pequeñas escasas y raíz blanca escasa. 3 callos pequeños café claro con abundantes gránulos blancos, escasa raíz blanca, sin tallo
		77.4193 %	0 %	

TESIS COM
 FALTA DE ORIGEN

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 10 (Testigo)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	2	--	--	No hay respuesta. Siembra de hoja (posición horizontal) y callo.
2	2	2 de 2	--	1 Callo pequeño café oscuro, sin raíz, sin tallo. (Sólo crecimiento del cultivo inicial proveniente de callo). 1 raíz blanca escasa sin callo, con brote de tallo.
3	2	2 de 2	--	2 Callos pequeños café oscuro, raíz escasa blanca, sin tallo. 2 callos pequeños café oscuro, raíz blanca escasa, brote de tallo.
4	5	5 de 5	--	2 callos medianos café oscuro, raíz café abundante, y tallo pequeño con hojas pequeñas y escasas. 1 raíz abundante, blanca, sin callo, con tallo mediano y hojas pequeñas abundantes.
5	5	4 de 5	--	2 callos medianos café oscuro, con hoja pequeña y escasa, abundante raíz blanca, de los cuales: 1 presento tallo pequeño 1 presento tallo grande y abundante.
6	5	5 de 5	1 de 5	2 callos pequeños café oscuro, tallo pequeño, raíz escasa y hojas chicas escasas. 1 raíz suficiente, no hay callo, tallo pequeño, hojas medianas suficientes.

Tabla 1. Características físicas del material vegetal de Anredera scandens obtenido por 10 factoriales de cultivo *in vitro*.

7	5	4 de 5	--	<p>2 callos medianos, café oscuro de los cuales: 2 presentaron raíz gruesa café oscuro sin tallo. 1 presento raíz adventicia, tallo grande, hojas medianas abundantes. 1 callo pequeño oscuro, raíz adventicia y raíz gruesa café oscura suficiente, tallo mediano, y hoja grande suficiente. 1 sin la presencia e callo, se presento la formación e un <u>tubérculo verde</u> a partir de la hoja de inóculo, raíz suficiente, color banca, y sin hojas</p>
8	5	5 de 5	--	<p>5 callos pequeños, café claro con abundante raíz blanca de los cuales: 4 no presentaron tallo 1 presento tallo mediano con hojas medianas suficientes.</p>
$\Sigma = 31$		28 de 31	1 de 31	
		90.3225 %	3.2259 %	

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenidos por el factorial 3 de cultivo *in vitro*.

FACTORIAL 3 (KIN - IBA)

Intervención	No. de cultivos	Respuesta	Contaminación	Características
1	54	54 de 54	1 de 54	<p><u>1</u> ausencia de callo, raíz, blanca gruesa, tallo mediano, hojas muy grandes.</p> <p><u>7</u> callos café oscuro pequeño, de los cuales:</p> <p>1 sólo presento tallo de 1 cm de largo, y hojas pequeñas, con suficiente raíz blanca.</p> <p>2 presentaron escasa raíz blanca, no presentan tallo, donde:</p> <p>1 de ellos presenta ligera coloración magenta en el medio (+)</p> <p>3 presentaron escasa raíz adventicia sin tallo.</p> <p>1 no presento raíz ni tallo.</p> <p><u>9</u> presentaron callo café oscuro mediano, de los cuales:</p> <p>7 presentaron raíz blanca adventicia, de los cuales:</p> <p>3 con raíz abundante</p> <p>4 con raíz suficiente.</p> <p>2 presentaron tallo grande y hojas medianas abundantes</p> <p><u>36</u> presentaron callo grande café oscuro, de los cuales:</p> <p>5 No presentaron raíz ni tallo</p> <p>9 presentaron escasa raíz blanca adventicia donde:</p> <p>4 de éstos presentaron tallo pequeño con hojas pequeñas y abundantes.</p> <p>5 no presentaron tallo.</p> <p>22 presentaron raíz gruesa café oscura y raíz adventicia donde:</p> <p>13 de éstos presentaron tallos medianos con hojas medianas</p> <p>9 no presentaron tallos.</p>

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Características físicas del material vegetal de *Anredera scandens* obtenidos por el factorial 3 de cultivo *in vitro*.

2	53	52 de 53	1 de 53	<p><u>3</u> presentaron escasa raíz blanca, sin callo de los cuales: 1 de ellos presento ligero color magenta en el medio (+).</p> <p><u>26</u> presentaron callo pequeño café oscuro, sin tallo, de los cuales: 15 presentaron ligero color magenta en el medio (+). 16 presentaron raíz blanca escasa 1 presento raíz blanca abundante <u>13</u> callos medianos café oscuro, de los cuales: 4 no presentaron raíz ni tallo 7 presentaron raíz blanca escasa, donde: 1 presento tallo mediano y hojas pequeñas suficientes. 6 no presentaron tallo.</p> <p>2 presentaron raíz abundante, tallo grande y hojas medianas suficientes.</p> <p><u>7</u> callos grandes café oscuro, de los cuales: 1 no presento raíz ni tallo, 4 presentaron raíz blanca suficiente, sin tallo 2 presentaron tallo mediano hojas medianas suficientes. 2 con raíz gruesa café oscuro sin callo.</p> <p><u>45</u> callos pequeños, café oscuro, sin tallo, de los cuales: 29 no presentaron raíz. 16 presentaron escasa raíz blanca, donde: 3 presentaron ligero color magenta en el medio (+).</p> <p><u>28</u> callos medianos, café oscuro de los cuales: 16 sin raíz ni tallo 12 con abundante raíz blanca gruesa, donde: 7 de ellos con tallo mediano, hojas medianas abundantes.</p> <p><u>25</u> callos grandes café oscuro, de los cuales: 9 sin raíz, ni tallo 5 presentaron escasa raíz blanca, sin tallo 11 con abundante raíz blanca y café oscura, con tallo y hoja pequeña suficiente.</p>
3	100	98 de 100	2 de 100	
	$\Sigma = 207$	204 de 207 98.5507 %	4 de 207 1.9323 %	

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN



Figura 1. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 1



Figura 2. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 3. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 3



Figura 4. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 5. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 4

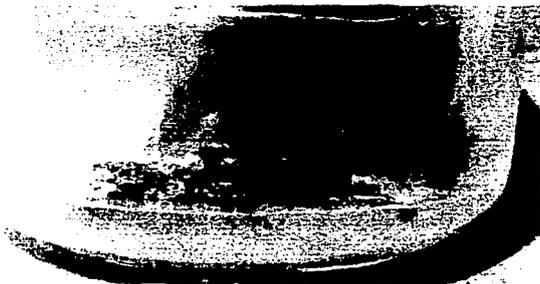


Figura 6. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 5

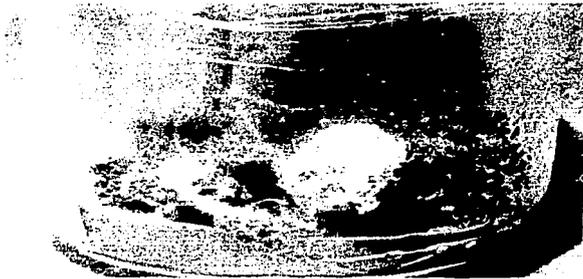


Figura 7. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 6



Figura 8. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 9. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de *Anrodora scandens*, FACTORIAL B



Figura 10. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de *Anrodora scandens*, FACTORIAL 9. Donde se observa un tuberculo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 11. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 10



Figura 12. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de Anredera scandens, FACTORIAL 10. Se observa la presencia de un tubérculo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 13. Material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* de *Anredera scandens*, FACTORIAL 3

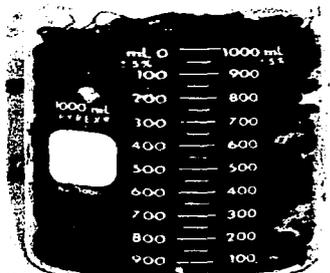


Figura 14. Material calloso obtenido del cultivo *in vitro* de *Anredera scandens*, FACTORIAL 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
LIBRERÍA

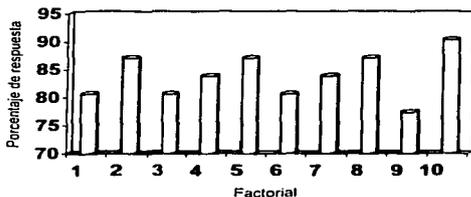
Resultados obtenidos del material vegetal, obtenido por el cultivo *in vitro* de *Anredera scandens* a partir de 10 factoriales donde se muestra el porcentaje de respuesta

Tabla 3.
PORCENTAJE DE RESPUESTA

Factorial	Porcentaje de respuesta
1	80.6451
2	87.0967
3	80.6451
4	83.8709
5	87.0967
6	80.6451
7	83.8709
8	87.0967
9	77.4193
10	90.3225
3	98.5507

Gráfica 1

PORCENTAJE DE RESPUESTA



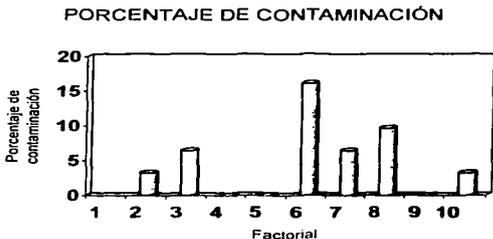
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados obtenidos del material vegetal, obtenido por el cultivo *in vitro* de Anredera scandens a partir de 10 factoriales donde se muestra el porcentaje de contaminación bacteriana

Tabla 4.
PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

Factorial	Porcentaje de contaminación
1	3.2259
2	3.2259
3	6.4516
4	0
5	0
6	16.1290
7	6.4516
8	9.6774
9	0
10	3.2259
3	1.9323

Gráfica 2



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5. Determinación de callos húmedos sometidos a 10 factoriales con "n" repeticiones

PESO HÚMEDO

F A C T O R I A L E S

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2.0843	1.7886	3.7128	2.2375	2.6703	3.2265	1.71	1.6258	1.4263	1.0716
1.7856	1.8532	3.9236	2.3475	2.4574	2.7095	1.7277	1.6312	1.1152	1.0848
2.7072	1.9182	4.7112	2.2875	2.4715	2.943	1.7371	1.7649	1.6137	1.0788
1.5136	1.1494	4.4356	2.3525	2.4983	2.574	1.7104	1.7532	1.5423	1.1532
2.8288	1.9406	3.224	2.2273	2.6082	2.466	1.6936	1.6552	1.6218	1.074
1.0912	1.9658	3.9048	2.2723	2.5218	2.7585	1.6891	1.7074	1.6354	1.0392
2.7552	1.854	3.9783	2.4225	2.3284	3.924	1.7688	1.5516	1.6014	1.0056
2.5824	1.0284	3.1148	2.2732	2.6065	3.582	1.8364	1.6492	1.4518	1.1112
1.8403	1.661	4.4494	2.5252	2.3004	2.9475	1.7676	1.7334	1.3566	1.0296
1.9632	1.8052	4.1476	2.3073	2.628	2.9555	1.6996	1.5696	1.4272	1.0932
2.1952	1.7072	4.2764	2.32	2.5461	2.817	1.8202	1.5976	1.3617	1.038
1.7376	1.8876	4.1928	2.505	2.6109	2.4345	1.7931	1.7334	1.5639	1.0776
1.6288	1.8639	4.1262	2.6471	2.4624	2.916	1.7404	1.5921	1.5753	1.0404
1.7222	1.7978	3.0888	2.3741	2.6757	2.812	1.8012	1.6902	1.5374	1.0884
1.9219	1.1846	3.5204	2.2275	2.5137	3.6585	1.7601	1.6272	1.5419	1.0488
2.024	1.87	3.8056	2.3750	2.6676	3.75	1.7822	1.6443	1.5864	0.9996
2.4032	1.7578	4.0976	2.2125	2.538	3.8103	1.7447	1.7244	1.4909	1.2001
1.5296	1.8382	4.1128	2.415	2.4921	2.993	1.8829	1.6156	1.5218	1.0368
2.5024	1.8705	4.8412	2.3085	2.5353	2.3895	1.7828	1.6816	1.5538	1.1532
2.5984	1.8436	4.1893	2.3923	2.6102	3.3075	1.7594	1.6254	1.4268	1.0008
2.0911	1.9262	3.6292	2.2221	2.5697	4.0905	1.0735	1.6431	1.5558	1.0848
2.0490	1.8258	4.1028	2.3572	2.3301	4.1805	1.8772	1.4958	1.5759	1.0728
1.7121	1.8326	3.7904	2.7473	2.3436	3.6156	1.7898	1.6182		0.948
2.3821	1.9592	3.626	2.1825	2.6217	3.6695	1.7195	1.6413		1.0428
2.3760	2.1494	3.2552	2.4775	2.5524	2.984	1.7081	1.6444		1.0836
	1.8942		2.125	2.376		1.7404	1.6596		1.19
	1.8062			2.4813			1.6272		1.0956

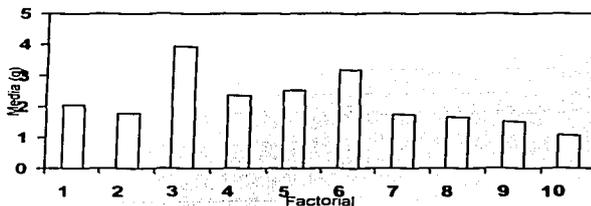
TESIS COM
 FALLA DE CANGEN

Resultados obtenidos de material calloso obtenido por el cultivo in vitro de *Anredera scandens* a partir de 10 factoriales donde se muestra la \bar{X} (g) y el C.V. (%)

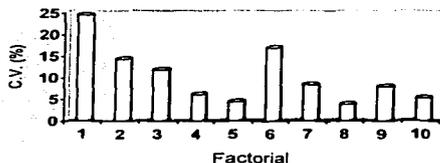
Tabla 6. PESO HÚMEDO

Factorial	\bar{X} (g)	C.V. (%)
1	2.0410	24.4453
2	1.7770	14.3001
3	3.9302	11.7991
4	2.3515	6.0529
5	2.5191	4.3502
6	3.1823	16.9093
7	1.7340	8.3233
8	1.6482	3.7670
9	1.5037	7.9046
10	1.0709	5.2488

Gráfica 3. PESO HÚMEDO



Gráfica 4. COEFICIENTE DE VARIACIÓN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados del Análisis de varianza (ANDEVA) del PESO HÚMEDO del material calloso obtenido por el cultivo *in vitro* de Anredera scandens a partir de 10 factoriales con diseño de 1 factor completamente al azar

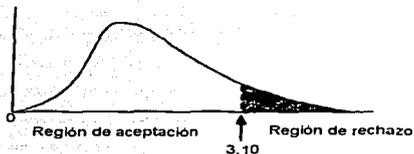
Ho: No hay diferencia significativa entre tratamientos
 Ha: Sí hay diferencia significativa entre tratamientos

$$\alpha = 0.01$$

$$F \text{ calculada} = 214.0842$$

$$F \text{ teórica } (0.99, 9, 248) = 3.10$$

Gráfica de distribución de F



Se rechaza Ho ∴ se concluye que sí existe diferencia significativa entre tratamientos.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. Determinación de callos secos sometidos a 10 factoriales con "n" repeticiones

PESO SECO

F A C T O R I A L E S

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.3775	0.3340	0.4122	0.3562	0.3519	0.3673	0.3297	0.2985	0.2670	0.0984
0.3234	0.3464	0.4355	0.3743	0.3237	0.3090	0.3331	0.3003	0.2110	0.0962
0.4905	0.3587	0.5126	0.3645	0.3258	0.3357	0.3352	0.3252	0.3053	0.0990
0.2740	0.2146	0.4927	0.3750	0.3303	0.2934	0.3297	0.3233	0.2920	0.1059
0.5126	0.2149	0.3572	0.3545	0.3438	0.2815	0.3265	0.3054	0.3070	0.0986
0.1973	0.3676	0.4334	0.3623	0.3326	0.3147	0.3255	0.3150	0.3090	0.0954
0.4992	0.3465	0.4415	0.3862	0.3070	0.4476	0.3412	0.2861	0.3031	0.0923
0.4678	0.1924	0.3456	0.3624	0.3435	0.4089	0.3541	0.3043	0.2738	0.1020
0.3324	0.3124	0.4937	0.4023	0.3032	0.3365	0.3410	0.3178	0.2565	0.0945
0.1745	0.3349	0.4604	0.3676	0.3465	0.3363	0.3269	0.2886	0.2702	0.1004
0.3976	0.3193	0.4747	0.3697	0.3355	0.3219	0.3512	0.2945	0.2570	0.0953
0.3146	0.3536	0.4655	0.3993	0.3442	0.2765	0.3403	0.3182	0.2963	0.0989
0.2955	0.3475	0.4578	0.4221	0.3246	0.3376	0.3357	0.2937	0.2981	0.0955
0.3120	0.3364	0.3430	0.3782	0.3527	0.3203	0.3475	0.3118	0.2912	0.0999
0.3472	0.2218	0.3910	0.3561	0.3316	0.4170	0.3390	0.3002	0.2818	0.0963
0.3667	0.3497	0.4226	0.3785	0.3517	0.4272	0.3433	0.3031	0.3001	0.0918
0.4352	0.3284	0.4547	0.3527	0.3343	0.4341	0.3356	0.3172	0.2823	0.1102
0.2771	0.3426	0.4564	0.3526	0.3285	0.3415	0.3632	0.2982	0.2890	0.0952
0.4534	0.3499	0.5384	0.3678	0.3277	0.2723	0.3437	0.3103	0.2942	0.1059
0.4710	0.3444	0.4652	0.3814	0.3440	0.3761	0.3393	0.2989	0.2700	0.0919
0.3779	0.3600	0.4030	0.3540	0.3385	0.4663	0.2071	0.3035	0.2945	0.0996
0.3813	0.3414	0.4545	0.3753	0.3070	0.4746	0.3622	0.2759	0.2983	0.0985
0.3102	0.3425	0.4208	0.4376	0.3086	0.4123	0.3452	0.2985		0.0870
0.4326	0.3653	0.4025	0.3465	0.3454	0.4184	0.3316	0.3027		0.0957
0.4305	0.4022	0.3613	0.3947	0.3362	0.3402	0.3432	0.3034		0.0995
	0.3542		0.3385	0.3133		0.3357	0.3062		0.1093
	0.3376			0.3268			0.3000		0.1006
									0.0960

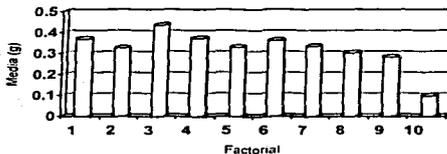
TESTS CON
 FALLA DE ORIGEN

Resultados obtenidos de material caloso seco proveniente del cultivo in vitro de Anredera scandens a partir de 10 factoriales donde se muestra la \bar{x} (g) y el C.V. (%)

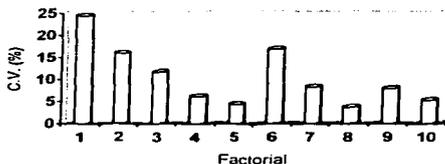
Tabla 8. PESO SECO

Factorial	\bar{X} (g)	C.V. (%)
1	0.37008	24.4637
2	0.32663	15.9407
3	0.43584	11.6763
4	0.3734	6.1689
5	0.3318	4.3606
6	0.36268	16.8761
7	0.33487	8.3250
8	0.3037	3.7235
9	0.28398	7.9644
10	0.0982	5.2749

Gráfica 5. PESO SECO



Gráfica 6. COEFICIENTE DE VARIACIÓN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados del Análisis de varianza (ANDEVA) del PESO SECO del material calloso obtenido por el cultivo *in vitro* de Anredera scandens a partir de 10 factoriales con diseño de 1 factor completamente al azar

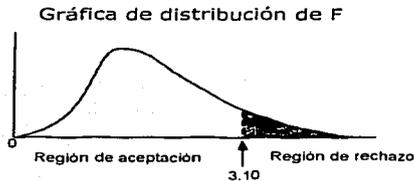
Ho: No hay diferencia significativa entre tratamientos

Ha: SI hay diferencia significativa entre tratamientos

$$\alpha = 0.01$$

$$F_{\text{calculada}} = 113.32$$

$$F_{\text{teórica}} (0.99, 9, 248) = 3.10$$



Se rechaza Ho \therefore se concluye que si existe diferencia significativa entre tratamientos

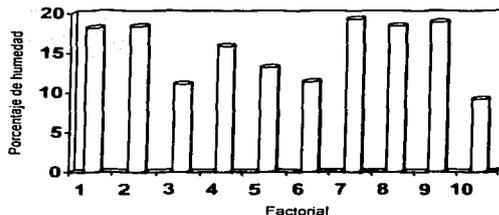
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Porcentaje de humedad obtenido del peso seco y el peso húmedo de material calloso de *Anredera scandens* para los 10 factoriales

Tabla 9. Porcentaje de humedad

FACTORIAL	PORCENTAJE DE HUMEDAD
1	18.1321
2	18.3812
3	11.0895
4	15.8817
5	13.1714
6	11.3970
7	19.3114
8	18.4275
9	18.8847
10	9.1700

Gráfica 7. PORCENTAJE DE HUMEDAD



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 10. Resumen de resultados obtenidos en los 10 factoriales donde se muestran valores sobre el material calloso húmedo y seco de *Anredera scandens*

Factorial	Número de cultivos	Σ peso húmedo (g)	Σ peso seco (g)	\bar{X} de peso húmedo (g)	\bar{X} de peso seco (g)	% de humedad
1	25	51.0254	9.2520	2.0410	0.3700	18.1321
2	27	47.9792	8.8192	1.7770	0.3266	18.3812
3	25	98.2568	10.8962	3.9302	0.4358	11.0895
4	26	61.1414	9.7103	2.3515	0.3734	15.8817
5	27	68.0176	8.9589	2.5191	0.3180	13.1714
6	25	79.5599	9.0672	3.1823	0.3626	11.3970
7	26	45.0858	8.7067	1.7340	0.3348	19.3114
8	27	44.5029	8.2008	1.6482	0.3037	18.4275
9	22	33.0833	6.2477	1.5037	0.2839	18.8847
10	28	29.9877	2.7498	1.0709	0.0982	9.1700
	$\Sigma = 258$					
3	204	518.8003	62.1564	2.5431	0.3046	11.9808

Tabla 11. Resultados de pruebas fitoquímicas preliminares

FACTORIAL	ÍNDICE DE ESPUMA
1	Menor de 100
2	Menor de 100
3	100
4	Menor de 100
5	Menor de 100
6	Menor de 100
7	Menor de 100
8	Menor de 100
9	Menor de 100
10	Menor de 100
3	100

Tabla 11. Resultados de pruebas fitoquímicas preliminares

Detección de:	Prueba fitoquímica preliminar	Extracto Etanólico	Extracto Acuoso	Extracto Clorofórmico
Alcaloides	HCl al 10 %	+	+	
	Dragendorff	+	+	
	Mayer	+	+	
	Silicotúngstico	-	-	
	Sonnenschain	-	-	
	Wagner	+	-	
Saponinas	Liebermann	+		+
	Bouchard			
	Rosenthaler	+		
	Espuma, estabilidad de.	+	+	
Quinonas	H ₂ SO ₄	-		
	NaOH	-		
Flavonoides	Shinoda	-		
Índice de espuma			100	
Hemólisis en placa		24 hrs. Con halos de 14 mm.	+	
		48 hrs. agar completamente hemolizado	+	

(+) = reacción positiva

(-) = reacción negativa

ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Como consecuencia de la aplicación de la Biotecnología para obtener clonas de *Anredera scandens*, se tiene que en los resultados de características físicas, de cada factorial se observa, la influencia de los reguladores de crecimiento vegetal de acuerdo con los siguientes criterios evaluados:

Tamaño de hoja	Pequeña (auxina) Mediana (sinergismo) Grande (citocinina)
Tallo, tanto presencia o ausencia y tamaño	Presencia (auxinas) Ausencia (citocinina) Mediano (sinergismo) Grande (auxina)
Raíz, color	Café (auxina) Blanca o adventicia (citocinina)
Callo	Chico (auxina) Mediano (sinergismo) Grande (citosina o sinergismo)

En relación a la micropropagación de ejemplares de *Anredera scandens* se produjeron ejemplares libres de contaminantes inherentes al sitio de colecta, por medio de la reproducción *in vitro*, bajo condiciones físicas, químicas y asépticas controladas; de manera que se obtuvo un alto porcentaje de respuesta que es representativo de acuerdo al número de muestras sanas obtenidas, en ensayos repetidos.

Sin embargo no fue posible controlar en su totalidad la contaminación inherente al explante proveniente de la planta donadora, ya que éste tipo de contaminación se encuentra en la zona vascularizada de la misma; por lo que los desinfectantes superficiales utilizados en la desinfección no penetran en dicha área.

15.14. 40

Así también se encontró que el factorial número 3 (Kin-IBA) promueve la producción de saponinas siendo evidente, en la determinación del índice de espuma con un valor de 100. Además cabe resaltar que fue el factorial que proporcionó mayor cantidad de material caloso (tabla 10).

14. 18. 19

En cuanto al porcentaje de humedad se tienen valores que van del 9.17 5 al 19.3114 % (tabla 9, gráfica 7), esto por 2 causas:

1. en el cultivo in vitro se da la micropropagación en altas concentraciones de humedad.
2. las auxinas son responsables del aumento en la permeabilidad en la pared celular, y del aumento en la presión osmótica.

14, 40,

Con respecto al coeficiente de variación tanto en peso húmedo como en peso seco se observa una gran dispersión relativa del factorial número 1 (Kin-AIA), como consecuencia de los reguladores de crecimiento vegetal.

(tablas 6 y 8)

En referencia a los resultados ANDEVA, para peso húmedo y peso seco, se tiene que se rechaza H_0 al obtener una F calculada de 214,084 con una F teórica de 3.10 para peso húmedo, así como una F calculada de 113.32 con una F teórica de 3.10 para peso seco. Afirmandose que existe diferencia entre los tratamientos. (páginas 84, 87)

Asimismo al obtener ejemplares en condiciones óptimas fue posible determinar la presencia de:

Saponinas
Alcaloides
Hemólisis en placa positivo a las 24 y 48 hrs.
Índice de espuma, estabilidad de espuma.

Así como la ausencia de:

Quinonas
Flavonoides.

A partir de pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos:

Etanólico
Acuoso
Clorofórmico.

(tabla 11)

CONCLUSIONES:

Al aplicar el cultivo *in vitro* como método biotecnológico para la micropropagación masiva de Anredera scandens, se tiene que se obtuvieron clones libres de contaminantes inherentes al sitio de colecta silvestre, que a su vez se vieron influenciadas por el uso de un diseño factorial de reguladores de crecimiento vegetal, que alteraron la cantidad obtenida de material calloso y la concentración de saponinas como metabolito secundario de interés microbiológico y farmacéutico.

Dado que se obtuvieron clones sanas en condiciones óptimas fue posible determinar la presencia o ausencia de: saponinas, alcaloides, hemólisis en placa, índice de espuma, quinonas y flavonoides.

Por lo que se concluye que para obtener ejemplares sanos de Anredera scandens por medio del cultivo *in vitro*, y a su vez estimular la producción de saponinas, se requiere:

Medio de cultivo:	Medio basal Murashige y Skoog (MS)
Reguladores del crecimiento vegetal:	Kin (6-furfurilamino purina) (0.2 mg / mL), IBA (Ácido naftalenacético) (2 mg / mL)
Temperatura:	26 °C ± 2°C
Fotoperíodo:	16 horas luz / 8 horas de oscuridad
Luz:	Blanca (lámparas fluorescentes)
Tiempo:	1.5 meses

PROPUESTAS:

Con la finalidad de dar seguimiento a ésta investigación se propone, a partir de la micropropagación *in vitro* de Anredera scandens:

- ✓ Extraer y caracterizar las saponinas presentes.
- ✓ Realizar bioensayos con cepas bacterianas.
- ✓ Determinar la presencia de betalainas.

ANEXOS

ANEXO A

Preparación de soluciones stock y medio basal MS para el cultivo *in vitro*

Soluciones stock MS

Componentes	Concentración final (mg/L)	g / 2 L
MS Mayor		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	7.400
NH ₄ NO ₃	1650	33.00
KNO ₃	1900	38.00
KH ₂ PO ₄	170	3.400
MS Menor		
H ₃ BO ₃	6.2	0.124
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.5	0.172
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.0005
KI	0.88	0.0176
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.0005
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.0005
MnSO ₄ ·4H ₂ O	16.9	0.338
MS Vitaminas		
Glicina	2	0.04
Ácido nicotínico	0.5	0.01
Piridoxina·HCl	0.5	0.01
Tiamina·HCl	1.0	0.02
Myo-inositol	100	2

Esta solución debe guardarse a 4 °C.

Preparación de soluciones stock MS de hierro y calcio

Solución de:	Compuesto	Cantidad en gramos	Vol. en mL
Fe ⁺²	FeSO ₄ ·7H ₂ O.	0.695	250
	Na ₂ EDTA	0.9325	250
Ca ⁺²	CaCl ₂	8.305	250

Estas soluciones se almacenan a 4 °C.

Composición química total del medio basal MS por litro.

Componentes	Cantidad por L
MS Mayor	100 mL
MS Menor	100 mL
MS Vitaminas	100 mL
Fe - EDTA	10 mL
CaCl ₂	10 mL
Sacarosa	30 g
Aforar a 1L y ajustar el pH a 5.8 ± 0.1	
Agar bacteriológico	8 g

Verter 20 mL del medio basal en los recipientes de cultivo (frascos gerber con tapa) y esterilizarlo en autoclave a 15 lb / in² (121 °C) por 20 minutos.

Cuando finalice el proceso de esterilización, dejar enfriar el material para que el medio adquiera una textura gelatinosa.

En caso de trabajar con medio líquido, no se debe añadir agar.

En éste ensayo en el que se comparan diferentes factoriales, se debe preparar primero una solución basal que contenga los ingredientes en común. Posteriormente se repartirá ésta solución basal en tantos matraces como tratamientos por ensayar existan, posteriormente se agregarán las hormonas por probar a las siguientes concentraciones:
Auxinas 2 mg / ml y citocinas 0.2 mg / ml

Finalmente se reparten en los recipientes de cultivo.

ANEXO B

Preparación de reactivos para análisis fitoquímico

Alcaloides:

- Reactivo de Dragendorff. Se disuelven 4.0 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml de HNO_3 al 30%, aparte se disuelven 13.6 gramos de KI en 25 ml de agua. Se mezclan ambas soluciones y se dejan reposar 24 hrs. Se decanta la solución y se afora con agua hasta 50 ml.
- Reactivo e Mayer. Se disuelven 1.36 g de HgCl_2 en 60 ml de agua y 5 g de KI en 10 ml de agua. Se unen ambas soluciones y se afora hasta 100 ml.
- Reactivo del ácido silicotúngstico. Se disuelven 5.0 g de ácido silicotúngstico ($4 \text{H}_2\text{O} \cdot \text{SO}_2 \cdot 12 \text{WO}_3 \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$) en H_2SO_4 6 N, necesario para formar 100ml de solución.
- Reactivo de Sonnenschein (ácido fosfomolibdico). Se prepara una solución acuosa, saturada de molibdato de amonio y se añade lentamente a una solución saturada de fosfato disódico (Na_2HPO_4) que está a unos 40°C hasta que no se forme más precipitado. Se recoge el precipitado por filtración, se lava con bastante agua, luego se pasa a un vaso donde se le mezcla con una solución concentrada de carbonato de sodio. La solución se calienta hasta que se disuelve hasta que se disuelve todo el precipitado. Después la solución se continúa calentando en baño María hasta llevarla a sequedad y que se haya desprendido todo el amoniaco. El residuo se humedece con ácido nítrico y vuelve a secarse. El nuevo residuo se disuelve en una solución 1:9 v/v de ácido nítrico y agua. Se filtra la solución y se guarda para su uso.
- Reactivo de Wagner. Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua; la solución se afora con 100 ml de agua.

Saponinas:

- Reactivo de Lieberman – Burchard. Se mezcla una solución 1:1 v/v de cloroformo – anhídrido acético y se añade una gota de ácido sulfúrico al extracto etanólico. Otra técnica, añade al extracto clorofórmico de la muestra, 3 gotas de anhídrido acético con una gota de ácido sulfúrico.

- o Reactivo de Rosenthaler. Solución de vainillina al 1 % en etanol.

Preparación de ASC al 5 % y al 10%

Pesar 13.2 g de base para ASC y verterlos en un matraz erlenmeyer de 500ml.

Disolverlos en 330 ml de agua caliente destilada, con agitación constante.

Esterilizar en autoclave a 15 lb / in² (121 °C) por 20 minutos.

Cuando finalice el proceso de esterilización, dejar enfriar a 40-45 °C.

Limpia el frasco con sangre de carnero, de manera aséptica y tomar 16.5 ml (para ASC al 5 %) o 33 ml (para ASC al 10 %)

Agregar la sangre de manera aséptica, resbalando por las paredes del matraz.

Homogenizar, y verter de manera aséptica 20 ml de medio en cada caja petri.

Dejar solidificar.

Las cantidades aquí mencionadas contemplan un 10 % por pérdida por evaporación.

BIBLIOGRAFIA

1. HOSTETTSMANN K, MARSTON A, MAILLARD M, 1995, *Phytochemistry of plants used in traditional medicine*, clarendon, Press Oxford, Great Britain: 17-25
2. GERMAN C, SILVA R, 2001, *Libro del curso experimental de fitoquímica*, 2ª edición, Departamento de Farmacia, E.N.C.B., I.P.N., México: 8-13,15, 16, 21-34
3. GUTIÉRREZ A, 1996, *La Biotecnología en la FES Zaragoza*, Vida en Zaragoza: 1 (1): 27-30
4. DEL VILLAR M, 1997, *Obtención de pigmentos de interés alimenticio mediante el cultivo de tejidos vegetales a partir de "Opuntia microdasys"*, Universidad Autónoma de Puebla, Tesis de Licenciatura, México:11-15
5. HEINRICH M, 2000, *Ethnobotany and its role in drug development*. Phototherapy. Res. 14 (): 417-488
6. BRUNETON J, 1991, *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Acribia, España: 304-311
7. EVANS W, 1991, *Trease y Evans Farmacognosia*, Interamericana-Mc. Graw Hill, México: 517-533
8. [http:// www.semarnat.qob.mx](http://www.semarnat.qob.mx)
9. VILLEGAS L, FERNANDEZ I, MALDONADO H, TORRES R, ZAVALA A, VISBERG A, HAMMOND G, 1997, *Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru*, J. Ethnopharmacol. 55 (3): 193 – 200
10. RATERA E, RATERA M, 1980, *Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular*, Editorial hemisferio Sur, Argentina: 5-31
11. DE JESÚS H, MARTÍNEZ I, 2002, *Cultivo in vitro de plantas medicinales informe final de servicio social*, FES Zaragoza, México: 2 -9
12. PENACHO A, CLOSAS L, 2001, *Cultivo in vitro de plantas superiores*, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida, España: 1- 50

13. ACEVES J, *Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo in vitro de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad*, [http://. www. uv.mx/iiesca/revista2/aceves2.html](http://www.uv.mx/iiesca/revista2/aceves2.html)
14. HARTMANN H, KESTER D, DAVIES F, GENEVE R, 1997, *Plant propagation - principles and practices*, sixth edition, Prentice Hall, USA : 236 - 246, 259 - 301, 592 -601
15. PEÑA G, VILLEGAS T, 2001, *Manual de técnicas para el cultivo in vitro de tejidos vegetales*, Departamento de Biofísica, E.N.C.B., I.P.N., México: 70- 82
16. Centro de Investigación en recursos genéticos y biotecnología vegetal (CIRGEV), Laboratorio de Genética, Departamento de biotecnología, 2001, *Manual de propagación in vitro de plantas medicinales*, Perú: 3-211
17. [http://. www.universum.unam.mx](http://www.universum.unam.mx).
18. ROMO A, 1985, *Productos Naturales de la Flora Mexicana*, Limusa, México: 23-38
19. WEAVER R, 1982, *reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*, Trillas, México: 17-20, 42, 83, 91-96, 102-106
20. DOMÍNGUEZ X, 1979, *Métodos de investigación fitoquímica*, Limusa, México: 23-30, 39-43, 149-168
21. WILLIAMSON E, OKPAK D, EVANS F, 1998, *Selection, Preparation and pharmacological evaluation of plant material*, vol1, Wiley, USA: 15-23
22. PELCZAR M, REID R, CHAN E, 1998, *Microbiología*, 4ª edición, Mc. Graw Hill, México: 369, 385, 423-425
23. POPOV A, ANISIMOV M, IVANOV A, KOREPANOVA E, ANTONOV V., 1982, *Characteristics of membrane activity of triterpene glycosides* Antibiotiki,27(4):276-280
24. ANISIMOV M, 1987, *Triterpene glycosides and the structural-functional properties of membranes*, Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki;(10):49-63
25. ANISIMOV M, SHCHEGLOV V, KISELEVA M,1978, *Effect of triterpene glycosides on the plasma membrane permeability for amino acids in Saccharomyces carlsbergensis yeast cells*, Antibiotiki Jan;23(1):66-9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

26. Shcheglov V, Anisimov M, Popov A, Sebko I, 1979, *Effect of triterpene glycosides on plasma membrane permeability for UV-absorbing substances in Saccharomyces carlsbergensis yeast cells*, Antibiotiki Jan; **24**(1):49-55
27. ANISIMOV M, CIRVA V, 1980, *The biological evaluation of triterpene glycosides*, Pharmazie Dec; **35** (12):731-8
28. TORNOS M, SÁENZ M, GARCÍA M, FERNÁNDEZ M, 1999, *Antinociceptive effects of the tubercles of Anredera leptostachys*, J Ethnopharmacol Dec 15; **68**(1-3):229-234
29. ESTRADA E, MENDOZA G, GARCÍA J, 1997, *Catálogo y usos terapéuticos de plantas medicinales que se comercializan en fresco en el mercado Sonora*, Universidad Autónoma Chapingo, Serie: Materiales para la Docencia No. 2, Departamento de Fitotecnia, Programa universitario de plantas medicinales, México: 14, 27, 31, 47, 62, 100, 107
30. *Actividad biológica de las saponinas de la Quinoa Chenopodium quinoa Willd.* <http://www.univalle.edu/journal/journal2/pag10>.
31. MARTÍNEZ M, 1987, *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*, Fondo de cultura Económica, México: 792, 816, 1048, 1060
32. MARTÍNEZ M, 1996, *Las plantas medicinales de México*, 6ª edición, 7ª reimpresión, Ediciones Botas, México: 1-8, 487, 546
33. VALENCIA C, 1995, *Fundamentos de fitoquímica*, Trillas, México: 11-29, 103-113, 127-145, 147-165, 210-221
34. SCHAUNBERG P, PARIS F, 1980, *Guía de las plantas medicinales*, 4ª edición, Omega, España: 22-24, 27-29, 120, 121, 250, 251
35. GEISSMAN T, CROUT D, 1979, *Organic chemistry of secondary plant metabolism*, Freeman-Cooper & Co., USA: 3-19
36. MABRY T, DREIDING A, 1968, *The betalains*, Recent advances in Phytochemistry, **1** (1):145-159
37. HARBONE J, 1973, *Phytochemical Methods*, Chapman and Hall, Great Britain: 1-26, 109-117, 182-192, 196-198, 202, 203

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

38. DEWICK P, 1998, *Medicinal Nature Products a biosynthetic approach*, John Wiley & sons, USA: 201, 202, 218-223
39. ARGUETA A, CANO L, RODARTE M, 1994, *Atlas de la medicina tradicional mexicana*, vol. 1, 3, Instituto Nacional Indigenista, biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, México: 19-26, 1493
40. Hurtado D, Merino M, 2001, Cultivo de tejidos vegetales, Trillas, México: 15-198
41. Limón J, 1983, La Biotecnología ¿un arma del futuro?, Ciencia y desarrollo, Marzo- abril, (49): 45-54
42. HERRERA M, 2002, *Ponencia sobre Medicina Tradicional*, Memorias del foro de consulta a los pueblos y comunidades indígenas de San Luis Potosí. Region Pame sede: Rayón, S. L. P. JUNIO 22 / 2002
43. OTT E, 1985, *Listados florísticos de México III Dicotiledoneas*. Estación de Biología Chamela, Jalisco, México. Instituto de Biología, UNAM, México:2 -14
44. GONZÁLEZ M, GONZÁLEZ S, HERRERA Y, 1991, *Listados florísticos de México IX. Flora de Durango*, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR)-Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango - Instituto de Biología UNAM, México: 6-2
45. _____, 1998, *Ordenamiento ecológico territorial del estado de Jalisco: grupo flora*, Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Departamento de Botánica y Zoología, Instituto de Botánica, México: 1-10, 93-95
46. WATSON L, DALLWITZ M, (1993). *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval*, CD-ROM, Version 1.0 for MS-DOS, CSIRO Publications, Australia.
47. VILORIA A, MORENO M, HIDALGO D, 2001, *Isolation and identification of betacyanin from fruits of *Opuntia boldinghii* Br. Et R. by HPTLC*, Cienc. Tecnol. Aliment. 3 (3):140-143
48. WALLER G, YAMASAKI K (editors), 1996, *Saponins used in traditional and modern medicine, advances in experimental medicine and biology*, vol. 404, Plenum publishing Corp. USA: 1-13, 117-127, 173-183, 184, 535-538, 567-570.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

49. MITSCHER L, 1969, *Antimicrobial agents from plants*, Recent advances in Phytochemistry, **9** (1):245-250
50. MUHLBACH H, 1998, *Use of plant cell cultures in Biotechnology*, Biotechnol. Annu. Rev.; **4**:113-76
51. PRAS N, 1992, *Bioconversion of naturally occurring precursors and related synthetic compounds using plant cell cultures*. J Biotechnol; **26**(1):29-62
52. LIN G, GRIFFIN W, 1992, *Biotechnology of Duboisia alkaloids*, Australas Biotechnol; **2**(1):23-6
53. EKIERT H, 2000, *Medicinal plant Biotechnology: the Apiaceae family as the example of rapid development*, Pharmazie; **55**(8):561-7
54. COMPTON M, 1994, *Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture **37**:217-242
55. Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos, 1998, S.S.A., México: 44, 45
56. Rosestein S, 2001, *Diccionario de especialidades farmacéuticas*, CD-ROM, para Windows ME, Edición 47, Ediciones PLM, México.
57. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N. Engl. J. Med 1997; **336**: 309 - 315
58. FUENTES X, CASTIÑEIRAS M, 1997, *Diccionario Inglés - Español de ciencias de laboratorio clínico*. Biobotech Publishing Corporation, Turkey