



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

FACULTAD DE QUÍMICA-FARMACIA

Departamento de Farmacia

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

***“Cuantificación de los flavonoides presentes en
la *Capraria biflora* L. Estudio de
micropropagación.”***

Autor: *Yaneli Colina Valdivia*

Tutor: *MSc. Arelys López Sacerio.*

Asesor: *Tec. Ángel Mollineda Trujillo*

2004-2005

Santa Clara

“AÑO DE LA ALTERNATIVA BOLIVARIANA PARA LAS AMÉRICAS”



RESUMEN:

La Capraria biflora L. es una Serophulariaceae utilizada por la población para el tratamiento de diversas afecciones, se encuentra ampliamente distribuida en nuestro archipiélago y presenta un gran número de acciones terapéuticas entre las que se destaca: antiinflamatorio, analgésico y diurético. Por tanto, resulta muy valioso el desarrollo de técnicas analíticas que garanticen la seguridad y eficacia de las formas farmacéuticas que se desarrollen a partir de esta planta. Además la biotecnología constituye una herramienta que permite la obtención de grandes cantidades de material vegetal a partir de una planta seleccionada en corto tiempo.

En el presente trabajo se cuantificaron los flavonoides totales en base a quercetina presentes en las hojas de *Capraria biflora L.* a través de Espectrofotetría UV-Vis. Dicha técnica analítica fue previamente validada. Por otra parte se desarrolló la micropropagación "in vitro" de esta planta con el objetivo de obtener en el futuro por esta vía metabolitos secundarios de probada actividad farmacológica. La técnica analítica evaluada para la determinación de flavonoides totales en las hojas de la planta resultó lineal, precisa y exacta, bajo las condiciones establecidas. El material vegetal cuenta con un 0.1 % de flavonoides totales calculados en base a quercetina. Se logró además el establecimiento "in vitro "de *Capraria biflora L* a partir de yemas apicales y axilares siendo más eficiente el proceso al emplear yemas apicales (0 % contaminación y 100 % brotación). La mejor combinación de reguladores del crecimiento en la fase de multiplicación resultó ser 1.0 mg/l de 6-BAP mas 0.5 mg/l de AIA al lograrse mayor número de brotes entrenudos así como el mayor coeficiente de multiplicación. Finalmente se favoreció el enraizamiento "in vitro " hasta un 75 % empleando AIA y AIB a 0.5 mg/l.

INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I. Revisión bibliográfica	
1.1 Monografía de la <i>Capraria biflora L.</i>	3
1.1.1 Nombre científico.....	3
1.1.2 Nombres vernáculos.....	3
1.1.3 Aspectos sobre el cultivo.....	3
1.1.4 Descripción Botánica.....	3
1.2 Usos tradicionales.....	5
1.2.1 Precauciones.....	5
1.3 Propiedades Farmacológicas.....	6
1.3.1 Efecto Antiinflamatorio y Analgésico.....	6
1.3.2 Efecto sobre el SNC.....	6
1.3.3 Efecto Diurético.....	7
1.4 Composición química.....	8
1.5 Flavonoides.....	9
1.6 Consideraciones analíticas de la <i>Capraria biflora L.</i>	10
1.7 Micropropagación.....	11
1.7.1 Etapas de la micropropagación.....	12
1.7.2 Principios básicos.....	13
1.7.3 Aplicaciones del cultivo de tejidos.....	17
CAPITULO II. Materiales y métodos.	
2.1 Preparación material vegetal.....	17
2.1.1 Recolección y selección.....	17
2.1.2 Secado y molinazo.....	17
2.2 Determinación cuantitativa del contenido de flavonoides totales expresado en base a quercetina mediante espectrofotometría UV-Vis.....	18
2.2.1 Desarrollo de la técnica analítica para la determinación cuantitativa del contenido de flavonoides totales expresados en base a quercetina mediante espectrofotometría UV-Vis.....	18
2.2.2.1 Validación de la técnica de análisis espectrofotométrica ultravioleta para la cuantificación de flavonoides totales en base a quercetina en los extractos de las hojas de la <i>Capraria biflora L.</i>	20

2.3 Micropropagación de la <i>Capraria biflora</i> L.....	24
2.3.1 Micropropagación natural de la <i>Capraria biflora</i> L.....	24
2.3.2 Micropropagación “in vitro” de la <i>Capraria biflora</i> L.....	24
2.3.2.1 Fase 0. Preparativa.....	25
2.3.2.2 Fase 1. Iniciación o establecimiento del cultivo “ in vitro”....	25
2.3.2.3 Fase 2. Multiplicación.....	25
2.3.2.4 Fase 3. Enraizamiento “in vitro” y aclimatización.....	26

CAPITULO III. Resultados y discusión.

3.1. Desarrollo y validación de una técnica analítica para la determinación de flavonoides totales.....	28
3.1.1. Cuantificación del contenido de flavonoides totales expresados en base a la quercetina.....	28
3.1.2. Validación de la técnica analítica UV-Vis indirecta para la cuantificación de flavonoides totales en base a la quercetina....	28
3.2 Micropropagación.....	33
3.2.1 Propagación natural de la <i>Capraria biflora</i> L.....	33
3.2.2 Establecimiento “ in vitro “ de yemas apicales y axilares...33.	
3.2.2.1 Multiplicación. Estudio de diferentes reguladores del Crecimiento.....	35.
3.2.2.2 Enraizamiento “ in vitro “.....	37
Conclusiones.....	38
Recomendaciones.....	39
Bibliografía.....	40
Anexos	

INTRODUCCION

El hombre depende del mundo vegetal, porque en este se encuentran las sustancias bioactivas y nutritivas necesarias para la vida. Sin embargo, a lo largo de muchos milenios no ha sido capaz de alcanzar un conocimiento completo de las plantas más comunes. El arsenal terapéutico moderno se nutre en buena parte de los fitofármacos y la ventaja del empleo de estos es que, junto a las sustancias bioactivas, existen otros constituyentes de acción sinérgica, que potencian su actividad y las hacen más eficaces que en estado puro.^[1]

El gran interés suscitado en la actualidad en torno a la fitoterapia no obedece a un hecho puntual o a una moda. Nuestra época está marcada por la búsqueda de una vida más sana y una mejora de la calidad de vida y para conseguirlo, el hombre se ha dado cuenta de la necesidad de volver a los valores esenciales que siguen estando básicamente en la naturaleza.^[2]

En este sentido la *Capraria biflora L* (esclaviosa) es de gran valor al ser utilizada tradicionalmente en dolores menstruales, recuperación post-parto, en ducha y lavados vaginales y en inflamaciones pélvicas, en el dolor de oído, hemorroides, tos, reumatismo, problemas hepáticos y con acción tónico fortificante general. Además se aplica en la pneumatosis y como astringente en las heridas.^[3]

Dichos atributos se evaluaron desde el punto de vista farmacológico y fitoquímico mostrando actividad antiinflamatoria, analgésica, diurética y sobre el Sistema Nervioso Central asociada a la presencia de flavonoides, taninos, y saponinas presentes en los extractos de esta planta.^[15]

En el desarrollo de formas farmacéuticas a partir de esta planta resulta indispensable disponer de técnicas analíticas que permitan realizar el control de la calidad de estas garantizando los requisitos de calidad, seguridad y eficacia que se reclaman a cualquier sustancia constitutiva de un medicamento. Por otra parte con el desarrollo de la biotecnología de las plantas se han producido a nivel mundial millones de vitroplantas^[62]. La micropropagación de planta "in vitro" tiene como ventajas la reproducción de una gran población uniforme a partir de una sola planta ornamental, árboles frutales, plantas agrícolas y medicinales. En este último caso una vez

establecida la micropropagación se obtienen en corto tiempo grandes cantidades de materia prima como fuente de metabolitos con actividad terapéutica. [63]

Teniendo en cuenta lo anterior, en nuestro trabajo nos proponemos como objetivos:

- Establecer una técnica analítica para la cuantificación de los flavonoides presentes en la *Capraria biflora L.*
- Iniciar la micropropagación "in vitro" de la *Capraria biflora L* (esclaviosa).

CAPITULO I. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1.1 – Monografía de la *Capraria biflora* L.

1.1.1- Nombre científico: *Capraria Biflora* L.

1.1.2 - Nombres vernáculos:

La *Capraria biflora* L es conocida con variados nombres en diferentes partes del mundo: Escabiosa, Savadilla, Escabo (Colombia), Té del país (Puerto Rico), The du pass (Guadalupe), Majuito, Viuda, Esclaviosa (Cuba), Claudiosa (México), Goat-Weed (Estados Unidos), Fregosa (Venezuela), Cha-de-Calçada (Brasil).^[3,4,5]

1.1.3. Aspectos sobre el cultivo

La esclaviosa es una planta silvestre ó común, que se mantiene en floración y fructificación durante todo el año, automultiplicándose continuamente ya que las semillas que caen provocan el surgimiento de nuevas plantas que sustituyen a las viejas. A pesar de esto se plantea que esta especie puede ser multiplicada por estacas, por trasplantes y por semillas en condiciones semejantes a las encontradas en la naturaleza, generalmente suelo húmedo y bien drenado, con espacio suficiente, permitiendo así varias colectas al año. En la literatura se reporta la posibilidad de obtenerla por vías biotecnológicas a través de explantes de hojas y tejidos de callos, conservándose sus propiedades morfológicas.^[6,7,8,9]

1.1.4. Descripción Botánica

Esta planta es una hierba perenne, con tallos de 3.0 a 9.0 cm. de altura, ramificada, a veces pubescentes. Sus hojas son alternas, más largas que anchas, oblanceoladas, cuneiformes u oblongadas de 1.0 a 4.0 cm. de largo,

agudamente aserradas por encima de la parte media. Las flores se soportan sobre pedicelos axilares y estos pueden estar solitarios o en pares, siendo más cortos que las hojas, de hasta 1,5 cm. El cáliz provisto de 5 sépalos estrechos, casi iguales, de lineal lanceolados a lineal aleznados, de 4.0 a 6.0 mm de largo. Su corola es blanca, campanulada, como de 1.0 cm de largo. El tubo presenta cinco lóbulos lanceolados de su mismo largo poco más o menos e igualmente campanulados. Los estambres comúnmente en número de cinco aparecen con dos sacos arteríferos,

divergentes y confluentes. Los estigmas son dilatados o 2-lobados. La cápsula es oval a oval-ovoide, como del largo de los sépalos, 2 surcadas con dehiscencia loculicida. Las semillas son reticuladas. [9,10]

Según la descripción macromorfológica dada por Tejeda en 1998, ^[11] posee además un sistema radicular pivotante, con una raíz principal de aproximadamente 10.0 cm, con raíces secundarias y raicillas, propia de una planta dicotiledónea. El tallo es aéreo de porte herbáceo y se muestra vertical o erguido. Presenta yemas axilares y nudos poco visibles, de escaso relieve. Sus hojas son simples con nerviación reticulada y también pubescente, pueden clasificarse como marcescentes por su duración y apegaminadas por su consistencia. Es característico la presencia de pelos pluricelulares los que se encuentran distribuidos en el borde y en el envés de la hoja pero sólo en el nervio central, con una longitud de aproximadamente 1.0 mm, que pueden detectarse incluso a simple vista. En cuanto a las flores puede agregarse que presentan ovario súpero y los estambres son definidos en número de cuatro e insertos.

Desde el punto de vista micromorfológico al realizar el corte del tallo nos encontramos con un tejido epidérmico formado por una sola capa de células fuertemente unidas, alargadas, con pelos pluricelulares. Se presenta un tejido parenquimático clorofílico subepidérmico formado por células isodiamétricas y gran cantidad de cloroplastos. Esta corteza está formada por varias capas de células que pueden ir desde 6 hasta 9, íntimamente unidas, observándose que a medida que se avanza en busca de la esfera central el número de cloroplastos disminuye lo cual es típico de la clase Magnoliatae. La médula está formada por un tejido colenquimático y parenquimático de reserva, incolora completamente y que tiende a perdurar aún con crecimiento secundario. El xilema se

presenta con engrosamientos helicoidales. Hay que descartar que en esta especie el crecimiento primario dura muy poco tiempo, dando la sensación de un verdadero anillo de haces conductores, los cuales se presentan muy unidos y entran rápidamente en crecimiento secundario.

En las hojas existe una mayor abundancia de cloroplastos en el haz que en el envés, lo cual está determinado precisamente por la mayor exposición de esta parte de la planta a las radiaciones solares justificándose la coloración más oscura hacia el haz.

1.2 Usos tradicionales:

La *Capraria Biflora L* es una planta perteneciente a la familia Srophulaceae, muy utilizada en la medicina natural y tradicional por sus múltiples propiedades farmacológicas. Ha sido ampliamente usada en países como Brasil, Puerto Rico, Estados Unidos, Venezuela, Martímica y otros.^[12,1 3]

Las plantas del género *Capraria* fueron utilizadas como bebida por los aborígenes americanos al igual que por los pobladores europeos en todo su alcance natural.

En algunas partes de Brasil se preparan excelentes tinturas antisépticas a partir de la raíz aplicándose en forma de compresas y lavados locales como tratamiento local y preventivo y en forma de pomada en el tratamiento local de heridas.^[14]

Una de sus aplicaciones más interesantes resulta ser su utilización en dolores menstruales, recuperación post-parto, en duchas y lavados vaginales y en inflamaciones pélvicas.^[9]

Se reporta su uso en dolores de oído, hemorroides, reumatismo, trastornos hepáticos y acción tónico fortificante general.^[13]

1.2.1. Precauciones

A altas dosis puede producir debilidad general, sueño, rigidez, hasta parálisis muscular. Puede presentarse una especie de embriaguez con debilidad de la memoria y hasta vértigo por su acción depresora sobre el Sistema Nervioso Central.^[13]

1.3. Propiedades farmacológicas:

Diferentes estudios plantean que la *Capraria biflora* L posee propiedades antiinflamatorias, diuréticas, y sobre el Sistema Nervioso Central.^[15]

1.3.1. Efecto antiinflamatorio y analgésico:

Investigaciones reportadas por Nii y Reinoso (1999), demostraron que un extracto acuoso de dicha planta posee efectos antiinflamatorios a dosis de 200mg/kg. de peso comparable a la indometacina 10 mg. de peso. También mostró efectos analgésicos aunque en una menor medida, a dosis de 100mg/kg, comparándolo con el ácido acetil salicílico. Un ensayo de toxicidad límite evidencia que el extracto acuoso de esta planta no posee efectos tóxicos graves a dosis menores a 2000 mg/kg de peso.^[15]

El aislamiento y la evaluación farmacológica de un crudo de flavonoides obtenido del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de la *Capraria biflora* L., son reportados por Medinilla y Ramos en el año 2000. La extracción del material vegetal fue realizado por maceración a través de mezclas hidroalcohólicas (etanol/agua), en proporciones (9:1) y (1:1), a través a temperatura ambiente, lavando con cloroformo y acetato de etilo. Mediante este método se logró el fraccionamiento de los componentes, obteniéndose los flavonoides concentrados en una fracción de acetato de etilo. El crudo así obtenido mostró actividad antiinflamatoria a dosis de 150 y 200 mg/kg de peso, pudiendo ser responsables del efecto antiinflamatorio los flavonoides contenidos también en el extracto acuoso evaluado.^[16]

En la tesis de Ania Reinoso y Samuel se evaluó la actividad analgésica de un extracto acuoso de esta planta. Las dosis experimentadas fueron 50, 100 y 200 mg/Kg de peso, por vía intraperitoneal, en modelos de analgesia química y térmica. Se corroboró la

propiedad atribuida, resultando la dosis de 200 mg/kg con efecto analgésico similar al ácido acetilsalicílico. En el rango de dosis experimentadas el efecto tuvo un comportamiento dosis-dependiente.

1.3.2. Efecto sobre el Sistema Nervioso Central:

Machado y colaboradores evaluaron la actividad farmacológica sobre el SNC de un extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de *Capraria biflora L*, mediante los test de Irwin y de la Curiosidad. Fueron empleados tres niveles de dosis para el caso del primer test (200, 250, 300 mg/kg de peso), mientras que para el segundo se aplicó una sola dosis (250mg/kg de peso). En el test de Irwin se observaron y evaluaron 35 parámetros, que se hallan agrupados en los aspectos de Conducta, Estado Autonómico, Estado Neurológico y otros. De estos últimos, la Conducta fue el aspecto más afectado por el extracto (en un 90%), y en 6 parámetros del total, se encontró que su efecto es dosis-dependiente. Se obtuvo como resultado que el extracto acuoso de *Capraria biflora L* posee su actividad estimulante sobre el SNC a las dosis ensayadas. Paralelamente se realizó un tamizaje fitoquímico del extracto. Se determinó la presencia de alcaloides, saponinas, taninos, pirocatecólicos, ácidos grasos, aminoácidos y esteroides siendo los alcaloides y los flavonoides los metabolitos que con mayor frecuencia la literatura reporta como responsables de la actividad farmacológica de varios extractos sobre el SNC.

1.3.3. Efecto diurético:

Se desarrolló una metodología para la obtención de un crudo de saponinas a partir del extracto de las hojas de *Capraria biflora L*. como posible responsable del efecto

diurético de la planta. Al mismo se le realizó una caracterización fitoquímica, cromatográfica y espectroscópica, considerándose que contiene además algunas estructuras de posible naturaleza flavonoide que deberán ser separadas para estudios posteriores.

Lorenzo Santos estudió el efecto diurético de un extracto acuoso de hojas de *Capraria biflora L.*, obtenido según las referencias de Rondina y colaboradores. Mediante este método se logró una extracción más eficiente y exhaustiva de los compuestos solubles, disminuyendo notablemente el tiempo de extracción y por tanto la posible influencia de altas temperaturas. Esta experiencia resulta novedosa pues este tipo de extracción nunca había sido utilizado en nuestro laboratorio, ni se dispone de referencias nacionales al respecto. La acción diurética fue evaluada según el método de Lipchitz con modificaciones, evaluando dosis de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/kg, siendo la de 300 y 500 mg/kg las de mayor potencia diurética. Aunque el extracto acuoso de *Capraria biflora L.*, no puede ser considerado como un potente diurético, si se compara con diuréticos clásicos, su uso en la medicina tradicional no es desacertado, quedando corroborado dicho efecto. Además el extracto no es un potente excretor del ion K^+ , lo que constituye una ventaja respecto a la furosemida. En la investigación se inició el estudio cromatográfico y fraccionamiento del extracto acuoso, logrando el aislamiento de una sustancia cristalina denominada C5 cuyo análisis espectroscópico resultó insuficiente para asignar una estructura, pero que constituye un valioso aporte a los estudios fitoquímicos de la planta.

1.4. Composición Química:

En 1998, Tejada Pérez realizó un tamizaje fitoquímico por las hojas desecadas a la sombra y obtuvo una composición variada de metabolitos, de donde pudo inferir la presencia de: Lípidos, Esteroides, Saponinas, Aminoácidos, Alcaloides, Quinonas, Flavonoides, Antocianidinas, Taninos, Compuestos fenólicos y Azúcares reductores.

Se reporta en las raíces de la planta la existencia de un compuesto color rosa llamado biflorina al cual se le atribuye propiedades antibacterianas por su acción sobre la mayoría de los gérmenes infecciosos. Se clasifica como naftoquinona muy soluble en acetona y un poco menos en alcohol especialmente cuando es diluido con agua. Sin

embargo, la aplicación de *Capraria biflora L.* en la medicina popular no se corresponde necesariamente con las propiedades antimicrobianas de la biflorina. [23,25]

Un estudio realizado por el Departamento de Química de la Universidad de las Indias Occidentales, Jamaica, plantea el aislamiento de cuatro nuevas estructuras isoméricas de sesquiterpenoides de las partes aéreas de la *Capraria biflora L.* En el mismo se determinaron cuatro caprarinoides A (1), B (3), C (3), D (4) por espectroscopia RMN. Se realizaron estudios insecticidas para estos compuestos para determinar su potencia contra el gorgojo del boniato (*Cylos formicarius elegantulus*). Dos de estos compuestos 1 y 2 presentan efectos de mortalidad dosis dependiente en los gorgojos adultos. [26]

La planta es rica en potasio, sodio, magnesio, calcio, lo cual fue determinado en muestras de té y en solución ácidas de las cenizas por espectrofotometría de absorción atómica (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y fotometría de llama (Na^+ y K^+). Además se aplicó la espectrofotometría de absorción molecular, para cuantificar la presencia de aluminio y hierro. También en la planta se destacan en la planta valores relativamente elevados de iones cloruro y en número menos significativo se muestran los iones fosfato. Algunos de estos elementos pudieran ser responsables en parte de la actividad farmacológica desplegada por la *Capraria biflora L.*, como es su efecto diurético. Esta actividad en muchas plantas se le atribuye, además de los flavonoides, a las sales de potasio presentes en las mismas, En la caracterización inorgánica realizada por Tejeda (1998) a las hojas de la planta, se obtienen valores elevados de los iones: potasio, magnesio, calcio y sodio, lo cual coincide con el estudio efectuado por investigadores brasileños reportado anteriormente. También se encontraron altos valores de hierro y zinc. Todo ello resulta ventajoso si tenemos en cuenta que estos son cationes muy comunes y se requieren para muchas reacciones enzimáticas en el organismo. [23,24]

Los valores encontrados por el autor para el cadmio y el plomo resultan inferiores a los valores tóxicos y sin lugar a dudas estos resultados limitan la posibilidad de reacciones colaterales indeseables por este concepto. [18,19]

1.5 Flavonoides.

Los flavonoides son un grupo heterogéneo de compuestos fenólicos (aproximadamente 40000), ubicados en la mayoría de las plantas. Ellos son pigmentos responsables de la

explosión otoñal de los colores de las plantas y del espectro del Amarillo, rojo y naranja en el florecimiento de las plantas (Ielpo y Basili,200).

Este metabolito es abundante en la dieta humana. Se encuentra principalmente en frutas, vegetales y en bebidas populares, tales como: el vino rojo, té, café y cerveza (Di Carlo y Mascaló, 1999).

Varias investigaciones se han llevado a cabo, con el objetivo de evaluar las acciones de los flavonoides en diversas enfermedades humanas.

Desde el punto de vista estructural se conocen mas de 10 clases de flavonoides, conteniendo todos 15 átomos de carbono en su núcleo básico, están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6 en el cual los dos anillos aromáticos están unidos a una unidad de 3 carbonos que puede o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C.

Los flavonoides han sido responsables por inducir,"in vitro" la relajación del músculo liso en varias preparaciones. Además, estos flavonoides son inhibidores no competitivos de la angiotensina II y la prostaglandinaE2 en el ileon del conejillo de Indias. Interfiere en el metabolismo del ácido araquidónico e inhibe el AMPcíclico de la fosfodiesterasa (Marta y Rojas, 1996).

Estudios realizados han demostrado que la Artemisia giraldie presenta dos flavonoides inhibidores e los hongos y algunas flavonas inhibidoras del VIH. Las flavonas demuestran acción antimicrobiana contra el Streptococcus aureus, P.Aeruginosa, E.Coli, Protus sp,A.Flavus y T.Viride (Zhanz,et.al,1996)

Por su parte, Alexander da Silvia (2000), reporta que la planta Costus spiralis rosi es utilizada en la medicina tradicional brasileña en afecciones urinarias y en la eliminación de calculo urinario. La evaluación farmacológica de esta planta en ratas confirmó la información anterior. Un estudio fotoquímico previo reveló la presencia de un nuevo flavonoide deglicídido el cual fue aislado y caracterizado.

La raíz seca de la planta Sopota flaviscens es una medicina herbácea utilizada como diurético y para el tratamiento de la disentería aguda, hemorragia gastrointestinal y eczema. Esta actividad farmacológica de la planta es proporcionada por un número de flavonoides presentes en ella (Khan y Kin, 2000).

Se realizó un estudio con una de las especies de la planta Rumorea wehusitschii, en la cual fue aislado el granoisoflavones, que presenta varias actividades farmacológicas

tales como: antipirética, antisifilítica y en las mordidas de culebras o serpientes (Steneart y Bartolomew, 2000).

En los flavonoides han sido reportados los efectos citotóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos. Debido a sus actividades multiplasmáticas ellos están incluidos entre los modificadores de la respuesta biológica-natural. Numerosos estudios “in vivo” han demostrado una estrecha relación entre la estructura química y la actividad biológica de sus moléculas. Esto sugiere que su estructura básica puede ser modificada al incrementarse o decrecer su actividad biológica (Ielpo y Basile, 2000). Estos autores plantean, además que numerosos flavonoides aparentan influir en la función de los sistemas enzimáticos que están críticamente relacionados en la respuesta inmune y en la generación de procesos inflamatorios, especialmente en la traducción de signos de activación celular.

Los efectos de una administración aguda de los flavonoides, apigenina y crisina, contenidos en *Matricaria chamomilla* y *Pasiflora incarnata*, respectivamente, fueron estudiados por P. Zanolli (2000), obteniendo resultados en animales de laboratorio y demostrando la actividad de estos flavonoides como ansiolíticos y sedantes.

1.6. Consideraciones analíticas de la *Capraria biflora* L.

No se han encontrado métodos analíticos que desarrollen y validen técnicas para la *Capraria biflora* L. No obstante Morais y colaboradores cuantificaron a través del Método de Folin-Denis, por espectrofotometría UV-visible, los taninos presentes en el té obtenido por infusión de la planta completa, ^[6]

Además se terminaron iones metálicos de muestras de té y en solución ácida de las cenizas por espectrofotometría de absorción atómica (Ca^{2+} y Mg^{2+}), espectrofotometría de absorción molecular (Al^{3+} y Fe^{2+}), y fotometría de llama (Na^+ y K^+). También se determinaron iones cloruros en valores elevados y en número menos significativos iones fosfato.

1.7. Micropropagación.

La palabra micropropagación fue empleada por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación “in vitro”. Se entiende por micropropagación, cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de

plántulas y que permitan el desvío, tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica, que se practica convencionalmente. Este procedimiento indica que cada una de las plantas que se produzcan pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original de que se deriva.^[63]

Dos principales métodos de regeneración *"in vitro"* han sido utilizados para la propagación: la órganogénesis, que se basa en la abolición de la dominancia apical y la proliferación de yemas axilares o adventicias y la embriogénesis somática que es la formación de embriones a partir de células somáticas (Vasil, 1994).

El más común de los métodos, y que es conocido popularmente como micropropagación, es la órganogénesis. Este método, a pesar de no ser el más rápido, ha sido el más ampliamente utilizado para la propagación comercial debido a la estabilidad genética de las plantas obtenidas y a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies. En la actualidad existe un mayor conocimiento de la biología de este proceso que de la embriogénesis somática y, técnicamente, es mucho más simple y no requiere de manos de obra altamente calificado.^[63]

Es difícil determinar un punto de partida en el origen del cultivo de tejidos, sin embargo, importantes antecedentes se remontan a 1838 y 1839 cuando Schuann y Schiellen hicieron un extraordinario aporte sobre el conocimiento de la célula. En su teoría celular ellos la describieron como la unidad biológica más pequeña que podía ser considerada como totipotente y por tanto, capaz de regenerar una planta completa en condiciones favorables.^[36]

Otros estudios importantes fueron los llevados a cabo por Vochting en 1978 referentes a la polaridad en la formación de nuevas yemas en dependencia de las condiciones y posición en que son colocadas. Sachs en 1892^[37] planteó que las sustancias sintetizadas por la planta están distribuidas polarmente. Morgan en 1901^[36] es posiblemente quien acuñó el concepto de totipotencia en función de la capacidad de regenerar un organismo completo a partir de una célula Harberlandt. Considerado actualmente como el padre del cultivo de tejidos asimiló todos los conceptos existentes en aquel momento y fue el primero en cultivar células aisladas de hojas. Sin embargo, no logró división celular debido probablemente a que trabajó con células altamente diferenciadas y a la carencia de hormonas, compuesto hasta entonces desconocido. Enfatizó el concepto de totipotencia celular, el de hormonas de crecimiento y de callos.

[38]White en 1939 [37] planteó que era factible cultivar con éxito órganos vegetales empleando para ello raíces de *hycopersuon esculentum*.

Estos experimentos respaldaron indirectamente la teoría de totipotencialidad celular. Posteriormente Steward et al (1958) y Reinert (1959) [39] describen la embriogénesis somática en cultivo de Zanahoria. Más tarde, se demostró que estos embriones eran originarios a partir de células, poniendo en evidencia la totipotencialidad de las células vegetales. Este fenómeno constituye la base de mucha de las aplicaciones prácticas del cultivo de tejidos en la agricultura y la salud.[39].

1.7.1 Etapas de la micropropagación.[62]

- **Fase 0: Preparativa.** En esta etapa se incluye la selección de la planta donadora y una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y el desarrollo posterior de los cultivos “*in vitro*”.
- **Fase 1: Establecimiento o iniciación de los cultivos.** El objetivo de esta fase es establecer cultivos axénicos y viables con los cuales iniciar el proceso de propagación.
- **Fase 2: Multiplicación.** Es considerada la etapa más importante del proceso donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas.
- **Fase 3: Enraizamiento.** Su objetivo es preparar las plántulas para su re-establecimiento en condiciones de suelo.
- **Fase 4: Aclimatación.** Es la fase final del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos comerciales de producción, casas de vidrio o invernaderos.

1.7.2. Principios básicos.

Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro* se siguen una serie de principios básicos que no pueden ser violados, estos son:

a) Selección del explante: la selección de un explante constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Prácticamente se puede utilizar cualquier porción o parte de la planta; en primera instancia, dicha selección esta determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Para arribar a una selección

adecuada del explante es recomendable comparar varias fuentes de células, tejidos u órganos antes de decidirse por una de ellas. En muchas especies tales como eucalipto, coffea, papa y otras se utilizan como explantes los segmentos nodales, hipocótilos y epicótilos de plantas geminadas “in vitro”, yemas terminales ^[39,40]

Generalmente se aconseja utilizar plantas sanas, vigorosas y dentro de estas las zonas que se encuentran en activa división, como los meristemas. De forma general, se admite que son plantas jóvenes las que aportan los explantes mas reactivos ya que la potencialidad disminuye con la cantidad. Este fenómeno se manifiesta particularmente con las plantas leñosas ^[41]

En forestales por lo general se parte de semillas, con el objetivo de evadir los inconvenientes que representan para el cultivo “in vitro” el envejecimiento del material vegetal; de esta manera muchos autores inician el proceso a partir de plantas germinadas in vitro ^[42,43,44,45,46,47] aunque también se han mencionado plantas provenientes de estacas enraizadas como una de las vías de revigorización del material inicial ^[48,49] y otros autores han empleado como material inicial los rebrotes obtenidas luego de podas intensivas ^[50,51]. Muy pocos autores se han referido al empleo de árboles adultos como material de partida y los que lo han hecho, no han mencionado resultados relevantes, pues los índices de contaminación y oxidación fenólica son muy elevados. ^[52,52,54]

Las condiciones de cultivo de la planta donadora también se deben considerar, pues se ha observado que los tejidos u órganos de plantas cultivadas en condiciones controladas son más fácilmente establecidas in vitro en comparación con el material proveniente de plantas cultivadas en el campo. ^[55]

El tipo de planta donadora también influye en el éxito del cultivo “in vitro”, por ejemplo, los tejidos de las gimnospermas, son más difíciles de cultivar que los de angiospermas. Entre estas últimas el material derivado de las dicotiledóneas puede ser cultivado con mayor facilidad que el de los monocotiledóneas.

b) Desinfección del explante : La relación explante medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban estos cultivos, constituyen un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos los cuales se reproducen más rápidamente que las células vegetales, agotando de esta forma los nutrientes del medio de cultivo, además que liberan hacia este algunos productos de su metabolismo que comúnmente son tóxicos para el material vegetal. Mediante este procedimiento se deben eliminar los

hongos, bacterias, levaduras, algas que se encuentran contaminando la superficie del material vegetal a utilizar, lo cual se realiza antes de poner el explante en cultivo con el medio de cultivo. ^[56]

Diversos compuestos químicos se han utilizado para desinfectar superficialmente los explantes; dentro de estos los más empleados son el etanol (70%) y el hipoclorito de sodio (NaOCl) DE 1-3% . Con menos frecuencia se usan el hipoclorito de calcio [Ca (OCI)₂ 6-12%] y el cloruro de mercurio (HgCl₂ 0.1-1.5%) aunque se debe recalcar que este compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante.

Las condiciones del agente esterilizante y la duración del tratamiento deben ser escogidas en función de minimizar los posibles daños para los explantes. No existe un procedimiento único para este fin, ya que deben tenerse en cuenta las especies vegetales y el tipo de explante. ^[57]

c) Los medios de cultivo: Los principales componentes de los medios de cultivos para el crecimiento ilimitado de células, tejidos y órganos han sido establecidos en los últimos 40 años gracias a los aportes de numerosos investigadores. Mediante el microorganismo sintético se le debe proporcionar al explante (células, tejidos u órganos) los requerimientos nutricionales esenciales (sales inorgánicas, reguladores de crecimiento, vitaminas, fuentes de carbono y aminoácidos) en la proporción y dosis específica para cada tipo de tejido cultivado. ^[36]

Cuando se va establecer un cultivo por primera vez, el procedimiento usual consiste en probar un medio previamente definido, que va siendo modificado y adaptado al nuevo sistema vegetal. Alternativamente puede probarse un medicamento de composición relativamente simple, al cual se van adicionando otros compuestos nutritivos complejos. Generalmente la complejidad del medio aumenta a medida que disminuye el tamaño del explante a cultivar.

El microorganismo con más frecuencia en la micropropagación de gran cantidad de especies es el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962), el cual ha sido utilizado por diversos autores como Kiet (1991), Sha Valli Khan (1996), Warrag (1990), Jenq-Chuan et al (1994) Rasmussen (1991), Gill (1996), , Azmi (1997), Srinivasan y Kankan (1994), Nicco1 (1994).

d) Condiciones ambientales de incubación: este requisito debe cumplirse de forma rigurosa para lograr éxito en el establecimiento de cultivo in vitro. Para ello es conveniente que los explantes sean incubados en ambientes controlados de luz y

temperatura así como de humedad relativa acordes con el objetivo del trabajo. Estos efectos influyen prácticamente en todos los tipos de procesos: Absorción de agua, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto. [38]

Los factores como la temperatura, la luz han sido poco estudiados; no obstante se conoce que las respuestas morfológicas varían en dependencia de la temperatura, calidad, intensidad, y duración de la luz. De forma general se recomiendan temperatura entre 25 y 28 °C, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes(40w) y lámparas incandescentes (25w) que brinden entre 42-48 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de iluminación. El fotoperíodo varia en dependencia del tipo de planta, el mas utilizado es el de 16h (Ochoa, 1990). En Cuba, actualmente se utiliza la luz natural en casi todos los sistemas de propagación acelerada de plantas en las 40 biofábricas que existen en el país. [58]

1.7.3. Aplicaciones del cultivo de tejidos:

El desarrollo extraordinario alcanzado por las técnicas de cultivo de tejido in vitro, desde sus inicios hasta la fecha ha dado un gran aporte no solo en el campo de la agricultura sino también a la biotecnología, que en la actualidad constituye una vía fundamental en la actividad científico tecnológico.

El cultivo de tejidos presenta aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas tales como : mejorar genética, multiplicación vegetativa(micropropagación), obtención de haploides y líneas isogénicas, obtención de plantas libre de virus y otros patógenos, conservación de gemoplasma, crioconservación, cultivo de células y protoplastos [38] y más recientemente la utilización de las técnicas biotecnológicas para la producción de metabolitos secundarios :flavonoides, alcaloides. Compuestos fenólicos.

El desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos ha hecho aportes indiscutibles en el campo de la biotecnología y otras especialidades dirigidas fundamentalmente a: cultivo de meristemas, cultivo de callos, cultivo de antenas, polen y óvalos, cultivo de células en suspensión y cultivo de protoplastos.

CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS.

2.1. Preparación del material vegetal.

2.1.1. Recolección y selección.

El material vegetal se recolectó en zonas rurales cercanas a Fomento, Sancti Spíritus, en el mes de Enero del año 2005. Comprendió ejemplares que se encontraban en estado de floración y fructificación. Se realizó en horas tempranas de la mañana tomando partes aéreas de la planta. Procurando dejar ramas suficientes para no afectar el desarrollo normal de las plantas, teniendo en cuenta que esta es una especie perenne. Posteriormente se trasladaron en bolsas de nylon hasta la

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas al laboratorio de Química – Farmacéutica y Farmacognosia, donde se procedió a la selección de las hojas como material de interés, eliminando las materias extrañas y otras especies de plantas o impurezas mecánicas que pudieran presentarse.

2.1.2. Secado y molinado.

El secado fue realizado según la metodología estandarizada por Tejeda y colaboradores (1998) a una temperatura de 30 °C utilizando estufa marca Thelco modelo 70 y extendiendo las hojas en capas delgadas sobre bandejas de papel. Después de secado, el material vegetal, fue triturado en un molino de cuchillas marca Retsch 6 mbh 5657 tipo SR-2 con un tamiz de 2.0 mm. ^[59].

2.2. Determinación cuantitativa del contenido de flavonoides totales expresados en base a quercetina mediante espectrofotometría UV-Vis.

2.2.1. Desarrollo y validación de la técnica analítica para la determinación cuantitativa del contenido de flavonoides totales por espectrofotometría UV-Vis.

Materiales y equipos:

- Estufa MLWWSU100, RDA.
- Balanza analítica digital Sartorius.
- Baño de agua termostaticado: Seima.
- Bomba de vacío VEBMLW.
- Espectrofotómetro UV-visible. (Ultrospec III Ph)
- Cubetas de cuarzo de 1cm de camino óptico.
- Cristalería de laboratorio.
- Papel de filtración lenta.
- Alcohol etílico al 50%.
- Alcohol etílico al 96%.
- Acido sulfúrico al 10%.

La determinación se realizó de forma cuantitativa aplicando un método espectrofotométrico, al cual se le realizaron algunas modificaciones. [60,61]

➤ **Patrón.**

Se partió de una solución patrón de quercetina de 0,005 g previamente secada en estufa a 120 °C durante dos horas. Luego se disuelve en alcohol etílico al 96% hasta completar 50 ml. De esta solución se tomaron diferentes alícuotas, correspondientes a los valores de concentración siguientes: 0.003g/l, 0.004g/l, 0.005g/l, 0.006g/l, 0.007g/l.

Y se completó hasta volúmen de 50 ml con alcohol etílico absoluto al 96%.

Posteriormente fueron leídos los valores de absorbancia a 295nm.

➤ **Blanco.**

Se utilizó como solución compensadora alcohol etílico absoluto al 96%. Fig :1

➤ **Muestra.**

El procedimiento realizado al material vegetal fue el siguiente:

Se pesan exactamente 1 g de droga, previamente secada y molinada, y se llevó a un frasco cónico de 250 ml, haciéndose reaccionar con 20 ml de la solución de ácido sulfúrico 10 % y 20 ml de solución de alcohol al 50 %. La mezcla reactiva se reflujó durante dos horas sobre baño de agua, luego se dejó enfriar y se filtró por papel de filtración rápida con ayuda de una bomba de vacío. El residuo se lavó con 30 ml de la solución de alcohol etílico 50 %.

Se eliminó el residuo y el filtrado resultante se evaporó en el mismo Kitasato sobre baño de agua a una temperatura de 80 °C, hasta alcanzar la mitad del volumen original. Luego se enfrió sobre baño de hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo se filtró por papel de filtración lenta, lavando el precipitado obtenido con cuatro fracciones de 30 ml de agua fría.

Se eliminó el filtrado y los lavados, y el residuo se disolvió en 70 ml de alcohol etílico 96 % calentado previamente a 50 °C. La solución se pasó a un matraz de 100 ml de capacidad y se completó volúmen con etanol 96 %, posteriormente fue leída esta muestra a 295 nm en cubetas de cuarzo y empleando como solución compensadora alcohol etílico 96 %.(Fig:2. Anéxos).

En base a los resultados obtenidos se puede cuantificar el contenido de flavonoides totales en base a quercetina, para lo cual se toman los valores medios de concentración hallados en la comprobación de la repetibilidad de la técnica analítica.

$$\% = \frac{M_{muestra}}{M_{inicial}} \times 100$$

Donde:

M_{inicial} - masa inicial del material vegetal para realizar la extracción.

M_{muestra} – masa de muestra contenida en la solución (Si).

% - porcentaje de flavonoides totales en base a quercetina.

2.2.1.1. Validación de la técnica de análisis espectrofotométrica UV-Vis para la cuantificación de flavonoides totales en base a quercetina en los extractos de las hojas de *Capraria biflora* L.

Para tener confiabilidad y seguridad en los resultados obtenidos se procedió a la validación de la técnica de análisis.

Linealidad.

Para demostrar el cumplimiento de este parámetro se prepararon tres curvas de calibración cada una con los valores de concentración (0.003g/l, 0.004g/l, 0.005mg/l, 0.006g/l ,0.007g/l).

En este caso, específicamente se valora el producto natural, analizando cinco soluciones patrones a un intervalo de concentración de 50-150 % de la teórica.

Se calcularon los requisitos establecidos para este parámetro (r, Cvf, Sb relativa a ± t * Sa,).

- **Coeficiente de correlación (r):**

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X * \sum Y}{n}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right) * \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)}}$$

- **Factores de respuestas:**

$$f_i = \frac{Y}{X}$$

- **Media de f_i:**

$$Sf = \sqrt{\frac{\sum (f_i - \bar{f})^2}{n-1}}$$

- **Coeficiente de variación de los factores respuestas (CVf):**

$$CVf = \frac{Sf}{\bar{f}} 100$$

- **Desviación estándar relativa de la pendiente (Sbrel %):**

$$Sb_{rel}(\%) = \frac{Sb}{b} 100$$

$$Sb^2 = \frac{S^2_{Y,X}}{\sum (X - \bar{X})^2} = \frac{S^2_{T,X}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

Donde:

$S^2_{Y,X}$ – varianza del error experimental total, varianza residual o varianza de regresión de “y” sobre “x”.

$S^2_{Y,X}$ se obtiene mediante las ecuaciones siguientes:

$$S^2_{Y,X} = \frac{\sum (Y - \bar{Y})^2}{n - 2} (1 - r^2)$$

- **Límites de confianza de la pendiente:**

$$b \pm t * Sb$$

Siendo t el valor de Student para n-2 grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente p = 0.05).

- **Varianza del termino independiente:**

$$Sa^2 = Sb^2 * \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S^2_{Y,X}}{\sum (X - \bar{X})^2} * \frac{\sum X^2}{n}$$

- **Desviación o error estándar:**

$$Sa = \sqrt{Sa^2}$$

- **Desviación estándar relativa del termino independiente:**

$$Sa_{\text{real}}(\%) = \frac{Sa}{a} * 100$$

- **Límites de confianza del término independiente:**

$$a \pm t * Sa$$

Siendo t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente $p = 0.05$).

✓ **Criterios:**

$$r \geq 0.99$$

$$CV_f \leq 5 \%$$

$$S_{brel} \leq 2 \%$$

$$a - tSa < 0 > a + tSa$$

Precisión.

Este aspecto incluye repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad:

Se prepararon 5 réplicas según la metodología descrita para la muestra desarrollada por un mismo analista, en un mismo día y bajo las mismas condiciones.

✓ **Criterio:**

$$CV \leq 2.0 \%$$

Precisión intermedia:

Para la precisión se realizaron 20 réplicas del experimento anterior dos días y por dos analistas diferentes.

✓ **Criterio:**

$$CV \leq 3.0 \%$$

Exactitud.

Para su cumplimiento se utilizó el método de adición de Standard. A la muestra se le incorporaron concentraciones crecientes del analito patrón (3mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 6mg/ml y 7mg/ml) y se realizan las determinaciones espectrofotométricas a 295 nm.

Los resultados se llevan a una gráfica de concentración añadida & concentración recuperada, se determina la ecuación de la recta y el valor de pendiente indica el porcentaje de recuperación de la técnica.

2.3. Micropropagación de la *Capraria biflora* L.

2.3.1 Propagación natural de la *Capraria biflora* L.

El material vegetal se identificó como *Capraria biflora* L por el ingeniero agrónomo Fernando Franco. El mismo fue recolectado en estado de floración y se procedió a la separación de sus semillas. Las mismas se sembraron en una parcela, previamente preparada, del Jardín Botánico de la Universidad Central “Martha Abreu” de las Villas en el mes de febrero.

2.3.2. Micropropagación “in vitro” de la *Capraria biflora* L.

Procedimientos generales:

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Biorreactores del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central “Martha Abreu” de las Villas durante el período comprendido entre marzo y junio del 2005.

Medios de Cultivo: Para el crecimiento de los explantes se empleó el medio de cultivo basal compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), el cual a partir de este momento se nombrará como medio MS, suplementado con 0,5 mg/l de tiamina, 100 mg/l de miyoinositol, 3 % de sacarosa y la adición de reguladores de crecimiento que se especifica en cada experimento. El pH fue ajustado a 5.7 previo a la esterilización, la cual se realizó en una autoclave vertical a una temperatura de 121 °C y una presión de 1,2kg/f/cm² durante 20 min.

Condiciones de cultivo: En todos los experimentos los explantes se incubaron en cámaras de crecimiento con luz natural y una temperatura promedio de 25±⁰C.

Para los experimentos relacionados con el establecimiento o iniciación de los explantes se emplearon tubos de ensayo con tapones de goma en los cuales se vertieron 10 ml de medio de cultivo sin reguladores del crecimiento. Se colocó un explante por tubo y se utilizaron 20 tubos por tratamiento.

En las restantes fases se emplearon frascos de vidrio con una capacidad de 250ml en los que se vertieron 30 ml del medio de cultivo. Se colocaron 4 explantes en cada uno y se emplearon 15 frascos / tratamientos.

2.3.2.1 Fase 0. Preparativa.

Selección del material vegetal:

Ya que no existen en el país Bancos de Germoplasma que garantizan el suministro continuo de brotes (que se requieren) para el establecimiento “in vitro” de este material se colocaron plantas procedentes de campo en la fase de aclimatización sobre un sustrato que contiene materia orgánica (80 %) y Zeolita (20 %).

Las plantas se mantuvieron hasta que alcanzaron una altura promedio de 20 cm y tuvieran un desarrollo adecuado de las yemas adventicias, además de que no presentaran síntomas de afectación por enfermedades virales o de insectos.

2.3.2.2 Fase 1. Iniciación o establecimiento del cultivo “in vitro”

Los brotes fueron llevados al laboratorio y sometidos a un lavado con agua limpia y detergente industrial, se le eliminaron las hojas quedando solo las yemas a las que se realizó una desinfección introduciéndolas en una solución de hipoclorito de sodio 3 % durante 20 minutos, preparada previamente en agua estéril. Se procedió a enjuagar los explantes en la cámara de flujo laminar.

Para la implantación “in vitro” se seccionaron las yemas con un tamaño de 2-3 mm y se colocaron en el medio de cultivo compuesto por sales de Murashige y Skoog(1962) con la adición de CaCl_2 2.9 ml/l ; 1 ml/l KI, 10 ml/l de EDTA-Fe , 2 ml/l de tiamina, 4 ml/l de 6-BAP, 0.23 ml/l de AIB, 100 mg/l de myionositol y sacarosa al 3 %.

Se evaluó el porcentaje de explantes contaminados, y el total de yemas con crecimientos a los 10, 15 y 25 días de establecida.

2.3.2.3 Fase 2. Multiplicación.

Multiplicación en medio semisólido. Estudio de diferentes reguladores del crecimiento.

Con el objetivo de los explantes en presencia de reguladores del crecimiento fueron adicionadas al medio de cultivo diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indolacético(AIA) como muestra la tabla. Se utilizaron yemas axilares con un par de hojas del material vegetal establecido.

Tabla # 1. Tratamientos evaluados en la fase de multiplicación.

Concentración de las hormonas del crecimiento		
Tratamientos	6-BAP (mg/l)	AIA (mg/l)
1	0	0
2	0	0,5
3	0	1
4	0,5	1
5	0,5	0,5
6	0,5	1
7	1	0
8	1	0,5
9	1	1
10	1,5	0
11	1,5	0,5
12	1,5	1
13	2	0
14	2	0,5
15	2	1

Las evaluaciones se realizaron a los 60 días y las variables evaluadas fueron el número de brotes por explantes, altura de los brotes, número de entrenudos por planta y se calculó el coeficiente de multiplicación. El experimento se replicó durante 2 subcultivos.

2.3.2.4 Enraizamiento “in vitro” y aclimatización.

Con el objetivo de calcular la influencia de reguladores del crecimiento sobre el enraizamiento de los explantes se estudiaron tres concentraciones de ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB) con un testigo sin regulador del crecimiento como muestra la tabla.

Tabla # 2.Tratamientos evaluados en la fase de multiplicación.

Tratamientos	Concentración
Control	Sin reguladores de crecimiento
1	0,5mg/L AIA
2	1mg/L AIA
3	2 mg/L AIA
4	0,5mg/L AIB
5	1 mg/L AIB
6	2.0mg/ AIB

Se utilizó el medio cultivo MS en estado físico líquido. Las sales MS se redujeron al 70% de la concentración original y la sacarosa se aumentó al 40%. Las evaluaciones se realizaron a los 45 días. Los parámetros evaluados fueron: altura de la planta (cm), el número y tamaño de las raíces y números de las hojas por planta y el total de plantas enraizadas expresadas en porcentaje. Se utilizaron 20 réplicas por tratamientos. Los brotes utilizados provenían de la fase de multiplicación a partir de yemas axilares.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1. Desarrollo y validación de una técnica analítica para la determinación de flavonoides totales.

3.1.1. Cuantificación del contenido de flavonoides totales expresados en base a la quercetina.

Se determinó que la planta *Capraria biflora L.*, presenta un 0.1 % de flavonoides del total de componentes de la planta.

3.1.2. Validación de la técnica analítica UV-Vis indirecta para la cuantificación de flavonoides totales en base a la quercetina.

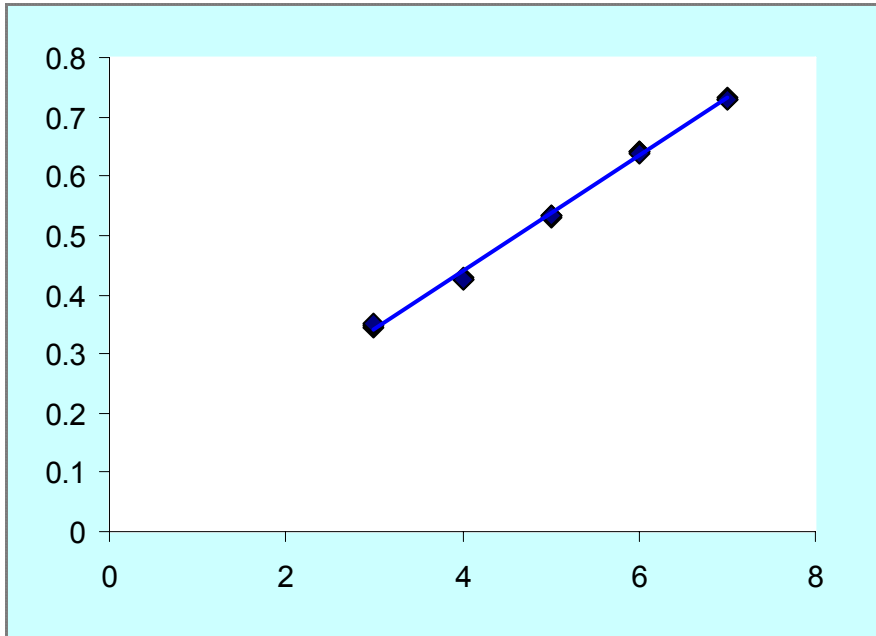
Linealidad:

Preparación de la curva de calibración.

En la tabla # 3 se reportan los valores medios de las absorbancias obtenidas para las concentraciones evaluadas en la comprobación de la linealidad de la técnica analítica con los cuales se confeccionó la curva de calibración.

Tabla # 3. Valores de concentración y absorbancia.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia (Curva 1)	Absorbancia (Curva 2)	Absorbancia (Curva 3)
3	0.345	0.348	0.35
4	0.429	0.425	0.427
5	0.535	0.531	0.533
6	0.64	0.642	0.638
7	0.731	0.728	0.73



$$Y = 0.0977 x + 0.047$$

Los resultados que definen el cumplimiento de este parámetro se muestran a continuación, los cuales se encuentran en el rango establecido.

Tabla # 4. Resultados para evaluar linealidad.

	r^2	CVF (%)	Sb_{rel} (%)	$a \pm t * Sa$
Valor obtenido	0.9975	3.835	1.373	Lím _{sup} : 0.05933 Lím _{inf} : - 0.0346
Valor reportado	≥ 0-99	≤ 5	≤ 2	$a + t * Sa < 0 > a - t * Sa$

r^2 : Coeficiente de correlación lineal.

CVf: Coeficiente de variación de los factores respuestas.

Sb_{rel} (%): Desviación estándar de la pendiente.

$a \pm t * Sa$: Límites de confianza del termino independiente.

Lím_{sup}: Límite superior.

Lím_{inf}: Límite inferior.

Como se puede observar los resultados experimentales corresponden con los criterios de aceptación por lo que la técnica es lineal en el rango de concentraciones de 3 mg/ml a 7 mg/ml, pues cumple con los requisitos establecidos.

Precisión:

Incluye los términos repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad.

Para evaluar este parámetro la técnica se repitió cinco veces sin alterar las condiciones, es decir, por el mismo analista, el mismo día y bajo las mismas condiciones. Los resultados se muestran en la tabla # 5.

Tabla # 5. Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad de la técnica analítica.

Réplicas	Absorbancia	Concentración	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	0.87	8.16	8.17538	0.087343	1.068
2	0.878	8.236			
3	0.884	8.29			
4	0.861	8.0769			
5	0.865	8.114			

La técnica se considera repetible pues el coeficiente de variación (1.068) es menor que 2.0, límite establecido para la repetibilidad ^[64].

Precisión intermedia:

En la tabla # 6 aparecen los resultados obtenidos en este ensayo, realizado en diferentes condiciones y en dos días y por dos analistas diferentes.

Tabla # 6. Resultados para evaluar la precisión intermedia.

	Primer día		Segundo día	
	Absorbancia	Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Concentración (mg/mL)
Analista 1	0.875	8.161	0.865	8.29
	0.858	8.236	0.884	8.264
	0.878	8.29	0.881	8.386
	0.884	8.0769	0.894	8.358
	0.861	8.114	0.891	8.41
Analista 2	0.897	8.133	0.861	8.076
	0.867	8.114	0.854	7.87
	0.865	8.067	0.84	7.954
	0.86	8.048	0.852	7.992
	0.854	7.87	0.846	7.936

N° de determinaciones: 20

Valor medio global: 8.132295

S: 0.164952

CV: 2.027

La técnica analítica espectrofotométrica UV-Vis indirecta para cuantificar flavonoides totales en el extracto etanólico de *Capraria biflora L.*, se considera **precisa**, pues resultado del procesamiento de los datos se encuentran dentro de los límites establecidos.

Exactitud :

Para evaluar la exactitud de la técnica analítica, fue empleado el método de adición de estándar. Como expresión de los resultados se determino el porcentaje de recobrado. A continuación se muestran los resultados.

Tabla # 5

Concentración añadidas	\bar{A}	Concentración recuperada	% de recobrado	% total de recobrado
M	0.76	-	-	-
M+1 mg/ml	0.891	0.13	96.42	89.24
M+2 mg/ml	0.978	0.21	91.30	
M+3 mg/ml	0.99	0.24	80	
				CV = 9.41 %

Test de t, $t_{exp} = 1.97$; $t_{tab} (p = 0.05 ; GL = 3-1 = 2) = 4.303$

Al ser $t_{exp} < t_{tabla}$ no existen diferencias significativas entre la recuperacion media y 100 por lo que la exactitud es correcta.

Teniendo en cuenta que se trata de un producto natural y la complejidad del proceso previo de extracción podemos considerar el por ciento de recuperación obtenido: 89.24 % aceptable, considerando que se establece como límite de recobro un 86%. Esto indica que la técnica es exacta al tener la capacidad de dar resultados lo más cercanos al verdadero.

3.2 Micropropagación.

3.2.1 Propagación natural de la *Capraria biflora* L.

3.2.2 Establecimiento “ in vitro “ de yemas apicales y axilares.

Los resultados obtenidos en la fase de establecimiento mostraron que en las yemas apicales se logró un 100 % de explantes libres de contaminación debido al uso de hipoclorito de sodio a concentraciones de 2 % (15 y 20 min de exposición) y 3 %(todos los tiempos de exposición evaluados).

Por otra parte la brotación mostró diferencias estadísticas en los tratamientos empleados y se observó mayor respuesta cuando los explantes se pusieron a una concentración de NaOCl de 2 % durante 10 y 15 min por lo que es importante que el procedimiento de desinfección permita eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes . (Tabla # 8).

Tabla # 8. Influencia del hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición en la desinfección de los explantes.

Concentración NaOCl (%)	Tiempo (min)	Contaminación (%)	Brotación (%)
1	10	21	73.3
	15	19	77.5
	20	11	79.3
2	10	7	100
	15	0	100
	20	0	81
3	10	0	67
	15	0	35
	20	0	22

La presencia de microorganismo contaminantes, hongos y bacterias es uno de los principales problemas durante el establecimiento “in vitro” de explantes, sobre todo plantas adultas y cultivadas en el campo ^[65]

De forma general los porcentajes de contaminación son bajos. Ello se relaciona a que fueron atendidos con todas las condiciones que se requieren durante la fase preparativa. Esta fase resulta limitante no solo en el aspecto sanitario sino también en la supervivencia de los mismos. En los casos en que se afectó la supervivencia de los explantes puede deberse al efecto toxico del compuesto químico sobre los tejidos vegetales debido a la fragilidad del tejido epidérmico procedente de plantas jóvenes.^[66]

Las yemas axilares tuvieron un comportamiento similar a las apicales en cuanto a porcentaje de contaminación, los más bajos se alcanzaron con 3 % de concentración de NaOCl en los tres tiempos de exposición. Las yemas axilares deben estar inactivas al escogerlas pues las mismas en crecimiento activo presentan un alto porcentaje de contaminación.^[67]

Sin embargo, con relación a la brotación no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 9)

Tabla # 9. Influencia del hipoclorito de sodio en tiempo de exposición en la desinfección de los explantes a partir de yemas axilares.

Concentración NaOCl (%)	Tiempo (min)	Contaminación (%)	Brotación (%)
1	10	43	56
	15	21	51
	20	18	64
2	10	45	57
	15	12	70
	20	15	65
3	10	7	61
	15	7	69
	20	7	58

Se logró el establecimiento “in vitro “ de la *Capraria biflora L* a partir de yemas apicales y axilares, siendo mas eficiente en el uso de las yemas apicales donde no se presentó contaminación y 100 % de brotación con 2 % y 15 min de inmersión en hipoclorito de sodio.

3.2.2.1 Multiplicación. Estudio de diferentes reguladores del crecimiento.

Las combinaciones de 6-BAP y AIA utilizadas en el medio de cultivo influyeron sobre la multiplicación de *Capraria biflora L*. La mejor combinación fue cuando se agregó el medio de cultivo, 1.0 mg/l de 6-BAP + 0.5 mg/l de AIA al lograrse un mayor número de brotes entrenudos y el mayor coeficiente de multiplicación. Mostró el mejor comportamiento integral para todas las variables evaluadas, no presentando diferencias estadísticas con los tratamientos que tuvieron mayores valores en cuanto al número de brotes y el coeficiente de multiplicación.

El 6-BAP en ausencia del AIA provoca mayor número de entrenudos al igual que mayor número de brotes lo cual coincide con otros estudios.^[68] Se aprecia que los mejores coeficientes de multiplicación se logran con los tratamientos que conllevan a un número mayor de brotes. Por lo tanto, este parámetro tiene gran influencia sobre el coeficiente de multiplicación en la planta,. Sin embargo, la altura de los brotes no influyó directamente en el coeficiente de multiplicación.

Tabla # 10. Influencia del 6- BAP y el AIA en la fase de multiplicación “in vitro “ de *Capraria biflora L*

Tratamiento	6-ABP	AIA	Altura (cm)	Nº Entrenudos	Nº Brotes	Coefficiente de multiplicación
1	0	0	2.3	1.1	0.9	1.6
2	0	0.5	2.5	0.8	1.07	1.39
3	0	1	2,4	0.5	0.4	0.42
4	0.5	0	2,6	1.3	1.3	2.7
5	0.5	0.5	1.8	0.2	0.4	0.29
6	0.5	1	2.2	2.1	2.1	5.55
7	1	0	2.3	1.3	1.5	3.1
8	1	0.5	2.7	2.3	2.0	6.81
9	1	1	2.1	1.2	1.1	2.11
10	1.5	0	2.2	2.2	1.3	4.05
11	1.5	0.5	2.2	1.5	1.4	3.26
12	1.5	1	2.3	1.9	2.1	5.4
13	2	0	2.2	2.4	1.2	4.1
14	2	0.5	2.1	1.8	1.6	4.27
15	2	1	1.8	1.3	1.8	3.43

Los resultados del análisis de regresión entre el coeficiente de multiplicación y el resto de los parámetros medidos confirman que el número de brotes de las plántulas es el indicador que más influye en el coeficiente de multiplicación ($R^2 = 88\%$) y en segundo lugar el número de entrenudos ($R^2 = 85\%$). La altura no influye en este caso.

La combinación de 1.0 mg/l de 6- BAP Y 0.5 mg/l de AIA resultó el mejor tratamiento empleado durante la multiplicación de *Capraria biflora L* pues se incrementa el coeficiente de multiplicación debido al aumento del número de brotes sin que la altura se viera afectada.

3.2.2.2 Enraizamiento “ in vitro “.

Durante el enraizamiento no se observó interacción entre los factores auxinas y concentración para ninguno de los parámetros evaluados. Además no existen diferencias entre las auxinas evaluadas.

La concentración de los reguladores del crecimiento sí influyó sobre el porcentaje de las plantas enraizadas, la altura de las plantas y el número de entrenudos. Resulta superior el comportamiento de las plantas tratadas con los reguladores del crecimiento a las plantas control. El número de raíces no mostró diferencias significativas pero si el tamaño de las mismas entre las concentraciones de reguladores de crecimiento añadidos por el medio de cultivo.

En la tabla aparece la influencia de los reguladores de crecimiento (AIA y AIB) en enraizamiento. Se observa que al añadir 0.5 mg/l de AIA y AIB se dispone de un 75 % de plantas enraizadas con buena calidad que se aprecia en la altura y el número de entrenudos.

Tabla # 11. Influencia de la concentración de los reguladores del crecimiento (AIA y AIB) en la fase de enraizamiento de la *Capraria biflora L.*

Concentración (mg/l)	Plantas enraizadas (%0)	Altura de la planta (cm)	Nº de Entrenudos	Tamaño raíz (cm)
Control	49.0	2.61	3.9	0.26
0.5	75.0	2.95	4.6	0.53
1.0	61.0	2.73	4.2	0.45
2.0	68.0	2.77	4.0	0.62

CONCLUSIONES

- La técnica analítica para la determinación de flavonoides totales en las hojas de la planta, es lineal, precisa y exacta, bajo las condiciones establecidas.
- El material vegetal cuenta con un 0.1 % de flavonoides totales calculados en base a quercetina.
- Se logró el establecimiento "in vitro " de *Capraria biflora L* a partir de yemas apicales y axilares siendo mas eficiente el proceso al emplear yemas apicales (0 % contaminación y 100 % brotación) .
- La mejor combinación de reguladores del crecimiento en la fase de multiplicación resultó ser 1.0 mg/l de 6-BAP más 0.5 mg/l de AIA al lograrse mayor número de brotes entrenudos así como el mayor coeficiente de multiplicación.
- Se favoreció el enraizamiento "in vitro " hasta un 75 % empleando AIA y AIB a 0.5 mg/l.

RECOMENDACIONES

- Continuar la micropropagación “in vitro” hasta la Fase 4 o de aclimatación.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Contenido del aceite esencial en el follaje de *Pirus caribaca monitel* en función de la edad del árbol. Rev. Cubana Farm. 2000;34(2):125-128.
- 2-Medicina natural y complementos de la dieta.(online).
- 3-Roig.Mesa, J.T; Diccionario Botánico de Nombres Vulgares Cubanos/J.T.Roig Mesa. III Edición. La Habana; Edición Científico-Técnica; T.2.1984.
- 4- Moráis, N.M.T; Nogueira, C.M.D; López, M.F.G; Vasconzuelos, N.M.S. y SA, M.I: Inorganic analytical study of medicinal plants. An Assoc. Bras Quim.. 44(4): 14-19,1999.
- 5- Roig Mesa J.T: Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba/J.T.Roig Mesa. III Edición. La Habana; Edición Científico- Técnica;T.2.1984.
- 6- Beschia, M; Leonie, A.; Oaencea, J.:Chem. Abst. 101 Pág 167005, 1984.
- 7- Fuentes V-R; Rodríguez M. Estudio en la medicina tradicional en Cuba I. Revista Plantas Medicinales. Vol. II, Pág 13, 1982.
- 8-. Matos, F. L.: Farmacias vivas. Editorial EUFC, Pág. 210 Fortaleza. 1994.
- 9-. Roig. Mesa, J. T; Diccionario Botánico de Nombres Vulgares Cubanos/ J.T. Roig Mesa. III Edición. La Habana; Edición Científico_Técnica; T. 2. 1984.
- 10- Hermano, A.: Flora de Cuba. Tomo IV.. Pág. 389 La Habana. 1957.
- 11-.Tejeda, Y. "Trabajo de Diploma: Evaluación farmacognóstica y botánica preliminar de la *Capraria biflora L*". Departamento de Farmacia. Facultad de Química. Universidad Central De las Villas. 1998.
- 12- Bases Científicas para la realización de algunas plantas medicinales cultivadas en Cuba. Autores: Dr. Israel Guadarrama Suárez, Marlene Hernández P. y Luis Mauricio Sosa V; 1997.
- 13-. Roig, J.T: Plantas Medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Juan Tomas Roig y Musa. Editorial Científico- Técnica. La Habana1974. Pág. 510-511.
14. Tejeda, Y: Evaluación fármacognóstica y botánica preliminar de la *Capraria Biflora*. Trabajo de Diploma. UCLV.1998
15. Nii y Reinoso, Evaluación del efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto acuoso de la *Capraria Biflora L* 1998.

16. Medinilla, M y Ramos, Arnaldo: Aislamiento y evaluación farmacológica de un crudo de flavonoides de *Capraria Biflora L.*, como posible responsable del efecto antiinflamatorio. Trabajo de Diploma. UCLV.2000.
- 17-. Colectivo de autores; Farmacología-Primer parte Pág 307-312, 1989.
18. Flores, J.: Farmacología humana. Ediciones Científico y Técnica, S.A Masson Salvat Medicina. Pág. 296. España 1994
- 20- Goodman and Gilman, A.; Goodman, L.S. y Gilman, A.: Los metales pesados y sus antagonistas. En Glima, A.: las bases farmacológicas de la terapéutica. Edición revolucionaria. Pág. 1574,1588. 1994.
- 21-. <http://umbujejira.cnip.org.br/db/pnechk/notes.shtml>
- 22-.Ideker, 1: *Capraria Mexicans* (Scraphulariaceae) endangered addition to the United States flora, Sida. 17(2);5231996.
- 23-. Matos, F.L: Farmacias vivas. Editorial EUFC, Pág.210 Fortaleza.1994.
24. Tejeda, Y. "Trabajo de Diploma: Evaluación farmacognóstica y botánica preliminar de la *Capraria biflora L*". Departamento de Farmacia. Facultad de Química. Universidad Central De las Villas. 1998
- 25- Beschia, M;Leonile,A;Oaencea, J:Chem. Abst. 101 Pág. 167005, 1984.
- 26-. Dwight O Collins y colobaradores "Nuevo esqueleto sesquiterpenoide capraroidales A-D, de la *Capraria biflora* y su actividad insecticida" J.Nat. Prod., 63, 1515-1518,2000.
- 27- Pérez L; Rodriguez, M.: Estandarización de la droga de *Rizophora mangle L* y del fitofármaco del Aceptan. Trabajo de diploma. UCLV.1994.
- 28- Pathak, D, et...al: Flavonoides as medicinal agent recent. Avances Fitoterapia.. Vol LXII, No. 5; Oag 371-378, 1991.
- 29-Fugaz de Dock, O;Investigación fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales. Asociados a publicaciones Educativas. Universidad católica de Perú 1998.
- 30- Cuellar Cuellar , Armando ,. Saponinas y sapogeninas esferoidales. En: Química de los fármacos naturales. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de la Habana. 1983:217-231.
- 31- Marcano, Deanna ; Haseqawa, Malasia. Triterpenos. Fitoquímica Orgánica. P233-274.

- 32-Peter R,Cheeke, Ph. D. Saponins: Suprising benefits of desert plants. URL diponible en : <http://lpi.oregonstate.edu/sp-su98/saponins.html>
- 33- Mulet Pascual, Luís. Principios tóxicos y síntomas de intoxicación. URL disponible en : <http://www.fitoterapia.net/vademécum/art.html>
- 34- Clarke, Mary. Sponins for Health. URL disponible en : <http://www.oznet.ksu.edu/dpfnut/timely/SAPONIN.HTM>
- 35- Bingham, Robert. Strengthen The Inmune System. Arthritis News TODAY Vol. 4,No.9.URL disponible en : http://www.saponins.com/the_inmune_system.cfm
- 36- Smith.R.H.1992.Plant tissue culture, techniques and experiments. Academic Press.p.170.
- 37-Cevallos, A. establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del cafeto(*Coffea spp.*), mediante el uso de marcadores morfológicos y moleculares. 2000. Tesis presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana. Cuba.
- 38- Pierik, R.L.M.1990.Inducción de callos. Cultivo de callos y regeneración de órganos y embriones . En : Cultivo “*in vitro*” de plantas superiores.- España: Ediciones Mundi-Prensa.pp.209-213.
- 39- Christiason, M.L y Warnik, D.A.1998.Órganogénesis “*in vitro*” as a developmental process. Hort Science 23(3): 515-519.
- 40- Gill,R.I.1996. In vitro exudation the phenol in Eucaliptus. Indian Forester. 120:6,504-509.
- 41- Azmi, A.1997.Bud regeneration from Eucalypyus globules clones and seedings through hormonl imbalances inuced by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science-Limerick. 127:81-90.
- 42- Dodds, J.H.y Roberts,I.W.1982. Experiments in plant Tissue Culture-Cambrige Uni. Press.
- 43-Sha Vlli Khan, P.S.1996.In vitro micropropagation o fan endemic fruit tree *Syzygium alternifolium* (wight) walp. Plant Cell reports. 16:325-328.
- 44-Ewald, D.1992.A system for repeatable formation of elongation adventitious buds in Norway spruce tissue culture. *Silvae genetica*.42: 4-5.
- 45-Maruyama, E. Konoshita, I. Katsuaki, I. Kihachiro, O. and Arika, S. 1996. Germplasm conservation of guazuma critina, a useful tree in the Peru-Amazon, by the

cryopreservation of "in vitro" cultured multiple bud clusters. *Plant cell, Tissue and organ Culture*. 48:161-165.

46- Chuanhan, J.M.S., Prabha-Bisht; Kapoor, M. L.; Rawat, M.S. Bischt, P. 1996 "in vitro" clonal propagation of Eucaliptus hybrid Fri-4 (e. tereticornis Sm. X E.Camaldulensis Dehn). *Annals of Forestry*. 4:2 186-191.

47- Wilson, J.P.1996. Multiplication rates in vitro and by stem cutting propagation and clonal development from Eucaliptus glovules seedling. *Forest Science*. 42:4 415-418.

48- Pelosi, A.;Lee, M.C.S. Chandler, S. F. y Hamil, J.D:1995. Hormonal control of root primordia differentiation and root formation in cultured explants of Eucaliptus glovules seedling. *Australian Journal of Plant Physiology*.22:3,409-415.

49- Kretzschmar, U.1994.vegetative propagation of 140 year old larix deciduas trees by different in vito techniques. *Journal Plant Cell physiol*.144:627-630.

50- Jenq Chuan,y., Jeng Der, C.;ZennZong,C,;Yang, J.C.Chung,J.D:and Cheng, Z.Z. 1994.Vegetative propagation of adult Eucaliptus grandis x E.urophylla, comparison of growth between micropropagated plantlets and root cuttings. *Plant cell Report* 15:3-4, 170-173.

51- Warrag, E.i.1990. micropropagation of field tested superior Eucaliptus grandis hybrids. *New Forest*. 4 : 67-79.

52- Jambhale, N.D.y Patil, S.C. 1996. micropropagation of elite Eucaliptos types through shoot tip cultura. *Indian Forester*. 122:161-64.

53- Nadgauda, R.S.; Nagaewala, N.N.;Parasharami, V.A.and mascarenhas, A.F.1993.Bud break and shoot formation from tissue of mature trees of Pinus carisbaea and Pinus Kesiya. "in vitro" *Cell dev. Biol*.29:131-134.

54- Rasmussen, G. 1991. Micropropagation of E, niyens and hybrid clones. *Proceedings 11th RW61(forest Genetics) Meeting, Coonawarra SA*.

55- Tsai- Chung, J.1992. Multiple shoot induction from eight-year-old trees of Eucalipytus saligna. *Quarterly- journal of the Experimental Forest of National Taiwan University*. 6(39): 29-36.

55- Garcia, L. y J . Noa. 1998. Obtención de plantas libres de patógenos. En : *Propagación y mejora de plantas por Biotecnologías*. Pérez, J.(Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas . Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. P. 135-149.

- 56- Alvarado , y M . 1998. Contaminación microbiana en el cultivo de plantas. En Pérez J. (Ed) Propagación y mejora de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. P 81-104.
- 57- Roca, M.W.1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones/ William M. Roca, L.A.Mroginski. (Cali): CIAT, p.970.
- 58- Pérez , J.;Suárez y P. Orellana. 2000. posibilidades y potencial de la micropropagación masiva de plantas en Cuba . biotecnología Vegetal . 1:3-12.
- 59-González, N y Fernández.M 'Trabajo de Diploma: Estudio fitoquímico de las hojas de la *Capraria biflora L* '. como droga antiinflamatoria. 2001.
- 60- Kostennikova, Z.A.UV Espectrophotometric quantitative determination of flavonoid in Calendula tincture Farmatsiya 6(86), 1984.
- 61- Lastra, H. Tintura de Caléndula: determinación del contenido de flavonoides totales. CIDEM;1996.
- 62- Pierik, R.L.M(1995) In: Micropropagation. Debergh, P.C.and Zimmerman, R,H,(Eds), pp.155-165.
- 63- Jiménez, E.Micropropagation. Etapas. Ventajas y limitaciones. Curso Internacional de Propagación "in vitro" de especies vegetales. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, 1999 pp 10-22.
- 64- Castro, M. et al : Validación de métodos analíticos. Asociación española de farmacéuticos de la industria; p. 4-55, Barcelona 1989.
- 65- Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento "in vitro" de Psidium. Guajava Rev. Fac. Agrom. 16:243-255. .Ramirez et al, 1999.
- 66- Delgado, L.A.F.2000.Micropropagación de Eucalyptus spp. "in vitro" en medio de cultivo líquido o sólido. Tesis de Maestría. Piracicaba. Sao Paulo. Brasil.
- 67-Miguel. Y Tryjillo,R;Daquinta,M;Concepción, Oy Nápoles L. 2001. Micro propagación de Dieffenbachia picta. Biología Vegetal 1: 49-55.
- 68- Machado, P. 2001. Propagación "in vitro" de Gerbera jamesonis, Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas, UCLV

Figura 1. Diagrama de flujo para el patrón.

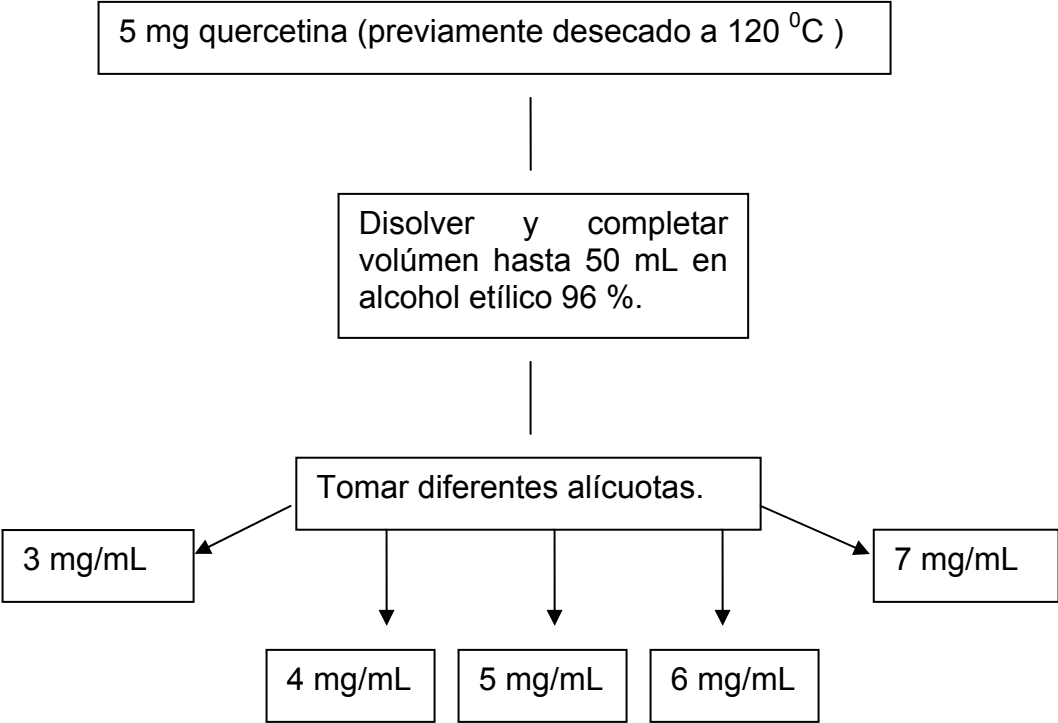


Figura 2. Diagrama de flujo para la obtención del crudo de flavonoides.

