

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“Producción de oxi-indolalcaloides de *Uncaria tomentosa in vitro*
y estudio del efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer”**

Código: 5410-1510-9701

COORDINADORA

MSc. Silvana Alvarenga Venutolo salvarenga@itcr.ac.cr

OTROS INVESTIGADORES

Licda. Tatiana Salazar Aguilar tatiana.salazar@itcr.ac.cr

MSc. Catalina Rosales López crosales@itcr.ac.cr

CARTAGO, 2015

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
Resumen	iii
1. Introducción	5
2. Objetivos.....	7
3. Revisión de Literatura	7
3.1 Generalidades <i>Uncaria tomentosa</i>	8
3.1. Género <i>Uncaria</i>	8
3.2. Distribución y taxonomía de <i>Uncaria tomentosa</i>	8
3.3. Usos medicinales.....	10
3.4. Cultivo in vitro de <i>Uncaria tomentosa</i>	11
3.5. Producción de metabolitos.....	11
4. Metodología.....	13
4.1. Inducción de la producción de oxi-indol alcaloides en vitro plantas.....	13
4.2. Uso de elicitores en células en suspensión.....	14
4.3. Determinación por HPLC de la concentración de oxi-indol alcaloides	15
4.4. Evaluación del crecimiento de biomasa, en suspensión de <i>U. tomentosa</i>	16
4.5. Evaluación de la actividad citotóxica en líneas celulares cancerígenas.....	16
5. Resultados y discusión	18
5.1. Inducción de oxi-indol alcaloides en vitro plantas	18
5.2. Inducción de oxi-indol alcaloides en células en suspensión.....	24
5.3. Cálculo de la concentración de oxi-indol alcaloides. Error! Bookmark not defined.	
5.4. Evaluación del crecimiento de biomasa en células en suspensión de <i>U. tomentosa</i>	27
5.5. Evaluación de la actividad citotóxica.....	25
6. Conclusiones	28
7. Recomendaciones	28
8. Bibliografía.....	29
9. Anexos	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar la producción de alcaloides totales en plantas <i>in vitro</i> de <i>U. tomentosa</i> utilizando tres elicitores y 3 concentraciones de sacarosa.....	13
Cuadro 2. Tratamientos de elicitación para suspensiones celulares de <i>U. tomentosa</i>	14
Cuadro 3. Longitud (cm), Peso fresco (g) y concentración de alcaloides en plantas <i>in vitro</i> de <i>Uncaria tomentosa</i> en tratamientos de elicitación.	18
Cuadro 4. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en tratamientos de elicitación en plantas <i>in vitro</i> de <i>U. tomentosa</i>	20
Cuadro 5. Concentración de alcaloides totales (mg / g) en suspensiones de <i>U. tomentosa</i> .	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Foto de un tratamiento al cabo de 10 días de montado el ensayo.....	14
Figura 2. Vitro planta después de 15 días de tratamiento	18
Figura 3. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en tratamientos de elicitación en plantas <i>in vitro</i> de <i>U. tomentosa</i>	18
Figura 4. Porcentajes de alcaloides totales (mg/g) en tratamientos de elicitación en plantas <i>in vitro</i> de <i>U. tomentosa</i>	22
Figura 5. Concentración de alcaloides totales (mg / g) en suspensiones de <i>U. tomentosa</i> . Error! Bookmark not defined.	

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Datos para la curva de calibración de Uncarina D.	34
Anexo 2. Curva de calibración de Uncarina D.....	34
Anexo 3. Datos para la curva de calibración de Mitrafilina.	34
Anexo 4. Curva de calibración de Mitrafilina.	34
Anexo 5. Datos para la curva de calibración de Uncarina C.	34
Anexo 6. Curva de calibración de Uncarina C.....	35
Anexo 7. Datos para la curva de calibración de Uncarina E.....	35
Anexo 8. Curva de calibración de Uncarina E.....	35
Anexo 9. Datos para la curva de calibración de Isorinchofilina.....	35
Anexo 10. Curva de calibración de Mitrafilina.	36
Anexo 11. Datos para la curva de calibración de Uncarina C.....	36
Anexo 12. Curva de calibración de Isomitrafilina.....	36
Anexo 13. Masa utilizada (mg/g) en plantas <i>in vitro</i> elicidadas	36
Anexo 14. Masa utilizada (mg/g) en suspensiones celulares elicidadas.....	37
Anexo 15. Áreas bajo la curva obtenidas en el HPLC a muestras de plantas <i>in vitro</i>	37
Anexo 16. Áreas bajo la curva obtenidas en el HPLC de suspensiones celulares.	37
Anexo 15. Cálculo de la concentración de Uncarina D.....	38
Anexo 16. Cálculo de la concentración de Mitrafilina.	39
Anexo 17. Cálculo de la concentración de Isomitrafilina.	40
Anexo 18. Cálculo de la concentración de Uncarina C.....	41
Anexo 19. Cálculo de la concentración de Isorrinchofilina.	41
Anexo 20. Cálculo de la concentración de Uncarina E.....	42
Anexo 21. Concentración de alcaloides (mg/g) en plantas <i>in vitro</i> elicidadas.....	43
Anexo 22. Concentración de alcaloides (mg/g) en plantas <i>in vitro</i> elicidadas.....	43
Anexo 23. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en plantas <i>in vitro</i> en diferentes tratamientos de elicitación.....	44
Anexo 24. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en plantas <i>in vitro</i> en diferentes tratamientos de elicitación.....	44
Anexo 25. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en suspensiones celulares de <i>U. tomentosa</i> en diferentes tratamientos de elicitación.	45

RESUMEN

Uncaria tomentosa (Willd.) D.C (Uña de Gato), es una planta de la familia Rubiaceae, se caracteriza por la producción de diferentes metabolitos secundarios de interés farmacológico e industrial. Los oxi-indol alcaloides presentan efectos inmuno modulatorios y citotóxicos en líneas celulares de cáncer. Por ser compuestos de difícil síntesis química, el cultivo de células es una alternativa biotecnológica para la producción de los oxi-indol alcaloides.

En esta investigación se evaluó el efecto de diferentes elicitores (sacarosa, pectina, extracto de levadura y ácido jasmónico) en la producción de los oxi-indolalcaloides en células en suspensión y en plantas *in vitro*, además, se determinó el índice de citotoxicidad del extracto de *U. tomentosa* en líneas celulares cancerígenas de carcinoma pulmonar (H460) y adenocarcinoma de mama (MCF-7).

Entre los resultados se puede mencionar que tanto en las plantas elicidadas como en las suspensiones celulares elicidadas, se logró cuantificar una producción de alcaloides oxi indólicos. Siendo la mayor concentración *in vitro* plantas de 6,4 mg/g de alcaloides totales, utilizando ácido jasmónico y en suspensiones de 0,277mg/g en 15 días, utilizando como elicitador al extracto de levadura a 5000mg/L.

El análisis citotóxico realizado al extracto de *U.tomentosa*, ninguno de las concentraciones probadas reporta una disminución en la viabilidad de las células cancerosas.

La técnica de cultivo *in vitro* de plantas para obtener los oxi indol alcaloides de interés farmacológico se perfila como una herramienta útil y válida a la luz de los resultados obtenidos en este ensayo.

El cultivo de células en suspensión mostró una baja producción de los oxiindol alcaloides, a nivel de compuestos traza, por lo que resultaron sistemas menos efectivos que la *in vitro* plantas.

Palabras clave: Biorreactor, cultivo de células vegetales, *Uncaria tomentosa*, escalamiento, elicitores. citotoxicidad, cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

Uncaria tomentosa es una liana del bosque tropical lluvioso, que se distribuye en forma natural desde Perú hasta Guatemala. En Costa Rica crece en la Zona Atlántica (Alvarenga *et al.*; 2008). Sus propiedades medicinales forman parte del acervo de la medicina tradicional de etnias peruanas (Obregón, 1997).

La actividad biológica de esta especie es reconocida por los efectos de los alcaloides oxiindólicos que produce. Existe respaldo científico, que demuestra que los alcaloides pentacíclicos tienen una acción inmuno estimulante, documentado en pacientes con cáncer y SIDA. Adicionalmente, se conocen sus propiedades como anti inflamatorio y contraceptivo, usándose también para el tratamiento de la artritis y la gastritis (Aquino *et al.* 1991; Obregón, 1997; Kleplinger *et al.*; 1999; Pero, 2010). Debido a la cantidad de reportes científicos, patentes y productos existentes en el mercado, el extracto de *U. tomentosa* se clasifica como un fitofármaco.

Actualmente existen en el mercado gran cantidad de productos naturales a base *U. tomentosa*, sin embargo, la mayoría no especifican el contenido de alcaloides de la formulación, solamente hacen referencia al contenido de material vegetal, por lo tanto, no son estandarizados. Solamente existe el producto AC-11(C-Med100), que cuenta con varias patentes y diversas publicaciones que respaldan el efecto citotóxico de este producto vendido como fitofármaco (Alvarenga *et al.*; 2012).

En el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), se ha realizado investigación en esta especie durante más de 15 años. Por lo que se dispone de la caracterización genética, la domesticación de la especie en zonas de Guápiles, el establecimiento y la propagación *in vitro*, así como la obtención de suspensiones celulares en matraz y en biorreactor (Tanque Agitado). En forma paralela a este proyecto, se efectuó el proyecto comercial CB-025-09, en el CENIBiot, en el que se desarrolló el protocolo de obtención de un extracto acuoso de hojas de *Uncaria tomentosa* (Uña de gato) con concentración conocida de alcaloides oxiindólicos para su uso como producto final de origen natural y como materia prima de otros derivados (Alvarenga *et al.*; 2012). Adicionalmente, se identificaron y la cuantificaron, con el empleo de cromatografía de alta resolución (HPLC), 6 oxindol alcaloides en diferentes órganos de la planta: hojas tiernas, hojas maduras, corteza de tallo y corteza de raíz, en plantas localizadas en tres fincas de productores de la zona Atlántica en dos épocas del año. Se determinó que el germoplasma analizado se clasifica como quimiotipo pentacíclico presentando un mayor contenido de alcaloides de este tipo, reportados como de mayor efecto terapéutico como anti tumoral y desinflamatorio (Reinhard, 1999; Heitzman *et al.* 2005; García Giménez *et al.*; 2010). En tanto que los oxindol alcaloides tetracíclicos como la rincofilina y la isorrincofilina, han mostrado un efecto protector en isquemias cerebrales (Zhou y Zhou, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes elicitores en la producción de oxi-indol alcaloides de células en suspensión y en *vitro* plantas, determinación de la actividad citotóxica de un extracto de *U. tomentosa* en dos líneas celulares de cáncer.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Inducción de la producción de cuatro oxi-indol alcaloides en ***vitro plantas*** de *U. tomentosa* con diferentes elicitores

2.2.2. Inducción de la producción de cuatro oxi-indol alcaloides en células en suspensión de *U. tomentosa* cultivadas en biorreactor con diferentes elicitores

2.2.3. Determinación por HPLC de la concentración de oxi-indol alcaloides producidos en *vitro* plantas y en células en suspensión de *U. tomentosa* utilizando diferentes elicitores.

2.2.4. Evaluación el crecimiento de biomasa, de los tratamientos que produjeron la mayor concentración de oxi-indol alcaloides: en células en suspensión de *U. tomentosa* (considerando el pH y la concentración de sacarosa) y en *vitro plantas* (considerando longitud de la planta, y características cualitativas).

2.2.5. Evaluación de la actividad citotóxica de un extracto de *U. tomentosa* en tres líneas celulares: carcinoma pulmonar (H460), adenocarcinoma de mama (MCF-7) y como control fibroblastos sanos para la determinación del índice de citotoxicidad del extracto.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades de *Uncaria tomentosa*.

Uncaria tomentosa (Willd.) D.C, conocida como Uña de Gato, rangayo o bejuco de agua, pertenece a la Familia Rubiaceae. Esta familia se caracteriza por la producción de diferentes metabolitos secundarios. La corteza de la raíz de uña de gato fue usada en la medicina tradicional de Perú por los indígenas Asháninca y otras etnias por su efecto antiinflamatorio y contraceptivo (Kleplinger *et al.*; 1999). Actualmente se usa para el tratamiento de la artritis, gastritis y el cáncer (Aquino *et al.* 1991; Obregón, 1997; Pero, 2010). El interés científico de esta planta se incrementó con la comprobación de propiedades bioestimulantes del sistema inmunológico así como antitumorales atribuidas a la presencia de oxindol alcaloides (Blumenthal, 1995; Pero, 2010; Luna-Palencia *et al.*; 2012).

3.2. Género *Uncaria*.

El género *Uncaria* es fácilmente reconocible, ya que todas las especies que lo componen tienen un hábito trepador y pedúnculos reducidos a ganchos curvados. Existen al menos unas 34 especies pertenecientes al género *Uncaria*, distribuidas en América, África y Asia. Una de las especies más estudiadas es *Uncaria tomentosa*, principalmente por su actividad metabólica y sus aplicaciones medicinales comprobadas, tanto de manera tradicional como científicamente (Laus, 2004; Pero, 2010).

3.3. Distribución y taxonomía de *Uncaria tomentosa*.

U. tomentosa, conocida comúnmente como uña de gato o bejuco de agua, es una liana leñosa originaria de América del Sur, específicamente de Colombia y Perú. Se extiende por la Amazonía Brasileña, Ecuador, Bolivia y por la región Atlántica de los países que integran América Central (Zevallos y Tomazello, 2006; Alvarenga *et al.*, 2008).

La uña de gato crece, por lo general, en bosques primarios, la mayoría de ellos ubicados en la zona tropical húmeda entre los 150 y los 800 msnm (González, 2006).

En Costa Rica, Morales (2006) reporta su ubicación en toda la vertiente caribeña y en la zona norte, en elevaciones de 0 a 700 msnm, en las áreas de conservación Huetar Norte, Amistad Caribe, Cordillera Volcánica Central y Tortuguero.

La taxonomía de la uña de gato según Cronquist (1981) se presenta a continuación:

- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Asteridae
- Orden: Rubiales
- Familia: *Rubiaceae*

- Género: *Uncaria* Schreb
- Especie: *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roemer & Schultes) DC.

Desde hace más de tres décadas, existe una gran demanda comercial de los extractos de *U. tomentosa*, originada por los descubrimientos de la actividad biológica de la planta e incrementada por su acción inmunoestimulante (Obregón, 1997; Pero, 2010). Los productos derivados de la uña de gato se comercializan en más de 30 países fuera de Perú, en diferentes presentaciones como té, tabletas o cápsulas (De Jong *et al.*; 1999). En los últimos años ha salido al mercado productos como el AC-11® y el C-Med 100®, extractos acuosos de *U. tomentosa* que contienen una concentración estandarizada de los compuestos bioactivos. La efectividad de estos productos ha sido respaldada con documentación científica, trabajo con pacientes, además de un gran número de patentes (Pero, 2010).

Además, numerosos estudios han demostrado que los extractos acuosos de esta planta, a diferentes concentraciones, tienen un efecto anticancerígeno en otras líneas celulares como MCF7 (Adenocarcinoma de mama), HT29 (carcinoma de colon humano), WEHI (fibrosarcoma en ratones), 164 B16/BL6 (melanoma), entre otras más (Pero, 2010; García Jiménez *et al.*; 2010). Investigaciones recientes han revelado que los oxindol alcaloides penta cíclicos monoterpénoides (MOA) tienen efecto inmuno modulador, con actividad anti VIH, anti leucémico con efectos citotóxicos promisorios para tratar varios tipos de cáncer, el empleo de extracto mostró efecto de incremento de la presencia de ADN “reparador” (Pero, 2010). Por ser compuestos de difícil síntesis química, el cultivo de células es una alternativa biotecnológica para la producción de dichos metabolitos (Trejo-Tapia *et al.*; 2005).

En el país existe una cadena industrial que involucra a agricultores, colectores, comerciantes y fabricantes los cuales extraen el material vegetal del ecosistema de bosque la fuerte demanda comercial internacional de esta especie podría incrementar las tasas de extracción del recurso en los países en que se distribuye en forma natural.

La micropropagación se perfila como una opción viable de explotación para la producción de compuestos activos, sin que involucre la extracción del germoplasma de su hábitat natural que además garantiza la producción de alcaloides en sistemas controlados a partir de material homogéneo (Luna-Palencia *et al.*; 2012)

Existe un gran potencial para el uso de cultivo de células vegetales en la producción de compuestos novedosos de uso farmacéutico que no se puede producir a partir de plantas completas o intactas con una adecuada eficiencia debido a que la producción por métodos convencionales (síntesis química o extracción a partir de las plantas) resulta difícil o poco viable económicamente (George, 2008). Adicionalmente las posibilidades de modificación genética ofrecen grandes perspectivas para la explotación de la capacidad de biosíntesis de las células vegetales y de las plantas (Verpoorter *et al.*; 2006).

Las plantas producen metabolitos secundarios, que son compuestos orgánicos que si bien, no son imprescindibles para la vida como los metabolitos primarios, juegan un importante rol en la interacción con otros organismos como los polinizadores y los patógenos (Verpoorter *et al.*; 2006). En muchas taxas de plantas, como en *U. tomentosa*, cuando se exponen a ataques de herbívoros, patógenos o metales pesados, se induce la producción de metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios sintetizados por plantas pertenecientes al género *Uncaria* han sido estudiados a partir de todas las especies conocidas, y se han podido identificar terpenoides, flavonoides y cerca de 40 alcaloides diferentes, la mayoría, correspondientes a tipos oxindólicos (Phillipson *et al.*, citado por Laus, 2004). La especie más conocida de este género por sus propiedades medicinales es *U. tomentosa*.

Trejo-Tapia y colaboradores (2005) en cultivos de células de *U. tomentosa* en suspensión obtuvieron un incremento de 10 veces de la concentración de compuestos mono terpenoides oxindol alcaloides pentacíclicos (MOA), cuando se aumentó la agitación a 400rpm en las células en el biorreactor tipo tanque agitado. Posteriormente, se evaluó el estrés hidrodinámico y la adición de oxígeno en la producción de oxindolalcaloides. Se determinó que la producción de MOA está relacionado con la presencia de H₂O₂ (Trejo-Tapia, 2007). En el 2009 se realizó otro trabajo en el que se estudió el efecto oxidativo en la acumulación de MOA en cultivos celulares y de raíces de *U. tomentosa* por la adición de H₂O₂ como un elicitador y se comparó con el estrés hidrodinámico. La producción de MOA fue mayor cuando se indujo estrés hidrodinámico en biorreactor, que con la adición de H₂O₂ exógeno, esta también fue mayor en biorreactor que en erlenmeyer (Huerta-Heredia, 2009).

3.4. Usos medicinales.

Uncaria tomentosa (Willd.) D.C, se caracteriza por la producción de metabolitos secundarios como taninos, esteroides y triterpenos (polihidroxilados y heterósidos del ácido quinóico). Como principio activo se consideran más de un 0,9% de alcaloides indólicos: oxindoles tetracíclicos (rinchofilina, isorinchofilina) y pentacíclicos (mitrafilina, isomitrafilina, isopteropodina, pteropodina, uncarinas (Carretero, 2001). Estos alcaloides ejercen su efecto principalmente en el sistema inmune, poseen propiedades inmunoestimulantes, antimutagénicas, citostática, antivirales, antiinflamatoria y antirradicalaria. (Falkiewicz *et al.*, 2001).

Varios oxindol alcaloides, aislados de la corteza de la raíz de *U. tomentosa* fueron investigados por su efecto antiproliferativo sobre las células HL60 y K-563, donde la Uncarina F mostró la mayor actividad, lo que sugiere que este compuesto puede ser usado en el tratamiento contra la leucemia aguda, en las líneas celulares (Stuppner *et al.*; 1993; Pero, 2010) ya que aumenta la actividad de fagocitos en el sistema retículo-endotelial (Pero, 2010). Además del efecto citotóxico sobre leucemia, numerosos estudios *in vitro* han demostrado que extractos de esta planta, a diferentes concentraciones, tienen un efecto anticancerígeno en otras líneas celulares como A549 (cáncer de pulmón), HT29 (carcinoma de colon humano), cáncer de mama (MCF7), HEp 2 (carcinoma cervical) entre otras, en donde se observa la disminución de sobrevivencia celular y el incremento de células apoptóticas después de un período de exposición al extracto (Pero, 2010; Pilarski *et al.*, 2010). Otros estudios *in vivo* muestran que ratones inducidos a desarrollar carcinoma pulmonar, después de 21 días de administración de bajas dosis de extractos de corteza de *U. tomentosa*, se inhibió significativamente el crecimiento tumoral (Pilarski *et al.*, 2010).

A nivel del sistema inmune, el efecto inflamatorio se da principalmente por evitar la activación de NF-κB. Los extractos de UT han demostrado inhibir la expresión del gen "lipopolysaccharide-

induced inducible Nitric Oxide synthase', a su vez la activación del factor de transcripción NF-kB así como la síntesis del TNF-a (Aguilar *et al.*, 2002). '.

Extractos del fármaco exhiben actividad citostática en tumores humanos, algunos estudios evidencian un efecto inhibitorio en la proliferación celular anormal debido a una acción directa sobre la ADNpolimerasa (López, 2006). Como resultado del daño ocasionado al ADN, se puede dar la activación de vías de transducción de señales y la activación del gen p53, el cual ocasiona la detención del ciclo celular. Es así como el control del ciclo celular aumenta el tiempo disponible para la reparación del ADN antes de la replicación y la mutación (Pero, 2010). Con la reparación del ADN se reduce el daño del ADN y se estimula la respuesta inmune, bloqueando así la transducción de señal. De esta manera se da lugar a la inducción de la apoptosis y la diferenciación, previniendo así el desarrollo de cáncer invasivo (Pero, 2010).

3.5. Cultivo *in vitro* de *Uncaria tomentosa*.

El uso del cultivo *in vitro* en esta especie es relevante debido a que, en la industria se emplea principalmente su corteza, la cual es pulverizada o procesada para la elaboración de productos medicinales comerciales. Tomando en cuenta que en la Amazonia se presenta un promedio de cinco especímenes por hectárea, y que únicamente se puede emplear la corteza después de que la planta alcanza los ocho años de edad, se hace necesario implementar métodos para una multiplicación masiva de las plantas o bien, que permitan la extracción de los compuestos de interés (Luna *et al.*, 2005).

En cuanto a los avances del cultivo *in vitro* en uña de gato, se han desarrollado diversos protocolos, principalmente con el objetivo de multiplicación del material, conservación e investigación y análisis de los principios activos de la planta.

Alvarenga (2010) reporta protocolos de desinfección de frutos y estacas para la introducción *in vitro* de *U. tomentosa* y de multiplicación del material *in vitro* empleando medio semisólido y sistemas de inmersión temporal, así como protocolos de enraizamiento y aclimatación de la vitroplantas. Adicionalmente, se desarrolló el protocolo de cultivo de células en suspensión (Sánchez-Calvo y Alvarenga-Venutolo, 2015),

De igual manera, se han obtenidos plántulas *in vitro* a partir de la introducción de semillas, y por medio de embriogénesis somática en hojas. Una vez establecidas las plantas, han sido multiplicadas por medio de microestacas y aclimatadas con éxito en invernadero (Domínguez y Tapia, 2000; Alvarenga, 2010).

3.6. Producción de metabolitos

Existe un gran potencial para el uso de cultivo de células vegetales en la producción de compuestos novedosos de uso farmacéutico que no se puede producir a partir de plantas completas o intactas con una adecuada eficiencia debido a que la producción por métodos convencionales (síntesis química o extracción a partir de las plantas) resulta difícil o poco viable económicamente (Robert *et al.*; 1991). Adicionalmente las posibilidades de modificación genética

ofrecen grandes perspectivas para la explotación de la capacidad de biosíntesis de las células vegetales y de las plantas (Verpoorter *et al.*; 2006).

Las plantas naturalmente producen metabolitos secundarios cuando se exponen a ataques de herbívoros, patógenos o metales pesados. Cuando se adiciona una sustancia que simule este ataque se habla de un “elicitor”. La utilización de elicitores es una de las posibilidades de incrementar la producción de los metabolitos secundarios. Flores-Sánchez y colaboradores en 2002 evaluaron diferentes tratamientos de elicitación sobre la producción de los ácidos triterpenos, ellos utilizaron *Pestalotia sp.*, *Trichoderma sp.*, *Alternaria tenuis*, *Epicoccum nigrum* y Pectina. Este último fue el que produjo mayor incremento en la producción de ácidos triterpenos en comparación al control. Otra de las posibilidades de aumentar la producción de los metabolitos es la utilización de los precursores de la ruta biosintética. Se evaluó el efecto de los elicitores pectina y extracto de levadura y dos precursores como lo son el ácido jasmónico y la adición de azúcar sobre la producción de ácidos triterpenoides. Se reportó el ácido jasmónico como el más eficiente en la producción de los ácidos triterpenoides (Feria-Romero *et al.*, 2005).

El cultivo de células de *U. tomentosa*, en biorreactor, tipo tanque agitado con el empleo de agitación mecánica reportó la acumulación de 5 a 10 veces mayor de MOA, respecto a células en suspensión cultivadas en erlenmeyer, por lo que se infirió que la producción de MOA podría estar relacionado con el estrés producido por la agitación (Trejo-Tapia *et al.*, 2005). Posteriormente, se evaluó el estrés hidrodinámico en combinación con un 85% de DOT, que indujo la producción de H₂O₂ endógeno y finalmente la síntesis de oxi-indol alcaloides, la producción de MOA se relacionó con la presencia de H₂O₂ (Trejo-Tapia, 2007).

Por otra parte, se estudió el estrés oxidativo en la acumulación de MOA en cultivos celulares y en raíces de *U. tomentosa*. La adición de H₂O₂ como elicitor se comparó con el estrés hidrodinámico. La producción de MOA fue mayor cuando se indujo estrés hidrodinámico en biorreactor que al adicionar H₂O₂ exógeno (Huerta-Heredia, 2009).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de diferentes elicitores en la producción de oxi-indol alcaloides de células en suspensión y en *vitro* plantas, además se determinó la actividad citotóxica de un extracto de *U. tomentosa* en dos líneas celulares de cáncer.

4. METODOLOGÍA

4.1. Inducción de la producción de oxi-indol alcaloides en *vitro* plantas.

Material vegetal

Se utilizaron plantas *in vitro* mantenidas en cultivo en el CIB, en medio de cultivo con sales y vitaminas M & S (1962), suplementado con 1 mg/l de Ácido giberélico (AG₃), 1mg/l Pantotenato de Calcio (PaCa), 30 g/l de sacarosa y un pH de 5,7. Se incubaron en el cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas a 2000 lux y una temperatura de 25±2°C.

Medios de cultivo

Se evaluaron 12 tratamientos (Cuadro 1) con tres concentraciones de sacarosa a 20, 30 y 50 g/l y cuatro elicitors. En el caso de la pectina cítrica (Sigma ®) se adicionaron 2 ml de solución (2% m/v) a un pH de 4.6 previamente estéril. Se agregaron 4 g/L de extracto de levadura, en tanto que el ácido jasmónico (0,1 ml) se empleó a una concentración de 50 mM diluidos en etanol (Feria-Romero *et al.*, 2005).

Las *vitro* plantas seleccionadas fueron de 1 a 1,5 cm de longitud con un ciclo de cultivo. Se realizaron 9 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar la producción de alcaloides totales en plantas *in vitro* de *U. tomentosa* utilizando tres elicitors y tres oncentraciones de sacarosa.

TRATAMIENTO	ELICITOR
T1, T2, T3	Sacarosa + control
T4,T5,T6	Sacarosa + pectina 2% p/v
T7,T8,T9	Sacarosa + extracto de levadura 4g/L
T10,T11,T12	Sacarosa + ácido jasmónico 50mM

Las pruebas se montaron en tubos de vidrio con 9ml de medio de cultivo de los diferentes tratamientos descritos en el Cuadro 1. En la cámara de flujo laminar, a cada tubo se le introdujo un “puente” de papel filtro cortado de forma tal que se ajustó dentro del tubo, la parte inferior del papel estuvo en contacto con el medio de cultivo y en la parte superior, se desarrolló la *vitro* planta. (Figura 1).

Los ensayos fueron montados por 15 días, bajo las mismas condiciones de cultivo descritas antes. Se incubaron en el cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas a 2000 lux y una temperatura de 25±2°C.



Figura 1. Establecimiento del cultivo de vitroplantas de *U. tomentosa* en medio líquido, a 10 días de iniciado el ensayo.

4.2. Inducción de la producción de oxi-indol alcaloides en células en suspensión de *U. tomentosa*

Se utilizaron suspensiones celulares de *U. tomentosa* (Uña de gato) mantenidas en erlenmeyers de 250 ml con 50 ml del Medio Gamborg B5 (1968), suplementado con 30 g/l de sacarosa, 2 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de AIB y pH de 6,2 antes de esterilizar. Las condiciones de cultivo en las que se mantuvieron estas suspensiones fueron: agitación 90 rpm, iluminación constante ($150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) y a una temperatura de 25 ± 2 °C.

Se tomaron células en la fase exponencial en el día nueve, se les cambió el medio de cultivo por un medio conteniendo el elicitor, según los tratamientos probados (Cuadro 2). Se tomaron muestras al día cero, cuatro, once y quince.

Cuadro 2. Tratamientos de elicitación en suspensiones celulares de *U. tomentosa*.

TRATAMIENTO	ELICITOR
T1	Extracto de levadura a 500mg/L
T2	Extracto de levadura a 5000mg/L
T3	Pectina 100mg/L
T4	Ácido jasmónico 200μM

4.3. Determinación por HPLC de la concentración de oxi-indol alcaloides en *vitro* plantas y suspensiones celulares elicidadas

Las nueve plantas de cada tratamiento, se pesaron y midieron por separado. Se pusieron en la estufa a 60°C por 24h. Se molieron juntas. Los materiales secos y molidos, obtenidos de los doce tratamientos se enviaron a laboratorios LAFIT de la Universidad Nacional para la cuantificación de alcaloides oxi-indólicos.

Se siguió el método descrito por Bertol y colaboradores (2012), el cual fue previamente optimizado y validado. Además, el análisis de las muestras por esta metodología se realizó por triplicado. El procedimiento se detalla a continuación:

Equipos

- Cromatógrafo líquido Perkin Elmer Series 200 provisto de un detector de UV de diodos en serie (DAD, LC200D).
- Baño ultrasónico

Reactivos

- Agua Milli Q.
- Acetonitrilo grado HPLC.
- Buffer 35mM de acetato de trietilamina pH 6,9 (a 950 mL de agua Milli Q se le agregan 2mL de ácido acético (0,2% m/v), se ajusta el pH a 6,9 con trietilamina (aprox 4,6 mL) y luego se afora a 1L con agua Milli Q)
- Cartuchos para extracción fase sólida Bond Elut C18 (500mg) de Agilent o similar.
- Etanol grado HPLC.
- Metanol grado HPLC.
- Kit estándares Uncaria tomentosa (isomitrafilina, mitrafilina, uncarina C, uncarina E) marca Chromadex 00003324-0HK, pureza >99%.
- Estándar de uncarina D marca Chromadex ASB-00021230-005, pureza >99%.
- Estándar de isorhynchofilina marca Chromadex ASB-00019384-010, pureza >99%.

Preparación de estándares y curvas de calibración

Los estándares del kit alcaloides se disolvieron en un balón aforado de 25mL con etanol para obtener una disolución madre de 400µg/mL de cada estándar. La curva de calibración, se preparó a partir de una disolución de concentración intermedia constituida por todos los alcaloides. Esta curva estuvo compuesta por 6 niveles de concentración (0,3-15µg/mL).

Tratamiento de muestra

0,2 g de material vegetal seco y molido (tamaño de partícula 125-180µm) en un tubo cónico de 15mL para centrifuga, se sometieron a un proceso de extracción utilizando etanol 60%v/v y baño ultrasónico durante 20 minutos (~30°C). El proceso de extracción se realizó con renovación del disolvente (tres extracciones sucesivas) para un volumen total de 10 mL.

La muestra extraída se hizo pasar a través de un cartucho de extracción en fase sólida C18 (SPE), previamente acondicionado con 3mL de metanol y 5mL de agua Milli Q. El cartucho se lavó con dos volúmenes de 1,5mL de etanol 60%v/v y una porción de la muestra de 1 mL se hizo pasar a través de un filtro de nylon de 0,45µm y se colocó en un vial de 2mL color ámbar.

A las muestras procedentes de biorreactor se les aplicó el mismo procedimiento descrito anteriormente. Únicamente se modificó la cantidad de material de partida, que en este caso fue de 1 g de muestra de biorreactor.

Condiciones cromatográficas

Columna	C18 150mm x 4.6mm, 3,5um (Gemini NX C18 de Phenomenex)
Fase móvil	A: Buffer 35mM de acetato de trietilamina (Ac. Acético 0.2% +Trietilamina pH=6.90) B: Acetonitrilo Composición de gradiente (A:B): 0min (45% B) 6min (60% B) 10min (60% B) 11min (45% B)
Duración de análisis	15 min
Flujo	0,8mL/min
Horno	15°C
Detector	245nm

Para garantizar la veracidad de los datos, se inyectaron curvas de calibración cada 15 muestras durante la secuencia de inyección.

Se probaron cuatro tratamientos (Cuadro 2), cada uno se evaluó a los 0, 4, 11 y 15 días después de adicionar el elicitor. Los resultados se muestran en el Cuadro 3.

4.4. Evaluación del crecimiento de biomasa, en células en suspensión y en vitro plantas de *U. tomentosa*

Se determinó el peso de las plantas en cada tratamiento, se pesaron y midieron por separado. Este objetivo se evaluó en el 4.1 y 4.2.

4.5. Evaluación de la actividad citotóxica de un extracto de *U. tomentosa* en dos líneas celulares cancerígenas (NCI-N87 y MCF7)

Se realizaron ensayos para determinar el efecto de los extractos sobre células cancerosas de tumores específicos (Freshney, 2005). Se trabajó con tres líneas celulares: carcinoma pulmonar (H460), adenocarcinoma de mama (MCF-7) y como control fibroblastos sanos. Se expandió cada línea celular hasta obtener 9×10^6 células en un frasco de cultivo celular. Una vez obtenida esta cantidad se inocularon 5000 células/pozo en una placa multipozo de 96 pocillos dejando los bordes de la placa sin células. Se probó el extracto a diferentes concentraciones del compuesto con

actividad biológica: 0 (control), 5, 10,15, 30, 40, 50, 60, 75, 100 ug/ml) en medio de cultivo celular para observar el efecto de la exposición de células al extracto durante 48 horas.

Cada tratamiento se realizó por triplicado. Posteriormente, por el método de determinación de viabilidad celular con MTT, se cuantificó el porcentaje de células viables para evaluar el efecto citotóxico del extracto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.1. *Vitro* plantas elicidadas

En el Cuadro 3 se muestran los resultados de crecimiento: longitud final, peso fresco, y la concentración de alcaloides en plantas *in vitro* de *U. tomentosa* en los tratamientos de elicitación probados en este trabajo. A dos semanas de tratamiento con elicitores para estimular la inducción de la producción de oxi-indol alcaloides en *in vitro* plantas, se observó un notable crecimiento de todas las *in vitro* que se mostraban vigorosas y de un color verde intenso, la mayoría con regeneración de hojas (Figura 2). La mayor tasa de crecimiento se observó en el tratamiento control, con el empleo de 30g/l de sacarosa en el medio de cultivo, lo que corrobora que el medio M&S (1962) complementado con 3% de sacarosa es adecuado para el crecimiento de las vitroplantas (Alvarenga, 2010).



Figura 2. Vitroplantas de *U. tomentosa* a los 15 días de tratamiento. (Ensayo realizado en CIB, ITCR).

En la Fig. 3. se resumen los datos de concentración de alcaloides totales (mg/g) en los tratamientos de elicitación probados en plantas *in vitro* de *U. tomentosa*.

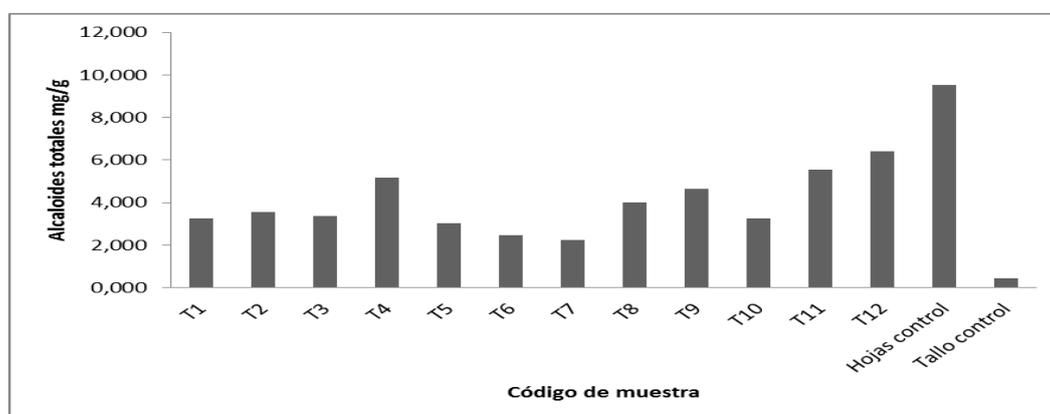


Figura 3. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en tratamientos de elicitación en plantas *in vitro* de *U. tomentosa*.

Cuadro 3. Longitud(cm), Peso fresco(g) y concentración de alcaloides(mg/g) en plantas *in vitro* de *Uncaria tomentosa* en tratamientos de elicitación.

Tratamiento	Longitud (cm)	Peso fresco (mg)	Código de muestra	Unc D (mg/g)	Mitrafilina (mg/g)	Isomitrafilina (mg/g)	Unc C (mg/g)	Isorincofilina (mg/g)	Unc E (mg/g)	Alcaloides Totales (mg/g)
T1	1,71ab	0,09a	2UT	0,320	0,681	0,57	0,810	0,68	0,184	3,240
T2	1,79a	0,11a	3UT	0,204	0,449	0,68	0,973	1,14	0,125	3,573
T3	1,65ab	0,08a	4UT	0,516	1,006	0,52	0,739	0,43	0,170	3,376
T4	1,16ab	0,08a	5UT	0,376	0,612	0,96	1,364	1,74	0,113	5,166
T5	1,37ab	0,14a	6UT	0,243	0,456	0,55	0,789	0,87	0,116	3,031
T6	1,09b	0,09a	7UT	0,179	0,345	0,47	0,673	0,73	0,074	2,473
T7	1,42ab	0,12a	8UT	0,181	0,356	0,42	0,599	0,55	0,118	2,225
T8	1,20ab	0,1a	9UT	0,278	0,535	0,75	1,069	1,29	0,104	4,022
T9	1,34ab	0,22a	10UT	0,455	0,792	0,79	1,119	1,29	0,219	4,662
T10	1,39ab	0,08a	11UT	0,182	0,378	0,63	0,897	1,09	0,078	3,251
T11	1,16ab	0,10a	12UT	0,375	0,854	1,01	1,433	1,72	0,145	5,537
T12	1,21ab	0,07a	13UT	0,484	0,862	1,14	1,622	2,17	0,130	6,404
Hojas de Vitroplantas control			14UT	0,421	1,540	2,23	3,175	1,75	0,424	9,535
Tallo Vitroplantas control			15UT	0,044	0,021	0,01	0,019	0,02	0,330	0,448

Como se observa en el Cuadro 3 y en la Fig.3, la mayor producción de alcaloides se presentó en las hojas de vitroplantas con 9,535mg de alcaloides totales, en tanto que en el tallo de las vitroplantas solo se detectaron 0,448mg de alcaloides totales.

En esta especie los oxindol alcaloides se consideran los de mayor importancia por sus propiedades medicinales. Se reporta la existencia de dos quimiotipos de alcaloides, los pentacíclicos (POA) y los tetracíclicos (TOA). Cada grupo de alcaloides muestra diferentes propiedades farmacológicas. Los tetracíclicos o TOA se caracterizan por ser efectivos en los sistemas nervioso central y en el cardiovascular, en tanto que los POA, están asociados con el sistema inmunitario como inmunomoduladores (Bertol, 2012).

Estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que los POA presentan actividad citotóxica, ampliamente estudiada en diferentes líneas celulares de cáncer, lo que valida el uso medicinal de esta especie. La concentración de los alcaloides varía en diferentes partes de la planta, así como con las condiciones ambientales y geográficas, por lo que se presentan diferentes perfiles durante la estación seca y la lluviosa, (Pereira *et al.*; 2008; Alvarenga *et al.*; 2012))

Los usos medicinales de *Uncaria tomentosa* es una planta en riesgo de extinción en Perú, por la deforestación de su hábitat natural y la comercialización de la planta en diferentes presentaciones, en las se emplean extractos y productos elaborados a partir de la corteza de la raíz, lo que implica la muerte de la planta. Además los fitofármacos se preparan con plantas de 8 a 10 años de edad, todo esto conlleva a la extracción del recurso del bosque, lo que lo hace menos sostenible. Con el fin de minimizar el extractivismo se ha intensificado el cultivo de la especie por semilla, estacas o acodos (Alvarenga *et al.*; 2008), sin embargo, estos métodos de cultivo no proporcionan la gran cantidad de material vegetal requerida para la preparación de fármacos naturales.

Una opción menos explorada es el cultivo *in vitro* con el fin de incrementar la producción clonal de vitroplantas (Alvarenga, 2010) y así asegurar la conservación y el uso sostenible del germoplasma para su explotación comercial. Por lo que, el empleo de otras herramientas biotecnológicas como el cultivo de células y tejidos para la obtención de los metabolitos de interés ha sido poco explorada (Luna Palencia *et al.*; 2005, Trejo Tapia *et al.*; 2005; Trejo Tapia *et al.*; 2007, Pereira *et al.* 2008; Alvarenga *et al.*, 2012; Luna Palencia *et al.*; 2012).

Los métodos de micropropagación se convierten en una alternativa sostenible para la producción de los alcaloides, con la ventaja adicional de que en estos sistemas se producen

plantas homogéneas en morfología y en la concentración de estos metabolitos, principalmente cuando se producen clones. Adicionalmente, los compuestos son caracterizados y aislados en forma aséptica, lo que garantiza que el material obtenido está libre de microorganismos contaminantes que se encuentran en el campo, y que se pueden incrementar con la manipulación en la colecta.

El empleo de herramientas biotecnológicas en la inducción de síntesis de compuestos bioactivos, objetivo principal de este proyecto es un modelo interesante, especialmente porque se pueden controlar las condiciones físicas y químicas que inducen la síntesis e incrementan la concentración de los metabolitos, por lo que la producción de los compuestos no dependería de los factores ambientales y geográficos del cultivo en campo (Alvarenga *et al.*; 2012; Verpoorte, 2006).

Las vías metabólicas de síntesis de los metabolitos secundarios son complejas y generalmente involucran células diferenciadas que forman parte de tejidos estructurados, por lo que los resultados obtenidos, en cuanto a la concentración de alcaloides producidos en sistemas de cultivos celulares con el empleo de suspensiones celulares y en biorreactores son un reflejo de ello, por lo que se deben continuar realizando estudios adicionales que conlleven a un mayor conocimiento de los factores que inciden en la síntesis de los compuestos de interés y así poder trazar estrategias biotecnológicas de producción a escala.

Cuadro 4. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en tratamientos de elicitación en plantas *in vitro* de *U. tomentosa*.

Tipo de Alcaloide	Concentración de Alcaloides (mg/L).	Concentración de Alcaloides (%).
Uncarina D	4,25	7,5
Mitrafilina	8,89	15,6
Uncarina C	10,73	18,8
Isomitrafilina	15,28	26,8
Isorinchofilina	15,46	27,2
Uncarina E	2,33	4,1
Total	56,94	100,0

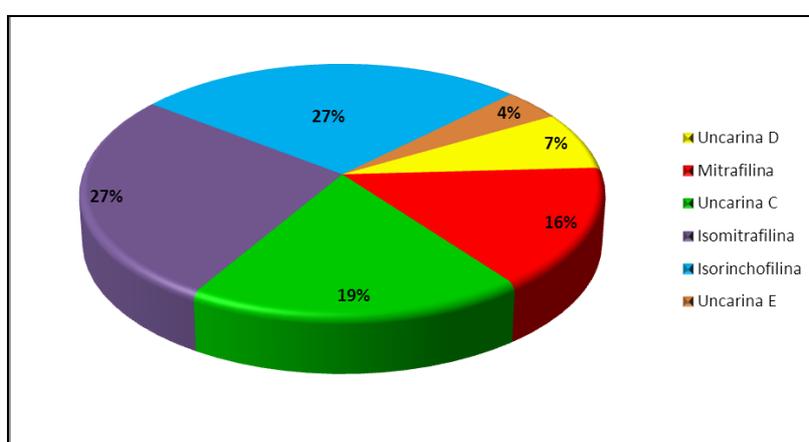


Figura 4. Porcentaje de alcaloides totales (mg/g) en los tratamientos de elicitación en plantas *in vitro* de *U. tomentosa*.

Como se observa en el Cuadro 4 y en la Figura 4, el material *in vitro* produjo alcaloides penta y tetracíclicos, siendo los de mayor abundancia la isorinchofilina con 27,2% (TOA), seguido por la Isomitrafilina con un 26,8% y la Uncarina C con 18,8%, (POA).

En el Cuadro 5 se compara la proporción de alcaloides POA y TOA que muestra 72,8 y 27,2 %, respectivamente, por lo que el germoplasma de la región Atlántica analizado en este estudio es del quimiotipo que mantiene una proporción POA TOA 3 :1, coincide con el quimiotipo que muestra los perfiles de alcaloides del material vegetal, similar al reportado en Perú Brasil (Domínguez *et al.*; 2010).

Cuadro 5. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en plantas *in vitro* en diferentes tratamientos de elicitación.

Tipo de Alcaloide	Tipo de Alcaloide	Concentración de Alcaloides (mg/g).	Concentración de Alcaloides (%).	Porcentaje acumulado(%)
Uncarina D	Pentacíclico	4,25	7,5	72,8
Mitrafilina	Pentacíclico	8,89	15,6	
Uncarina C	Pentacíclico	10,73	18,8	
Isomitrafilina	Pentacíclico	15,28	26,8	
Uncarina E	Pentacíclico	2,33	4,1	
Isorinchofilina	Tetracíclico	15,46	27,2	27,2
Total	Pentacíclico	56,94	100,0	100

Luna-Palencia y colaboradores (2013) evaluaron plantas *in vitro* de *U. tomentosa* a la luz continua y a la 16 horas luz. Se evaluó la concentración de seis alcaloides: Pteropodine (Uncarina C), Isopteropodine (Uncarina E), Mitrafilina, Isomitrafilina, Rincofilina, e Isorinchofilina a los dos y seis meses en cultivo *in vitro* y en plantas, a los dos años de aclimatadas en invernadero. En este trabajo se determinó que en plantas jóvenes el contenido de MOA tetracíclicos es mayor pero que decrece con la edad y aumentan los MOA pentacíclicos, debido a que son más frecuentes en las plantas maduras. En este estudio se reportó una mayor producción de alcaloides tetracíclicos en plantas bajo luz continua.

Existen pocos trabajos de obtención de estos metabolitos a partir de vitroplantas (Luna Palencia *et al.*; 2013; Pereira *et al.*; 2008), sin embargo, los resultados obtenidos no son comparables entre sí pues las condiciones de cultivo y los métodos de elicitación empleado son diferentes en cada trabajo de investigación. Sin embargo, sientan las bases de algunos factores que se podrían implementar en posibles ensayos futuros, por ejemplo el empleo de luz continua indujo un mayor producción de oxindol alcaloides (Luna-Palencia *et al.*, 2013). En los resultados obtenidos se obtuvo mayor proporción de alcaloides pentacíclicos, sin embargo se debe resaltar que los alcaloides analizados no son los mismos.

5.1.2. Células en suspensión de *U. tomentosa* elicidadas

El objetivo a cumplir con este análisis, fue la inducción de células en suspensión de *U. tomentosa* con diferentes elicitores para la producción de oxi-indol alcaloides. Lo esperado, era obtener una alta concentración de compuestos de interés después de ser elicitados.

En la Figura 5. Se presentan los comportamientos de los distintos tratamientos. T1 y T2 con extracto de levadura a diferentes concentraciones, demuestran un comportamiento esperado, con la diferencia que a bajas concentraciones de extracto de levadura hubo un aumento en la producción de alcaloides antes de los cinco días, pero al cabo de ese tiempo, disminuy{o la producción considerablemente. A diferencia del utilizar extracto de levadura a mayor concentración (5000mg/L), la producción de metabolitos aumento notablemente con respecto al tiempo, hasta los doce días. Indicando que esta fuente de nitrógeno, estimula la producción. Así como la concentración del extracto.

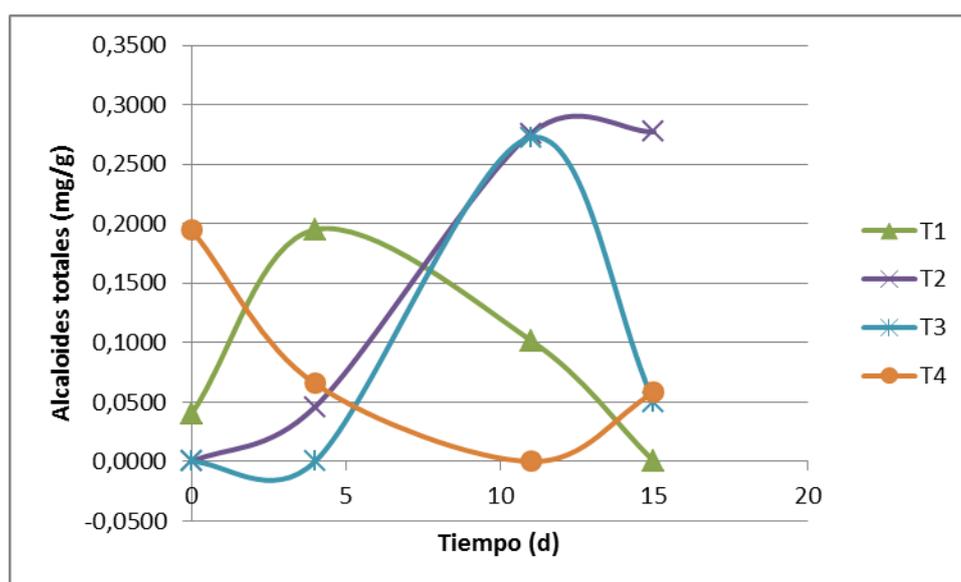


Figura 5. Concentración de alcaloides totales (mg / g) en suspensiones de *U. tomentosa*.

El tratamiento tres, igualmente, presenta un comportamiento esperado, produciendo a los 11 días un máximo de 0,2700mg/g de alcaloides totales. En este caso, la pectina a 100mg/L, estimula la producción de alcaloides. Se debería de considerar si al igual que la fuente de nitrógeno, este polisacárido le beneficia el aumento en la concentración.

Se considera el T2 como el tratamiento que permitió mayor producción de alcaloides totales, a los quince días, con respecto al resto de los tratamientos.

En este caso, las células en suspensión fueron tratadas con los mismos elicitores que las *in vitro* plantas. Con la diferencia que en las muestras *in vitro*, la concentración utilizada de cada uno de los elicitores fue mayor que a nivel celular, evitando el daño del material vegetal.

En el Cuadro 5, se muestra como en los primeros tres tratamientos hubo producción de alcaloides totales, gracias a la elicitación realizada en los 0, 4, 11 y 15 días.

En cuanto al tratamiento cuatro, se descartó pues los resultados obtenidos no fueron bien analizados, dando datos erróneos con respecto al resto.

Cuadro 5. Concentración de alcaloides totales (mg /g) en suspensiones de *U. tomentosa*.

Tratamiento	Día			
	0	4	11	15
T1	0,0402	0,1950	0,1019	0,0000
T2	0,0000	0,0459	0,2758	0,2773
T3	0,0000	0,0000	0,2726	0,0501

5.2 Evaluación de la actividad citotóxica de un extracto de *U. tomentosa*

Este ensayo mide la proliferación celular debido a la reducción metabólica de la sal MTT, por la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales. La reducción del compuesto es proporcional a la viabilidad celular. Los resultados se muestran en la siguiente figura.

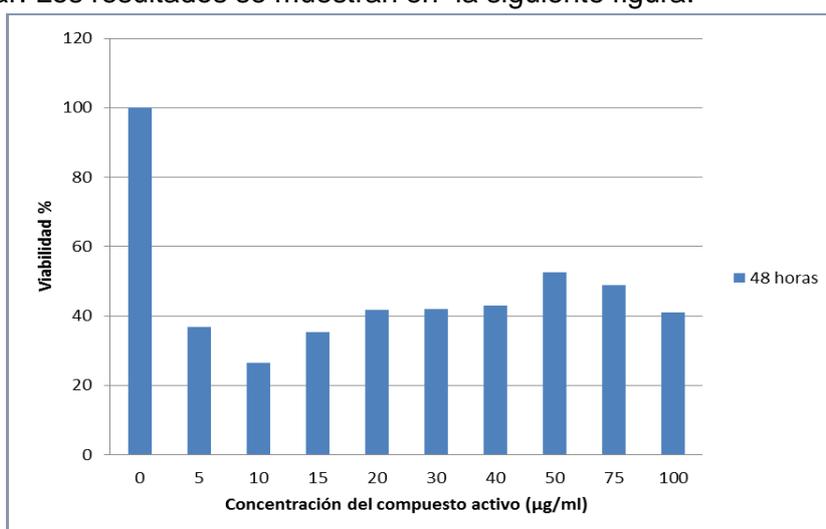


Fig.6 Porcentaje de viabilidad de células de la línea de cáncer de pulmón (H460) a diferentes concentraciones del compuesto activo, de un extracto estandarizado de *U. tomentosa*,

En este caso, se muestra una disminución en la viabilidad incluso en la menor concentración probada (5 µg/ml). Se espera que, conforme aumenta la concentración del compuesto activo, la viabilidad disminuya, pero en este caso no lo fue. Con respecto al cálculo de la IC 50 a las 48 horas, no es posible calcularlo debido a que no se muestra una tendencia en la disminución de la viabilidad. Solamente en la concentración de 50 µg/ml se mostró una viabilidad del 52%, las demás concentraciones no superaron este valor.

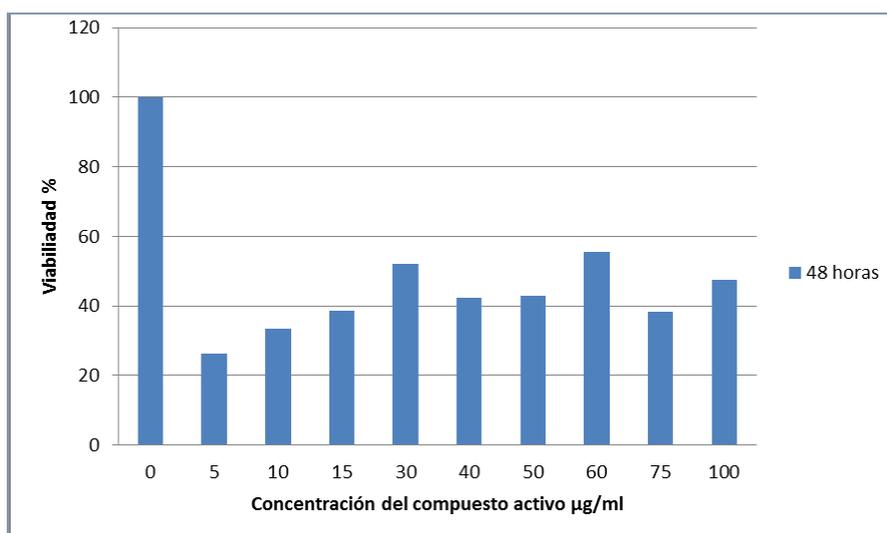


Fig.7. Porcentaje de viabilidad de células de la línea de adenocarcinoma de mama (MCF-7) a diferentes concentraciones del compuesto activo de un extracto estandarizado de *U. tomentosa*

En este caso, se muestra una disminución en la viabilidad considerable incluso en la menor concentración probada. Se espera de la misma forma que el caso anterior, que conforme aumenta la concentración del compuesto activo, la viabilidad disminuya, pero en este caso también no lo fue. Con respecto al cálculo de la IC 50 a las 48 horas, no es posible calcularlo debido a que no se muestra una tendencia en la disminución de la viabilidad. Solamente en la concentración de 30 y 60 µg/ml se mostraron una viabilidad del 52 y 55%, respectivamente, las demás concentraciones no superaron este valor.

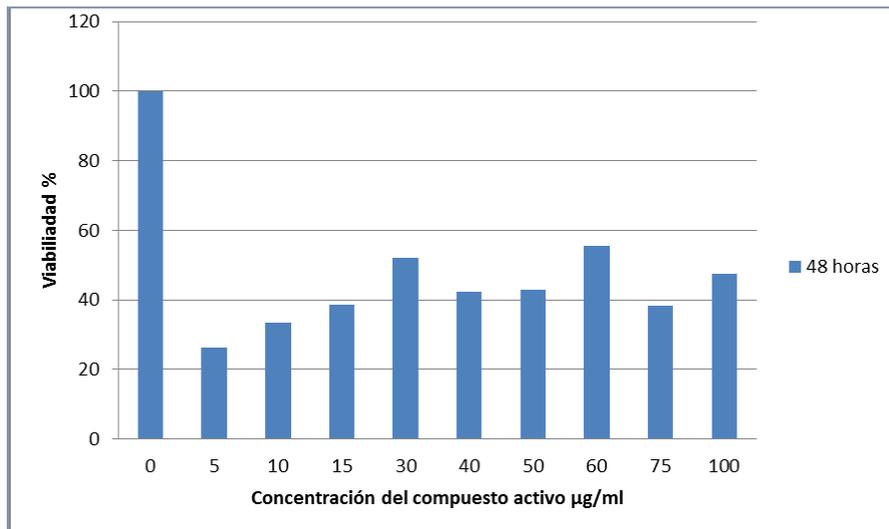


Figura 8. Porcentaje de viabilidad de células de la línea de fibroblastos (control) a diferentes concentraciones del compuesto activo de un extracto estandarizado de *U. tomentosa*

Los fibroblastos sanos se utilizaron como control. Debido a que si un extracto con actividad citotóxica afecta células sanas, éste no tendrá aplicación, clínica, médica o similar. Ninguna de las concentraciones utilizadas mostró una disminución en la viabilidad menor al 50%, más bien, se observa como hay incremento en la viabilidad. Es importante aclarar que, este incremento en la viabilidad no se presenta necesariamente por un efecto del extracto, sino que las células continúan creciendo en la placa de cultivo sin ningún problema. En este caso, se recomienda que *Uncaria* siga siendo estudiado por dos motivos principales: 1) Este no es citotóxico sobre las células normales y 2) a concentraciones muy bajas logra disminuir la viabilidad de las células tumorales de pulmón y mama.

6. Conclusiones

La técnica de cultivo *in vitro* de plantas para obtener los oxi indol alcaloides de interés farmacológico se perfila como una herramienta útil y válida a la luz de los resultados obtenidos en este ensayo.

La mayor proporción de metabolitos secundarios se produjo en las hojas de las *in vitro* plantas y no en el tallo, las *in vitro* plantas control mostraron una mayor proporción de los compuestos que los tratamientos de elicitación.

El tratamiento 12, con el empleo del 5% de sacarosa y ácido jasmónico fue el más efectivo en la inducción de los metabolitos de interés.

El cultivo de células en suspensión mostró una baja producción de los oxiindol alcaloides, a nivel de compuestos traza, por lo que resultaron sistemas menos efectivos que la vitroplantas.

7. Recomendaciones

Realizar ensayos de cultivo y elicitación para la obtención de oxi indol alcaloides, en vitroplantas en cultivo, utilizando luz continua (Luna Palencia *et al.*; 2013) sin el empleo de elicitores, como se especifica en la metodología de este ensayo y compararlos con el empleo del tratamiento 12 (Ácido Jasmónico con 5% de sacarosa).

Realizar los ensayos de citotoxicidad a mayores concentraciones de oxi indol alcaloides, dado que si se cuantifica la presencia de ellos.

Repetir los tratamientos 1 y 2 de elicitación de células en suspensión con el fin de alargar el tiempo, para ver si después de los quince días se sigue aumentando la producción de alcaloides.

Hay haber presencia de alcaloides del resultado de la elicitación en ambos tejidos se recomienda optimizar el uso de elicitores.

8. Bibliografía

Alvarenga, S. 2010. Establecimiento *in vitro* y cultivo de células de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) (Willd.) D.C. Tecnología en marcha. 23(5): 24-33

Alvarenga, S., Alán, E. Peraza, J. 2002. Informe Final. Estudio de la biología, la propagación vegetativa y el cultivo in vitro de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). Fundación Neotrópica-ITCR. Cartago, Costa Rica. 89p

Alvarenga, S.; Arnáez, E.; Moreira, I.; Alan, E.; Peraza, J.; Romero, E.; Vargas, W.; Loaiza, J.; Barrios, M. 2008. Domesticación de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) en Costa Rica. **En:** Manejo integrado de Recursos Bióticos. Rogelio Oliver, Marisela Tabeada y Andrea Granjeno (Compiladores). AGT Editor S.A. 37-146pp.

Sánchez Calvo, L.; Alvarenga Venutolo, S. 2015. Calogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (Uña de Gato).(en prensa), Tecnología en marcha.

Bertol, G.; Franco, L.; de Oliveira, H. 2012. HPLC Analysis of Oxindole Alkaloids in *Uncaria Tomentosa*: Sample Preparation and Analysis Optimisation by Factorial Design. *Phytochemical Analysis* 23:143-151.

Bray, E.; Bailey-Serres, J. Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. **In:** Biochemistry and molecular biology of plants. Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. pp:1158-1203.

Caballero, C., Cardona, N. 2007. Evaluación del crecimiento celular y consumo de sustrato a partir del establecimiento de suspensiones celulares de *Borojoa patinoi* cuatrec. (En línea). Disponible en:< <http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P660.6CDC112/marcoTeorico.pdf>> Consultado: 5 noviembre, 2010.

Cahuana-Vasquez, R.A., Santos dos, S., Koga-Ito, C., Jorge, A. 2007. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz. Oral Res.* 21(1):46-50

Carvalho, M.V., Penido, C., Siani A.C., Valente, L.M.M., Henriques, M.G.O. 2006. Investigations on the anti-inflammatory and anti-allergic activities of the leaves of *Uncaria guianensis* (Aublet) J. F. Gmelin. *Inflammopharmacology.* 14:48-56.

De Jong, W.; Melnyk, M.; Alfaro, L.; Rosales, M.; García, M. 1999. Uña de Gato: Fate Future of Peruvian Forest Resource. Center for international forestry research. Occasional paper no 22. Jakarta, Indonesia. 15p.

Domínguez, G., Castillo, A. 2007. Crecimiento de un clon de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. En cuatro condiciones de hábitat en la cuenca del río Aguaytía, Ucayali Perú. *Ecología Aplicada.* 6(1-2):39-46.

Domínguez, G., Tapia, L. 2000. Reportes de archivo de ensayos de estandarización in vitro de *Uncaria tomentosa*. Instituto de Biotecnología, Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú.

Feria-Romero, I., Lazo, E., Ponce, T., Cerda, C., Ramos, A. 2005. Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Biotechnology Letters*. 27:839-843

Flores, Y. 1995. Propagación por semilla de “uña de gato” (*Uncaria tomentosa*). *Boletín Técnico* N°5. Instituto Nacional de Investigación Agraria.

Freshney, I. 2005. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 5ta Ed. John Wiley&Sons. New Jersey, USA. 359-370 pp

George, E. 2008. Plant Tissue Culture Procedure – Background. **IN**: *Plant Propagation by Tissue Culture*. EF. George, MA. Hall, G. De Kerk. 3ed. Netherlands. Springer. pp:1-28

George, E., Debergh, P. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. **IN**: *Plant Propagation by Tissue Culture*. EF. George, MA. Hall, G. De Kerk. 3ed. Netherlands. Springer. pp:1-28.

Gonçalves, C.; Dinis, T.; Batista, M. 2005. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 66: 89-98.

González, H. 2006. Evaluación del potencial de los productos forestales no maderables en el ámbito del Proyecto Bosques del Chinchipe. En línea. <<http://www.itdg.org.pe/bosques/documentos/chinchipe000006.pdf>> Consultado 11 octubre del 2010.

González, O.; Sam, O.; Hernández, M.; Coronado, M.; Silva, J. 2010. Estudios histológicos de la embriogénesis somática: una necesidad para el conocimiento de los procesos biotecnológicos y la biodiversidad en el cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) LAM. Cuadernos de Biodiversidad. 23-28

Green, V.; Stott, D.; Diack, M. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology & Biochemistry*. 38:693-701

Heitzman, M.; Neto, C. C.; Winiarz, E.; Vaisberg, A. J.; Hammond, G. B. 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 66: 5-29.

Hermoso-Gallardo, L., Menéndez-Yuffá, A. 2000. Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante el cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. *Acta Científica Venezolana*. 51:90-95

Huerta-Heredia, A.; Marín-López, R.; Ponce-Noyola, T.; Cerda-García-Rojas, C.; Trejo-Tapia, G.; Ramos-Valdivia, R. 2009. Oxidative stress induces alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root and cell cultures in bioreactors. *Engineering in Life Sci.* 2009, 9, No. 3, 211–218.

Jordán, M.; Casaretto, J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. **EN**: *Fisiología Vegetal*. F.A. Squeo, L. Cardemil. La Serena, Chile. Ediciones Universidad de La Serena. Cap 15 (s.p.)

Keplinger, K.; Laus, G., Wurm, M.; Dierich, M.; Teppner, H., 1999. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.: Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology*. 64(1):23-34.

Kohda, H.; Namera, A.; Koyama, A.; Yamasaki, K.; Tani, T. 1996. Indole Alkaloid Production in Callus of *Uncaria rhynchophylla* (MIQ.) MIQUEL. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 44(2):352-357

Kumar, V.; Giridhar, P.; Ravishankar, G. 2009. AgNO₃- a potencialregulator of ethylene activity and plant growth modulator. Electron J Biotechnol 12(2) sp

Kumar, V.; Ramakrishna, A.; Ravishankar, G. 2007. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis fom Coffea canephora P ex Fr. In vitro cell Dev. Biol-Plant. 43:602-607

Laus, G. 2004. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. Phytother. Res. 18:259–274

Lombardi, I y Zevallos, P. 1999. Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la uña de gato *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schultes) De Candolle. Santadé de Bogotá (Colombia). Convenio Andrés Bello. 48p (Serie Ciencia y Tecnología N°75) (sp).

Loyola, V.; Sánchez-Iturbe, P.; Canto-Canché, B.; Gutiérrez, L.; Galaz-Ávalos, R.; Moreno-Valenzuela, O. 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revision crítica. Rev Soc Méx. 48:67-94

Luna, G.; Cerda, C.; Rodríguez, M.; Ramos, A. 2005. Influence of Auxins and Sucrose in Monoterpenoid Oxindole Alkaloid Production by *Uncaria tomentosa* Cell Suspension Cultures. Biotechnol. Prog. 21:198-204.

Luna-Palencia, G., Huerta-Heredia, Ariana, A., Cerda-García C., Ramos-Valdivia. A. 2013. Differential alkaloid profile in *Uncaria tomentosa* micropropagated plantlets and root cultures. Biotechnol Lett (2013) 35:791–797

Machakova, I.; Zazimalova, E.; Geroge, E.F. 2008 IN: Plant Propagation by Tissue Culture. EF. George, MA. Hall, G. De Kerk. 3ed. Netherlands. Springer. pp: 175-204

Martínez, M.; Hernández, C.A.; Restrepo, L.F. 2007. Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojó (*Borojoa patinoi* CUATR.) Fase I. Revista Colombiana de Biotecnología. 9(2):45-55

Mills, D. y Lee, J. 1996. A simple, accurate method for determining wet and dry weight concentrations of plant cells suspension cultures using microcentrifuge tubes. Plant Cell reports. 15:634-636.

Morales, J. 2006. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. En línea. Disponible en: <<http://darnis.inbio.ac.cr/ubis/FMPPro?-DB=UBIPUB.fp3&-lay=WebAll&-error=norec.html&-Format=detail.html&-Op=eq&id=7059&-Find>> Consultado: 11 octubre del 2010.

Murashige, T. and Skoog, G. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.

Núñez, C.; Lozada-Requena, I.; Akamine, I., Carbajal, L.; Aguilar, J. 2008. Efecto de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) sobre la población y activación de células dendríticas en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoidea. Acta Medica Peruana. 25(3):135-139.

Obregón, V. 1997. Uña de gato (Cat's claw). Género *Uncaria*. Estudios botánicos químicos y farmacocinéticos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. 3 ed. Perú. 88p

Ogita, S. 2005. Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology* 22:119–125.

Peña, R.; Timmermann, B.; Iturriaga, L.; González, L.; Montenegro, G. 1998. Posibilidades de un control botánico analítico de la uña de gato *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Rev. Acad. Comb Cienc.* 22(85):595-600

Pereira, R.; Valente, L.; Pinto, J.; Bertoluccic S.; Bezerra,G.; Alves, F.; dos Santos, P.; Benevides, P.; Siani, A.; Rosario, S.; Mazzei, J.; d'Avila, L.; Gomes, L.; de Aquino-Neto, R.; Emmerickb, I.; Carvalhaesb, S. 2008. *In Vitro* Cultivated *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* with Determination of the Pentacyclic Oxindole Alkaloid Contents and Profiles. *J. Braz. Chem. Soc.*, 19(6): 1193-1200

Pero, R. Method of preparation and composition of a water soluble extract of the plant species *Uncaria* for enhancing immune, anti-inflammatory, anti-tumor and DNA repair processes of warm blooded animals. United States Patent #US2001/0022981. Sep. 20, 2001

Pero, R. W. 2010. HISTORICAL DEVELOPMENT OF UNCARIA PREPARATIONS AND THEIR RELATED BIOACTIVE COMPONENTS. **IN:** DNA Damage Repair. Repair Mechanisms and Aging. Edited by Allison E, Thomas. Nova Science Publishers, INC. pp:223-236.

Qiaochun, W.; Munir, M.; Nahman, S.; Ping, L.; Colova, V.; Ron, G.; Ilian, S.; Edna, T. y Avihai, P. 2004. Cryopreservation of grapevine (*Vitis spp.*) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. *Plant cell tissue and organ culture* 77:267-275.

Rodríguez-Monroy, M. 2007. Manual de prácticas del curso: Aspectos Teórico Prácticos del cultivo de células vegetales en biorreactores. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. pp:10-24.

Salcedo, G.; Rosas, G.; Nabor, N.; Bermúdez, K.; López, A.; Trejo, G. 2009. Propagation and conservation of *Castilleja tenuiflora* BENTH. ("Hierba del cpancer") through in vitro culture. *Polibotánica.* 28:119-137

Santos, A.; Silveira, V.; Steiner, N.; Maraschin, M.; Guerra, M. 2010. Biochemical and Morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53(3):497-504

Song, J.; Kanazawra, K.; Sun, T.; Murata, K. 1999. Color coding the cell death status of plants suspensión cels. *BioTechniques.* 26:1060-1062

Sridevi, V.; Giridhar, P.; Simmi, P. 2010. Direct shoot organogenesis on hypocotyl with collar región from in vitro seedlings of *Coffea canephora* Pierre ex. Frohner cv. C x R and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation.

Srivastava, L. 2002. Plant growth and development: hormones and environment. Amsterdam Academic Press 772p

Su, W. 2006. Biorreactor engineering for recombinant protein production using plant cell suspension culture. **IN:** Plant Tissue Culture Engineering. Eds. SD Gupta; Y Ibaraki. Springer. The Netherlands. pp:135-159.

Taticek, R.; Moo-Young, M.; Legge, R., 1991. The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24:139-158

Trejo-Tapia, G.; Cerda, C.; Rodríguez, M.; Ramos, A. 2005. Monoterpenoid Oxindole Alkaloid Production by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. Cell Suspension Cultures in a Stirred Tank Bioreactor. *Biotechnology Progress* 21(3):786–792.

Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia*. 32(10):669-674

Trejo-Tapia, G.; Sepúlveda, G.; Trejo, J.; Cerda, C.; De la Torre, M.; Rodríguez, M.; Ramos, A. 2007. Hydrodynamic Stress Induces Monoterpenoid Oxindole Alkaloid Accumulation by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. Cell Suspension Cultures via Oxidative Burst. *Biotechnology and Bioengineering*. 98(1):230-238.

Van Blerkom, J. y Davis, P. 1994. Cytogenetics cellular and developmental consequences of criopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc Res Tec* 27:165-170.

Verpoorte, R. y Hoopen, H. 2006. *Plant Cell biotechnology. IN: Basic Biotechnonology*. 3 ed. C Ratledge; B Kristiansen. United Kingdom. Cambridge University Press. pp:549-578.

Yang, H.; Zhao, A.; Acker, J.; Liu, J.; Akabutu, J. 2005. Effect of dimethyl sulfoxide on post thaw viability assessment of CD45+ and CD34+ cells of umbilical cord blood and mobilized peripheral blood. *Cryobiology* 10:165-175.

Zeiger, E. y Taiz, L. 2006. *Fisiología Vegetal*. 3ed. Massachusetts. United States. Universitat Jaume I. 2v, 1336p

Zevallos, P. y Flores, Y. 2003. Caracterización morfológica de plántulas de “uña de gato” *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roemer & Schultes) D.C. y *U. guianensis* (Aublet) Gmelin del bosque nacional Alexander Von Humbolt. *Ecología Aplicada*. 2(1):41-46

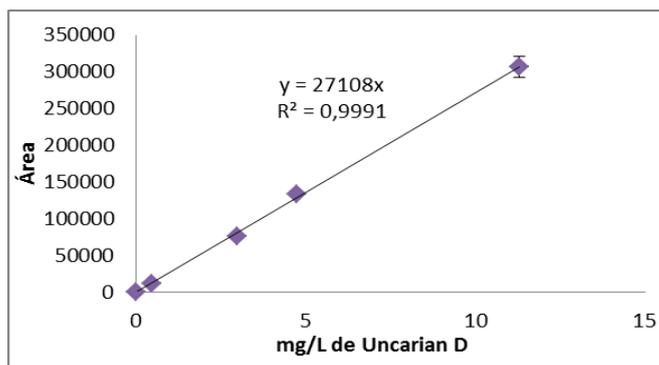
Zevallos, P. y Tomazello, M. 2006. Anatomia do lenho de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa* (Rubiaceae) do Estado do Acre, Brasil. *Acta Amazónica*. 36(2):169-176.

Zhou J, Zhou S (2010) Antihypertensive and neuroprotective activities of rhynchophylline: the role of rhynchophylline in neurotransmission and ion channel activity. *J Ethnopharmacol* 132:15–27.

9. Anexos

Anexo 1. Datos para la curva de calibración de Uncarina D.

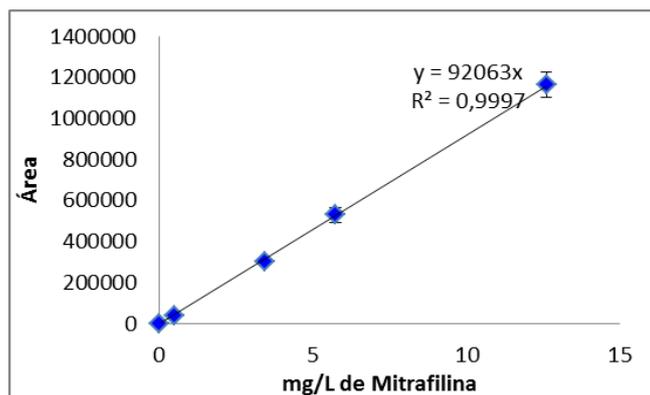
Uncarina D	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio de áreas	Des std
0	0					0	0
0,46	10655,44	12472,18	8838,7	11256,08	9887,38	10621,956	1228,50862
3,00	76021,62	77749,28	74293,96	75975,3	72546,00	75317,232	1764,70314
4,75	132649,295	132454,75	132843,84		134543,50	133122,8463	831,670751
11,31	298574,46	300921,85	296227,07		329957,90	306420,32	13690,4228



Anexo 2. Curva de calibración de Uncarina D.

Anexo 3. Datos para la curva de calibración de Mitrafilina.

Mitrafilina	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio de áreas	Des std
0	0	0	0	0	0	0	0
0,48	39906,73	38857,46	40956	34307,99	40039,14	38813,464	2349,00849
3,43	298107,695	299534,07	296681,32	295341,45	321230,5	302179,007	9628,16085
5,73	545056,895	509060,32	581053,47		485646,17	530204,2138	36189,5444
12,60	1198754,79	1205409,49	1192100,09		1054423,8	1162672,043	62674,0498

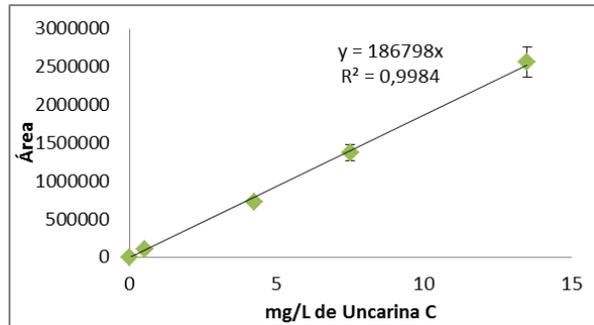


Anexo 4. Curva de calibración de Mitrafilina.

Anexo 5. Datos para la curva de calibración de Uncarina C.

Uncarina C	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio de áreas	Des std
0	0	0	0	0	0	0	0
0,52	104182,825	109040,7	99324,95	97309,76	107733,95	103518,437	4579,09059
4,25	722197,215	733121,28	711273,15	715578,22	732533,2	722940,613	8792,62043

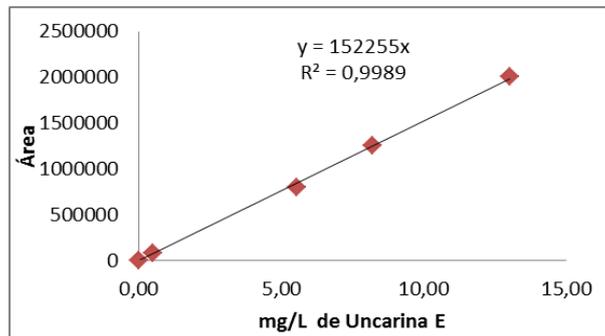
7,50	1424054,66	1332313,29	1515796,02		1225217,2	1374345,291	107802,141
13,50	2670257,8	2685985,55	2654530,05		2223917,56	2558672,74	193590,697



Anexo 6. Curva de calibración de Uncarina C.

Anexo 7. Datos para la curva de calibración de Uncarina E.

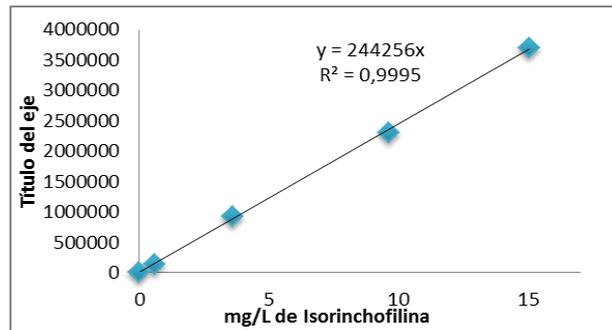
Uncarina E	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio de áreas	Des std
0,00	0	0	0	0	0	0	0
0,50	77312,405	79492,81	75132	65728,8	72602,9	74053,783	4749,20177
5,54	800835,24	787781,7	813888,78	761378,23	799080,8	792592,95	17669,447
8,22	1254243,94	1214557,75	1293930,12		1252354,21	1253771,504	28074,2981
13,01	2011494,2	2021752,61	2001235,78		1972634,35	2001779,234	18323,7266



Anexo 8. Curva de calibración de Uncarina E.

Anexo 9. Datos para la curva de calibración de Isorinchofilina.

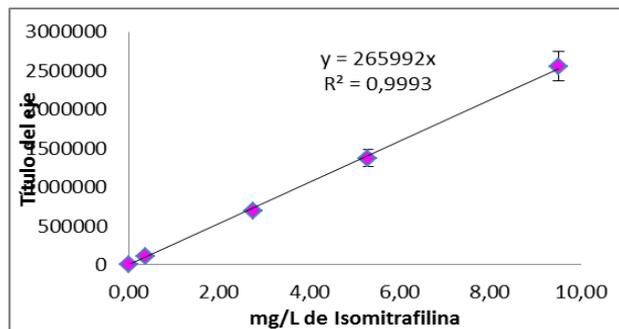
Isorinchofilina	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio de áreas	Des std
0	0					0	0
0,60	142150,09	149868,86	134431,32	117352,6	138050,25	136370,624	10806,2193
3,60	965922,24	992368,68	939475,8	815866,75	935263,2	929779,334	60537,4379
9,61	2409504,2	2474809,81	2344198,58		1993852,14	2305591,181	185812,15
15,06	3798035,43	3821415,92	3774654,93		3374618,77	3692181,261	184088,663



Anexo 10. Curva de calibración de Mitrafilina.

Anexo 11. Datos para la curva de calibración de Uncarina C.

Isomitrafilina	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio de áreas	Des std
0,00	0	0	0	0	0	0	0
0,38	104182,825	109040,7	99324,95	97309,76	107733,95	103518,437	4579,09059
2,75	712197,2	733121,28	691273,15	655578,22	702533,2	698940,613	25675,0824
5,30	1424054,81	1332313,59	1515796,02		1225217,2	1374345,404	107802,129
9,51	2670257,8	2685985,55	2654530,05		2223917,56	2558672,74	193590,697



Anexo 12. Curva de calibración de Isomitrafilina.

Anexo 13. Masa utilizada (mg/g) en plantas *in vitro* en diferentes tratamientos de elicitación.

Código de muestra	Masa (g)
2UT	0,1047
3UT	0,1009
4UT	0,1025
5UT	0,0908
6UT	0,1011
7UT	0,1032
8UT	0,1021
9UT	0,1018
10UT	0,1022
11UT	0,1009
12UT	0,0902
13UT	0,1001
14UT	0,016
15UT	0,0135

Anexo 14. Masa utilizada (mg/g) en suspensiones celulares en diferentes tratamientos de elicitación.

Código de muestra	Tratamiento	Masa (g)
AF-12-18-144	Extr Levad	0,1875
AF-12-18-152		0,1602
AF-12-18-260		0,1863
AF-12-18-268		0,1985
AF-12-18-150		0,1945
AF-12-18-160		0,1963
AF-12-18-264		0,1965
AF-12-18-274		0,1991
AF-12-18-126	Pectina	0,1983
AF-12-18-137		0,2032
AF-12-18-169		0,1906
AF-12-18-180		0,1932
AF-12-18-183		0,1882
AF-12-18-187	Acido jasmónico	0,1788
AF-12-18-198		0,1998
AF-12-18-240		0,1983

Anexo 15. Áreas bajo la curva obtenidas en el HPLC a muestras de plantas *in vitro*.

Código de muestra	Alcaloides /Área					
	Uncarina D	Mitrafilina	Isomitrafilina	Uncarina C	Isorichofilina	Uncarina E
2UT	1.514.195,70	1.094.375,04	2.638.999,90	2.638.999,90	2.885.551,30	487.612,50
3UT	929.198,70	694.808,20	3.056.930,10	3.056.930,10	4.677.457,80	319.998,13
4UT	2.388.159,40	1.582.065,22	2.357.228,60	2.357.228,60	1.781.163,40	442.518,12
5UT	1.544.095,80	851.978,60	3.856.690,45	3.856.690,45	6.440.762,50	260.078,25
6UT	1.111.005,37	707.082,49	2.484.621,14	2.484.621,14	3.589.448,55	297.187,42
7UT	832.970,98	546.290,57	2.162.289,30	2.162.289,30	3.067.091,02	194.284,03
8UT	835.106,72	558.373,28	1.905.275,45	2.284.353,50	2.284.353,50	305.766,10
9UT	1.274.917,50	834.938,30	3.388.117,10	3.388.117,10	5.329.312,80	267.540,15
10UT	2.101.110,80	1.241.631,50	3.560.345,80	3.560.345,80	5.372.997,20	566.821,00
11UT	829.816,27	585.841,33	2.816.397,23	2.816.397,23	4.463.082,40	199.579,60
12UT	1.521.923,70	1.181.789,45	4.024.801,20	4.024.801,20	6.327.122,60	332.209,87
13UT	2.109.068,80	1.323.627,30	5.053.827,30	5.053.827,30	8.829.037,00	331.330,80
14UT	130.966,78	755.957,80	3.163.441,60	3.163.441,60	2.274.190,93	1.243.978,60
15UT	50.371,70	8.870,30	15.813,80	15.813,80	22.410,30	225.999,50

Anexo 16. Áreas bajo la curva obtenidas en el HPLC de muestras de suspensiones celulares de *U. tomentosa*.

Código de muestra	Alcaloides /Área					
	Uncarina D	Mitrafilina	Isomitrafilina	Uncarina C	Isorichofilina	Uncarina E
AF-12-18-144	4.635,20	1.084,30	5.234,80	5.234,80	2.043,20	1.336,50
AF-12-18-152	3.237,80	-	50.455,20	50.455,20	8.089,11	-
AF-12-18-260	-	-	33.171,80	33.171,80	11.880,73	1.563,80
AF-12-18-268	-	-	-	-	-	-

AF-12-18-150	-	-	-	-	-	-
AF-12-18-160	2.793,35	-	11.321,61	11.321,61	2.254,20	-
AF-12-18-264	51.725,48	-	7.373,10	7.373,10	6.968,00	1.972,00
AF-12-18-274	51.804,90	-	9.069,85	9.069,85	6.159,40	2.408,70
AF-12-18-126	-	-	-	-	-	-
AF-12-18-137	-	-	-	-	-	-
AF-12-18-169	3.948,00	13.086,10	85.979,00	85.979,00	18.069,50	-
AF-12-18-180	1.618,88	19.415,80	6,00	78.762,90	43.319,05	3.912,30
AF-12-18-183	9.853,60	6.797,30	43.881,90	43.881,90	47.174,30	7.238,60
AF-12-18-187	2.415,40	22.290,13	14.369,25	14.369,25	15.413,27	2.598,60
AF-12-18-198	-	-	-	-	-	-
AF-12-18-240	-	-	17.253,00	17.253,00	18.604,60	12.439,80
2UT	1.514.195,70	1.094.375,04	2.638.999,90	2.638.999,90	2.885.551,30	487.612,50
3UT	929.198,70	694.808,20	3.056.930,10	3.056.930,10	4.677.457,80	319.998,13
4UT	2.388.159,40	1.582.065,22	2.357.228,60	2.357.228,60	1.781.163,40	442.518,12
5UT	1.544.095,80	851.978,60	3.856.690,45	3.856.690,45	6.440.762,50	260.078,25
6UT	1.111.005,37	707.082,49	2.484.621,14	2.484.621,14	3.589.448,55	297.187,42
7UT	832.970,98	546.290,57	2.162.289,30	2.162.289,30	3.067.091,02	194.284,03
8UT	835.106,72	558.373,28	1.905.275,45	2.284.353,50	2.284.353,50	305.766,10
9UT	1.274.917,50	834.938,30	3.388.117,10	3.388.117,10	5.329.312,80	267.540,15
10UT	2.101.110,80	1.241.631,50	3.560.345,80	3.560.345,80	5.372.997,20	566.821,00
11UT	829.816,27	585.841,33	2.816.397,23	2.816.397,23	4.463.082,40	199.579,60
12UT	1.521.923,70	1.181.789,45	4.024.801,20	4.024.801,20	6.327.122,60	332.209,87
13UT	2.109.068,80	1.323.627,30	5.053.827,30	5.053.827,30	8.829.037,00	331.330,80
14UT	130.966,78	755.957,80	3.163.441,60	3.163.441,60	2.274.190,93	1.243.978,60
15UT	50.371,70	8.870,30	15.813,80	15.813,80	22.410,30	225.999,50

Anexo 15. Cálculo de la concentración de Uncarina D.

Código de muestra	Área del ALCALOIDE Uncarina D	Dilución	Factor de dilución	[]	Masa (g)	Uncarina D (mg/g)
AF-12-18-144	4635,2	0,013	1	0,002222871	0,1875	0,012
AF-12-18-152	3237,8	0,013	1	0,00155273	0,1602	0,010
AF-12-18-260	0	0,013	1	0	0,1863	0,000
AF-12-18-268	0	0,013	1	0	0,1985	0,000
AF-12-18-150	0	0,013	1	0	0,1945	0,000
AF-12-18-160	2793,35	0,013	1	0,001339588	0,1963	0,007
AF-12-18-264	51725,48	0,013	1	0,024805638	0,1965	0,126
AF-12-18-274	51804,9	0,013	1	0,024843725	0,1991	0,125
AF-12-18-126	0	0,013	1	0	0,1983	0,000
AF-12-18-137	0	0,013	1	0	0,2032	0,000
AF-12-18-169	3948	0,013	1	0,001893316	0,1906	0,010
AF-12-18-180	1618,88	0,013	1	0,000776355	0,1932	0,004
AF-12-18-183	9853,6	0,013	1	0,004725424	0,1882	0,025

AF-12-18-187	2915,4	0,013	1	0,001398119	0,1788	0,008
AF-12-18-198	0	0,013	1	0	0,1998	0,000
AF-12-18-240	0	0,013	1	0	0,1983	0,000
2UT	151415,7	0,006	1	0,033513878	0,1047	0,320
3UT	92918,7	0,006	1	0,020566335	0,1009	0,204
4UT	238819,4	0,006	1	0,05285954	0,1025	0,516
5UT	154405,8	0,006	1	0,034175697	0,0908	0,376
6UT	111100,37	0,006	1	0,024590609	0,1011	0,243
7UT	83270,98	0,006	1	0,018430938	0,1032	0,179
8UT	83506,72	0,006	1	0,018483116	0,1021	0,181
9UT	127917,5	0,006	1	0,02831286	0,1018	0,278
10UT	210110,8	0,006	1	0,046505268	0,1022	0,455
11UT	82816,27	0,006	1	0,018330294	0,1009	0,182
12UT	152923,7	0,006	1	0,033847654	0,0902	0,375
13UT	219068,8	0,006	1	0,048488004	0,1001	0,484
14UT	60866,78	0,003	1	0,006736031	0,016	0,421
15UT	5371,7	0,003	1	0,000594478	0,0135	0,044

Anexo 16. Cálculo de la concentración de Mitrafilina.

Código de muestra	Área del ALCALOIDE	Dilución	Factor de dilución	Concentración	Masa pesada	Mitrafilina mg / g
	Mitrafilina					
AF-12-18-144	1084,3	0,013	1	0,00051999	0,1875	0,003
AF-12-18-152	0	0,013	1	0	0,1602	0,000
AF-12-18-260	0	0,013	1	0	0,1863	0,000
AF-12-18-268	0	0,013	1	0	0,1985	0,000
AF-12-18-150	0	0,013	1	0	0,1945	0,000
AF-12-18-160	0	0,013	1	0	0,1963	0,000
AF-12-18-264	0	0,013	1	0	0,1965	0,000
AF-12-18-274	0	0,013	1	0	0,1991	0,000
AF-12-18-126	0	0,013	1	0	0,1983	0,000
AF-12-18-137	0	0,013	1	0	0,2032	0,000
AF-12-18-169	13086,1	0,013	1	0,006275612	0,1906	0,033
AF-12-18-180	19415,8	0,013	1	0,009311104	0,1932	0,048
AF-12-18-183	6797,3	0,013	1	0,003259735	0,1882	0,017
AF-12-18-187	22290,13	0,013	1	0,010689527	0,1788	0,060
AF-12-18-198	0	0,013	1	0	0,1998	0,000
AF-12-18-240	0	0,013	1	0	0,1983	0,000
2UT	1094375,04	0,006	1	0,071323444	0,1047	0,681
3UT	694808,2	0,006	1	0,04528257	0,1009	0,449
4UT	1582065,22	0,006	1	0,10310756	0,1025	1,006
5UT	851978,6	0,006	1	0,055525799	0,0908	0,612
6UT	707082,49	0,006	1	0,046082519	0,1011	0,456
7UT	546290,57	0,006	1	0,035603265	0,1032	0,345

8UT	558373,28	0,006	1	0,036390729	0,1021	0,356
9UT	834938,3	0,006	1	0,054415235	0,1018	0,535
10UT	1241631,5	0,006	1	0,080920554	0,1022	0,792
11UT	585841,33	0,006	1	0,038180898	0,1009	0,378
12UT	1181789,45	0,006	1	0,077020483	0,0902	0,854
13UT	1323627,3	0,006	1	0,086264447	0,1001	0,862
14UT	755957,8	0,003	1	0,024633929	0,016	1,540
15UT	8870,3	0,003	1	0,000289051	0,0135	0,021

Anexo 17. Cálculo de la concentración de Isomitrafilina

Código de muestra	Área del ALCALOIDE	Dilución	Factor de dilución	[]	Masa pesada	IsoMitrafilina mg/g
	IsoMitrafilina					
AF-12-18-144	5234,8	0,013	1	0,002510418	0,1875	0,013
AF-12-18-152	50455,2	0,013	1	0,024196459	0,1602	0,151
AF-12-18-260	33171,8	0,013	1	0,015907976	0,1863	0,085
AF-12-18-268	0	0,013	1	0	0,1985	0,000
AF-12-18-150	0	0,013	1	0	0,1945	0,000
AF-12-18-160	11321,61	0,013	1	0,005429428	0,1963	0,028
AF-12-18-264	7373,1	0,013	1	0,003535868	0,1965	0,018
AF-12-18-274	9069,85	0,013	1	0,004349567	0,1991	0,022
AF-12-18-126	0	0,013	1	0	0,1983	0,000
AF-12-18-137	0	0,013	1	0	0,2032	0,000
AF-12-18-169	85979	0,013	1	0,041232367	0,1906	0,216
AF-12-18-180	6	0,013	1	2,87738E-06	0,1932	0,000
AF-12-18-183	43881,9	0,013	1	0,021044146	0,1882	0,112
AF-12-18-187	14369,25	0,013	1	0,006890964	0,1788	0,039
AF-12-18-198	0	0,013	1	0	0,1998	0,000
AF-12-18-240	17253	0,013	1	0,008273904	0,1983	0,042
2UT	2638999,9	0,006	1	0,059528104	0,1047	0,569
3UT	3056930,1	0,006	1	0,068955384	0,1009	0,683
4UT	2357228,6	0,006	1	0,053172169	0,1025	0,519
5UT	3856690,45	0,006	1	0,086995634	0,0908	0,958
6UT	2484621,14	0,006	1	0,056045771	0,1011	0,554
7UT	2162289,3	0,006	1	0,04877491	0,1032	0,473
8UT	1905275,45	0,006	1	0,042977431	0,1021	0,421
9UT	3388117,1	0,006	1	0,076425993	0,1018	0,751
10UT	3560345,8	0,006	1	0,080310967	0,1022	0,786
11UT	2816397,23	0,006	1	0,063529668	0,1009	0,630
12UT	4024801,2	0,006	1	0,09078772	0,0902	1,007
13UT	5053827,3	0,006	1	0,113999533	0,1001	1,139
14UT	3163441,6	0,003	1	0,035678986	0,016	2,230
15UT	15813,8	0,003	1	0,000178356	0,0135	0,013

Anexo 18. Cálculo de la concentración de Uncarina C.

Código de muestra	Área del ALCALOIDE	Dilución	Factor de dilución	Concentración	Masa pesada	Uncarina C mg/ g
	Uncarina C					
2UT	2638999,9	0,006	1	0,084765358	0,1047	0,810
3UT	3056930,1	0,006	1	0,098189384	0,1009	0,973
4UT	2357228,6	0,006	1	0,075714791	0,1025	0,739
5UT	3856690,45	0,006	1	0,123877893	0,0908	1,364
6UT	2484621,14	0,006	1	0,079806673	0,1011	0,789
7UT	2162289,3	0,006	1	0,069453291	0,1032	0,673
8UT	1905275,45	0,006	1	0,061197939	0,1021	0,599
9UT	3388117,1	0,006	1	0,108827196	0,1018	1,069
10UT	3560345,8	0,006	1	0,114359227	0,1022	1,119
11UT	2816397,23	0,006	1	0,090463406	0,1009	0,897
12UT	4024801,2	0,006	1	0,129277654	0,0902	1,433
13UT	5053827,3	0,006	1	0,162330238	0,1001	1,622
14UT	3163441,6	0,003	1	0,050805281	0,016	3,175
15UT	15813,8	0,003	1	0,000253972	0,0135	0,019
AF-12-18-144	5234,8000	0,0130	1,0000	0,0004	0,1875	0,0019
AF-12-18-152	50455,2000	0,0130	1,0000	0,0035	0,1602	0,0219
AF-12-18-260	33171,8000	0,0130	1,0000	0,0023	0,1863	0,0124
AF-12-18-268	0,0000	0,0130	1,0000	0,0000	0,1985	0,0000
AF-12-18-150	0,0000	0,0130	1,0000	0,0000	0,1945	0,0000
AF-12-18-160	11321,6100	0,0130	1,0000	0,0008	0,1963	0,0040
AF-12-18-264	7373,1000	0,0130	1,0000	0,0005	0,1965	0,0026
AF-12-18-274	9069,8500	0,0130	1,0000	0,0006	0,1991	0,0032
AF-12-18-126	0,0000	0,0130	1,0000	0,0000	0,1983	0,0000
AF-12-18-137	0,0000	0,0130	1,0000	0,0000	0,2032	0,0000
AF-12-18-169	85979,0000	0,0130	1,0000	0,0060	0,1906	0,0314
AF-12-18-180	78762,9000	0,0130	1,0000	0,0055	0,1932	0,0284
AF-12-18-183	43881,9000	0,0130	1,0000	0,0031	0,1882	0,0162
AF-12-18-187	14369,2500	0,0130	1,0000	0,0010	0,1788	0,0056
AF-12-18-198	0,0000	0,0130	1,0000	0,0000	0,1998	0,0000
AF-12-18-240	17253,0000	0,0130	1,0000	0,0012	0,1983	0,0061

Anexo 19. Cálculo de la concentración de Isorinchofilina.

Código de muestra	Área del ALCALOIDE	Dilución	Factor de dilución	Concentración	Masa pesada	Isorinchofilina mg/g
	Isorinchofilina					
2UT	2885551,3	0,006	1	0,070881812	0,1047	0,677
3UT	4677457,8	0,006	1	0,114898904	0,1009	1,139
4UT	1781163,4	0,006	1	0,043753195	0,1025	0,427
5UT	6440762,5	0,006	1	0,158213411	0,0908	1,742
6UT	3589448,55	0,006	1	0,088172619	0,1011	0,872
7UT	3067091,02	0,006	1	0,075341224	0,1032	0,730

8UT	2284353,5	0,006	1	0,056113754	0,1021	0,550
9UT	5329312,8	0,006	1	0,130911326	0,1018	1,286
10UT	5372997,2	0,006	1	0,131984407	0,1022	1,291
11UT	4463082,4	0,006	1	0,109632903	0,1009	1,087
12UT	6327122,6	0,006	1	0,155421916	0,0902	1,723
13UT	8829037	0,006	1	0,216879921	0,1001	2,167
14UT	2274190,93	0,003	1	0,027932058	0,016	1,746
15UT	22410,3	0,003	1	0,000275248	0,0135	0,020
AF-12-18-144	2043,2	0,013	1	0,000108745	0,1875	0,0006
AF-12-18-152	8089,11	0,013	1	0,000430525	0,1602	0,0027
AF-12-18-260	11880,73	0,013	1	0,000632326	0,1863	0,0034
AF-12-18-268	0	0,013	1	0	0,1985	0,0000
AF-12-18-150	0	0,013	1	0	0,1945	0,0000
AF-12-18-160	2254,2	0,013	1	0,000119975	0,1963	0,0006
AF-12-18-264	6968	0,013	1	0,000370857	0,1965	0,0019
AF-12-18-274	6159,4	0,013	1	0,000327821	0,1991	0,0016
AF-12-18-126	0	0,013	1	0	0,1983	0,0000
AF-12-18-137	0	0,013	1	0	0,2032	0,0000
AF-12-18-169	18069,5	0,013	1	0,00096171	0,1906	0,0050
AF-12-18-180	43319,05	0,013	1	0,002305563	0,1932	0,0119
AF-12-18-183	47174,3	0,013	1	0,002510751	0,1882	0,0133
AF-12-18-187	15413,27	0,013	1	0,000820338	0,1788	0,0046
AF-12-18-198	0	0,013	1	0	0,1998	0,0000
AF-12-18-240	18604,6	0,013	1	0,00099019	0,1983	0,0050

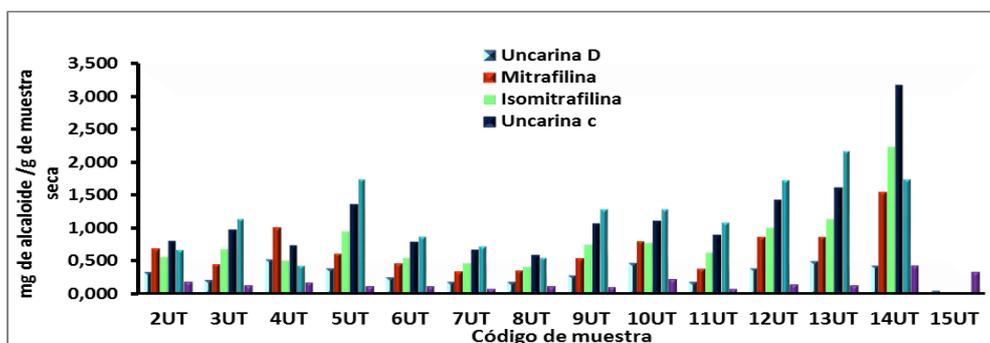
Anexo 20. Cálculo de la concentración de Uncarina E.

Código de muestra	Área del ALCALOIDE	Dilución	Factor de dilución	Concentración	Masa pesada	Uncarina E mg /g
	Uncarina E					
2UT	487612,5	0,006	1	0,019215625	0,1047	0,184
3UT	319998,13	0,006	1	0,01261035	0,1009	0,125
4UT	442518,12	0,006	1	0,017438565	0,1025	0,170
5UT	260078,25	0,006	1	0,010249053	0,0908	0,113
6UT	297187,42	0,006	1	0,011711435	0,1011	0,116
7UT	194284,03	0,006	1	0,007656262	0,1032	0,074
8UT	305766,1	0,006	1	0,0120495	0,1021	0,118
9UT	267540,15	0,006	1	0,010543108	0,1018	0,104
10UT	566821	0,006	1	0,02233704	0,1022	0,219
11UT	199579,6	0,006	1	0,007864948	0,1009	0,078
12UT	332209,87	0,006	1	0,013091585	0,0902	0,145
13UT	331330,8	0,006	1	0,013056943	0,1001	0,130
14UT	343978,6	0,003	1	0,006777681	0,016	0,424
15UT	225999,5	0,003	1	0,004453046	0,0135	0,330
AF-12-18-144	1336,5	0,013	1	0,000114114	0,1875	0,001
AF-12-18-152	0	0,013	1	0	0,1602	0,000

AF-12-18-260	1563,8	0,013	1	0,000133522	0,1863	0,001
AF-12-18-268	0	0,013	1	0	0,1985	0,000
AF-12-18-150	0	0,013	1	0	0,1945	0,000
AF-12-18-160	0	0,013	1	0	0,1963	0,000
AF-12-18-264	1972	0,013	1	0,000168375	0,1965	0,001
AF-12-18-274	2408,7	0,013	1	0,000205662	0,1991	0,001
AF-12-18-126	0	0,013	1	0	0,1983	0,000
AF-12-18-137	0	0,013	1	0	0,2032	0,000
AF-12-18-169	0	0,013	1	0	0,1906	0,000
AF-12-18-180	3912,3	0,013	1	0,000334044	0,1932	0,002
AF-12-18-183	7238,6	0,013	1	0,000618054	0,1882	0,003
AF-12-18-187	2598,6	0,013	1	0,000221876	0,1788	0,001
AF-12-18-198	0	0,013	1	0	0,1998	0,000
AF-12-18-240	12439,8	0,013	1	0,001062148	0,1983	0,005

Anexo 21. Concentración de alcaloides (mg/g) en plantas *in vitro* de *U. tomentosa* en diferentes tratamientos de elicitación.

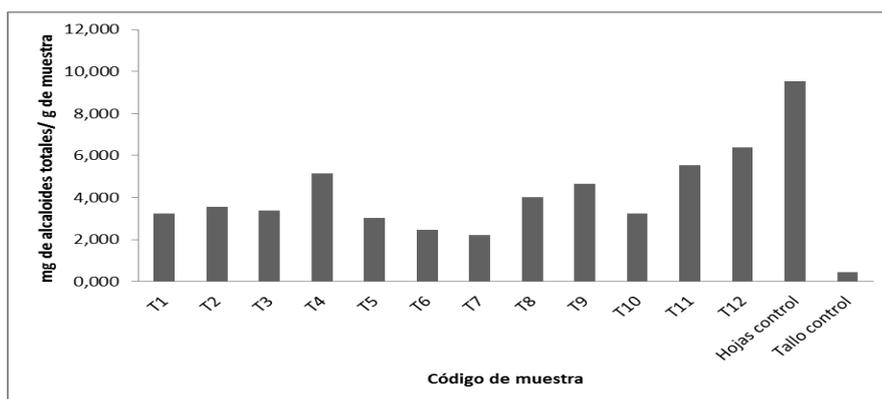
Tratamientos	Uuncarina D	Mitrafilina	Isomitrafilina	Uuncarina C	Isorincofilina	Uncarina E
T1	0,320	0,681	0,57	0,810	0,68	0,184
T2	0,204	0,449	0,68	0,973	1,14	0,125
T3	0,516	1,006	0,52	0,739	0,43	0,170
T4	0,376	0,612	0,96	1,364	1,74	0,113
T5	0,243	0,456	0,55	0,789	0,87	0,116
T6	0,179	0,345	0,47	0,673	0,73	0,074
T7	0,181	0,356	0,42	0,599	0,55	0,118
T8	0,278	0,535	0,75	1,069	1,29	0,104
T9	0,455	0,792	0,79	1,119	1,29	0,219
T10	0,182	0,378	0,63	0,897	1,09	0,078
T11	0,375	0,854	1,01	1,433	1,72	0,145
T12	0,484	0,862	1,14	1,622	2,17	0,130
Hojas Control	0,421	1,540	2,23	3,175	1,75	0,424
Tallo Control	0,044	0,021	0,01	0,019	0,02	0,330



Anexo 22. Concentración de alcaloides (mg/g) en plantas *in vitro* en diferentes tratamientos de elicitación.

Anexo 23. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en plantas *in vitro* en diferentes tratamientos de elicitación.

Muestra	Alcaloides Totales
T1	3,240
T2	3,573
T3	3,376
T4	5,166
T5	3,031
T6	2,473
T7	2,225
T8	4,022
T9	4,662
T10	3,251
T11	5,537
T12	6,404
Hojas control	9,535
Tallo control	0,448



Anexo 24. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en plantas *in vitro* en diferentes tratamientos de elicitación.

Anexo 25. Concentración de alcaloides totales (mg/g) en suspensiones celulares de *U. tomentosa* en diferentes tratamientos de elicitación.

Código	Alcaloides totales (mg / g)
AF-12-18-144	0,0402
AF-12-18-152	0,1950
AF-12-18-260	0,1019
AF-12-18-268	0,0000
AF-12-18-150	0,0000
AF-12-18-160	0,0459
AF-12-18-264	0,2758
AF-12-18-274	0,2773
AF-12-18-126	0,0000
AF-12-18-137	0,0000
AF-12-18-169	0,2726
AF-12-18-180	0,0501
AF-12-18-183	0,1949
AF-12-18-187	0,0656
AF-12-18-198	0,0000
AF-12-18-240	0,0581