

# Identificación, establecimiento *in vitro* y análisis fitoquímico preliminar de especies silvestres de ñame (*Dioscorea spp.*) empleadas con fines medicinales

## Identification, *in vitro* establishment and preliminary phytochemical analysis of wild yam (*Dioscorea spp.*) used for medicinal purposes

Ramos D. Víctor Andrés\*, Bustamante, R. Silvia Lizette\*, Rincón Velandia, Javier\*\*, Rojas Cardozo, Maritza Adelina\*\*, Raz, Lauren\*\*\*, Buitrago Hurtado, Gustavo\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50711

### Resumen

Tubérculos del género *Dioscorea* comercializados con fines medicinales, fueron recolectados con el propósito de lograr su establecimiento a condiciones *in vitro*. Previamente se lograron identificar taxonómicamente las especies y por medio de análisis fitoquímicos demostrar su potencial farmacéutico. El material recolectado fue identificado como *Dioscorea coriacea*, *D. lehmannii*, *D. meridensis*, *D. polygonoides* y una especie comestible *D. trifida*. Tubérculos recolectados de centros de acopio y traídos de campo fueron lavados, desinfectados, asperjados con Ácido Giberélico (AG<sub>3</sub>) y sembrados en sustrato BM-2®, en invernadero a 18°C día y 10°C noche. Los tubérculos completos o por secciones fueron almacenados en bolsas herméticas a temperatura ambiente. Posteriormente se desinfectó material vegetal de las especies *D. coriacea*, *D. lehmannii*, *D. meridensis* y *D. polygonoides*, seleccionando explantes de brotes sanos (*D. coriacea* / laboratorio) para su establecimiento. Se evaluaron tres medios de cultivo para establecimiento, el que presentó los mejores resultados fue Medio Murashige & Skoog (1962) suplementado con BAP 1 mL/L, AG<sub>3</sub> 1 mL/L y Putrescina 2 mL/L. Para la extracción y análisis de metabolitos secundarios se utilizaron tubérculos de *D. coriacea*, *D. lehmannii* y *D. polygonoides*, empleando como solvente de extracción metanol. Se encontró mayor concentración de extracto vegetal en *D. coriacea* (54%), y mediante cromatografía en capa delgada (CCD), se confirmó la presencia de saponinas, que resultó mayor en comparación con *D. polygonoides* especie reconocida por su alto contenido de saponinas. Estos resultados permitirán realizar análisis más avanzados de los compuestos presentes y plantear su propagación masiva en condiciones *in vitro*.

**Palabras clave:** diosgenina, micropropagación, ñame silvestre, cultivo de tejidos vegetales, saponinas, fitoquímica.

### Abstract

Wild tubers of the genus *Dioscorea* sold for medicinal use were collected for the purpose of achieving its establishment under *in vitro* conditions. First we taxonomically identified the species and through phytochemical analysis demonstrated pharmaceutical potential. The material collected was identified as *Dioscorea coriacea*, *D. lehmannii*, *D. meridensis*, *D. polygonoides* and the edible species *D. trifida*. Tubers collected from wholesale distributors and from the field were washed, disinfected, sprayed with Gibberellic Acid (GA<sub>3</sub>) and planted in substrate BM-2®, in a greenhouse at 18 ° C during the day and 10 ° C overnight. Whole tubers or sections thereof were stored in sealed bags at room temperature. Subsequently plant material of the species *D. coriacea*, *D. lehmannii*, *D. meridensis* and *D. polygonoides* was disinfected and healthy buds (*D. coriacea* / laboratory) were selected for *in vitro* establishment. Three different culture media were evaluated for establishment; that which presented the best results was the Murashige & Skoog (1962) medium, supplemented with BAP 1 mL / L, GA<sub>3</sub> 1 mL / L and Putrescin 2 mL / L. For the collection and analysis of secondary metabolites, tubers of *D. coriacea*, *D. lehmannii* and *D. polygonoides* were used, using methanol as the extraction solvent. The highest concentration of plant ex-

\* Grupo de Investigación sobre el Cultivo de Ñame. Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. varamosd@unal.edu.co, slbustamanter@unal.edu.co, gbuitragoh@unal.edu.co

\*\* Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia. Facultad de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. jrinconv@unal.edu.co, marojasc@unal.edu.c

\*\*\* Instituto de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. Iraz@unal.edu.co

tract, 54%, was found in *D. coriacea*, a higher value than that of *D. polygonoides*, which had been reported previously; the presence of saponins was confirmed by thin layer chromatography (TLC). These results will enable more advanced analysis of the present compounds and enhance their mass propagation under *in vitro* conditions.

**Key words:** diosgenin, micropropagation, wild yam, tissue culture, saponins, phytochemistry.

**Recibido:** agosto 20 de 2014

**Aprobado:** abril 20 de 2015

## Introducción

El género *Dioscorea* agrupa a 600 especies de plantas herbáceas trepadoras, lianas o bejucos, distribuidas mayormente alrededor de los trópicos. Numerosas especies silvestres sirven de alimento en diferentes países en África, Asia, Latinoamérica y Australia, sobre todo en tiempos de carestía o pobreza. Otras son usadas en Asia, Europa, Norte y Centroamérica con fines medicinales, para tratar el reumatismo, cólicos y espasmos intestinales, dolores o como abortivas. Algunas se emplean en fitoterapia y en homeopatía, y popularmente como piscicidas, pediculicidas, insecticidas, para elaborar champús, jabones, o para envenenar flechas para la cacería (Waizel, 2009).

Los ñames en los Estados Unidos son en realidad batatas, por esta razón, el Departamento de Agricultura de los EEUU requiere que la etiqueta “yam” siempre sea acompañada por la de “sweet potato”, los ñames verdaderos sí son especies de *Dioscorea* (USDA, 2012). Los ñames verdaderos han sido comúnmente usados en la industria farmacéutica, para tratar condiciones tan diversas como la inflamación, dolor en articulaciones, diabetes, infecciones y la dismenorrea. Los componentes farmacológicamente activos de las especies de *Dioscorea* incluyen diosgenina, que es una saponina esteroidal, y dioscina, una forma de diosgenina con azúcares.

Entre las diversas metodologías utilizadas para micropropagación de ñame se encuentra el cultivo de meristemas, efectivo para la eliminación de infecciones virales y la conservación del germoplasma. Otro de los mecanismos utilizados para la propagación es la microtuberización, que permite la conservación de material genético básico de clones madres libres de enfermedades en un espacio reducido sin la necesidad de hacer operaciones costosas para recolectar ñame en el campo. (Perea & Buitrago, 2000)

El Grupo de Investigación sobre el cultivo de ñame del Instituto de Biotecnología (IBUN) de la Universidad Nacional de Colombia, enfoca sus investigaciones tanto a ñames silvestres como a especies y variedades cultivadas, trabajos que han desarrollado metodologías de cultivo en condiciones *in vitro*, generando conocimiento sobre un cultivo considerados huérfano (FAO 2006), a nivel nacional e internacional, bajo un enfoque claro de incidir favorablemente en la calidad de vida de los productores de ñame de Colombia.

Este trabajo buscó establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de especies de ñame, silvestres y comercializadas en plazas de mercado de Bogotá, contribuyendo de esta manera a futuros trabajos con estas especies al garantizar material vegetal disponible. Como complemento, se propuso identificarlas taxonómicamente y realizar un primer análisis fitoquímico para identificar su potencial fitoterapéutico.

## Materiales y métodos

### Selección del material

Tubérculos conocidos como zarzaparrilla fueron adquiridos en centros de acopio de la ciudad de Bogotá, por secciones y completos, adicionalmente, se contó con material donado (tubérculos con tallos, hojas y raíces) por el Instituto de Ciencias Naturales y el Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia de la Universidad Nacional, y material colectado en diferentes municipios del departamento de Cundinamarca.

### Estudio y determinación de la especie

Para la determinación de la especie de los tubérculos recolectados en su hábitat natural provenientes de campo, se tuvo en cuenta caracteres morfológicos que definen las características del género y la especie, tomando como referencia las colecciones en el Herbario Nacional Colombiano (COL) y la literatura botánica (Knuth, 1924). Se registró altitud, localidad, descripción de la planta, y especie. Para los demás tubérculos, se reportaron los caracteres morfológicos que definen las características de las especies del género *Dioscorea* spp., color y diámetro del tallo tanto joven como maduro, presencia o no de espinas en la base o en todo el tallo, presencia o ausencia de tubérculos aéreos, forma del tubérculo subterráneo así como su anchura, color de la epidermis, color de la parénquima, presencia o ausencia de grietas en su superficie y propiedades organolépticas del tubérculo (IPGR/IITA, 1997).

### Adaptación de ñame silvestre en invernadero

Los tubérculos adquiridos en centros de acopio fueron previamente lavados con detergente y agua y sembrados en macetas, previamente se les aplicó Ácido Giberélico (AG<sub>3</sub>) por aspersión para romper la dormancia. Tubérculos donados en secciones que se encontraban en bolsas herméticas con desarrollo de brotes,

fueron lavados y desinfectados para establecimiento. Tubérculos provenientes de campo fueron lavados y almacenados en bolsas herméticas durante 1 mes para romper dormancia y se sembraron en invernadero.

Tubérculos lavados con abundante agua y jabón, fueron sembrados en macetas con BM2® (mezcla para germinar) y arena 2:1, llevados a invernadero, riego cada dos días, 20°C día, 10°C noche, revisión diaria de los tubérculos sembrados y semanal de brotes y raíces, registrados a los 8, 15, 30 y 60 días. A los 30 días se dispusieron a temperatura a la ambiente (aproximadamente 18°C día y 10°C noche).

### **Introducción del material vegetal a condiciones in vitro**

Esquejes nodales fueron cortados de un tamaño de 2 cm cada uno y lavados con abundante agua y extrán, sumergidos en solución de Tween 20, 8 mL / 100 mL de agua destilada estéril, Isodine® al 3,5 % por 30 minutos, cuyo ingrediente activo es yodo polividona, hipoclorito de sodio 2,5 % por 15', enjuague 3 veces con agua destilada estéril entre cada paso por 5'.

### **Establecimiento in vitro de explantes**

Se emplearon segmentos uninodales desprovistos de hojas con una longitud de 15 mm, procedentes de tallos de las plantas donantes, los explantes fueron sembrados individualmente en 20 mL de medio/frasco, se utilizaron 12 frascos/tratamiento, se evaluó contaminación a los 3, 5, 8 y 15 días de sembrados. Los medios empleados fueron los siguientes:

- i. Medio M&S (1962), Tiamina 3 mL/L, BAP 2 mL/L, carbón activado 3 mL/L, Sacarosa 30 g/L, Agar 5 g/L.
- ii. Medio M&S (1962), Vitaminas Morel 2 mL/L, Ácido Fólico 1 mL/L, L-Asparagina 4 mL/L, Cisteína 10 mg/L, Sacarosa 30 g/L, Agar 5 g/L.
- iii. Medio M&S (1962), Tiamina 3 mL/L, BAP 1 mL/L, AG<sub>3</sub> 1 mL/L, Putrescina 2 mL/L, Sacarosa 30 g/L, Agar 5 g/L.

### **Extracción y análisis de metabolitos secundarios**

Tubérculos recolectados fueron lavados, cortados y secados en estufa con circulación forzada de aire durante 48 h. Posteriormente fueron molidos en un molino de martillos y se realizó la extracción con metanol, por percolación exhaustiva. El solvente fue retirado del extracto empleando rotavaporador rotatorio acoplado a una bomba de vacío a 38 °C. Una vez obtenido el extracto seco, se procedió a la caracterización de cada uno de los extractos por la técnica de Cromatografía en capa delgada (CCD), sobre sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, empleando las siguientes fases móviles:

- i. Metanol: Cloroformo: Ácido Acético. 6:6:1,
- ii. Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido glacial acético: Agua. 100:11:11:27,
- iii. Cloroformo: Acetato de etilo 4:1,
- iv. Metanol: Cloroformo: Ácido Acético 7:3:1,
- v. Acetato de etilo: Metanol: Ácido fórmico: Ácido glacial acético 100: 27: 11:11,
- vi. Metanol: Cloroformo 9:1.

Las placas se revelaron con los reactivos de Godín (Vainillina en etanol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol) y anisaldehído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Tabla 1.** Especies silvestres utilizadas para extracción (Diferentes colectas).

Muestras	Tubérculo seleccionado
M1	<i>Dioscorea lehmannii I</i>
M2	<i>Dioscorea lehmannii II</i>
M3	<i>Dioscorea lehmannii III</i>
M4	<i>Dioscorea coriacea I</i>
M5	<i>Dioscorea coriacea II</i>
M6	<i>Dioscorea polygonoides</i>

### **Análisis estadístico**

Para determinar el medio con mejores resultados y verificar diferencias significativas, se realizó un análisis de varianza ANOVA, con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , mediante el programa Statistix de Windows®.

### **Resultados y discusión**

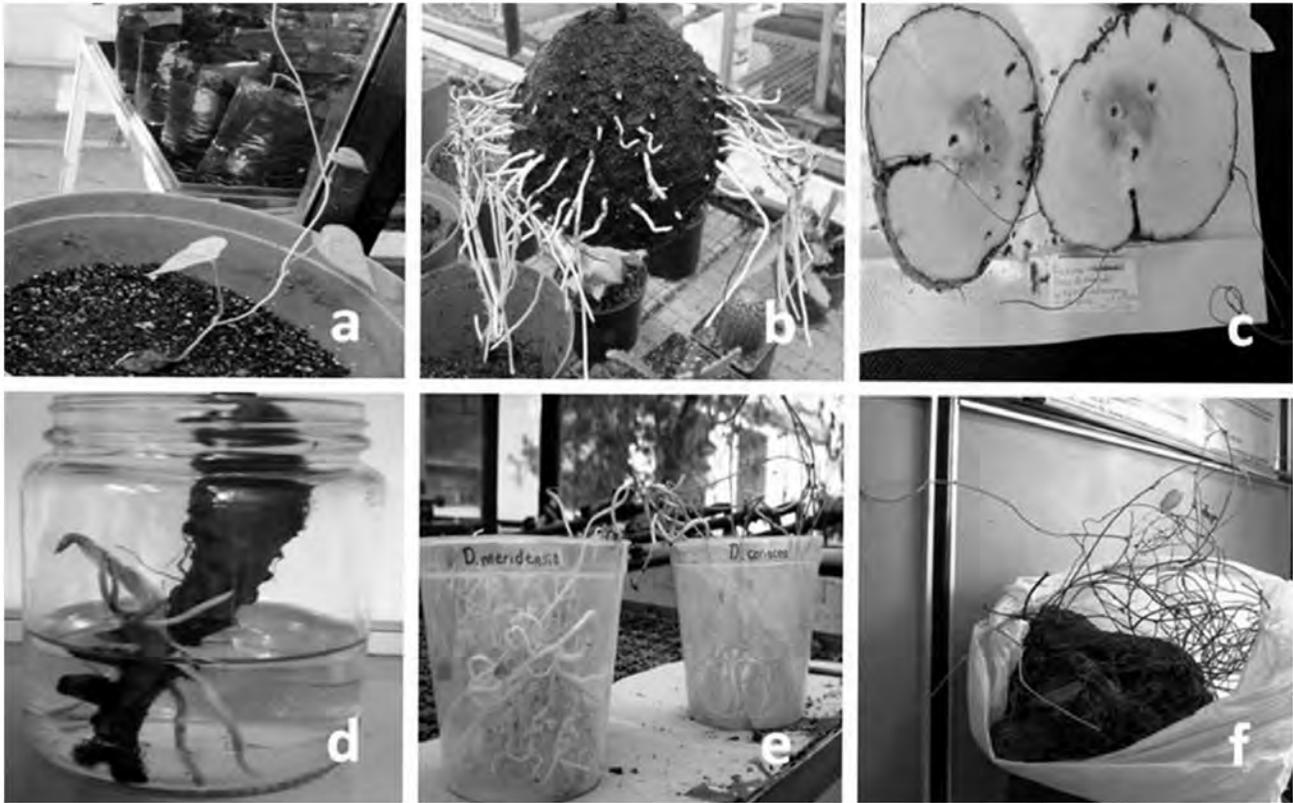
#### **Selección del material**

El material recolectado en plazas de mercado fue identificado taxonómicamente como *D. lehmannii*, tubérculos donados en secciones, fueron identificados como *D. coriacea* y *D. meridensis*. Tubérculos recolectados provenientes de campo fueron identificados como *D. coriacea*, *D. polygonoides* y *D. lehmannii*. Tubérculos de *D. trifida* provenían de la región de Chocó, de una plaza de mercado en Quibdó. Tubérculos de *D. polygonoides* solo fueron usados para obtención de un extracto de referencia. El material de *D. coriacea* correspondió al tubérculo donado por laboratorio del Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia de la Universidad Nacional. Los tubérculos de *Dioscorea spp.* fueron adquiridos en plazas de mercado, se les atribuye que previenen y alivian dolencias relacionadas con el sistema sanguíneo, purificador o reconstituyente, sin embargo, tubérculos de diferentes especies son ofertados bajo el mismo nombre de zarzaparrilla, lo cual genera incertidumbre sobre el efecto

fitoterapéutico atribuido. La figura 1 y la tabla 2 presentan el material recolectado.

Pinzón (2011), registró 72 puestos de plantas medicinales en 26 puntos comerciales distribuidos en 12 de

las 20 localidades de Bogotá D.C. plazas primarias, secundarias y puestos individuales, siendo *D. coriacea* y *D. meridensis* (62 - 60%), las especies con mayor oferta en Bogotá. *D. lehmannii* también fue adquirida en varios puntos de venta de la ciudad.



**Figura 1.** Tubérculos de *Dioscorea* recolectados. **a.** *D. lehmannii* en salida de campo, **b.** *D. lehmannii* en plaza de mercado cortado punta de base, **c.** *D. coriacea* cortados en secciones almacenados en bolsas herméticas, **d.** *D. trifida* **e.** *D. coriacea* y *D. meridensis* donados por laboratorio en secciones, **f.** *D. coriacea* donado por laboratorio.

**Tabla 2.** Tubérculos seleccionados.

Tub.	Especie	Procedencia y
T1	<i>D. lehmannii</i>	Salida de campo. Tubérculo completo,
T2	<i>D. lehmannii</i>	Plaza de Mercado. Corte de base
T3	<i>D. lehmannii</i>	Plaza de mercado. Tubérculo completo
T4	<i>D. trifida</i>	ICN. Tubérculo completo
T5	<i>D. coriacea</i>	ICN. Cortados en secciones
T6	<i>D. meridensis</i>	ICN. Cortados en secciones
T7	<i>D. coriacea</i>	GIFFUN. Tallos y hojas

Al colocar los tubérculos en bolsas plásticas se generaron abundantes brotes, siendo la especie *D. coriacea* (figura 1f) la que mayor número de brotes desarrolló. Similares resultados reportaron Hata y colaboradores (2003) quienes reportaron dormancia en el período comprendido entre la cosecha del tubérculo y el almacenamiento en bolsas herméticas del material en tubérculos de *D. rotundata*, material del que se obtuvo mayor contenido de sapogeninas y presencia de diosgeninas, infiriendo que el fenómeno de dormancia tiene relación con un aumento en el contenido de algunas sapogeninas, posiblemente porque al consumirse almidón del tubérculo para la formación de tallos, la proporción de sapogeninas aumenta, con respecto a la cantidad de material seco.

Los tubérculos colocados previamente en bolsas herméticas presentaron brotes nodales (T1, T5, T6, T7),

como era de esperarse los tubérculos sembrados en BM2® y asperjados con AG<sub>3</sub> produjeron abundantes raíces (T2, T3, T4), debido a la acción que cumplen las giberelinas en la activación del metabolismo, síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva para generar la elongación del embrión o en este caso la formación de raíces. Tubérculos de la especie *D. lehmannii* y *D. trifida* (T2,T3,T4), que solamente produjeron raíces y no brotes, no fueron utilizados dentro de los ensayos debido a que el material, los diseños de desinfección y establecimiento eran para yemas nodales.

La acción del AG<sub>3</sub> no es tóxica para humanos ni animales y es de fácil manejo. Las técnicas pueden variar de inmersión del tubérculo o aspersión, esto depende de la variedad y del estado de reposo en que se encuentran los tubérculos, causando en muchas variedades la brotación cuando el período de reposo casi ha finalizado. Para inmersión, Marca (1997) sugiere que los tubérculos recién cosechados sean lavados y desinfectados, se deben secar al aire y luego sumergir en una solución de AG<sub>3</sub> (5 ppm) por 10 minutos. Después del tratamiento los tubérculos deben secarse y colocarse en una cámara o ambiente caliente entre 18 y 25°C para inducir la brotación. Luego de 15 días el brotamiento es abundante.

### Estudio y determinación de la especie

Especies identificadas provenientes de campo fueron registradas de acuerdo a sus características (ver materiales y métodos), y comparadas con ejemplares del género *Dioscorea* en el Herbario Nacional Colombiano (ver tabla 3). Información sobre la distribución de las especies fue consultada en la base de datos del Herbario ([www.biovirtual.unal.edu.co](http://www.biovirtual.unal.edu.co)). La mayoría de las especies de *Dioscorea* son de latitudes tropicales, con pocas excepciones en Norteamérica, Europa y el oriente de Asia. Wilson (1977) incluye a las especies asiáticas *D. japonica* y *D. opposita*, como tolerantes a heladas, sin embargo para *D. alata* y especies tropica-

les comestibles, temperaturas inferiores a los 20 °C restringen el crecimiento y se favorece con temperaturas entre 25 y 30 °C, limitados por el rango de latitudes comprendido entre 20° N y 20° S y altitudes máximas de 1000 msnm.

Se puede inferir que las especies silvestres de *Dioscorea* poseen diferencias significativas en sus condiciones de adaptación frente a las especies comestibles, siendo un factor importante el contenido de diosgenina o de saponinas derivadas de ésta, el cual es proporcional al consumo de almidón por parte del tubérculo, que es mayor en las condiciones agroecológicas de bosques, subpáramos y páramos, donde se encuentran las especies silvestres que generalmente crecen sin mayor atención por parte del agricultor.

### Adaptación de ñame silvestre

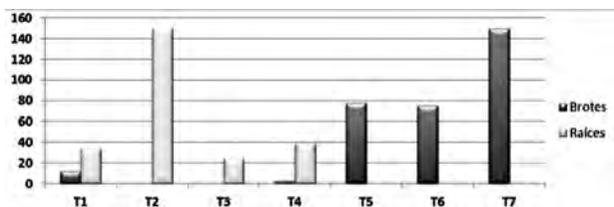
Todos los tubérculos de *D. lehmannii* (T2, T3), especies silvestres de *Dioscorea* traídas de campo (T1) y de *D. trifida* (T4), se sembraron a las mismas condiciones, presentando brotación de raíces más lenta. En las condiciones de siembra los tubérculos presentaron brotes y raíces simultáneamente. El material donado de laboratorio, se sembró en invernadero, al igual que las secciones de diferentes especies donadas por el Instituto de Ciencias Naturales (T5, T6).

La figura 2, permite determinar que solo los tubérculos colocados previamente en bolsas herméticas produjeron brotes, y que los asperjados con AG<sub>3</sub> produjeron raíces, lo cual no era favorable para el establecimiento. Es posible, que la humedad generada en las bolsas favorezcan el crecimiento del follaje por las altas tasas respiratorias, y la ausencia de esta fase de humedad con adición de AG<sub>3</sub> genere raíces y no brotes, debido a las tres fases del ñame designadas como reposo, crecimiento vegetativo y crecimiento reproductivo. La brotación de los tubérculos señala la finalización del período de reposo y el inicio de la fase vegetativa, ca-

**Tabla 3.** Altitudes registradas para las especies silvestres recolectadas (ICN).

Especies	Colecciones en COL	Alt. Mín.	Alt. Máx.	Alt. Max. prom	Alt. Min. prom
<i>D. coriacea</i>	66	400	3700	2212,5	2317,6
<i>D. lehmannii</i>	16	1650	3600	2521,4	2621,4
<i>D. meridensis</i> *	17	500	2500	1708,8	1738,8
<i>D. polygonoides</i> *	53	10	2000	1283,8	1328,9
<i>D. trifida</i>	23	5	1120	244,6	255,4

\* Datos actualizados en Raz (2015)



**Figura 2.** Crecimiento de Brotes y Raíces de *Dioscorea* T1-T4 Invernadero, T5-T7 Donados.

racterizada por un rápido crecimiento de los tallos y las hojas.

Haynes *et al.*, (1967) indicó para *D. alata* que la fase reproductiva inicia cuando la tuberización alcanza una tasa de crecimiento exponencial, la cual coincide con una reducción del crecimiento de los tallos y las hojas, la fase reproductiva del ñame coincidiría con la floración seguida por la maduración de los tubérculos.

Los tubérculos tratados con AG<sub>3</sub>, presentaron raíces, teniendo en cuenta que el tipo de explante requerido eran brotes o yemas, no fueron empleados para la fase de establecimiento. Así mismo tubérculos cortados en secciones y almacenados en bolsas presentaron mejores resultados, reflejados en mayores brotes, lo cual concuerda con Fergusson (1977), que uso secciones de tubérculos de *D. alata*, siendo menor el tiempo necesario para iniciar el crecimiento de los tubérculos. Estos resultados permiten interpretar que esta fase está caracterizada por una acelerada división celular y expansión de células que posteriormente estarán involucradas en la microtuberización.

### Desinfección del material vegetal

El material utilizado provenía de condiciones donde la presencia de microorganismos o agentes contaminantes es elevada. Solamente el protocolo que incluyó Isodine® (Yodo PVP), como desinfectante, tuvo resultados favorables, la calidad del explante (invernadero, campo o laboratorio), así como también el tipo de explante (raíz o tallo) también fueron factores importantes en el establecimiento. Bonafont (2011), indica para el Isodine®, que la solución en sí no es activa, pero libera el yodo lentamente, que es el que posee la actividad bactericida, penetrando a través de la pared celular y combinándose con diferentes sustratos orgánicos, mediante reacciones de oxidoreducción.

Los mejores resultados se obtuvieron de yemas jóvenes provenientes de las puntas de los tallos, donde posibles contaminantes endógenos no habían invadido los haces vasculares de la planta.

### Establecimiento de explantes

Explantes nodales del medio iii reportaron brotes 30 días después de sembrados (0.2 – 0.5 cm), a los 60

días aún no estaban listos para multiplicación (1 – 1.5 cm), en el medio i el crecimiento se reportó a los 45 días de sembrados debido a la ausencia de reguladores y el medio ii tampoco presentó mayor desarrollo de brotes (0.8 – 1 cm).

Segmentos nodales de *D. coriacea* donados por laboratorio, presentaron mejores resultados en el medio iii (1 – 1.5 cm), que contenía BAP y AG<sub>3</sub> como reguladores de crecimiento, los resultados fueron favorables en el medio que se adicionó AG<sub>3</sub>, el cual es empleado para el crecimiento de los tallos y fundamentalmente para el rompimiento en la dormancia de algunas especies. (Ver figura 3)

La poliamina Putrescina es considerada un regulador de crecimiento y desarrollo de plantas por su efecto demostrado sobre el crecimiento, la división y la diferenciación celular en bajas concentraciones. En el diseño del medio se incluyó la putrescina por su capacidad antioxidante y estabilizadora de las membranas (Perea, 2010).

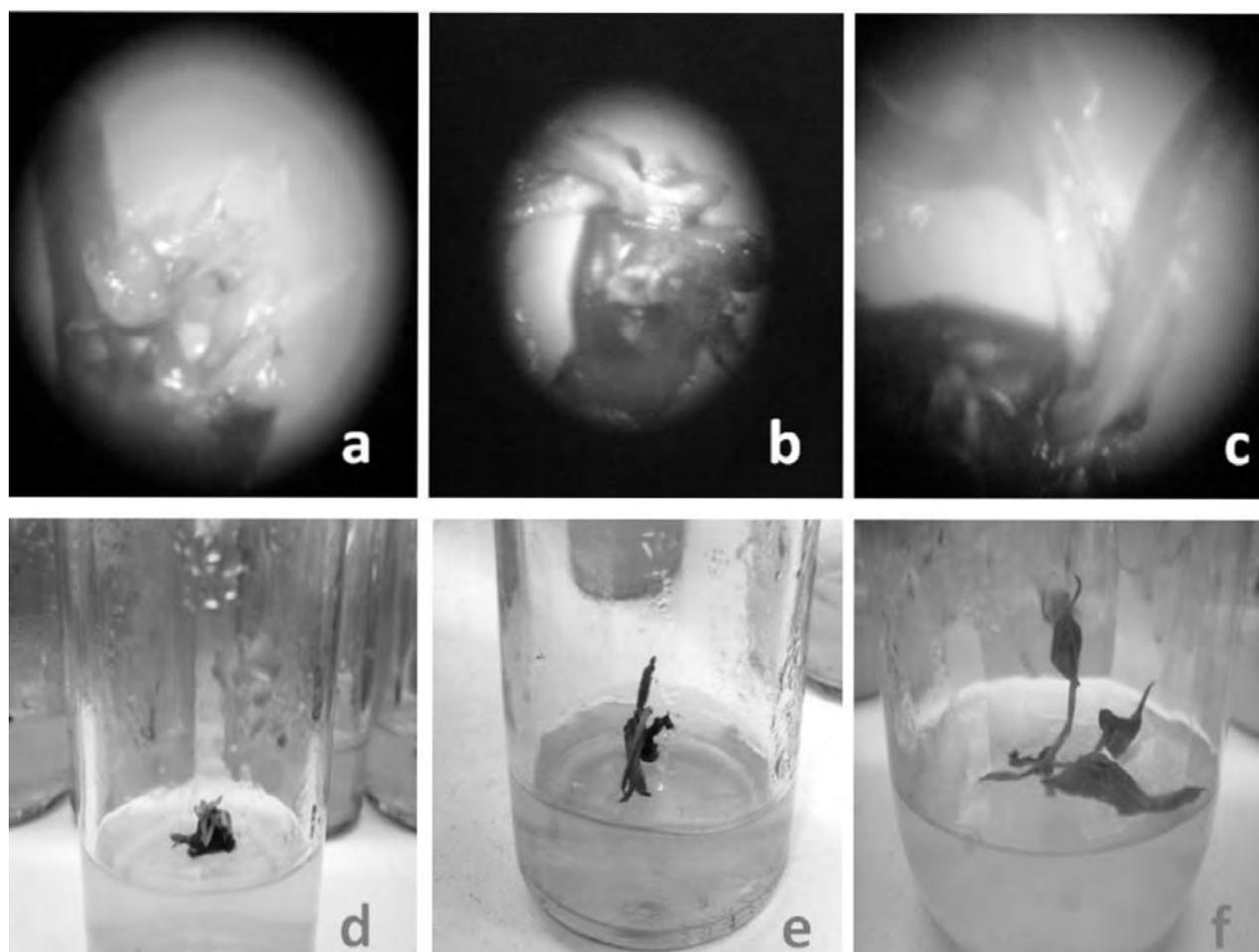
Los análisis estadísticos permitieron determinar que el mejor tratamiento fue T3 (iii), encontrando una diferencia significativa a los 30 y 60 días de 0,0578. No se encontraron diferencias significativas en T1 y T2.

### Extracción y análisis de metabolitos secundarios

Las placas revelaron que todas las muestras contienen sapogeninas, el color y la formación de espuma, fue un indicador cualitativo, las bandas revelaron mayor concentración en las muestras que presentaban un color rojo más fuerte.

El solvente de extracción fue el metanol que presentó mayor proporción de sustancias polares. La fase móvil que permitió obtener un mejor perfil de los extractos está constituida por una mezcla de Acetato de etilo: Metanol: Ácido fórmico: Ácido glacial acético 100: 27: 11:11, una fase móvil frecuentemente empleada para la detección de flavonoides. (Ver figura 4)

Las diferentes placas cromatográficas permitieron determinar que hay un grupo de compuestos orgánicos de alta polaridad presentes en los extractos de *D. coriacea*, *D. lehmannii* y *D. meridensis*, y permitieron corroborar que en todas las especies evaluadas hay presencia de sapogeninas, debido a la formación de espuma como indicador cualitativo. La cromatografía en capa delgada mostró compuestos tipo sapogeninas más polares que las presentes en *D. polygonoides*, lo que permite inferir un alto grado de glicosilación. Como ya habían observado Hata y colaboradores (2003), al analizar los metabolitos presentes en *D. rotundata*; la concentración de sapogeninas obtenidas para cada muestra están relacionadas con el número de sapogeninas detectadas, concluyendo que existe una correlación entre ambos resultados, es decir que *D. rotundata* presentó un mayor número de sapogeninas y una mayor concentración de estos compuestos.



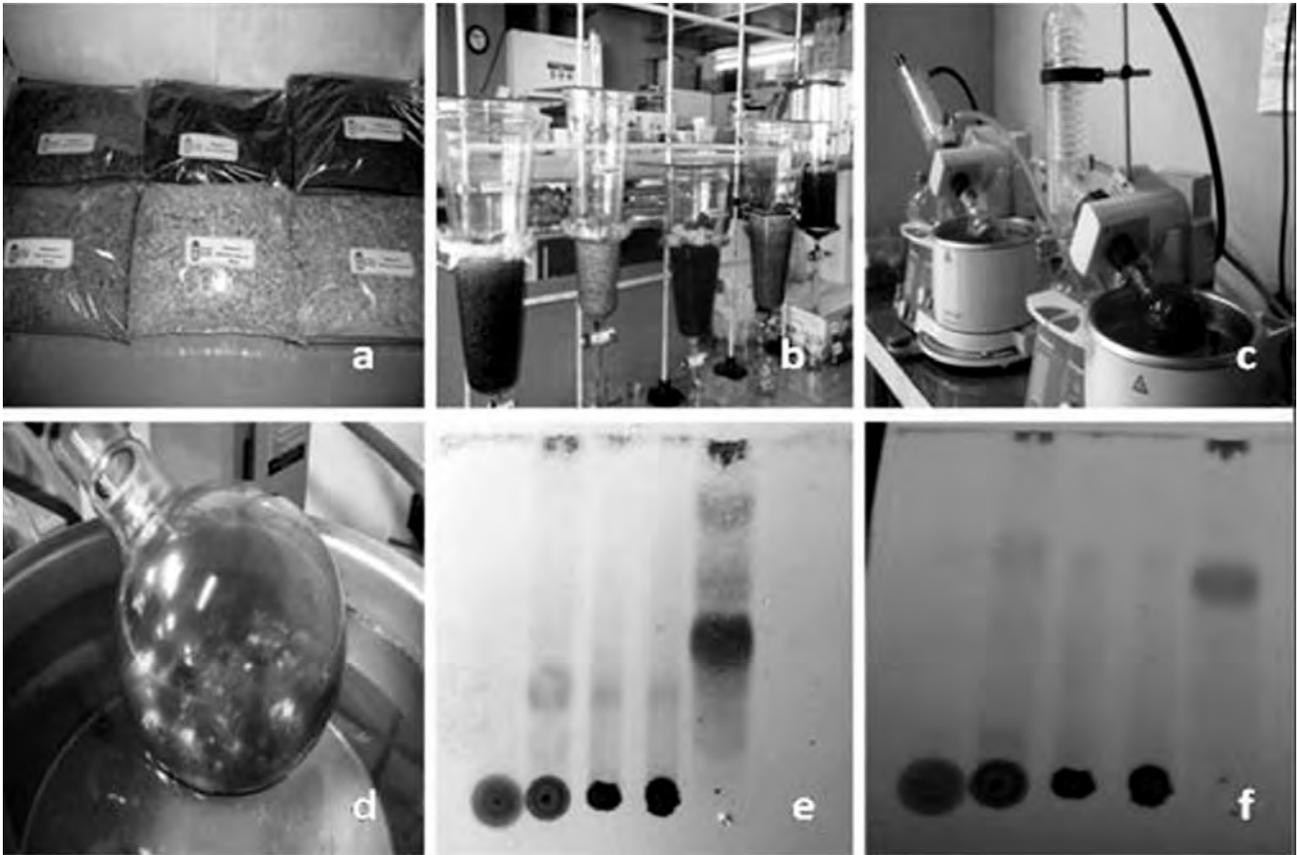
**Figura 3.** Establecimiento explantes de *D. coriácea*. **a, b.** Brotes observados en estereoscopio después de 30 días, **c.** Brotes después de 60 días, **d.** Yemas nodales 30 días, **e.** Yemas nodales 60 días **f.** Yemas nodales 90 días después de establecidas.

Los resultados de la extracción (tabla 4) mostraron que el mayor rendimiento se obtuvo con *D. coriácea*, con un rendimiento de 54 y 21% para cada muestra procesada, seguida por *D. polygonoides* y *D. lehmannii*. Las placas revelaron sustancias polares (figura 4e y 4f), sin embargo en las diferentes especies se detectan grupos de metabolitos diferentes a saponinas que re-

velaron de color amarillo con el reactivo de Godin. Estos resultados conllevan a proponer análisis por CLAE (cromatografía líquida de alta eficiencia), o aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios para determinar su naturaleza química. Al variar de especie se detectan grupos de metabolitos diferentes, no solo saponinas, y otros metabolitos que presentan

**Tabla 4.** Pesos obtenidos en las muestras y rendimiento de saponinas.

Muestra	Material seco (g)	Extracto seco (g)	Rendimiento (%)
M1 (DI I + DI II)	413,68	72,48	17
M2 (DI III)	487,3	24,101	5
M3 (Dc I)	567,9	120,98	21
M4 (Dc II)	616,5	330,46	54
M5 (Dp)	265	49,66	18



**Figura 4.** Extracción de metabolitos secundarios. **a.** Tubérculos de ñame molidos y empacados, **b.** Montaje en percoladores, **c,** **d.** Extracción de solvente metanólico en rotavaporador **e.** Revelado de la placa con reactivo de Godin **f.** Revelado de las bandas con ultravioleta.

color amarillo y que también se convierten en objeto de estudio por medio de análisis más detallados como HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia), o aislamiento de los metabolitos para identificación por análisis de Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo, entre otros.

En estudios realizados por Flores (2010), registrado por Reina (2012), en el documento de Trabajo sobre Economía Regional del Ñame, evaluaron el contenido de saponinas en ocho especies incluida *D. polygonoides*, existentes en la región Caribe con el fin de determinar su potencial uso con fines medicinales y farmacéuticos. Las especies analizadas fueron *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, *D. dodecaneura*, *D. esculenta*, *D. polygonoides*, *D. rotundata* y *D. trifida*. Los resultados mostraron que la especie *D. polygonoides* es la de mayor presencia de saponinas.

Igualmente Hata y colaboradores (2003) encontraron saponinas en *D. alata* y *D. rotundata*, estos resultados se basaron en la hidrólisis de las saponinas para obtener las saponinas libres, el estudio presentó una forma práctica para detectar saponinas por cromatografía en capa delgada de tipo diosgenina/yamogenina

y tigogenina/neotigogenina en la mayoría de las accesiones, empleando *D. polygonoides* como referencia al considerar que esta especie ha sido ampliamente estudiada y se conoce la polaridad y estructura de las saponinas y terpenos.

La especie *D. coriacea* presentó un extracto del 54% en base seca, por lo que constituye una especie con aparente alto potencial de contenido de saponinas, si tenemos presente el valor fitoterapéutico que se le reconoce en su uso tradicional y popular en el tratamiento de diferentes condiciones de salud como la hipercolesterolemia y la diabetes, se amplía su potencial. Como ya mencionaban Hata y colaboradores (2003), “un mejoramiento de estas especies puede convertir las en especies promisorias para la obtención de saponinas esteroidales”.

### Conclusiones

Las mejores condiciones para la formación de brotes se lograron colocando el material por aproximadamente 30 días en condiciones de temperatura de 18°C día y 10°C noche.

Los medios de cultivo con una dosis de 1 mL/L de AG<sub>3</sub>, resultaron los más apropiados en la formación de brotes en *D. coriacea*, bajo las condiciones de experimentación. Medios de cultivo que contenían solamente BAP indujeron la formación de callos, igualmente la poliamina Putrescina resultó efectiva como antioxidante.

Las especies silvestres de *Dioscorea* que fueron recolectadas, presentaron alto contenido de saponinas, indicadores cualitativos como la actividad tensoactiva revelada por la formación de espuma, y la presencia de las bandas por CCD que manifiestan como positivas estos metabolitos.

Como resultado de este trabajo, se propone un procedimiento para establecer a condiciones *in vitro* la especie *D. coriacea*, la cual podrá ser implementada a otras especies e igualmente permitirá el diseño de medios de cultivo para las etapas de multiplicación, enraizamiento y microtuberización.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia y a los apoyos científicos otorgados por la Doctora Margarita Perea Dallos y el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma / Bayamo - Cuba, especialmente al Doctor Misterbino Borges.

### Referencias bibliográficas

Bonafont, X. (2012). Antisepsia y desinfección en el hospital. Recuperado: 20 de noviembre de 2012 en <http://www.combino-pharm.es/wp-content/uploads/2014/07/MONO-GRAFIA-ANTISEPTICOS.pdf>. 13 - 14.

Fergusson, T. U. (1977). Tuber development in yams; physiological and agronomic implications. In Third Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. Proceedings. Ibadán, Nigeria. *International Institute of Tropical Agriculture*. 72 - 77.

Flores, G. (2010). Evaluación del contenido de saponinas en ocho especies de ñame (*Dioscorea spp.*), y actividad antioxidante de los extractos clorofórmicos. XXIX Congreso Latinoamericano de química.

Food Agricultural Organization (2012). Iniciativa mundial de fitomejoramiento. *The way forward to strengthen national plant breeding and biotechnology capacity*. Recuperado: febrero 4 de 2012 en: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0606sp1.htm> en.

Hata, Y., Reguero, M. T., de García, L. A., Buitrago, G., & Álvarez, A. (2003). Evaluación del contenido de saponinas en variedades nativas de ñame (*Dioscorea spp.*) provenientes de la co-

lección de la Universidad de Córdoba. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéutica*, 32(2), 149-57.

Haynes, P. H., Spence, J. A., & Walter, C. J. (1967, April). The use of physiological studies in the agronomy of root crops. In 1st. *International Symposium Society for Tropical Root Crops* (Vol. 3, pp. 1-15).

International Plant Genetic Resources Institute - International Institute of Tropical Agriculture (1997). *Descriptores para el ñame (Dioscorea spp.)*. Recuperado de [http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx\\_news/Descriptores\\_para\\_el\\_%C3%B1ame\\_\\_Dioscorea\\_spp.\\_\\_481.pdf](http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Descriptores_para_el_%C3%B1ame__Dioscorea_spp.__481.pdf)

Knuth, R. (1924). *Dioscoreaceae* En A. Engler (editor) *Das Pflanzenreich* Vol. IV.43. 387 pp. Engelmann, Leipzig.

Marca, J. (1997). Métodos para acelerar el brotamiento de los tubérculos - semillas, Producción de tubérculos, manual de capacitación. Centro Internacional de la Papa (CIP).

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Perea, M., & Buitrago, G. (2000). Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. Ñame: producción de semillas por biotecnología. Ed.: M Guzmán y G Buitrago. Universidad Nacional de Colombia. Editorial Unibiblos. Bogotá, DC, 17-19.

Perea, M. (2010). Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*, Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología, sede Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 21 - 27, 34.

Pinzón, A. (2011). *Uso Medicinal tradicional de Dioscorea (Dioscoreaceae) en Bogotá D.C., Colombia* Contribución que hace parte del proyecto "Sistemática y etnobotánica del género *Dioscorea* en Colombia". Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Raz, L. (2015) *Dioscoreaceae* en Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de: <http://catalogoplantascolumbia.unal.edu.co>

Reina, A. (2012). Documentos de Trabajo sobre Economía Regional. *El cultivo del ñame en el Caribe Colombiano*. Banco de la República, Centro de Estudios Económicos Regionales. Cartagena, Colombia.

Statistix, 8. (2003). *Statistix 8: Analytical Software User's Manual*. Tallahassee, Florida, U.S.A.

United States Department of Agriculture. (2012). National Agricultural Library. Recuperado: 03 de febrero de 2012 en <http://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe?k=default&l=115&w=33776&n=1&s=5&t=2>

Waizel, J. B. (2009). El uso tradicional de las especies del género *Dioscorea*. Departamento de Investigación. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. *Revista de Fitoterapia*, 9 (1) 53-67.

Wilson, L. A. (1977). Root Crops. In: Alvin, P. T.; Kozłowski, T. T. Eds. *Ecophysiology of tropical Crops* - New York, Academic Press. 187 - 236.