

Identificación preliminar de metabolitos secundarios producidos por callos inducidos en "Corpus Way" *Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex J.s. Pringle

*Preliminary Identification Secondary Metabolites Produced in Induced by Callos "Corpus Way" *Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex J.s. Pringle.*

SOLÓRZANO ACOSTA, Andi¹; RUÍZ REYEZ, Guillermo ²; VENEGAS, Edmundo ³

RESUMEN

El corpus way está considerada en el folklore medicinal peruano por sus propiedades estimulantes del apetito, curativas de enfermedades hepáticas (Ríos y Ventura, 1991; Colquicocha y Lozano, 2001), purificador sanguíneo y contra el acné (Bussman *et al.*, 2008). La planta completa se usa en forma de infusión. La presente investigación permitió identificar los metabolitos secundarios producidos por los callos inducidos en Corpus Way, a la vez contribuir al conocimiento sobre la composición química de la planta y la posibilidad de producir sus metabolitos secundarios mediante el cultivo de tejidos.

Se determinó el protocolo para la introducción *in vitro* de las hojas y para inducir la callogenesis.

Para identificar los metabolitos secundarios presentes en las plantas recolectadas en el distrito de Quiruvilca se obtuvieron extractos con etanol y agua correspondientemente y se analizaron por la prueba de "la gota" en la marcha fitoquímica preliminar. Los metabolitos secundarios producidos por los callos inducidos en "Corpus Way" con 2ppm de 2,4-D. y 0.2 ppm de Kinetina en medio de cultivo *in vitro* Murashige- Skoog a partir de una hoja juvenil de una planta en floración a los cuarenta días de introducida y diez días de desarrollados los callos fueron: esteroides, flavonoides, taninos, leucoantocianidinas y aminoácidos libres. Los callos fueron compactos y con una tasa de crecimiento de 0.375mm por día. Hasta los diez días de desarrollo del callo no se encontraron quinonas, cardiotónicos y saponinas que si se encontraron en las plantas recolectadas.

Palabras clave: Corpus way, *gentianella*, biotecnología, metabolitos secundarios, callos.

ABSTRACT

The corpus way is a peruvian medicinal plant, is used commonly for hepatic disease, appetite increase (Ríos y Ventura, 1991; Colquicocha y Lozano, 2001), clear blood and against the acne (Bussman *et al.*, 2008). The plant complete is used in infusion. The present investigation was identify the secondary metabolites produced by callus induced in Corpus Way, at a time contribute on knowledge upon the chemical composition of the herb and the possibility of producing yours secondary metabolites through the tissue culture. It determined the protocol for the *in vitro* and for inducing the callogenesis. For identify the secondary metabolites presents in, the plants recollected in Quiruvilca district its separated in flowers, roots and leafs and to start of its obtained extracts with dichloromethane, ethanol, acid water and water, respectively. The extracts are analysed by test of "the drop" in Preliminary Assay Phytochemical. The secondary metabolites produced by callus in "Corpus Way" induced with 2ppm of 2,4-D. and 0.2 ppm of Kinetin in médium culture *in vitro* Murashige- Skoog to start of a young leaf of plant flowering at forty days of introducing and ten days of development of callus be: esteroids, flavonoids, tannins, leucoantocianidins and free aminoacids. The callus be compacts and with rate of growth of 0.375mm for day. Up to ten days of callus development it not find quinones, cardiotonics and saponins that if it find in the recollected plants.

Key words: Corpus way, *gentianella*, biotechnology, secondary metabolites, callus.

¹Ingeniero Agrónomo. Asesor en Biotecnología vegetal. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Trujillo.andi.solorzano@gmail.com

²Profesor de Farmacognosia y Farmacomórfica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo.guille_ruiz2012@hotmail.com

³Profesor de Farmacognosia y Farmacomórfica. Universidad Nacional de Trujillo.edmundo373@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La *Gentianella bicolor* (Wedd.) es una especie silvestre que sólo se ha reportado para los andes norperuanos de los departamentos de La Libertad, Cajamarca, Piura, Ancash entre los 2500 y 4200 m.s.n.m. (Villanueva y Rodríguez, 1991).

Su floración es estacional, según pobladores de la zona, en los meses de mayo a julio. Las semillas germinan en los meses de lluvias tempranas de setiembre a noviembre y crecen de diciembre a marzo para poblar los cerros en floraciones escalonadas. Los cultivos celulares de plantas medicinales son utilizados para la producción de metabolitos complejos a gran escala. El desarrollo de estos cultivos y la optimización de la producción de metabolitos, puede ser de gran utilidad para el desarrollo de la industria (producción de compuestos en biorreactores); así como, para identificar compuestos de alto valor que permitan aumentar la consideración e interés, por diversas instituciones y empresarios, de nuestras especies nativas (Villamil y Bonnecarrere, 2005).

Investigaciones fitoquímicas de especies americanas entre ellas *Gentiana affinis*, *G. álgida*, *G. calycosa*, *G. cerastioidea*, *G. detonsa* y *G. strictiflora*, determinaron la quimiotaxonomía de las *Gentianas*, caracterizadas por la presencia de principios amargos, secoiridoides glicosidados; flavonas C-glicosidadas y xantonas (agliconas y glicósidos). Secoiridoides y flavonas C-glicosidadas ocurren en casi todas las especies estudiadas, pero

las xantonas demostraron ser los marcadores más útiles (Hostettmann *et al.*, 1981). Las *Gentianas* como se ha mencionado, son conocidas por tener xantonas y secoiridoides, dos clases de compuestos con interesante actividad biológica. Las xantonas son pigmentos fenólicos amarillos, estructuralmente se relacionan con los flavonoides. Ciertamente xantonas como bellidifolina (1,5,8-trihidroxi-3-metoxixantona) y gentiacauleina (1,5,8-trihidroxi-3-metoxixantona) y gentiacauleina (1,3-dihidroxi-7,8-dimetoxixantona) son potentes inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO); mientras los secoiridoides son principios amargos usados como tónicos amargos (Wolfman *et al.*, 1993).

En especial por su potencial farmacológico no conocido en su totalidad y por la ausencia de antecedentes de cultivo *in vitro* de Corpus Way a fin de fomentar su aprovechamiento sustentable y conservación necesaria ante las quemadas de pastos naturales y destrucción de sus poblaciones ubicadas en zonas de actividad minera, se planteó en el presente trabajo el objetivo de determinar la concentración o concentraciones adecuadas de 2,4-D y de kinetina en la inducción de callos en "Corpus Way" y comparar preliminarmente los metabolitos secundarios producidos por los callos inducidos y las plantas recolectadas para la producción de metabolitos secundarios.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

Se recolectó 30 plantas en junio; con flores en botón, a raíz desnuda y fueron empaquetadas en cajas de cartón cubiertas con periódico humedecido en agua para ser transportadas al laboratorio de farmacognosia de la Universidad Nacional de Trujillo, donde se mantuvieron en dichas condiciones para la obtención de explantes cada vez que se necesitó cultivar por el tiempo que sobrevivió la planta y la otra mitad se seco y proceso para la marcha fitoquímica según la metodología propuesta por Lock (1994).

Ensayo de callogenesis

A las hojas tratadas con 2000 ppm de ácido ascórbico por diez minutos seguidamente desinfectadas con lejía al 10% durante diez minutos, se les cortaron las bases pecioladas bajo condiciones asépticas en una cámara de siembra. Los explantes se cultivaron en frascos con medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con sacarosa al 3% y agar al 0,58% como agente solidificante. El pH del medio se ajustó a 5,6 con NaOH 0,5 N.

Para la inducción de callos se aplicaron los siguientes tratamientos especificados en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos para inducir callogenesis

Tratamiento (Clave)	DESCRIPCIÓN TRATAMIENTOS			ENPLANTE (segmento de hoja)	Nº de repeticiones (Bancos)
	MEDIO BASAL	2,4-D (ppm)	KINETINA (ppm)		
TO-A	MS	0	0	Adulta	5
TO-B	MS	0	0	Joven	5
T1	MS	0.2	0.1	Adulta	5
T2	MS	0.2	0.1	Joven	5
T3	MS	0.2	0.2	Adulta	5
T4	MS	0.2	0.2	Joven	5
T5	MS	0.5	0.1	Adulta	5
T6	MS	0.5	0.1	Joven	5
T7	MS	0.5	0.2	Adulta	5
T8	MS	0.5	0.2	Joven	5
T9	MS	1	0.1	Adulta	5
T10	MS	1	0.1	Joven	5
T11	MS	1	0.2	Adulta	5
T12	MS	1	0.2	Joven	5
T13	MS	2	0.1	Adulta	5
T14	MS	2	0.1	Joven	5
T15	MS	2	0.2	Adulta	5
T16	MS	2	0.2	Joven	5

Las frascos (con 30ml de medio) cultivados para cada tratamiento se colocaron en el estante de incubación con 24 h de luz a 16 ± 1 °C de temperatura al interior del laboratorio. Se evaluaron el número de explantes que formaron callo en los distintos tratamientos, cada 5 días hasta el día 25 que se inició la callogenesis, y del día 30 hasta los 40 días se caracterizó el callo desarrollado. Se empleó el diseño estadístico completamente al azar. En los tratamientos se consideró como punto de partida las

concentraciones de fitorreguladores sintéticos normalmente usados en la inducción de callos y cultivos en suspensión en plantas medicinales productoras de triterpenos, alcaloides y flavonoides (Mulabagal *et al.*, 2004). Marcha fitoquímica preliminar para las plantas recolectadas y callos inducidos. El método usado fue la prueba de la gota para hojas, flores y raíces de plantas silvestres y callos obtenidos en laboratorio (Lock, 1994; Zari *et al.* 2010).

RESULTADOS

La planta presenta una gran cantidad de semillas (160 semillas en promedio) que haría suponer que es una planta invasora o con crecimiento desbordante así como con una alta variabilidad genética, de lo dicho, en realidad es una especie que crece en forma unitaria; esto es, caen y germinan varias semillas en un sólo punto, pero cuando se observa a la nueva planta ya desarrollada, todas las demás han desaparecido dejando solamente una sobreviviente, en todo el tiempo de colecta no se encontró creciendo más de una planta en un sólo punto.

Ensayo de callogenesis

Este ensayo comprendió 18 tratamientos, con 5 repeticiones, donde cada unidad experimental fue un frasco. El 72.2% (Tabla 2) de los tratamientos

perdidos fueron por causas ajenas al factor de estudio (concentración de fitorreguladores) debido a que los explantes murieron a los pocos días de cultivados y las repeticiones se redujeron a 3 por motivos de contaminación o muerte del explante. El callo obtenido en el tratamiento T16, de hoja joven, 2ppm de 2,4 D y 0.2 ppm de Kinetina, presenta una buena relación entre el peso y su tasa de crecimiento diario, por lo que fue seleccionado pues con esta característica podría cultivarse como un agregado celular con una amplia potencialidad para producir masa en menor tiempo. En los callos inducidos con este tratamiento, luego cultivados en mayor número, se determinó sus metabolitos secundarios.

Tabla 2. Características promedio evaluadas de los callos

TRATAMIENTO (CLAVE)	CARACTERÍSTICAS CUALITATIVAS			CARACTERÍSTICAS CUANTITATIVAS	
	TIPO DE CONSISTENCIA	COLORACIÓN	FORMA	PESO FRESCO	TASA*CRECIMIENTO (mm/día)
TO-A	0	0	0	0	0
TO-B	0	0	0	0	0
T1	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0
T5	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0
T8	0	0	0	0	0
T9	0	0	0	0	0
T10	0	0	0	0	0
T11	disgregable	Crema(variable)	amorfo	0.34	0.2
T12	0	0	0	0	0
T13	compacto	Verde claro	ovoide	0.35	0.20
T14	compacto	Verde claro	ovoide	0.36	0.23
T15	disgregable	Crema(variable)	amorfo	0.41	0.28
T16	compacto	Verde claro	ovoide	0.44	0.38



Figura 1. Curvado de la hoja a los 5 días



Figura 2. Callo disgregable de coloración variable

Cálculo de la tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento de los callos fue determinada a partir de los siguientes datos:

CLAVE	DIÁMETRO FINAL	DIÁMETRO INICIAL	TASA CRECIMIENTO(mm/día)
T11	7	5	0.200
T13	6	4	0.200
T14	6.33	4	0.233
T15	7.75	5	0.275
T16	8	4	0.375

Tasa de crecimiento= (diámetro final observado a los 40 días - diámetro inicial medido a los 30 días)/días transcurridos entre las evaluaciones de los diámetros, es decir diez días.

Del análisis de varianza para el diámetro de callos se tiene que existe una diferencia altamente significativa entre tratamientos. Para determinar con mayor claridad estas diferencias se procedió a aplicar la prueba de Duncan comparando las medias de los tratamientos. De la prueba de Duncan, que se aprecia en la Tabla 3, se tiene que todos los tratamientos son significativamente diferentes entre sí.

Tabla 3. Comparación múltiple de Duncan para diámetro de callos (mm) al 0.05 de confianza

TRATAMIENTO	PROMEDIO
T16(hoja joven+2ppm 2,4 D+0.2 ppm kin)	8 a
T15(hoja adulta+2ppm 2,4 D+0.2 ppm kin)	7.67 b
T11(hoja adulta+1ppm 2,4 D+0.2 ppm kin)	7 c
T14(hoja joven+2ppm 2,4 D+0.1 ppm kin)	6.33 d
T13(hoja adulta+2ppm 2,4 D+0.1 ppm kin)	6 e

El tratamiento T16, seleccionado, se encuentra en el límite de concentraciones empleadas en el cultivo de callos según Mulabagal *et al.* (2004), a pesar de que 5 fueron los tratamientos que produjeron callos sólo el tratamiento T16 demostró ser superior a los demás como respuesta al medio donde se desarrolló, esto sólo demuestra la especificidad que debe tener el medio de cultivo y fitorreguladores según la especie a cultivar.

Se prefirió el callo compacto de mejor aspecto, coloración uniforme y alta tasa de crecimiento (T16) como propuesta para la producción de metabolitos secundarios según Trejo y Rodríguez (2007, 2005) que mencionan que en la actualidad se tiende al cultivo de agregados celulares en vez de la tradicional suspensión celular, pues estos tejidos mejor diferenciados con respecto a las células en suspensión tienden a manifestar rápidamente las rutas biosintéticas al tener sus organelos mejor formados y funcionales al ser tejido más diferenciado.

Según Arias (2001) sólo cerca del diez por ciento del cincuenta por ciento de intentos de inducción de callos muestran alguna actividad, los callos inducidos así lo hacen pero requiere de estudios más finos para cuantificarlos y aprovechar mejor su producción.

Marcha Fitoquímica Preliminar para las plantas recolectadas

Se reporta la presencia de esteroides, quinonas, flavonoides, taninos, polifenoles, leucoantocianidinas, saponinas y aminoácidos libres en raíces, flores y hojas, de esto se colige que la distribución de estos metabolitos en la planta es amplia además de respaldar el uso popular de la planta completa. Resulta interesante la presencia de flavonoides en las raíces ya que su síntesis y acumulación por lo general está restringida a flores, frutos y semillas. No se reportaron alcaloides de los que se sospechaba su presencia inicialmente.

Tabla 4. Identificación de metabolitos secundarios en Corpus Way

TIPO DE EXTRACTO	METABOLITO SECUNDARIO	HOJAS	FLORES	RAICES
Diclorometánico	Esteroides	+	+	+
	Quinonas	-	-	-
	Cardiotónicos	+	+	+
Etanólico	Esteroides	+	+	-
	Quinonas	+	+	+
		-	-	-
	Alcaloides	-	-	-
		-	-	-
	Flavonoides	+	+	+
	Taninos	+	+	+
Acuoso-ácido (H⁺/H₂O)		-	-	-
	Alcaloides	-	-	-
		-	-	-
	Polifenoles	+	+	+
Acuoso (H₂O)	Flavonoides	+	+	+
	Leucoantocianidinas	+	+	+
	Saponinas	+	+	+
	Taninos	+	+	+
	Aminoácidos libres	+	+	+

* (+) presencia, (-) ausencia

En la marcha fitoquímica preliminar realizada para hojas, flores y raíces comparado con los resultados obtenidos por Pérez y Malca (2008), quienes no reportan contenido de quinonas, en el presente estudio si se encontraron, a las cuales se les puede atribuir el sabor amargo, ya que la planta no presenta alcaloides. Este resultado puede explicarse debido a la época de recolección, lugar y solvente empleado, ellos colectaron en febrero de la zona de Huamachuco y como solvente usaron el cloroformo. Las raíces analizadas de Corpus Way, presentaron flavonoides, resultado que es poco usual, dado que estos compuestos están relacionados generalmente con coloraciones en frutos, hojas, semillas y flores.

Marcha Fitoquímica Preliminar para callos inducidos en Corpus Way

En los callos inducidos se reportó la presencia de una amplia gama de metabolitos que el callo llega a producir, poco usual para un tejido creciendo en laboratorio, esta prueba sólo identifica los metabolitos secundarios pero no llega a cuantificarlos o precisar cuáles son dentro de los grupos generales ya identificados. Por lo dicho anteriormente, es necesario investigar qué tipo de flavonoides, sólo por citar un ejemplo, o de otros metabolitos sintetizan los callos de Corpus Way y en qué cantidad.

Tabla 5. Identificación de metabolitos secundarios en callos inducidos en corpus way (T16 seleccionado) procedentes de cultivo *in vitro*

TIPO DE EXTRACTO	METABOLITO SECUNDARIO	REACTIVO	CALLO
Etanólico	Esteroides	Lieberman-Burchard	+
	Alcaloides	Dragendorff	-
		Mayer	-
	Flavonoides	Shinoda	+
	Taninos	FeCl ₃	+
	Gelatina	+	
Acuoso	Flavonoides	Shinoda	+
	Leucoantocianidinas	Rosenhein	+
	Saponinas	Espuma	-
	Taninos	FeCl ₃	+
	Aminoácidoslibres	Ninhidrina	+

* (+) presencia, (-) ausencia, en callos desarrollados después de diez días de culminada la callogenesis.

No se encontraron antecedentes de la inducción de callos en el *Corpus Way* o siquiera en otra especie de la misma familia como para contrastar los ensayos que a este trabajo corresponden, de todos los compuestos encontrados en los callos, los flavonoides que podrían estar presentes de

acuerdo a otros trabajos fitoquímicos en Gentianáceas mencionados por Wolfender *et al.* (1993) y Hostettman *et al.* (1981) como xantonas o secoiridoides podrían producirse a partir de los callos de *Corpus Way* teniendo ya la metodología que aporta este trabajo para su obtención.

CONCLUSIONES

La concentración de 2 ppm de 2,4-D y 0.2 ppm de Kinetina (T16) en medio Murashige and Skoog permitió la formación de un callo compacto a partir de hojas jóvenes de *Corpus Way*, *Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex J.S. Pringle (2007) con una tasa de crecimiento de 0.375mm por día para iniciar un cultivo de agregados celulares en la producción de metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios producidos e identificados por los callos inducidos en "*Corpus Way*" "*Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex J.S. Pringle con 2ppm de 2,4-D. y 0.2 ppm de Kinetina en medio de cultivo *in vitro* Murashige-Skoog (T16) a partir de una hoja joven de una planta en

floración a los cuarenta días de introducida en el medio y diez días después de desarrollados los callos fueron: esteroides, flavonoides, taninos, leucoantocianidinas y aminoácidos.

Las rutas biosintéticas para quinonas, cardiotónicos y saponinas no se expresaron en los callos inducidos hasta los diez días de desarrollado, donde no se identificó estos metabolitos en comparación con las plantas recolectadas en floración en junio donde se identificaron: **esteroides, flavonoides, taninos, leucoantocianidinas, aminoácidos, quinonas, cardiotónicos y saponinas.**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, A. 2001. Biotecnología y metabolitos secundarios en *Lepidium peruvianum* Chacón. "maca". Tesis para optar el título de Biólogo con mención en genética, Universidad Nacional mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Bussman R., A. Glenn y D. Sharon 2010. Antibacterial activity of medicinal plants of Northern Peru- can traditional applications provide leads for modern science? *Indian Journal of Traditional Knowledge*, vol 9(4), October 2010, pp. 742-753.
- Bussman, R., D. Sharon, Douglas y P. Diaz . 2008. Las plantas peruanas «canchalagua» *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze, «hercampuri» *Gentianella alborosea* (Gilg.) Fabris y «corpus way» *Gentianella bicolor* (Wedd.) J. Pringle eficaces en el tratamiento del acné. *Arnaldoa*, vol.15, no.1, p.149-152. ISSN 1815-8242.
- Colquicocha, V. y A. Lozano. 2001. Efecto del extracto acuoso de *Gentianella bicolor* sobre la glicemia en *Rattus rattus* var. *albinus* con prueba de tolerancia a la glucosa. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Hostettmann-kaldas, M, Hostettmann K., Stichero. (1981) Xanthones, flavones and secoiridoids of American *Gentiana* species. *Phytochem.* 20, 443-446.
- Lock de Ugaz, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. Fondo Editorial de la PUCP. Lima, Perú, 212 p.
- Mulabagal, V.; Y. Chen, ; F. Shu, ; N. Satish,.; Y. Chien, and S. Hsin, . 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 1-22. Taiwan.
- Pérez F y G. Malca .2008. Preliminary assay phytochemical from peruvian medicinal plants TECHNICAL: Prueba de la Gota. Trujillo-Perú 2008 (sin publicar)
- Pringle, J. 2007. Validation of a new combination in *Gentianella* (Gentianaceae). *Arnaldoa*, Jan./jun, vol.14, no.1, p.143-143. ISSN 1815-8242.
- Ríos, R. y J. Ventura. 1991. Estudio Fitoquímico de *Gentianella umbellata* y efecto de su extracto en la hipoglicemia experimental en *Rattus rattus* var. *albinus*. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Trejo, G. y M. Rodríguez. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, vol. 32, n° 10: 669-674. México.
- Trejo, Gabriela; C. Cerda; A. Ramos y M. Rodríguez. 2005. Producción de alcaloides oxindólicos en agregados celulares de *Uncaria tomentosa*. Instituto Politécnico Nacional 2508. San Pedro Zacatenco. México, D.F
- Villamil, J. y V. Bonnacerrere. 2005. Nuevos enfoques en el campo de las plantas aromáticas y medicinales: la producción de fitoterápicos. *Revista INIA*, n° 5: 43-46. Uruguay.
- Villanueva, B. y M. Rodríguez. 1991. Identificación de los fitoconstituyentes del extracto acuoso de *Gentianella graminea* "chinchimali" y su ensayo hipoglicémico en *Oryctolagus cuniculus* con diabetes experimental. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Wolfender J., M. Hamburger, K. Hostettman, J. Msonthi, S. Mavis .1993. Search for bitter principles in *Chironia* species by LC-MS and isolation of a new secoiridoid diglycoside from *Chironia krebsii*. *Journal of Natural Products*, 56(5), 682-689.
- Zari, Gilmer; G. Ruiz, E. Venegas. Guía de Farmacognosia II. 2010. Cátedra de Farmacognosia y Farmacomórfica. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Recibido: 14 mayo 2014 | Aceptado: 19 julio 2014