

CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES DE PLANTAS DEL GÉNERO  
*ZEPHYRANTHES* Y EVALUACIÓN DE SU PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES

LUIS ALBERTO PERALTA NAVARRO

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
QUÍMICA FARMACÉUTICA  
SANTIAGO DE CALI

2014

CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES DE PLANTAS DEL GÉNERO  
*ZEPHYRANTHES* Y EVALUACIÓN DE SU PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES

LUIS ALBERTO PERALTA NAVARRO

Trabajo de grado para optar al grado de  
Pregrado en Química Farmacéutica

Tutor:

Marcela Santaella Tenorio, Ph.D.

Cotutores:

Guillermo Montoya, Ph. D.

Zaida Lentini Gil, Ph. D.

SANTIAGO DE CALI

2014

Aprobado por:

---

EVALUADOR

---

EVALUADOR

---

Marcela Santaella Tenorio Ph.D.

TUTORA

---

Zaida J. Lentini Gil Ph.D.

CO-TUTORA

---

Guillermo L. Montoya Ph.D.

CO-TUTOR

Santiago de Cali, 16 de Junio de 2014

## AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a la Universidad Icesi, a la oficina de apoyo a la investigación Icesi, al grupo de investigación Natura y su semillero de investigación GIByQ de la Facultad de Ciencias Naturales, por el apoyo y espacio otorgado. Agradecemos también a Colciencias, Semillero de investigación (Convocatoria 617 de 2013, Capítulo 1) por el apoyo en esta actividad.

A la doctora Marcela Santaella Tenorios Ph.D. por todo el conocimiento que me brindo durante este tiempo como estudiante de proyecto de grado, además como miembro del semillero de investigación en biología molecular y biotecnología.

A mi madre, mi padre y mis hermanos por ese apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A mis amigos y demás compañeros por su ayuda en los momentos que más necesite.

Y a Dios por acompañarme, guiarme y darme la sabiduría que necesite en cada etapa de esta profesión.

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN DEL PROYECTO .....	8
2. ABSTRACT .....	9
3. INTRODUCCIÓN .....	10
4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	12
4.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	12
4.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	14
Familia Amaryllidaceae .....	14
Alcaloides de Amaryllidaceae .....	15
Extracción y detección de alcaloides .....	16
Cultivo <i>in-vitro</i> .....	17
5. OBJETIVOS .....	20
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	20
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
6. METODOLOGÍA .....	21
6.1. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
6.1.1. <i>Cultivo in vitro</i> .....	21
6.1.2. <i>Extracción de alcaloides</i> .....	25
6.1.3. <i>Determinación y cuantificación de alcaloides</i> .....	25
7. RESULTADOS .....	28
8. DISCUSIÓN:.....	50
Cultivo <i>in-vitro</i> .....	50
Análisis cromatográfico .....	51
9. CONCLUSIONES .....	53
10. RECOMENDACIONES .....	54
11. BIBLIOGRAFÍA.....	55
12. ANEXO 1 .....	58
13. ANEXO 2.....	59

Protocolo de desinfección .....	59
14. ANEXO 3.....	60
Protocolo de cultivo semi-sólido.....	60
Protocolo de cultivo líquido .....	60
15. ANEXO 4.....	61
Tablas y gráficos obtenidos en los corridos cromatográficos .....	61

## CONTENIDO DE TABLAS

<i>Tabla 1. Registro de plantas disponibles en la Universidad ICESI.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 2. Concentraciones de los inductores químicos ácido araquidónico y metil jasmonato y los explantes requeridos para cada tratamiento.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 3. Consideraciones cromatográficas utilizadas en el UPLC. ....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 4. Condiciones específicas para el desarrollo cromatográfico en el espectrómetro de masas.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 5. Datos de contaminación y respuesta del medio de cultivo in-vitro para la especie Zephyranthes carinata. El porcentaje de hipoclorito para la desinfección inicial está dado con base en la solución comercial (5,5% de reactivo). ....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 6. Tipos de hojas, explantes y pesos del material de prueba para la extracción de alcaloides. ....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 7. Resultados de la prueba de identificación de alcaloides en hojas y bulbo (muestra 1) de Zephyranthes carinata por el método UPLC. Tres alcaloides fueron positivamente identificados por contraste con la biblioteca espectral (Escobar Fuertes, 2014), los alcaloides 11, 25 y 14.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 8. Resultados de la prueba preliminar de identificación de alcaloides en raíces (muestra 2) de Zephyranthes carinata por el método UPLC. Un alcaloide fue positivamente identificado por contraste con la biblioteca espectral (Escobar Fuertes, 2014) – alcaloide 23. ....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 9. Explantes utilizados para la primera prueba de extracción de alcaloides del medio de cultivo líquido. ....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 10. Alcaloides identificados para la muestra A01: IA-100, AA1, Día 3, mediante corrido cromatográfico en UPLC y espectrómetro de masas. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 11. Resumen de alcaloides identificados en los corridos cromatográficos a partir de las muestras de medio líquido, tratadas con el inductor ácido araquidónico.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 12. Descripción del rotulo utilizado para el tratamiento con Metil Jasmonato. ....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 13. Alcaloides identificados para la muestra 20 MJ 2 del día 28. ....</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 14. Resumen de alcaloides identificados en los corridos cromatográficos para las muestras cultivadas en medio líquido con el inductor Metil Jasmonato... </i>	<i>48</i>
<i>Tabla 15. Explantes utilizados en cada tratamiento y pesos de la muestra utilizada en el estudio con Ácido Araquidónico. ....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 16. Registro del control de pesos, índice de crecimiento y variación de peso en los tres días de tratamiento para cada material vegetal utilizado con ácido araquidónico.....</i>	<i>61</i>

<i>Tabla 17. Pesos de los explantes por tratamiento para cada material vegetal, en el día inicial. ....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 18. Registro del control de pesos, índice de crecimiento y variación de peso en los tres días de tratamiento para cada material vegetal utilizado con metil jasmonato.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 19. Sumatoria de alcaloides para cada muestra en los diferentes días de tratamiento con ácido araquidónico, A: 3 día, B: 10 día, C: 22 día y T: tejido .....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 20. Sumatoria de alcaloides para cada muestra en los diferentes días de tratamiento con metil jasmonato.....</i>	<i>63</i>



## CONTENIDO DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Resumen de resultados del porcentaje de contaminación y respuesta en relación al porcentaje de hipoclorito empleado en la desinfección inicial. En el eje horizontal se presentan los materiales cultivados y en paréntesis los porcentajes de hipoclorito utilizados para cada material. ....	30
Gráfico 2. Cromatograma para la prueba en la identificación de alcaloides en hojas y bulbos cultivados in-vitro, material IA-025 TS-2-3-B. ....	32
Gráfico 3. Cromatograma para la prueba de identificación de alcaloides en raíces cultivadas in-vitro. ....	34
Gráfico 4. Variación de peso de los explantes respecto a su peso inicial (datos combinados para IA-100, IA-021 y IA-023) en los días 3, 10 y 28 de tratamiento con el inductor Ácido Araquidónico. Control: sin inductor; AA1: 3.28 uM; AA2: 8.21 uM; AA3: 16.42 uM. ....	37
Gráfico 5. Índice de crecimiento de los explantes utilizados (datos combinados para IA-100, IA-021 y IA-023) en los días 3, 10 y 28 de tratamiento con el inductor Ácido Araquidónico. Control: sin inductor; AA1: 3.28 uM; AA2: 8.21 uM; AA3: 16.42 uM. ....	38
Gráfico 6. Cromatograma del UPLC-MS para el estándar de Boldina 50 mg/l. ....	39
Gráfico 7. Cromatograma de la muestra A01. En la tabla sobrepuesta se expone la información de todos picos identificados por el espectrómetro de masas. ....	40
Gráfico 8. Concentración total de alcaloides liberados al medio en los tratamientos con Ácido Araquidónico (AA). En la nomenclatura de cada barra (eje horizontal), la primera posición corresponde al día de evaluación (A= día 3, B= día 10, C= día 27); la segunda posición corresponde al material (0 = IA-100; 1 = IA-021; 2 = IA-023); la tercera posición corresponde al tratamiento (C = Control 0 uM AA, 1 = 3.28 uM del AA , 2 = 8.21 uM del AA y 3 = 16.42 uM del AA. ....	41
Gráfico 9. Evaluación de los alcaloides totales liberados al medio líquido comparado con los obtenidos en el tejido vegetal. La nomenclatura de cada barra (eje horizontal) en la primera posición: 0: IA-100; 1: IA-021; 2: IA-023. En la segunda posición, C: control; 1: AA1; 2: AA2; 3: AA3. La concentración de alcaloides se expresa en mg/L (eje vertical). ....	42
Gráfico 10. Variación de peso de los explantes respecto a su peso inicial (datos combinados para IA-100, IA-021 y IA-023) en los días 3, 10 y 22 de tratamiento con el inductor Metil Jasmonato (MJ). Control: sin inductor; MJ 1: 25 uM; MJ 2: 50 uM; MJ 3: 100 uM; MJ 4: 250 uM. ....	43
Gráfico 11. Índice de crecimiento de los explantes utilizados (datos combinados para IA-100, IA-021 y IA-023) en los días 3, 10 y 22 de tratamiento con el inductor	

<i>Metil Jasmonato (MJ). Control: sin inductor; MJ 1: 25 uM; MJ 2: 50 uM; MJ 3: 100 uM; MJ 4: 250 uM.</i> .....	44
<i>Gráfico 12. Cromatograma del UPLC-MS para el estándar de Boldina.</i> .....	45
<i>Gráfico 13. Cromatograma de la muestra 20 MJ-28, en la cual se identificó la mayor concentración de alcaloides totales bajo el tratamiento con el inductor metil jasmonato (MJ 2, 50 uM).</i> .....	46
<i>Gráfico 14. Concentración total de alcaloides para los diferentes tratamientos con Metil Jasmonato (MJ). Para la nomenclatura de las barras (eje horizontal) revisar la tabla 12. A corresponde al día 10, 22 y 28. 100 corresponde al material IA-100; 21 al material IA-021; 20 al material IA-020. Control, MJ 1: 25 uM, MJ 2: 50 uM, MJ 3: 100 uM, MJ 4: 250 uM.</i> .....	47
<i>Gráfico 15. Evaluación de los alcaloides totales liberados al medio líquido, comparado con los obtenidos en el tejido vegetal. CTROL: tratamiento control; MJ 1: 25 uM; MJ 2: 50 uM; MJ 3: 100 uM; MJ 4: 250 uM. Concentración de alcaloides expresada en mg/L.</i> .....	49
<i>Gráfico 16. Cromatograma para la muestra A22, tratamiento con ácido araquidónico.</i> .....	64
<i>Gráfico 17. Cromatograma para la muestra B01, tratamiento con ácido araquidónico.</i> .....	64
<i>Gráfico 18. Cromatograma para la muestra C26, tratamiento con ácido araquidónico.</i> .....	65
<i>Gráfico 19. Cromatograma para la muestra C23, tratamiento con ácido araquidónico.</i> .....	65
<i>Gráfico 20. Cromatograma para la muestra T21, tratamiento con ácido araquidónico.</i> .....	66
<i>Gráfico 21. Cromatograma para la muestra T23, tratamiento con ácido araquidónico.</i> .....	66
<i>Gráfico 22. Cromatograma para la muestra 100 MJ 4 - 28, tratamiento con metil jasmonato.</i> .....	67
<i>Gráfico 23. Cromatograma para la muestra 21 CTROL - TE, tratamiento con ácido araquidónico.</i> .....	67
<i>Gráfico 24. Cromatograma para la muestra 20 MJ 4 - 10, tratamiento con ácido araquidónico.</i> .....	68

## CONTENIDO DE FIGURAS

<i>Figura 1. Equilibrio químico del alcaloide .....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 2. Efectos farmacológicos de la licorina. Tomado de: (Cao et al., 2013)....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 3. Descripción de la nomenclatura utilizada en medio in-vitro semi-sólido.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 4. Placa de TLC para evaluar la presencia de alcaloides en el medio líquido para las muestras 1 y 2, utilizando como control positivo la Boldina (última posición). Entre la muestra 2 y el estándar se sembró el negativo, el cual consiste en medio de cultivo sin crecimiento de explantes. La TLC fue revelada con el reactivo de Dragendorff. ....</i>	<i>35</i>

## 1. RESUMEN DEL PROYECTO

Las Amaryllidaceae son una familia de plantas bulbosas y perennes las cuales han sido ampliamente conocidas por su valor ornamental. El estudio de esta familia ha aumentado desde 1950 y una de las razones se debe a la gran utilidad farmacéutica que han presentado los alcaloides presentes en dichas plantas.

Se han identificado algunos géneros ubicados en el Valle del Cauca que se han visto en peligro de extinción debido a la destrucción de su hábitat como el caso de *Eucharis* y *Caliphruria* (en ejemplo *C. hartwegiana* y *C. subedentata*); además de otros géneros como *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hippeastrum* y *Crinum*.

Los dos principales alcaloides reportados para la familia Amaryllidaceae son la galantamina y la licorina. El mecanismo de acción de estas moléculas se basa en la inhibición enzimática de la acetil colinesterasa, exhibiendo aplicación farmacéutica en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Otros alcaloides como Haemantamina, Vittatina y tazetina entre otros, han presentado actividad antiinflamatorio, anti-malárico y antibacterial.

Factores ambientales como químicos promueven en la planta estrés fisiológico llevando a la producción de metabolitos secundarios. En este estudio solo fueron analizados solo los inductores químicos en relación a la liberación de los alcaloides. Se utilizó el metil jasmonato en concentraciones de 25, 50, 100 y 250  $\mu\text{M}$ ; y 3,28, 8,21 y 16,42  $\mu\text{M}$  para el ácido araquidónico. En un estudio Colque *et al* en el 2004, encontraron galantamina como el alcaloide en mayor proporción en *Narcissus confusus* con estos mismos inductores. Además de la presencia de otros alcaloides como *N*-formilnorgalantamina, Haemantamina, Homolicorina y Pretazetina.

El objetivo principal del trabajo fue identificar los alcaloides liberados por la planta en los tratamientos con inductores, además de la extracción en el tejido vegetal. La identificación de estas moléculas se realizó por espectrometría de masas (MS) acoplado al cromatógrafo líquido de alta eficiencia (UPLC). Los pesos de 302 g/mol y 272 g/mol corresponden a Haemantamina y Vittatina respectivamente, encontrados en medio líquido y también en tejido vegetal. Vale resaltar que se encontraron otros pesos moleculares que no se lograron identificar, aunque por los pesos moleculares y los tiempos de retención se pueden asumir que son productos alcaloidales, sin embargo con estudios posteriores y la ayuda de tratamientos estadísticos permitiría ratificar dicha información acercándose al perfil alcaloidal en esta especie.

**Palabras Clave:** Amaryllidaceae, *Zephyranthes carinata*, cultivo *in vitro*, metil jasmonato, ácido araquidónico.

## 2. ABSTRACT

The Amaryllidaceae is a family of bulbous and perennial plants which have been widely known for their ornamental value. The study of this family in the last decade has increased; one reason is because of the large pharmaceutical potential that possesses the alkaloids present in these plants.

Genres of this family found in the Valle del Cauca have been endangered due to habitat destruction such as *Eucharis* and *Caliphruria* (for example *C. hartwegiana* and *C. subdentata*). In addition, other genres like *Phaedranasa*, *Sprekelia*, *Hippeastrum* and *Crinum*.

The Amaryllidaceae alkaloids reported in greater abundance are Licorine and Galantamine. The mechanism of action of these molecules is based on inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, showing pharmaceutical use in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. Other alkaloids such Haemantamina, Vittatina and tazetina among others, have presented anti-inflammatory activity, antimalarial and antibacterial

Environmental and chemicals factors in plant promote physiological stress leading to the production of secondary metabolites. In this study were analyzed only chemical inducers in relation to release of alkaloids. Methyl jasmonate was used in concentrations of 25, 50, 100 and 250  $\mu\text{M}$ ; and 3.28, 8.21 and 16.42  $\mu\text{M}$  for arachidonic acid. In Colque *et al* in the 2004, they found the alkaloid galanthamine as the most in *Narcissus confusus* with these same inducers. Although the presence of alkaloids and other N-formilnorgalantamina, Haemantamina, Homolicorina and Pretazetina.

The main objective was to identify the alkaloids released by the plant in inducing treatments, plus extraction plant tissue. The identification of these molecules was performed by mass spectrometry (MS) coupled to high efficiency liquid chromatograph (UPLC). The weights of 302 g/mol and 272 g/mol and corresponding to Haemantamina Vittatina respectively, found in liquid medium and in plant tissue. It is noteworthy that other molecular weights failed to identify, although the molecular weights and retention times can be assumed to be alkaloidal products were found, however, and further studies with the help of statistical treatments such information would allow approaching ratify profile alkaloidal in this species.

**Keywords:** Amaryllidaceae, *Zephyranthes carinata*, Culture *in vitro*, methyl jasmonate, arachidonic acid

### 3. INTRODUCCIÓN

La familia Amaryllidaceae está conformada por plantas herbáceas, bulbosas y perennes principalmente conocidas por su valor ornamental (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004), debido a que sus flores tienen gran variedad de tamaños, formas y colores.

En Colombia se ha reportado la presencia de varios géneros como *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hippeastrum* y *Crinum*. Además especies de dos géneros se están enfrentando a la amenaza de la destrucción de su hábitat y por ende a la extinción de estas plantas, como son *Eucharis caucana* y *Caliphruria subdentata*.

Otro de los aspectos que hace llamativa esta familia de plantas y que despierta un amplio interés científico son sus metabolitos secundarios, aunque no se encuentren muchos estudios reportados para *Zephyranthes carinata*, (algunos de estos estudios son referenciados a lo largo de este proyecto). Estos alcaloides son conocidos por ser de tipo isoquinolínicos, exclusivos de esta familia de plantas, teniendo principalmente reportados la licorina, crinina, haemantamina, tazetina y galantamina, entre otros. Dada su ruta de biosíntesis, los alcaloides de Amaryllidaceae tienen un mismo precursor, O-metilnorbelladina (Torras-Claveria, Berkov, Codina, Viladomat, & Bastida, 2014).

Estudios recientes de estos metabolitos en otros géneros de esta familia, por ejemplo en *Narcissus* y *Leucojum*, han reportado la presencia mayoritaria de galantamina (Ivanov, Georgiev, & Pavlov, 2013). Otra investigación en la especie *Pancratium maritimum* determinó algunos alcaloides como tazetina, haemantamina, licorina y galantamina (Berkov *et al.*, 2010). Ya en el género *Zephyranthes*, encontrada en Colombia en regiones de Cundinamarca, Boyacá y Antioquia (Fernández Alonso & Groenendijk, 2004), se han hecho reportes bibliográficos sobre la presencia de alcaloides como en el caso de *Zephyranthes citrina* donde se reporta crinina, licorina y galantamina entre otros (Herrera *et al.*, 2001). En el caso de *Z. concolor* y *Z. robusta* también hay evidencia de la biosíntesis de galantamina (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011). En el caso de *Z. carinata* especie utilizada en este proyecto, ya se han registrado alcaloides como licorina, galantina y haemantamina (Cahlíková, Valterová, Macáková, & Opletal, 2011).

El interés farmacológico en algunos de estos alcaloides, radica en la inhibición reversible de la enzima acetil colinesterasa (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011), la cual es el principal blanco para el tratamiento contra afecciones neurológicas colinérgicas, dado a su eficacia, además que logra a travesar la barrera hematoencefálica. De este modo al inhibir dicha enzima, como efecto directo se aumentan los niveles del neurotransmisor acetil colina y de este modo se pueden atenuar los síntomas producidos por dichas enfermedades (Tako & Rook, 2013).

El cultivo *in vitro* ha sido ya utilizado en esta familia para la extracción de los metabolitos secundarios. Esta técnica es empleada para establecer cuál es la etapa de crecimiento del explante más apropiada para la producción de alcaloides. En años recientes se han manipulado componentes del cultivo, por ejemplo el cambio del medio de cultivo semi-sólido a líquido, además de la suplementación con inductores químicos que estimulen la liberación de los metabolitos secundarios. Esto con el fin de tener las condiciones adecuadas de cultivo *in vitro* que permitan obtener cantidades aproximadas de los alcaloides en el medio como las registradas en el tejido (Colque *et al.*, 2004), y de esta forma facilitar el aislamiento de los alcaloides a la par de conservar la planta.

Este trabajo logró de forma preliminar establecer un medio de cultivo *in-vitro* líquido con el que se evaluó la liberación de los alcaloides en la especie *Zephyranthes carinata*. Esto se llevó a cabo con la utilización de dos inductores químicos, metil jasmonato en concentraciones de 25, 50, 100 y 250  $\mu\text{M}$  y ácido araquidónico en concentraciones de 3.28, 8.21 y 16.42  $\mu\text{M}$ . Estas concentraciones de los inductores fueron utilizadas con base en el trabajo anterior de Colque y colaboradores (Colque *et al.*, 2004), en el cual trabajaron con la especie *Narcissus confusus*. Por este motivo, el presente trabajo tiene un enfoque explorativo estudiando estos inductores en la especie *Z. carinata*, dado que hasta la fecha no hay reportes al respecto.

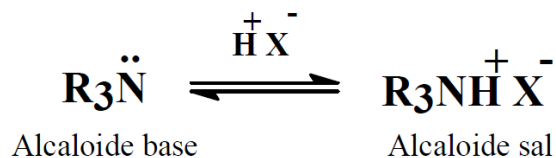
Como contraste a la liberación de los alcaloides en el medio líquido, también se realizó la extracción de los alcaloides en el tejido de la planta de la especie *Z. carinata* cultivada en la colección de Amaryllidaceae de la Universidad Icesi. La identificación de los alcaloides en ambos medios de evaluación se realizó por medio de la cromatografía de alta eficiencia, UPLC acoplada a un espectrómetro de masas.

## 4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 4.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los alcaloides son moléculas básicas orgánicas, cuyo carácter básico es debido a la presencia del átomo de nitrógeno en el anillo heterocíclico. Por esta razón se pueden encontrar alcaloides como aminas primarias, secundarias y/o terciarias, pero la mayor cantidad está en forma de sal (Arango, 2002).

Para la extracción de estos metabolitos es necesario tener en cuenta qué tipo de solvente se usa, teniendo presente que el pH de la solución guiará el desplazamiento químico del alcaloide, bien sea en forma de base o en forma de sal soluble. Esta última conformación se logra con ácidos y soluciones hidroalcohólicas, como se observa en la figura 1 (Arango, 2002).



**Figura 1.** Equilibrio químico del alcaloide

En la actualidad se conocen dos vías de extracción de alcaloides. La primera es usando solventes orgánicos que alcalinizan el medio; y la segunda es extracción en medio ácido, usando ácidos, agua y soluciones hidroalcohólicas (de Marcano & Hasegawa, 1991). Estas vías de obtención de alcaloides se llevan a cabo con el material vegetal pulverizado.

En el caso particular para esta familia de plantas, se ha identificado mayor concentración de alcaloides en el bulbo y partes aéreas que en las raíces. Siendo en la actualidad utilizadas con fines terapéuticos, como el caso de los bulbos de *Lycoris radiata*, en el que se han identificado más de 20 alcaloides de Amaryllidaceae y de las cuales su extracción se realiza directamente sobre el tejido vegetal (Wang, Zhang, Yin, Wang, & Ye, 2009).

Con lo anterior se observa que los medios de extracción de alcaloides no son muy favorables para las especies que se encuentren en peligro de extinción, o su hábitat esté amenazado. Este es el panorama en el que se encuentran algunas regiones del país, en general el ecosistema o bioma del bosque seco tropical. Los géneros que se encuentran amenazados en la región del Valle del Cauca para la familia amaryllidaceae son *Caliphruria*, *Crinum* y *Eucharis* entre otras, debido al



incremento en la destrucción del espacio donde habitan (Silverstone-Sopkin, 2011).

La técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha permitido la propagación, el mantenimiento y en algunos casos la extracción de metabolitos en especies de la familia Amaryllidaceae, como en el caso de *Narcissus confusus* (Colque *et al.*, 2004); en este estudio los autores implementaron y ajustaron la técnica de cultivo *in-vitro* en medio líquido para esta especie. Por otro lado lograron la liberación de los alcaloides de esta familia, entre ellos la galantamina y licorina, siendo en la actualidad gran utilidad en el tratamiento en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Konrath, Passos, Klein-Júnior, & Henriques, 2013).

La línea de trabajos de investigadores como Colque *et al.* (Colque *et al.*, 2004), Pavlov *et al.* (Pavlov *et al.*, 2007) y Berkov *et al.* (Berkov *et al.*, 2010), ha mostrado que mediante la técnica de cultivo *in-vitro* en medio líquido han logrado la liberación de alcaloides al medio. Esta estrategia de obtención de metabolitos secundarios para cualquier especie de plantas garantizaría como fin último que no se altere la integridad física de la misma, permitiendo obtener sus alcaloides además de conservar la especie vegetal.

Los estudios reportados para la extracción de estos metabolitos han sido principalmente para las especies *Narcissus pseudonarcissus* y *Leucojum aestivum*, y aunque sus estudios han sido de gran relevancia para la comunidad científica, en la actualidad no se han reportado avances de este tipo en especies de la región del Valle del Cauca. Por este motivo genera interés particular estudiar *Zephyranthes carinata* la cual hace parte de la colección de plantas de la Universidad Icesi.

En este contexto, en este proyecto se trabajó con la especie *Zephyranthes carinata* utilizando la técnica de cultivo *in-vitro* en medio líquido, con la cual se evaluó la liberación de los alcaloides al medio; y a su vez se compararon estos productos con los obtenidos en el resto la planta (hojas, bulbo y raíces).

## 4.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Desde la antigüedad se ha visto la necesidad de tratar enfermedades por medio de metabolitos presentes en el material vegetal. En muchos países se han utilizado diferentes especies de *Zephyranthes* en la medicina tradicional. *Z. candida* para la diabetes mellitus, *Z. parulla* en el Perú ha sido utilizada para el tratamiento antitumoral (Cahlíková *et al.*, 2011) y *Z. grandiflora* en diversos tratamientos antineoplásicos (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011).

Con esto, el interés en estudiar estas plantas ha aumentado considerablemente, proporcionando estrategias que permitan la optimización del uso de estos organismos, desarrollando técnicas que permitan la propagación de estos individuos de manera sostenible. Por ejemplo, en el cultivo *In-vitro* de tejidos se toma un embrión inmaduro y/o explante primario, al cual se le proporcionan las condiciones óptimas de nutrición y ambiente consiguiendo la generación de una nueva planta (Tirado Perea & Perea Dallos, 2011).

Esta herramienta puede tener aplicación en cualquier tipo de tejido vegetal, lo que hace necesario tener claro el objetivo para el cual se desea utilizar dicha técnica. Por ello su uso se puede aplicar para aquellas plantas a las que se les confiere alguna propiedad especial como por ejemplo expresión de proteínas, anticuerpos, metabolitos secundarios, vacunas entre otras (Hefferon, 2010).

Se tomará de la familia de plantas amaryllidaceae el género *Zephyranthes*, el cual ha reportado la presencia de metabolitos secundarios como los alcaloides. Estas moléculas han demostrado importante actividad farmacológica en el tratamiento en enfermedades neurodegenerativas, y también actividad antivírica, antimalarica, antiprotozoario, antidepresivo y anticonvulsivante (Ivanov, Georgiev, Berkov, & Pavlov, 2012).

### **Familia Amaryllidaceae**

Este trabajo se basa en la utilización de la especie *Zephyranthes carinata*. Estas plantas han sido usadas por muchos años en diferentes países por sus propiedades medicinales, como por ejemplo la diabetes mellitus en el sur África. En algunos países del sur de América ha beneficiado el tratamiento de tumores y enfermedades del sistema nervioso central (Cahlíková *et al.*, 2011) (Fernández Alonso & Groenendijk, 2004; Silverstone-Sopkin, 2011).

En el ámbito nacional, hay registros de los géneros *Caliphruria*, *Phaedranasa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Eucharis*, *Hippeastrum* y *Crinum*, además de un detallado estudio para el género *Zephyranthes* (Fernández Alonso & Groenendijk, 2004). En este estudio, los autores hacen la descripción morfológica y geográfica

de algunas especies de *Zephyranthes*, en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia, Bolívar y Santander.

Algunos de los géneros de esta familia en Colombia se han reportado en peligro de extinción debido a la destrucción de su hábitat (Silverstone-Sopkin, 2011; Viladomat *et al.*, 2007). Este motivo es lo que ha despertado gran interés en aplicar metodologías de propagación y conservación de dichas plantas.

En la zona del Valle del Cauca con bosque seco tropical se han encontrado especies como *E. bonplandii*, *E. caucana*, *Plagiolirion horsmannii* e *H. puniceum*. En la cordillera occidental y central, con bosque nublado, las especies *Caliphruria subedentata*, *Zephyranthes carinata*; y por último en la costa pacífica las especies *Calicharis butcheri*, *Crinum kunthianum* y *Eucharis sanderi* (Silverstone-Sopkin, 2011).

Estudios previos en algunas de las especies de esta gran familia han permitido identificar que además de sus características ornamentales, les confiere gran valor la importancia farmacológica de sus metabolitos secundarios conocidos como alcaloides de amaryllidaceae, los cuales han demostrado efectividad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (Colque *et al.*, 2004).

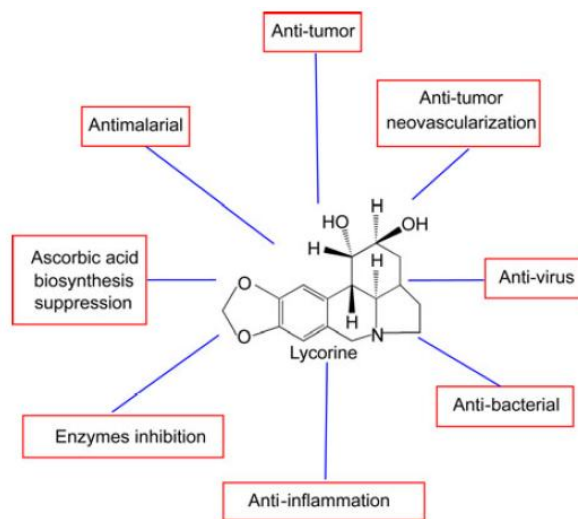
En plantas, los metabolitos secundarios son aquellos compuestos que no están involucrados directamente en el crecimiento y desarrollo del organismo. Estos compuestos difieren de los productos del metabolismo primario, como son aminoácidos, nucleótidos, azúcares o ácidos grasos. Entre las funciones principales de dichos compuestos está la protección frente a herbívoros, liberando sus metabolitos secundarios con señales de olor, color y sabor, entre otras funciones (Taiz & Zeiger, 2006).

### **Alcaloides de Amaryllidaceae**

Los metabolitos de relevancia para esta familia de plantas son los alcaloides; de los cuales la galantamina es uno de los más reportados por su cantidad y su marcado efecto farmacológico, actuando como inhibidor de forma reversible y competitiva a la enzima acetilcolinesterasa (Ivanov *et al.*, 2013).

La inhibición enzimática se da cuando en presencia de un compuesto con atracción hacia la enzima, este logra disminuir su actividad. De este modo se puede clasificar la inhibición como reversible o irreversible, dependiendo del inhibidor y su enzima. La inhibición reversible se da cuando el inhibidor se une a la enzima de forma no covalente, por lo cual el efecto inhibitorio disminuye a través del tiempo, es decir, la función de la enzima se restablece. En el caso de la galantamina, se conoce que su función conlleva a una inhibición reversible, por lo cual disminuye en el tiempo además de competir con el neurotransmisor acetilcolina, generando una inhibición reversible competitiva (Peretó & Barrachina, 2007).

Otro de los alcaloides con mayor proporción encontrados en esta familia es licorina, la cual ha evidenciado fuertes efectos antiviral, antibacterial, así como antimicótico y citotóxico (Ver figura 2) (Georgiev *et al.*, 2012). Licorina ha sido considerado uno de los alcaloides que en mayor cantidad se ha obtenido (Ivanov *et al.*, 2013). En especies como *Leucojum aestivum* se han identificado 20 mg de licorina por cada 100 mg de tejido vegetal (Ptak *et al.*, 2009). En *Crinum macowanii* se han obtenido cantidades de hasta 5.9 mg de licorina por cada 100 g de tejido vegetal (Cao, Yang, & Zhou, 2013).



**Figura 2.** Efectos farmacológicos de la licorina. Tomado de: (Cao *et al.*, 2013)

Además de galantamina y licorina, Jin en su estudio sobre los alcaloides de amaryllidaceae, en la especie *Galanthus plicatus*, identificó por cromatografía de gases y espectrometría de masa, doce alcaloides más: trisferidina 1, Busfanisina 3, Norgalantamine 4, Norycoramina 5, Narwedina 6, Crinina 7, Maritidina 8, Haemantamina 9, Tazetina 10, Galwesina 11, *N*-Formilgalantamina 13 y *O*-Metilleucotamina 14, (ver anexo 1) (Jin, 2005).

### **Extracción y detección de alcaloides**

La estructura de los alcaloides está definida por la presencia del átomo de nitrógeno intracíclico además de la presencia de los grupos hidroxilo (OH-), que a su vez confieren el carácter básico a la molécula. El átomo de nitrógeno se puede encontrar como amina primaria, secundaria, terciaria y sal cuaternaria de amonio (de Marcano & Hasegawa, 1991).

Para la extracción y alistamiento de los alcaloides no se ha definido un método, debido a que se pueden encontrar estructuras diversas en cuanto a la composición química y de las propiedades físicas de los mismos. De este modo se utilizan tanto solventes orgánicos como soluciones acuosas.

Por lo tanto, la extracción de los alcaloides se divide en dos vías, una extracción en medio alcalino y otra en medio ácido. En la primera, se utilizan solventes orgánicos alcalinos, esto permite al alcaloide base separarse de las impurezas presentes en el medio, después se trata con ácido diluido que lleva a los alcaloides en forma de sales. El medio se alcaliniza nuevamente con un compuesto orgánico no miscible que extrae la totalidad de los alcaloides (Arango, 2002). En el medio ácido, la muestra se trata con ácido diluido como el ácido clorhídrico a temperatura ambiente, repitiendo el procedimiento varias veces (de Marcano & Hasegawa, 1991).

### **Cultivo *in-vitro***

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la regeneración de una nueva planta completamente idéntica, esto se da por la característica totipotencial de las células de las plantas, sugerida en el año 1.838 por los científicos Scheilden y Schwan (Tirado Perea & Perea Dallos, 2011). La totipotencia, dada por el meristema, se evidencia a medida que se da el crecimiento del organismo, la célula vegetal se especializa según su necesidad fisiológica y su localización en la planta. Esto lleva a resaltar rasgos propios de las plantas, como el tamaño, color, forma del tallo, hojas y flores. Pero las plantas también tienen la característica de re-diferenciación, lo que permite a la planta generar un nuevo órgano o tejido según la necesidad de la misma. Lo que señala que la especialización celular en las plantas es un proceso reversible (Razdan, 2003).

Para el óptimo desarrollo del cultivo *in-vitro* se deben de establecer una serie de etapas, que conllevarán al material vegetal a cambios fisiológicos y morfológicos. La primera etapa es la selección de la especie, en este trabajo se utilizó la especie *Z. carinata* como material vegetal; la segunda es el establecimiento del medio de cultivo que se menciona en la metodología; tercero el desarrollo del tejido; en una cuarta etapa está el enraizamiento y acondicionamiento; y por último la adaptación de la plántula en tierra, aunque el fin de este proyecto no llega hasta este nivel. Aunque estas etapas son generales para cualquier tejido vegetal, estas varían dependiendo del tipo de explante que el investigador desea para el establecimiento del cultivo *in-vitro* (Tirado Perea & Perea Dallos, 2011).

Junto a los componentes utilizados en el cultivo *in-vitro* se han adicionado los inductores químicos (ácido jasmónico y ácido araquidónico) que estimulan la producción endógena de metabolitos secundarios, ocasionando a la planta estrés fisiológico, donde se considera que inducen la expresión de alguno de los productos secundarios de interés como los alcaloides. En este estudio se utiliza la especie vegetal *Z. carinata* con la que se espera que estos inductores puedan incrementar la producción de sus alcaloides, los cuales no han sido estudiados además no hay suficiente información respecto a su perfil alcaloidal.

En el cultivo *in-vitro* es usual emplear reguladores de crecimiento, los cuales son: Auxinas, involucradas en el alargamiento celular, diferenciación del floema y del

xilema, promoción de la dominancia apical, regulación de la formación de la flora; Citoquinas, con una característica importante definida como el retraso de la senescencia además de la división celular; Ácido abscísico, que facilita la formación de bulbos y tubérculos, y facilita la aclimatación de plantas en invernadero (Tirado Perea & Perea Dallos, 2011).

Las citoquinas han sido ampliamente utilizadas en cultivo *in vitro*, dado que estas hormonas favorecen la formación de nuevos brotes a partir de los meristemos, ápices o yemas ya existentes en el tejido vegetal a estudiar (Vilchez, Rivas, Albany, Molina, & Martínez, 2009). Para la complementación de los nutrientes utilizados en los medio de cultivo *in vitro* semi-sólido y líquido, en este trabajo se utilizó Bencilamino purina (BAP) reportada en la literatura, esto con el fin de lograr la formación de brotes, donde la tasa de división celular y sus procesos metabólicos son altos, y así favorecer la obtención de sus alcaloides (Colque *et al.*, 2004).

En otras especies de la familia amaryllidaceae, como en *Leucojum aestivum*, han usado inductores como el Metil Jasmonato (MJ) y el Ácido jasmónico (JA) (Ivanov *et al.*, 2013). En *Narcissus confusus* además del MJ, han empleado el Ácido Araquidónico (AA), Ácido Salicílico (SA) y Quitosano (CHI) (Colque *et al.*, 2004). Así la manipulación de las condiciones externas por medio de la administración de sustancias químicas afectan el metabolismo de la planta, lo cual estimula la producción de sus metabolitos secundarios, incluso excretándolos al medio de cultivo líquido.

Aunque estos compuestos pueden inducir la producción de los alcaloides de amaryllidaceae, también se ha demostrado que a ciertas concentraciones los explantes presentan un efecto negativo en su desarrollo. El metil jasmonato, el cual ha evidenciado ser uno de los mejores inductores para la obtención de estos metabolitos secundarios, por otro lado también ha demostrado un marcado efecto en la disminución en el índice de crecimiento a concentraciones por encima de los 100 uM, en *Narcissus confusus* (Colque *et al.*, 2004).

Este trabajo procura dar información relevante sobre los protocolos de cultivo *in vitro* en medio líquido para *Z. carinata*, lo que permita tener datos experimentales sobre el crecimiento de la planta, ya que en la actualidad no hay evidencia para las especies locales del Valle del Cauca. Además se busca proporcionar información sobre los alcaloides obtenidos en medio líquido para *Z. carinata* y también a partir del tejido vegetal. Esto teniendo como fin último, la posibilidad de extrapolar estas condiciones a especies que se encuentren en peligro de extinción y así mejorar la obtención de sus alcaloides, teniendo presente la conservación de estas especies.

## **Aspectos cromatográficos**

### *Espectrómetro de Masas (MS)*

El proceso inicia con la selección adecuada de la fuente de ionización, en este punto la muestra puede pasar por tres pasos, el primero es el impacto electrónico, el segundo es ionización por electroaspersión y por último ionización por desorción con láser asistida por una matriz (MALDI). Posteriormente, el analito pasa al analizador de masas, el cual puede ser magnético, de tiempo de vuelo (TOF) y/o de cuadrupolo (Q). En la detección se cuenta con un fotomultiplicador, un multiplicador de electrones y/o una placa de microcanales. De esta forma, el analito cargado pasa como una señal masa/carga al visualizador para su interpretación (McMurry, 2012).

La fuente de electroaspersión o electrospray ioniza la muestra a analizar en solución; esta es rociada a través de un tubo capilar sobre el cual incide un voltaje aproximado de 4000 V, que evapora el solvente generando iones en estado gaseoso que por su masa y carga energética son fácilmente transportados y acelerados. De esta forma permite la medición con exactitud de los valores de masa/carga. Al determinar la carga, el equipo finalmente realiza el cálculo del peso de la molécula de interés (Voet, Voet, & Pratt, 2007).

### *Cromatógrafo de alta eficiencia UPLC*

La cromatografía líquida en general comprende una fase estacionaria sólida, la cual retiene los analitos de interés, y por otro lado cuenta con una fase móvil líquida, el cual guía el analito por todo el sistema cromatográfico hasta su detección. En esta cromatografía se deben garantizar algunas variables, como lo son un flujo continuo de fase móvil, que la molécula sea soluble en la fase móvil además tener también interacción con la fase estacionaria, para garantizar la retención del analito (Laitinen & Harris, 1982).

De igual forma funciona el análisis cromatográfico por UPLC, la gran diferencia con este equipo viene dada por el aumento en la sensibilidad, mejora en la separación, aumento en las presiones de la columna, disminución en los tiempos de análisis, mayor reproducibilidad y disminución en el consumo del sistema de solventes. Estos factores conllevan a mejorar notablemente el proceso de separación e identificación de moléculas, lo cual lo hace una técnica muy útil y de amplia aplicación (Waksmundzka-Hajnos & Sherma, 2010).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Este proyecto de grado busca evaluar un protocolo de cultivo *in-vitro* en medio líquido para la especie *Zephyranthes carinata*, para la obtención de sus alcaloides mediante un estrés fisiológico.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar un protocolo de cultivo *in-vitro* en medio líquido para la especie *Zephyranthes carinata* de la familia Amaryllidaceae.
- Evaluar la liberación de alcaloides al medio de cultivo, con el fin de comparar con los alcaloides generados en los tejidos de planta.
- Determinar la liberación de alcaloides al medio de cultivo *in-vitro* líquido por efecto de dos inductores químicos como el metil jasmonato y el ácido araquidónico.



## 6. METODOLOGÍA

Este proyecto se desarrolló en colaboración con los laboratorios de investigación en Biotecnología y Biología Molecular y Farmacognosia y Fitoquímica de la Universidad ICESI en la ciudad de Cali.

### 6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.1.1. *Cultivo in vitro*

El material utilizado son plantas de la familia Amaryllidaceae con interés particular la especie *Zephyranthes carinata*. Estas plantas fueron colectadas por los profesores Marcela Santaella Tenorio y William Vargas, y mantenidas en el invernadero de la Universidad ICESI. El detalle del material vegetal utilizado es el siguiente (tabla 1):

*Tabla 1. Registro de plantas disponibles en la Universidad ICESI*

No. De Registro	Fecha de Ingreso	Colector	Procedencia
IA – 020	12–Agosto	WV	Zarzal, Valle
IA – 021	12–Agosto	WV	Zarzal, Valle
IA – 023	12–Agosto	WV	Zarzal, Valle
IA – 025	12–Agosto	WV	Zarzal, Valle
IA – 100	13–Marzo	MST	San Fernando, Cali

WV: William Vargas; MST: Marcela Santaella Tenorio; *Z. carinata*: *Zephyranthes carinata*.

#### Protocolo De Desinfección del material inicial

El protocolo de desinfección para esta especie vegetal se tomó del trabajo preliminar realizado en el semillero de investigación de biotecnología y biología molecular de la Universidad Icesi. Se hizo un compendio de varios artículos donde los autores reportan diferentes concentraciones de los agentes sanitizantes y desinfectantes además de los tiempos de lavado (Langens-Gerrits, De Klerk, & Croes, 2003; Smith, Burrows, & Kurten, 1999). Hay que tener en cuenta que estos protocolos estaban dirigidos a otros géneros de la misma familia Amaryllidaceae. Con base en esta información se definió el siguiente protocolo:

#### PASOS:

1. Retirar el bulbo de la maceta teniendo en cuenta de no llevar en la planta demasiada tierra. Puede ser objeto de contaminación.
2. Lavar bajo el grifo dejando caer el agua sobre el bulbo sin hojas y sin raíces durante 20 minutos.
3. Retirar al menos 2 capas externas del bulbo.

Trabajar los siguientes pasos en cabina de seguridad biológica

4. Lavar con solución de Extran al 10%, tibia y durante 10 minutos en constante agitación.
5. Durante un minuto realizar inmersión en etanol al 70%
6. Sumergir el bulbo en una solución de hipoclorito comercial al 25% más Tween 20 (2 gotas/100 ml), con la cual se realizan dos lavados de 10 minutos cada uno, cambiando por solución nueva en cada periodo.
7. Enjuagar tres veces con agua destilada estéril.
8. Realizar el corte del bulbo utilizando la técnica del *twin-scales*.
9. Cada explante sumergirlo por 10 segundos en solución de hipoclorito comercial al 1% con Tween 20 (2 gotas/100 ml).
10. Lavar una vez con agua destilada estéril.
11. Sembrar el explante garantizando que la zona meristemática de la placa basal esté en contacto con el medio, cuidando de no sumergir, preferiblemente la curvatura del explante al interior del medio.

#### Protocolo de cultivo en medio sólido

Al igual que el protocolo de esterilización, este protocolo fue tomado realizando un consenso de varios autores, en cuento a las cantidades de los nutrientes para el medio sólido (Hol & Linde, 1992; Rice, Finnie, & Van Staden, 2011; Smith *et al.*, 1999). Este protocolo se desarrolló de la siguiente manera:

#### PASOS:

1. Pesar la cantidad necesaria del medio MS (Murashige y Skoog): 4.43g/l
2. Pesar la cantidad necesaria de sacarosa: 30 g/l
3. Disolver en agua destilada el medio MS y la sacarosa
4. Ajustar el pH a 5.70
5. Pesar la cantidad necesaria de Gellam Gum 0.25% (Fitagel)
6. Aforar al volumen final requerido y agitar hasta garantizar la dispersión del Fitagel
7. Autoclavar, tiempo de esterilización de 15 minutos a 121°C.

Tanto el medio de cultivo como los frascos de compota donde se sirve el medio se llevan al autoclave, así se garantiza que tanto el medio de cultivo como los recipientes se encuentran libres de patógenos que puedan afectar la integridad del medio y del material vegetal.

Los explantes en los frascos de compota fueron mantenidos en el cuarto de cultivo bajo fotoperiodo de 12 horas, con temperatura de 23 – 25 °C y con lámparas Cool-White de 80 – 100  $\mu\text{Moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### Protocolo de cultivo en medio líquido

En el caso del medio líquido se realizó una modificación con respecto al paso 5 de protocolo de preparación del medio sólido, donde se eliminó el agente gelificante Fitagel, y en cambio se adicionó el reactivo PPM (*Plant Preservation medium*), el cual tiene la función de proteger de contaminación el medio vegetal. Los tiempos de cultivo se especifican según el tratamiento que se esté realizando, los cuales se especifican más adelante. Las condiciones de luz, temperatura y fotoperiodo fueron las mismas utilizadas para los medios semi-sólidos.

Por otro lado, en el artículo de referencia "*Improve Production of Galanthamine and Related Alkaloids by Methyl Jasmonate in Narcissus confusus Shoot-Clumps*" (Colque *et al.*, 2004), los autores recomiendan usar 3 mg/L de Benciladenina. Para este trabajo se utilizó un análogo sintético, Bencilamino purina o BAP, a una concentración final de 3 mg/L.

Tanto para la hormona BAP como para los inductores químicos, Ácido Araquidónico y Metil Jasmonato, se tuvieron en cuenta dos recomendaciones; la primera es su almacenamiento a -20°C. La segunda recomendación es la temperatura a la cual se incorporan estos compuestos en el medio de cultivo después de autoclavado, la cual debe de realizarse a temperatura ambiente.

#### PASOS:

1. Pesar la cantidad necesaria del medio MS (Murashige y Skoog): 4.43g/l
2. Pesar la cantidad necesaria de sacarosa: 30 g/l
3. Diluir en agua destilada el medio MS y la sacarosa
4. Ajustar el pH en 5.70
5. Tomar el volumen necesario de PPM 0.5 mL/L
6. Aforar al volumen requerido y agitar hasta la homogenización del medio
7. Autoclavar, tiempo de esterilización de 15 minutos a 121°C
8. Reposar el medio hasta llegar a temperatura ambiente
9. Adicionar la cantidad necesaria de BAP: 3 mg/ml

10. Adicionar la cantidad necesaria del inductor (Ácido Araquidónico o Metil Jasmonato, según la tabla 2)

**Tabla 2.** Concentraciones de los inductores químicos ácido araquidónico y metil jasmonato y los explantes requeridos para cada tratamiento.

Inductor	Concentración final (uM)	Explantes
Ácido Araquidónico (AA)	3.28	3
	8.21	3
	16.42	3
Metil Jasmonato (MJ)	25	3
	50	3
	100	3
	250	3
Control	--	3

Se llevó un registro semanal de todos los explantes cultivados en medio semi-sólido, donde se verificaba el crecimiento del explante y la contaminación que pudieran presentar. Los explantes se cambiaron a medio fresco cada cuatro (4) semanas o si se percibía crecimiento de hongos o bacterias, para lo cual los explantes fueron lavados de la siguiente forma:

PASOS:

1. Cada explante se sumerge por 10 segundos en solución de hipoclorito comercial al 1% con Tween 20 (2 gotas/100 ml).
2. Lavar una vez con agua destilada estéril.
3. Sembrar el explante en nuevo medio semi-sólido, garantizando que la zona meristemática esté en contacto con el medio.

Para el caso de los tratamientos con los inductores en medio líquido, los explantes estuvieron durante los 28 días de tratamiento en agitación a 100 rpm, bajo las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura anteriormente nombradas para el cultivo en medio semi-sólido.

En los días que se evaluaron los explantes (día 3, día 10 y día 22) estos fueron cambiados a medio fresco. En cada evaluación, se llevó registro de los pesos de cada muestra, lo que permitió determinar el índice de crecimiento y la variación de peso en cada día de tratamiento.

### **6.1.2. Extracción de alcaloides**

Para la extracción de los alcaloides del tejido vegetal se siguió el siguiente protocolo, tomado del trabajo de grado de Andrea Escobar (Escobar Fuertes, 2014):

1. Poner en el mortero el material vegetal, adicionar nitrógeno líquido y macerar hasta pulverizar el tejido.
2. El macerado se acidificó con ácido clorhídrico al 5%, verificando el pH con papel tornasol
3. Sonicar por 15 minutos
4. Adicionar cloroformo en igual proporción a lo adicionado en ácido (si es necesario, sonicar para romper las emulsiones).
5. Descartar la fase de cloroformo, en este paso los alcaloides son solubles en medio acuoso.
6. Adicionar hidróxido de amonio al 30% hasta llegar a pH 10.
7. Adicionar aproximadamente 30 mL cloroformo (Ver paso 4)
8. Sonicar por 5 minutos.
9. La fase de cloroformo se filtró por gravedad y se adicionó aproximadamente 10 g de fosfato de sodio dibásico anhidro para eliminar el agua restante.
10. Se utilizó el Rapid Vap para secar la muestra con condiciones de 35°C, 250 bares de presión, agitación a 12 rpm durante 35 minutos.
11. El pellet se reconstituyó con 1 ml del estándar de Boldina solubilizado en metanol y preparado a 50 PPM (mg/L)
12. El volumen anterior se pasó por un filtro de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  y fue puesto en viales para UPLC.

Para la extracción del tejido vegetal se utilizó todo el explante, siguiendo paso a paso el protocolo anteriormente descrito. En el caso del medio de cultivo líquido, el protocolo se inició a partir del paso 2.

### **6.1.3. Determinación y cuantificación de alcaloides**

Previa a la inyección de las muestras en el UPLC-MS, se realizó una siembra en placas de cromatografía de capa fina las cuales fueron reveladas con el reactivo de Dragendorff. El objetivo de esto, fue observar la presencia de alcaloides en la muestra. Se sembró en un mismo punto de la placa la cantidad suficiente del extracto (20 gotas aproximadamente) para concentrar en ese mismo lugar los alcaloides que reaccionen con este reactivo, y así observar la coloración anaranjada cuando son positivos a la coloración con Dragendorff. La placa

utilizada fue de 3 x 3 cm, y las muestras fueron comparadas con el estándar de boldina dado a su semejanza con los alcaloides de amaryllidaceae, por un lado el número de sus ciclos así como la densidad electrónica. Tanto las muestras como el estándar se concentraron aplicando aproximadamente 20 gotas en el mismo sitio de la placa.

Para la cuantificación de los alcaloides presentes en las muestras de medio líquido y tejido, se preparó un estándar interno de Boldina a 50 PPM. El estándar se preparó utilizando como solvente metanol grado HPLC. De esta solución se tomó un (1) ml y se adicionó a cada muestra. Posterior a esto, se utilizaron filtros de nylon de 0.22 um para mejorar la limpieza de la muestra, y finalmente se inyectó en el UPLC acoplado al espectrómetro de masas.

Para la evaluación de los alcaloides en las muestras se emplearon las siguientes condiciones del UPLC (tabla 3):

**Tabla 3.** Consideraciones cromatográficas utilizadas en el UPLC.

<b>Columna</b>	<b>CSH Charged Surface Hybrid (2.1 mm x 100 mm, tamaño de partícula de 1.7 um)</b>
<b>Temperatura</b>	25°C
<b>Fase Móvil</b>	Solvente A: Agua (0.05% Ácido Fórmico). Solvente B: Acetonitrilo
<b>Flujo</b>	0.3 ml/min
<b>Longitud de Onda</b>	280 nm
<b>Gradiente</b>	0.0 – 2.0 min 95% A 0.7 – 2.2 min 87% A 2.5 – 3.6 min 84% A 4.2 – 4.8 min 77% A 5.0 – 6.0 min 70% A 7.0 – 7.8 min 95% A

Las condiciones utilizadas en el espectrómetro de masas fueron las siguientes (Tabla 4):

**Tabla 4.** Condiciones específicas para el desarrollo cromatográfico en el espectrómetro de masas

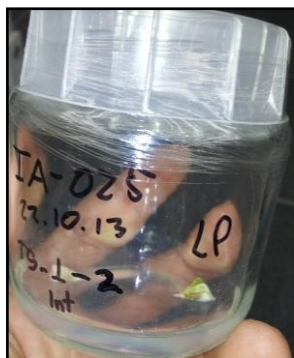
<b>Fuente (ES+)</b>	<b>Configuración</b>	<b>Característica</b>	<b>MS1 Scan</b>
<b>Capilar (Kv)</b>	3	Modo Del Ión	ES+
<b>Cono (V)</b>	10	Formato De Datos	Continuum
<b>RF (V)</b>	2.5	Masa Inicial	100.0
<b>Extractor (V)</b>	3	Masa Final	500.0
<b>Temperatura De La Fuente (°C)</b>	150	Tiempo De Scan (Sec)	3.000
<b>Temperatura Desolvatación (°C)</b>	450	Interscan Delay (Sec)	Automatic
<b>Flujo Del Gas Del Cono (L/Hr)</b>	20	Tiempo De Inicio (Min)	0.0
<b>Flujo Del Gas Para Desolvatación (L/Hr)</b>	900	Tiempo Final (Min)	9.0

## 7. RESULTADOS

En la primera parte del proyecto se llevó a cabo el cultivo *in-vitro* en medio semi-sólido de los explantes proveniente de las entradas IA-025, IA-020, IA-100, IA-021 y IA-023 de la colección de Amaryllidaceae de la Universidad Icesi. Durante el proceso se identificaron características relevantes del proceso de desinfección y crecimiento, como la necesidad del uso de guantes, tapabocas y en algunas ocasiones utilizar una bata exclusiva para la cabina de bioseguridad; medidas con las cuales se logró disminuir la contaminación y de paso optimizar la respuesta del tejido vegetal en medio semi-sólido.

La nomenclatura utilizada para identificar el material vegetal y los tratamientos se basó en cuatro parámetros: en el primero indicaba el nombre del explante, posterior a este la fecha en la que se realizó la siembra del mismo, luego la técnica de corte empleada, es decir, *twin scales*, seguido finalmente de la posición en el bulbo de donde fue tomada la *twin scale* y el número consecutivo de explantes de este tipo de sembrado.

Por ejemplo en la figura 3 se describe el material: IA-025; fecha de cultivo: 22.10.13; técnica: TS – 1 – 2 (*Twin Scales*, capa interna 1, y repetición 2, respectivamente). Debido a la cantidad de explantes que salen de un bulbo, se cultivaron 2 o 3 explantes por tarro de compota como estrategia de optimización de espacio y medio.



**Figura 3.** Descripción de la nomenclatura utilizada en medio *in-vitro* semi-sólido.

El primer explante sembrado en cultivo *in vitro* semi-sólido fue **IA-025** en la fecha del 22 de octubre de 2013. La solución de hipoclorito para la esterilización del material vegetal se preparó partiendo de la presentación de límpido Clorox, el cual declara una concentración de 5.5% de hipoclorito de sodio. Así, la solución de hipoclorito al 50% utilizada en el protocolo contiene 2.75% de hipoclorito de sodio.



Una vez se realizó la desinfección y la siembra de los explantes de un bulbo al medio de cultivo semi-sólido, estos fueron distribuidos equitativamente entre crecimiento bajo condiciones de luz (12 horas/día) y oscuridad (24 horas/día). De estos tratamientos se concluyó que pasada la quinta (5) semana de cultivo, los explantes en oscuridad aun no tenían un desarrollo marcado en comparación los expuestos a la luz. Por esta razón se decidió pasar todos los explantes a 12 horas/día de exposición con luz artificial, en la cual se comprobó una respuesta positiva a la siguiente semana.

A la semana dos, se observó que en algunos explantes se había iniciado la apertura de sus escamas, lo cual observamos en todo el trabajo, es uno de los signos positivos de desarrollo. Seguido a este proceso, los explantes presentaron un cambio de color blanco a rojo intenso y justo una semana después la coloración cambió a verde intenso con la aparición de hojas, raíces y/o bulbos. El efecto contrario o sin respuesta se detalló cuando las escamas se tornaban de color café o la coloración inicial del tejido no cambiaba, lo que por tendencia mostró que el tejido no estaba respondiendo o simplemente el explante moría.

El siguiente bulbo cultivado en enero de 2014 en medio semi-sólido fue el **IA-020**. En este caso se modificó la concentración de hipoclorito para la desinfección inicial, se utilizó 2.5% de hipoclorito comercial (0.14% de concentración final del reactivo) (ver tabla 1). En esta siembra se obtuvo un porcentaje de contaminación del 16% y, un porcentaje en respuesta del 0.0%. Al no obtener resultados en las siguientes 8 semanas de cultivo, se decidió descartar el material vegetal.

A la fecha del 10 de enero de 2014 se realizó la tercera siembra, con el material **IA-100**. Para este material vegetal el porcentaje de hipoclorito fue de 2.5% (teniendo 0.14% de concentración final del reactivo).

En este tratamiento, el porcentaje de contaminación estuvo en un 29% y la respuesta de los explantes fue de 81% (gráfico 1). Esta respuesta en los explantes se evaluó considerando la coloración verdosa del tejido, aparición de hojas, bulbos o raíces. En algunos casos se evidenciaron primero las hojas y posteriormente el bulbo, mientras en unos pocos explantes se observaron hojas y raíces sin bulbo pasada una semana después de la siembra.

El siguiente material vegetal cultivado el 11 de febrero de 2014 en condiciones *in-vitro* fue el **IA-021**. Con este explante se aumentó el porcentaje de hipoclorito para la desinfección inicial, incrementando de un 2,5% a 25% del comercial (equivalente a 1.37% de concentración final) (gráfico 1). De este modo se logró una mejora en las dos variables que se estaba evaluando, en este caso se obtuvo un porcentaje de contaminación del 2% con una respuesta del 98%, siendo este material el que mejor resultados presentó.

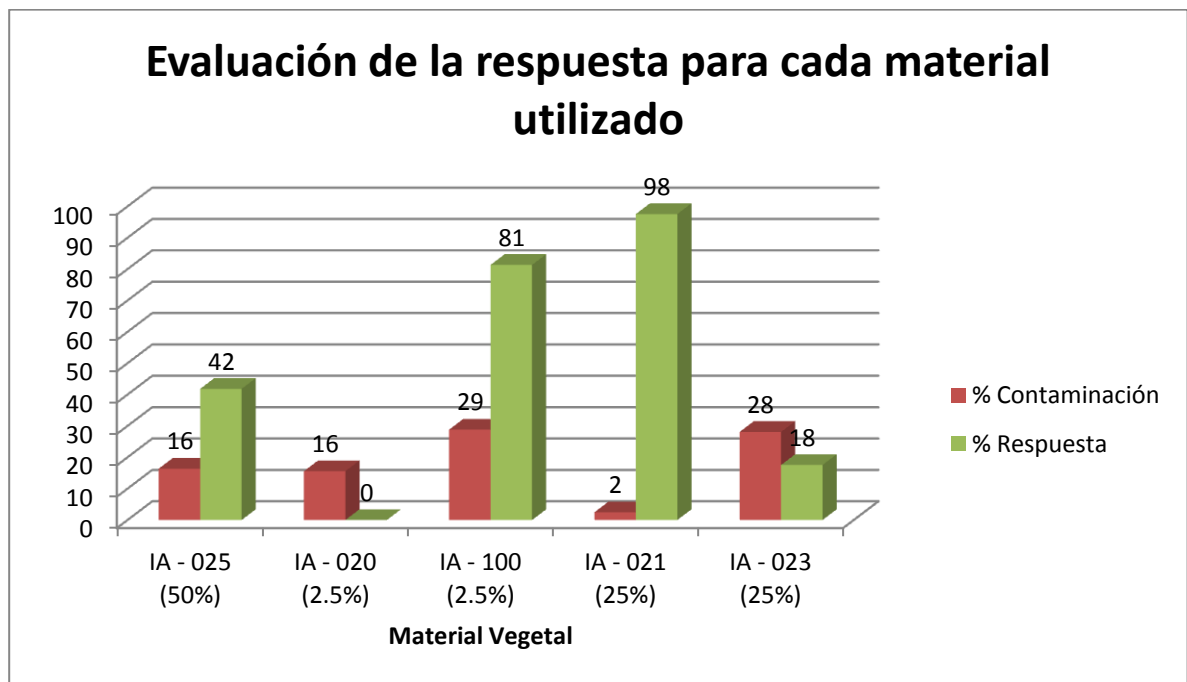
El 13 de febrero de 2014 se realizó el cultivo del material **IA-023**, en el cual se utilizó hipoclorito al 25% (1.37% de concentración final) en el primer lavado de

desinfección, igual al explante anterior (IA-021), pero para el segundo lavado no se agregó tween 20 a la solución de hipoclorito al 1%. Dadas estas condiciones, se obtuvo un 28% de contaminación y un 18% de respuesta (gráfico 1).

En la siguiente tabla (tabla 5) y en el gráfico 1 se hace un breve resumen de los resultados ya expuestos:

**Tabla 5.** Datos de contaminación y respuesta del medio de cultivo in-vitro para la especie *Zephyranthes carinata*. El porcentaje de hipoclorito para la desinfección inicial está dado con base en la solución comercial (5,5% de reactivo).

Siembra	% Hipoclorito	% Contaminación	% Respuesta
IA - 025	50	16	42
IA - 020	2.5	16	0
IA - 100	2.5	29	81
IA - 021	25	2	98
IA - 023	25	28	18



**Gráfico 1.** Resumen de resultados del porcentaje de contaminación y respuesta en relación al porcentaje de hipoclorito empleado en la desinfección inicial. En el eje horizontal se presentan los materiales cultivados y en paréntesis los porcentajes de hipoclorito utilizados para cada material.

Con base en los resultados obtenidos en esta primera aproximación exploratoria al cultivo *in vitro* de *Z. carinata*, se concluye que las condiciones de desinfección óptimas incluyen: concentración de hipoclorito comercial en el primer lavado a 25% con Tween 20 (2 gotas/100 ml), y en el segundo lavado hipoclorito comercial al 1% también con Tween 20 (2 gotas/100 ml).

### **Transferencia de cultivo de medio semi-sólido a medio líquido**

Antes de realizar la transferencia de explantes de medio semi-sólido a líquido, se evaluó la producción de alcaloides en los tejidos de explantes en diferentes estadios de desarrollo. Para ello se tomó registro de los explantes cultivados inicialmente que tuviesen hojas largas (aproximadamente 4-5 cm) y medianas (aproximadamente 3-4 cm). Se tomaron 5 frascos de hojas largas y 4 frascos de hojas medianas, clasificados de la siguiente forma (tabla 6):

**Tabla 6.** Tipos de hojas, explantes y pesos del material de prueba para la extracción de alcaloides.

Tamaño de hoja	Explante	Peso de las hojas (g)	
<b>Hoja Grande (HG)</b>	HG 1	TS – 2 – 3 A	0.1093
	HG 2	TS – 1 – 6 C	0.1526
	HG 3	TS – 3 – 7 B	0.0689
	HG 4	TS – 1 – 5 A	0.0494
	HG 5	TS – 1 – 6 A	0.1431
<b>Hoja Mediana (HM)</b>	HM 1	TS – 1 – 5 B	0.0389
	HM 2	TS – 2 – 1 A	0.0302
	HM 3	TS – 3 – 2 A	0.0236
	HM 4	TS – 1 – 1 A	0.0326

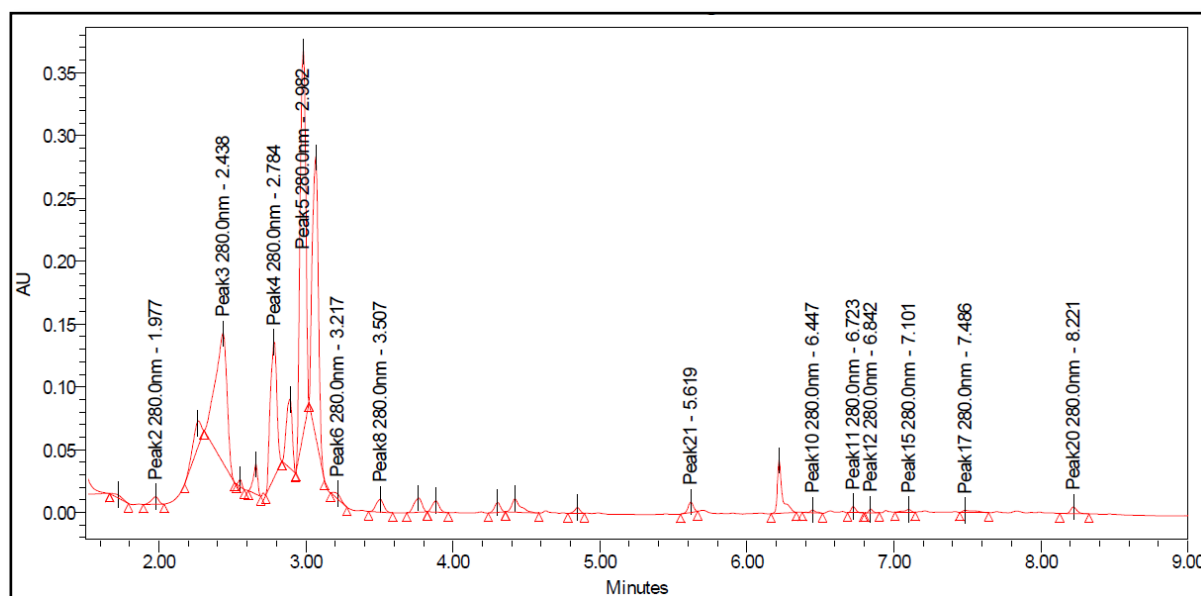
Se extrajo los alcaloides a partir de las hojas provenientes de estos materiales como se indica en los materiales y métodos (sección 6.1.2). Se realizó un corrido cromatográfico con todas las muestras mediante el UPLC con las condiciones ya especificadas, sin incluir estándar interno. Los resultados de los perfiles y los picos de absorción se compararon con la biblioteca de alcaloides realizada en la Universidad Icesi por la estudiante Andrea Escobar (Escobar Fuertes, 2014), y no se encontró ningún metabolito acorde a los ya conocidos.

Esto posiblemente es consecuencia de la poca cantidad de material vegetal utilizado (entre 0.02 y 0.1 g de tejido inicial). Con esta problemática, se decidió aumentar la cantidad de material vegetal y con esto incrementar la probabilidad de identificar los alcaloides.

Se programó una segunda prueba la cual consistió en hacer la extracción de alcaloides a partir de toda la planta, subdividida en dos partes: muestra 1 de **hojas y bulbos**, y muestra 2 de **raíces**. El explante que se tomó para esta prueba

fue IA-025, TS – 2 – 3 B, el cual provenía de las escamas intermedias del bulbo original, con 16 semanas de crecimiento y formación de hojas, bulbo y raíces. El corrido cromatográfico de estas muestras presentó alcaloides con tiempos de retención similares a los reportados en la biblioteca de alcaloides (gráfico 2, (Escobar Fuertes, 2014)).

En el cromatograma obtenido (gráfico 2) se presentan los picos de absorción de los alcaloides identificados, y en la tabla 7 se muestran los tiempos de retención para cada pico del cromatograma, de esta forma el equipo realiza un paralelo entre los tiempos de retención de la biblioteca con los obtenidos en la muestra, con lo que se registra la presencia de tres (3) alcaloides en hojas y bulbos.



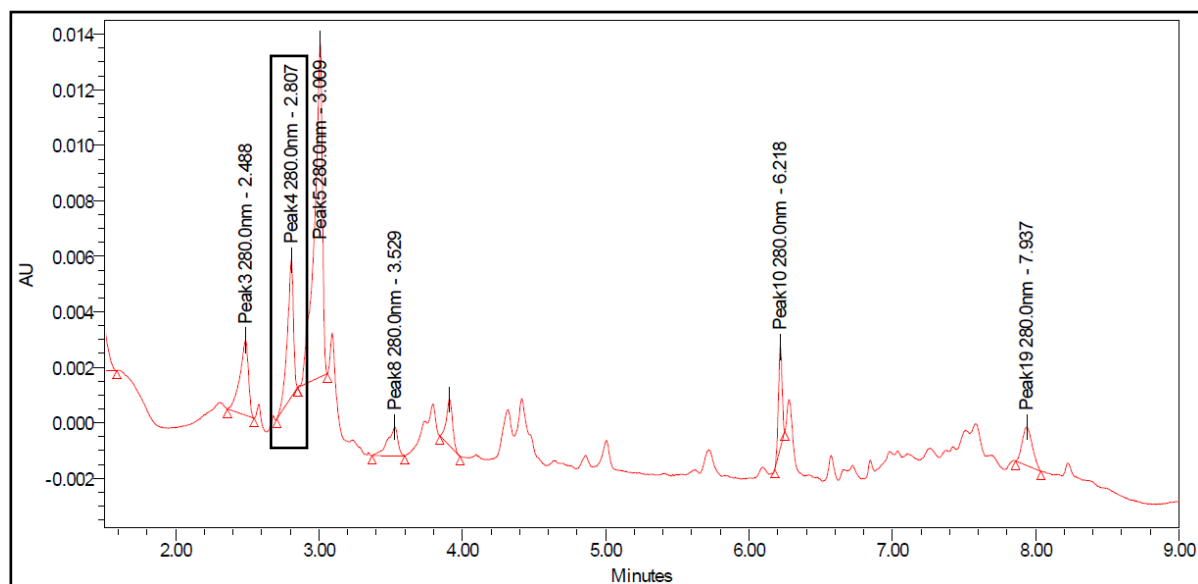
**Gráfico 2.** Cromatograma para la prueba en la identificación de alcaloides en hojas y bulbos cultivados in-vitro, material IA-025 TS-2-3-B.

En la siguiente tabla (tabla 7) se muestran los picos registrados para tiempos de retención mayores a 2.661 minutos, que fue el límite observado de detección de moléculas.

**Tabla 7.** Resultados de la prueba de identificación de alcaloides en hojas y bulbo (muestra 1) de *Zephyranthes carinata* por el método UPLC. Tres alcaloides fueron positivamente identificados por contraste con la biblioteca espectral (Escobar Fuertes, 2014), los alcaloides 11, 25 y 14.

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
9		2.661	12.336	90.000	Alcaloide 11	3.881	90.000
10	Peak4 280.0nm	2.784	6.210	32.424			
11		2.892	6.736	90.000			
12	Peak5 280.0nm	2.982	5.713	15.468	Alcaloide 25	9.344	27.317
13		3.068	4.545	26.835			
14	Peak6 280.0nm	3.217	11.35€	90.000			
15	Peak7 280.0nm	3.317					
16	Peak8 280.0nm	3.507	9.588	90.000			
17		3.767	9.154	90.000			
18		3.884	3.679	90.000			
19		4.304	10.755	90.000			
20		4.423	41.624	90.000			
21		4.848	12.017	90.000			
22	Peak9 280.0nm	5.402					
23	Peak21	5.619	6.680	90.000			
24		6.219	11.81'	52.520	Alcaloide 14	4.135	19.233

En los resultados para la muestra 2 correspondiente a raíces, se logró reconocer un solo pico de absorción para alcaloides a los 2.807 minutos (gráfico 3) reportado como el alcaloide 23, con base en la comparación con la biblioteca de Escobar (Escobar Fuertes, 2014).



**Gráfico 3.** Cromatograma para la prueba de identificación de alcaloides en raíces cultivadas in-vitro.

En la siguiente tabla (tabla 8) se registran todos los picos de absorción identificados para el corrido cromatográfico de raíces (muestra 2). Se hace énfasis en el pico observado para el tiempo de retención de 2.807 minutos, identificado como alcaloide 23 con base en la biblioteca espectral de alcaloides de *Zephyranthes* de la Universidad Icesi (Escobar Fuertes, 2014).

**Tabla 8.** Resultados de la prueba preliminar de identificación de alcaloides en raíces (muestra 2) de *Zephyranthes carinata* por el método UPLC. Un alcaloide fue positivamente identificado por contraste con la biblioteca espectral (Escobar Fuertes, 2014) – alcaloide 23.

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1		1.213	23.243	3.988			
2	Peak1 280.0nm	1.301					
3		1.436	8.324	5.297			
4	Peak2 280.0nm	1.942					
5	Peak3 280.0nm	2.488	12.305	44.174			
6	Peak4 280.0nm	2.807	9.054	20.625	Alcaloide 23	3.971	11.99C
7	Peak5 280.0nm	3.009	7.139	9.152			
8	Peak6 280.0nm	3.164					

Dado que con las pruebas anteriores se observó que poca cantidad de material dificulta la detección en el UPLC, se decidió que los tratamientos para el cultivo en medio líquido deberían agrupar 3 explantes de un mismo material, y de esta forma aumentar la sensibilidad de detección de los alcaloides producidos.

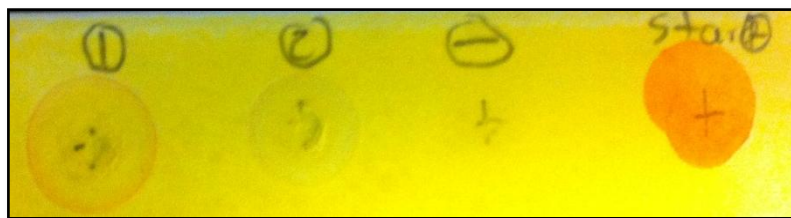
### Prueba en medio líquido

Para iniciar los experimentos en medio líquido con los inductores químicos (ácido araquidónico y metil jasmonato), se llevó a cabo una prueba de liberación de alcaloides al medio de cultivo líquido. Para ello se tomó el material IA-025 el cual se encontraban en la semana 18 de cultivo. Este material ya presentaba crecimiento de hojas, bulbos y en algunos casos raíces. El cultivo *in-vitro* se realizó en agitación constante a 110 rpm, temperatura ambiente y en condiciones iguales a las descritas para el cultivo semi-sólido. La prueba se realizó con un total de 6 explantes, distribuidos de la siguiente manera (tabla 9).

**Tabla 9.** Explantes utilizados para la primera prueba de extracción de alcaloides del medio de cultivo líquido.

Muestra	Material	Explantes	Peso del material (g)	Total de pesos por muestra (g)
1	IA - 025	TS-1-1A	0.706	0.944
		TS-1-1B		
		TS-3-6B	0.238	
2	IA - 025	TS-2-1A	0.680	0.795
		TS-2-1B		
		TS-3-2A	0.115	

En la figura 4 se observa la prueba cromatográfica en TLC para las muestras 1 y 2 de presencia de alcaloides en el medio líquido, y el estándar de Boldina. Al revelarse con el reactivo de Dragendorff, se observó la presencia de compuestos alcaloidales en las muestras obtenidas de medio líquido (posiciones 1 y 2 en la figura 4). Esto evidencia que los explantes sí liberan alcaloides al medio, lo que permitió programar los tratamientos con los inductores seleccionados, ácido araquidónico (AA) y metil jasmonato (MJ).



**Figura 4.** Placa de TLC para evaluar la presencia de alcaloides en el medio líquido para las muestras 1 y 2, utilizando como control positivo la Boldina (última posición). Entre la muestra 2 y el estándar se sembró el negativo, el cual consiste en medio de cultivo sin crecimiento de explantes. La TLC fue revelada con el reactivo de Dragendorff.

## TRATAMIENTO CON INDUCTORES

Para los tratamientos con los inductores, se preparó el medio de cultivo *in-vitro* líquido, tal como se describe en la metodología. Los explantes se sembraron en frascos de compota con el respectivo medio de cultivo líquido. Con base en las pruebas de detección de alcaloides previas, se determinó el uso de tres explantes por frasco de compota. Dada la disponibilidad del material vegetal y de reactivos, fue necesario iniciar con el tratamiento con ácido araquidónico. En este experimento, los explantes fueron transferidos a medio fresco los días 3 y 10, y en el día 28 se llevó a cabo la extracción de alcaloides tanto del tejido y como del medio final.

### *Tratamiento con Ácido Araquidónico (AA)*

Para este tratamiento se empleó el material de cultivo *in vitro* IA-100, IA-021 y IA-023, con un total de 12 explantes cada uno, los cuales se distribuyeron de a tres explantes por muestra, es decir, 3 explantes por tratamiento (Ver anexo 4, tabla 15).

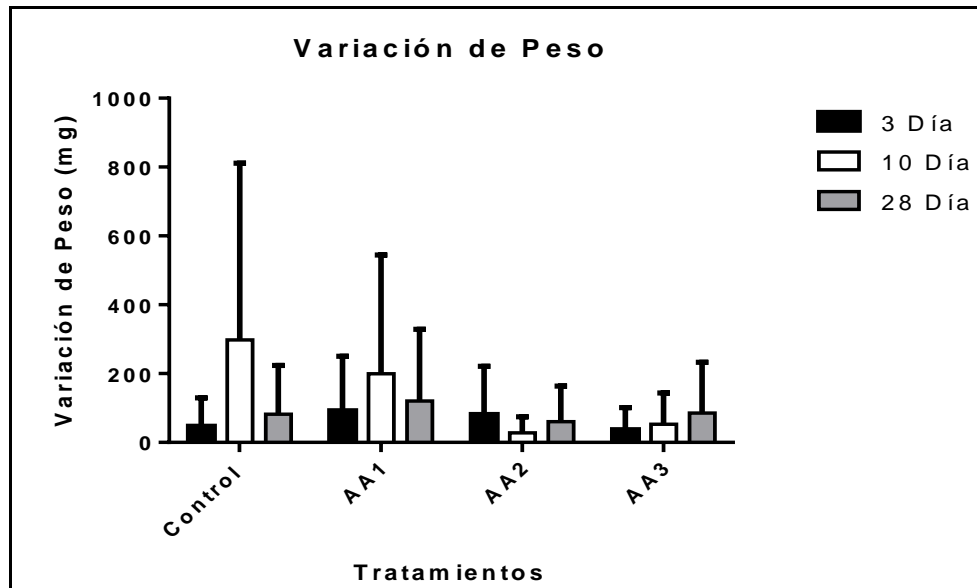
Durante el experimento con los tratamientos se realizó el seguimiento de los pesos de cada unidad experimental (1 frasco con 3 explantes) para cada día de evaluación (3, 10 y 28 días), y de esta forma determinar la ganancia o pérdida de peso en cada tratamiento (ver tabla 16 del anexo 4). Para esto se tuvo en cuenta la variación de peso y el índice de crecimiento. A continuación se presenta la muestra de cálculos para las dos variables.

$$\text{Variación de peso} = \text{peso final} - \text{peso inicial}$$

$$\text{Índice de Crecimiento} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}}$$

El registro de los datos para la variación de peso e índice de crecimiento se encuentran en el anexo 4, tabla 16. Con base en estos datos, las gráficas de variación de peso y el índice de crecimiento (gráficos 4 y 5) permitieron identificar la tendencia de estas variables en todo el estudio.

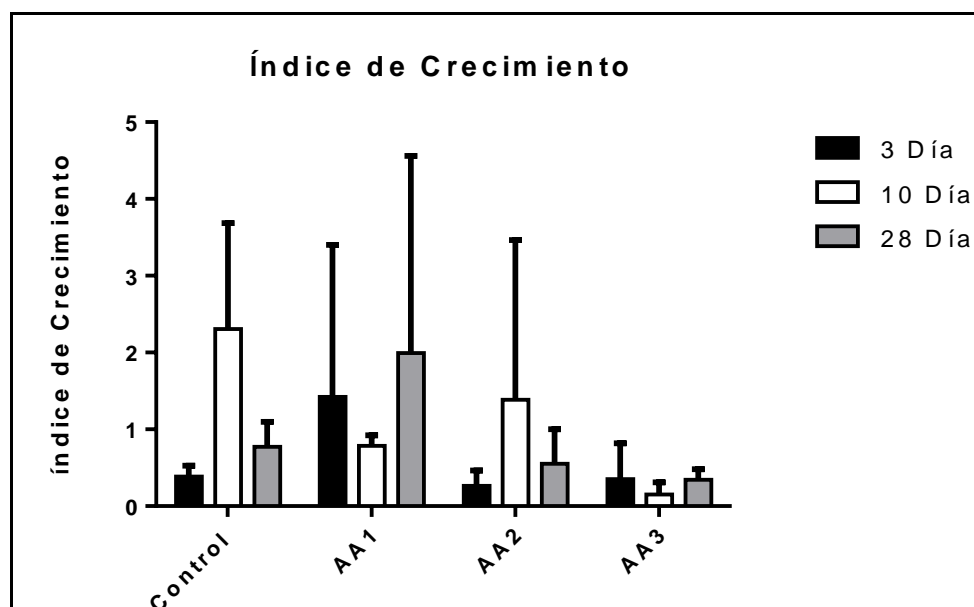




**Gráfico 4.** Variación de peso de los explantes respecto a su peso inicial (datos combinados para IA-100, IA-021 y IA-023) en los días 3, 10 y 28 de tratamiento con el inductor Ácido Araquidónico. Control: sin inductor; AA1: 3.28 uM; AA2: 8.21 uM; AA3: 16.42 uM.

En el gráfico 4, se evidencia una disminución en la variación de peso de los explantes a las concentraciones AA2 y AA3 (8.21 uM y 16.42 uM de AA respectivamente). Esto puede deberse a que tratamientos en concentraciones mayores a 5 mg/L de ácido araquidónico inducen muerte celular (Colque et al., 2004). La concentración de 8.21 uM corresponde a 2.5 mg/L, lo que representa la mitad del valor tóxico reportado. Adicionalmente pudo haber influido el tiempo de exposición a este reactivo lo que resulta en la disminución del crecimiento del explante.

Al realizar el mismo cálculo para la concentración 16.42 uM, se obtiene que equivale a 5.0 mg/L, por lo cual a estas dos concentraciones se puede esperar que las células del explante no tuvieran mayor crecimiento. Esto se evidencia al observar los gráficos 4 y 5, en concordancia a lo reportado en la literatura con respecto a la toxicidad del reactivo.

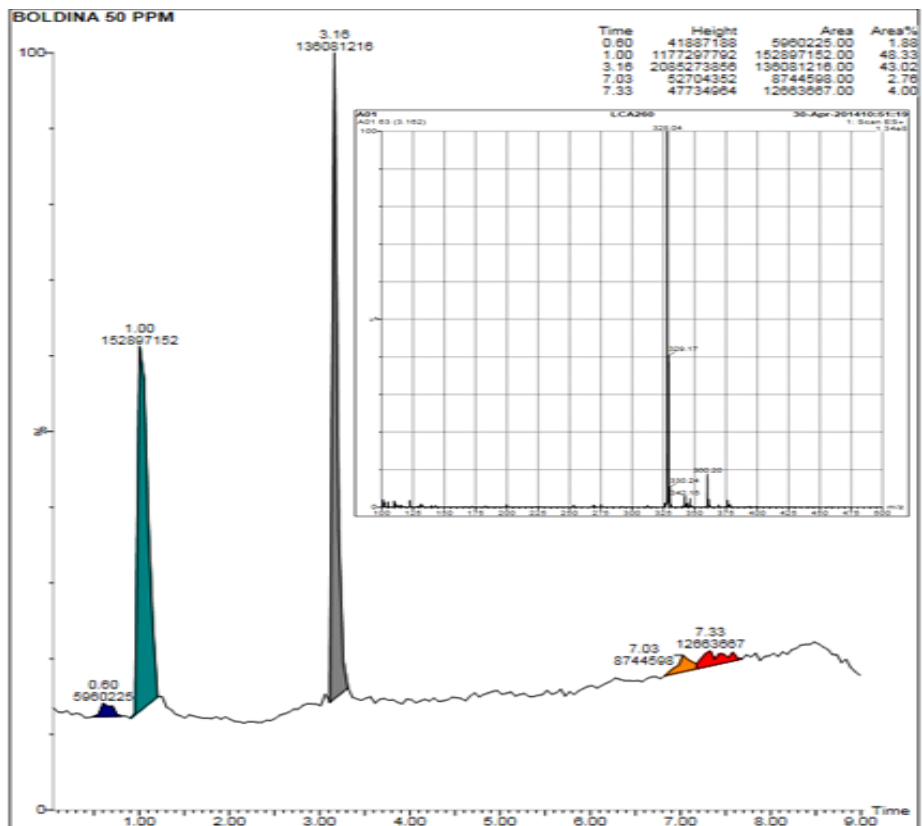


**Gráfico 5.** Índice de crecimiento de los explantes utilizados (datos combinados para IA-100, IA-021 y IA-023) en los días 3, 10 y 28 de tratamiento con el inductor Ácido Araquidónico. Control: sin inductor; AA1: 3.28  $\mu$ M; AA2: 8.21  $\mu$ M; AA3: 16.42  $\mu$ M.

### Corridos Cromatográficos para la obtención de alcaloides

La identificación de los alcaloides se realizó con el UPLC-MS. Estos equipos fueron acondicionados inyectando el solvente Metanol, dado que tanto el estándar como las muestras se solubilizaron en dicho solvente. Posteriormente, la primera inyección correspondió al estándar de boldina, utilizándolo como estándar interno para la posterior cuantificación de los alcaloides identificados. El cromatograma tanto del espectro UV como el espectrómetro de masas para el estándar de boldina se presenta en el gráfico 6. El tiempo de retención fue de 3.6 minutos, y el área de 136081216 para una concentración de 50 mg/L.

En el gráfico del UV para la boldina (gráfico 6) se evidencia el pico característico para esta molécula en el tiempo de retención de 3.6 minutos, aunque también se observa un primer pico en 1.00 minutos el cual correspondió al metanol, solvente utilizado la preparación de este estándar.



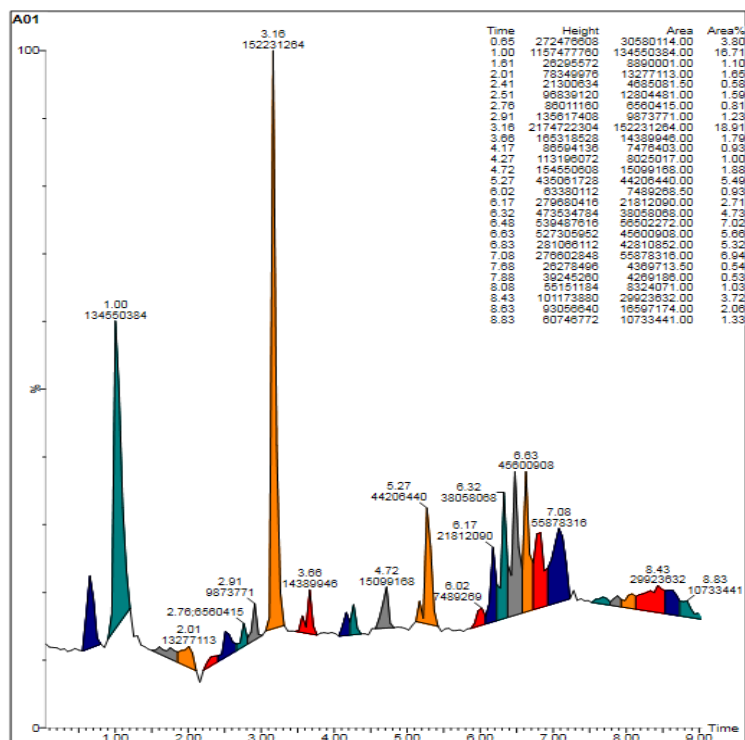
**Gráfico 6.** Cromatograma del UPLC-MS para el estándar de Boldina 50 mg/l.

La identificación de los alcaloides se realizó tanto en medio como en tejido vegetal, de tal forma que los alcaloides fueron presentados como alcaloides totales, siendo estos la sumatoria de todas las moléculas alcaloidales en cada muestra. Los pesos obtenidos por el espectrómetro de masas fueron comparados en artículos con el fin de concretar a que alcaloide corresponde cada peso molecular.

A continuación se presenta la tabla resumen del tratamiento A01 que corresponde al individuo IA-100, concentración de 3.28 uM, día 3 (tabla 10), debido a que este fue el que registró mayor cantidad de alcaloides (ALK). Estos alcaloides se reportan como fracción total de alcaloides, es decir la suma de la concentración o área obtenida en cada uno de los picos de alcaloides identificados. El tratamiento A01 registró un total de 95.77 mg/L de alcaloides, y en el gráfico 7 se muestra el corrido cromatográfico para esta misma muestra.

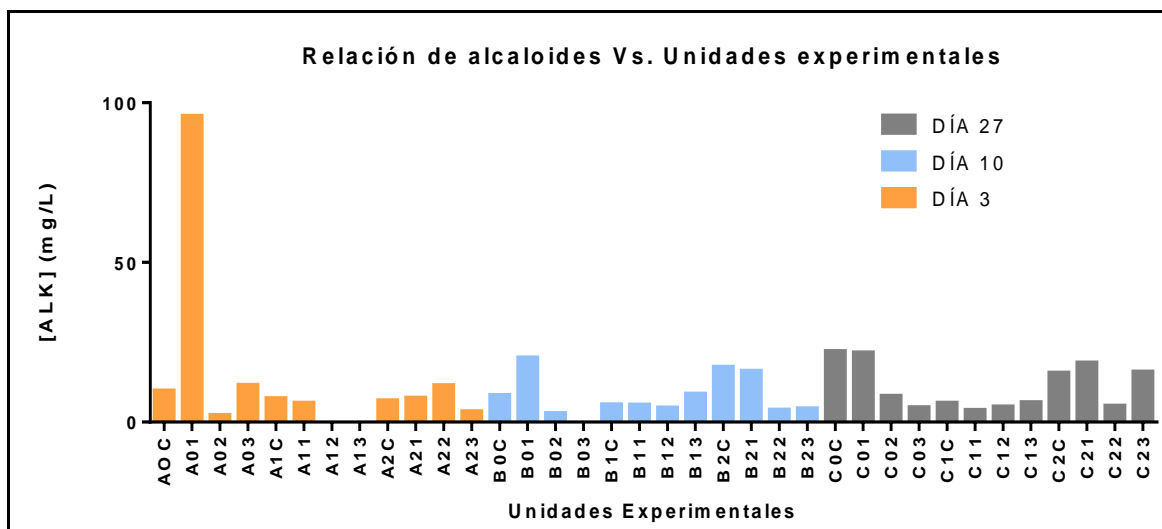
**Tabla 10.** Alcaloides identificados para la muestra A01: IA-100, AA1, Día 3, mediante corrido cromatográfico en UPLC y espectrómetro de masas.

A01			
Tipo de Muestra	Time	Área	Concentración (mg/L)
METANOL	1	134550384	49.44
BOLDINA	3.16	152231264	55.93
ALK1	6.17	21812090	8.014
ALK2	6.32	38058068	13.98
ALK3	6.48	56502272	20.76
ALK4	6.63	45600908	16.76
ALK5	6.83	42810852	15.73
ALK6	7.08	55878316	20.53
	<b>ALK TOTALES</b>		<b>95.77</b>



**Gráfico 7.** Cromatograma de la muestra A01. En la tabla sobrepuesta se expone la información de todos picos identificados por el espectrómetro de masas.

El gráfico 8 resume las cantidades experimentales de alcaloides liberados al medio de cultivo por los explantes en cada tratamiento a los diferentes días de tratamiento 3, 10 y 27, con el inductor AA. En este gráfico se observa que la muestra que más alcaloides reporto fue la A01.



**Gráfico 8.** Concentración total de alcaloides liberados al medio en los tratamientos con Ácido Araquidónico (AA). En la nomenclatura de cada barra (eje horizontal), la primera posición corresponde al día de evaluación (A= día 3, B= día 10, C= día 27); la segunda posición corresponde al material (0 = IA-100; 1 = IA-021; 2 = IA-023); la tercera posición corresponde al tratamiento (C = Control 0  $\mu$ M AA, 1 = 3.28  $\mu$ M del AA, 2 = 8.21  $\mu$ M del AA y 3 = 16.42  $\mu$ M del AA).

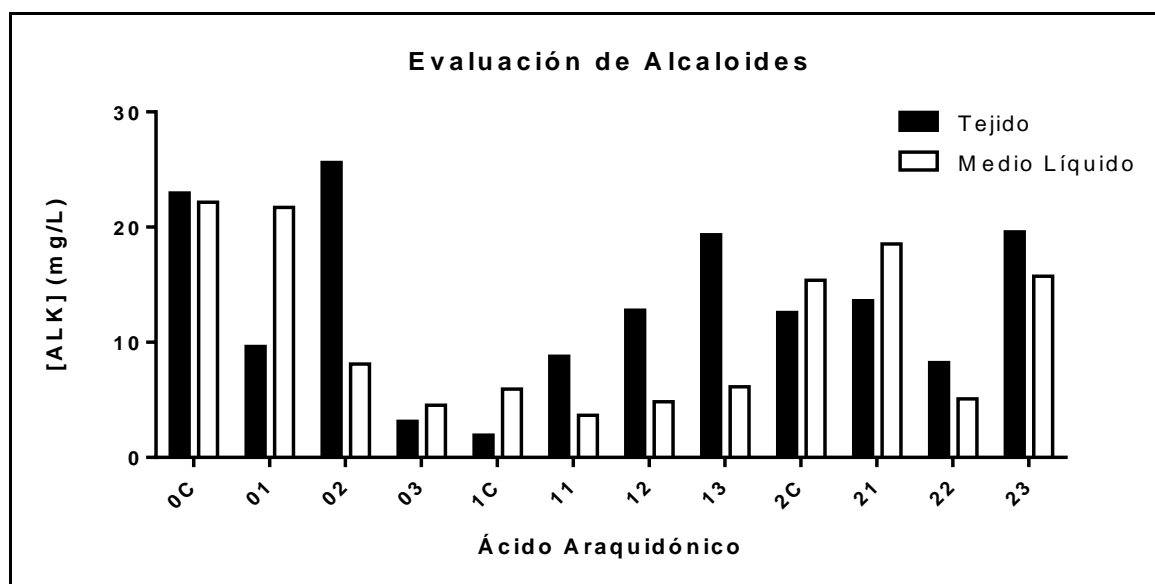
En la tabla 11 se presenta un resumen de los 6 alcaloides mayoritarios que fueron liberados al medio líquido con ácido araquidónico, y pudieron ser parcialmente identificados. Con respecto a estos alcaloides, el ALK 3 con peso molecular de 382 g/mol fue reportado como alcaloide desconocido para la especie *Zephyranthes grandiflora* (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012). Aunque los alcaloides de Amaryllidaceae tienen pesos moleculares impares, en este proyecto se reportan pares dado que la protonación por el espectrómetro de masas hace que sus pesos moleculares aumenten en una unidad. Estos autores referencian este alcaloide aun como desconocido, por lo tanto en este trabajo se presenta de igual forma hasta poder obtener nombre específico de la molécula.

En la misma tabla se evidencian otras 5 moléculas que pueden representar moléculas alcaloidales aun sin tener certeza de ello. Por ello solo se da referencia de las masas, tiempos de retención y áreas obtenidas experimentalmente.

**Tabla 11.** Resumen de alcaloides identificados en los corridos cromatográficos a partir de las muestras de medio líquido, tratadas con el inductor ácido araquidónico.

Tipo de Muestra	Tiempo	Peso Molecular (g/mol)
ALK1	6.17	316
ALK2	6.32	360
ALK3	6.48	382
ALK4	6.63	384
ALK5	6.83	404
ALK6	7.08	452

Al comparar los alcaloides liberados al medio con los obtenidos a partir del tejido vegetal de los explantes, se encontró que la tendencia para todos los tratamientos es una mayor cantidad de alcaloides en los tejidos. Sin embargo, para el tratamiento con AA a la menor concentración, las muestras IA-100 e IA-023 presentaron mayor cantidad de alcaloides totales liberados al medio (grafico 9). Las muestras de los controles de IA-023 e IA-100 en la concentración más alta de AA, evidenciaron liberación de alcaloides en concentraciones similares tanto en tejido vegetal como en el medio líquido.

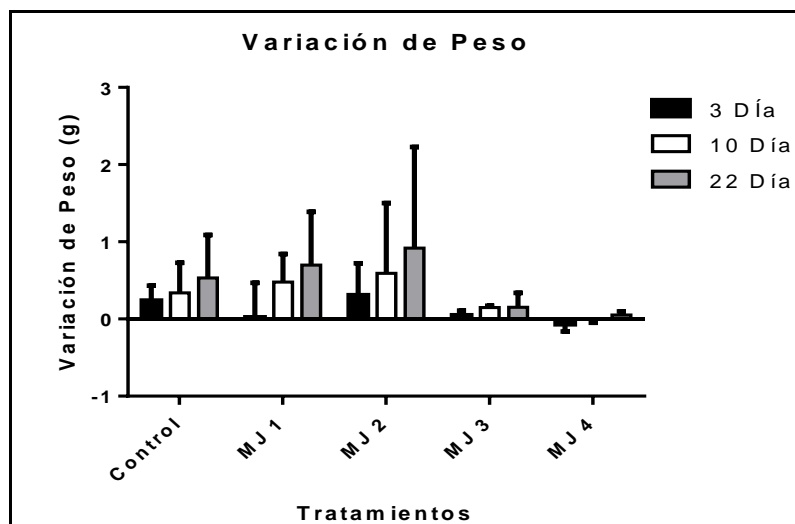


**Gráfico 9.** Evaluación de los alcaloides totales liberados al medio líquido comparado con los obtenidos en el tejido vegetal. La nomenclatura de cada barra (eje horizontal) en la primera posición: 0: IA-100; 1: IA-021; 2: IA-023. En la segunda posición, C: control; 1: AA1; 2: AA2; 3: AA3. La concentración de alcaloides se expresa en mg/L (eje vertical).

### Tratamiento con Metil Jasmonato (MJ)

Para el tratamiento con metil jasmonato, se mantuvo las mismas condiciones de la hormona BAP y del reactivo de protección micro biológica, PPM (*Plant Preservative Mixture*), tal como en los medios con el AA.

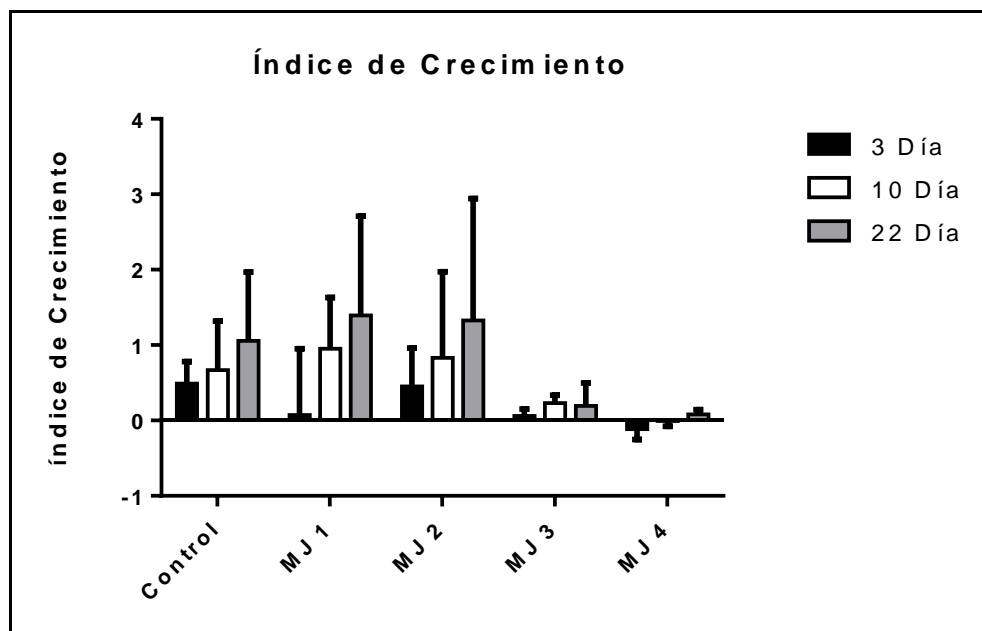
Al igual que con el inductor de AA, se determinó el índice de crecimiento y la variación en peso en los tres días de evaluación (3, 10 y 22 días, en lugar de 27 como en los tratamientos con AA). Debido a un error en el procedimiento causando confusión con las muestras, por lo que no fue posible registrar tanto el índice de crecimiento como la variación de peso para el día 28 del experimento; aunque si fue posible realizar la extracción y la cuantificación de los alcaloides. En la tabla 17 del anexo 4, se indican los explantes utilizados para cada material vegetal, y en la tabla 18 del anexo 4 se indican los índices de crecimiento y variación de peso. Con los datos consignados en las tablas anteriormente nombradas, se obtuvieron los gráficos para el índice de crecimiento así como la variación en peso (gráficos 10 y 11).



**Gráfico 10.** Variación de peso de los explantes respecto a su peso inicial (datos combinados para IA-100, IA-021 y IA-023) en los días 3, 10 y 22 de tratamiento con el inductor Metil Jasmonato (MJ). Control: sin inductor; MJ 1: 25  $\mu$ M; MJ 2: 50  $\mu$ M; MJ 3: 100  $\mu$ M; MJ 4: 250  $\mu$ M.

Respecto a las dos variables evaluadas en los gráficos 10 y 11, se observa una disminución en la variación de peso así como en el índice de crecimiento de los explantes. Al verificar estos datos en el estudio de Colque y colaboradores (2004), se encuentra la misma tendencia. En este estudio, los autores observaron que bajas concentraciones del inductor MJ no afectan el crecimiento del explante,

mientras que al aumentar la concentración por encima de 100 uM, se tiene una influencia negativa en el crecimiento de los explantes (Colque et al., 2004).



**Gráfico 11.** Índice de crecimiento de los explantes utilizados (datos combinados para IA-100, IA-021 y IA-023) en los días 3, 10 y 22 de tratamiento con el inductor Metil Jasmonato (MJ). Control: sin inductor; MJ 1: 25 uM; MJ 2: 50 uM; MJ 3: 100 uM; MJ 4: 250 uM.

### Condiciones De Los Corridos Cromatográficos

Para los corridos cromatográficos las muestras fueron rotuladas de la siguiente forma:

**Tabla 12.** Descripción del rotulo utilizado para el tratamiento con Metil Jasmonato.

Primera posición		Segunda posición	Tercera posición
Material		Tratamiento	Día de evaluación
		Control	
IA-100	100	MJ 1	3
IA-021	21	MJ 2	10
IA-020	20	MJ 3	22
		MJ 4	28*

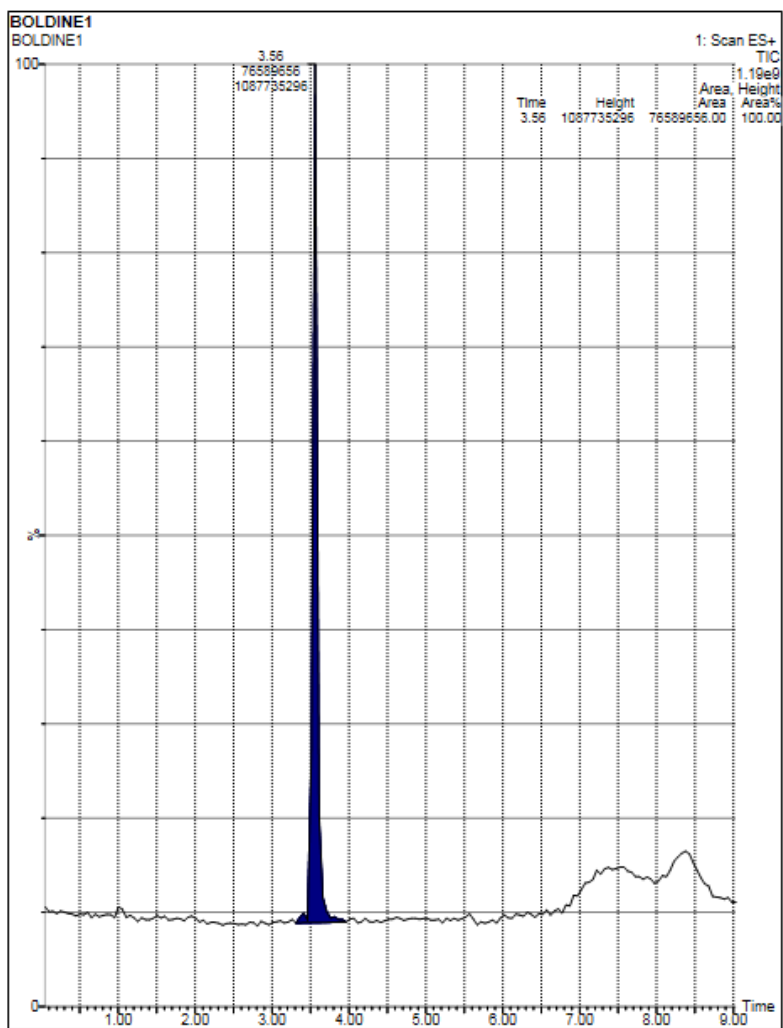
\*El día 28 correspondió solo para la extracción alcaloidal, debido a un error en el procedimiento, con lo que no se logró tener registro de la variación de peso para este día.



Por ejemplo, la muestra 100MJ2-22 corresponde al material IA-100, tratamiento MJ 2 (concentración de metil jasmonato #2), día 22 de evaluación.

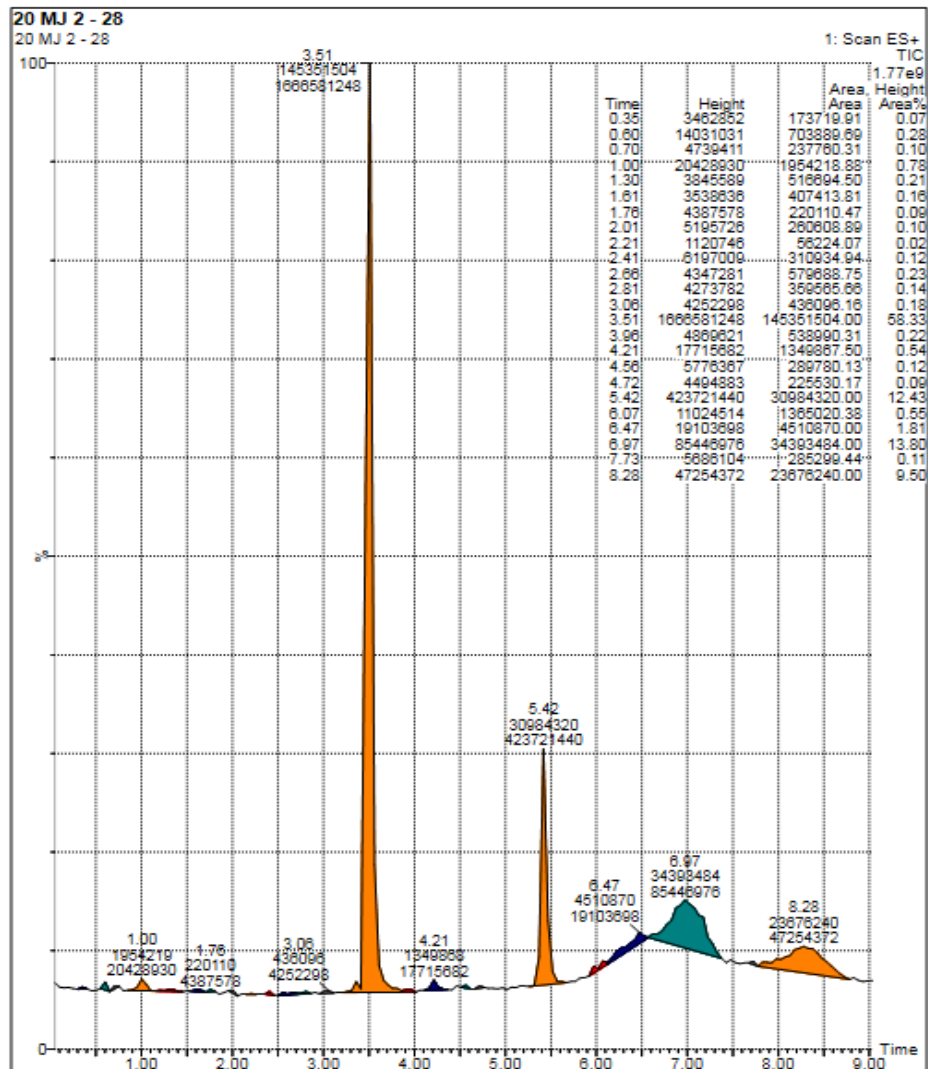
La primera inyección correspondió al estándar de boldina, utilizándolo como estándar interno para la posterior cuantificación de los alcaloides identificados. En el corrido cromatográfico se identificó el tiempo de corrido a 3.56 minutos, con un área de 76589656 para una concentración de 50 PPM. Aunque la boldina fue inyectada por triplicado para garantizar la reproducibilidad del equipo, solo se presenta el dato de la primera inyección dado que no se evidenció mayor variabilidad.

El cromatograma tanto del espectro UV como el espectrómetro de masas para el estándar de boldina se presenta a continuación (Gráfico 12). Solo se observa un pico, el cual corresponde al estándar de boldina a 3.56 minutos.



**Gráfico 12.** Cromatograma del UPLC-MS para el estándar de Boldina.

A continuación se presenta la tabla resumen (tabla 13) de la muestra IA-020 bajo el tratamiento MJ 2 evaluada el día 28, debido a que esta fue la que registró mayor cantidad de alcaloides totales (ALK) liberados al medio líquido, con 20.98 mg/L.



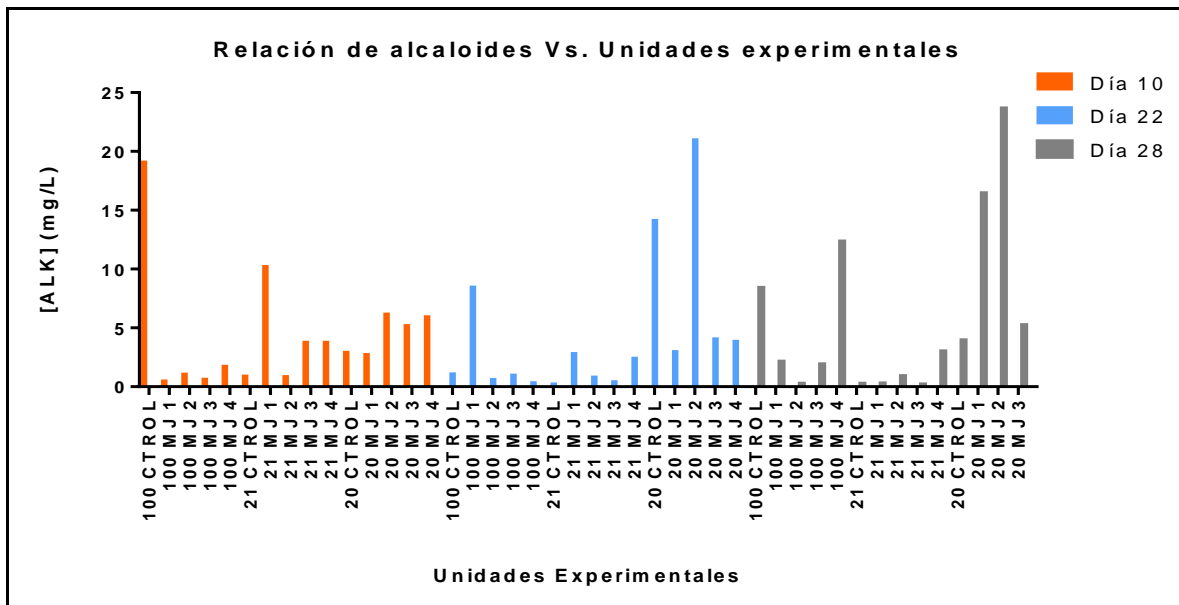
**Gráfico 13.** Cromatograma de la muestra 20 MJ-28, en la cual se identificó la mayor concentración de alcaloides totales bajo el tratamiento con el inductor metil jasmonato (MJ 2, 50 uM).

Los picos registrados para esta muestra (20 MJ2-28) en el tiempo de retención de 3 minutos corresponden al alcaloide con peso molecular de 302 g/mol. A 3.51 minutos se observó el pico correspondiente al estándar de boldina. En 5.42 minutos el pico registrado para la hormona BAP. Entre 6 y 7 minutos de retención

se observaron los picos correspondientes al resto de alcaloides en esta muestra. Entre 7 y 8 minutos de retención se identificaron diferentes picos correspondientes al inductor metil jasmonato.

**Tabla 13.** Alcaloides identificados para la muestra 20 MJ 2 del día 28.

Muestra 20 MJ 2-28			
Tipo de Muestra	Tiempo	Área	Concentración (mg/L)
BOLDINE	3.56	76589656	50
ALK	3.11	353920.78	0.231
ALK	6.67	31782484	20.749
<b>ALK TOTALES</b>			<b>20.980</b>



**Gráfico 14.** Concentración total de alcaloides para los diferentes tratamientos con Metil Jasmonato (MJ). Para la nomenclatura de las barras (eje horizontal) revisar la tabla 12. A corresponde al día 10, 22 y 28. 100 corresponde al material IA-100; 21 al material IA-021; 20 al material IA-020. Control, MJ 1: 25 uM, MJ 2: 50 uM, MJ 3: 100 uM, MJ 4: 250 uM.

El proceso de extracción se realizó para cada día de tratamiento, (3, 10, 22 y 28), sin embargo al momento de la identificación en el sistema cromatográfico, hubo un extravío de las muestras del día 3, por lo cual no se tiene datos de este día. Por este motivo, el gráfico 14 señala solo las cantidades alcaloidales de los días 10, 22 y 28.

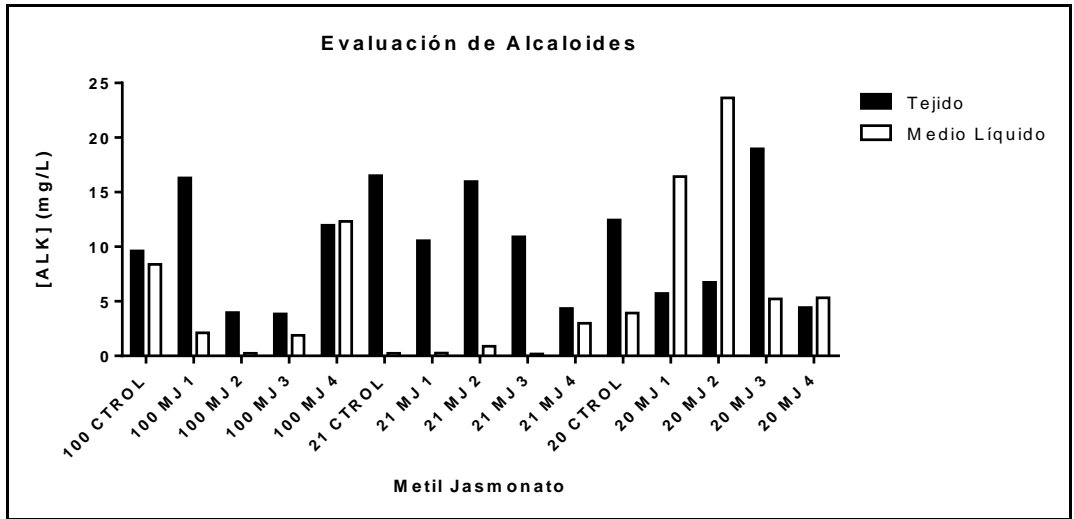
El gráfico 14 resume las cantidades experimentales de alcaloides en cada tratamiento con MJ a los diferentes días de tratamiento 10, 22 y 28. Aquí se observa que el individuo que más alcaloides reportó fue el 20 MJ 2 del día 28.

En la tabla 14 se resumen los 10 alcaloides mayoritarios que fueron liberados en el medio líquido bajo tratamiento con MJ. Así mismo se presentan sus tiempos de retención y pesos moleculares, datos que permitieron hacer una búsqueda bibliográfica, sin lograr resultados específicos para todos los alcaloides. Sin embargo el ALK 1, con peso molecular de 302 g/mol, se identificó para Haemantamina y N-formilnorgalantamina (Cahlíková *et al.*, 2011). El ALK 6, con peso de 272 g/mol se identificó para vittatina (Katoch *et al.*, 2012).

**Tabla 14.** Resumen de alcaloides identificados en los corridos cromatográficos para las muestras cultivadas en medio líquido con el inductor Metil Jasmonato.

Tipo de Muestra	Tiempo (Min)	Peso Molecular (g/mol)
ALK1	3.01	302
ALK2	3.36	314
ALK3	7.17	340
ALK4	6.87	362
ALK5	6.07	188
ALK6	3.06	272
ALK7	7.17	306
ALK8	6.67	308
ALK9	7.12	308
ALK10	7.37	308

Comparando los alcaloides liberados al medio de cultivo con MJ con los obtenidos en la extracción del tejido vegetal de los explantes, la tendencia para la mayoría de las muestras fue tener mayor cantidad de alcaloides en el tejido. Aunque se observó que las muestras 100 MJ 4, 20 MJ 1 y 20 MJ 2 en la liberación de alcaloides al medio líquido en el día 28 de evaluación superaron el contenido de alcaloides en los respectivos tejidos (Gráfico 15).



**Gráfico 15.** Evaluación de los alcaloides totales liberados al medio líquido, comparado con los obtenidos en el tejido vegetal. CTROL: tratamiento control; MJ 1: 25  $\mu$ M; MJ 2: 50  $\mu$ M; MJ 3: 100  $\mu$ M; MJ 4: 250  $\mu$ M. Concentración de alcaloides expresada en mg/L.

## 8. DISCUSIÓN:

### **Cultivo *in-vitro***

#### *Desinfección del material vegetal*

Un aspecto crítico que se evaluó durante la observación del material vegetal en cultivo *in-vitro* fue el proceso de desinfección del tejido. Este paso debe garantizar la inocuidad del explante pero a su vez no matar las células meristemáticas, las cuales son las encargadas de la totipotencia de las plantas (Tirado Perea & Perea Dallos, 2011).

Tal como se observó en los resultados, en este trabajo se evaluó la efectividad sanitizante del hipoclorito a concentraciones comerciales de 2.5, 25 y 50%. Estos tratamientos revelaron la posible relación que puede tener la concentración de hipoclorito *versus* el porcentaje de contaminación y respuesta. El porcentaje de contaminación se evaluó solo en los cuatro (4) primeros días de cultivo, dado que en este periodo de tiempo se evidencia la contaminación por deficiencias en la desinfección y sanitización del tejido, dado que en algunos casos las bacterias se encuentran al interior del tejido vegetal y por este motivo el medio se contamina. Hongos o bacterias que se presenten más allá de este periodo, suelen estar relacionadas a la manipulación del tejido y/o la incorrecta preparación del medio de cultivo.

Los ajustes realizados al protocolo de desinfección del tejido brindó mejoras relevantes en la relación a la contaminación/respuesta, condiciones que se desconocían para la especie *Zephyranthes carinata*, indicando que la concentración óptima de hipoclorito fue de 25% (del comercial) suplementado con Tween 20 (2 gotas/100ml).

Cuando se llevó a cabo la siembra del material IA-020, se observó que la respuesta de estos explantes al cultivo *in-vitro* en medio semi-sólido fue de cero (0) %. Se cultivaron 45 explantes de este material en medio semi-sólido, sembrados el 09 de enero de 2014, de los cuales 7 presentaron contaminación a las semanas 6 y 7 de cultivo.

Esto se puede deber a que los cortes generados presentaron problemas por la inexperiencia del investigador. La técnica de *twin scales* requiere de gran destreza dado que se requiere cortar pequeños explantes en los cuales se garantice la presencia de células meristemáticas, necesarias para el desarrollo de nuevos tejidos en el explante. Para lograr un mayor conocimiento es necesario hacer seguimiento de los cortes, internos, intermedios y externos del bulbo, lo cual

permita obtener información sobre cual posición en el bulbo madre tendría mejor desarrollo del tejido.

La última posible causa de la poca respuesta del material sea el estadio de desarrollo del bulbo original o condiciones ambientales no controlables por las que se vio negativamente afectado para la multiplicación de los explantes.

### *Coloración del material vegetal*

Al ser el primer trabajo de este tipo para la especie *Z. carinata*, se pensó que el fenómeno de cambio de coloración de los explantes indicaba la presencia de algún microorganismo, pero con el paso de tiempo y al percibir repetidamente este color rojo en el resto de los materiales vegetales, se llegó a la conclusión de que estos fenómenos corresponden al desarrollo positivo bajo condiciones de cultivo *in-vitro* de la especie en estudio.

Una característica recurrente que se notó en el crecimiento y respuesta de los explantes fue el cambio de coloración del tejido. El explante una vez era cortado del bulbo por medio de la técnica *Twin Scales*, presentaba un color blanco en las escamas, con una coloración tenue amarilla en la zona meristemática. Ya en el medio de cultivo y pasadas una o dos semanas, se observó una coloración roja intensa de las escamas que generalmente tuvieron un crecimiento activo posteriormente. También se observó que algunos explantes viraron a una coloración café oscura, pero en este caso este hecho se evidenció como indicador de la muerte del tejido.

### **Análisis cromatográfico**

Las pruebas de extracción de alcaloides bajo cultivo en medio líquido se determinaron para garantizar si la planta estaba liberando sus alcaloides en este medio. Este resultado fue de vital importancia dado que es el primer indicio de la presencia de los alcaloides en el medio de cultivo, y que no se han reportado estudios de este tipo en esta especie. De esta manera se verificó la producción de alcaloides en el UPLC con tejidos de toda la planta (1ª prueba) y posteriormente se realizó TLC con el medio líquido, obteniendo resultados positivos en ambos casos.

Bajo la revisión bibliografía hecha sobre los inductores químicos utilizados en este tipo de estudios, Colque y colaboradores en el 2004 publicaron un estudio en el cual utilizaron 2 de los inductores químicos propuestos aquí: ácido araquidónico y metil jasmonato (Colque *et al.*, 2004). En dicho estudio, evaluaron alcaloides como Homolicorina, Galantamina, Prazetina y Haemantamina, determinando la concentración de alcaloides totales en el cultivo de brotes en medio líquido.

Durante el cultivo *in-vitro* se observó que en los tratamientos con ácido araquidónico y metil jasmonato el crecimiento del explante disminuía cuando la concentración del inductor es mayor a 8  $\mu\text{M}$  de ácido araquidónico o mayor de 100  $\mu\text{M}$  de metil jasmonato (gráficos 4, 5, 10 y 11). Esto se correlaciona con la teoría la cual a altas concentraciones de estos inductores son tóxicas para la planta, dando como resultado un efecto negativo en el crecimiento y/o desarrollo del explante (Colque et al., 2004).

Al momento de revisar las gráficas 8 y 14 que muestran la liberación de los alcaloides en el medio líquido, se observa que los valores entre los tres materiales utilizados en cada experimento no muestran una tendencia clara que correlacione la liberación de los alcaloides con el crecimiento de la planta. Por este motivo no es posible concluir cuál es la concentración de cada inductor que mejor liberación de alcaloides produzca en los diferentes materiales.

Al comparar los alcaloides liberados al medio respecto a los extraídos del tejido vegetal, en los gráficos 9 y 15 se observa que los datos, representados como alcaloides totales, son superiores en tejido que los alcaloides liberados al medio, a excepción de un par de muestras ya expuestas en los resultados. Esto concuerda con el trabajo descrito por Colque y colaboradores (Colque *et al.*, 2004), y se requieren de experimentos adicionales que confirmen las muestras que generan mayor cantidad de alcaloides liberados al medio.

Como trabajo exploratorio, los resultados presentados en este trabajo evidencian la presencia de alcaloides tanto en muestras de medio líquido como en tejido vegetal cultivado *in-vitro*, lo que permite plantear bases para la producción y extracción de alcaloides a partir de *Zephyranthes carinata* en estas condiciones. Las concentraciones de alcaloides obtenidos bajo la influencia de ambos inductores químicos (AA y MJ) estuvieron en el orden de los 10 a 30 mg/L en relación al estándar de boldina, el cual fue preparado a 50 mg/L. La obtención de los pesos moleculares de las estructuras reportadas en el experimento permitió identificar, como parámetro inicial, moléculas como Haemantamina, *N*-Formilgalantamina y la Vittatina.



## 9. CONCLUSIONES

- ✓ Se generó el protocolo de cultivo *in-vitro* y de desinfección para la especie *Zephyranthes carinata*, expuestos en los anexos 2 y 3.
- ✓ Estudios anteriores permitieron confirmar que algunos de los alcaloides identificados en este proyecto ya han sido reportados. En el caso del tratamiento con AA se verificó que la molécula con peso molecular de 382 g/mol fue identificado como alcaloide de la especie *Zephyranthes grandiflora* (Katoch *et al.*, 2012), aunque no se ha dilucidado su estructura. En el tratamiento con metil jasmonato el peso molecular de 302 g/mol está reportado para dos alcaloides: Haemantamina y *N*-formilnorgalantamina (Cahlíková *et al.*, 2011), y el peso molecular de 272 g/mol está reportado como vittatina (Katoch *et al.*, 2012).
- ✓ Los alcaloides anteriormente descritos se identificaron tanto en las muestras de medio líquido, como en tejido. Al realizar la comparación entre las concentraciones encontradas en las muestras, se observó que la sumatoria de los alcaloides fue mayor en tejido que en el medio de cultivo. Solo para algunas muestras la liberación de alcaloides al medio líquido superó la concentración de alcaloides en el tejido.
- ✓ Aunque se lograron identificar los alcaloides anteriormente descritos, es necesario realizar más experimentos que confirmen la identidad de estas moléculas.

## 10.RECOMENDACIONES

- ✓ El protocolo que se presenta en este trabajo se da como base para próximos trabajos. Se debe realizar un experimento con un tratamiento estadístico riguroso que garantice la reproducibilidad del método de desinfección para el género *Zephyranthes*.
- ✓ Respecto a los protocolos de extracción de alcaloides en medio líquido, se pueden evaluar otros procesos que permitan obtener mayores cantidades de estos metabolitos en la especie *Zephyranthes carinata*, tal como lo reportan autores como Ivanov y colaboradores, Georgiev y colaboradores, y Pavlov y colaboradores (Ivanov, Georgiev, Georgiev, Ilieva, & Pavlov, 2011).

Se sugiere realizar un trabajo de investigación que evalúe las condiciones de liberación de alcaloides con otras especies como el caso de *Zephyranthes rose*, dado que también se tiene material disponible en el invernadero de la Universidad Icesi. Y de esta forma poder extrapolarlo a otras plantas de esta familia especies que tengan mayor tendencia a la extinción, como por ejemplo *Eucharis* y *Caliphruria*.

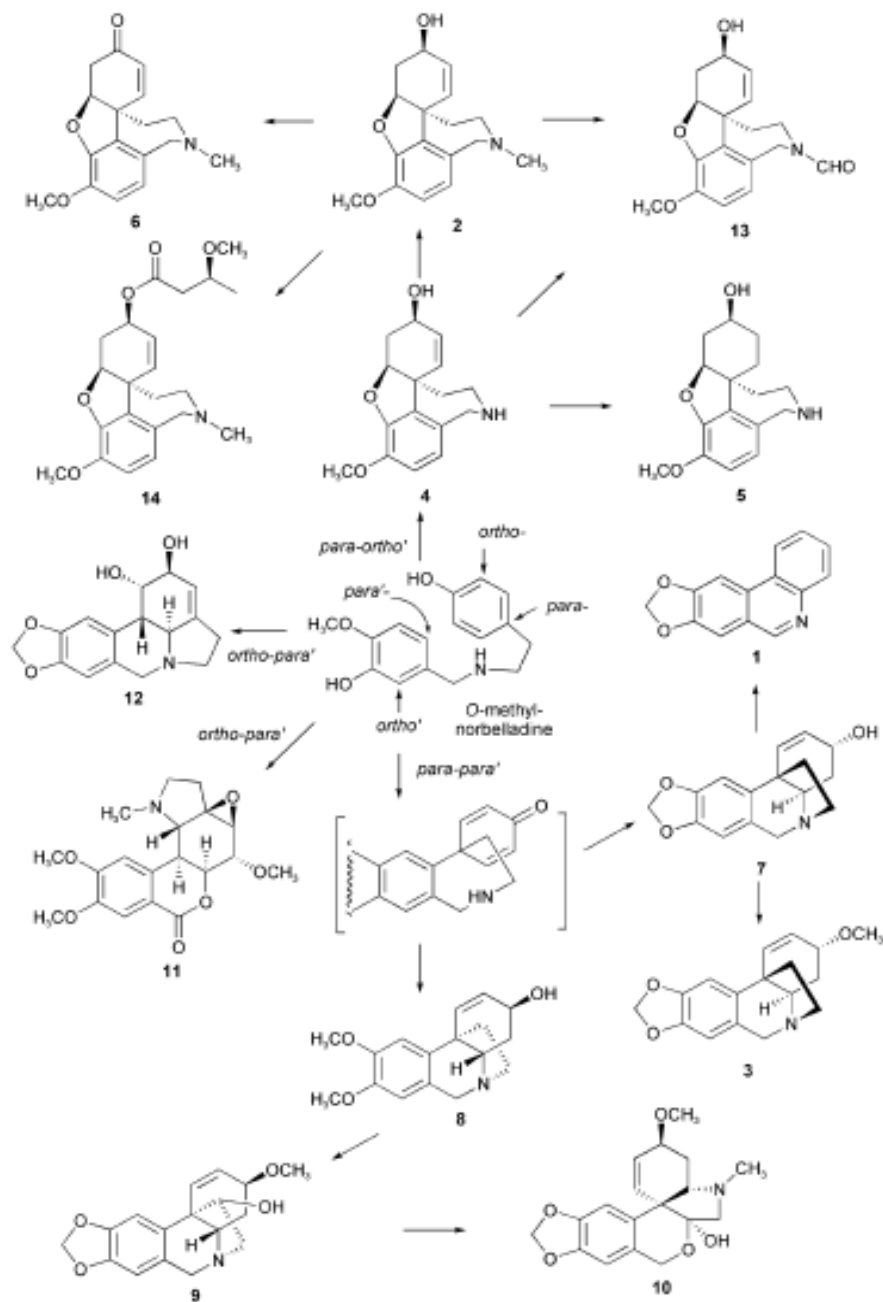
## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Arango, A. (2002). Alkaloides y compuestos nitrogenados. *Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.*
- Berkov, S., Pavlov, A., Georgiev, V., Weber, J., Bley, T., Viladomat, F., . . . Codina, C. (2010). Changes in apolar metabolites during in vitro organogenesis of *Pancreaticum maritimum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(10-11), 827-835. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.07.002
- Cahlíková, L., Valterová, I., Macáková, K., & Opletal, L. (2011). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(4), 575-580.
- Cao, Z. F., Yang, P., & Zhou, Q. S. (2013). Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China-Chemistry*, 56(10), 1382-1391. doi: 10.1007/s11426-013-4967-9
- Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (2004). Improved production of galanthamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Planta Medica*, 70(12), 1180-1188. doi: 10.1055/s-2004-835849
- de Marcano, D., & Hasegawa, M. (1991). *Fitoquímica orgánica*: Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Escobar Fuertes, A. M., Guillermo. Santaella Tenorio, Marcela. (2014). *CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ALCALOIDES DEL GÉNERO Zephyranthes sp.*, Universidad Icesi.
- Fernández Alonso, J. L., & Groenendijk, J. P. (2004). A new specie of *Zephyranthes* Herb. sl (Amaryllidaceae, Hippeastreae) with notes on the genus in Colombia.
- Georgiev, V., Ivanov, I., Berkov, S., Ilieva, M., Georgiev, M., Gocheva, T., & Pavlov, A. (2012). Galanthamine production by *Leucojum aestivum* L. shoot culture in a modified bubble column bioreactor with internal sections. *Engineering in Life Sciences*, 12(5), 534-543. doi: 10.1002/elsc.201100177
- Hefferon, K. L. (2010). *Biopharmaceuticals in Plants: Toward the Next Century of Medicine*: CRC Press.
- Herrera, M. R., Machocho, A. K., Brun, R., Viladomat, F., Codina, C., & Bastida, J. (2001). Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Medica*, 67(2), 191-193. doi: 10.1055/s-2001-11495
- Hol, G. M. G. M., & Linde, P. C. G. (1992). Reduction of contamination in bulb-explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31(1), 75-79. doi: 10.1007/BF00043478
- Ivanov, I., Georgiev, V., Berkov, S., & Pavlov, A. (2012). Alkaloid patterns in *Leucojum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *Journal of Plant Physiology*, 169(2), 206-211. doi: 10.1016/j.jplph.2011.09.010

- Ivanov, I., Georgiev, V., Georgiev, M., Ilieva, M., & Pavlov, A. (2011). Galanthamine and Related Alkaloids Production by *Leucojum aestivum* L. Shoot Culture using a Temporary Immersion Technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(2), 268-277. doi: 10.1007/s12010-010-9036-7
- Ivanov, I., Georgiev, V., & Pavlov, A. (2013). Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. *Journal of Plant Physiology*, 170(12), 1122-1129. doi: 10.1016/j.jplph.2013.03.017
- Jin, Z. (2005). Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. *Natural Product Reports*, 22(1), 111-126. doi: 10.1039/b316106b
- Katoch, D., Kumar, S., Kumar, N., & Singh, B. (2012). Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 187-192. doi: 10.1016/j.jpba.2012.08.001
- Konrath, E. L., Passos, C. d. S., Klein-Júnior, L. C., & Henriques, A. T. (2013). Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.
- Laitinen, H. A., & Harris, W. E. (1982). *Análisis químico: texto avanzado y de referencia*: Reverté.
- Langens-Gerrits, M., De Klerk, G. J., & Croes, A. (2003). Phase change in lily bulblets regenerated in vitro. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 590-597. doi: 10.1046/j.1399-3054.2003.00214.x
- McMurry, J. (2012). *Química orgánica*: Cengage Learning Editores.
- Pasto, D. J., & Johnson, C. R. (1981). *Determinación de estructuras orgánicas*: Reverté.
- Pavlov, A., Berkov, S., Courot, E., Gocheva, T., Tuneva, D., Pandova, B., . . . Ilieva, M. (2007). Galanthamine production by *Leucojum aestivum* in vitro systems. *Process Biochemistry*, 42(4), 734-739. doi: 10.1016/j.procbio.2006.12.006
- Peretó, J., & Barrachina, C. (2007). *Fundamentos de bioquímica* (Vol. 96): Universitat de Valencia.
- Ptak, A., El Tahchy, A., Dupire, F., Boisbrun, M., Henry, M., Chapleur, Y., . . . Laurain-Mattar, D. (2009). LCMS and GCMS for the Screening of Alkaloids in Natural and in Vitro Extracts of *Leucojum aestivum*. *Journal of Natural Products*, 72(1), 142-147. doi: 10.1021/np800585c
- Razdan, M. K. (2003). *Introduction to plant tissue culture*: Science Publishers.
- Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Hernández-Ortega, S., Jankowski, C. K., Arseneau, S., Clotet-Codina, I., . . . Bastida, J. (2011). Acetylcholinesterase-inhibiting Alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, 16(11), 9520-9533. doi: 10.3390/molecules16119520
- Rice, L. J., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2011). In vitro bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. *South African Journal of Botany*, 77(2), 305-312. doi: 10.1016/j.sajb.2010.08.011

- Silverstone-Sopkin, P. A. (2011). *Los muertos vivientes: la historia natural de cuatro lirios amazónicos del suroccidente de Colombia (Eucharis y Plagiolirion, Amaryllidaceae)*: Universidad del Valle, Programa Editorial.
- Smith, R., Burrows, J., & Kurten, K. (1999). Challenges associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippesatrum* sp. (Amaryllidaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35(4), 281-282. doi: 10.1007/s11627-999-0032-y
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Photosynthesis: the light reactions. *Plant Physiology. Fourth Ed. Sinauer Associates, Inc*, 111.
- Takos, A. M., & Rook, F. (2013). Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11713-11741. doi: 10.3390/ijms140611713
- Tirado Perea, A., & Perea Dallos, M. (2011). Cultivo de tejidos vegetales in vitro: manual de prácticas de laboratorio.
- Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., & Bastida, J. (2014). Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of *Narcissus* by GC-MS combined with k-means cluster analysis. *Industrial Crops & Products*, 56, 211-222. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.03.008
- Viladomat, F., Codina, C., Cabezas, F., Bastida, J., Argoti, J., & Martínez, S. (2007). Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de amaryllidaceae. *Scientia Et Technica*, 13(33), 237-241.
- Vilchez, J., Rivas, Y., Albany, N., Molina, M., & Martínez, L. (2009). Efecto de la N6 bencilaminopurina sobre la multiplicación in vitro de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). *Rev. Fac. Agron.(LUZ)*, 26(3), 212-222.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos De Bioquímica/Fundamental of Biochemistry*: Ed. Médica Panamericana.
- Waksmundzka-Hajnos, M., & Sherma, J. (2010). *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*: Taylor & Francis.
- Wang, L., Zhang, X.-Q., Yin, Z.-Q., Wang, Y., & Ye, W.-C. (2009). Two new amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(6), 610-611.

## 12.ANEXO 1



**Anexo 1.** Vía biosintética en la producción de alcaloides. **Tomado de: (Jin, 2005).**

1 trisferidina, 2 Galantamina, 3 Busfanisina, 4 Norgalantamine, 5 norycoramina, 6 narwedina, 7 crinina, 8 maritidina, 9 haemantamina, 10 tazetina, 11 galwesina, 12 licorina, 13 N-formilgalantamina y 14 O-metilleucotamina.

## 13. ANEXO 2

### Protocolo de desinfección

#### PASOS:

1. Retirar el bulbo de la maceta teniendo en cuenta de no llevar en la planta demasiada tierra. Puede ser objeto de contaminación.
2. Lavar bajo el grifo dejando caer el agua sobre el bulbo sin hojas y sin raíces durante 20 minutos.
3. Retirar al menos 2 capas externas del bulbo.

Trabajar los siguientes pasos en cabina de seguridad biológica

4. Lavar con solución de Extran al 10%, tibia y durante 10 minutos en constante agitación.
5. Durante un minuto realizar inmersión en etanol al 70%
6. El hipoclorito al 25% más Tween 20 (2 gotas/100 ml), el cual se le adiciona 1 gota cada 50 mL, es utilizado para realizar dos lavados cada 10 minutos, cambiando por solución nueva en cada periodo.
7. Enjuagar por triplicado con agua destilada estéril.
8. Realizar el corte del bulbo utilizando la técnica del *twin-scales*.
9. Cada explante sumergirlo por 10 segundos en solución de hipoclorito al 1% con Tween 20 (2 gotas/100 ml).
10. Lavar una vez con agua destilada estéril.

Sembrar el explante garantizando que la zona meristemática esté en contacto con el medio, cuidando de no sumergir, preferiblemente la curvatura del explante al interior del medio.

## 14. ANEXO 3

### Protocolo de cultivo semi-sólido

#### PASOS:

1. Pesar la cantidad necesaria del medio MS (Murashige y Skoog) 4.43g/l
2. Pesar la cantidad necesaria de sacarosa 30 g/l
3. Disolver en agua destilada el medio MS y la sacarosa
4. Ajustar el pH a 5.70
5. Pesar la cantidad necesaria de Gellam Gum 0.25% (Fitagel)
6. Aforar al volumen requerido y agitar hasta garantizar la dispersión del Fitagel
7. Autoclavar, tiempo de esterilización de 15 minutos a 121°C

### Protocolo de cultivo líquido

#### PASOS:

11. Pesar la cantidad necesaria del medio MS (Murashige y Skoog) 4.43g/l
12. Pesar la cantidad necesaria de sacarosa 30 g/l
13. Diluir en agua destilada el medio MS y la sacarosa
14. Ajustar el pH en 5.70
15. Tomar el volumen necesario de PPM
16. Aforar al volumen requerido y agitar hasta la homogenización del medio
8. Autoclavar, tiempo de esterilización de 15 minutos a 121°C
17. Reposar el medio hasta llegar a temperatura ambiente
18. Adicionar la cantidad necesaria de BAP 3 mg/ml
19. Adicionar la cantidad necesaria del inductor (Ácido Araquidónico o Metil Jasmonato, según la tabla 2)



## 15. ANEXO 4

### Tablas y gráficos obtenidos en los corridos cromatográficos

**Tabla 15.** Explantes utilizados en cada tratamiento y pesos de la muestra utilizada en el estudio con Ácido Araquidónico.

Material: IA - 100			Material: IA - 021		Material: IA - 023	
Tratamientos	Explantes	Peso del material (g)	Explantes	Peso del material (g)	Explantes	Peso del material (g)
Control	TS-1-5	0.575	TS-1-2	0.592	TS-1-7	0.261
	TS-2-5		TS-1-5			
AA 1	TS-1-8	0.870	TS-1-6	0.508	TS-2-7	0.279
	TS-2-2		TS-2-5		TS-2-8	
AA 2	TS-1-3	0.608	TS-2-2	0.420	TS-1-4	0.486
	TS-1-6		TS-2-6		TS-2-2	
AA 3	TS-1-1	0.525	TS-1-4	0.431	TS-2-4	0.541
	TS-3-6		TS-2-3		TS-1-4	

**Tabla 16.** Registro del control de pesos, índice de crecimiento y variación de peso en los tres días de tratamiento para cada material vegetal utilizado con ácido araquidónico.

IA-100	Peso de los explantes (g)			Índice de crecimiento			Variación de peso (g)		
	Día 3	Día 10	Día 28	Día 3	Día 10	Día 28	Día 3	Día 10	Día 28
Control	0.717	1.466	0.821	0.247	1.550	0.428	0.142	0.891	0.246
AA 1	1.145	1.468	1.231	0.316	0.687	0.415	0.275	0.598	0.361
AA 2	0.851	0.690	0.788	0.400	0.135	0.296	0.243	0.082	0.180
AA 3	0.636	0.683	0.781	0.211	0.301	0.488	0.111	0.158	0.256
IA-021	Peso de los explantes (g)			Índice de crecimiento			Variación de peso (g)		
	Día 3	Día 10	Día 28	Día 3	Día 10	Día 28	Día 3	Día 10	Día 28
Control	0.907	1.461	1.225	0.532	1.468	1.069	0.315	0.869	0.633
AA 1	0.636	0.874	0.817	0.252	0.720	0.608	0.128	0.366	0.309
AA 2	0.572	2.010	0.871	0.362	3.786	1.074	0.152	1.590	0.451
AA 3	0.808	0.503	0.575	0.875	0.167	0.334	0.377	0.072	0.144
IA-023	Peso de los explantes (g)			Índice de crecimiento			Variación de peso (g)		
	Día 3	Día 10	Día 28	Día 3	Día 10	Día 28	Día 3	Día 10	Día 28
Control	0.360	1.278	0.476	0.379	3.897	0.824	0.099	1.017	0.215
AA 1	1.313	0.542	0.662	3.706	0.943	1.373	1.034	0.263	0.383
AA 2	0.503	0.599	0.626	0.035	0.233	0.288	0.017	0.113	0.140
AA 3	0.527	0.532	0.656	-0.026	-0.017	0.213	-0.014	-0.009	0.115

**Tabla 17.** Pesos de los explantes por tratamiento para cada material vegetal, en el día inicial.

IA - 100		IA - 021		IA - 020	
Tratamientos	Peso de los bulbos (g)	Tratamientos	Peso de los bulbos (g)	Tratamientos	Peso de los bulbos (g)
Control	0.374	Control	0.56	Control	0.414
MJ 1	0.331	MJ 1	0.51	MJ 1	0.622
MJ 2	0.503	MJ 2	0.776	MJ 2	0.402
MJ 3	0.503	MJ 3	0.637	MJ 3	0.971
MJ 4	0.507	MJ 4	0.689	MJ 4	0.706

**Tabla 18.** Registro del control de pesos, índice de crecimiento y variación de peso en los tres días de tratamiento para cada material vegetal utilizado con metil jasmonato.

IA-100	Peso de los explantes (g)			Índice de crecimiento			Variación de peso (g)		
	Día 3	Día 10	Día 22	Día 3	Día 10	Día 22	Día 3	Día 10	Día 22
Control	0.478	0.551	0.634	0.278	0.473	0.695	0.104	0.177	0.260
MJ 1	0.525	0.507	0.534	0.586	0.532	0.613	0.194	0.176	0.203
MJ 2	0.505	0.447	0.481	0.004	-0.111	-0.044	0.002	-0.056	-0.022
MJ 3	0.481	0.666	0.447	-0.044	0.324	-0.111	-0.022	0.163	-0.056
MJ 4	0.419	0.480	0.533	-0.174	-0.053	0.051	-0.088	-0.027	0.026
IA-021	Peso de los explantes (g)			Índice de crecimiento			Variación de peso (g)		
	Día 3	Día 10	Día 22	Día 3	Día 10	Día 22	Día 3	Día 10	Día 22
Control	1.021	1.342	1.732	0.823	1.396	2.093	0.461	0.782	1.172
MJ 1	0.029	1.395	1.996	-0.943	1.735	2.914	-0.481	0.885	1.486
MJ 2	1.556	2.408	3.188	1.005	2.103	3.108	0.780	1.632	2.412
MJ 3	0.726	0.798	0.951	0.140	0.253	0.493	0.089	0.161	0.314
MJ 4	0.72	0.739	0.796	0.045	0.073	0.155	0.031	0.050	0.107
IA-020	Peso de los explantes (g)			Índice de crecimiento			Variación de peso (g)		
	Día 3	Día 10	Día 22	Día 3	Día 10	Día 22	Día 3	Día 10	Día 22
Control	0.567	0.473	0.573	0.370	0.143	0.384	0.153	0.059	0.159
MJ 1	0.979	0.991	1.027	0.574	0.593	0.651	0.357	0.369	0.405
MJ 2	0.542	0.602	0.771	0.348	0.498	0.918	0.140	0.200	0.369
MJ 3	1.049	1.089	1.165	0.080	0.122	0.200	0.078	0.118	0.194
MJ 4	0.555	0.675	0.732	-0.214	-0.044	0.037	-0.151	-0.031	0.026

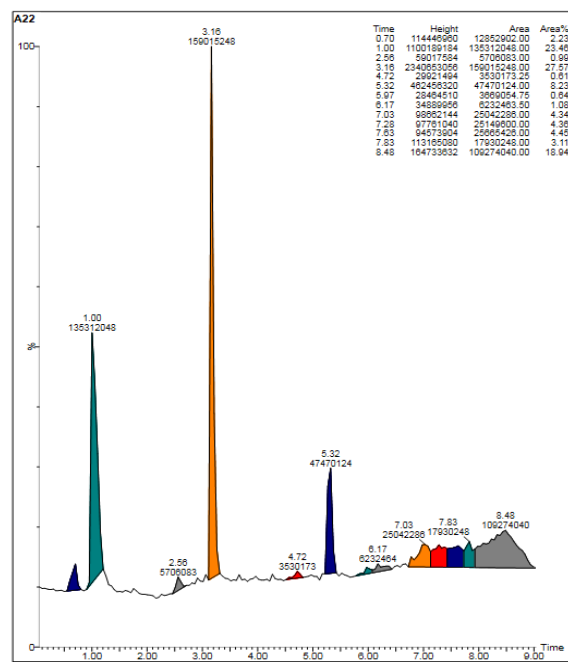
**Tabla 19.** Sumatoria de alcaloides para cada muestra en los diferentes días de tratamiento con ácido araquidónico, A: 3 día, B: 10 día, C: 22 día y T: tejido

ALCALOIDES DE A		ALCALOIDES DE B		ALCALOIDES DE C		ALCALOIDES DE T	
Explante	Sumatoria	Explante	Sumatoria	Explante	Sumatoria	Explante	Sumatoria
AOC	9.7597	B0C	8.3399	C0C	22.1612	T0C	22.9536
A01	95.7746	B01	20.1097	C01	21.7004	T01	9.6297

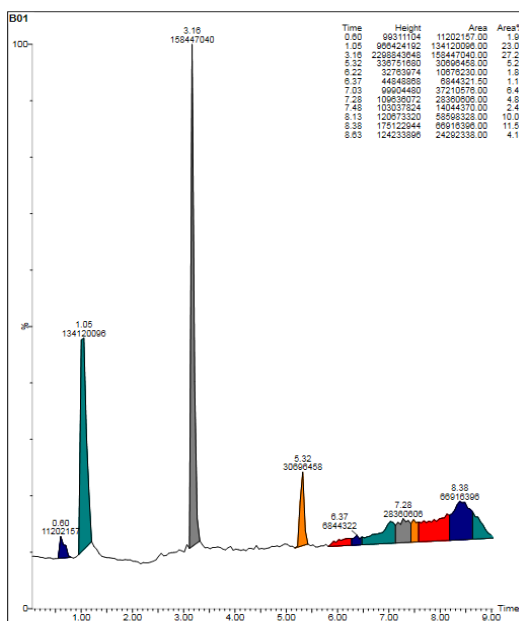
A02	2.1422	B02	2.6973	C02	8.1069	T02	25.6080
A03	11.5340	B03	0.0000	C03	4.5359	T03	3.1254
A1C	7.3513	B1C	5.4642	C1C	5.9422	T1C	1.9332
A11	5.9203	B11	5.3999	C11	3.6684	T11	8.7752
A12	0.0000	B12	4.4773	C12	4.8310	T12	12.7885
A13	0.0000	B13	8.7681	C13	6.1306	T13	19.3342
A2C	6.6743	B2C	17.1750	C2C	15.3914	T2C	12.5942
A21	7.5489	B21	15.9197	C21	18.5477	T21	13.6243
A22	11.4912	B22	3.7928	C22	5.0764	T22	8.2276
A23	3.2783	B23	4.1995	C23	15.7335	T23	19.5770

**Tabla 20.** Sumatoria de alcaloides para cada muestra en los diferentes días de tratamiento con metil jasmonato.

	Día 10	Día 22	Día 28	Tejido
Explante	Sumatoria	Sumatoria	Sumatoria	Sumatoria
<b>100 CTROL</b>	19.1043	1.0855	8.3828	9.6207
<b>100 MJ 1</b>	0.4985	8.4780	2.1110	16.3043
<b>100 MJ 2</b>	1.0714	0.6198	0.2339	3.9693
<b>100 MJ 3</b>	0.6390	0.9847	1.8780	3.8459
<b>100 MJ 4</b>	1.7354	0.3520	12.3234	11.9700
<b>21 CTROL</b>	0.9071	0.2384	0.2452	16.5116
<b>21 MJ 1</b>	10.2167	2.8294	0.2543	10.5556
<b>21 MJ 2</b>	0.8655	0.8226	0.8826	15.9720
<b>21 MJ 3</b>	3.7812	0.4356	0.1821	10.9029
<b>21 MJ 4</b>	3.7812	2.4370	2.9817	4.3465
<b>20 CTROL</b>	2.9277	14.1427	3.9300	12.4581
<b>20 MJ 1</b>	2.7396	2.9961	16.4284	5.7257
<b>20 MJ 2</b>	6.1776	20.9796	23.6289	6.7305
<b>20 MJ 3</b>	5.2021	4.0661	5.2151	18.9673
<b>20 MJ 4</b>	5.9501	3.8663	5.3218	4.4345



**Gráfico 16.** Cromatograma para la muestra A22, tratamiento con ácido araquidónico.



**Gráfico 17.** Cromatograma para la muestra B01, tratamiento con ácido araquidónico.

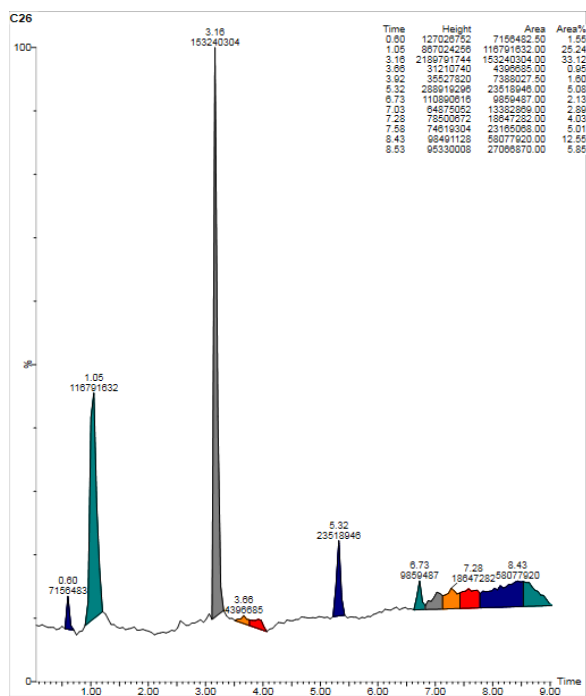


Gráfico 18. Cromatograma para la muestra C26, tratamiento con ácido araquidónico.

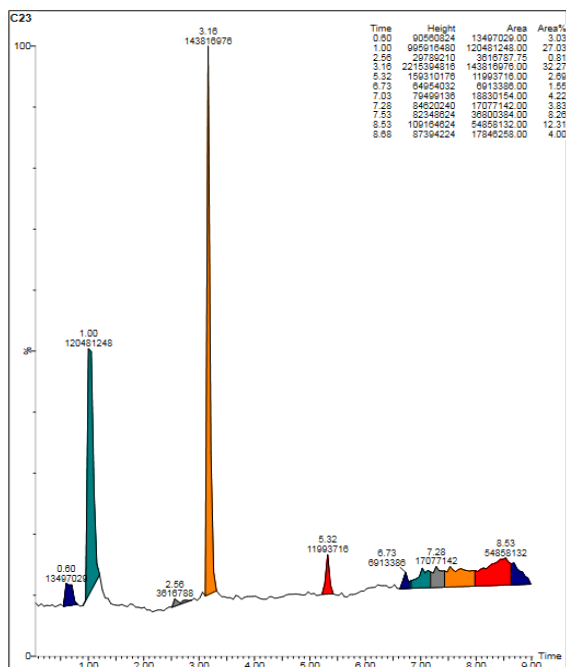


Gráfico 19. Cromatograma para la muestra C23, tratamiento con ácido araquidónico.

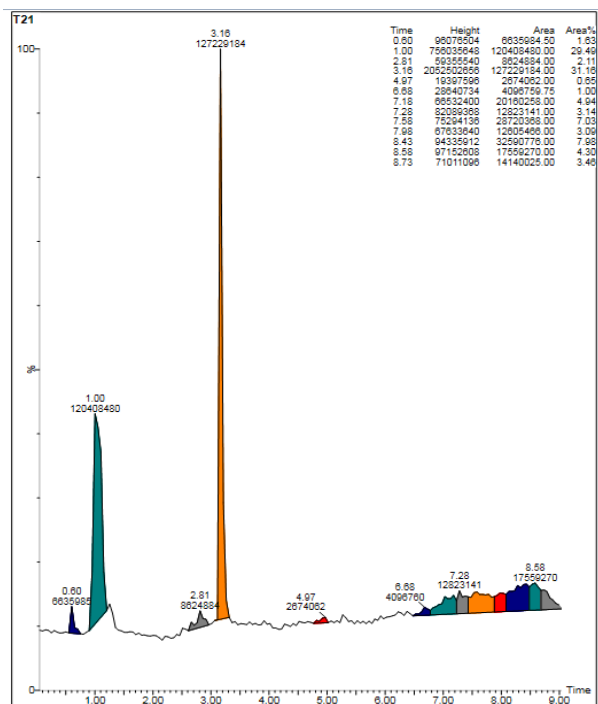


Gráfico 20. Cromatograma para la muestra T21, tratamiento con ácido araquidónico.

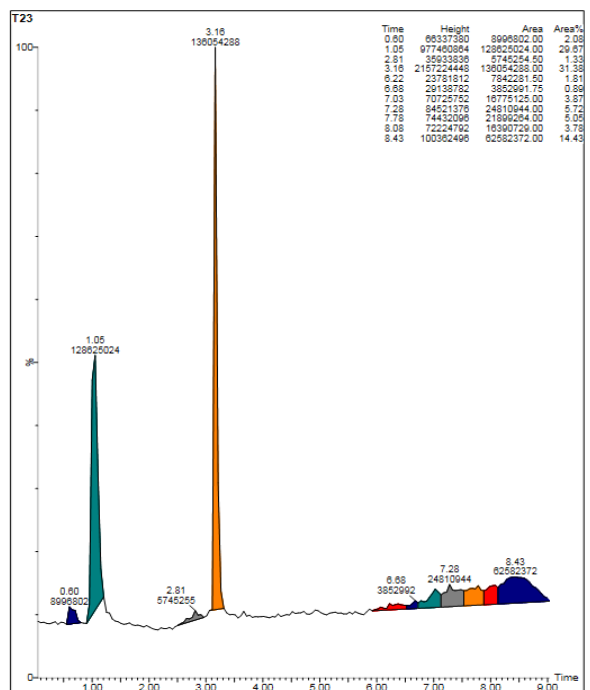


Gráfico 21. Cromatograma para la muestra T23, tratamiento con ácido araquidónico.

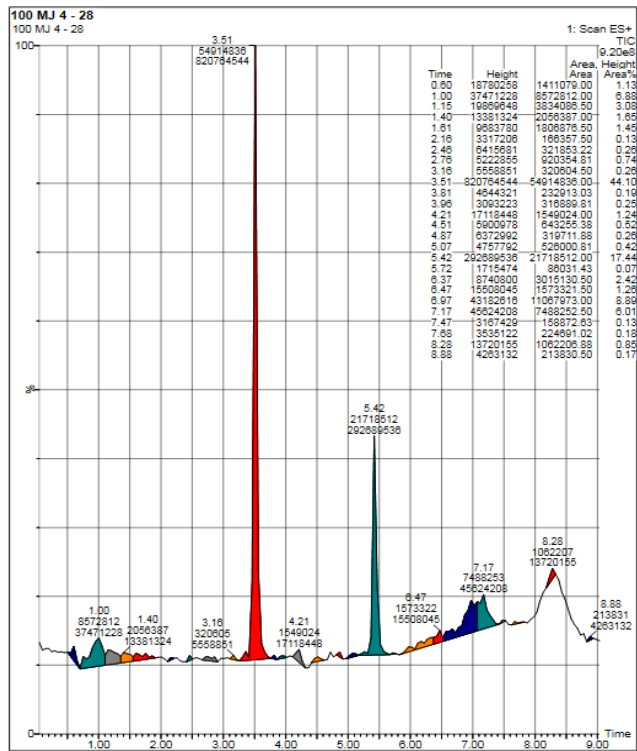


Gráfico 22. Cromatograma para la muestra 100 MJ 4 - 28, tratamiento con metil jasmonato.

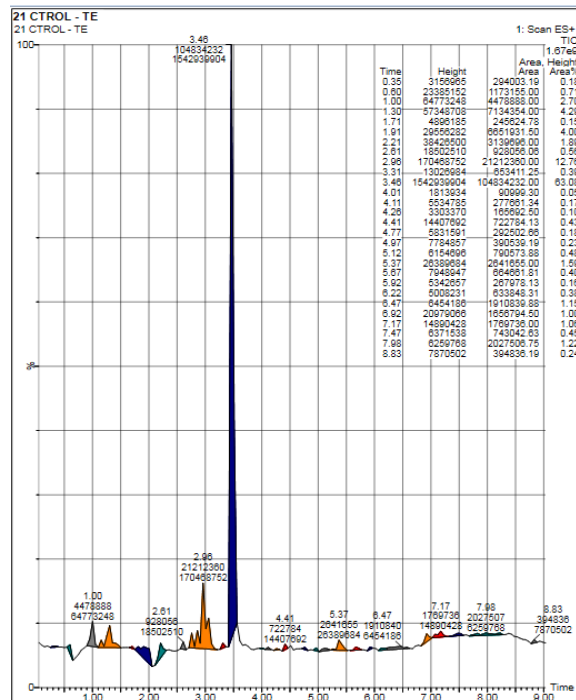


Gráfico 23. Cromatograma para la muestra 21 CTROL - TE, tratamiento con ácido araquidónico.

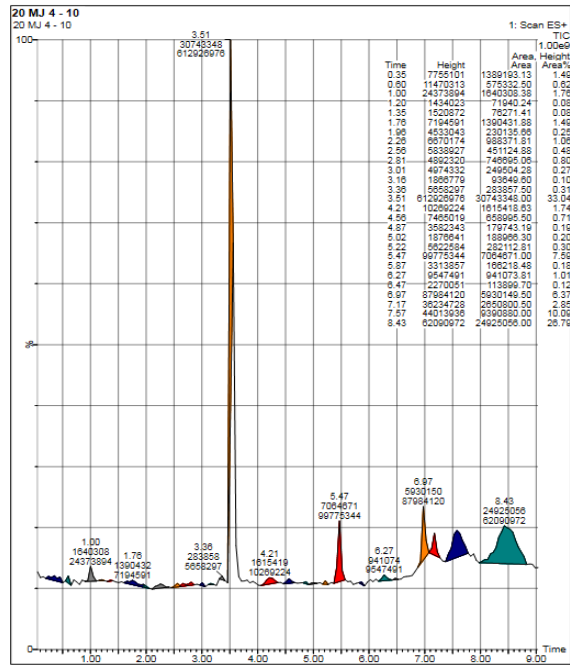


Gráfico 24. Cromatograma para la muestra 20 MJ 4 - 10, tratamiento con ácido araquidónico.