

Inducción de la producción de alcaloides tipo galantamina y licorina en *Eucharis grandiflora* mediante ácido salicílico y un sistema de inmersión temporal.

Isabella Fernández Bahamón

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO
Y CIENCIAS APLICADAS

Biología

Santiago de Cali
2024

Inducción de la producción de alcaloides tipo galantamina y licorina en *Eucharis grandiflora* mediante ácido salicílico y un sistema de inmersión temporal.

Isabella Fernández Bahamón

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
BIOLOGÍA

Asesoras:

María Eugenia Buitrago González, MSc
Paola Andrea Caicedo Burbano, PhD

Santiago de Cali
2024

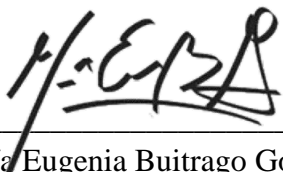
AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG I

Firma del Asesor:



Paola Andrea Caicedo Burbano

Firma del Co-asesor:



María Eugenia Buitrago González

Firma del estudiante:

Isabella Fernández B.

Isabella Fernández Bahamón

Resumen

La familia Amaryllidaceae es reconocida por producir metabolitos secundarios conocidos como alcaloides, que tienen propiedades farmacológicas y terapéuticas de gran interés para el tratamiento de diversas enfermedades. Teniendo en cuenta su utilidad y relevancia se han planteado nuevas estrategias para mejorar la obtención de alcaloides. Una de estas es utilizar cultivos *in vitro* para favorecer la propagación de material vegetal en conjunto con la adición de elicitors que generen estímulos permitiendo una mayor producción de estos compuestos. En este proyecto se evalúa la producción de alcaloides tipo galantamina y licorina a partir de bulbillos de *Eucharis grandiflora* producidos *in vitro* expuestos al elicitor ácido salicílico en un sistema de inmersión temporal (SIT).

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de dos concentraciones de ácido salicílico en la producción de alcaloides tipo galantamina y licorina en plantas de *Eucharis grandiflora* cultivadas en un SIT. Para ello, las concentraciones que se utilizarán son: 0.1 mM y 0.25 mM tratadas durante 24 días. El crecimiento vegetal se evaluó en términos de longitud de hojas, raíces y acumulación de biomasa. Por último, la producción de alcaloides se determinó mediante la técnica de espectrofotometría UV. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de 0.1 mM de ácido salicílico incrementa significativamente la producción de galantamina y licorina. Adicionalmente, esta concentración no genera un efecto negativo en las variables físicas evaluadas.

Palabras clave: galantamina, licorina, ácido salicílico, cultivos *in vitro*, amarilidáceas

Introducción

Amaryllidaceae es una familia de plantas angiospermas monocotiledóneas compuesta por plantas herbáceas perennes de gran interés económico, médico, farmacéutico y cosmético. Estas plantas cuentan con una amplia distribución en el mundo con presencia en zonas tropicales, subtropicales y regiones templadas cálidas, sin embargo, son predominantes en el sur de África, América del Sur andina y la cuenca mediterránea¹. Las plantas de la familia Amaryllidaceae son particularmente llamativas en numerosos países y comunidades debido a su destacado potencial en el tratamiento de enfermedades y afecciones inflamatorias². El uso de esta especie como medicina herbaria tradicional se debe en gran medida a las propiedades biológicas de los alcaloides que producen y su efecto positivo en el mejoramiento en los síntomas de algunas patologías.

En este sentido, las diferentes plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae producen una clase de alcaloides denominados como alcaloides de amarilidácea (AA)³, los cuales exhiben diversas actividades farmacológicas, incluyendo propiedades antitumorales^{4,5} antivirales⁶, antibacterianas⁷, antifúngicas⁸, antipalúdicas^{6,9} analgésica⁶, citotóxicas, antiproliferativas³ y larvicidas en mosquitos¹⁰. Estos metabolitos cumplen funciones asociadas a la defensa de la planta frente a agentes externos y se producen en estados específicos del desarrollo, así como en períodos de estrés. Se diferencian del metabolismo primario porque sus productos moleculares no son esenciales para el crecimiento y la reproducción del organismo¹¹. En consecuencia, las cantidades que se generan son bajas planteando uno de los principales retos en el proceso de su obtención para posterior uso en el desarrollo de fármacos o en investigación básica entre otras aplicaciones.

Entre los AA identificados en esta familia, se destacan la galantamina y la licorina al ser los más estudiados dados sus beneficios en el tratamiento de diferentes enfermedades. La galantamina se utiliza como principio activo en los medicamentos Razadyne® y Nivalin®, que son dos de los principales tratamientos paliativos contra la enfermedad de Alzheimer de leve a moderado¹². Su mecanismo de acción consiste en bloquear el funcionamiento de la enzima acetilcolinesterasa encargada de la degradación de la acetilcolina (neurotransmisor esencial para el funcionamiento cerebral). Por otro lado, la licorina también se convierte en foco de interés gracias a que exhibe un amplio espectro de actividades biológicas que incluyen efectos antitumorales, antibacterianos y actividad citotóxica¹³, por lo que se emplea en múltiples estudios para desarrollar fármacos con este compuesto¹².

La familia Amaryllidaceae está representada en Colombia por 18 géneros, entre los cuales se encuentra *Eucharis*. Este género particularmente cuenta con una distribución notable en nuestro país y Ecuador en donde se halla en bosques tropicales y premontanos de la cordillera Occidental¹⁴. En estudios se han informado que *Eucharis grandiflora*, una especie perteneciente a este grupo, produce una gran variedad de alcaloides, entre los que se pueden encontrar de tipo licorina, narciclasina (triseridina, ismina), tazetina (tazetina, 3- epimacronina y 3-O-Demetiltazetina), galantamina (galantamina, sanguinina) y hemantamina (hamaina, 8-O- demetilmartidina, hidroxivitatina y 2-O-Acetillicorina)¹⁵. Al igual como se mencionó con respecto a los alcaloides de galantamina y licorina y sus efectos a nivel biológico, la narciclasina ha demostrado tener potencial en el tratamiento de cánceres al disminuir considerablemente la proliferación celular¹⁶. Además, otros estudios han demostrado que la sanguinina actúa como un fuerte inhibidor de la colinesterasa, e incluso se ha reportado que muestra un nivel de inhibición mayor al estimado para la galantamina¹⁷. Por su parte, para la tazetina se ha reportado que tiene actividades antipalúdicas y antineoplásicas^{18,19}.

Si bien con el tiempo se han dado a conocer los potenciales beneficios de los AA, aún no han sido utilizados ni aprovechados en su totalidad. Esto se debe como se mencionó con anterioridad a los limitantes existentes con respecto a las bajas cantidades de alcaloides que producen estas plantas naturalmente. Adicionalmente, también hay otros factores que pueden restringir la obtención de metabolitos, tales como, la diversidad genética de las plantas, condiciones climáticas y el estatus fisiológico al momento de realizar la evaluación. Estas limitaciones impactan directamente en el tiempo requerido para que las plantas se desarrollen adecuadamente y alcancen la fase de producción para que sea rentable¹⁸.

La situación anteriormente planteada junto con el interés creciente ha impulsado la búsqueda de métodos tanto biológicos como químicos para incrementar la obtención de alcaloides y posterior aplicación en diferentes áreas. En el momento existen dos métodos principales para la obtención de estos compuestos orgánicos: el primero es el uso de plantas como biorreactores mediante el cultivo vegetal *in-vitro* (por ejemplo, el sistema de inmersión temporal-SIT) y el segundo implica un proceso de síntesis química total que resulta siendo poco efectivo y muy complejo de llevar a cabo.

Al ser descartado cada vez con más frecuencia el uso de métodos químicos, se ha convertido en foco de atención como una alternativa viable la producción de moléculas biológicamente activas a través del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales^{19,20}. Esta tecnología que representa un

enfoque novedoso abarca un conjunto de técnicas que permiten el crecimiento y mantenimiento de células, órganos y tejidos vegetales bajo condiciones ambientales controladas, cuyo principal objetivo es manipular su crecimiento, multiplicación y diferenciación en un medio de composición conocida²¹.

Otra alternativa que se ha utilizado para dar solución a la problemática planteada es la de inducir la respuesta de defensa en las plantas con compuestos químicos como elicitores, que potencien la producción de alcaloides. Entre los elicitores más utilizados como inductores se encuentran el metil jasmonato, el ácido jasmónico y en menor proporción el ácido salicílico para producir una diversidad de alcaloides de amarilidáceas (AA), como la galantamina, licorina, hemantamina, montanina, pancratistatina, entre otros^{22,23}. Cabe resaltar que hasta el momento, la información sobre el efecto que genera el ácido salicílico es escasa en comparación con otros elicitores, y está restringida a especies no nativas de nuestro país²⁴.

En la amplia gama de metabolitos secundarios producidos por las plantas, se identifican alrededor de 50,000 de ellos²⁵, clasificándose en cinco grupos principales: fenoles, terpenos, esteroides, alcaloides y flavonoides, subrayando la diversidad de respuestas a situaciones adversas²⁶. Entre estas, sobresale la vía de señalización de la isocorismato sintasa (ICS) o la vía de la fenilalanina amoníaco-liasa (PAL), activadas en respuesta a una gran variedad de patógenos, conduciendo a la producción de la hormona vegetal ácido salicílico (SA)²⁷. Este compuesto, cuya concentración se incrementa frente al daño por el patógeno, estimula la producción de proteínas defensivas y expresión de genes que codifican enzimas cruciales para la biosíntesis de metabolitos secundarios como método de resistencia²⁸.

Para ejemplificar cómo ocurre esta síntesis es necesario mencionar que tanto el ácido salicílico como otros biofactores inducen la expresión de enzimas como PAL (phenylalanine ammonia-liase) y TD (tyrosine decarboxylase)²⁹. Las enzimas mencionadas forman parte de los primeros pasos de la ruta metabólica de los alcaloides de Amaryllidaceae, iniciando con la formación del intermediario biosintético común O-metilnorbellaína²⁹. El acoplamiento oxidativo de -Ortho-para fenol con el intermediario da lugar a la formación de licorina, mientras que el de para-orto fenol conduce a la formación de galantamina³⁰ (Figura 1).

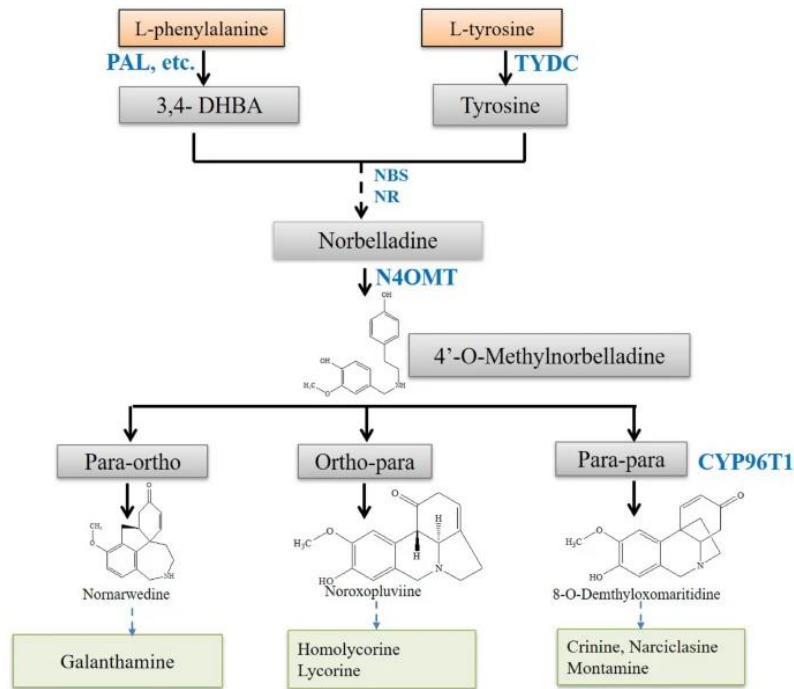


Figura 1. Principales tipos de vía biosintética de alcaloides para la familia Amaryllidaceae. Tomado de: (Kaur, H., 2022).

Dentro de los elicitores que han cobrado mayor relevancia con el tiempo se encuentra el ácido salicílico (SA) y sus derivados conocidos como salicilatos, compuestos fenólicos encargados de desencadenar una respuesta hipersensible cuando tiene lugar la interacción planta-patógeno³¹. Investigaciones han revelado aumentos en la concentración de diversos metabolitos secundarios con la adición de ácido salicílico en sistemas de cultivo *in vitro*, centrándose en los alcaloides y, más específicamente, evaluando su efecto en la producción de galantamina y licorina^(32,33) entre otros³⁴. Cabe resaltar que el incremento en la acumulación de metabolitos secundarios como resultado del efecto del SA es menor en comparación con otros inductores como los jasmonatos³⁴. La optimización de la concentración y el tiempo de exposición de los inductores en los cultivos *in vitro* es clave para obtener producciones exitosas de alcaloides, para lo cual es indispensable la investigación y profundización del tema. Dentro de las ventajas de utilizar este tipo de inductor se encuentra que (a) es un producto natural se requieren bajas cantidades para producir efectos positivos, (c) es fácil de aplicar y (d) es un producto químico barato disponible en casi cualquier lugar³⁷.

El uso de cultivos *in vitro* para plantas, ha demostrado mejoras significativas en términos de acumulación de alcaloides y producción de biomasa¹². Entre los sistemas de cultivo *in vitro* se encuentra el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) que se utiliza comúnmente como

biorreactor vegetal dado que proporciona múltiples ventajas en términos de manejo, estabilidad de condiciones propicias para tejidos vegetales y escalabilidad de producción³⁵. Así mismo, se ha demostrado que este tipo de sistema en comparación con los sistemas de cultivo sólido permiten al material vegetal una mayor accesibilidad a los componentes del sustrato, lo que genera mayores ganancias de biomasa y tiempos de propagación reducidos.

El SIT consta de dos recipientes conectados por una manguera: el primer recipiente alberga los explantes, mientras que en el segundo se ubica el medio de cultivo. En la parte interna de cada recipiente, una manguera de silicona desciende hasta el fondo para absorber el medio, permitiendo la circulación de este de un frasco a otro mediante la inyección de aire (Figura 2). La frecuencia y duración del intercambio pueden ajustarse programándose con ayuda de un temporizador¹². Los biorreactores SIT suelen estar compuestos con recipientes de vidrio o plástico que permiten el ingreso de fuentes de luz externas a los materiales vegetales cultivados, factor de relevancia en cultivos *in vitro*.

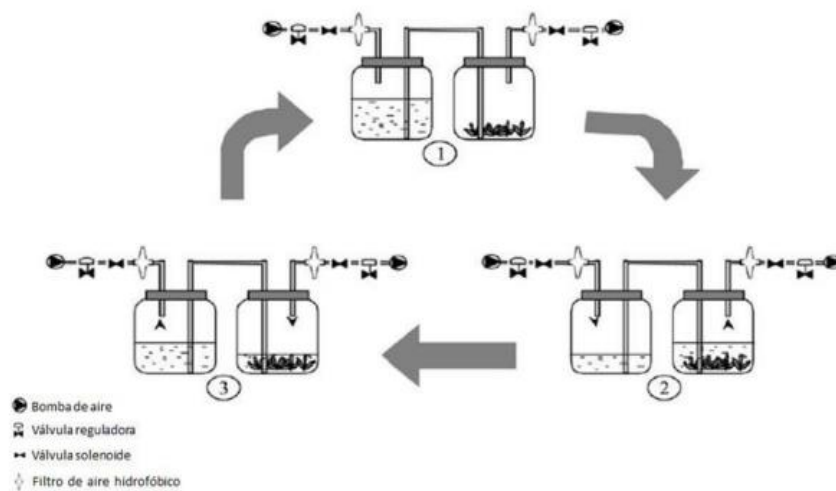


Figura 2. Sistema de inmersión temporal (SIT). 1. El medio líquido está separado del recipiente de cultivo que contiene los explantes 2. Inmersión o paso del medio de cultivo del frasco reservorio al frasco donde están los explantes. 3. Retorno del medio de cultivo al frasco reservorio luego de cumplir el tiempo de inmersión establecido. Tomado de: (Barragán, I., 2017).

Es importante mencionar que la respuesta a los estímulos generados por los elicitores son altamente dependientes de la especie de la planta, así como de la concentración específica del elicitador y el tiempo de exposición. La información disponible sobre el uso de elicitores en plantas de *E. grandiflora* es limitada, lo que hace que determinar el efecto de los elicitores en

esta planta se convierta en una nueva rama de investigación que puede ser de gran utilidad para descubrir cómo esta especie se comporta en el proceso de producción de alcaloides.

El presente estudio tiene como objetivo general evaluar el efecto de dos concentraciones de ácido salicílico en la producción de alcaloides tipo galantamina y licorina en plantas de *Eucharis grandiflora* cultivadas en un sistema de inmersión temporal (SIT). Entre los objetivos específicos se encuentran determinar la cantidad total de alcaloides producidos, caracterizar los alcaloides tipo galantamina y licorina y, por último, evaluar el efecto del ácido salicílico en el desarrollo y la acumulación de biomasa de las plantas.

Metodología

1. Introducción de material vegetal a cultivo *in vitro*.

El ensayo tiene lugar en el laboratorio de biotecnología de la Universidad ICESI, utilizando plantas de *Eucharis grandiflora* que formaban parte de la colección de plantas de cultivo *in vitro*. Adicionalmente, con el objetivo de aumentar la cantidad de unidades experimentales, se incorporaron plantas procedentes del vivero ubicado en casa de malla en la misma universidad. Estas plantas se mantuvieron en condiciones de sombra proporcionada por una polisombra, similar al entorno natural de las plantas en un intento de emular las condiciones propias de un sotobosque que corresponde al entorno natural de estas plantas. Cabe resaltar que el vivero se encuentra en condiciones ambientales no controladas, es decir, era reflejo de las condiciones naturales de la zona de estudio, en este caso Cali, incluyendo variaciones en luz, humedad y temperatura.

Se introdujeron 6 bulbos de *Eucharis grandiflora* los cuales fueron expuestos a procesos de desinfección para su posterior siembra *in vitro*. Los pasos llevados a cabo se describirán a detalle en los siguientes párrafos.

1.1 Preparación de medios de cultivo.

En la preparación, se utilizó el medio de cultivo denominado MS (Murashige and Skoog) completo⁴⁴, suplementado con sucrosa 3% y bencilopurina (BAP) (1ml/L) para estimular el crecimiento y la generación de bulbos en las plantas y gel rite al 2%, como agente gelificante para dar consistencia al medio. Por último, se añadió carbón vegetal (Duchefa Biochemie ®) 0.1%. La adición del carbón se realizó con el propósito de neutralizar los compuestos fenólicos

que la especie de interés pueda secretar y, de este modo, evitar cualquier alteración de estos compuestos en el desarrollo del experimento. Por otro lado, para hacer el cultivo en medio de inmersión temporal se empleó el medio MS líquido suplementado con vitaminas y glucosa al 3%.

1.2 Desinfección de material.

El proceso de desinfección del material vegetal procedente del vivero, previo a su introducción en el cultivo *in vitro* en el laboratorio, fue el siguiente: inicialmente, se realiza una limpieza física de las plantas colectadas mediante un lavado con agua corriente, eliminando escamas exteriores, tallos y raíces necrosadas o contaminadas en el vivero (Figura 3). Después se lavan los bulbos con abundante agua y detergente Extran® al 50% para eliminar el exceso de tierra. Posteriormente, se sumergen durante 5 minutos con agitación en una solución desinfectante compuesta por MERCK TEGO 51 (Dodecil Dietilen Diaminoglicina y Dodecilano Propilglicina 9.0%, Excipientes C.S.P.100%) al 2%. En la cabina de flujo laminar se realiza la segunda etapa de desinfección que consiste en sumergir los bulbos en etanol al 70% durante 1 minuto con agitación constante. Luego, se enjuaga con agua estéril por 1 minuto y con agitación constante para eliminar el exceso de etanol. Tras este paso se retira el agua y se elabora un corte transversal al bulbo para retirar la parte apical, y se corta en 4 partes iguales conservando la placa basal. Tras esto, se enjuaga con agua estéril y se sumerge las partes resultantes de los bulbos en etanol al 70% por 1 minuto con agitación constante. Se realiza un enjuague con agua estéril por 1 minuto, y con agitación constante para eliminar el exceso de etanol y se sumergen en 150 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% con 4 gotas de Tween 20 por cada 100 mL de solución durante 20 minutos con agitación constante. Posteriormente, se efectúan 3 enjuagues con agua destilada durante 3, 10 y 15 minutos consecutivamente, se retira el agua y se adiciona nuevamente agua destilada para evitar la deshidratación de los bulbillos mientras se lleva a cabo con el protocolo de introducción al medio de cultivo *in vitro*. El procedimiento descrito coincide con el protocolo de desinfección empleado en el laboratorio de biotecnología el cual se encuentra descrito detalladamente en (Barragan, I., 2017).

1.3 Inducción de material a un sistema de cultivo *in vitro* permanente.

Para realizar el proceso de inducción de material desde el vivero al laboratorio, se empleó la técnica de "twin-scaling" con el fin de inducir la formación de bulbillos *in vitro*¹⁴ y aprovechar al máximo el material recolectado. En el paso inicial de este proceso, se retiraron las 4 escamas más externas de los bulbos como medida para prevenir contaminación en el medio. Posteriormente, se cortó el bulbo de manera transversal, descartando la parte apical. Luego, la parte basal del bulbo se dividió en seis secciones, y de cada sección se seleccionaron 3 pares de escamas unidas por la placa basal como se muestra en la Figura 3. Lo anterior se realizó con la ayuda de un estereoscopio (SMZ445 Nikon ®), y se introdujeron en medio de cultivo MSA1B, teniendo en cuenta que el área de la placa basal del explante estuviera en contacto con el medio de cultivo para garantizar la apertura de las escamas y posterior formación de nuevos bulbillos. Se sembraron de 2 a 4 pares de escamas por recipiente, dependiendo del tamaño del frasco y el explante.



Figura 3: De izquierda a derecha se muestran plantas de *E. grandiflora* y técnica de twin-scaling

En este proyecto, se procesaron un total de 10 bulbos de *Eucharis grandiflora* procedentes del invernadero, lo que resultó en la siembra de 24 pares de escamas por bulbo. Además de utilizar el material procedente del vivero, se emplearon bulbos presentes en cultivo *in vitro* al inicio del proyecto, en concreto se usaron 8 bulbos con estas características, de los cuales se obtuvieron 10 escamas por bulbo. En todos los casos, los bulbillos se propagaron en medio MSA1B.

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto a temperatura constante de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas bajo luz blanca y 8 horas de oscuridad, y con una humedad relativa del 70%.

2. Introducción de los bulbos de *Eucharis grandiflora* al sistema de inmersión temporal.

El Sistema de Inmersión Temporal (SIT) que se utilizará se encuentra en el cuarto de crecimiento del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi. Consta de tres componentes: un compresor sin aceite de la marca Kaeser Dental 5T, que controla la presión del aire y facilita el intercambio de medio entre los recipientes; paneles o estantes con mangueras de silicona Tygon 3350 que conectan cada unidad de cultivo (dos recipientes para el intercambio del medio); y los recipientes de cultivo, que en este estudio consistieron en pares de Erlenmeyer de 250 mL cada uno.

Cada unidad de cultivo, o réplica, se compone de dos Erlenmeyer cerrados con tapones de caucho grado alimenticio, conectados por una manguera de silicona Tygon 3350 que permite el paso del medio de cultivo entre ellos. El sistema incluye un tubo de vidrio en forma de "Y" con tapón de goma tipo septum en la manguera, permitiendo inyectar, mediante jeringa y aguja hipodérmica estéril, el medio de cultivo una vez consumido o evaporado, devolviéndolo a su volumen inicial (Figura 4).

El diseño del SIT permite preservar la integridad morfológica de las plantas in vitro y reduce el estrés mecánico al posibilitar el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los tejidos vegetales durante breves periodos, renovando la atmósfera gaseosa. Lo anterior es importante porque permite controlar el entorno gaseoso mientras se utiliza de forma eficiente el entorno líquido proporcionando un sistema de producción que reduce costos³⁶. A diferencia de los cultivos semisólidos que solo permiten la aireación, el SIT, ofrece un contacto completo de todo el tejido vegetal con los medios nutritivos permitiendo la absorción de estos³⁶.

Además, destaca por su facilidad de manipulación, y permite ajustar la composición del medio mediante una simple transferencia, ofreciendo oportunidades para la automatización⁵⁶. En estos experimentos, se programó una frecuencia de inmersión de cada 8 horas con 15 minutos de inmersión, y se cultivaron las plantas en medio MS líquido completo suplementado con un 3% de sucrosa. El volumen del medio para el SIT fue de 40 ml, el cual se mantiene constante durante el proceso experimental, completándolo cuando fue necesario es decir cuando se consumió o evaporó.

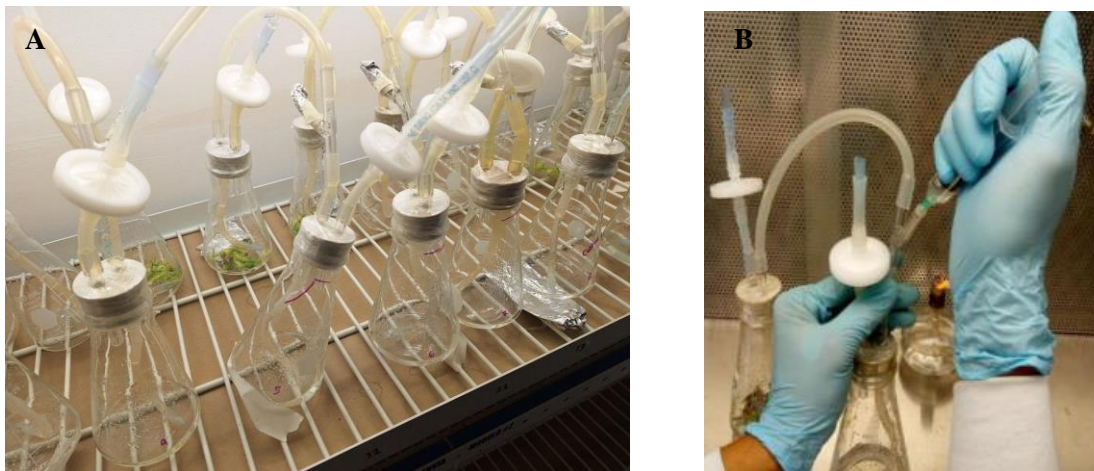


Figura 4: *a*, SIT instalado, en la parte de atrás Erlenmeyer con plantas y adelante Erlenmeyer donde se agrega inicialmente el medio de cultivo. *b*, inyección de medio de cultivo por el tapón tipo septum¹².

2.1 Preparación de los tratamientos con ácido salicílico para la inducción en la producción de alcaloides en plantas de *E. grandiflora*.

Para la transición de las plantas desde el sistema de cultivo *in vitro* permanente al sistema de inmersión temporal, se realizó la remoción de hojas y raíces, para conservar únicamente los bulbillos. Este procedimiento busca simplificar su adición en los matraces Erlenmeyer, así como garantizar la asepsia del experimento y estandarizar el estatus fisiológico de los tejidos que se van a evaluar. En cada matraz Erlenmeyer se introdujo la cantidad necesaria de bulbillos para alcanzar un peso fresco de 2.5 g por matraz (entre 9 a 15 bulbillos). Por su parte, en el matraz emparejado (réplica), se añadieron 40 ml de medio MS suplementado con vitaminas y un 3% de sacarosa. Se evaluó el efecto del ácido salicílico en el medio de cultivo en dos concentraciones diferentes: 0.1 mM y 0.25 mM, este compuesto se añadió 7 días después de la introducción de los bulbillos en el sistema de inmersión temporal. La cosecha de los bulbillos se realizó a los 17 días posteriores a la introducción del elicitor en el medio de cultivo. Como control, se incluyeron plantas cultivadas en el sistema de inmersión temporal en el mismo medio de cultivo, pero sin el uso del elicitor, manteniendo el mismo período de 24 días en total.

Una semana después de iniciar el cultivo, se realizaron inyecciones de 5 mL de medio (con o sin elicitores según el tratamiento) con el propósito de compensar la reducción del medio 14 debida a la evaporación y al consumo por parte de las plantas, manteniendo así el volumen inicial de 40 mL.

3. Toma de medidas morfológicas.

Luego de los 24 días de tratamiento con ácido salicílico, se retiraron las plantas de los sistemas de inmersión temporal (SIT) y se realizó la medición de su peso fresco, comparándolo con las mediciones previas al ingreso al SIT. Asimismo, para determinar la biomasa de los bulbillos fue necesario en primera instancia secarlos en un horno durante 48 horas para después ser pesados. Todas las mediciones de esta variable se realizaron utilizando una balanza analítica de la marca Sartorius. Los datos de biomasa corresponden a los datos de peso seco de los bulbos, puesto que de esta manera se tiene en cuenta la masa real de la planta, descartando la variación que proporciona el contenido de humedad al interior de cada planta.

Finalmente, para obtener las medidas de longitud de las hojas y raíces más largas, se empleó cinta métrica para realizar las mediciones correspondientes, tomando en cuenta la raíz y la hoja más extensa de todos los bulbillos (Figura 5). Para disminuir el porcentaje de error en los datos obtenidos en este punto se tomó una medida que sería utilizada como referencia para verificar en el programa imageJ el valor determinado para cada bulbo.



Figura 5: Técnica usada para medir el largo de hojas, en este caso de un bulbo de *E. grandiflora*

4. Extracción de alcaloides.

La extracción de alcaloides siguió el protocolo establecido por Ortiz (2023). Para iniciar, se secó el material vegetal a 55 °C durante tres días con el propósito de eliminar la humedad y determinar su peso seco. Una vez seco el material vegetal se tomó una muestra de 300 mg, que fue macerada con nitrógeno líquido hasta convertir el material inicial en polvo. La mezcla resultante se resuspendió en ácido clorhídrico al 5% con una relación peso-volumen del 6%. Luego, esta suspensión se sometió a sonicación (Qsonica®) durante 16 minutos a una amplitud

del 70% en intervalos de 50 segundos encendido y 30 segundos apagado. Posteriormente, se llevó la suspensión al shaker con agitación orbital a 300 rpm durante dos horas seguido de una centrifugación a 4000 rpm para separar el sobrenadante (fase acuosa ácida), que se recuperó en un erlenmeyer de 125 mL. Después de la recuperación se homogeniza con vortex por 5 minutos. El precipitado resultante se trató con HCl dos veces más, realizando la centrifugación y el vortex en cada lavado.

El sobrenadante recolectado se lavó tres veces con n-Hexano en relación 1:1 con la fase ácida para desengrasar las muestras. Después de cada lavado, se agitó a 300 rpm en el shaker durante media hora y se separaron las fases en un balón de decantación. Se aumentó el pH de la fase ácida a 9.0 empleando hidróxido de amonio al 28%, obteniendo la fase acuosa básica. Así pues, la muestra se agitó a 300 rpm durante 24 horas. Luego, se añadió cloroformo en proporción 1:1 y se homogeneizó durante 2 horas, separando las fases en un balón de decantación y conservando la fase orgánica (cloroformo, fase orgánica enriquecida con los alcaloides). Este paso se repitió dos veces más. Posteriormente, se realizaron dos lavados adicionales con agua tipo 2 en relación 1:1, agitándolos a 300 rpm durante 30 minutos cada uno. Para finalizar, se filtró la fase orgánica enriquecida pasándola por un embudo con sulfato de sodio anhidro para eliminar trazas de agua, y se llevó a rotoevaporación a 40 °C y un vacío entre 280-600 bares a 80 rpm.

Los alcaloides se recuperaron del balón con metanol y se transfirieron a un vial de vidrio debidamente rotulado y se llevó al horno durante dos días con el objetivo de evaporar el metanol y calcular el rendimiento de la extracción. Luego, se resuspendieron las muestras en metanol y se almacenó a 4 °C hasta realizar el proceso de cuantificación.

5. Cuantificación por espectrofotometría.

La cuantificación de galantamina y licorina se realizó mediante espectrofotometría UV utilizando un espectrofotómetro modelo Shimadzu UV-1800. En primer lugar, se realizó un espectro de barrido en el rango de 200 a 500 nm para determinar la absorbancia máxima de ambos compuestos. Una vez identificadas las longitudes de onda de absorbancia máxima, se desarrollaron curvas de calibración para galantamina y licorina. Para la galantamina, se emplearon soluciones con concentraciones de 0.0125, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.1 g/L de bromhidrato de galantamina (Supelco®). Para la licorina, se utilizaron concentraciones de 0.0125, 0.025, 0.0375, 0.05 y 0.075 g/L de clorhidrato de licorina (Sigma-Aldrich®). Ambos

compuestos fueron disueltos en metanol. En este análisis se usó 1 ml de muestra, el cual era el resultado de la extracción ácida de los alcaloides en donde se utilizó 300 mg para cada tratamiento.

Para la curva de calibración se realizaron diluciones con el objetivo de que cada una de las concentraciones previamente determinadas se encontraran en el rango de absorbancia, es decir, de 0 a 1. Dicho esto, a la muestra que ya estaba diluida en metanol se le añadió 1ml de adicional de este disolvente obteniendo un volumen final de 2ml. De esta cantidad se extrajeron 300 microlitros que fueron añadidos a las celdas de cuarzo para después añadir 1700 microlitros y tener nuevamente el volumen final de 2ml.

6. Análisis estadístico

El experimento emplea un diseño completamente al azar de un factor con tres niveles que fueron el control y los cultivos expuestos a las dos concentraciones de ácido salicílico. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los análisis se hicieron usando análisis de varianza (ANOVA) y para evaluar las diferencias entre los grupos, se utilizó la prueba de Tukey con la función `HSD.test` del paquete `agricolae` en R 46 con una significancia $p < 0.05$. Estas pruebas fueron realizadas en el programa R versión 4.4.0.

Resultados

1. Propagación de material vegetal

Se obtuvieron un total de 150 plántulas de *E. grandiflora* mediante la técnica de twin scaling. Lo anterior se traduce en un porcentaje de inducción del 83%. Al considerar la pérdida del 10% debido a la contaminación, la efectividad de propagación fue del 73%. Se considera que una tasa de contaminación igual al 10% indica que el proceso de introducción del material es parcialmente efectivo, pero debe considerarse situaciones en las que el protocolo de desinfección integre la parte interna de los bulbos. Dado que, en el proceso de inducción de bulbos desde el invernadero al cultivo in vitro se observó que en una gran parte del material recolectado presentaba en la placa basal hongos o bacterias que dificultaron la separación de las escamas sanas para su posterior crecimiento (Figura 6).



Figura 6. Partes seccionadas de un bulbo de *E. grandiflora* introducido del vivero al laboratorio con aparente contaminación por hongos o bacterias.

2. Medidas físicas de las plantas.

Posterior al tratamiento con el elicitor se observó que las plantas de *E. grandiflora* expuestas a la concentración de 0.1 mM tuvieron una mejor respuesta a su cultivo en el sistema de inmersión temporal, siendo capaces de producir una cantidad de hojas y raíces similares al control (Figura 7). Teniendo en cuenta lo anterior, los análisis físicos se realizaron únicamente con las plantas que presentaban hojas y raíces, con el objetivo de evitar variaciones excesivas provocadas por datos atípicos que supondrían las plantas sin hojas o raíces.

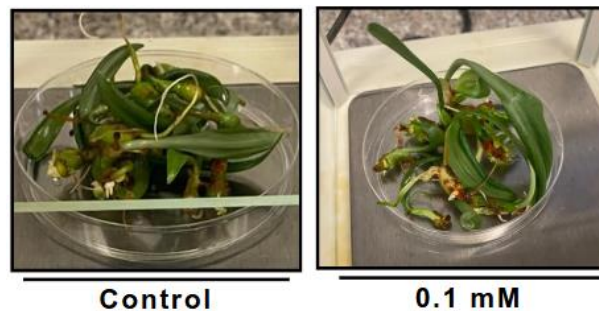


Figura 7: Plantas de *E. grandiflora* cosechadas después de haber sido sometidas a los distintos tratamientos propuestos en el presente trabajo en el sistema de inmersión temporal.

El procedimiento experimental arrojó como resultado que el tratamiento correspondiente a la concentración de 0.1mM de ácido salicílico presentó en general hojas más largas en comparación con el promedio de la concentración más alta. Como prueba de ello es que tanto el control como el tratamiento con SA de 0.1mM no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ambas plantas. Esto contrasta con lo que se ha descrito en estudios anteriores donde la aplicación de SA provocaba un efecto negativo en el desarrollo de las hojas^{24, 38}. En este estudio, por su parte, se encontró que el tratamiento de 0.1mM de SA no genera una disminución en el crecimiento de la hoja más larga, por el contrario, genera un incremento del

4% en relación con el control. A su vez, el tratamiento con la concentración de 0.25 mM de SA mostró una disminución correspondiente al 16% en la longitud de la hoja más larga en comparación con el control. Lo anterior demuestra que concentraciones más altas del elicitor pueden generar un efecto inhibitorio en el crecimiento y desarrollo de las hojas.

Por otro lado, las raíces vieron disminuido su crecimiento con la adición de SA, efecto que se notó de forma más severa en el tratamiento con la concentración más alta del inductor. Para la concentración de 0.1 mM se observó que la raíz más larga tuvo una longitud menor correspondiente al 2% con respecto al control mientras que las plantas expuestas a 0.25 mM de SA redujeron el tamaño de su raíz en aproximadamente un 14%. Estos resultados se pueden observar de manera gráfica en la Figura 8. Además, es importante destacar que todos los tratamientos tuvieron una variación significativa, esto puede ser ocasionado debido a que no todas las plantas cosechadas produjeron raíces. Lo anterior puede estar asociado a una respuesta propia de la especie de estudio o el hecho de que cuando las plantas están sumergidas en el medio, tienen la capacidad de absorber nutrientes por toda la superficie de la planta.

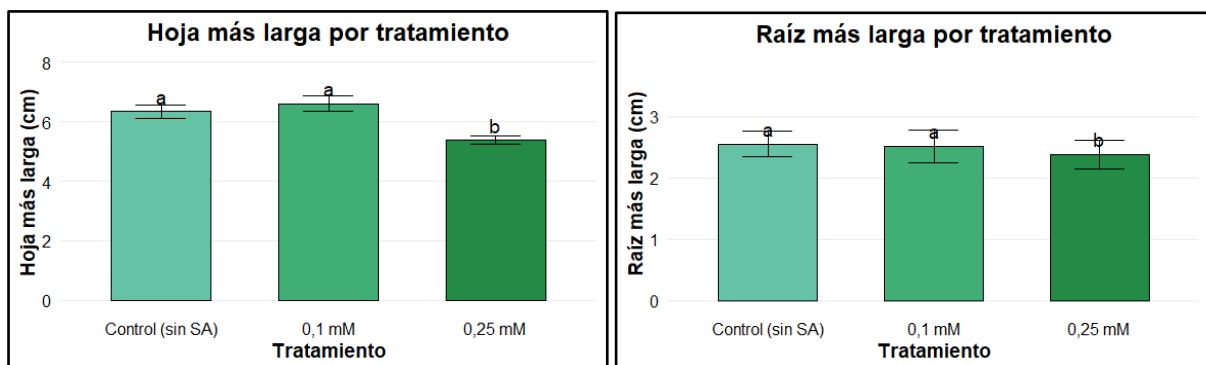


Figura 8: En el panel izquierdo, se muestra el promedio de la hoja más larga para cada tratamiento evaluado, incluyendo los tratamientos con las concentraciones de 0.1 mM y 0.25 mM de SA y su respectivo control. En el panel derecho, se presenta el promedio de la raíz más larga para cada tratamiento. En ambos paneles, se incluyen barras de error que representan la desviación estándar y las letras indican las diferencias significativas según la prueba de Tukey.

En cuanto a la variable de biomasa, en la Figura 9 se observa que las plantas expuestas a la concentración de 0.1 mM tienden a producir una mayor cantidad de biomasa en comparación con el tratamiento de 0.25mM. Lo anterior coincide con las observaciones físicas que se hicieron en la figura 7 donde se evidenció que las plantas del tratamiento de menor concentración tuvieron un crecimiento similar al del control, mientras que, para 0.25mM se encontraron más registros de poco desarrollo en hojas y raíces. Es importante retomar lo

mencionado en párrafos anteriores donde se menciona que estos resultados no coinciden con lo reportado en otros estudios como el de Colque (2004) en donde se encontró que cualquier concentración de SA, incluso las más bajas afectarían de forma negativa el desarrollo de las plantas²⁴. En este caso, podemos evidenciar que para *Eucharis grandiflora* la concentración de 0.1 mM de ácido salicílico mantiene la acumulación de biomasa de manera positiva.

Si bien la información sobre el efecto del ácido salicílico en la producción de alcaloides es limitada, existen diversos artículos en donde se expone que la aplicación de inductores ralentiza el desarrollo de la planta³⁸. En dichos artículos se explica que, los elicitores pueden reducir el crecimiento de las plantas al desviar recursos de los procesos de crecimiento hacia los mecanismos de defensa. Cuando las plantas detectan elicitores, activan sus sistemas de defensa, lo que frecuentemente implica la producción de metabolitos secundarios como los alcaloides. Esta respuesta requiere de energía y recursos, que no están disponibles para las actividades de crecimiento primario, como la división y el alargamiento celular. Los inductores desencadenan una respuesta de estrés oxidativo en las plantas, acompañada de la activación de genes relacionados con la defensa. Este proceso metabólico, al demandar una gran cantidad de recursos, puede inhibir el crecimiento vegetativo, ya que la planta prioriza su supervivencia sobre su desarrollo⁵¹.

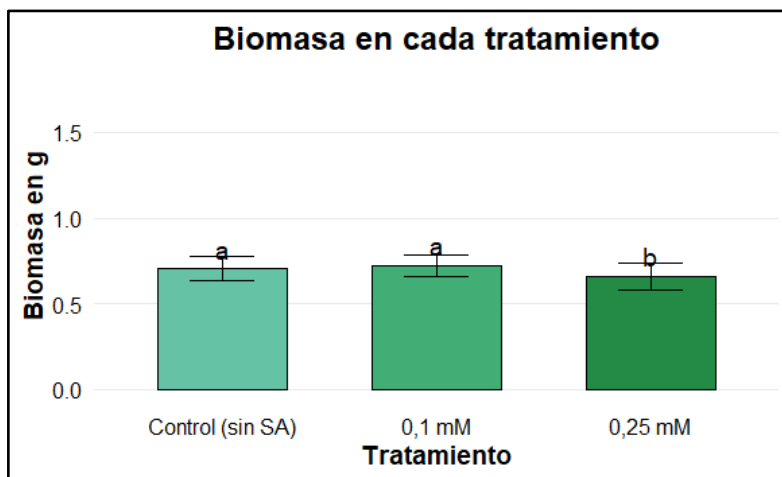


Figura 9: Biomasa acumulada promedio de *Eucharis grandiflora* bajo diferentes tratamientos. Los tratamientos incluyen dos diferentes concentraciones de ácido salicílico (0.1 mM y 0.25 mM) y su respectivo control. Las barras de error indican la desviación estándar, y las letras sobre las barras muestran las diferencias significativas determinadas por la prueba de Tukey

A pesar de los hallazgos obtenidos, la limitada información disponible para las especies analizadas sugiere que los elicitores podrían estar ejerciendo un efecto distinto sobre las rutas metabólicas de estas plantas, en comparación con otros grupos vegetales.

3. Obtención de alcaloides galantamina y licorina.

Se usó la espectrofotometría UV para cumplir con uno de los objetivos del trabajo, el cual era determinar la concentración de galantamina y licorina presentes en las plantas evaluadas en cada uno de los tratamientos. Para esto se realizó un espectro de barrido, en donde se encontró que la absorbancia máxima para los compuestos era de 289 nm y 286 nm para galantamina y licorina respectivamente, estos resultados se ajustan a lo reportado en la teoría para estos compuestos^{39,40}. Adicionalmente, en la figura 10 se muestra los resultados de las curvas de calibración realizadas para obtener la concentración de los alcaloides extraídos de las plantas estudiadas.

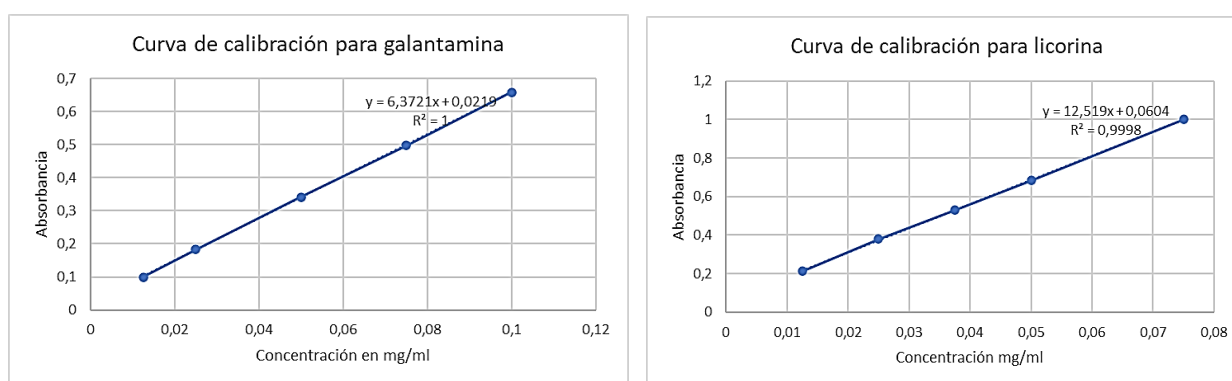


Figura 10: de izquierda a derecha se muestran las curvas de calibración realizadas para galantamina y licorina respectivamente. También se muestra el R2 de la recta y su ecuación.

En general se observó que el ácido salicílico en bajas concentraciones puede incrementar la producción de alcaloides. El efecto que genera este elicitador ha sido documentado en diversos estudios cuyos resultados pueden variar de una especie a otra dependiendo el tiempo de exposición y las concentraciones utilizadas⁴⁸. En estos se indica que el efecto positivo del SA en el aumento de alcaloides se debe a que este compuesto influye en la actividad de diversas enzimas clave en las rutas metabólicas de algunas especies vegetales⁴¹. Por ejemplo, tiene un efecto positivo en la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL), que es una enzima clave en la vía de biosíntesis de compuestos fenólicos y alcaloides^{41,42}. En particular, PAL cataliza la conversión de fenilalanina en trans-cinámico, un paso fundamental que conecta el metabolismo primario con el especializado⁴⁴. Esto permite la síntesis de una variedad de compuestos, incluidos los alcaloides de Amaryllidaceae, conocidos por sus propiedades biológicas y farmacológicas. Lo anterior es posible gracias a que el ácido salicílico juega un papel relevante en la regulación de la expresión génica permitiendo la expresión de genes y enzimas asociados a la producción de alcaloides⁴³. Adicionalmente, concentraciones adecuadas

de SA pueden estimular el crecimiento celular, lo que a su vez puede contribuir a una mayor producción de biomasa y, por ende, de alcaloides⁴³.

Continuando con el análisis, se encontró que la concentración de ácido salicílico que generó una mejor respuesta en cuanto a la producción de alcaloides fue la de 0.1 mM. Lo anterior se puede evidenciar en la figura 11 donde el valor más alto para galantamina fue de 1.19 mg/ml correspondiente al tratamiento de 0.1 mM. Por su parte, la producción para el tratamiento de 0.25 mM fue de 0.47 mg/ml siendo un valor muy cercano al encontrado en el control. Para licorina la tendencia es la misma que la descrita anteriormente, el valor más alto fue de 0.40 mg/ml para la concentración de 0.1 mM. En el caso de la concentración 0.25 mM la producción fue de 0.23 mg/mL siendo un valor muy cercano al control con 0.24 mg/mL.

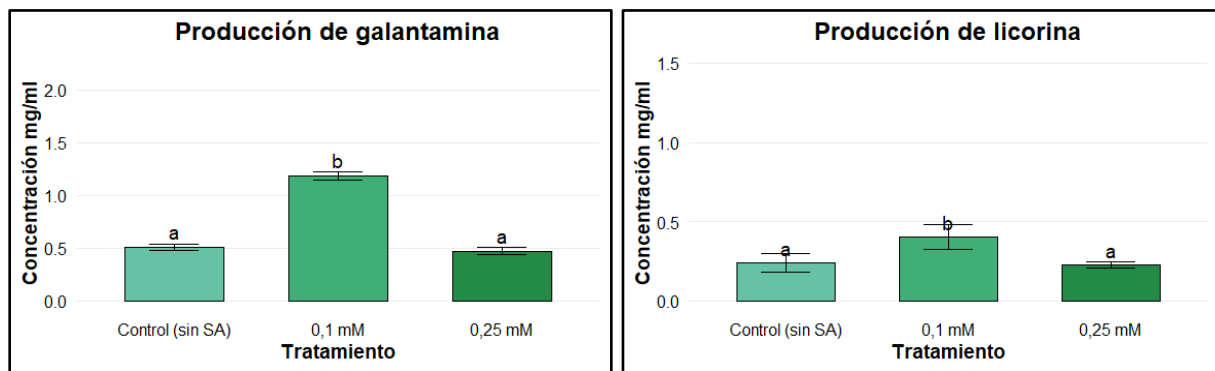


Figura 10: Producción promedio de galantamina y licorina en *Eucharis grandiflora* bajo diferentes tratamientos (0.1 mM y 0.25 mM y su respectivo control sin ácido salicílico). En el panel izquierdo, se muestra la producción de galantamina, y en el panel derecho, la producción de licorina, en cada tratamiento evaluado. Las letras indican el resultado de las pruebas estadísticas, donde letras iguales no representan diferencias estadísticamente significativas.

Ahora bien, si se comparan los tratamientos con el control se tiene que para *Eucharis grandiflora* se incrementa un 57% la producción de galantamina con el tratamiento de 0.1 mM de ácido salicílico con respecto al control. En su lugar, el tratamiento de 0.25 mM presentó un valor menor correspondiente al 8% en la producción de este alcaloide en comparación con el control. Para licorina el incremento es más modesto, pues se encontró que el tratamiento de 0.1 mM incrementa en un 40% la producción. Esto contrasta con el resultado de 0.25 mM donde la concentración de alcaloides está por debajo del control en un 4%.

De los datos anteriormente presentados se puede decir que, para los dos tipos de alcaloides estudiados, el ácido salicílico incrementa significativamente la producción cuando se añade al medio una concentración de 0.1 mM. Por otro lado, en la producción de licorina, ambos

tratamientos reducen el porcentaje de rendimiento del alcaloide siendo más evidente con la concentración de 0.25 mM, esto puede deberse a la producción de otros compuestos en respuesta al estrés generado por el elicitador, disminuyendo la producción de este tipo de alcaloide^{45,46,47}.

También es importante señalar que estos resultados representan información nueva sobre la producción de galantamina y licorina en *Eucharis grandiflora* utilizando ácido salicílico ya que hasta el momento no se habían reportado estudios sobre este tema. Sin embargo, en investigaciones relacionadas con el uso de SA para mejorar la producción de alcaloides se encontró que la concentración de 0.1 mM de ácido salicílico (SA) se identificó como la más efectiva para inducir la producción de alcaloides tropanos en varias especies de *Datura*⁴⁹. El uso de 0.1 mM de SA según la investigación parece estar relacionado con la inducción de la expresión de genes específicos involucrados en la biosíntesis de TAs, como el gen que codifica para la enzima H6H (hidroxilasa de hiosciamina), que es crucial para la producción de escopolamina y hiosciamina⁴⁹. La activación de estas vías metabólicas puede ser mediada por la señalización del SA, ya que actúa como un regulador en la respuesta de las plantas a estreses bióticos y abióticos. Lo anterior permite dilucidar un poco cuál puede ser el mecanismo que está permitiendo la producción de galantamina y licorina en *Eucharis grandiflora*.

En otro estudio se encontró que la suplementación del medio con una concentración de 100 μ M (0.1mM) de SA promovió la acumulación de compuestos alcaloides totales e individuales luego de estar expuestas de 15 a 20 días de tratamiento⁵⁰. Asimismo, en *Stevia rebaudiana*, la suplementación de 100 μ M de SA en el medio de cultivo aumentó la producción de diterpenoides y compuestos fenólicos en 4.1 y 3.4 veces, respectivamente⁴¹. Es importante mencionar que el uso de ácido salicílico en la producción de alcaloides como la galantamina en otras especies ha mostrado efectos negativos. Tal es el caso de *Narcissus confusus* donde las concentraciones evaluadas de SA en general tuvieron un efecto inhibitorio en la producción de alcaloides²⁴. En este sentido, a medida que se aumentó la concentración de SA, se observó una disminución tanto en la acumulación de galantamina (GAL) en los tejidos como en su liberación al medio de cultivo²⁴. Lo anterior coincide con varios estudios donde se menciona que concentraciones más altas de ácido salicílico tienen efectos inhibitorios en la producción de alcaloides⁴¹.

Por último, los resultados encontrados no coinciden con ideas previas que mencionan que existe una relación inversa entre el peso seco y la producción de alcaloides. Ya que como se

observa en la gráfica 9 para *Eucharis grandiflora* el tratamiento de 0.25 mM presenta una cantidad de biomasa (tomada como peso seco en este estudio) menor que el tratamiento de 0.1 mM, sin embargo, es este último la concentración que sí permite el incremento en la producción de los alcaloides de interés. Lo anterior puede deberse a que cada especie incluso perteneciendo a una misma familia tiene su propia fisiología y metabolismo, lo que puede influir en la manera en que produce y acumula alcaloides. Caso opuesto fue la relación del crecimiento de hojas, y su contribución a la producción de alcaloides, pues parece que el poco crecimiento de las hojas potencia la producción de alcaloides. Es importante mencionar que esta última afirmación no puede ser confirmada ya que hasta el momento no hay información disponible para esta especie. Estos resultados junto con los interrogantes que se han planteado en la investigación dan apertura a futuros trabajos sobre el papel del ácido salicílico en el proceso de obtención de alcaloides en plantas. Adicionalmente, también se genera evidencia sobre cómo los resultados de elicitación pueden variar de una especie a otra.

Conclusión

El presente estudio se enfoca en evaluar la producción de alcaloides en la especie *Eucharis grandiflora* perteneciente a la familia Amarilidácea, utilizando un enfoque de cultivo in vitro e inducción mediante elicitores, con el objetivo de incrementar la producción natural de alcaloides útiles para la industria farmacéutica y cosmética.

Para lograr esto, se estableció una metodología que permitiera la propagación eficiente de las plantas estudiadas en sistemas in vitro. En este sentido, la técnica “twin scaling” demostró ser adecuada para esto ya que permitió la obtención de nuevas plantas con una alta tasa de supervivencia y desarrollo.

Adicionalmente, se analizaron las medidas físicas de las plantas para identificar su reacción al tratamiento de ácido salicílico, haciendo énfasis en las dos concentraciones evaluadas. Se observaron diferencias importantes en la respuesta de las plantas al cultivo: La concentración de 0.1 mM no generó un efecto inhibitorio en el crecimiento de hojas y raíces, lo que sí ocurrió con el tratamiento de 0.25 mM que presentó una disminución en los valores para estas variables. Las tendencias de biomasa presentaron un patrón similar donde el control y la concentración de 0.1 mM fueron estadísticamente iguales, en comparación con la concentración de 0.25 mM que tuvo un valor de biomasa menor.

El aspecto de más relevancia del estudio guarda relación con la producción de los alcaloides de interés. Mediante espectrofotometría UV se encontró que el tratamiento de 0.1 mM de ácido salicílico favorece la producción de alcaloides en *Eucharis grandiflora*, a través de un incremento del 57% de galantamina y 40% de licorina en comparación con el control. Por otro lado, se confirmó lo reportado en la literatura con respecto a que elevadas concentraciones de ácido salicílico afectan la producción de alcaloides, como se evidenció con el tratamiento de 0.25 mM. Esto demuestra que la mejora en la producción de estos compuestos utilizando SA depende de factores clave como las concentraciones que se apliquen en el medio.

Estos resultados dan apertura a nuevos interrogantes relacionados con el efecto del ácido salicílico en las plantas amarilidáceas. En este caso, *Eucharis grandiflora* mostró resultados opuestos para las dos concentraciones evaluadas, sin embargo, aún queda mucho por aprender de cómo ocurre el proceso de biosíntesis en esta especie. Así mismo, si se utilizan concentraciones más pequeñas de SA a las evaluadas es posible o no incrementar la producción de alcaloides.

Finalmente, esta investigación contribuye a comprender mejor la producción y obtención de metabolitos secundarios en plantas de la familia amarilidácea, principalmente en el estudio de alcaloides. Esto ya que al incrementar la producción de alcaloides como la licorina y la galantamina permite que otros grupos de investigación tengan una base sólida para el uso de estos compuestos en el tratamiento de diversas enfermedades.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Paola Caicedo Burbano por ser mi tutora durante el desarrollo del proyecto, por su disposición a escucharme y guiarme en lo que hiciera falta. También, le agradezco a María Eugenia Buitrago por su co dirección, paciencia, apoyo constante en cada paso de la investigación y su aporte significativo en el laboratorio. Su conocimiento y experiencia han sido fundamentales para el éxito de esta investigación.

Le agradezco asimismo a Luigy Miranda por ser un soporte clave durante el tiempo de la investigación y siempre estar dispuesto a responder mis dudas. A mi mamá por confiar en mí y motivarme cuando más lo necesitaba y a mi hermano por ser mi ejemplo a seguir de vida. También quiero agradecer al auxiliar de laboratorio Jhonny Andrés Bolaños por su disposición

y amabilidad para guiarme en el manejo del espectrofotómetro, sin duda alguna me brindó la claridad que necesitaba para terminar el proyecto.

Por último, agradezco a la Universidad ICESI por hacer posible este proyecto mediante su financiación y el préstamo de sus instalaciones y equipos.

Referencias bibliográficas

1. Masi, M. et al. Alkaloids isolated from indigenous South African Amaryllidaceae: *Crinum buphanoides* (Welw. ex Baker), *Crinum graminicola* (I. Verd.), *Cyrtanthus mackenii* (Hook. f) and *Brunsvigia grandiflora* (Lindl). *South African Journal of Botany* 118, 188–191 (2018).
2. Nair, J. J. & van Staden, J. Anti-inflammatory effects of the plant family Amaryllidaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 327, 117943 (2024).
3. Tallini, L. R., Giordani, R. B., de Andrade, J. P., Bastida, J. & Zuanazzi, J. A. S. Structural Diversity and Biological Potential of Alkaloids from the Genus *Hippeastrum*, Amaryllidaceae: an Update. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 31, 648–657 (2021).
4. Zhang, P. et al. Lycorine inhibits melanoma cell migration and metastasis mainly through reducing intracellular levels of β -catenin and matrix metalloproteinase 9. *Journal of cellular physiology* 234, 10566–10575 (2019).
5. Masi, M. et al. Alkaloids isolated from *Haemanthus humilis* Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity of coccinine and montanine. *South African Journal of Botany* 126, 277–281 (2019).
6. He, M., Qu, C., Gao, O., Hu, X. & Hong, X. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* 5, 16562–16574 (2015).
7. Leon, F. & Evidente, A. Advances on the Amaryllidacea Alkaloids Collected in South Africa, Andean South America and the Mediterranean Basin. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 4055 28, 4055 (2023).
8. Nair, J. J. & van Staden, J. Insight to the antifungal properties of Amaryllidaceae constituents. *Phytomedicine* 73, 152753 (2020).
9. Nair, J. J. & van Staden, J. Antiplasmodial constituents in the minor alkaloid groups of the Amaryllidaceae. *South African Journal of Botany* 126, 362–370 (2019).
10. Masi, M. et al. Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *Nerine sarniensis*, an indigenous South African Amaryllidaceae, with larvicidal and adulticidal activities against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 116, 34–38 (2017).

11. Pang, Z. et al. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science* 12, 621276 (2021).
12. Martínez, J. F. Optimización de la producción de alcaloides en plantas de *Zephyranthes carinata* cultivadas in vitro en Sistemas de Inmersión Temporal. (Universidad Icesi, 2021).
13. Chen, H. et al. Antiviral activity of lycorine against Zika virus in vivo and in vitro. *Virology* 546, 88–97 (2020).
14. Guerrero-Valencia, F. A. et al. Micropropagación del lirio amazónico (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) mediante organogénesis directa. *Polibotánica* 0, 141–153 (2021).
15. Cabezas Fabio, Argoti Juan, Martinez Santiago M, Bastida, J. & Viladomat, F. Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subdentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de amaryllidaceae. *Scientia Et Technica* XIII, 237–241 (2007).
16. Georgiev, V., Ivanov, I. & Pavlov, A. Recent Progress in Amaryllidaceae Biotechnology. *Molecules* 25, (2020).
17. Katoch, D., Kumar, D., Padwad, Y. S., Singh, B. & Sharma, U. Pseudolycorine N-oxide, a new N-oxide from *Narcissus tazetta*. *Natural Product Research* 34, 2051–2058 (2020).
18. Ptak, A. et al. Elicitation of galanthamine and lycorine biosynthesis by *Leucojum aestivum* L. and *L. aestivum* ‘Gravety Giant’ plants cultured in bioreactor RITA®. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 128, 335–345 (2017).
19. Chandran, H., Meena, M., Barupal, T. & Sharma, K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports* 26, e00450 (2020).
20. Marchev, A. S., Yordanova, Z. P. & Georgiev, M. I. Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 40, 443–458 (2020).
21. Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A. & García-Lara, S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* 248, 1 (2018).
22. Murthy, H. N., Lee, E. J. & Paek, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 118, 1–16 (2014).

23. Al, A., Cahlíková, L. & Al Mamun, A. Amaryllidaceae alkaloids of genus *Narcissus* and their biological activity. (2023).
24. Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. Improved production of galanthamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Planta Medica* 70, 1180–1188 (2004).
25. Teoh, E. S. Secondary Metabolites of Plants. *Medicinal Orchids of Asia* 59 (2016) doi:10.1007/978-3-319-24274-3_5.
26. Kessler, A. & Kalske, A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49, 115–138 (2018).
27. Ullah, C., Chen, Y. H., Ortega, M. A. & Tsai, C. J. The diversity of salicylic acid biosynthesis and defense signaling in plants: Knowledge gaps and future opportunities. *Current Opinion in Plant Biology* 72, 102349 (2023).
28. Mishra, S. et al. Salicylic acid (SA)-mediated plant immunity against biotic stresses: An insight on molecular components and signaling mechanism. *Plant Stress* 11, 100427 (2024).
29. Kaur, H. et al. Harnessing plant biotechnology-based strategies for in vitro galanthamine (GAL) biosynthesis: a potent drug against Alzheimer's disease. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2022 149:1 149, 81–103 (2022).
30. Selwal, N. et al. Enhancing secondary metabolite production in plants: Exploring traditional and modern strategies. *Journal of Agriculture and Food Research* 14, 100702 (2023).
31. Nair, J. J., Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F. & van Staden, J. Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: a Review.
32. Yue, W. et al. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 36, 215–232 (2016).
33. Dempsey, D. A. & Klessig, D. F. Salicylic Acid. *Encyclopedia of Hormones* 321–329 (2003) doi:10.1016/B0-12-341103-3/00266-7.
34. Leon, F. & Evidente, A. Advances on the Amaryllidacea Alkaloids Collected in South Africa, Andean South America and the Mediterranean Basin. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 4055 28, 4055 (2023).
35. de Carlo, A. et al. Temporary Immersion System for Production of Biomass and Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 2414 11, 2414 (2021).

36. Mirzabe, A. H., Hajiahmad, A., Fadavi, A. & Rafiee, S. Temporary immersion systems (TISs): A comprehensive review. *Journal of Biotechnology* 357, 56–83 (2022).
37. Martín-Mex, R., Nexticapan-Garcez, A. & Larqué-Saavedra, A. Potential Benefits of Salicylic Acid in Food Production. *SALICYLIC ACID* 299–313 (2013) doi:10.1007/978-94-007-6428-6_13.
38. Schumann, A. *et al.* Elicitation of galanthamine production by *Leucojum aestivum* shoots grown in temporary immersion system. *Biotechnology progress* **29**, 311–318 (2013).
39. Bokov, D. O. STANDARDIZATION OF SNOWDROP (*GALANTHUS L.*) HERBAL PHARMACEUTICAL SUBSTANCES BY UV-SPECTROPHOTOMETRY. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 11, 207–211 (2018).
40. Numan Taspinar, Y. & Bulduk, İ. Alternative Analytical Methods for Quantification of Galantamine in Pharmaceuticals. *Aegean Journal of Medical Sciences* 5, 58–64 (2022).
41. Ali, B. Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **31**, 101884 (2021).
42. Nandy, S., Das, T. & Dey, A. Role of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling in Secondary Metabolite Production. 87–113 (2021) doi:10.1007/978-3-030-75805-9_5.
43. Hadizadeh, M., Ofoghi, H., Kianirad, M. & Amidi, Z. Elicitation of pharmaceutical alkaloids biosynthesis by salicylic acid in marine microalgae *Arthrospira platensis*. *Algal Research* **42**, 101597 (2019).
44. Desgagné-Penix, I. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Reviews* **20**, 409–431 (2021).
45. Isah, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research* 2019 52:1 52, 1–25 (2019).
46. Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K. & Puri, S. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *J Appl Res Med Aromat Plants* 12, 1–12 (2019).
47. Kang, S. M. *et al.* Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science* 166, 745–751 (2004).
48. Woch, N., Laha, S. & Gudipalli, P. Salicylic acid and jasmonic acid induced enhanced production of total phenolics, flavonoids, and antioxidant metabolism in callus cultures of *Givotia moluccana* (L.) Sreem. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 59, 227–248 (2023).

49. Wen, Y. *et al.* Metabolic Effects of Elicitors on the Biosynthesis of Tropane Alkaloids in Medicinal Plants. *Plants* **12**, 3050 (2023).
50. Duan, Y., Zhang, H., Meng, X. *et al.* Accumulation of salicylic acid-elicited alkaloid compounds in in vitro cultured *Pinellia ternata* microtubers and expression profiling of genes associated with benzoic acid-derived alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **139**, 317–325 (2019).
51. Alisandre Valverde, D. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL METIL JASMONATO Y EL ÁCIDO JASMÓNICO EN LA LIBERACIÓN DE ALCALOIDES PRODUCIDOS in vitro EN *Zephyranthes carinata*. (UNIVERSIDAD ICESI, SANTIAGO DE CALI, 2017).