

Optimización de las condiciones *in vitro* para la producción de alcaloides a partir de plántulas de *Zephyrantes carinata* (*Amaryllidaceae*)

Daniel Andrés Chamorro Mondragón

Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Química Farmacéutica
Santiago de Cali
2016

Optimización de las condiciones *in vitro* para la producción de alcaloides a partir
de plántulas de *Zephyrantes carinata* (*Amaryllidaceae*)

Daniel Andrés Chamorro Mondragón

Proyecto de Grado

Dirección: Zaida Lentini Gil PhD.
Decana de la Facultad de Ciencias Naturales

Co- Dirección: Guillermo León Montoya Peláez PhD.
Jefe Del Departamento de Ciencias Farmacéuticas;

Geraldine Restrepo, Bióloga
Joven Investigadora Laboratorio de Biotecnología Vegetal

Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Química Farmacéutica
Santiago de Cali
2016

Tabla de Contenido

Agradecimientos	9
1 RESUMEN	10
2 INTRODUCCIÓN	12
3 DESCRIPCIÓN	14
3.1 Planteamiento del problema.....	14
3.2 MARCO TEÓRICO.....	16
4 OBJETIVOS	20
4.1.1 Objetivo general.....	20
4.1.2 Objetivos específicos	20
5 METODOLOGIA.....	21
5.1.1 Colecta de Material Vegetal y Lugar de Estudio	21
5.2 Cultivo <i>in vitro</i> para la inducción de bulbillos y producción de alcaloides	21
5.2.1 Protocolo de esterilización superficial de los bulbos cultivados en el invernadero	21
5.2.2 Metodología Twin-Scale	22
5.2.3 Inducción de bulbillos mediante la técnica de Twin-Scale a partir de bulbos provenientes del invernadero	22
5.2.4 Inducción de bulbillos mediante la técnica de Twin-Scale a partir de bulbos subcultivados <i>in vitro</i>	23
5.2.5 Medios de Cultivo	23
5.3 Evaluación de características morfológicas para determinar el efecto de la concentración de sacarosa en el medio; el efecto de la fuente del material de partida para el cultivo <i>in vitro</i> ; y el efecto de la edad de los bulbillos propagados <i>in vitro</i>	26
Los diferentes tratamientos fueron evaluados por: 1) el número de bulbillos producidos por cada par de escamas cultivadas <i>in vitro</i> ; 2) el número y longitud de los bulbillos formados; 3) el número y longitud de las hojas por bulbillo producido <i>in vitro</i>	26
5.4 Determinación del peso seco del material producido en los diferentes tratamientos	27
5.5 Extracción de alcaloides.....	28
5.5.1 Método de extracción de alcaloides.....	28
5.5.2 Cuantificación de alcaloides por TLC.....	28
6 RESULTADOS	30

6.1	Evaluación del efecto de la fuente del material de partida (bulbos de invernadero o provenientes del subcultivos <i>in vitro</i>) y la edad del cultivo sobre las características morfológicas del material	30
6.1.1	Inducción de bulbillos a partir de bulbos provenientes directamente del invernadero o subcultivados <i>in vitro</i> en medio de inducción MS-A1	30
6.1.2	Formación de hojas en los bulbillos inducidos a partir de bulbos provenientes directamente del invernadero o subcultivados <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS.....	31
6.1.3	Longitud de los bulbillos según el origen del material vegetal	32
6.1.4	Longitud de las hojas según origen del material vegetal	33
6.2	Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo <i>in vitro</i> sobre las características morfológicas del material inducido.....	34
6.2.1	Formación de hojas en los bulbillos inducidos a diferentes concentraciones de sacarosa.....	34
6.2.2	Longitud del bulbillito inducidos a diferentes concentraciones de sacarosa	35
6.2.3	Longitud de las hojas de los bulbillos inducidos a diferentes concentraciones de sacarosa.....	36
6.3	Evaluación del peso del material vegetal fresco, seco y porcentaje de humedad	37
6.3.1	Peso de bulbillos invernadero vs <i>in vitro</i>	37
6.3.2	Peso de hojas invernadero vs <i>in vitro</i>	38
6.3.3	Porcentaje de humedad de hojas y bulbillos invernadero vs <i>in vitro</i>	39
6.3.4	Peso de bulbillos y hojas con diferente concentración de sacarosa	41
6.3.5	Porcentaje de humedad de hojas y bulbillos en diferentes concentraciones de sacarosa.....	42
6.4	Resultados de estandarización por cromatografía TLC.....	44
	47
7	Discusión.....	49
7.1	Producción de material vegetal (invernadero vs <i>in vitro</i>).....	49
7.2	Control de la contaminación	49
7.3	Evaluación de parámetros morfológicos.....	50
7.4	Concentración de sacarosa y efecto osmótico	51
7.5	Evaluación de peso seco en material vegetal	53
7.6	Estandarización de metodología analítica cromatografía capa fina (TLC)	53
8	CONCLUSIONES.....	55

9 RECOMENDACIONES 56

10 REFERENCIAS 58

Tabla de Figuras

Figura 1. Estructura de alcaloides presentes en <i>Amaryllidaceae</i>	17
Figura 2. Procedimiento de propagación para material proveniente de invernadero....	22
Figura 3. Procedimiento de propagación para material subcultivado	23
Figura 4. Esquema experimental de tratamientos respectivos al parámetro de concentración de sacarosa en el medio de cultivo	25
Figura 5. Esquema experimental de tratamientos respectivos al parámetro de tiempo de inducción del bulbillo en origen subcultivado e invernadero	27
Figura 6. Producción de bulbillos por escamas <i>in vitro</i> después de 40 días de inducción	30
Figura 7. Formación de bulbillos por cada par de escamas después de 40 días de inducción	31
Figura 8. Número de hojas por bulbillo en relación con la edad de inducción	32
Figura 9. Longitud de los bulbillos en relación al origen del material y la edad cultivo ..	33
Figura 10. Longitud de las hojas en relación al origen del material y la edad cultivo	34
Figura 11. Número de hojas por bulbillos formados a diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo después de 2 meses de inducción	35
Figura 12. Longitud de los bulbillos formados a las diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo después de 2 meses de inducción	36
Figura 13. Longitud de las hojas por bulbillos formados a las diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo después de 2 meses de inducción	37
Figura 14 . Comparación de peso fresco y seco de bulbillos de origen invernadero.....	38
Figura 15. Comparación de peso fresco y seco de bulbillos de origen <i>in vitro</i>	38
Figura 16 Comparación de peso fresco y seco de hojas de origen invernadero	39
Figura 17. Comparación de peso fresco y seco de hojas de origen <i>in vitro</i>	39
Figura 18. Porcentaje de humedad de bulbillos de origen invernadero e <i>in vitro</i>	40
Figura 19. Porcentaje de humedad de hojas de origen invernadero e <i>in vitro</i>	41
Figura 20. Comparación de pesos fresco y seco de bulbillos en diferentes concentraciones de sacarosa después de 2 meses de inducción	41
Figura 21. Comparación de pesos fresco y seco de hojas en diferentes concentraciones de sacarosa después de 2 meses de inducción	42
Figura 22. Porcentaje de humedad relativa de bulbillos en diferentes concentraciones de sacarosa después de 2 días de inducción.....	43
Figura 23 Porcentaje de humedad relativa de hojas en diferentes concentraciones de sacarosa después de 2 meses de inducción	44
Figura 24 .Curva de calibración de boldina revelada con reactivo de Dragendorff.....	45
Figura 25. Relación de área bajo la curva y cantidad de boldina presente en la placa cromatografía	45
Figura 26. Placas de TLC reveladas con reactivo de Dragendorff con volumen de muestra de 1, 5 y 10 μ L respectivamente.....	46
Figura 27. Placa revelada con reactivo de Dragendorff utilizando un volumen de muestra de 10 μ L.....	47

Figura 28. Placa de boldina revelada con 10 μ L de muestra inyectada (Izq.) .Placa revelada de muestra proveniente de la especie Hymenocallis (Der)..... 48

Tabla de Cuadros

Cuadro 1. Componentes de los medios de cultivo MS y MS-A1.....	24
---	----

Agradecimientos

Especial agradecimiento a la Universidad Icesi, a la oficina de apoyo a la investigación Icesi, al grupo de investigación en biotecnología vegetal y su semillero de investigación de la Facultad de Ciencias Naturales, por el apoyo y espacio otorgado.

A la doctora Zaida J. Lentini 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 biotecnología vegetal

Al doctor Guillermo León Montoya Ph.D. Por la asesoría y conocimiento brindado durante el tiempo como estudiante de proyecto de grado.

A la Bióloga y joven investigadora Geraldine Restrepo Espinoza por guiarme y asesorarme en la parte práctica del proyecto de grado junto a mis compañeros del semillero de investigación de biotecnología vegetal.

A mi madre, mi padre y mi hermana por ese apoyo incondicional durante todo este tiempo de trabajo.

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

A Dios por brindarme la fortaleza necesaria para culminar mi etapa estudiantil con humildad y sabiduría.

1 RESUMEN

La familia *Amaryllidaceae*, ha sido muy estudiada en los últimos años, debido a que muchas de sus especies presentan moléculas con potencial uso farmacológico llamadas alcaloides. Estas moléculas se derivan del metabolismo secundario de las plantas, y algunas de ellas han reportado usos medicinales como agentes antimalárico, analgésicos y terapéuticos frente a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. En Colombia, muchas especies se encuentran en peligro de extinción, lo cual ha sido una limitante frente al estudio selectivo de algunos individuos, como por ejemplo: *Crinum kunthianum*, *Eucharis amazónica*, *E. grandiflora*. Sin embargo, la especie *Zephyranthes carinata*, es una especie de fácil acceso, debido a que se puede encontrar en puntos comerciales y zonas rurales del territorio vallecaucano, además, al no ser una especie amenazada puede utilizarse como un modelo experimental adecuado.

En la especie *Zephyranthes carinata*, no se han realizado muchos estudios sobre la producción de alcaloides, lo cual permite desarrollar una amplia línea de investigación para su producción mediante procesos biotecnológicos, entre ellos, el tratamiento de propagación por organogénesis *Twin Scale*. Esta metodología, permite generar gran cantidad de individuos a partir de un bulbo principal, permitiendo una multiplicación del material vegetal. Por otro lado, (Tahchy, y otros, 2011) reportan el uso de sacarosa en los medios de cultivo como un inductor que interviene en el metabolismo primario en las plantas, y que puede generar mayor cantidad de alcaloides en las mismas.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del origen de material de partida (invernadero Vs subcultivo *in vitro*), la edad del cultivo *in vitro* (2, 3 y 4 meses) y la concentración de sacarosa del medio (0, 3, 6, 9,12 y 15%) sobre el desarrollo del material vegetal y potencial producción de alcaloides. El material subcultivado *in vitro* mostró una mayor respuesta (76,7%) y producción de bulbillos por escamas (hasta un total de 4 o 5 bulbillos por par de escamas) respecto al material del invernadero (con 70,7% de repuesta y un promedio 1.48 bulbillos por par de escamas). Además del origen del material de partida, se encontró que la edad del cultivo *in vitro* tiene un efecto significativo tanto en la inducción y desarrollo de los bulbillos y las hojas. En general, la mayor respuesta se obtuvo a los 4 meses después del cultivo. En relación a las hojas, no se encontraron mayores diferencias entre el material proveniente del invernadero respecto al del subcultivo *in vitro*, con excepción a la longitud de las hojas que tiende a ser mayor en el material subcultivado (promedio 7,25 cm) respecto a las inducidas *in vitro* a partir del material del invernadero (promedio 5,98 cm), y al peso seco, donde las hojas obtenidas *in vitro* a partir de los bulbos provenientes del invernadero presentan un mayor peso seco (promedio 4,2 mg/ hoja) respecto a las obtenidas a partir de los bulbillos subcultivados *in vitro* (promedio 3,3 mg/ hoja). La mayor diferencia significativa se observó en el desarrollo de los bulbillos. Los bulbillos inducidos a partir del material proveniente del invernadero presentaron el mayor peso seco (3.9 veces) a los 4 meses

de inducción (promedio 34,7 mg de peso seco/ bulbillito) respecto a los obtenidos a partir del material de subcultivo *in vitro* (promedio 8,8 mg de peso seco/ bulbillito). Estas diferencias se incrementaron aún más cuando el porcentaje de sacarosa del medio se incrementó del 3% al 15% (promedio 45,8 mg de peso seco/ bulbillito).

Con respecto a la semi cuantificación de alcaloides en *Zephyranthes carinata*, no se lograron detectar por medio de la técnica cromatográfica de capa fina (TLC). Se concluye que es necesario utilizar una metodología analítica mucho más sensible tal como lo es la cromatografía líquida de gases acoplado a espectrofotometría de masas (GC/MS), puesto a que la cromatografía de capa fina (TLC) necesita grandes cantidades de material vegetal seco para que el reactivo de Dragendorff pueda revelar la presencia de alcaloides en una muestra de manera adecuada. El material producido en este estudio fue secado, procesado y almacenado acorde para ser evaluado por su contenido de alcaloides en una futura investigación.

Palabras clave: *Amaryllidaceae*, *Zephyranthes carinata*, cultivo *in vitro*, *Twin Scale*, alcaloides, extracción, TLC

2 INTRODUCCIÓN

El género *Zephyranthes* pertenece a la familia *Amaryllidaceae* y es nativa de América. Las plantas de esta familia son bien conocidas por su valor ornamental y propiedades medicinales. Los compuestos activos de este género especialmente alcaloides, son responsables de las diversas actividades farmacológicas (Katoch *et al.*, 2012) y hacen parte de los metabolitos secundarios, los cuales a su vez no representan una función definida en los procesos metabólicos de las plantas. No todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, también su producción se restringe a un determinado genero de plantas, familia o incluso especie (Avalos & Perez-Urria, 2009). La mayoría de estos alcaloides de *Amaryllidaceae*, se pueden clasificar en ocho subgrupos principales, los cuales son esqueléticamente homogéneos, aunque hay algunos que tienen estructuras que divergen de estos marcos moleculares principales. Los alcaloides más representativos de estos ocho subgrupos incluyen a: licorina, licorerina, narciclasina, galantamina, crinina, pretazetina, latizodina y montanina (Martin, 1987). En reportes previos, se ha demostrado que en algunas especies de la familia, se resaltan características de gran valor farmacológico presente en sus metabolitos secundarios, los cuales han demostrado efectividad frente al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004)

Actualmente, las *Amaryllidaceae* se encuentran distribuidas mayormente en la zona andina del país. Algunas de sus especies han sido reportadas en peligro de extinción, entre ellas encontramos a *Crinum kunthianum*, *Eucharis amazónica*, *E. grandiflora*, *Caliphuria subedentata*, entre otras (Cabezas & Codina, 2012). *Zephyranthes carinata* es la especie central del trabajo experimental propuesto, debido a que es una especie encontrada en el departamento del Valle del Cauca y de la cual no se tienen muchos reportes de estudios referentes a que se encuentre en peligro de extinción, por lo que resulta ser una especie modelo. Además, esta especie presenta alto interés farmacológico por sus metabolitos secundarios del tipo alcaloides. Sin embargo, si estos alcaloides van a ser utilizados como ingredientes activos para la formulación de medicamentos, es necesario optimizar su producción debido a que éstos se encuentran a muy bajas concentraciones (menor al 0,01%) en la plantas. Este es el caso de la licorina presente en bulbos de *Galanthus elwesii* y *Leucojum aestivum* (Niño *et al.*, 2005). En un estudio previo realizado en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Icesi, Peralta (2014) utilizó individuos de la familia *Zephyranthes*, que fueron tratados con inductores químicos como el metil jasmonato y el ácido araquidónico para evaluar la producción de alcaloides, al final, logró identificar los alcaloides Haemantamina y Vittatina que se encontraron en mayor cantidad en las hojas de los individuos, además logro concluir que la producción de alcaloides en el

tejido vegetal (hojas y bulbillos) era mayor a la producción obtenida en el medio de cultivo.

En este proyecto se tuvo como objetivo principal la evaluación de la producción de alcaloides en la especie *Zephyranthes carinata*, para ello, el presente trabajo fue realizado mediante el uso del cultivo y propagación *in vitro* de bulbillos, órganos reproductivos de propagación clonal de estas especies. Durante la micropropagación, se pueden modificar las condiciones tanto químicas como físicas del medio de cultivo, las cuales han demostrado tener una influencia importante en la producción de los alcaloides (Arias et al., 2009). Teniendo en cuenta lo anterior, se recolectó material vegetal del invernadero, y se le realizó un tratamiento de inducción de bulbillos mediante la técnica *Twin-Scale* (Fennell & Van Staden, 2004), de igual manera se seleccionó material ya inducido *in vitro* y fue subcultivado. Ambos materiales fueron inducidos en el medio de cultivo para la formación de bulbillos. A partir de ese material generado, se trabajaron tratamientos referentes a la edad de los bulbillos (2,3,4 meses) teniendo en cuenta el origen del material vegetal (invernadero, *in vitro*), también se evaluó la incidencia del porcentaje de sacarosa (3,6,8,12,15%) (p/v) en el medio de cultivo, puesto que anteriormente (Selles, Bergeño, Viladomat, Bastida, & Codina, 1997) demostraron que la sacarosa al 9% de concentración en el medio, generaba mayor respuesta en la biosíntesis del alcaloide galantamina en la especie *Narcissus confusus*. Los tres tratamientos hicieron parte de la estandarización de la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata*. Posteriormente, se realizó la cuantificación de alcaloides mediante la técnica cromatográfica TLC o cromatografía plana. La cromatografía plana es un tipo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria está extendida sobre la superficie de un plano y la fase móvil fluye a través de ella. La fase móvil siempre será un líquido mientras que la estacionaria puede ser un líquido soportado en un sólido o un sólido sorbente. El flujo de la fase móvil se produce por capilaridad y gravedad (Valcarcel Cases & Gómez Hens, 1988). Los analitos finales, fueron revelados por una solución reveladora para alcaloides llamada reactivo de Dragendorff (Arango Acosta, 2008). La finalidad de este trabajo radica en encontrar parámetros controlables para la producción de alcaloides en la especie *Zephyranthes carinata* por medio de un tratamiento *in vitro*.

3 DESCRIPCIÓN

3.1 Planteamiento del problema

Colombia es un país que presenta gran biodiversidad vegetal, sin embargo, aún hay mucho desconocimiento de la composición de las especies, incluyendo su identificación, ubicación, ecología y usos potenciales. Este conocimiento es fundamental para poder implementar proyectos adecuados para la bioconservación y aprovechamiento sustentable de las especies endémicas, entre las que se encuentran las pertenecientes a la familia *Amaryllidaceae*. Las *Amaryllidaceae* se encuentran distribuidas mayormente en la zona andina del país. Algunas de sus especies han sido reportadas en peligro de extinción, entre ellas encontramos a *Crinum kunthianum*, *Eucharis amazónica*, *E. grandiflora*, *Caliphuria subedentata* y *Phaedranassa dubia* (Cabezas & Codina, 2012). Por otro lado, la zona del Valle del Cauca presenta un bosque seco tropical, en el que se pueden encontrar especies como *E. bonplandii*, y *E. caucana*. En la cordillera occidental y central con bosque nublado, encontramos las especies *Caliphuria subedentata* y *Zephyranthes carinata* (Silverstone-Sopkin, 2011). *Zephyranthes carinata* es la especie central del trabajo experimental propuesto, debido a que es una especie encontrada en el departamento del Valle del Cauca y de la cual no se tienen muchos reportes de estudio. Además, esta especie presenta alto interés farmacológico por sus metabolitos secundarios del tipo alcaloides. Entre los alcaloides reportados para la familia *Amaryllidaceae* se encuentran la licorina, crinina, haemantamina, tazetina y galantamina, entre otros. La efectividad de la galantamina ha sido demostrada en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como es el Alzheimer (Konrath *et al.*, 2013). La galantamina inhibe la acetilcolinesterasa por inhibición competitiva, aumentando los niveles de acetilcolina y estimulando los receptores nicotínicos presinápticos, permitiendo que el impulso nervioso se transmita de forma más eficaz y continua (Acosta *et al.*, 2006). Sin embargo, si estos alcaloides van a ser utilizados como ingredientes activos para la formulación de medicamentos, es necesario optimizar su producción debido a que éstos se encuentran a muy bajas concentraciones (menor al 0,01%) en la plantas. Este es el caso de la licorina presente en bulbos de *Galanthus elwesii* y *Leucojum aestivum* (Niño *et al.*, 2005). Por lo tanto, es necesario desarrollar y optimizar técnicas que incrementen su producción y garanticen un suministro adecuado para posibles aplicaciones en salud.

Los alcaloides son metabolitos secundarios, cuya producción es altamente afectada por la fisiología de la planta, y ésta a su vez, es muy afectada por las condiciones medio ambientales. Una alternativa es producir estos alcaloides haciendo uso de herramientas biotecnológicas. Una de estas aplicaciones biotecnológicas es la multiplicación masiva *in vitro* de los tejidos productores de los alcaloides, de esta manera se podría tener control de los factores que afectan su producción y escalarla a nivel industrial. El presente trabajo propone el uso del cultivo y propagación *in vitro* de bulbillos, órganos

reproductivos de propagación clonal de estas especies. Durante la micropropagación, se pueden modificar las condiciones tanto químicas como físicas del medio de cultivo, las cuales han demostrado tener una influencia importante en la producción de los alcaloides (Arias et al.,2009). La ventaja de utilizar un medio sólido es que asegura el crecimiento de material vegetal en la superficie del medio, proveyendo suficiente aireación a los explantes, estos pueden ser evaluados y manipulados fácilmente, adicionalmente los bulbos y las raíces pueden crecer de manera ordenada bajo condiciones controladas. (Muñoz David, 2006). Por lo tanto es necesario modificar las condiciones de crecimiento *in vitro*. Teniendo en cuenta lo anterior, se necesita una serie de estrategias para lograr incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro*. Uno de los factores de alta prioridad a revisar es la composición del medio de cultivo *in vitro*, el cual provee de los elementos esenciales para el crecimiento, desarrollo y propagación de las plantas (Charry, Adema, & Abedini, 2015). El medio de cultivo contiene macroelementos, microelementos, vitaminas, fitohormonas y fuente de carbono que garantizan el metabolismo adecuado de las células (Raval et al., 2003). La fuente de carbono, además de afectar al crecimiento de las plantas *in vitro* debido a que bajo estas condiciones las plantas no realizan un proceso fotosintético, la fuente de carbono afecta la producción de metabolitos secundarios en la planta dependiendo del tipo de carbohidrato y la concentración en el medio de cultivo (Akalezi et al.,1999).

A la fecha, se conoce muy poco de los factores que pueden afectar la producción de alcaloides en plantas propagadas *in vitro*, y en especial, en plantas pertenecientes a la familia *Amarilidáceas*. Es necesario optimizar y estandarizar las condiciones y las metodologías para producir cantidades de alcaloides suficientes y funcionales que permitan su uso a gran escala. En este proyecto se propone evaluar varios factores esenciales para incrementar la producción de alcaloides, utilizando a la especie *Zephyranthes carinata* como modelo. (Arias-Zabala et al., 2009)

3.2 MARCO TEÓRICO

El género *Zephyranthes* pertenece a la familia *Amaryllidaceae* y es nativa de América. Las plantas de esta familia son bien conocidas por su valor ornamental y propiedades medicinales. Tradicionalmente, las especies de este género, tales como *Z. candida* y *Z. flava* han sido reportadas en para el tratamiento de tumores, cáncer de mama, diabetes mellitus y otra variedad de propósitos terapéuticos. Los compuestos activos de este género especialmente alcaloides, son responsables de las diversas actividades farmacológicas (Katoch *et al.*, 2012).

Los metabolitos secundarios no representan una función definida en los procesos metabólicos de las plantas, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, también su producción se restringe a un determinado género de plantas, familia o incluso especies. Los alcaloides son una gran familia de más de 15000 metabolitos secundarios, tienen características de solubilidad en solventes acuosos, tienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas, la mayoría de ellas son consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis bajas, presentan unos altos valores terapéuticos como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos, analgésicos, etc. (Avalos & Perez-Urria, 2009).

Los alcaloides de las *amaryllidaceae* constituyen un grupo importante de origen natural que posee una alta diversidad funcional y estructural. De hecho, más de 100 alcaloides han sido aislados de esta familia. La mayoría de estos alcaloides se pueden clasificar en ocho subgrupos principales, los cuales son esqueléticamente homogéneos, aunque hay algunos que tienen estructuras derivadas que divergen de estos marcos moleculares principales. Los alcaloides más representativos de estos ocho subgrupos incluyen a: licorina (1), licorerina (2), narciclasina (3), galantamina (4) , crinina (5) , pretazetina (6) , latizodina (7) y montanina (8) (Martín , 1987). En reportes previos, se ha demostrado que en algunas especies de la familia, se resaltan características de gran valor farmacológico presente en sus metabolitos secundarios, los cuales han demostrado efectividad frente al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004). En la **Figura 1** Se pueden observar los alcaloides más representativos de la familia *Amaryllidaceae*. En el género *Zephyranthes*, los alcaloides reportados, han demostrado importante actividad farmacológica en el tratamiento contra enfermedades neurodegenerativas, también han demostrado actividad antivírica, antimalarica, anticonvulsivante, antidepresivo, y un efecto antiprotozoario (Ivanov, *et all*, 2012).

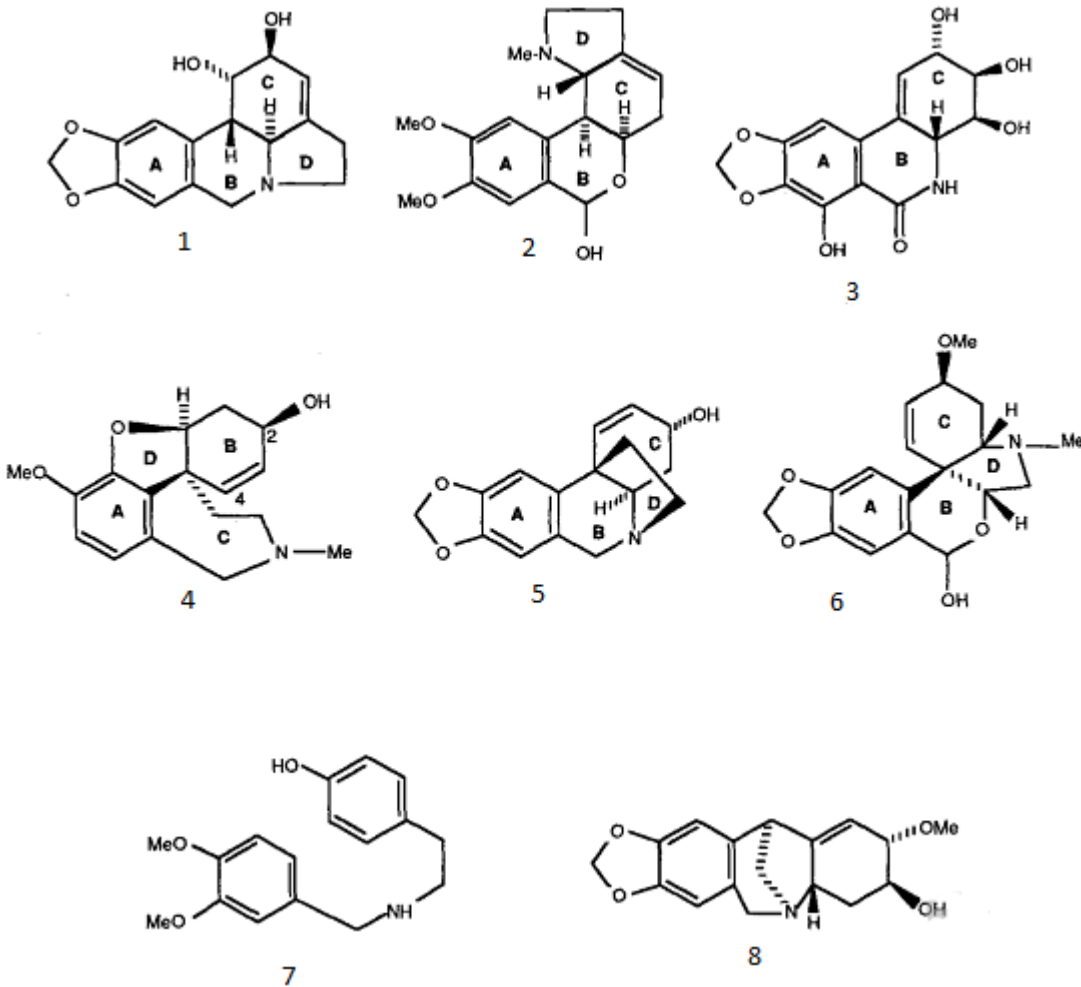


Figura 1. Estructura de alcaloides presentes en *Amaryllidaceae*

El proyecto utilizara la micropropagación de plantas *in vitro*, herramienta biotecnológica que aprovecha la habilidad natural que poseen las plantas para regenerar individuos completos a partir de células o tejidos (totipotencia), ya sea por vía embriogénica u organogénica. En la micropropagación se obtienen plantas que son genéticamente idénticas a partir de un fragmento o explante de una planta madre. La micropropagación consta de varias etapas: la etapa 0, la cual es de selección y preparación de la planta madre, la etapa I de iniciación y establecimiento de condiciones asépticas, luego la etapa II de multiplicación de brotes o rápida formación de embriones somáticos mediante un medio de cultivo, seguido de la etapa III o etapa de enraizamiento y por ultimo una etapa IV de aclimatación (Razdan, 2003). Para la familia *Amaryllidaceae*, los explantes Twin-Scale, que están conformados por dos escamas adyacentes

conectadas por un pedazo de tejido de placa basal, se han utilizado con éxito para su reproducción masiva (Fennell & Van Staden, *Biotechnology of southern African bulbs*, 2004). Muchas especies bulbosas producen con éxito brotes adventicios a partir de tejido basal en las escamas del bulbo y desde la unión de las escamas en la placa basal. Para el caso de *Zephyranthes carinata* es necesario incluir la placa basal en las escamas del explante debido a que sin ella, los bulbillos no se pueden formar en el medio de cultivo. Cuando se corta la placa basal, la dominancia apical se supera y se estimulan los meristemas axilares preexistentes (Fennell, 2002).

La extracción de alcaloides a partir de material vegetal micropropagado *in vitro* tiene las siguientes ventajas: reduce el costo del medio de cultivo, acelera el crecimiento vegetal, simplifica el manejo a gran escala, puede significar un ahorro en el consumo de energía, se tiene un control de los parámetros de crecimiento y condiciones del mismo, mayor probabilidad de evitar contaminantes externos, entre otras. (Muñoz David, 2006). Para un uso comercial, se deben emplear estrategias dirigidas a incrementar la producción de los alcaloides. El presente proyecto evaluará la composición del medio de cultivo, tomando como base la composición de microelementos, vitaminas y fitohormonas que garantizan el metabolismo de las células heterótrofas de las plantas. Algunos medios comúnmente utilizados, son el Murashige-Skoog (MS), Linsmaier-Skoog (LS), Gamborg (B5) y Schenk-Hildebrandt (SH). (Arias-Zabala *et al.*, 2009).

Por otro lado, la fuente de carbono es importante para estimular la producción de alcaloides tal y como lo reportan los estudios de (Tahchy, y otros, 2011) , donde utilizaron como fuente de carbono a la sacarosa en concentraciones de 30, 60, 90 o 120 g/L. En otro estudio se determinó que 9% de sacarosa induce la mayor producción de alcaloides en la especie *Narcissus confusus*, *Amaryllidaceae* (Selles, Bergoñon, Viladomat, Bastida, & Codina, 1997). Si bien hay estudios previos sobre el efecto de la concentración de sacarosa en la producción de alcaloides en otras especies de amarilidáceas, no hay información sobre *Zephyranthes carinata*. Adicionalmente, no se conoce el efecto que puede tener la edad de los bulbillos propagados *in vitro*, ni del origen del material utilizado (*in vitro* Vs proveniente del invernadero) sobre la producción de alcaloides. Por lo que en el proyecto se estudiarán estos factores con la especie *Zephyranthes carinata*. Por otro lado, estudios previos demostraron que en la familia *Zephyranthes* , se encontró mayor cantidad de alcaloides en el tejido vegetal (hojas y bulbillos) que en el medio de cultivo donde las plántulas fueron inducidas (Peralta Navarro, 2014).

Para la extracción de alcaloides, existe un procedimiento que consta de una primera fase que consiste en la despigmentación o eliminación de los pigmentos más lipófilos

del extracto metanolico y acidificado de la planta, utilizando para ello un disolvente de polaridad similar, como por ejemplo butanol, éter etílico o éter de petróleo. La segunda fase del proceso es el fraccionamiento propiamente dicho, en el cual se requiere trabajar a diferentes pH a fin de obtener los alcaloides, que por definición son sustancias básicas, en forma neutra o salina, y poder recuperarlos con el disolvente más adecuado a su polaridad. La última fase consiste en obtener diversos extractos enriquecidos en un tipo determinado de cada tipo de alcaloide, y evitar que puedan estar contaminados con otras sustancias orgánicas que no sean de interés. Esta fase puede resultar simple o compleja en función de la cantidad de material de partida. (Fuster, 1994). En este proyecto se utilizara técnicas para una valoración semicuantitativa o cualitativa, como es la cromatografía plana o (TLC), el procedimiento analítico por TLC, permite una detección rápida, sencilla y económica, a diferencia de otras técnicas de detección como el uso de equipos UPLC acoplado a espectrómetro de masas, que es un equipo que requiere un manejo más riguroso, además de ser un procedimiento más costoso, fue utilizado por (Peralta Navarro, 2014) *Zephyrantes* . La cromatografía plana es un tipo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria está extendida sobre la superficie de un plano y la fase móvil fluye a través de ella. La fase móvil siempre será un líquido mientras que la estacionaria puede ser un líquido soportado en un sólido. El flujo de la fase móvil se produce por capilaridad y gravedad (Valcarcel Cases & Gómez Hens, 1988).

4 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo general

Optimizar la producción de alcaloides de *Zephyrantes carinata* (Amaryllidaceae) bajo condiciones *in vitro*

4.1.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la concentración de sacarosa en la producción de alcaloides de *Zephyrantes carinata* (Amaryllidaceae) bajo condiciones *in vitro*.
2. Comparar la producción de alcaloides de bulbillos inducidos *in vitro* con el material de invernadero.
3. Determinar la concentración de alcaloides de acuerdo al tiempo de inducción de la formación de bulbillos propagados *in vitro*

5 METODOLOGIA

5.1.1 Colecta de Material Vegetal y Lugar de Estudio

Parte del material vegetal fue obtenido del invernadero de la Universidad Icesi en la Ciudad de Santiago de Cali, el invernadero presentaba condiciones de aislamiento y se encontraban bajo una malla de poli sombra lo cual simulaba las condiciones *in situ* de la especie, las plantas fueron regadas en un lapso de tiempo de 48 horas. Referente a las características de las plantas, se tomaron bulbos que cumplieran con un diámetro entre 15 y 20 mm, se seleccionaron los bulbos de individuos que no estuvieran en floración debido a que la respuesta *in vitro* sería modificada. Las características anteriormente descritas, hacen parte del material llamado: Bulbillos provenientes de invernadero

En el caso de los bulbos provenientes de cultivo *in vitro*, se seleccionaran los que han sido producidos en el laboratorio de investigación en biotecnología vegetal de la Universidad Icesi (LIBV).

5.2 Cultivo *in vitro* para la inducción de bulbillos y producción de alcaloides

5.2.1 Protocolo de esterilización superficial de los bulbos cultivados en el invernadero

1. Se retiraron raíces, hojas y escamas externas secas del bulbo
2. Se lavó con agua de grifo y jabón para remover tierra del bulbo y cuidando la integridad de la placa basal
3. En una cabina de flujo laminar, se sumergió en etanol al 70% por 1 minuto el bulbo y se cortó longitudinalmente en 4 partes iguales
4. Se enjuagaron con agua estéril 3 veces y posteriormente se sumergieron en etanol al 70% por 1 minuto
5. Se sumergieron en NaOCl 1,5% durante 20 minutos con agitación constante en una plancha de agitación con magneto
6. Se añadieron 4 gotas de Tween 20 por cada 100mL de solución y se agitó hasta homogenizar con un magneto
7. Por último, se enjuago con agua estéril 3 veces: el primer lavado duro 3 minutos, el segundo de 10 y ultimo de 15 minutos.
8. En una cabina de seguridad biológica, utilizando una caja Petri estéril, se trabajaron los bulbos ya esterilizados realizando un proceso de separación de las escamas de cada fracción de bulbo cortada.

9. Se tomaron dos pares de escamas provenientes del mismo bulbo y se indujeron en el medio de cultivo de forma adaxial.

5.2.2 Metodología Twin-Scale

Para la obtención de los explantes que fueron cultivados *in vitro*, a partir de bulbos de la especie *Zephyranthes carinata*, se realizó mediante la técnica Twin-Scale, la cual permitió la propagación y multiplicación de la especie a partir de pares de escamas provenientes de un bulbo o varios. Lo anterior permitió un rápido crecimiento de las plantas disminuyendo la presión sobre poblaciones silvestres. El procedimiento general de cultivo por *Twin-Scale* consistió en realizar un corte transversal del bulbillo donde se utilizó la parte donde se encuentre la zona del tejido basal para realizar dos cortes longitudinales. A partir de esos cortes, se extrajeron de los segmentos 5 milímetros de la placa basal los cuales fueron sembrados en orientación adaxial referente al medio de cultivo (Rice, Finnie, & Van Staden, 2011).

5.2.3 Inducción de bulbillos mediante la técnica de Twin-Scale a partir de bulbos provenientes del invernadero

Para la inducción de bulbillos provenientes del invernadero, se recolectaron 4 bulbos como material vegetal, se tuvieron en cuenta parámetros como: el diámetro del bulbillo y el estado de no floración de la planta, posteriormente, se siguió el protocolo de esterilización anteriormente descrito. Se realizó la siembra de 240 pares de escamas en el medio de inducción correspondiente, las cuales fueron distribuidas de a dos pares de escamas por frasco de vidrio para un total de 120 frascos de vidrio. De cada segmento se separaron con bisturí el par de escamas y se adicionaron en orientación adaxial al medio de inducción presente en los frascos de vidrio. Los explantes fueron cultivados y en un intervalo de 20 a 45 días se evaluó la formación de nuevos bulbillos por par de escamas inducidas **Figura 2**.

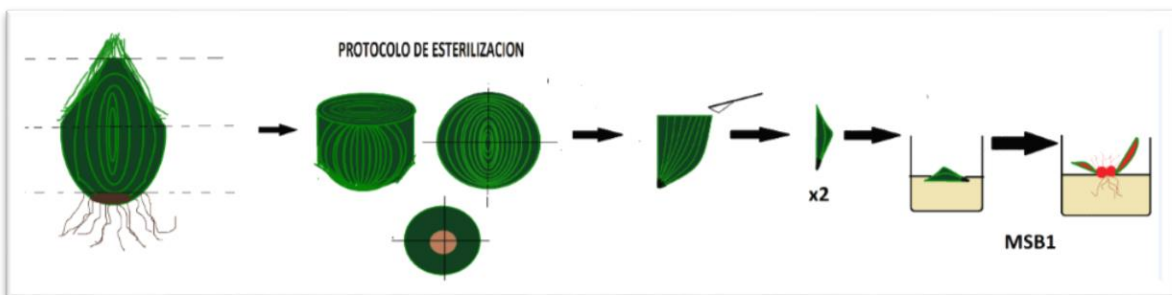


Figura 2. Procedimiento de propagación para material proveniente de invernadero

5.2.4 Inducción de bulbillos mediante la técnica de Twin-Scale a partir de bulbos subcultivados *in vitro*

Para la inducción de nuevos bulbillos a partir de escamas generadas por bulbos formados *in vitro*, se tomaron 3 bulbillos ya subcultivados provenientes del cuarto de cultivo del laboratorio de investigación en biotecnología vegetal de la Universidad Icesi (LIBV). Posteriormente, se realizaron los cortes de las raíces y hojas, se cortaron los bulbos en 4 partes de forma longitudinal. Seguido a esto, se separaron con un bisturí los pares de escamas provenientes de las fracciones de bulbos cortadas y se adicionaron en orientación adaxial al medio de inducción presente en frascos de vidrio. Fueron sembrados 4 pares de explantes por fracción de bulbillito, obteniendo un total de 12 pares de explantes por bulbillito. Los explantes fueron cultivados y en un intervalo de 20 a 45 días se evaluó la formación de nuevos bulbillos por par de escamas inducidas. **Figura 3.** Para este procedimiento no se tuvo en cuenta el protocolo de esterilización debido al estado de material vegetal utilizado, el cual se encuentra estéril.

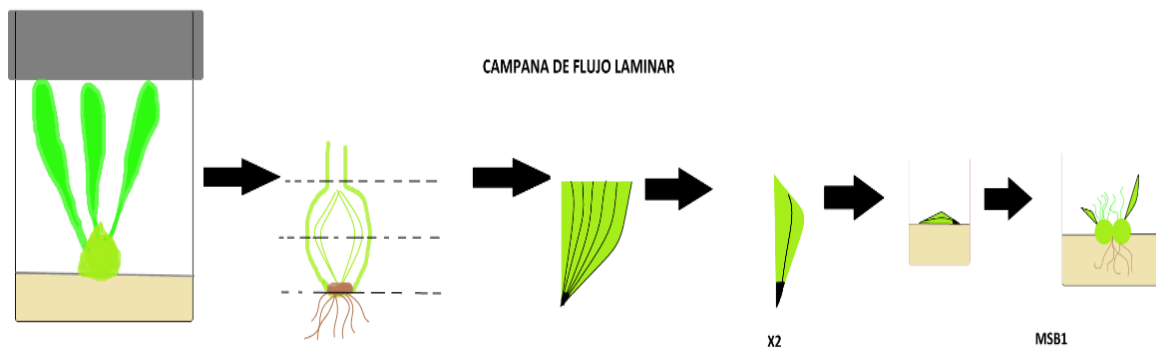


Figura 3. Procedimiento de propagación para material subcultivado

5.2.5 Medios de Cultivo

5.2.5.1 Medio de inducción MS-A1

Para la realización de la inducción de bulbillos *in vitro* se preparó un medio de cultivo que está siendo utilizado en el LIBV (laboratorio de investigación biotecnológica vegetal) llamado MS-A1, el cual es una modificación del medio de cultivo basal propuesto por Murashige & Skoog (MS) que fue desarrollado inicialmente para crecimiento de callos de tabaco y en la actualidad se emplea como medio de cultivo basal para un grupo importante de plantas de interés para la alimentación y con fines ornamentales (Murashige & Skoog, 1962) **Cuadro 1.** Se utilizó este medio debido a que

ha presentado una mayor tasa de producción de bulbillos, de acuerdo a los estudios previos que se han realizado en el laboratorio.

	MS		MS-A1	
	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L
Macroelementos				
NH ₄ NO ₃	1650	20,61	1650	20,61
KNO ₃	1900	18,79	1900	18,79
MgSO ₄	180,7	1,50	180,7	1,50
KH ₂ PO ₄	170	1,25	170	1,25
Microelementos				
H ₃ BO ₃	6,2	0,100	6,2	0,100
MnSO ₄ X H ₂ O	16,9	0,10	16,9	0,10
ZnSO ₄ X 7H ₂ O	8,6	0,0299	8,6	0,0299
Na ₂ MoO ₄ X 2 H ₂ O	0,25	0,001	0,25	0,0010
CuSO ₄ X 5H ₂ O	0,025	0,0001	0,025	0,00010
CoCl ₂ X 6H ₂ O	0,025	0,0001	0,025	0,0001
KI	0,83	0,0050	0,83	0,0050
CaCl ₂	332,2	2,99	332,2	2,99
Na ₂ EDTA X 2H ₂ O	37,26	0,1052	37,26	0,1052
FeSO ₄ X 7H ₂ O	27,80	0,1000	27,80	0,1000
Vitaminas				
Acido nicotínico	0,50	0,0041	0,50	0,0041
Piridoxina. HCL	0,50	0,0024	0,50	0,0024
Tiamina X HCL	0,1	0,0003	0,1	0,0003
Glicina	2	0,0266	2	0,0266
Inositol	100	0,5551	100	0,5551
Regulador de crecimiento				
BAP	0	0	0,6	0,0027
Fuente de carbono				
Sacarosa	30000	87,64	30000	87,64
Agentes gelificantes				
Goma gellan	3000		3000	
pH	5,8		5,8	

Cuadro 1. Componentes de los medios de cultivo MS y MS-A1

Como se muestra en el **Cuadro 1**. La única diferencia entre el medio de cultivo MS-A1 y el MS, es que el MS-A1 con tiene de BAP 0.6 mg/L. Las citoquininas son fundamentales reguladores del crecimiento para la formación de brotes. Entre ellas la 6-bencilaminopurina (6-BAP) es, en general la citoquininas más efectiva y la más empleada en la inducción de yemas axilares. (Mesa, Romero, & Cruz, 2002).

5.2.5.2 Medios para la evaluación del efecto de sacarosa en la producción de los alcaloides

Después de obtener bulbillos a partir de bulbos provenientes del invernadero y utilizando el protocolo de esterilización (sección 5.2.1), estos fueron subcultivados para inducir bulbillos a partir de los obtenidos *in vitro* (sección 5.2.4.). Esta nueva inducción se realizó en medios de cultivo MS en los cuales se agregaron diferentes concentraciones de sacarosa. Los valores porcentuales de sacarosa correspondieron a 0, 6, 9, 12 y 15% (p/v) respectivamente, siendo 0% el control (Cuadro 1). Para esta evaluación se utilizaron 160 bulbillos que fueron repartidos en 16 frascos por tratamiento de sacarosa, los cuales contenían dos bulbillos por frasco. Al cabo de dos meses de inducción, se evaluó el número y la longitud de bulbillos inducidos por bulbillito subcultivado, el número y la longitud de las hojas por bulbillito. No obstante, solo se tuvieron en cuenta los bulbillos que se encontraban vivos y no contaminados para la evaluación de los diferentes tratamientos (**Figura 4**).

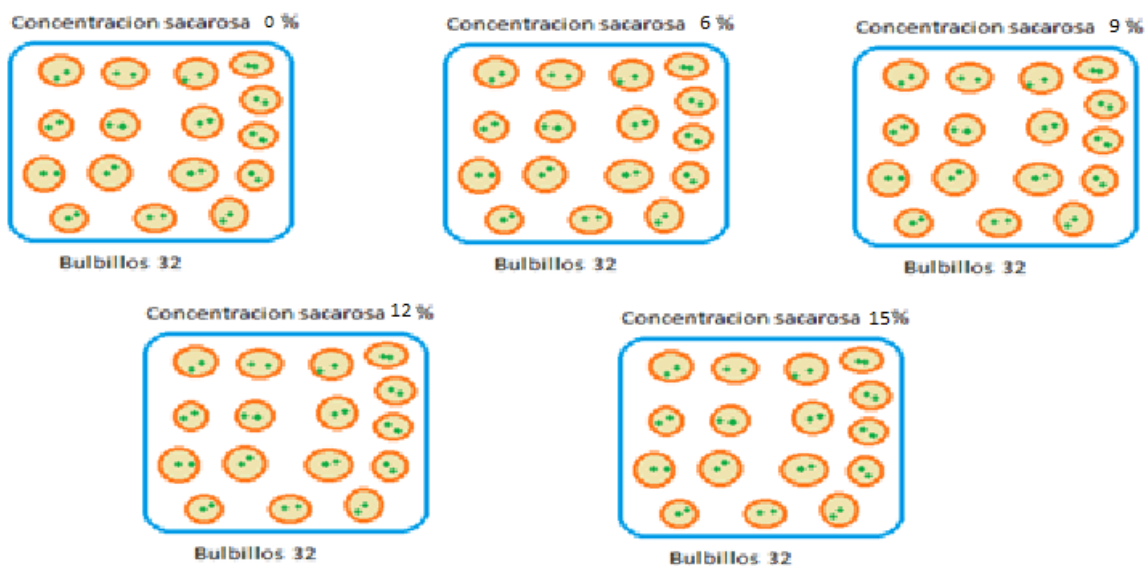


Figura 4. Esquema experimental de tratamientos respectivos al parámetro de concentración de sacarosa en el medio de cultivo

5.3 Evaluación de características morfológicas para determinar el efecto de la concentración de sacarosa en el medio; el efecto de la fuente del material de partida para el cultivo *in vitro*; y el efecto de la edad de los bulbillos propagados *in vitro*

Los diferentes tratamientos fueron evaluados por: 1) el número de bulbillos producidos por cada par de escamas cultivadas *in vitro*; 2) el número y longitud de los bulbillos formados; 3) el número y longitud de las hojas por bulbillito producido *in vitro*.

Para las escamas cultivadas a partir de bulbos obtenidos del invernadero (sección 5.2.3) o a partir de los bulbillos producidos *in vitro* (sección 5.2.4), se evaluó la inducción de bulbillos a los 20 y 45 días de siembra. Posteriormente, estos bulbillos recién formados se separaron en los diferentes tratamientos.

Los bulbillos provenientes del invernadero fueron utilizados para realizar tres tipos de experimentos:

- a) El primero correspondió a la evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre la respuesta al cultivo *in vitro* y su influencia en la producción de alcaloides (Sección 5.5.2).
- b) El segundo experimento consistió en la evaluación del desarrollo del bulbillito con la edad del subcultivo para determinar el efecto de la fuente del material de partida para el cultivo *in vitro* en medio de cultivo MS.
- c) En el tercer experimento se evaluó el efecto de la edad de los bulbillos inducidos *in vitro* sobre la producción de alcaloides. Estos parámetros fueron evaluados a los 2, 3 y 4 meses después de la inducción *in vitro* en el medio de cultivo MS, se utilizaron 72 bulbillos provenientes del material invernadero de los cuales fueron seleccionados 63 bulbillos (2 bulbillos por frasco **Figura 5**).

Los bulbillos obtenidos a partir de material subcultivado *in vitro* fueron utilizados para:

- a) Determinar el efecto de la fuente del material de partida sobre el desarrollo del bulbillito con la edad del subcultivos en medio de cultivo MS
- b) Determinar el efecto de la edad de los bulbillos inducidos *in vitro* sobre la producción de alcaloides. Para esta evaluación se utilizaron un total de 120 bulbillos del material subcultivado, donde se seleccionaron solamente 96 finales debido a la contaminación presente en los mismos. Fueron puestos en frascos de medio de cultivo (MS) **Figura 5**.

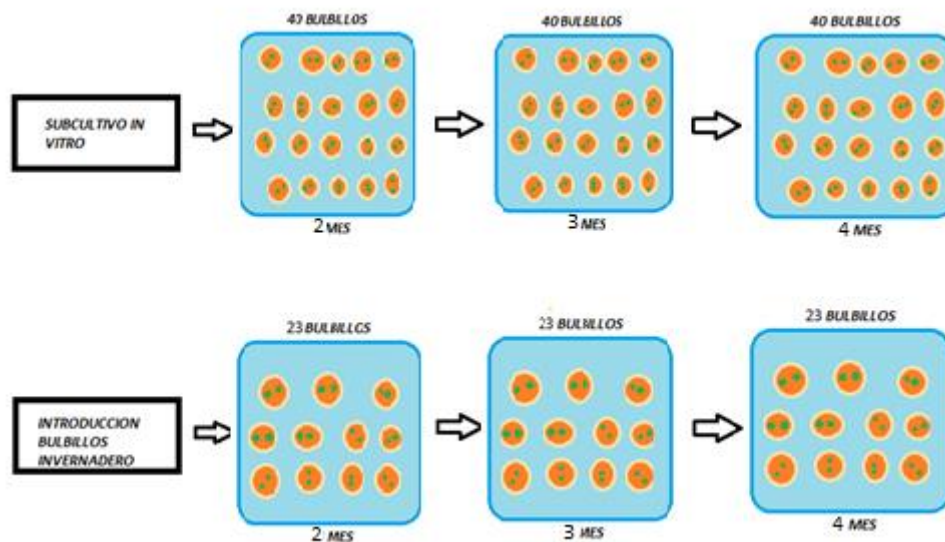


Figura 5. Esquema experimental de tratamientos respectivos al parámetro de tiempo de inducción del bulbillo en origen subcultivado e invernadero

5.4 Determinación del peso seco del material producido en los diferentes tratamientos

Para cada tratamiento, ya fuera que provinieran de diferente origen, los que tenían diferentes tiempos de cultivo y de los tratamientos en diferentes concentraciones de sacarosa, se retiraron las plántulas de los frascos y se cortaron las raíces de los bulbos. Después, se realizaron cortes para separar los bulbos de las hojas en cada tratamiento. Se pesó el material fresco (bulbillos y hojas) por triplicado, reportando sus valores. Este material vegetal fresco, fue sometido a 2 días de secado en un horno Binder a 47°C. Después de la verificación del material en estado seco, se maceraron las hojas y los bulbillos, se registró el peso del macerado para cada tratamiento, todo esto con el fin de determinar el porcentaje de disminución del peso del material en el proceso de secado.

5.5 Extracción de alcaloides

5.5.1 Método de extracción de alcaloides

Para la extracción de los alcaloides a partir del tejido vegetal se siguió el siguiente protocolo, tomado de un proyecto de grado realizado en la Universidad Icesi referente a la caracterización química de alcaloides del genero *Zephyranthes* sp (Escobar Fuertes, 2014)

1. Secar material vegetal por 48 horas como mínimo en horno a 45°C
2. Retirar cuidadosamente el material vegetal seco y macerarlo en un mortero hasta asegurar la pulverización del material
3. El macerado se acidifico con ácido clorhídrico al 5%, verificando el pH con papel tornasol
4. Sonicar por 15 minutos
5. Realizar la acidificación del material por triplicado en tubos de ensayo utilizando 2 mL de ácido clorhídrico al 5%
6. Descartar el material vegetal cuidadosamente
7. Adicionar hidróxido de amonio al 30% hasta llegar a pH 9 (Verificar con pH-metro)
8. Sonicar por 5 minutos.
9. Realizar extracción liquido-liquido adicionando 30 mL de cloroformo y dejar reposar por 24 horas.
10. La fase de cloroformo se filtró por gravedad y se adiciono aproximadamente 10 g de fosfato de sodio dibasico anhidro para eliminar el agua restante.
11. Se utilizó el Rapid Vap para secar la muestra con condiciones de 35°C, 250 bares de presión, agitación 12 rpm durante 35 minutos
12. Una vez el balón de rota evaporación se encuentre seco, se recupera el contenido adicionando 2 mL de metanol y se agita manualmente hasta que se concentre la muestra obtenida.

5.5.2 Cuantificación de alcaloides por TLC

La producción de alcaloides, se evaluó con la técnica de cromatografía líquida planar (TLC), la cual es una metodología semicuantitativa., teniendo en cuenta un componente estándar de boldina. (Wagner & Bladt, 1996) Que es un alcaloide proveniente del Boldo (O'Brien, Carrasco-Pozo, & Speisky, 2006) el cual sirvió como referencia para indicar la presencia de alcaloides y la intensidad de los mismos reportada en las muestras de las bandas en la placa cromatográfica y siendo verificada por el indicador colorimétrico de alcaloides; revelador de Dragendorff.

El procedimiento consistió en utilizar material vegetal de la especie *Zephyranthes carinata*, proveniente del invernadero para estandarizar la metodología analítica por

(Cromatografía de capa delgada) TLC en relación con la muestra final obtenida en el proceso de extracción de alcaloides. Para ello, primero se realizó una curva de calibración en una placa cromatográfica (cromatografía en capa fina de alto rendimiento) HPTLC, en la cual se sembraron 5 muestras de diferente concentración, todas ellas llevadas a volúmenes de 1 μ L en cada siembra del estándar utilizando el manejo instrumental del equipo Nanomat4, el cual permite tomar un volumen definido de muestra. Tales muestras fueron producto de una serie de diluciones realizadas con el fin de obtener en las siembras cantidades de alcaloides (3, 5, 10, 12,15 μ g). Al realizar la siembra, se procedió a realizar la respectiva elución de la placa en 20 mL de fase móvil: Metanol/Agua/Di etilamina 70:30:0,01 y llevándola a un pH de 3,5 con ácido fórmico. (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984)

Después de realizar el corrido de las muestras de la curva de calibración en la fase móvil, se procedió a realizar un revelado con el reactivo de Dragendorff para después tomar un registro fotográfico y procesarlo en el software ImageJ (Rasband, 2016) para determinar una relación (área bajo la curva/cantidad de muestra).

Al realizar la curva de calibración, se realizaron las extracciones con el material vegetal anteriormente descrito, el cual fue diferenciado por peso del mismo macerado y seco: (300, 400,500 mg) con el fin de optimizar el peso a utilizar proveniente del material trabajado *in vitro* y su detección por el revelador de Dragendorff. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento, utilizando 1000 mg de material vegetal seco y macerado.

También el proceso fue realizado utilizando material vegetal seco y macerado de la especie *Hymenocallis*, la cual proviene de la colección personal del profesor Guillermo Montoya, esta especie fue utilizada como especie de control para la técnica de cromatográfica de TLC debido a que se ha demostrado la presencia de alcaloides en la especie (Trujillo & Madrigal, 2005).

6 RESULTADOS

6.1 Evaluación del efecto de la fuente del material de partida (bulbos de invernadero o provenientes del subcultivos *in vitro*) y la edad del cultivo sobre las características morfológicas del material

6.1.1 Inducción de bulbillos a partir de bulbos provenientes directamente del invernadero o subcultivados *in vitro* en medio de inducción MS-A1

Al evaluar la capacidad de respuesta de acuerdo al origen del material, se encontró que el material proveniente del subcultivo de bulbos *in vitro* presentó una mayor respuesta, un 76,7% de las escamas inducidas, produjo al menos un bulbillo (% de par de escamas con bulbillos/ número total de escamas inducidas), respecto al material proveniente del invernadero el cual presentó un rendimiento 70,7%. La evaluación se realizó 40 días después de la inducción. **(Figura 6).**

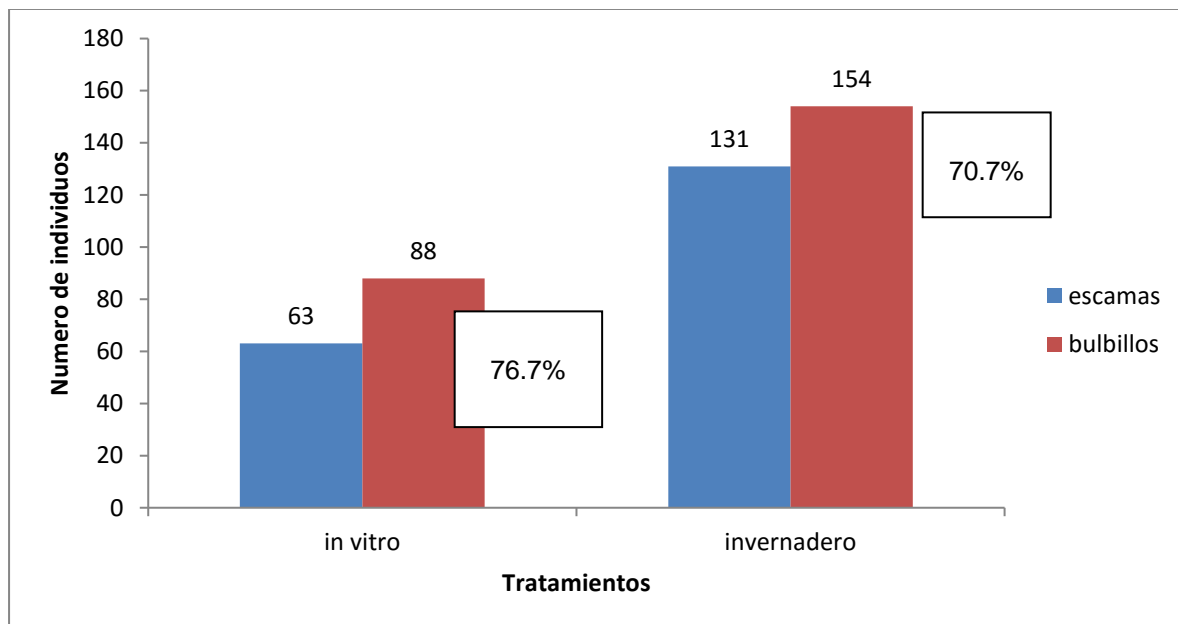


Figura 6. Producción de bulbillos por escamas *in vitro* después de 40 días de inducción

Estas diferencias también se mantienen cuando se evalúa el número de bulbillos producidos por par de escamas cultivadas. Las escamas de bulbillos subcultivados *in vitro* producen en promedio más bulbillos (25% superior, 1.48 bulbillos por par de escamas cultivadas) **(Figura 6)** y un mayor número total de bulbillos por cada par de escamas cultivadas (hasta un total de 4 o 5 bulbillos) **(Figura 7)**, respecto a aquellas

provenientes de bulbos del invernadero, las cuales producen 1.18 bulbillos por par escamas cultivadas (**Figura 6**) y hasta un máximo total de 3 bulbillos por cada par de escamas cultivadas. En la (**Figura 7**) solo se tuvieron en cuenta los bulbillos no contaminados en el estudio, frente a ello, el porcentaje total de bulbillos de origen invernadero y subcultivados que se utilizaron para estudiar la formación de bulbillos por escamas inducidas fue de 85,82% y 73,22% para ambos tratamientos respectivamente.

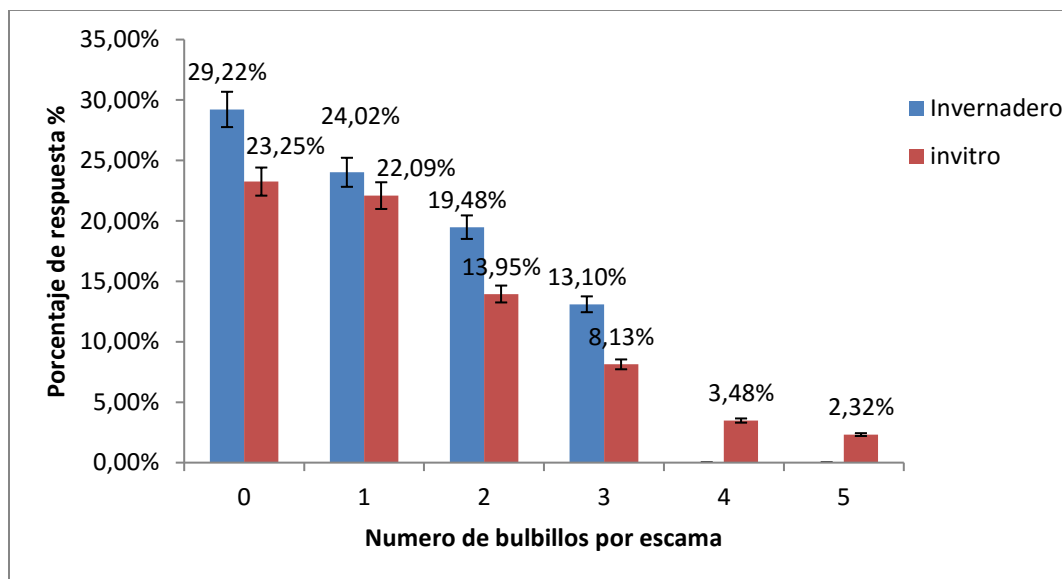


Figura 7. Formación de bulbillos por cada par de escamas después de 40 días de inducción

6.1.2 Formación de hojas en los bulbillos inducidos a partir de bulbos provenientes directamente del invernadero o subcultivados *in vitro* en medio de cultivo MS

Si bien el material proveniente del subcultivo *in vitro*, muestra un menor número de hojas por bulbillo respecto al del invernadero a dos meses del cultivo, a los 3 meses de inducción se muestra un valor máximo de número de hojas. Por otro lado, en los tratamientos de invernadero, los valores de números de hoja por bulbillos, son máximos a los 3 y 4 meses. (**Figura 8**), no obstante, el valor para los 4 meses en el tratamiento *in vitro* se encuentra asociado a un posible error experimental.

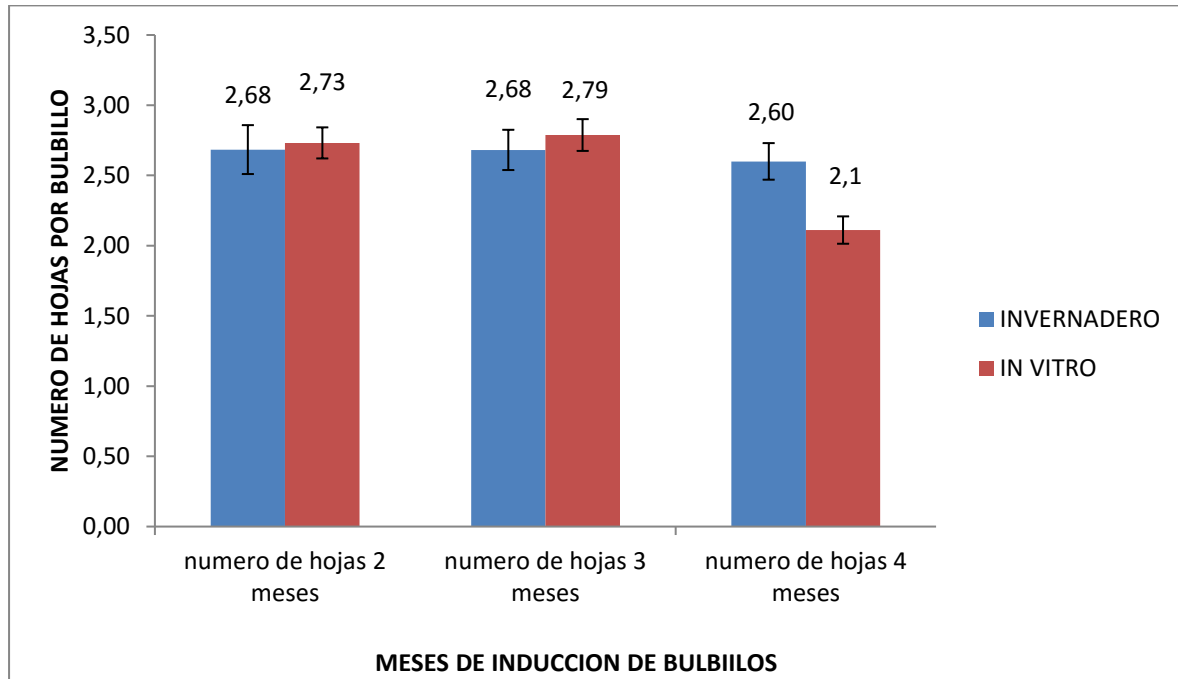


Figura 8. Número de hojas por bulbillo en relación con la edad de inducción

6.1.3 Longitud de los bulbillos según el origen del material vegetal

En general los bulbillos midieron en promedio entre 0.88 cm a 1.14 cm de longitud. Se detectaron variaciones en longitud para ambos tratamientos dependiendo de la edad del cultivo, tales valores muestran que en el tratamiento *in vitro*, la longitud de los bulbillos disminuye en función de tiempo, tal respuesta es reflejada en menor proporción en el tratamiento de invernadero. **(Figura 9).**

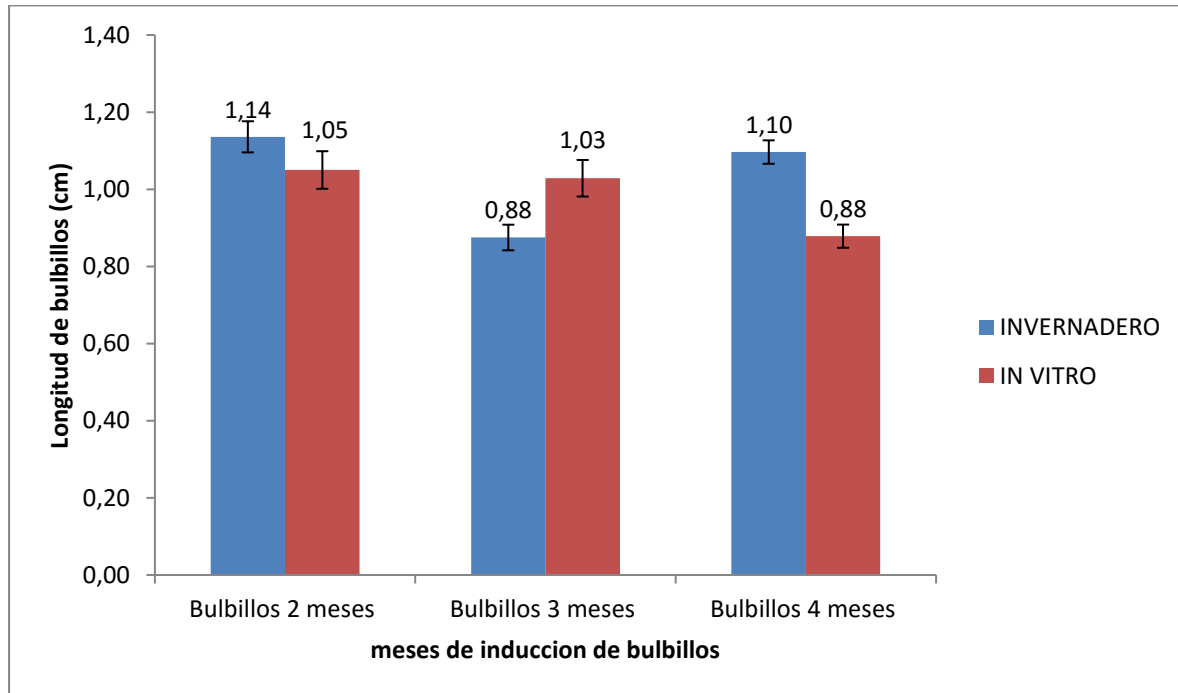


Figura 9. Longitud de los bulbillos en relación al origen del material y la edad cultivo

6.1.4 Longitud de las hojas según origen del material vegetal

En general las hojas de los bulbillos producidos a partir del material *in vitro* mostraron hojas más largas respecto a los provenientes del invernadero en función del tiempo, alcanzando valores aproximados de 1 centímetro por mes de inducción. **(Figura 10).**

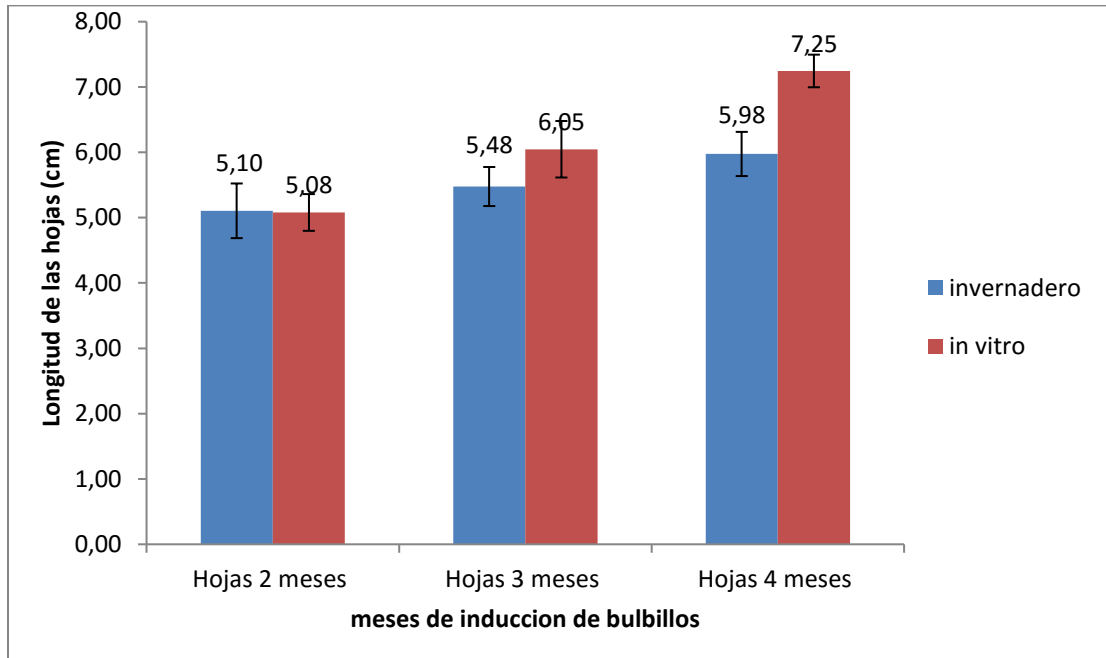


Figura 10. Longitud de las hojas en relación al origen del material y la edad cultivo

6.2 Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo *in vitro* sobre las características morfológicas del material inducido

6.2.1 Formación de hojas en los bulbillos inducidos a diferentes concentraciones de sacarosa

Para la evaluación de este parámetro, se tuvieron en cuenta los 6 tratamientos correspondientes al porcentaje (p/v) de sacarosa en el medio de cultivo. Los resultados muestran un menor número de hojas por bulbillo a medida que se incrementa la concentración de sacarosa (**Figura 11**). El mayor número de hojas (2.7 a 2.8 hojas por bulbillo) se producen a 0% y 3 % de sacarosa, a 6% se obtuvo un promedio de 2.4 hojas/ bulbillos, mientras que a 9% y 12% la respuesta fue de 1.9 y 1.8 hojas/ bulbillos respectivamente, y el menor valor (1.5 hojas/ bulbillos) se obtuvo a 15% sacarosa

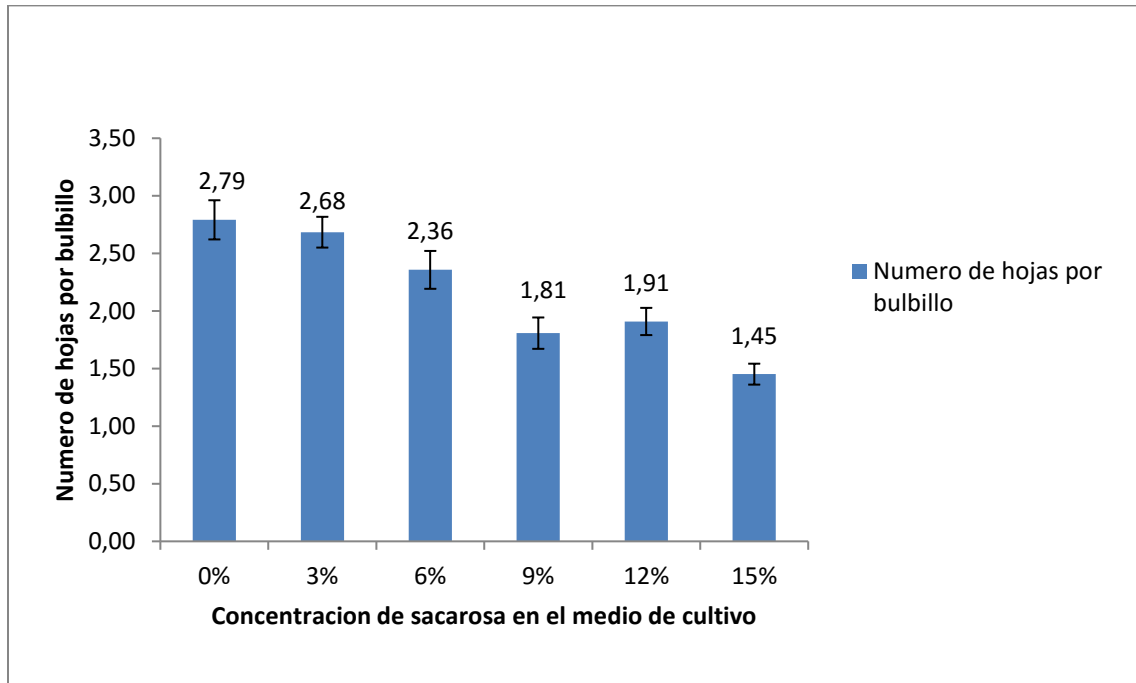


Figura 11. Número de hojas por bulbillos formados a diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo después de 2 meses de inducción

6.2.2 Longitud del bulbilllo inducidos a diferentes concentraciones de sacarosa

En la (Figura 12) se observa una menor longitud del bulbilllo a medida que aumenta el porcentaje de sacarosa en el medio, el valor de mayor longitud de bulbilllo es de 1,15 cm correspondiente al tratamiento de 3%. Por otro lado, el tratamiento 9% de sacarosa presentó el menor valor de longitud de bulbo correspondiente a 0,75 cm.

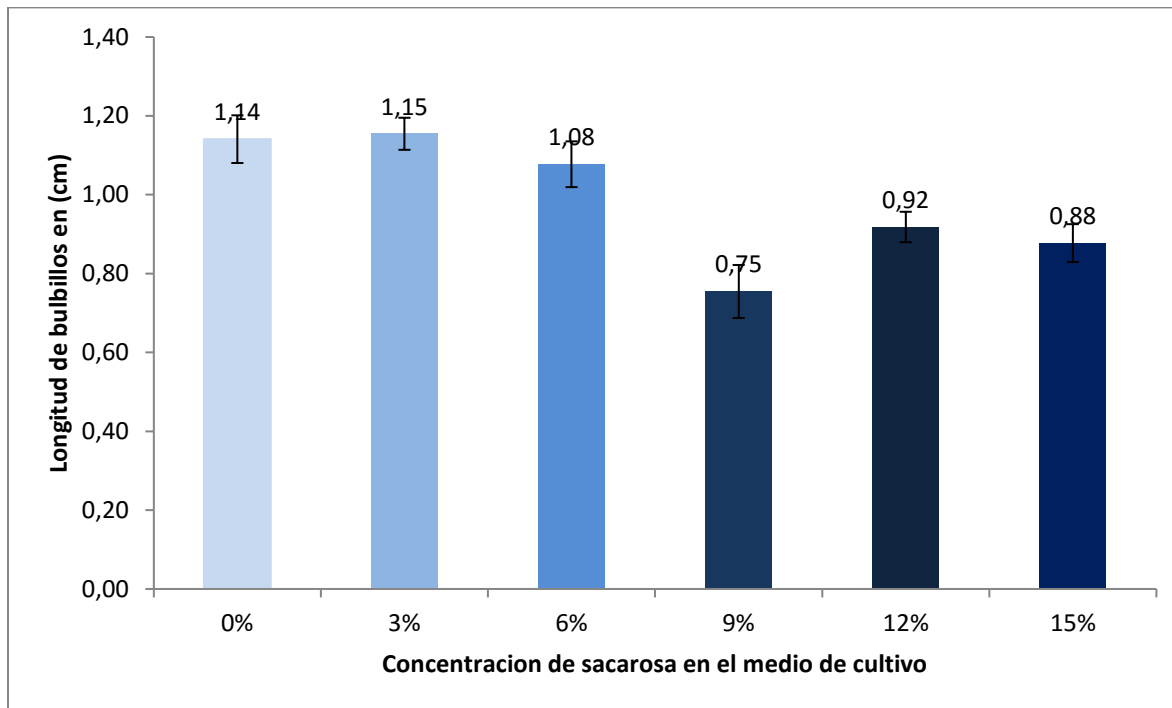


Figura 12. Longitud de los bulbillos formados a las diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo después de 2 meses de inducción

6.2.3 Longitud de las hojas de los bulbillos inducidos a diferentes concentraciones de sacarosa

El efecto de las concentraciones de sacarosa sobre el crecimiento de las hojas (**Figura 13**) es aún más marcado respecto al efecto sobre el crecimiento de los bulbillos mostrados en la (**Figura 12**). Para la evaluación de esta característica en los tratamientos realizados, se tuvo en cuenta que la hoja no estuviese marchita o presentara daños en el tejido. Los resultados de esta evaluación indican que a medida que la concentración de sacarosa aumenta en el medio de cultivo, la longitud de las hojas de los bulbos es menor (**Figura 13**). Se distinguen 3 grupos: Las hojas de los materiales cultivados a 0% y 3% de sacarosa, presentan las hojas más largas (un promedio de hojas de 5.4 cm de largo); la longitud de las hojas se reduce a la mitad cuando los bulbillos de cultivan entre 6% y 12% de sacarosa (un promedio de hojas de 2.5 cm de largo); esta reducción en crecimiento es aún más marcado a 15% de sacarosa, concentración a la cual las hojas desarrolladas son las más pequeñas (1.1 cm de largo) mostrando una reducción de casi 5 veces en tamaño respecto al primer grupo cultivado entre 0% a 3% de sacarosa (**Figura 13**).

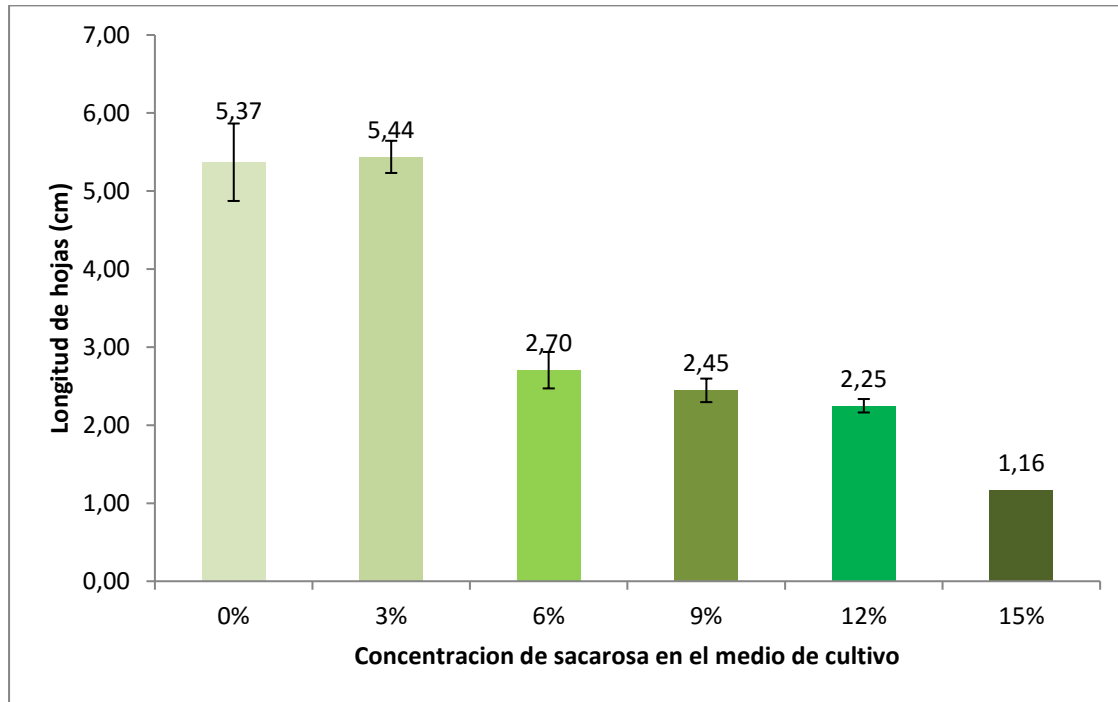


Figura 13. Longitud de las hojas por bulbillos formados a las diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo después de 2 meses de inducción

6.3 Evaluación del peso del material vegetal fresco, seco y porcentaje de humedad

6.3.1 Peso de bulbillos invernadero vs *in vitro*

En cuanto al peso de los bulbillos de origen invernadero, a medida que aumenta la edad del material vegetal, el peso fresco y el peso seco fueron mayores en los bulbillos, donde los bulbillos de 4 meses de inducción presentaron el mayor peso fresco y seco de 183,2 mg y 34,7 mg respectivamente **Figura 14**. Por otro lado, los bulbillos de origen subcultivado, presentaron un menor peso fresco a los 3 meses de inducción con un valor promedio por bulbillito de 49,1 mg, sin embargo, el valor de su peso promedio seco por bulbillito, fue el más elevado con respecto a los demás meses, con 9,4 mg de peso por bulbillito. **Figura 15**.

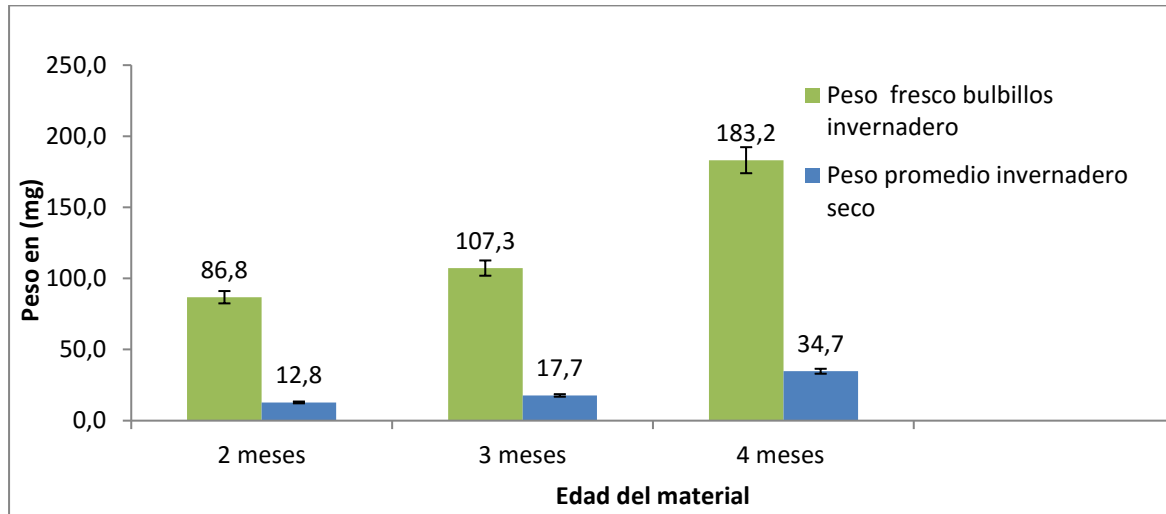


Figura 14 . Comparación de peso fresco y seco de bulbillos de origen invernadero

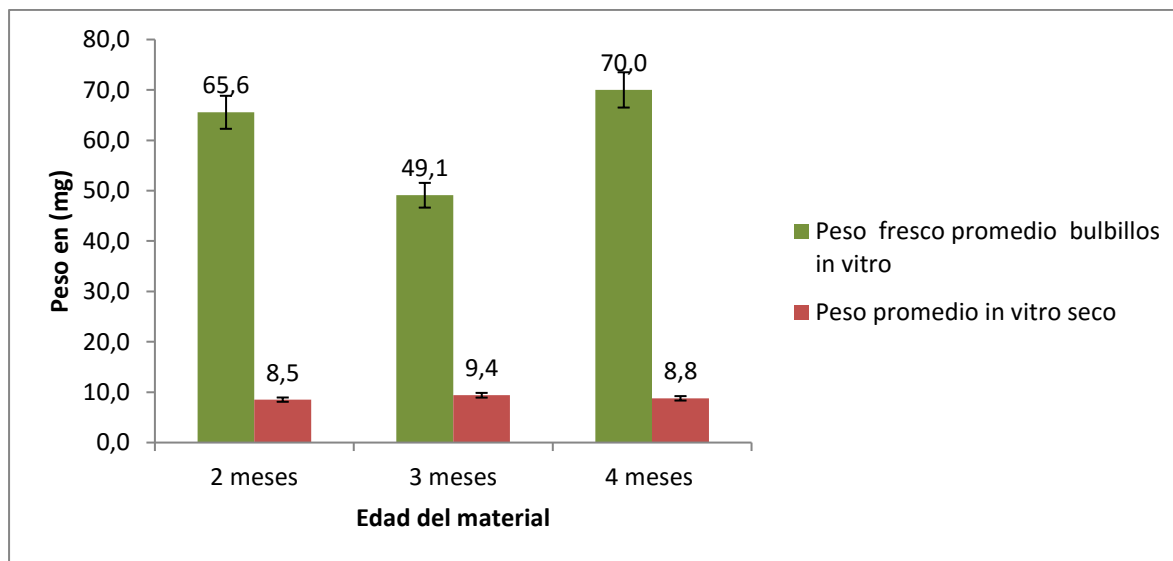


Figura 15. Comparación de peso fresco y seco de bulbillos de origen *in vitro*

6.3.2 Peso de hojas invernadero vs *in vitro*

En las hojas de origen invernadero, se presentó un peso seco máximo de 4,2 mg en el tratamiento de 4 meses de inducción, siendo este, el valor más elevado de peso en hojas de todos los tratamientos **Figura 16**, este valor fue comparado con el obtenido a los 4 meses de inducción *in vitro* 3,3 mg **Figura 17**. Además, en los tratamientos de origen subcultivado, a medida que aumentó la edad del material vegetal, el peso promedio de las hojas fue mayor.

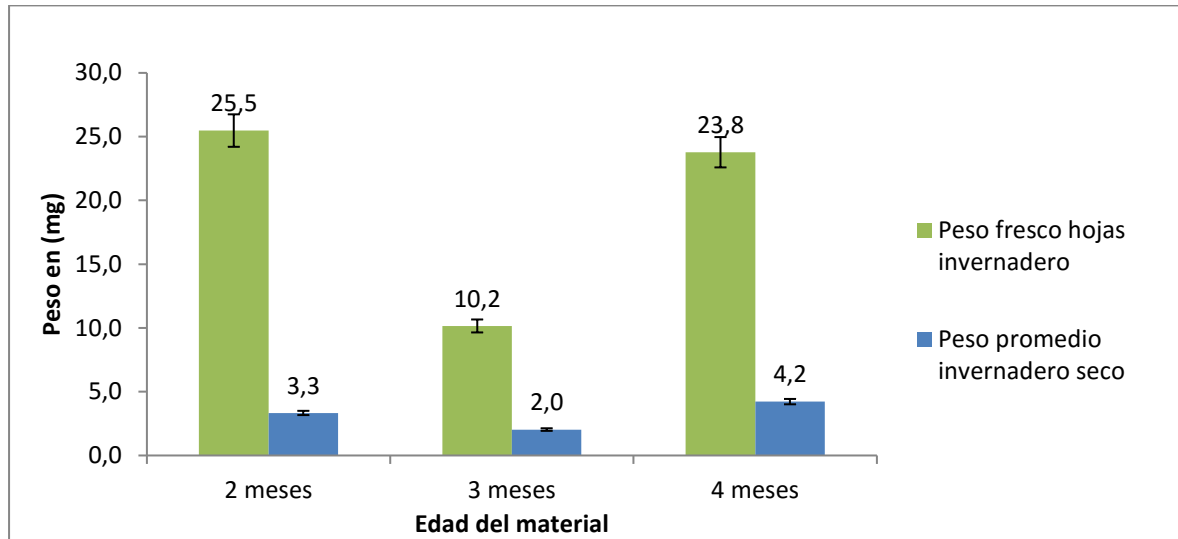


Figura 16 Comparación de peso fresco y seco de hojas de origen invernadero

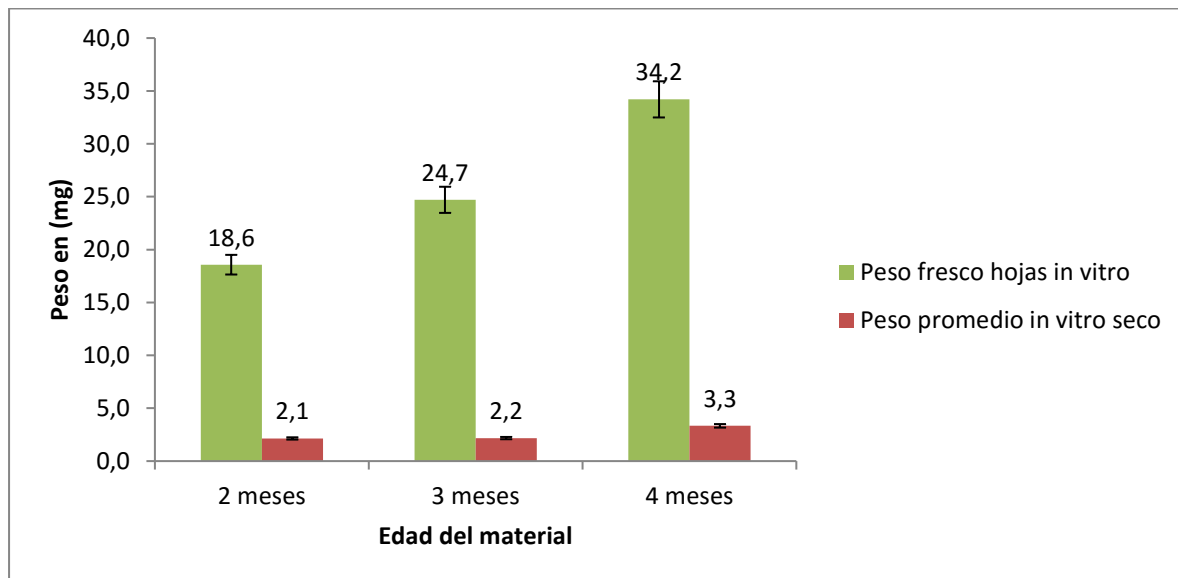


Figura 17. Comparación de peso fresco y seco de hojas de origen *in vitro*

6.3.3 Porcentaje de humedad de hojas y bulbillos invernadero vs *in vitro*

El porcentaje de humedad en los bulbillos de origen invernadero, disminuye a medida que aumentaba la edad del material, siendo el tratamiento de 4 meses, el de menor

porcentaje de humedad, con un valor de 76,3%, Por otro lado, los bulbillos de origen subcultivado presentaron un mayor valor de humedad relativa a los 4 meses de inducción, siendo el más alto del estudio con un valor de 87,5%. **Figura 18.**

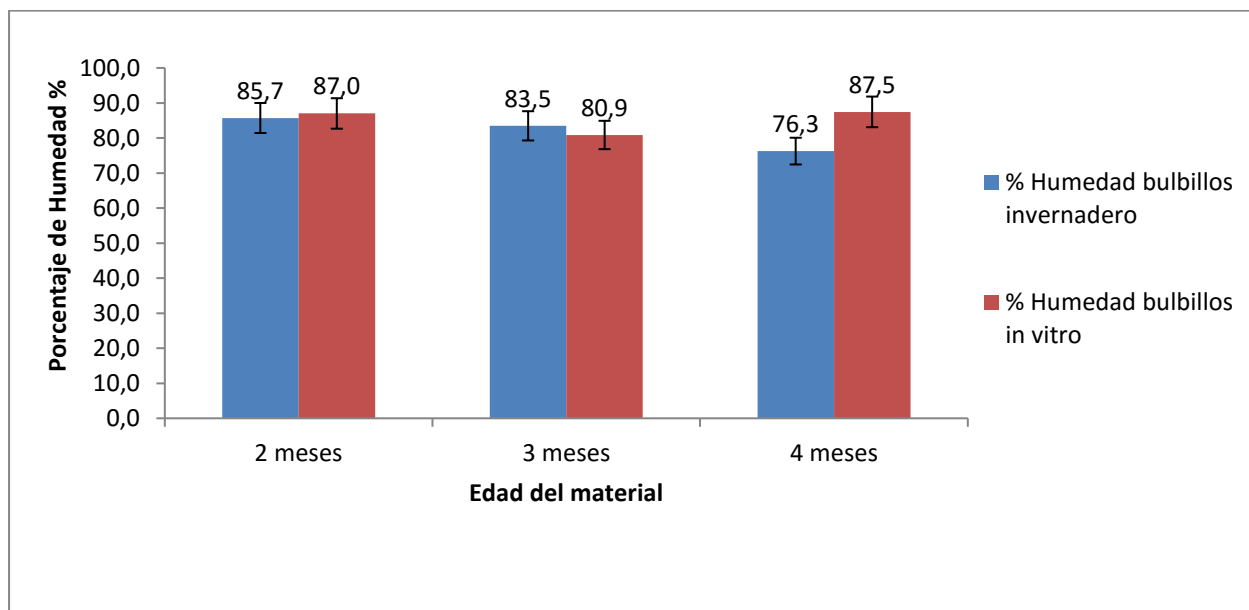


Figura 18. Porcentaje de humedad de bulbillos de origen invernadero e *in vitro*

Por otro lado, en el porcentaje de humedad correspondiente a las hojas del material invernadero, el tratamiento de 4 meses de inducción presentó el menor porcentaje de humedad con un valor de 86,2%, siendo este, el menor porcentaje de la humedad en las hojas de todo el estudio, por otra parte, el material de origen subcultivado a los 4 meses de inducción, presentó un valor de 90,3% de humedad relativa. **Figura 19**

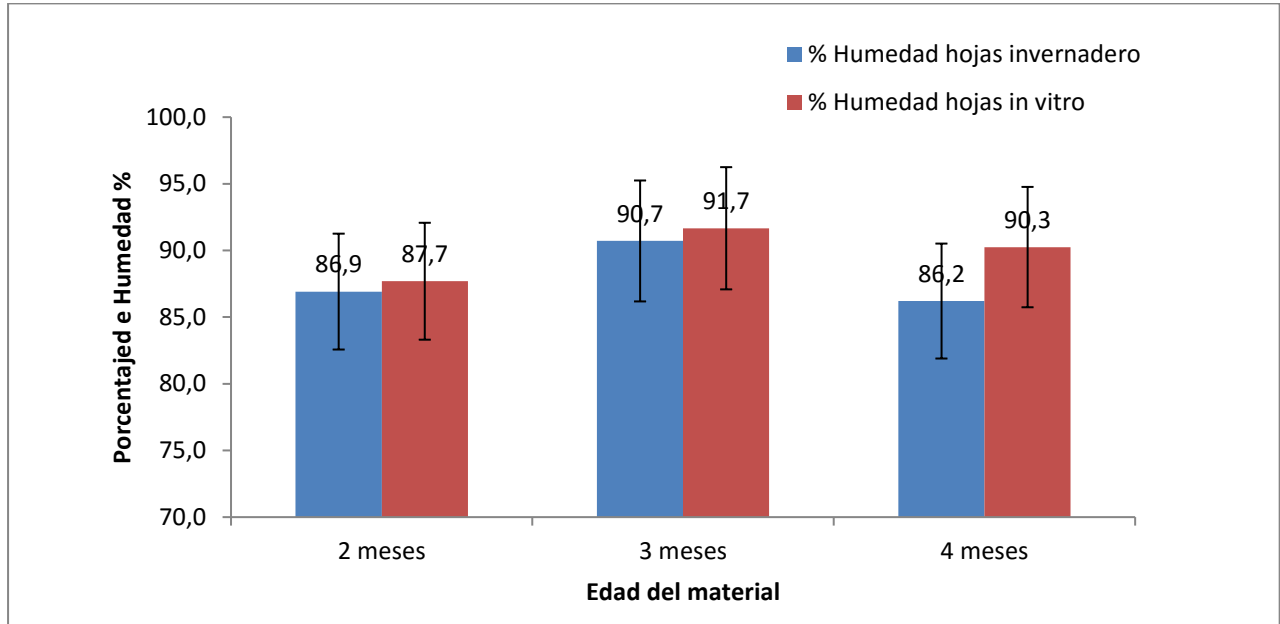


Figura 19. Porcentaje de humedad de hojas de origen invernadero e *in vitro*

6.3.4 Peso de bulbillos y hojas con diferente concentración de sacarosa

Frente a las diferentes concentraciones de sacarosa, a medida que aumentó la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, el peso fresco y seco de los bulbillos fue mayor, siendo el tratamiento de 15% de sacarosa, el de mayor peso seco con un valor promedio de 45,81 mg. **Figura 20**

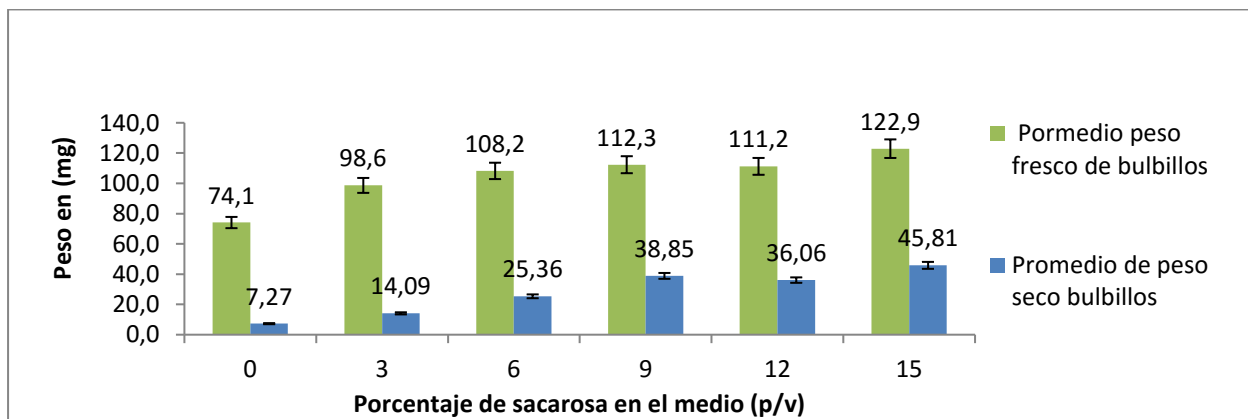


Figura 20. Comparación de pesos fresco y seco de bulbillos en diferentes concentraciones de sacarosa después de 2 meses de inducción

Por otro lado, las hojas de la especie presentaron un menor peso fresco y seco a medida que aumentaba la concentración de sacarosa en el medio, sin embargo, para el tratamiento de 3% de sacarosa, se presentó el mayor peso promedio de hoja con un valor de 3.75 mg **Figura 21**

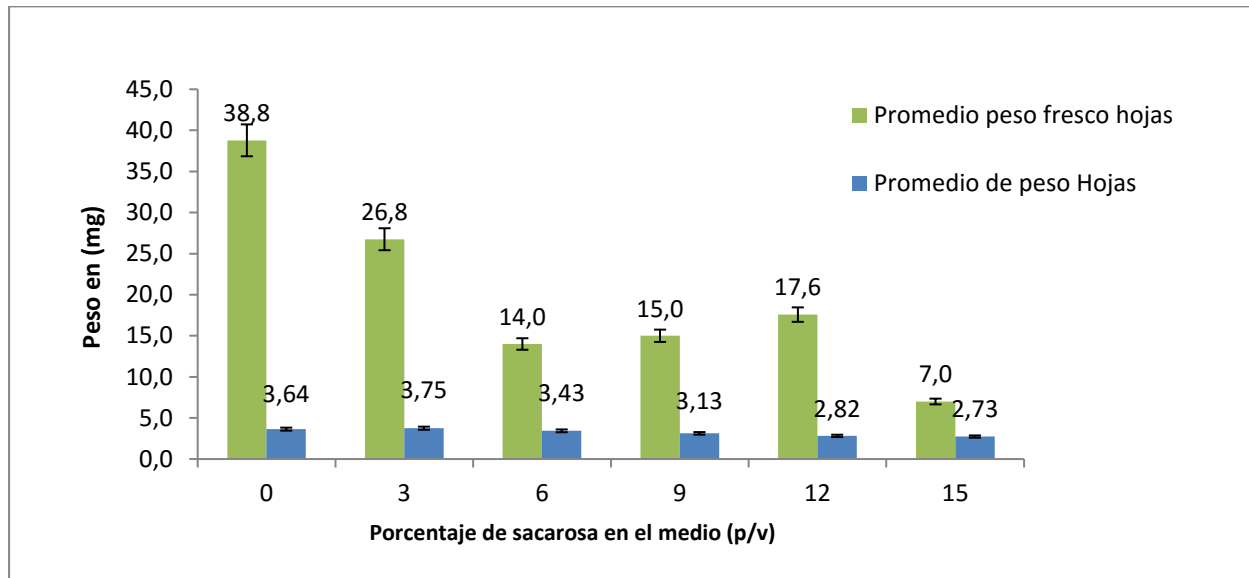


Figura 21. Comparación de pesos fresco y seco de hojas en diferentes concentraciones de sacarosa después de 2 meses de inducción

6.3.5 Porcentaje de humedad de hojas y bulbillos en diferentes concentraciones de sacarosa

Con respecto al porcentaje de humedad de los bulbillos, entre mayor fue la concentración de sacarosa en el medio, menor fue el porcentaje de humedad en los bulbillos, siendo el tratamiento de 0% el de mayor porcentaje de humedad con un valor de 90,2% y el tratamiento de 9% con el menor valor registrado de 62,3 % **Figura 22**

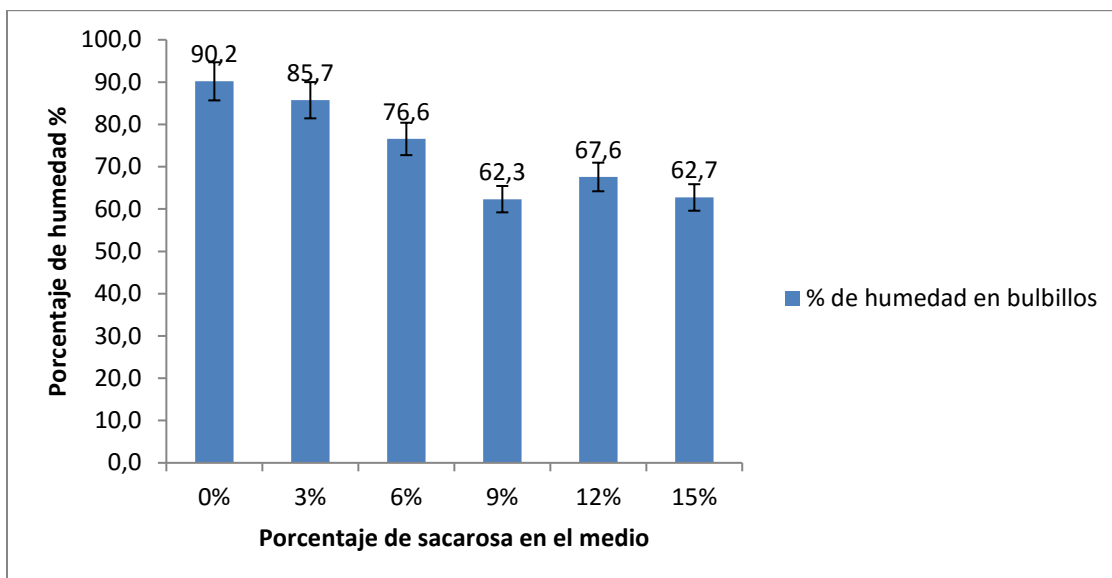


Figura 22. Porcentaje de humedad relativa de bulbillos en diferentes concentraciones de sacarosa después de 2 días de inducción

Por otra parte, con respecto al porcentaje de humedad relativa en hojas, a medida que aumentó la concentración de sacarosa en el medio, el porcentaje fue menor, siendo el tratamiento a 0% y 6% de sacarosa en el medio, los de mayor humedad relativa con valores de 90,6% y 89,8%. **Figura 23.**

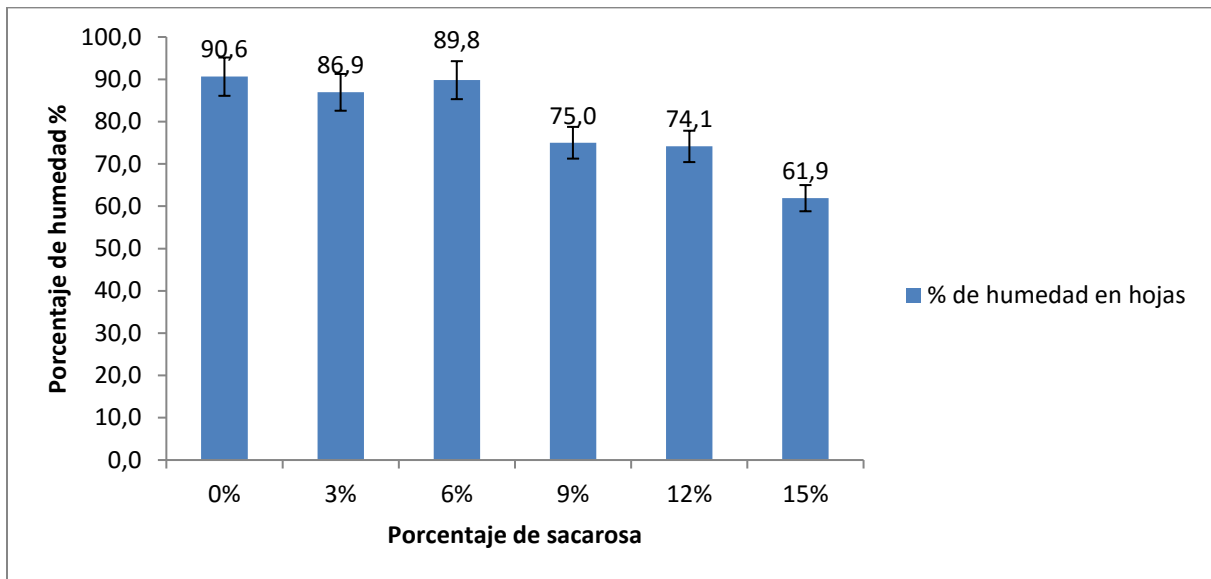


Figura 23 Porcentaje de humedad relativa de hojas en diferentes concentraciones de sacarosa después de 2 meses de inducción

6.4 Resultados de estandarización por cromatografía TLC

Para poder determinar la reproducibilidad del método, se realizó una calibración colorimétrica en las bandas, teniendo en cuenta la **Figura 24**, la cual muestra el resultado del procedimiento analítico revelado en la placa cromatográfica de Boldina, que posteriormente, se procesó por el software ImageJ, el cual analizó la intensidad colorimétrica de las bandas reveladas en la placa y las extrapolaron en áreas bajo la curva del sistema, a partir de esas áreas bajo la curva, se realizó una curva de calibración con respecto a las cantidades de boldina utilizada la cual se puede observar en la **Figura 25**. La tendencia de la curva refleja una mayor intensidad colorimétrica a medida que la concentración de boldina aumenta.



Figura 24 .Curva de calibración de boldina revelada con reactivo de Dragendorff

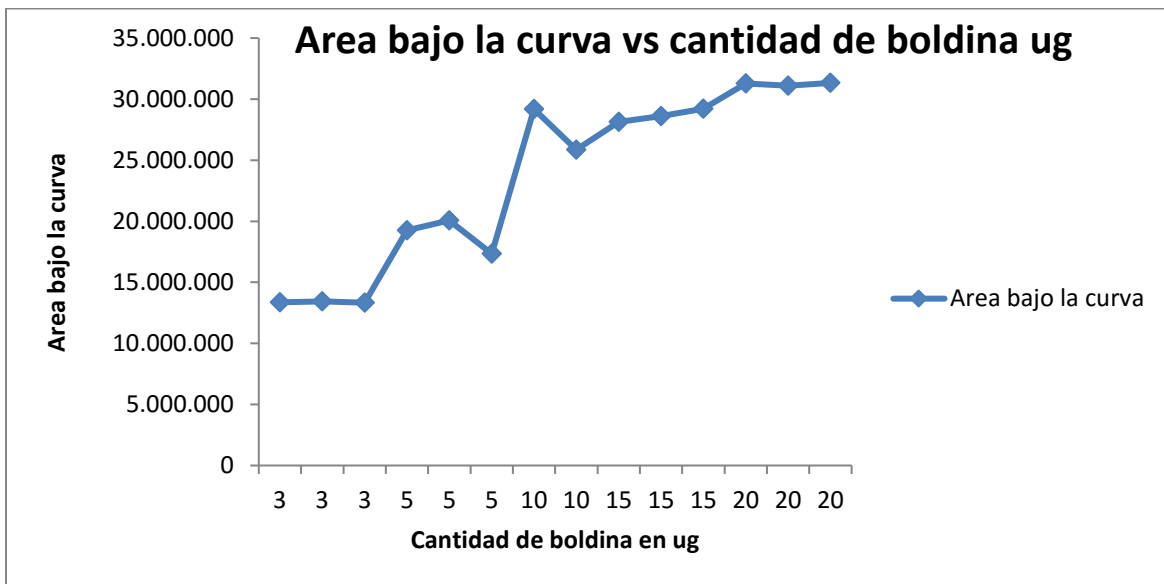


Figura 25. Relación de área bajo la curva y cantidad de boldina presente en la placa cromatografía

La curva de calibración con boldina, se representó como referente colorimétrico para los ensayos realizados con el material vegetal, el cual que fue destinado para la estandarización del método analítico por TLC. Después, se realizó un triplicado de siembra en placas de TLC, utilizando 1, 5 y 10 μ L de volumen de siembra en el capilar,

para material proveniente de 300, 400 y 500 mg hojas secas de *Zephyranthes carinata*, proveniente del de invernadero de la Universidad Icesi. Estas placas fueron reveladas con el reactivo de Dragendorff como se representa en la **Figura 26**. Debido a que no se registró una coloración marrón o similar en la placa después de utilizar el revelador, se determina que la prueba es negativa en detección de alcaloides para todas las cantidades establecidas.

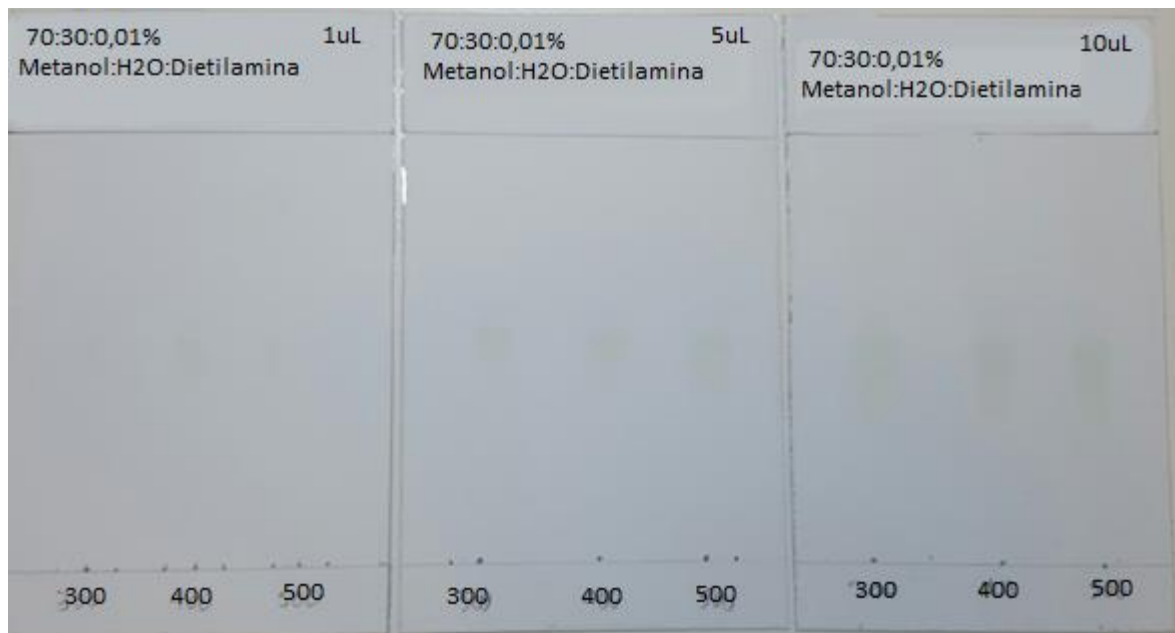


Figura 26. Placas de TLC reveladas con reactivo de Dragendorff con volumen de muestra de 1, 5 y 10 μL respectivamente

Después, se procedió a utilizar 300, 400, 500 y 1000 mg de material vegetal seco para la extracción de alcaloides, al momento de realizar la siembra en la placa cromatográfica, se utilizó únicamente un volumen de muestra de 10 μL en el capilar, con el fin de proporcionar el mayor volumen de muestra que pudiese detectar alcaloides por TLC. En la **Figura 27** se puede observar que al revelar la placa cromatográfica con reactivo de Dragendorff, la prueba de alcaloides para *Zephyranthes carinata* tuvo resultado negativo en detección para 1000 mg.



Figura 27. Placa revelada con reactivo de Dragendorff utilizando un volumen de muestra de 10 μ L

Se decidió repetir el procedimiento reflejado en la **Figura 27** para verificar si la metodología por TLC era la apropiada para el diseño experimental propuesto en la extracción de alcaloides para la especie *Zephyranthes carinata*. Para ello, se realizó una extracción vegetal con material vegetal de la especie *Hymenocallis*, la cual hace parte de la familia *Amaryllidaceae* y de la cual se ha demostrado previamente la presencia de alcaloides en su tejido vegetal (Trujillo & Madrigal, 2005). En la **Figura 28** se muestra la comparación de una curva de calibración con Boldina frente a una placa de TLC en la que se utilizaron desde 300 hasta 1000 mg de material vegetal seco extraído proveniente de *Hymenocallis*, ambas placas fueron reveladas con reactivo de Dragendorff.

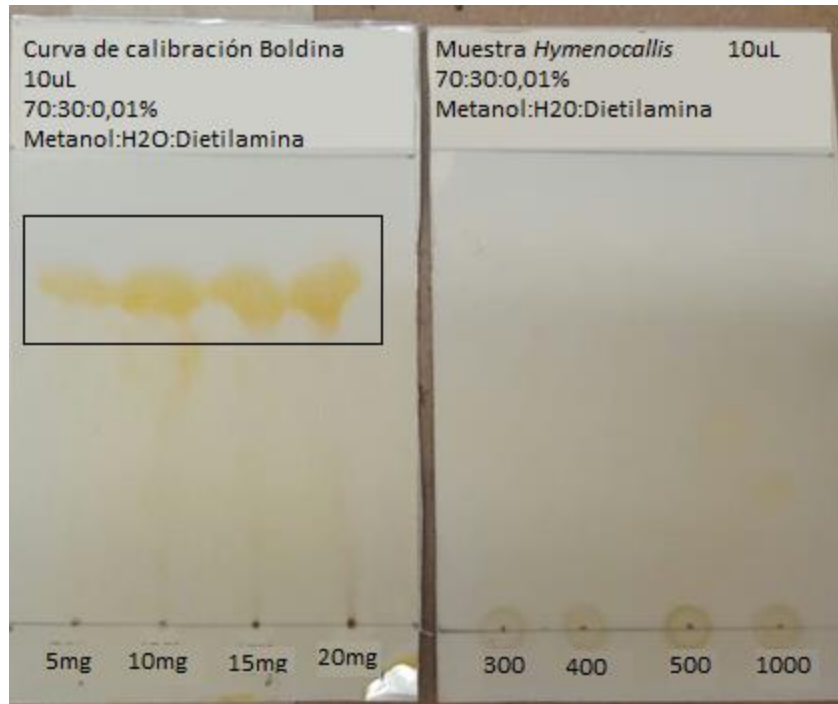


Figura 28. Placa de boldina revelada con 10 μ L de muestra inyectada (Izq.) .Placa revelada de muestra proveniente de la especie *Hymenocallis* (Der)

Por último, en la **Figura 28**, no se observó un indicador colorimétrico positivo para alcaloides por medio del revelador de Dragendorff en la placa de la muestra proveniente de la especie *Hymenocallis* (derecha), en relación con la placa revelada del estándar Boldina. (Izquierda). Por lo tanto, se verificó que la metodología de TLC para la detección de alcaloides en la familia *Amaryllidaceae* es ineficiente y poco sensible para un análisis cualitativo.

7 Discusión

7.1 Producción de material vegetal (invernadero vs *in vitro*)

En el presente trabajo se evaluó el efecto del origen de material de partida, la edad del cultivo y la concentración de sacarosa del medio sobre el desarrollo del material *in vitro* y posible efecto en la producción de alcaloides. En la evaluación correspondiente al porcentaje de formación de bulbillos, el material proveniente de invernadero presentó un 70,7% de respuesta respecto a un 76,7% del material subcultivado. El material subcultivado *in vitro* también mostró una mayor producción de bulbillos por escamas (hasta un total de 4 o 5 bulbillos por par de escamas) respecto al material del invernadero (promedio 1.48). Estas diferencias probablemente se deben a que el material subcultivado ya tiene un proceso de aclimatación del tejido vegetal en el medio *in vitro*, viene desarrollándose en unas condiciones óptimas, además de una acumulación progresiva de reguladores de crecimiento. En contraste, el material de origen invernadero se desarrolló bajo unas condiciones variables de temperatura, humedad relativa, y nutricionales, por lo que este tejido debe pasar por un período adaptación cuando se extraen las escamas de los bulbos del invernadero, y se transfieren a las condiciones *in vitro* (Preece, 1991), por lo tanto, el crecimiento es mucho más lento que el de plántulas de origen subcultivado, las cuales ya se encuentran aclimatadas a estas condiciones. Los resultados del presente estudio con la especie *Zephyranthes carinata*, son comparables a los obtenidos por Sultana & Sultana (2010) (Sultana & Sultana, 2010), los cuales reportan una respuesta del 71.77% para la formación de bulbillos a partir de escamas de bulbos obtenidos en el invernadero de la especie *Hippeastrum*.

7.2 Control de la contaminación

La contaminación es un problema importante que afecta la propagación del material vegetal. En este estudio se implementó el manejo del protocolo de esterilización estandarizado en el laboratorio de investigación en biotecnología vegetal de la Universidad Icesi (LIBV) (sesión 5. 2.1), el cual permite que solo el 10% del material, se contamina en el proceso. Los autores (Van der Linde & Hol, 1992), reportaron que en estudios de formación de bulbillos para la especie *Narcissus*, se obtuvo un porcentaje de contaminación del 40%, donde se encontró que la mayoría de los individuos fueron contaminados por el hongo *Fusarium spp.* Por lo tanto, es importante tener un adecuado manejo de los instrumentos y material vegetal frente a las condiciones asépticas que el procedimiento exige, si bien, el protocolo de esterilización tiene un bajo porcentaje de contaminación, los errores de instrumentación por parte del experimentador son los responsables de la presencia final de hongos en los cultivos,

debido a que no se utiliza un agente fungicida que pueda reducir la presencia de hongos en los individuos.

7.3 Evaluación de parámetros morfológicos

En este estudio se encontró que el origen del material de partida y la edad del cultivo sobre la respuesta *in vitro* tienen un efecto significativo tanto en la inducción y desarrollo de los bulbillos y las hojas. En general, la mayor respuesta se obtuvo a los 4 meses después del cultivo. En relación a las hojas, no se encontraron mayores diferencias entre el material proveniente del invernadero respecto al del subcultivo *in vitro*, con excepción a la longitud de las hojas que tiende a ser mayor en el material subcultivado (promedio 7,25 cm) respecto a las inducidas *in vitro* a partir del material del invernadero (promedio 5,98 cm), y al peso seco, donde las hojas obtenidas *in vitro* a partir de los bulbos provenientes del invernadero presentan un mayor peso seco (promedio 4,2 mg/ hoja) respecto a las obtenidas a partir de los bulbillos subcultivados *in vitro* (promedio 3,3 mg/ hoja). La mayor diferencia significativa se observó en el desarrollo de los bulbillos. Los bulbillos inducidos a partir del material proveniente del invernadero presentaron el mayor peso seco (3.9 veces) a los 4 meses de inducción (promedio 34,7 mg de peso seco/ bulbillito) respecto a los obtenidos a partir del material de subcultivo (promedio 8,8 mg de peso seco/ bulbillito). Estas diferencias se incrementaron aún más cuando el porcentaje de sacarosa del medio se incrementó del 3% al 15% (promedio 45,8 mg de peso seco/ bulbillito).

El desarrollo de las hojas inducidas *in vitro* en este trabajo con la especie *Zephyranthes carinata* es mayor (se obtuvieron hojas de 7,25 cm de largo) respecto al reportado para la especie *H.vittatum*, con desarrollo máximo de 3,18 cm a partir de escamas de bulbos de origen invernadero a los 3 meses de cultivo *in vitro*.

Por otro lado, estudios anteriores realizados por (Cabezas , Pigni, & Bastida, 2013) reportan que en las hojas, se almacena la mayor cantidad de alcaloides en la especie *Caliphuria subdentata*, lo cual infiere que para la especie *Zephyranthes carinata*, podría presentarse un comportamiento similar. También existen reportes previos de peso seco en hojas para la especie *Leucojum aestivum*, donde después de un mes de inducción *in vitro*, se obtuvo un peso seco promedio de 10 mg (Georgieva & Antanassov, 2014). Teniendo en cuenta lo reportado en el presente estudio para el tratamiento invernadero a los 4 meses de inducción, se puede inferir que este presenta la mayor cantidad de alcaloides respecto al peso de la hoja seca

El bulbo es un órgano de almacenamiento de nutrientes en las plantas para el crecimiento de los tallos aéreos y las hojas (Bell, 1997), al ser sometido a condiciones *in vitro*, donde el medio de cultivo le proporciona todos los nutrientes requeridos para el crecimiento de la plántula; como lo es la adición de citoquininas y auxinas (Salgado, 2016), la adaptación de la planta *in vitro* no requerirá que el bulbo absorba y almacene

nutrientes en su interior en función del tiempo. Por lo tanto, el bulbillito no crecerá longitudinalmente, pero si lo harán sus hojas. Los bulbillitos de origen invernadero, fueron más pesados que los de origen subcultivado, obteniendo el mayor valor de peso seco promedio de 34,7 mg a los 4 meses de inducción comparado con 8,8 mg del origen subcultivado. El diámetro de los bulbillitos de origen del invernadero fue visualmente mayor (datos no cuantificados). A pesar de que en los tratamientos de origen invernadero, se obtienen cantidades mayores de material vegetal seco correspondiente a los bulbillitos, en comparación con las hojas, es necesario realizar una evaluación comparativa con respecto a la cantidad total de alcaloides, encontrada en ambos tipos de material vegetal. (Peralta Navarro, 2014) Reporta que hay mayor cantidad de alcaloides en el tejido vegetal con respecto al medio de cultivo, sin embargo la metodología utilizada, no permitió distinguir que tejido tiene una mayor producción de alcaloides debido a que la muestra de material vegetal analizado consistió en una mezcla de bulbillitos y hojas. Autores como (Cabezas , Pigni, & Bastida, 2013) y (Georgieva & Antanassov, 2014) reportan que utilizaron únicamente las hojas como material de referencia para la extracción de alcaloides, debido a que en ellas se almacenan la mayor cantidad de estas moléculas en la planta. Por otro lado, (Arango Acosta, 2008) reporta que los alcaloides derivados de los aminoácidos fenil alanina y tirosina, se acumulan en las hojas, dichos aminoácidos, son los principales precursores de la formación de alcaloides en la familia *Amarilidácea* tal y como lo concluyó (Flores Hernandez, 2011). Por lo tanto, se puede inferir que en las hojas podría existir una mayor concentración de alcaloides para la especie *Zephyranthes carinata*.

7.4 Concentración de sacarosa y efecto osmótico

En relación al efecto de la concentración de sacarosa sobre la respuesta *in vitro*, existe una leve diferencia en los tratamientos de 0% y 3% de sacarosa, ambos tratamientos generaron un número de hojas por bulbillito de 2,79 y 2,68 respectivamente. A medida que la concentración de sacarosa aumentaba, el número de hojas por bulbillito fue menor. Lo anterior se puede explicar teniendo en cuenta el efecto osmótico que se presenta en el medio de cultivo. A medida que el porcentaje de sacarosa aumenta en el medio, este se comporta mucho más hipertónico con respecto a la planta (Salisbury & Ross, 1992). Por lo general, las plantas tienden a vivir en medios hipotónicos con respecto al ambiente interno de sus células y gracias a eso, pueden absorber agua por sus raíces. Ese ingreso de agua en las células provoca un grado de turgencia que facilita el crecimiento de las plantas, si esta se encuentra en un medio muy hipertónico, el flujo osmótico del agua tenderá a moverse directamente al medio de cultivo y por ende, la planta se marchitará por la pérdida excesiva de agua, ocurriendo una plasmólisis, además, con el poco requerimiento de agua en las células vegetales, la planta tiende a frenar su crecimiento (Raven & Evert, 1992) . Referente al cultivo *in vitro*, en este estudio, es necesario conocer el efecto que los solutos del medio tienen en el potencial osmótico, debido a que pueden ocasionar que los explantes *in vitro* absorban mayor cantidad de agua y ocurra hiperhidratación de tejidos (Cardenas Lara

& Villegas Monter, 2002), autores han demostrado que la sacarosa interviene en el potencial osmótico del medio de cultivo haciéndolo más negativo, frente a ello, la hiperhidratación disminuye como consecuencia de una menor absorción de agua, que dificulta la multiplicación de vástagos axilares; además, el explante tiene un contacto menos eficiente con el medio, lo que dificulta la disponibilidad de los macro y micronutrientes del mismo. Lo anterior, es congruente con el estudio reportado por (Pierik & Steegmans, 1975), quienes concluyeron que el crecimiento y organogénesis del cultivo *in vitro*, se detienen si el potencial osmótico es más negativo que aproximadamente $-3 \times 10^5 \text{ Pa} = -3 \text{ bar} (= -0.3 \text{ MPa})$, porque se impide la absorción de agua, teniendo en cuenta, que el aporte de azúcares en el potencial osmótico basal del medio de cultivo Murashige y Skoog, es de -2,20 bar (Yoshida F, 1973). Otro efecto a considerar, con respecto a la degradación del material bajo altas concentraciones de sacarosa, es el causado por la producción de metabolitos bajo la acción ocasionada por la enzima invertasa, la cual se localiza en las células de la pared celular (George & Hall, 2008). Cuando la invertasa genera los monómeros fructosa y glucosa, los problemas de toxicidad en el tejido vegetal vienen relacionados directamente en la formación del 5-hidroximetil-2-furaldehído, el cual es generado por la degradación de la fructosa en altas temperaturas cuando el medio de cultivo es autoclavado (Azofeifa, 2009). Por lo tanto, si se aumenta la concentración de sacarosa, es posible que el metabolito generado por la fructosa se pueda encontrar en mayor cantidad y afecte de manera relevante los tejidos de la planta de forma oxidativa. Estos efectos también explican los valores decrecientes de longitud de bulbillos y de hojas a medida que la concentración de sacarosa es mayor en el medio de cultivo. Por otro lado, en las hojas se presentó un color marrón característico, cada vez más pronunciado a medida que la concentración de sacarosa aumentaba en el medio, esto pudo ser producto del fenómeno de senescencia, el cual se presenta por factores bióticos o abióticos y que se caracteriza por la pérdida de clorofila reflejada en el color pardo de las hojas, que culmina con la marchitez y, a menudo, la abscisión de la hoja (Perez & Galindo, 2007). Los resultados de este comportamiento, fueron similares a los que al que reportaron (Diaz & Carmona, 2015) para la especie *Dioscorea spp* donde al final obtuvieron 6% de pérdida en las hojas al cabo 8 meses de cultivo *in vitro*.

Por otro lado, se evidenció que a medida que la concentración de sacarosa aumenta, la humedad relativa de las hojas y bulbillos disminuye, esto se debe a la existencia de un flujo osmótico del medio hacia la planta (Raven & Evert, 1992) en donde se presenta un mayor porcentaje de agua en las hojas cuando se tiene menor concentración de sacarosa, por lo tanto el peso de la hoja será mayor y al secarse, su porcentaje de humedad relativa por evaporación del agua será elevado.

7.5 Evaluación de peso seco en material vegetal

Los individuos con mayor longitud de hoja, pertenecen a los tratamientos de 0% de sacarosa y 3%, cuyos valores son 5,37 y 5,44 cm, respectivamente. Teniendo en cuenta lo anterior, este par de tratamientos tuvieron valores elevados de humedad relativa en hojas: 90,6% para tratamiento de 0% de concentración de sacarosa y 86,3% para el tratamiento de 3%, esto confirma lo reportado por (Barceló & Rodrigo, 1995), quienes reportaron que el material vegetal fresco contiene alrededor de 85% de su peso en agua. Para el tratamiento de 3% de sacarosa, se obtuvo un menor porcentaje de humedad relativa y un mayor peso promedio de hoja (3,75 mg).

Referente al peso de los bulbillos, se observó que en el tratamiento de 15% de sacarosa, el promedio de peso fue de 45,81 mg, a medida que aumentaba la concentración de sacarosa, el valor del peso seco en bulbillos fue mayor. Este comportamiento, fue similar en un estudio realizado por (Lipavska H, 1996), donde encontraron que cuando se utiliza una concentración alta de sacarosa aumenta la acumulación de materia seca, coincidiendo con los valores crecientes de peso en los bulbillos. A pesar de que el peso seco en los bulbillos es considerablemente mayor al peso seco de las hojas, varios autores reportan que el contenido de alcaloides en la familia *Amarilidácea*, se encuentra presente en las hojas, no obstante, es interesante el comportamiento que presentaron los individuos frente al tratamiento con sacarosa, ya que el peso de los bulbillos fue aumentando a medida que el porcentaje de la fuente de carbono era mayor, posiblemente, se deba a un comportamiento asociado a la absorción de nutrientes por parte del bulbo. Sin embargo, el elevado peso promedio seco de los bulbillos obtenidos *in vitro*, sugiere que es importante evaluar por separado el contenido de alcaloides en los bulbillos y las hojas), para determinar el material seco que tiene la mayor producción de alcaloides en la especie *Zephyranthes carinata*.

7.6 Estandarización de metodología analítica cromatografía capa fina (TLC)

Para la estandarización de la técnica analítica por cromatografía de capa fina o cromatografía plana (TLC), se realizó una serie de diluciones del estándar de Boldina en metanol, teniendo en cuenta la metodología realizada, se sembraron las diluciones correspondientes a (3, 5, 10, 15,20) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, en una fase móvil de Metanol/Agua/Di etilamina 70:30:0,01 y se llevó a un pH de 3,5 con ácido fórmico. (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984). En la **Figura 24** se evidencia la intensidad colorimétrica de la placa cromatográfica revelada con el reactivo de Dragendorff, el cual genera una coloración marrón indicando que en el analito hay presencia de moléculas alcaloides. La intensidad colorimétrica de las bandas correspondientes a las concentraciones, demostraron un comportamiento mucho más intenso a medida que la concentración era mayor, no obstante, para las concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ es poca la diferencia

visual con respecto a la intensidad colorimétrica reflejada, esto pudo asociarse a un posible error experimental en la toma de la alícuota de las diluciones. Sin embargo, se realizó una curva de calibración utilizando un registro fotográfico de la placa y llevándolo al software ImageJ donde se seleccionaron las bandas correspondientes al revelado por el reactivo de Dragendorff y se procesaron cuantitativamente en áreas bajo la curva **Figura 25**. El área bajo la curva reflejó un comportamiento creciente a medida que la concentración de boldina en la alícuota sembrada era mayor. Frente al resultado positivo de lectura de alcaloides para el estándar boldina, se realizó una toma de muestra de hojas provenientes del invernadero de la especie *Zephyranthes carinata* y se separó el material seco en pesos de 300, 400, 500 y 1000 mg **Figura 26**, después de realizar el protocolo de extracción, se utilizaron diferentes volúmenes de alícuotas (1, 5, 10 μ L) para cada una de las muestras **Figura 27** las cuales fueron reveladas posteriormente con el reactivo de Dragendorff y se obtuvieron resultados negativos para la detección colorimétrica de alcaloides. Teniendo en cuenta lo anterior, se especulaba que la técnica no era lo suficientemente sensible para detectar alcaloides en *Zephyranthes carinata*. Sin embargo, se decidió realizar el mismo procedimiento, utilizando material vegetal de la especie *Hymenocallis*, de la cual, autores reportan alcaloides como la licorina por medio de una técnica RNM (Long-Ze & Shu-Fang, 1995). Luego de realizado el procedimiento de extracción, se tomó una alícuota de 10 μ L para el material vegetal seco (300, 400, 500 y 1000 mg) **Figura 28**, donde se reportó que la prueba de alcaloides utilizando la metodología cromatográfica de TLC tuvo una respuesta negativa en detección de alcaloides. Posiblemente, los resultados negativos de la prueba, se deben a que la cantidad de muestra vegetal del material seco es insuficiente para la detección final, teniendo en cuenta que existen otros tipos de técnicas analíticas que utilizan una cantidad de muestra aproximada de 300 mg de material vegetal seco, y la detección y cuantificación final de alcaloides es realizada por medio de un equipo de cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS) (Cortes, y otros, 2015). También se reportan trabajos realizados en la detección de alcaloides de *Amaryllidaceae* donde constatan el uso de hasta 100mg de peso seco del material vegetal que fue detectado por un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). (Georgieva & Antanassov, 2014).

8 CONCLUSIONES

1. El material subcultivado presentó una mayor formación de bulbillos (76,7%) respecto al material proveniente de invernadero (70.6%). El material subcultivado genera entre 4 y 5 bulbillos por explante, correspondiente a 3,5% y 2,3% del material subcultivado total, respectivamente.
2. La mayor respuesta se obtiene, a los 4 meses de inducción. El tratamiento sin sacarosa indujo el mayor número de hojas por bulbillito.
3. La longitud de las hojas tiende a aumentar a medida que aumenta el tiempo de cultivo *in vitro* tanto para el material proveniente del invernadero como el obtenido por subcultivo *in vitro*.
4. De acuerdo al porcentaje de humedad y peso promedio de las hojas, el tratamiento invernadero de los 4 meses de inducción y el tratamiento de sacarosa al 3% son los tratamientos que presentaron menor humedad relativa y mayor cantidad de peso seco promedio en las hojas, donde posiblemente el contenido de alcaloides en las plántulas, será mayor.
5. El peso seco de bulbillos fue considerablemente mayor al de las hojas, principalmente en el tratamiento invernadero al 4to mes de inducción. A una concentración del 15% de sacarosa en el medio de cultivo, el peso seco promedio de bulbillos fue 10 veces mayor al de las hojas. Es necesario un estudio comparativo de producción de alcaloides en ambos tipos de tejidos para determinar la concentración máxima de alcaloides en la especie.
6. La técnica analítica de TLC, no es una técnica apropiada para realizar un análisis cuantitativo de producción de alcaloides en la familia *Amaryllidaceae* en condiciones *in vitro*, ya que se necesita gran cantidad de material vegetal para que la metodología pueda obtener resultados medibles de acuerdo a la sensibilidad de la técnica.
7. Para realizar un análisis cuantitativo reproducible de la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata*, es necesario utilizar técnicas analíticas más sensibles de acuerdo a la toma de muestra. Técnicas como el GC/MS o el UPLC, permiten utilizar una menor cantidad de muestra vegetal seca que será procesada para la obtención de resultados confiables.

9 RECOMENDACIONES

Es necesario realizar un análisis del diámetro del bulbillo de las plántulas en cada uno de los tratamientos, ya que es una variable que ayuda a predecir el comportamiento de la plántula frente a la absorción de nutrientes e inducción en medios de cultivo que contengan fitohormonas asociadas al crecimiento celular, que puedan dar indicios de aumento la producción de alcaloides en la planta, tal y como lo reportan (Ozel & Khawar, 2007). Una posible técnica a implementar, consistiría en dividir el bulbo a la mitad y colocar la superficie en un papel milimetrado para calcular el diámetro total del bulbo.

Para futuros trabajos experimentales respectivos a la cuantificación de alcaloides producidos en plantas, se recomienda incluir en la metodología, equipos con un rango de detección mucho más sensible como lo es el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, ya que el equipo permite resolver problemas de cantidad de muestra utilizada y su funcionamiento permite una toma de resultados de manera más reproducible.

El equipo de espectrometría de masas para cromatografía de gases es un sistema combinado que reúne el poder de discriminación y la sensibilidad de un cromatógrafo de gases (GC) con la especificidad para la muestra analizada que aporta una técnica espectroscópica. Puede proporcionar datos espectrales altamente específicos de las distintas sustancias presentes en una mezcla compleja sin necesidad de aislarlos previamente. (Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína , 2012). El análisis realizado en este equipo, consiste en recuperar una cantidad aproximada de 2mg de extracto en 1mL de metanol por muestra para ser procesado por el equipo a través de un capilar teniendo en cuenta un estándar de Boldina como referencia que se inyecta en el equipo. (Cortes, y otros, 2015)

Para posteriores estudios, es necesario realizar un trabajo experimental más profundo frente a los tratamientos de 0% y 3% de concentración de sacarosa en el medio de cultivo, puesto a que ambos tratamientos presentaron valores de humedad relativa, peso promedio de hoja, longitud de hoja y número de hojas por bulbillo muy similares. Por otro lado, también es importante evaluar el contenido de alcaloides en bulbillos cuando estos son sometidos a altas concentraciones de sacarosa, puesto que al 15% en el medio de cultivo se encontró el mayor peso seco de bulbillos en las plántulas. Se necesitan realizar un estudio mucho más amplio frente a otras variables que puedan intervenir en estos tratamientos para definir el más adecuado frente a la producción de alcaloides.

A pesar de utilizar el protocolo de esterilización, el cual ayuda a reducir la contaminación en la inducción de escamas y plántulas en el medio de cultivo, es indispensable verificar el estado de limpieza y esterilidad de los instrumentos que tienen contacto directo con el material vegetal, así mismo, el estado de limpieza y esterilidad de la cabina de flujo laminar debe verificarse antes de realizar un proceso de inducción.

10 REFERENCIAS

- Acosta, J. L., Jimenez-Alayola, J., Lopez-Segovia, L., & Borbolla-Sala, M. E. (2006). Eficacia de la Galantamina en los síntomas de demencia del tipo Alzheimer, vascular y mixta. *Salud en Tabasco*, 423-436.
- Akalezi, C., Liu, S., Li, Q., Yu, J., & Zhong, J. (1999). Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. *Process Biochemistry* 34(6), 639-642.
- Arango Acosta, G. J. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Medellín: Universidad de Antioquia, 34-56
- Arias Zabala, M., Angarita Velasquez, M. J., Aguirre Cardona, A. M., Restrepo Florez, J. M., & Montoya Vallejo, C. (2009). *Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales*. Medellín .1-5.
- Avalos, A., & Perez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología).Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3), 119-145.
- Azofeifa, A. (2009). *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro*. San Jose: Agronomía mesoamericana, 3-6
- Barceló, J., & Rodrigo, N. (1995). *Fisiología Vegetal*. 7 Ed. Madrid: Ed. Piramide.
- Bell, A. D. (1997). *Plant Form: an illustrated guide to flowering plant morphology*. Oxford University Press, U.K.
- Cabezas, F., Pigni, N., & Bastida, J. (2013). Análisis del contenido alcaloídico de *Caliphuria Subdentata* Baker (Amaryllidaceae) por el método CG-EM. *latinoam. quím vol.41 no.1*, 4.
- Cabezas, F., & Codina, C. (2012). *Algunas especies colombianas de amaryllidaceae como fuentes potenciales de inhibidores de enzimas*. Popayan.
- Cardenas Lara, A., & Villegas Monter, A. (2002). Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación in vitro. *Rev. Fitotec. Mex. Vol. 25 (2)*, 4.
- Celis, M., & Bernal, R. (2015). *Catalogo plantas de colombia*. Recuperado el 9 de 11 de 2015, de <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/nc/resultados-de>

busqueda/nombre/Zephyranthes%20carinata.html?tx_biovirtual_catalogo%5Baccion%5D=list&tx_biovirtual_catalogo%5Bcontroller%5D=Especies

- Charry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagacion de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata.
- 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.
- Cortes, N., & Posada-Duque, R. A. (2014). Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sciences*, 8.
- Cortes, N., Duque, R., Alvarez, R., Alzate, F., Berkov, S., Gloria, C. P., & Osorio, E. (2015). Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sciences*, 42-50.
- Diaz, L., & Carmona, O. (2015). Optimizacion de la conservacion in vitro de germoplasma de *Discorea* spp por crecimiento minimo. *Revista Colombiana de Biotecnologia*, 6.
- Escobar Fuertes, A. (2014). *Caracterizacion quimica de alcaloides del genero Zephyranthes sp*. Santiago de Cali: Universidad Icesi.
- Fennell, C. W. (2002). *Micropropagation and Secondary Metabolite Production in Crinum macowanii*. Pietermaritzburg.: PhD Thesis. University of Natal.
- Fennell, C. W., & Van Staden, J. (2004). Biotechnology of southern African bulbs . *South African Journal of Botany*, 70, 37-46.
- Flores Hernandez, M. A. (2011). Compilación bibliográfica brugmansia spp. *trabajo recepcional, universidad veracruzana*, 23.
- Fuster, S. B. (1994). *Aislamiento y caracterizacion quimica de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Produccion de galantamina por cultivos "in vitro" de Narcissus confusus*. Barcelona.
- George, E. F., & Hall, M. A. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Merriott: Springer.
- Georgieva, L., & Antanassov, A. (2014). Long-term in vitro storage and multiplication of *leucojum aestivum* L. *Biotechnol.& Biotechnol. eq*, 6.

- 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.
- Katoch, D., Kumar, S., Kumar, N., & Bigkr, S. (2012). Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS . *ELSERVIER Volume 71*, 187–192.
- Klee, H., & Estelle, M. (1991). Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio*, 529-551.
- Konrath, E. L., Passos, C., Klein-Junior, L., & Henriques, A. (2013). Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journak of Pharmacy and Pharmacology*.
- Lipavska H, D. V. (1996). Utake of mannitol from the media by in vitro grown plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45 (2), 103-107.
- Long-Ze, L., & Shu-Fang, H. (1995). Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. *ELSEVIER*, 4.
- Martin , S. (1987). The Amaryllidaceae Alkaloids. En A. Brossi, *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology V30* (pág. 383). Texas: Academic Press inc.
- Mesa, D., Romero, A., & Cruz, A. M. (2002). Estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagacion in vitro de la *Leucaena leucocephala* vc Peru. *Revista Cubana de Ciencias Agricola, Tomo 36, No 3*, 271-274.
- Muñoz David, M. A. (2006). *Estudio de sistemas de cultivo Invitro, aclimatizacion de plantulas y crecimiento de bulbos en tres especies de Rhodophiala Presl. (Amaryllidaceae)*. Valdivia.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497.
- Niño, J., Correa, M., Mosquera, M., & Ramirez, L. (2005). *Cuantificaion de licorina, en callos y raices cultivados in vitro de crinum x powelli "album2 (amaryllidaceae) por cromatografia liquida de alta eficiencia (HPLC)*. Pereira.
- O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., & Speisky, H. (2006). *Boldine and its Antioxidant or Health-Promoting Properties*. 17.
- Ozel, A., & Khawar, K. (2007). In vitro Axillary Bulblet Regeneration of Turkish Yellow Grape Hyacinth, (*Muscari macrocarpum* Sweet) from Twin Scale Explants. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5.

- Peralta Navarro, L. A. (2014). *Cultivo in vitro de tejidos vegetales de plantas del genero zephyranthes y evaluacion de si produccion de alcaloides*. Santiago de cali.
- Perez, Y., & Galindo, I. (2007). La muerte celular programada en las plantas: ¿es semejante a la “apoptosis” en animales? *interciencia*, 8.
- Pierik, R. M., & Steegmans, H. M. (1975). Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of rhododendrom. *Scientia Hort*, 1-20.
- Preece, J. E. (1991). Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. *Micropropagation technology and application*, 71 – 93. .
- Rasband, W. (3 de mayo de 2016). *Image Processing And Analysis in Java*. Recuperado el 4 de marzo de 2016, de <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>
- Raval, K., Hellwing, S., Prakash, G., Ramos, A., Srivastava, A., & Buchs, J. (2003). Necessity of two stage process for the production of azadirachtin related limonoids in suspension cultures of Azadirachta indica. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (1), 16-22.
- Raven, P. H., & Evert, R. F. (1992). *Biología de las plantas Volumen 2*. Barcelona: REVERTÉ.
- Razdan, M. (2003). *Introduction to Plant Tissue Culture*. Delhi: Science Publishers.
- Reyes Moreno, J. E. (2014). *Cultivo in vitro de tejidos vegetales de plantas de la familia amaryllidaceae*. Santiago de Cali.
- Rice, L. J., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2011). In vitro bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales-, *Volume 77*, 305-312.
- Sakakibara, H. (2006). CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 18.
- Salgado, R. (9 de mayo de 2016). *Revista de divulgacion de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. Recuperado el 31 de mayo de 2016, de <http://www.sabermas.umich.mx/archivo/secciones-antiores/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html>
- Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (1992). *Plant Physiology*. Belmont: Wadsworth Publishing Company.
- Selles, M., Bergoñon, S., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (1997). Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49, 129.

- Silverstone-Sopkin, P. (2011). *Los muertos vivientes: la historia natural de cuatro lirios amazónicos del suroccidente de Colombia (Eucharis y Plagiolirion, Amaryllidaceae)*. Santiago de Cali: Universidad del Valle Programa Editorial.
- Sultana, J., & Sultana, N. (2010). In vitro bulb production in *hippeastrum* (*hippeastrum hybridum*). *Journal of central European Agriculture* vol 11, 6.
- Tahchy, A., Bordage, S., Ptak, A., Dupire, F., Barre, E., Guillou, C., . . . Laurain-Mattar, D. (2011). Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 381-390.
- Trujillo, S., & Madrigal, B. (2005). *Plantas antimaláricas de Tumaco*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Valcarcel Cases, M., & Gómez Hens, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: editorial reverté, s.a.
- Valerin, A. T. (10 de Julio de 2015). *DocSlide*. Recuperado el 31 de mayo de 2016, de Aclimatación de plantulas producidas in vitro: <http://myslide.es/documents/aclimatacion-de-plantulas-producidas-in-vitro.html>
- Van der Linde, P. C., & Hol, G. M. (1992). Reduction of contamination in bulb explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parents bulbs. *Plant cell, tissue Organ Culture*, 5.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas*. Munich: Springer.
- Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E. M. (1984). *Plant Drug Analysis*. New York.
- Yoshida F, T. K. (1973). The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco I. Effects of salts, sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chlorophyll contents and mineral absorption of cells. *Plant Cell Physiol.* 14, 329-339.
- Zayed, R., & Berkov, S. (2011). in vitro micropropagation and alkaloids of *hippeastrum vittatum*. *in vitro cell*, 8.

