

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL METIL JASMONATO Y EL ÁCIDO
JASMÓNICO EN LA LIBERACIÓN DE ALCALOIDES PRODUCIDOS *in vitro* EN
*Zephyranthes carinata***

DANIELA ALISANDRE VALVERDE

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI**

2017

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL METIL JASMONATO Y EL ÁCIDO
JASMÓNICO EN LA LIBERACIÓN DE ALCALOIDES PRODUCIDOS *in vitro* EN
*Zephyranthes carinata***

DANIELA ALISANDRE VALVERDE

Trabajo de grado para optar al título de pregrado de Química Farmacéutica

Directora: Zaida Lentini, Ph.D

Co-Directores: Guillermo Montoya, Ph.D y Geraldine Restrepo, Bióloga

UNIVERSIDAD ICESI

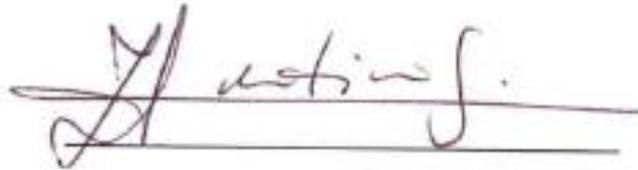
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

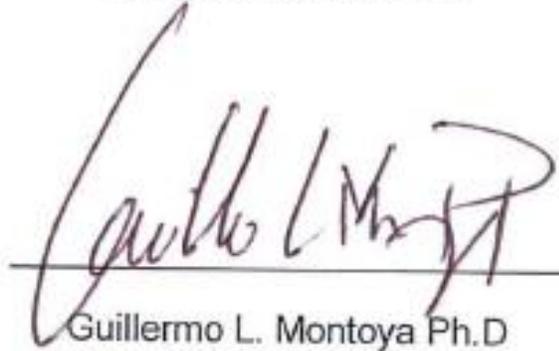
SANTIAGO DE CALI

2017

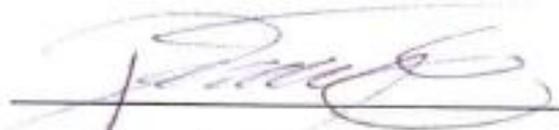
APROBADO

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Zaida Lentini', written over a horizontal line.

Zaida Lentini Ph.D
Directora del proyecto

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Guillermo L. Montoya', written over a horizontal line.

Guillermo L. Montoya Ph.D
Co-director del proyecto

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Aram Joel Panay', written over a horizontal line.

Aram Joel Panay Ph.D
Evaluador del proyecto

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	15
2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia.....	15
2.2 Marco teórico y estado del arte.....	16
2.2.1 Familia Amaryllidaceae.....	16
2.2.2 Alcaloides.....	18
2.2.3 Alcaloides de la familia <i>Amaryllidaceae</i>	20
2.2.4 Inductores químicos o elicitores.....	22
2.2.5 Extracción e identificación de alcaloides.....	26
2.2.6 Métodos de identificación y/o cuantificación.....	27
2.3 OBJETIVOS.....	31
2.3.1 Objetivo general.....	31
2.3.2 Objetivos específicos.....	31
2.4 METODOLOGÍA.....	32
2.4.1 Recolecta del material vegetal.....	32
2.4.2 Esterilización superficial del material de invernadero.....	33
2.4.5 Cultivo <i>in vitro</i> por la técnica <i>twin scale</i>	33
2.4.4 Preparación de los medios de cultivo <i>in vitro</i>	34
2.4.4.1 Preparación medio semi-sólido MSA1.....	34
2.4.4.2 Preparación medio líquido MSAJ o MSMJ.....	37
2.4.5 Subcultivo del material vegetal generado <i>in vitro</i> en el medio de cultivo líquido.....	38
2.4.6 Extracción de alcaloides.....	42
2.4.6.1 Extracción del material vegetal.....	42

2.4.6.2 Extracción de medio líquido	44
2.4.7 Análisis y cuantificación de alcaloides.....	44
2.4.7.1 Identificación de alcaloides	45
2.4.7.2 Semicuantificación de alcaloides.....	47
2.4.8 Análisis estadísticos de los resultados	48
2.5 RESULTADOS.....	49
2.5.1 Inducción de bulbillos en medio MSA1 a partir de bulbos provenientes del invernadero	49
2.5.2 Evaluación del peso fresco, seco y porcentaje de humedad del material vegetal producido.....	49
2.5.3 Evaluación del efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico..	52
2.5.3.1 Identificación de alcaloides	53
2.5.3.2 Cuantificación de alcaloides totales.....	56
2.5.4 Efecto inductor del ácido jasmónico y el metil jasmonato.....	57
2.6 DISCUSIÓN	61
2.7 CONCLUSIONES	68
2.8 RECOMENDACIONES.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	72

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. <i>Zephyranthes carinata</i>	16
Figura 2. Estructura del bulbo	17
Figura 3. Aminoácidos y bases que dan origen a los alcaloides por diferentes rutas biosintéticas.	19
Figura 4. Tipos de alcaloides producidos por la familia de plantas Amaryllidaceae	21
Figura 5. Efecto de los inductores en la ruta biosintética de metabolitos secundarios. Los elicitores o determinantes virulentos son percibidos por los receptores localizados en la membrana citoplasmática. Los receptores activan los canales iónicos y proteínas G que a su vez activan las fosfolipasas como PLA2. Las fosfolipasas hidrolizan los fosfolípidos en ácidos grasos, los cuales son utilizados como precursores de los jasmonatos (Ruta de octadecanoides) y oxilipinas. La oxidación de estas moléculas activa la biosíntesis de metabolitos secundarios (Zhao, Lawrence, & Verpoorte, 2005).	24
Figura 6. Estructura química de A) Ácido Jasmónico y B) Metil Jasmonato.	24
Figura 7. Efecto del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la ruta biosintética de los alcaloides de Amaryllidaceae. Las flechas grises señalan la ruta biosintética que se vio influenciada por el metil jasmonato y las flechas blancas señalan la ruta biosintética influenciada por el ácido jasmónico. Las flechas que están resaltadas en negrilla son aquellas que mostraron mayor activación y las que no están resaltadas mostraron menos activación (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013)	25
Figura 8. Cromatografía planar	28
Figura 9. Interacción de un analito con la fase móvil y la fase estacionaria en una columna cromatográfica.	29
Figura 10. Ejemplo de un cromatograma. En el eje X se muestra el tiempo de retención de cada molécula y en el eje Y el porcentaje de cada molécula retenida.	29
Figura 11. Ejemplo de espectro de masas. En el eje X se muestra la relación carga/masa (m/z) y en el eje Y el porcentaje de abundancia de cada fragmentación	30
Figura 12. Protocolo de cultivo in vitro por técnica twin scale	34
Figura 13. Frasco compota con 25 mL de medio MSA1	37
Figura 14. Esquema experimental de tratamientos con MJ o AJ por repeticiones	41
Figura 15. Ejemplo de espectro cromatográfico obtenido en la identificación de alcaloides de la especie <i>Zephyranthes carinata</i> . En el eje x se tiene el tiempo de retención y en el eje Y se tiene el porcentaje de cada pico retenido. Este espectro se obtuvo con el UPLC/MS Waters® (SQD2) y el software masslinx.	46
Figura 16. Ejemplo espectro de masas obtenido en la identificación de alcaloides de la especie <i>Zephyranthes carinata</i> . Espectro obtenido de la molécula retenida al tiempo 0,96. En el eje X se tiene la relación masa carga (m/z) y en el eje Y el porcentaje de abundancia de las diferentes fragmentaciones de la molécula retenida	

al tiempo 0,96. Este espectro se obtuvo con el UPLC/MS Waters® (SQD2) y el software masslinx.	46
Figura 17. Áreas de cada molécula retenida a los diferentes tiempos de retención. En el eje X se encuentra el tiempo de retención y en el eje Y el porcentaje de cada pico retenido. Este espectro se obtuvo con el UPLC/MS Waters® (SQD2) y el software masslinx	47
Figura 18. Inducción de bulbillos después de un mes del cultivo de las escamas (twin scales) en condiciones in vitro. A) Escamas sin cambio de color. B) Escamas que presentan cambio de color. C) Escamas con formación de bulbillos.	49
Figura 19. Peso seco promedio por bulbillito después de 10 días de tratamiento con o sin inductores.....	51
Figura 20. Porcentaje de humedad por bulbillito después de 10 días de tratamiento con o sin inductores	51
Figura 21. Porcentaje de peso seco por bulbillito después de 10 días de tratamiento con o sin inductores	52
Figura 22. Bulbillos después del tratamiento con o sin inductores.....	52
Figura 23. Concentración total de alcaloides obtenidos por tratamiento en el medio líquido (% p/V, Barras Azules) y tejido vegetal (% p/p, Barras Verdes). Se presentan los resultados con el error estándar de cada tratamiento.	57
Figura 24. Efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la liberación de alcaloides producidos in vitro al medio líquido de cultivo.	60

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de la composición de los medios de cultivo MS y MSA1	35
Cuadro 2. Cantidades utilizadas para la preparación de soluciones stocks para los tratamientos con inductores químicos.....	37
Cuadro 3. Experimentos y número de repeticiones evaluados por tratamiento ...	40
Cuadro 4. Repeticiones obtenidas a partir de los tratamientos realizados.....	42
Cuadro 5. Reactivos para análisis por UPLC/MS.....	45
Cuadro 6. Condiciones para el análisis por UPLC/MS.....	45
Cuadro 7. Peso fresco y seco promedio después de 10 días de tratamiento con o sin inductores.....	50
Cuadro 8. Identificación de alcaloides producidos en condiciones in vitro por <i>Zephyranthes carinata</i> después de 10 días de tratamiento con o sin inductores. Se utilizó como referencia los tiempos de retención y fragmentaciones (m/z) de los alcaloides reportados.....	53
Cuadro 9. Diversidad de estructuras alcaloidales presentes en los tratamientos con y sin inductor para la especie <i>Zephyranthes carinata</i>	55
Cuadro 10. Concentraciones de los alcaloides representativos presentes en los tratamientos evaluados y efecto farmacológico reportado.....	58

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a la doctora Zaida Lentini, el doctor Guillermo Montoya y a la bióloga Geraldine Restrepo por su apoyo durante la realización de este proyecto.

A María Eugenia Buitrago, Eddie Tabares, Freddy Vanegas y Duvan Castillo por su ayuda, orientación y asesoría durante todo este tiempo de trabajo.

A mi familia y amigos por su apoyo, colaboración y paciencia durante todo mi proceso de formación profesional.

Y a Dios por acompañarme, guiarme y darme la sabiduría que necesite en cada etapa de mi formación académica.

RESUMEN

La familia *Amaryllidaceae* es una de las familias que son ampliamente estudiadas debido a la producción casi exclusiva de alcaloides representativos y que han demostrado tener acciones farmacológicas para diferentes enfermedades crónicas e infecciosas que afligen a la población del siglo XXI. Los estudios en los cuales se evalúa el efecto de los metabolitos secundarios en el tratamiento de enfermedades han aumentado en los últimos años debido al potencial que representan los fármacos obtenidos a partir de material vegetal y a las nuevas técnicas analíticas que permiten la identificación y cuantificación de los metabolitos secundarios producidos por las plantas. Sin embargo, las bajas producciones de metabolitos secundarios dificultan el estudio y el desarrollo de nuevos fármacos. Por esta razón, se están evaluando nuevas metodologías que permitan la producción masiva y fácil extracción, identificación y cuantificación de los alcaloides. Se han estudiado varias formas que permitan aumentar la producción de alcaloides y optimizar los procesos de extracción. Entre estas opciones se encuentran la propagación *in vitro* del material vegetal y la adición de sustancias exógenas que generen algún tipo de estrés y permitan la producción masiva de alcaloides. En el presente trabajo se evaluó el efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la liberación de los alcaloides en el medio líquido de cultivo *in vitro* a partir de tejidos de *Zephyranthes carinata*. Se evidenció que los inductores químicos evaluados aumentaban considerablemente la liberación de estos metabolitos secundarios desde el material vegetal al medio líquido de cultivo *in vitro*. En general, la mayor liberación de alcaloides al medio líquido se obtuvo con el tratamiento 50 uM de metil jasmonato. Igualmente, los resultados indican que estos inductores incrementan la producción de alcaloides en el tejido vegetal comparado con el control. La mayor concentración de alcaloides totales en los tejidos vegetales se obtuvo con el tratamiento 25 uM de metil jasmonato. Fue posible identificar 19 alcaloides potenciales en las muestras analizadas. Estas 19 moléculas posiblemente tienen una estructura alcaloidal justificada con base a los espectros de masas y los patrones de fragmentación obtenidos. Se encontraron algunas que presentan similitudes con alcaloides reportados, en la especie *Zephyranthes grandiflora*, por dos grupos de investigación. Adicionalmente, se identificaron 8 moléculas presentes en todos los tratamientos evaluados. Algunas de estas moléculas no obtuvieron patrones de fragmentación reportados en otros estudios, por lo tanto, se nombraron como Desconocido. La molécula con posible estructura alcaloidal denominada Desconocido 3, se presentó en todos los tratamientos y obtuvo la mayor concentración en todos ellos.

Palabras clave: Alcaloides, *Amaryllidaceae*, Metil Jasmonato, Acido jasmónico.

ABSTRACT

The *Amaryllidaceae* family is one of the most widely studied not only because of its almost exclusive production of alkaloids, but also its pharmacological properties for different chronic and infectious diseases that affect the population of the 21st century. Studies evaluating the effect of secondary metabolites produced by plants in the treatment of diseases have increased in recent years due to the potential of drugs obtained from plant material and new analytical techniques that allow the identification and quantification of these secondary metabolites. However, low production of these molecules make it difficult to study and develop new drugs. For this reason, new methodologies are being evaluated that allow mass production and easy extraction, identification and quantification of alkaloids. Several ways have been studied to increase alkaloid production and optimize extraction processes. These options include the *in vitro* propagation of plant material and the addition of exogenous substances that generate some type of stress and allow the massive production of alkaloids. In the present work we evaluated the inducing effect of methyl jasmonate and jasmonic acid on the release of alkaloids in liquid culture medium *in vitro* from *Zephyranthes carinata* tissues. It was evidenced that the chemical inducers evaluated considerably increased the release of these secondary metabolites from the plant material to the liquid culture medium *in vitro*. In general, the highest release of alkaloids into the liquid medium was obtained with 50 μM methyl jasmonate treatment. Likewise, the results indicate that these inducers increase the alkaloid production in the plant tissue compared to the control treatment. The highest concentration of total alkaloids in plant tissues was obtained with 25 μM methyl jasmonate. Furthermore, it was possible to identify 19 potential alkaloids in the analyzed samples. These 19 molecules possibly have an alkaloidal structure justified on the basis of the mass spectra and the fragmentation patterns obtained. Of these 19 molecules, some were found to have similarities with alkaloids reported in the species *Zephyranthes grandiflora*. Additionally, of the 19 molecules classified, 8 of them were present in all treatments evaluated. Some of these molecules did not obtain fragmentation patterns reported in other studies, therefore, they were named Unknown. The molecule with possible alkaloidal structure called Unknown 3 was present in all treatments and obtained the highest concentration in all of them.

Key Words: Alkaloids, *Amaryllidaceae*, Methyl jasmonato, Jasmonic acid.

1. INTRODUCCIÓN

Se tienen registros en Mesopotamia, desde el año 2600 A.C, del uso de recursos naturales para el tratamiento de enfermedades (Dias, Urban, & Roessner, 2012). Sin embargo, el uso y aplicación de productos naturales bioactivos como fármacos solo se presentaron hasta el siglo XIX, cuando algunas de estas moléculas fueron aisladas y caracterizadas (Veeresham, 2012).

Actualmente, por diversos motivos, se utilizan recursos naturales para la atención primaria en salud (Evidente & Kornienko, 2009). No obstante, la aparición de enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes mellitus, el Alzheimer y patologías infecciosas como la malaria y el VIH; que afectan a gran parte de la población en el siglo XXI, ha renovado el interés por la investigación de nuevas posibles moléculas que permitan ampliar la diversidad y la efectividad de objetivos terapéuticos. Algunos estudios se han centrado en el análisis de diferentes metabolitos producidos por las plantas. La gran diversidad de estas, permite que este objeto de estudio pueda identificar nuevas y diversas moléculas funcionales para diferentes objetivos terapéuticos.

Entre los metabolitos más estudiados se encuentran los alcaloides, debido a sus amplias aplicaciones farmacológicas (Roberts & Wink, 2013). Hacia finales del siglo XX, ya se había reportado el aislamiento de 7000 alcaloides presentes en diferentes familias de plantas, en microorganismos, peces y ranas. Las plantas de las cuales, generalmente, se han aislado este tipo de moléculas, corresponden a plantas superiores y a más de 100 familias de Fanerógamas y Criptógamas. (Arango, 2008).

Entre las aplicaciones farmacológicas que se han reportado para estos metabolitos están los depresores del SNC, vasopresores, relajantes musculares, convulsivantes, analgésicos y anestésicos, vasodilatadores, actividad anticancerígena y antineoplásica, actividad antimicótica, entre otras. (Shamma, 2012) (Singh B, 2015). Uno de estos alcaloides de uso frecuente en medicina es la morfina, la cual se utiliza como analgésico y anestésico. La morfina fue aislada por Friedrich Sertürner a partir de la especie *Papaver somniferum*, planta nativa del sur y este del Mediterráneo en Europa, y se comercializa desde 1817 (Chida, 2011).

Según el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (SiB), Colombia es uno de los diez países más biodiversos, contando con aproximadamente 56,343 especies (SiB, 2016), por lo tanto, Colombia podría ser, por su diversidad, una fuente importante de moléculas con potencial farmacológico. Algunas de las familias

de plantas que producen alcaloides con actividad farmacológica son *Solanaceae*, *Elaeocarpaceae*, *Apocynaceae*, *Phyllanthaceae*, *Melanthiaceae*, *Ephedraceae*, *Rubiaceae*, *Lycopodiaceae*, *Amaryllidaceae*, *Fabaceae*, entre otras (Arango, 2008), (Olafsdóttir, Halldorsdotti, Pich, & Omarsdottir, 2013) (Krayner & Acheson, 1946) (Plummer, Earl, Schneider, Trapold, & Barrett, 1954) (Haller, Jacob III, & Benowitz, 2002).

La familia *Amaryllidaceae* es una de las 20 familias de plantas que se caracterizan por la producción de alcaloides (Unver, 2007). Algunos de los alcaloides de esta familia han reportado actividad anticancerígena, neuroprotectora, antimalarica y antiviral (Lamorale-Theys, y otros, 2009) (Gotti, 2006). En Colombia, se encuentran los géneros: *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes*, *Hippeastrum* y *Crinum*. Los géneros: *Eucharis*, *Crinum* y *Caliphuria* se encuentran en vía de extinción (Cabezas, y otros, 2007).

Los estudios de los alcaloides de la familia *Amaryllidaceae* comenzaron con la extracción y aislamiento de la licorina en 1877, desde entonces la cantidad de alcaloides extraídos y caracterizados ha aumentado hasta alcanzar aproximadamente 350 registros de moléculas producidas por esta familia. (Fuster, 1994). Sin embargo, la extracción de dichos alcaloides en suficiente cantidad ha dificultado el estudio y el diseño de fármacos que tengan acciones farmacológicas comprobadas y controladas. Es por esta razón que hay interés en evaluar nuevas metodologías para la producción masiva de estos metabolitos secundarios y la extracción óptima de los mismos.

Entre las nuevas metodologías evaluadas se encuentra la producción masiva de estos componentes químicos, mediante la propagación *in vitro* del material vegetal (Bogdanova, Pandova, Yanev, & Stanilova, 2009). Adicionalmente, se han evaluado diferentes técnicas para aumentar la producción *in vitro*, por ejemplo, el uso de sacarosa para aumentar la presión osmótica, generando un estado de estrés que induzca la producción de alcaloides, por lo tanto, se tiene mayor cantidad de material productor y mayor producción de los mismos por la inclusión de factores exógenos como la sacarosa. (El Tahchy, y otros, 2011).

La extracción de los componentes se realiza a partir del material vegetal, hojas y bulbos, donde se almacenan la mayor cantidad de alcaloides. Estos procesos no son óptimos debido a que el material vegetal utilizado es completamente destruido, y se necesita reponer sucesivamente el material por tejido fresco para proseguir con las extracciones de más alcaloides. Por lo tanto, es necesario la implementación de nuevas estrategias que faciliten la extracción continua de dichos metabolitos secundarios.

El presente proyecto de grado forma parte de una investigación que tiene como objetivo general desarrollar nuevas estrategias que faciliten la extracción de altas concentraciones de alcaloides producidos *in vitro*. Este proyecto de grado tuvo como objetivo, evaluar el efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la liberación de alcaloides desde el tejido vegetal de la especie *Zephyranthes carinata* al medio de cultivo líquido *in vitro*. La determinación del efecto inductor de estos elicitores permitirá a futuro la elección de un tratamiento óptimo para el diseño de un biorreactor que posibilite la extracción constante de alcaloides en altas concentraciones, para su posterior estudio farmacológico.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia

Los alcaloides de la familia *Amaryllidaceae* son de interés farmacéutico, ya que estudios anteriores han encontrado que podrían tener acciones farmacológicas que ayudarían a tratar enfermedades crónicas como el cáncer, teniendo una actividad antiproliférica (Van Goietsenoven, y otros, 2010) (Lamoral-Theys, y otros, 2009) y el Alzheimer con actividad neuroprotectora (Gotti, 2006). Sin embargo, la extracción de los alcaloides ha sido un reto, debido a que se concentran, principalmente, en las hojas de la planta (Jin, 2007) y es probable que la producción de este metabolito secundario se limite a condiciones de estrés. Por lo tanto, se requieren técnicas no destructivas que permitan la extracción de los alcaloides y que no afecten la producción de los mismos. Además, algunas de las especies presentes en la familia *Amaryllidaceae*, están en peligro de extinción, por lo cual se deben considerar técnicas que permitan un uso sostenible del material vegetal (Cabezas, y otros, 2007).

La propuesta de utilizar inductores químicos para la liberación de los alcaloides al medio líquido de cultivo *in vitro* ha sido reportada y evaluada por algunos investigadores. Sin embargo los estudios encontrados se realizan en especies de la familia *Amaryllidaceae* no nativas en Colombia, como *Narcissus confusus* y *Leucojum aestivum* las cuales utilizaron metil jasmonato (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004) y ácido jasmónico (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013) respectivamente como agentes inductores. En la especie *Zephyranthes carinata* no se conocen estudios sobre la utilización de inductores para liberar los alcaloides al medio líquido.

Por medio de la evaluación del efecto inductor del ácido jasmónico y el metil jasmonato se busca obtener información básica que pueda ser aplicada en la construcción e implementación de biorreactores que faciliten la extracción de alcaloides a nivel industrial. Además, mediante la caracterización cualitativa y cuantitativa de los alcaloides encontrados en *Zephyranthes carinata* se aportará información sobre el perfil químico que tiene esta especie de la familia *Amaryllidaceae*.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Familia Amaryllidaceae

La familia *Amaryllidaceae* tiene una amplia distribución que abarca zonas tropicales y subtropicales como la región andina y Sudáfrica, así como regiones de climas templados del Mediterráneo y Asia (Bastida, y otros, 2011).

Las plantas de la familia *Amaryllidaceae* tienen una gran variedad de flores, tamaños y colores debido a que está compuesta por diversas especies bulbosas y perennes, que son comúnmente usadas como plantas ornamentales (de Andrade, 2014). Sin embargo, una de las características más importantes para el sector farmacéutico es la producción casi exclusiva de alcaloides característicos que han sido estudiados por varios años por presentar posibles acciones farmacológicas como anticancerígenas, neuroprotectoras, antimaláricas y antivirales (Lamoral-Theys, y otros, 2009) (Gotti, 2006) (Fernández-Alonso & Groenendijk, 2004).

El género *Zephyranthes* cuenta con cerca de 60 especies presentes en toda América y las Antillas. En Colombia, se ha reportado la presencia de varias especies de este género, principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Bolívar, Antioquía y Santander (Fernandez & Groenendijk, 2004). Una de estas especies es *Zephyranthes carinata* que se caracteriza por presentar hojas aciculares, color rojizo al inicio de cada hoja, y flores rosadas (Figura 1). Rara vez se presentan dos flores por tallo y estas crecen después de temporadas lluviosas por lo cual, son comúnmente llamadas lirios de lluvia (Singh B, 2015). Esta especie es de uso común ornamental en Colombia, es de amplia distribución en la región andina, no se encuentra amenazada, y se puede adquirir fácilmente por venta comercial en viveros. Por estas características y al ser cultivada en la Universidad Icesi con fines académicos e investigativos, esta especie se seleccionó como modelo de estudio para evaluar la producción y extracción de alcaloides.



Figura 1. *Zephyranthes carinata*

2.2.1.1 Propagación *in vitro* de la familia *Amaryllidaceae*

La propagación *in vitro* o micropropagación implica el cultivo aséptico de explantes en recipientes cerrados, con medios de cultivo definidos y bajo condiciones ambientales controladas. (Loberant & Altman, 2010). Existen varias técnicas de propagación, entre las cuales se encuentra la técnica de *twin scale*. El propósito de esta técnica se basa en la separación de escamas adyacentes unidas en la base por tejido basal (Barnhoorn, 2005).

La técnica *twin scale* se realiza en plantas bulbosas. Los bulbos son órganos subterráneos que tienen como función principal el almacenamiento de nutrientes para asegurar la supervivencia de la planta, y son utilizados para la técnica de *twin scale* porque su placa basal presenta células meristemáticas o totipotentes, que se dividen por mitosis para posteriormente, diferenciarse. En la Figura 2 se muestra la estructura de este órgano subterráneo.

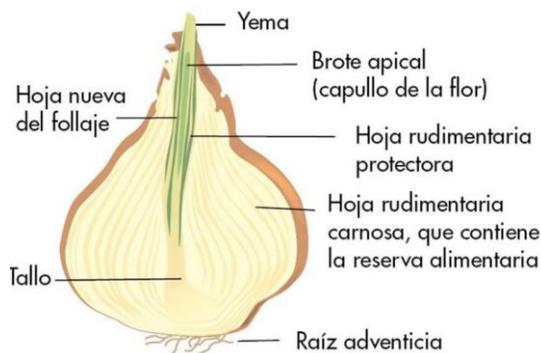


Figura 2. Estructura del bulbo

Los medios de cultivo *in vitro* utilizados para la micropropagación se complementan con auxinas y citoquininas. Está comprobado que el uso de estas dos hormonas en concentraciones específicas determinan el crecimiento de diferentes órganos de la planta, por ejemplo, una relación mayor de auxinas/citoquininas genera la formación de raíces, mientras que, una relación menor de estas genera la formación de brotes. (Nordstrom, y otros, 2004).

Para la micropropagación de *twin scales* de *Zephyranthes carinata* se ha podido observar que el uso de BAP (Bencil Amino Purina) a 0,6mg/L, permite la formación de bulbillos al primer mes de inducción, obteniendo al menos 2 bulbillos por escama. (Restrepo, 2016).

2.2.2 Alcaloides

Un alcaloide es una molécula orgánica de carácter básico, otorgado por el nitrógeno presente en la estructura química, que en su estado base es poco soluble en agua, y habitualmente proviene de material vegetal. Sin embargo, se ha reportado la producción de alcaloides en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*s, hongos de la especie *Claviceps purpurea*, algunas ranas y peces. En las plantas, los alcaloides se encuentran comúnmente en forma de sal (Arango, 2008).

Hay un gran número de medicamentos que se han obtenido a partir de alcaloides como la morfina, atropina, colchicina, efedrina, entre otros. (Bianchi, Guarna, & Tagliamonte, 1994) (Arango, 2008). También, se reporta un incremento en el número de estudios en los cuales se evalúa la capacidad de los alcaloides para reducir los avances de enfermedades como el cáncer y el Alzheimer (Ancuceanu, 2004) (Ptak et al., 2009).

Las actividades farmacológicas de los alcaloides generan, particularmente, efectos en los mamíferos, incluyendo a los seres humanos. Algunas de estas actividades están relacionadas con el sistema nervioso central, afectando, especialmente, la función química de los neurotransmisores como dopamina, norepinefrina epinefrina, GABA, y serotonina. Además, se han encontrado otras actividades farmacológicas como efectos antihipertensivos, antiarrítmicos, antimaláricos, antibióticos y anticancerígenos. (Roberts & Wink, 2013)

Se tienen varias teorías sobre la función de los alcaloides en las plantas, por ejemplo, que son productos de desecho o de almacenamiento de nitrógeno sobrante; reguladores de crecimiento y otorgantes de protección contra insectos. Sin embargo, mediante tecnologías que involucran a la microquímica se ha podido demostrar que los alcaloides se almacenan en los tejidos periféricos de la planta (Arango, 2008), en el caso de la familia *Amaryllidaceae* en los bulbos, hojas y raíces (Jin, 2007). Teniendo en cuenta lo anterior, la pérdida de alcaloides en estas partes de la planta no producen la muerte de la misma, lo cual indica que estos compuestos son metabolitos secundarios de la planta y no son requeridos para su desarrollo .

Los alcaloides pueden ser clasificados según los aminoácidos que son precursores de la ruta biosintética, por ejemplo, los alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos o aromáticos. Además, en la ruta biosintética intervienen bases púricas, unidades terpénicas y derivados del acetato (Arango, 2008). En la Figura 3 se puede observar los diferentes aminoácidos y bases nitrogenadas que dan origen a las

diferentes rutas biosintéticas de los alcaloides y por las cuales pueden ser clasificados.

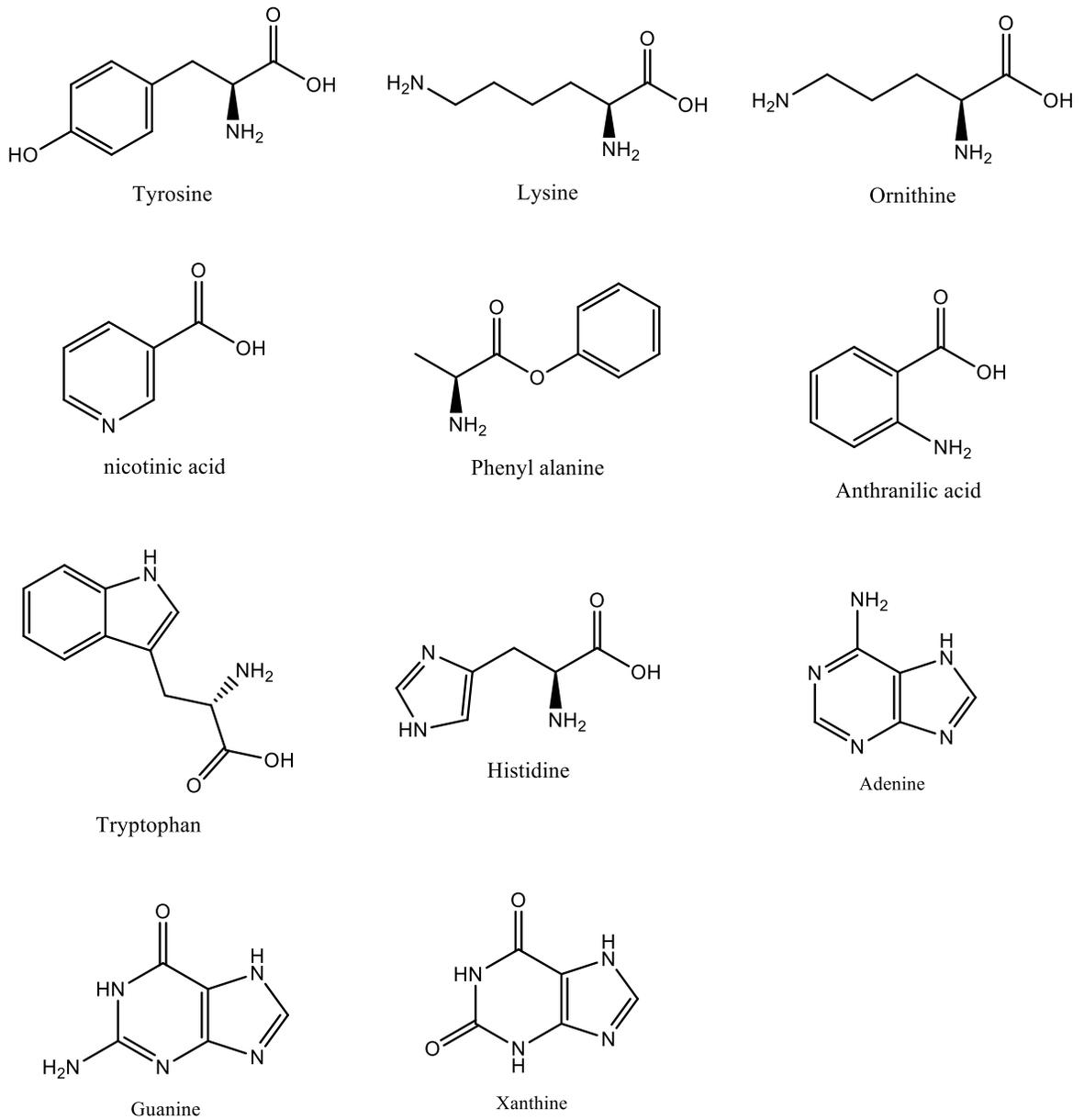


Figura 3. Aminoácidos y bases que dan origen a los alcaloides por diferentes rutas biosintéticas.

2.2.3 Alcaloides de la familia *Amaryllidaceae*

Los alcaloides de la familia *Amaryllidaceae* tienen como precursores en la ruta biosintética a los aminoácidos L-Tirosina (L-Tyr) y L-Fenilalanina (L-Phe) (Gotti, 2006). En 1957, se utilizaron marcadores moleculares para estudiar la biosíntesis de los alcaloides y se pudo determinar que en la síntesis de los diferentes alcaloides había un intermediario común al cual se le designó el nombre de norbelladina, el cual representa una transición entre el metabolito primario y el secundario (de Andrade, 2014).

La norbelladina presenta diferentes reacciones que permiten la diversificación de los alcaloides de la familia *Amaryllidaceae* (Figura 4). Entre los alcaloides más importantes para el área farmacéutica se encuentran la galantamina y la licorina (Van Goietsenoven et al., 2010) (Van Goietsenoven, y otros, 2010).

La licorina fue el primer alcaloide extraído y está presente en muchos géneros de la familia *Amaryllidaceae*, por ejemplo en *Lycoris*, *Pancratium*, *Leucojum*, *Urginea*, *Narcissus*, *Galanthus*, *Amaryllis*, *Crinum*, *Hymenocallis*, *Nerine*, *Sternbergia*, *Zephyranthes*, *Eustephia*, *Haemanthus* y *Vallota*. Este alcaloide ha sido estudiado porque se cree que tiene actividad inhibitoria contra las actividades del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) (Bogdanova, Pandova, Yanev, & Stanilova, 2009). En el caso de la galantamina, esta se conoce por sus propiedades analgésicas y en su ruta biosintética se forma a partir de dos moléculas de L-Tirosina. Esta se encuentra principalmente en los géneros *Galanthus*, *Narcissus* y *Leucojum* y es un inhibidor competitivo de la colinesterasa, la cual mejora la función cognitiva en la enfermedad del Alzheimer (Gotti, 2006).

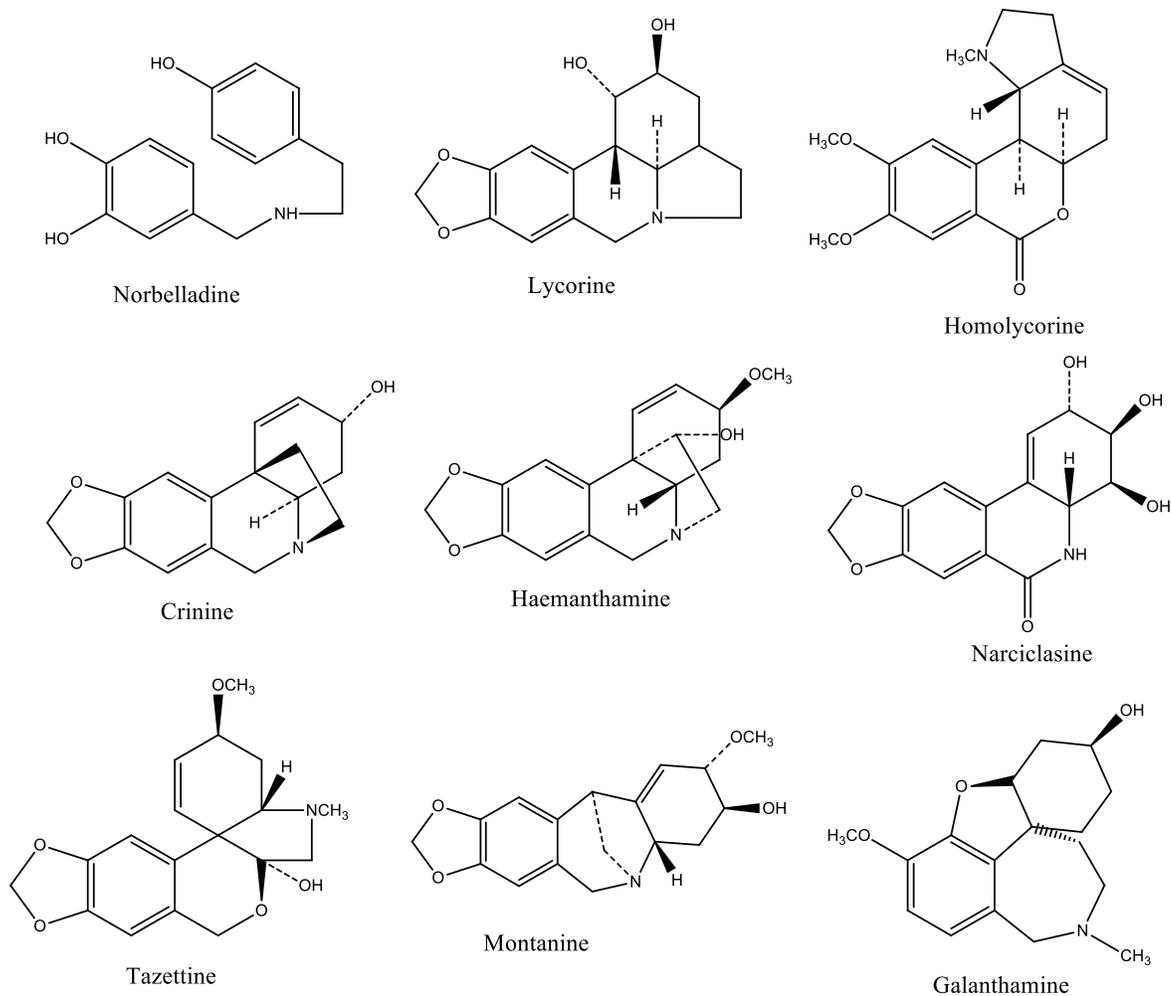


Figura 4. Tipos de alcaloides producidos por la familia de plantas *Amaryllidaceae*

Dichos alcaloides, al presentar posibles acciones farmacológicas, han sido extraídos para diferentes estudios de interés farmacéutico. Sin embargo, las extracciones se han caracterizado por utilizar métodos destructivos para la planta debido a que la mayor cantidad de alcaloides se produce y almacena en las hojas y el bulbo de la misma (Jin, 2007). Es importante mencionar que de no existir técnicas de propagación *in vitro*, se necesitaría material vegetal previamente escalado para poder obtener la cantidad de alcaloides necesaria para los estudios de interés farmacéutico.

Otro reto que se presenta en el estudio de los alcaloides de la familia *Amaryllidaceae* es la baja producción de estos metabolitos. Por esta razón, se han evaluado estrategias que permitan aumentar su concentración para, posteriormente, poder extraerlos de la planta. Un ejemplo es la adición de sacarosa en el medio de cultivo *in vitro*, en diferentes concentraciones, para aumentar la presión osmótica,

generando un estrés en la planta y finalmente produciendo más alcaloides.. En este caso, en un estudio realizado en la Universidad Icesi, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, se encontró que, a mayor concentración de sacarosa, las hojas disminuían su longitud y la concentración total de alcaloides aumentaba hasta alcanzar un punto óptimo, después del cual disminuía la concentración de alcaloides. Además, se encontró que la concentración óptima de sacarosa para la producción de alcaloides, era de 15% (Chamorro, 2016).

Este proyecto busca formas alternativas que puedan evitar la destrucción de material vegetal, que en el caso de la familia *Amaryllidaceae* cuenta con especies en vía de extinción, optimizar el proceso de extracción y disminuir el tiempo requerido para el mismo. Lo anterior con el fin de establecer una estrategia de uso sustentable que pueda ser aplicable incluso a especies amenazadas o en vía de extinción. Una de las alternativas es el uso de elicitors o inductores químicos que estimulen la secreción de los alcaloides al exterior del tejido donde se produce y/o almacena, para facilitar así su extracción.

2.2.4 Inductores químicos o elicitors

Los elicitors o inductores químicos, son compuestos químicos o biofactores derivados de varias fuentes que pueden inducir cambios fisiológicos y/o morfológicos en el organismo vegetal (Chaichana & Dheeranupattana, 2012). En algunos estudios se ha reportado cómo los elicitors pueden aumentar la producción de metabolitos secundarios y, en algunos casos, se ha evaluado cómo permiten la liberación de metabolitos, particularmente, de alcaloides en el medio líquido de cultivo *in vitro* (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004).

Se ha reportado el uso de estos inductores, para la liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo *in vitro*, en especies como *Narcissus confusus* y *Leucojum aestivum*. El metil jasmonato y el ácido jasmónico permiten la liberación de los metabolitos secundarios del tipo alcaloidal, al medio de cultivo líquido (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004) (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013). En el caso de la especie *Zephyranthes carinata*, a la fecha no se han reportado estudios de este tipo.

El estudio realizado por Colque y colaboradores (2004), en la especie *Narcissus confusus*, consistió en la evaluación del efecto de cuatro inductores químicos en el crecimiento del tejido vegetal, la cantidad de alcaloides producidos en el material vegetal y los liberados en el medio líquido. Los inductores evaluados fueron metil

jasmonato, ácido araquidónico, ácido salicílico y quitosan. Los autores anteriores encontraron que hay una relación indirectamente proporcional entre la concentración de inductor y el crecimiento del material vegetal, especialmente en los tratamientos en los que se utilizó ácido salicílico. Adicionalmente, que a una concentración de 25µM de metil jasmonato, la liberación de alcaloides en el medio líquido de cultivo era 300% mayor comparada con el control. La cuantificación e identificación de alcaloides se realizó por la técnica cromatográfica HPLC, teniendo como referencia una base de datos de alcaloides previamente caracterizados de la especie *N. confusus* (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004).

Por otro lado, el estudio en la especie *Leucojum aestivum* realizado por Ivanov y colaboradores (2013), evaluó el efecto de dos inductores: metil jasmonato y ácido jasmónico, en el crecimiento del tejido vegetal y en la producción de alcaloides y ácido fenólico. Respecto al aumento de la biomasa, los autores encuentran que el metil jasmonato y el ácido jasmónico incrementan en 1.32 y 1.26 veces el tejido vegetal en relación al control. En la evaluación de la producción de alcaloides se presentan dos tratamientos, en el primero se determinó la producción de alcaloides con cada uno de los inductores en la fase exponencial de crecimiento, el cual se consideró como el día 28 de cultivo. En este caso, con la adición de ácido jasmónico se produjo mayor cantidad del alcaloide galantamina y licorina, mientras que con la adición de metil jasmonato se encontró un aumento en la concentración de norgalantamina, precursor directo de la galantamina. Lo anterior se evaluó después de 7 días de la adición de los inductores al medio de cultivo líquido. En el segundo tratamiento se evaluó la concentración de alcaloides producidos en la fase estacionaria de crecimiento. En esta fase, la cual corresponde al día 35 de crecimiento, la adición de los inductores no aumenta la concentración de alcaloides significativamente. (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013)

El metil jasmonato y el ácido jasmónico hacen parte de la categoría de jasmonatos, los cuales son sintetizados en las plantas por la ruta de los octadecanoides. Estas moléculas se conocen por su actividad señalizadora en la planta en respuesta a diferentes factores de estrés (Figura 5) y participan en diferentes rutas del desarrollo de la misma (Cheong & Choi, 2003). La estructura de estas dos moléculas se muestra en la Figura 6.

Es importante mencionar que estos dos inductores han mostrado una actividad importante en la producción y acumulación de alcaloides en las plantas. (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013) Además, han permitido la liberación de dichos compuestos al medio líquido de cultivo *in vitro* (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004). El metil jasmonato y el ácido jasmónico inducen la expresión de las enzimas PAL (phenylalanine ammonia-lyase) y TD (tyrosine decarboxylase) las cuales catalizan los primeros pasos de la ruta metabólica de los alcaloides de

Amaryllidaceae (Figura 7). Se cree que los genes involucrados en la producción de alcaloides pueden participar en la secreción de estos metabolitos (Cai, Kastell, & Knorr, 2012) (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013).

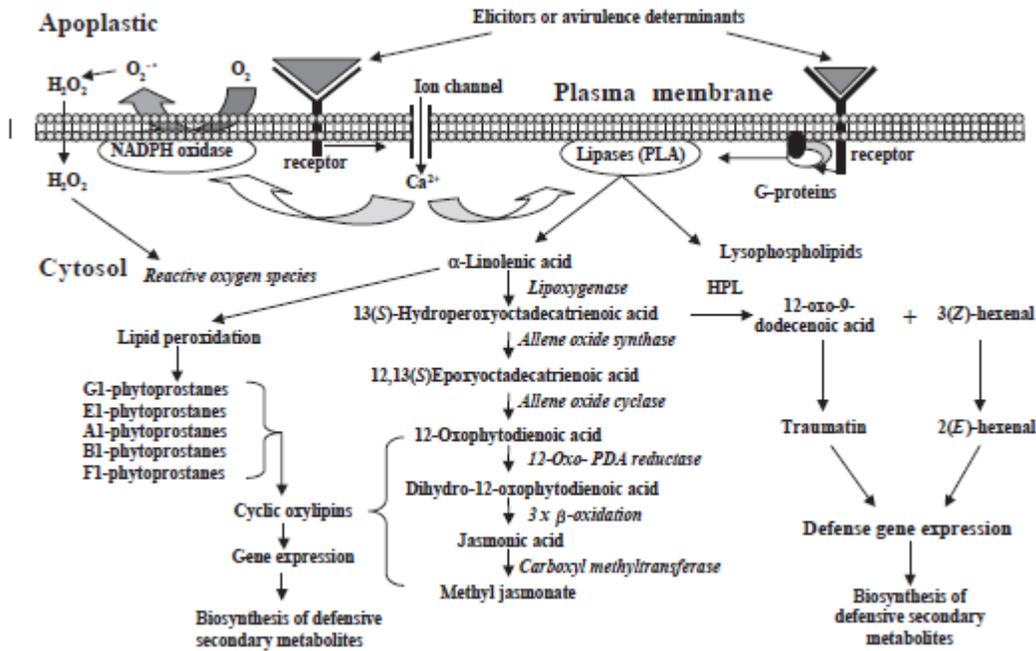


Figura 5. Efecto de los inductores en la ruta biosintética de metabolitos secundarios. Los elicitores o determinantes virulentos son percibidos por los receptores localizados en la membrana citoplasmática. Los receptores activan los canales iónicos y proteínas G que a su vez activan las fosfolipasas como PLA2. Las fosfolipasas hidrolizan los fosfolípidos en ácidos grasos, los cuales son utilizados como precursores de los jasmonatos (Ruta de octadecanoides) y oxilipinas. La oxidación de estas moléculas activa la biosíntesis de metabolitos secundarios (Zhao, Lawrence, & Verpoorte, 2005).

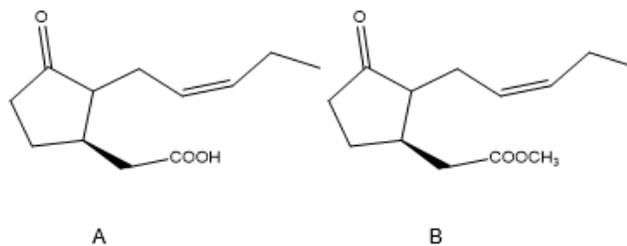


Figura 6. Estructura química de A) Ácido Jasmónico y B) Metil Jasmonato.

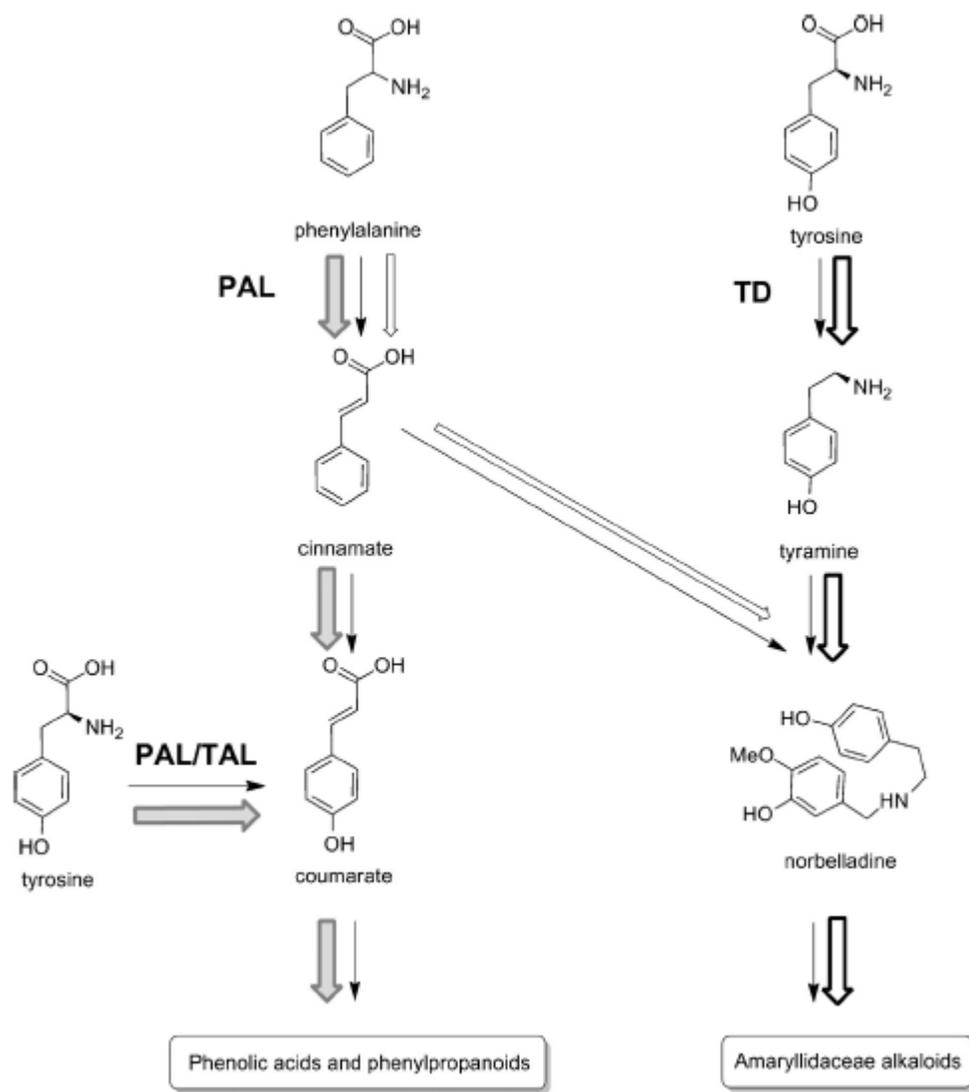


Figura 7. Efecto del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la ruta biosintética de los alcaloides de Amaryllidaceae. Las flechas grises señalan la ruta biosintética que se vio influenciada por el metil jasmonato y las flechas blancas señalan la ruta biosintética influenciada por el ácido jasmónico. Las flechas que están resaltadas en negrilla son aquellas que mostraron mayor activación y las que no están resaltadas mostraron menos activación (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013)

2.2.5 Extracción e identificación de alcaloides

No existe un método único para extraer alcaloides, ya que los factores como el material vegetal a procesar, el tipo de alcaloide, las propiedades fisicoquímicas de los alcaloides, entre otras, aumentan la complejidad de los procesos de extracción (Marcano & Hasegawa, 2002). Sin embargo, se conocen 4 métodos generales de extracción de alcaloides: Extracción de alcaloides con solventes inmiscibles en agua, extracción con solventes miscibles en agua, extracción con agua acidulada y extracción con soluciones de sales de reacción ácida. (Sharapin, 2000).

La extracción de alcaloides presentes en las plantas comienza con la obtención del extracto bruto, que contiene, además de los alcaloides totales presentes en las plantas, algunas impurezas como grasas y ceras vegetales, resinas, pigmentos, taninos y sales de ácidos orgánicos como el ácido oxálico. Para la purificación del extracto bruto es necesario el uso de solventes inmiscibles y variaciones del pH, lo cual permite la separación de los alcaloides de los demás componentes mencionados anteriormente. (Sharapin, 2000).

La extracción de los alcaloides se puede realizar utilizando solventes orgánicos o soluciones acuosas de ácidos o de sales de reacción ácida. La extracción de alcaloides con solventes inmiscibles en agua presenta una desventaja en la necesidad del uso de grandes cantidades de solventes orgánicos, que pueden afectar la salud de los investigadores o el equilibrio del medio ambiente. A estos solventes inmiscibles en el agua se le debe realizar un proceso de desecho especial, lo cual aumenta los costos del proceso. La ventaja del método consiste en la obtención de extractos con menor cantidad de impurezas, facilitando los procesos de purificación e identificación de los alcaloides (Sharapin, 2000).

Por otro lado, la extracción de alcaloides con solventes miscibles en agua, utiliza solventes como el etanol y el metanol. Estos solventes presentan una alta polaridad, lo cual permite extraer los alcaloides del material vegetal por la alteración de la fluidez de las membranas (Elvir, 1993) (Sharapin, 2000). Sin embargo, no solo se extraen alcaloides; también compuestos químicos como taninos, pigmentos y otras impurezas. Por tanto, se requiere la adición de un compuesto de carácter ácido, que permita la formación de alcaloides en su estado de sal y elimine impurezas con la adición de un solvente orgánico de carácter apolar, por ejemplo, diclorometano o cloroformo. Las cantidades de solvente utilizadas en este método de extracción son considerablemente menores que las necesarias en el método que usa solventes inmiscibles. Posteriormente, se adiciona una base fuerte que permite que los alcaloides en forma de sal, que fueron solubilizados en el medio ácido y separados de las impurezas, puedan ser aislados en su forma neutra (Arango, 2008).

Para este proyecto de grado se utilizaron solventes miscibles en agua para extraer los alcaloides del material vegetal. La metodología utilizada fue estandarizada por

Guillermo Montoya, 2016, Universidad Icesi, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Farmacéuticas (comunicación personal). Este método presenta varias ventajas, entre ellas se encuentran la rapidez de extracción, menores costos de los solventes y no necesitar tratamientos previos con solventes alcalinos para la extracción de los alcaloides (Sharapin, 2000).

2.2.6 Métodos de identificación y/o cuantificación

En la actualidad existen una variedad de metodologías que permiten determinar la presencia, la identidad y la cantidad de alcaloides. Algunas técnicas se apoyan en los avances tecnológicos que permiten mayor sensibilidad, exactitud y precisión de las mediciones.

La cromatografía es uno de los métodos de análisis utilizados para la identificación y cuantificación de diferentes moléculas. Generalmente, se emplean equipos acoplados al cromatógrafo con el fin de obtener mayor información sobre las moléculas que se están analizando. La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar, se distribuyen entre dos fases, una que permanece inmóvil y otra que se mueve en una dirección determinada a través de la primera. Este método fue desarrollado por el botánico ruso Mikhail S. Tswet a principios de 1900 y actualmente existen diferentes tipos de cromatografía, las cuales se pueden separar en dos categorías según la forma en la que las fases (móvil y estacionaria) se ponen en contacto (Sharapin, 2000).

La clasificación de los métodos cromatográficos según la forma de la fase móvil y estacionaria es

- Cromatografía planar: En esta técnica se sitúa la fase estacionaria sobre una placa plana o sobre un papel. En esta técnica se incluyen la cromatografía en papel y en capa fina.
- Cromatografía en columna: En esta técnica se sitúa la fase estacionaria dentro de una columna y según el fluido empleado como fase móvil se pueden clasificar en cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos.

La cromatografía planar es una de las técnicas cromatográficas empleadas para la separación de metabolitos; en esta técnica se utiliza como fase estacionaria una placa compuesta de geles de sílice refinados, alúminas, celulosa o celulosa polietilenimina. En esta placa se coloca la muestra y la fase móvil asciende por capilaridad separando los componentes (Figura 8). Esta técnica tiene una desventaja y es que solo puede separar de 6 a 8 analitos. (Braithwaite & Smith, 1999).

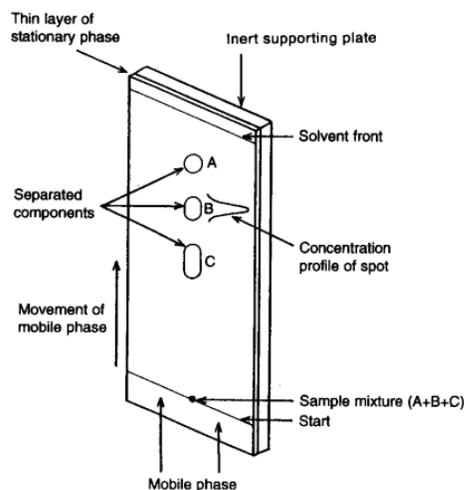


Figura 8. Cromatografía planar

Se encontró que esta técnica analítica no era suficientemente sensible para detectar los niveles de alcaloides producidos por los bulbillos inducidos *in vitro* de *Zephyranthes carinata*, ya que se necesitaba gran cantidad de miligramos de peso seco, para identificar la presencia y cuantificar los alcaloides totales en la muestra (Chamorro, 2016). Por lo tanto, en este proyecto de grado se optó por utilizar técnicas más sensibles que aportaran información sobre el perfil químico de los alcaloides de *Zephyranthes carinata*.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una de las herramientas analíticas más utilizadas. Esta técnica permite separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en una muestra líquida. Además, tiene una gran sensibilidad permitiendo identificar muestras con concentraciones en partes por millón (ppm) (Waters, Waters , 2016). Sin embargo, los avances tecnológicos han permitido mejorar esta técnica obteniendo mayor sensibilidad, resolución y velocidad de análisis de las muestras. Esta técnica mejorada fue llamada cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) (Swartz, 2005). Los incrementos en la sensibilidad y la resolución son posibles debido a la disminución del tamaño de las partículas de la columna cromatográfica que han venido disminuyendo de 2.5 μm hasta 1.5 μm . En otras palabras, la reducción del tamaño de las partículas de la fase estacionaria ocasiona que el analito deba interactuar un mayor tiempo en esta fase promoviendo la retención y separación de las moléculas (Figura 9). Sin embargo, para que el proceso se pueda realizar en un menor tiempo, se incrementó la presión en la columna, de esta manera, el flujo del solvente aumenta y así mismo la eficiencia del proceso de separación (Braithwaite & Smith, 1999). La separación de los diferentes analitos presentes en la muestra líquida se representa en un cromatograma (Figura 10) donde para cada pico, que representa la separación de una molécula, se tiene un tiempo de retención y un porcentaje en términos de concentración.

La cromatografía líquida de ultra eficiencia es aproximadamente 100 veces más sensible que la cromatografía de capa fina (Unilever, 2016). Esta es una de las principales razones por las cuales se escogió esta técnica por encima de la cromatografía de capa fina previamente evaluada por el estudiante Daniel Chamorro.

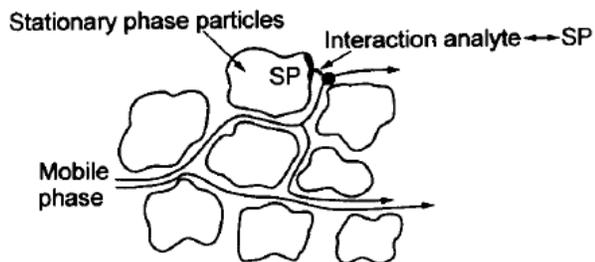


Figura 9. Interacción de un analito con la fase móvil y la fase estacionaria en una columna cromatográfica

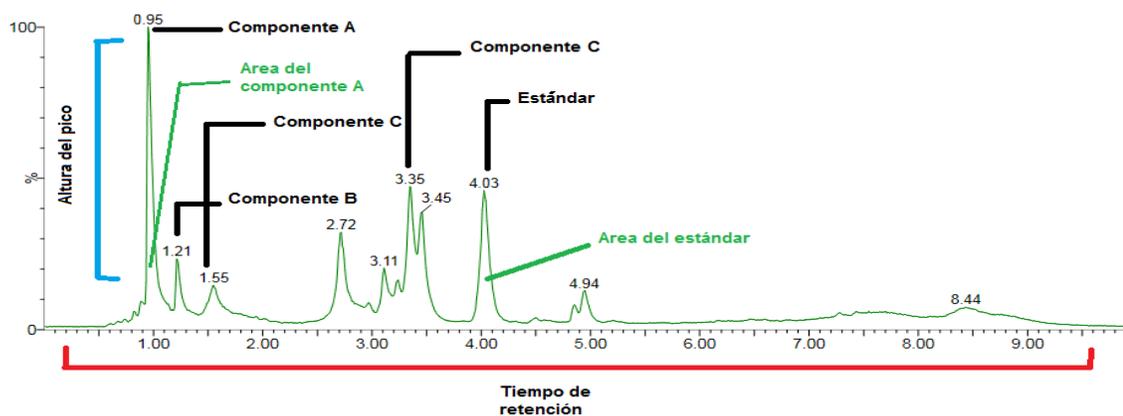


Figura 10. Ejemplo de un cromatograma. En el eje X se muestra el tiempo de retención de cada molécula y en el eje Y el porcentaje de cada molécula retenida.

La técnica UPLC se evaluó en este proyecto de grado debido a su disponibilidad, sensibilidad, resolución y velocidad de análisis. Adicionalmente, se acoplo el equipo cromatográfico a un espectrómetro de masas.

La espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas más completas que existen (M.C. Gutiérrez & Droguet, 2002). Esta técnica consiste en la formación de una fase gaseosa de iones del componente a presión atmosférica en vez de a alto vacío. Esto permite fragmentaciones estructurales más controladas (Wiley, 2013). Una vez ionizadas las moléculas, estas son conducidas a un sistema colector por medio de campos magnéticos (M.C. Gutiérrez & Droguet, 2002). La velocidad

alcanzada por cada ion dependerá de su masa y su detección es en relación a su abundancia y estabilidad (Gross, 2011). La espectrometría de masas proporciona un espectro característico para cada molécula por lo que permite identificar y clasificar un analito. Además, presenta gran sensibilidad ya que detecta concentración del orden de ppb. También proporciona información estructural debido a que cada señal registrada en el espectro de masas, está asociada a un patrón de fragmentación para cada molécula (M.C. Gutiérrez & Droguet, 2002). La Figura 11 muestra un ejemplo de un espectro de masas, el cual presenta en el eje X la relación carga/masa (m/z) de la molécula y sus respectivas fragmentaciones, y en el eje Y el porcentaje de abundancia de los diferentes iones generados. El pico que presenta mayor porcentaje de abundancia se denomina pico base y es la fragmentación más estable.

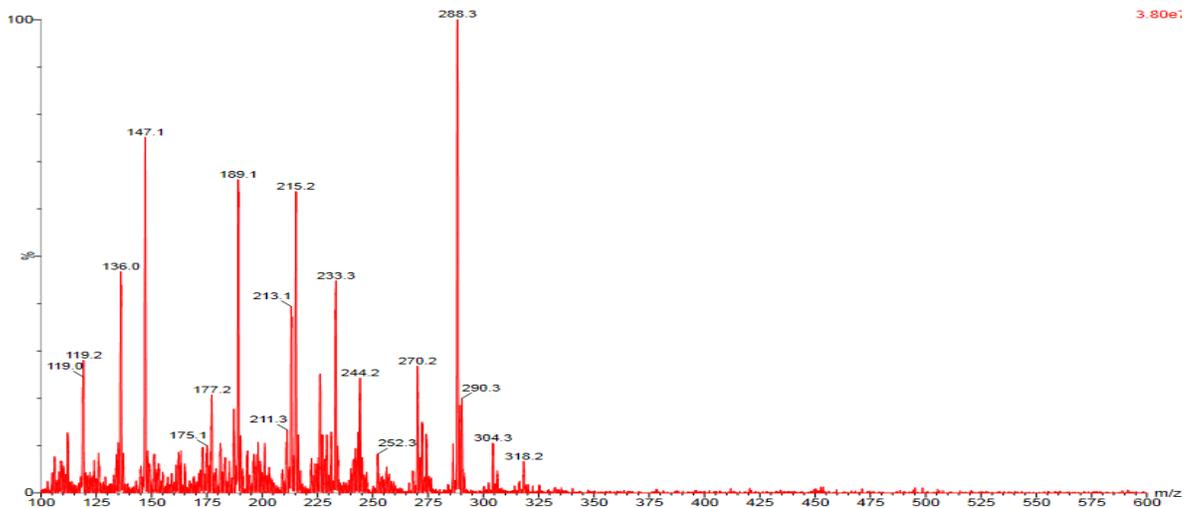


Figura 11. Ejemplo de espectro de masas. En el eje X se muestra la relación carga/masa (m/z) y en el eje Y el porcentaje de abundancia de cada fragmentación

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los inductores, metil jasmonato y ácido jasmónico, en la liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo *in vitro* de la especie *Zephyranthes carinata* perteneciente a la familia de plantas *Amaryllidaceae*.

2.3.2 Objetivos específicos

- Identificar si el metil jasmonato genera un efecto inductor en la liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo *in vitro* en la especie *Zephyranthes carinata*.
- Identificar si el ácido jasmónico genera un efecto inductor en la liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo *in vitro* en la especie *Zephyranthes carinata*.
- Evaluar por medio de métodos cromatográficos la presencia y la cantidad de los alcaloides liberados al medio líquido de cultivo *in vitro* después de cultivar los bulbillos con el metil jasmonato o el ácido jasmónico.

2.4 METODOLOGÍA

El desarrollo de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi. La metodología que descrita a continuación se elaboró con el objetivo de determinar si existe un efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la liberación de alcaloides, producidos *in vitro* en la especie *Zephyranthes carinata*, en un medio de cultivo líquido.

2.4.1 Recolecta del material vegetal

Se recolectó material vegetal de la familia *Amaryllidaceae*, específicamente de la especie *Zephyranthes carinata*, la cual se cultiva en el invernadero de la Universidad Icesi, Cali-Valle del Cauca, con fines de conservación e investigativos. Este material se encontraba en una poli-sombra que simulaba las condiciones *in situ* de la especie.

El material que fue recolectado tuvo las siguientes características:

1. Ausencia de flor o de pedúnculo color rojizo que precede la formación de la flor
2. Diámetro del bulbo de 15-20 mm

Estas condiciones fueron estandarizadas en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi. Tener en cuenta las características anteriores al momento de la selección del bulbo permite que la inducción de bulbillos *in vitro* sea exitosa, ya que, para la primera condición se encontró que la siembra de bulbos florecidos o la presencia del pedúnculo de color rojizo, en el centro del bulbo, generaban el crecimiento de una flor en vez de bulbillos. El pedúnculo se desarrolla antes del crecimiento de la flor y generalmente se puede observar después de varios días de lluvia. Para la segunda condición se encontró que un bulbo con un diámetro mayor al especificado no permitía la apertura de la escama para el crecimiento de los bulbillos generados *in vitro* (Restrepo, 2016).

Los bulbos recolectados se encontraron bajo una polisombra que disminuye la intensidad de la luz solar, fueron regados dos veces por semana debido a que la temporada de recolección fue calurosa y fertilizados una vez cada dos semanas.

La recolecta del material vegetal se realizó en los meses de Junio, Julio y Agosto. Durante estos meses el rango de temperatura en la ciudad de Santiago de Cali, estuvo entre los 30°C y los 34°C (AccuWeather, 2016).

2.4.2 Esterilización superficial del material de invernadero

El protocolo de esterilización del material de invernadero fue estandarizado en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi. (Restrepo, 2016).

1. Retirar hojas, raíces y escamas viejas y/o secas que pueda presentar el bulbo.
2. Lavar el bulbo con agua potable y jabón con el objetivo de retirar la tierra.
3. Llevar material a la cabina de flujo laminar y sumergirlo en Etanol al 70% durante 1 minuto.
4. Cortar el bulbo longitudinalmente en 4 partes iguales incluyendo placa basal.
5. Sumergir en Etanol al 70% por 1 minuto.
6. Sumergir en Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 1,5% por 20 minutos con agitación constante.
7. Por cada 100 ml de NaOCl, adicionar 4gotas / 100ml de Tween 20.
8. Enjuagar con agua estéril tres veces por 3, 10 y 15 minutos respectivamente.

2.4.5 Cultivo *in vitro* por la técnica *twin scale*

Se realizó la inducción de bulbillos mediante el método de *twin scale*, el cual se basa en la separación de escamas adyacentes unidas por una fracción de capa basal. (Huang , Okubo, & Uemoto, 1990). Esta técnica fue estandarizada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi. A continuación, se detalla el protocolo realizado para el cultivo *in vitro*, por la técnica *twin scale*, en el medio de cultivo (Figura 12).

1. Cortar, en cada fragmento de bulbo, dos escamas adyacentes con fracción de capa basal.
2. Sembrar en el medio semisólido, dos pares de escamas por frasco de compota.
3. Tapar y sellar el frasco para evitar contaminación
4. Repetir los pasos anteriores.

Es importante mencionar que las escamas adyacentes de menor tamaño, es decir, las próximas al centro del bulbo no presentaron respuesta en la inducción de

bulbillos. Por tanto, se requiere del corte de las escamas adyacentes que se encuentran a partir de la zona intermedia del bulbo (Restrepo, 2016)



Figura 12. Protocolo de cultivo in vitro por técnica *twin scale*

Se sembraron 242 escamas en 121 frascos de compota. Se mantuvieron a una temperatura de 25°C, fotoperiodo de 16h bajo luz blanca - 8h de oscuridad y humedad relativa de 44%. Se presentaron brotes a la tercera semanas de cultivo y a la quinta semana se observaron los bulbillos. Estos bulbillos fueron evaluados a los dos meses de cultivo, dando así un mes para el crecimiento de los mismos. De la inducción se obtuvieron 265 bulbillos que fueron dispuestos para la evaluación del efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico.

2.4.4 Preparación de los medios de cultivo *in vitro*

2.4.4.1 Preparación medio semi-sólido MSA1

Se preparó un medio de cultivo utilizando como base el modelo propuesto por Murashige & Skoog (1962) para el crecimiento de callos de tabaco (Murashige & Skoog, 1962) y modificado en el Laboratorio de Investigación de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi para la inducción de bulbillos. Este medio permite inducir al menos un bulbillo en un 70% de los explantes cultivados *in vitro* (Chamorro, 2016). El medio de cultivo contó con la adición de bencilaminopurina (BAP), una citoquinina para la inducción de brotes. La bencilaminopurina es un análogo sintético de la benciladenina. A este medio se le conoce en el grupo de investigación como MSA1.

Este medio (Cuadro 1), fue esterilizado por filtración al vacío con membrana de celulosa de 0.22µm, el agente gelificante fue autoclavado y posteriormente se adicionó al medio filtrado. Una vez realizado lo anterior, el medio fue servido en envases estériles de compota (Figura 13), teniendo en total 25 mL por envase.

El siguiente protocolo de preparación se realiza para un Litro de medio semi-sólido MSA1 estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi y produce la inducción de al menos dos bulbillos por escama. En el Cuadro 1, se reportan las cantidades en gramo por litro para la preparación del medio MSA1 y se realiza una comparación entre el medio MS y el MSA1, el cual cuenta con la adición de BAP.

1. Agregar en 500 ml de agua destilada 4,43 g/L de medio Murashige & Skoog (MS). Agitar hasta disolver todas las sales.
2. Agregar 0,6 mg/L de BAP en agitación constante,
3. Agregar 30 g de sucrosa y agitar hasta obtener una solución homogénea.
4. Filtrar con membrana de 0,22 μm en cabina de bioseguridad.
5. Agregar en 500 ml de agua destilada 3,0 g de agente gelificante (Gellan Gum)
6. Autoclavar la solución que contiene el agente gelificante.
7. Calentar la solución que contiene el medio Murashige & Skoog
8. Mezclar ambas soluciones y agitar manualmente para homogenizar los componentes.
9. Servir 25 ml de medio MSA1 en cada frasco de compota
10. Dejar enfriar

Usar después de 3 días para asegurar que no haya contaminación.

Cuadro 1. Comparación de la composición de los medios de cultivo MS y MSA1

Medios				
Compuesto	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	0,0010	0,25	0,0010
CuSO ₄ X 5H ₂ O	0,025	0,00010	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 miocardio	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	

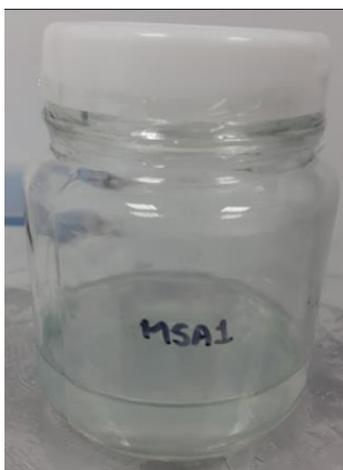


Figura 13. Frasco compota con 25 mL de medio MSA1

2.4.4.2 Preparación medio líquido MSAJ o MSMJ

Se utilizó el medio MS líquido (sin agente gelificante) y sin BAP como base (Cuadro 1), al cual, después de ser esterilizado y servido de a 10mL en Erlenmeyers de 25 mL, se le adiciona 25 o 50 uM de ácido jasmónico (MSAJ) o 25 o 50 uM de metil jasmonato (MSMJ). No se adiciona BAP porque la evaluación de los inductores químicos, metil jasmonato y ácido jasmónico, no es necesaria para aumentar el crecimiento de los bulbillos ya generados. En el Cuadro 2, se reportan las cantidades en gramos por litro para la preparación de las soluciones *stock* de los inductores químicos que luego serían adicionados en los medios líquidos de cultivo.

Cuadro 2. Cantidades utilizadas para la preparación de soluciones stocks para los tratamientos con inductores químicos

Inductor químico	Peso molecular	Concentración	MS		Soluciones Stock		Para preparar 10 ml de MS /ml de Solución Stock
			mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	
Ácido Jasmónico	210,3	25 uM	5,26	0,025	1000	5	0,053
		50 uM	10,52	0,05	1000	5	0,105
Metil Jasmonato	224,3	25 uM	5,61	0,025	200	1	0,28
		50 uM	11,22	0,05	200	1	0,56

Para la preparación del inductor químico metil jasmonato se realizó una solución stock de 200 ppm. El procedimiento para la disolución del inductor fue tomado del artículo “Improved production of Galanthamine and Related Alkaloids by Methyl Jasmonate in *Narcissus confusus* shoot clumps” (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004). El inductor fue disuelto en 50 ml de etanol absoluto y posteriormente fue filtrado con una membrana de 0,22 μm ; posteriormente, se adicionaron 280 μL en 10 ml de medio líquido MS, contenidos en un Erlenmeyer de 25 ml, para la concentración de 25 μM . Para el tratamiento con 50 μM de metil jasmonato se agregaron 560 μL en 10 ml de medio líquido MS, contenidos en un Erlenmeyer de 25 ml. El medio líquido estuvo a temperatura ambiente antes de la adición de las concentraciones correspondientes de cada tratamiento. El metil jasmonato se adicionó al medio líquido MS antes de agregar los bulbillos en cada Erlenmeyer. Este procedimiento aporta un porcentaje de etanol al medio de cultivo. El medio con concentración de 25 μM de metil jasmonato tiene 2,7% de etanol y el medio de 50 μM de metil jasmonato tiene 5,4% de etanol.

En el caso del ácido jasmónico, se realizó un *stock* de 1000ppm. El inductor fue disuelto en 50ml de etanol absoluto; posteriormente se filtró en una membrana de 0,22 μm . Se adicionaron 53 μL en 10 ml de medio líquido MS, contenidos en un Erlenmeyer de 25 ml, para la concentración de 25 μM . Para el tratamiento con 50 μM de ácido jasmónico se agregaron 105 μL en 10 ml de medio líquido MS, contenidos en un Erlenmeyer de 25 ml. El medio líquido estuvo a temperatura ambiente antes de la adición de las concentraciones correspondientes de cada tratamiento. El ácido jasmónico se adicionó al medio líquido MS antes de agregar los bulbillos en cada Erlenmeyer. Este procedimiento aporta un porcentaje de etanol al medio de cultivo. El medio con concentración de 25 μM de ácido jasmónico tiene 0,51% de etanol y el medio de 50 μM de ácido jasmónico tiene 1,02% de etanol.

2.4.5 Subcultivo del material vegetal generado *in vitro* en el medio de cultivo líquido.

Se utilizaron bulbillos que tenían dos meses de inducción y crecimiento y se adicionaron al medio líquido de cultivo que contenía la concentración correspondiente de cada inductor a evaluar. El número de bulbillos que fueron tratados en cada medio se determinó teniendo en cuenta la investigación realizada por Ivanov, Georgiev y Pavlov (2013) y el proyecto de grado de Daniel Chamorro (2016). En la primera investigación se evaluó el efecto del ácido jasmónico y el metil jasmonato en la producción de galantamina en la especie *Leucojum aestivum*. En dicho estudio, para la evaluación de la producción de galantamina se utilizaron Erlenmeyers de 500 ml con 200ml de medio líquido con ácido jasmónico o metil jasmonato a 25 μM . La cantidad de material vegetal fresco requerido para la evaluación fue de 11,5 a 12,0 g de peso fresco de bulbillos por Erlenmeyer. Los bulbos fueron adicionados al medio líquido con inductor al día 28 y 35 de crecimiento, temperatura de 26°C, fotoperiodo 16h luz/ 8 h de oscuridad y colocados en un shaker a 110 rpm. Se evaluó la producción de galantamina pasados 1, 4, 7 y

14 días de tratamiento. (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013). En el caso del trabajo de grado de Daniel Chamorro, él encontró que, en promedio, el peso fresco de un bulbillo con hojas producido *in vitro*, de la especie *Zephyranthes carinata*, era de 112,3 mg y el porcentaje de humedad era de 85,7%.

Teniendo en cuenta estos estudios, se realizó un cálculo en el cual se determinó la relación del número de bulbillos a colocar por cada Erlenmeyer de 50 ml con 10 ml de medio líquido con inductores. Al necesitar al menos 11.500 mg de material fresco para cada tratamiento y conociendo que, en promedio, el peso fresco de un bulbillo con hojas es de 112,3 mg, se obtiene que Ivanov y colaboradores utilizaron aproximadamente 102 bulbillos por 200 ml de medio líquido. Lo anterior indica que se adicionó 1,96 ml por bulbillo. A continuación, se expresa la relación mencionada anteriormente.

$$\frac{11500 \text{ mg } \textit{Peso fresco}}{112,3 \text{ mg de } \textit{Peso fresco bulbo con hojas}} = 102 \text{ bulbillos con hojas.}$$

En este proyecto se utilizaron 10 ml de medio líquido para los tratamientos con y sin inductores.

$$10 \text{ ml de medio liquido } \times \frac{102 \text{ bulbos con hojas}}{200 \text{ ml de medio liquido}} = 5,1 \text{ bulbillos}$$

Esta relación indicó que era necesario cultivar 5 bulbillos por Erlenmeyer de 50 ml con 10 ml de medio líquido con o sin inductor.

La edad de los bulbillos para cada tratamiento, como se mencionó anteriormente, fue de dos meses de inducción. Durante este tiempo los bulbillos se encuentran en la etapa exponencial de crecimiento, la cual ha sido reportada como la edad de mayor producción de alcaloides (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013). Adicionalmente, es importante mencionar que, los bulbillos que fueron seleccionados presentaban un tamaño similar. Esto se realizó con el objetivo de evitar la variabilidad entre las muestras.

Las condiciones de fotoperiodo para la evaluación del efecto inductor fueron 16h de luz blanca y 8h de oscuridad, temperatura de 26°C y humedad relativa de 44%. Además, se incubó con movimiento en un skaker Heidolph tipo Unimax 1010DT a 110 rpm. Se evaluó el efecto inductor de cada elicitador después de 10 días de

incubación. En el Cuadro 3, se muestra el número de experimentos y de repeticiones para cada tratamiento realizado. En el Cuadro 3 se reporta que los tratamientos de metil jasmonato presentaron una mayor cantidad de repeticiones comparado con los tratamientos de ácido jasmónico. Esto se debe a que, en los primeros experimentos realizados, en donde se trató de mantener la misma cantidad de repeticiones para cada tratamiento, se pudo observar que el peso seco del material vegetal de los tratamientos que tenían ácido jasmónico era mayor en comparación con el peso seco de los bulbillos que fueron tratados con metil jasmonato. Por lo tanto, se tomó la decisión de realizar más experimentos con el inductor metil jasmonato.

Cuadro 3. Experimentos y número de repeticiones evaluados por tratamiento

Experimento	No de Erlenmeyer con 5 bulbillos cada uno					No de Erlenmeyer sin bulbillos				
	Metil Jasmonato		Ácido Jasmónico		Control sin inductor	Metil Jasmonato		Ácido Jasmónico		Control sin inductor
	25 uM	50 uM	25 uM	50 uM	Medio liquido con plantas	25 uM	50 uM	25 uM	50 uM	Medio liquido sin inductor
1	4	4	0	0	1	0	0	0	0	1
2	0	0	4	4	1	0	0	0	0	0
3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	2	2	0	0	0	0	0	0	0	1
7	4	3	0	0	0	0	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	3	3	3	3	1
Total de Erlenmeyers por tratamiento	17	16	7	7	5	3	3	3	3	4

Después de 10 días de incubación se retiraron los bulbillos de cada Erlenmeyer, se agruparon por tratamiento y se realizó la medición del peso fresco total de los bulbillos y hojas. Posteriormente, el material vegetal se dejó en un horno a 47°C por 3 días, por último, se realizó la medición del peso seco. En la Figura 14, se esquematiza el procedimiento anteriormente descrito.

El peso seco de los bulbillos de cada tratamiento se dividió en muestras aproximadamente de 150 mg. Se utilizó esta cantidad como mínimo requerido debido a que los ensayos anteriores mostraron que una menor cantidad de material vegetal dificultaba la detección de los alcaloides en UPLC/MS, debido a la sensibilidad del equipo. Se analizaron todas las muestras obtenidas, pero debido a las diferencias en la cantidad total de materia seca obtenida en cada tratamiento, al

agrupar las muestras en grupos de 150 mg, resultó que, en algunos casos, hubo que analizar un mayor número de muestras en comparación con otros tratamientos (Cuadro 4).

Para la extracción de alcaloides en los tratamientos de medios líquidos, con o sin inductores, se necesitaron, de acuerdo al protocolo de extracción, 10 ml de medio líquido. El muestreo de este medio, se realizó tomando aleatoriamente 5 ml de cada Erlenmeyer evaluado por de cada tratamiento hasta completar los 10 ml necesarios. Este procedimiento se realizó hasta muestrear todas las repeticiones por cada tratamiento y por experimento. En el Cuadro 4, se resume la cantidad de repeticiones obtenidas a partir del muestreo de los medios líquidos.

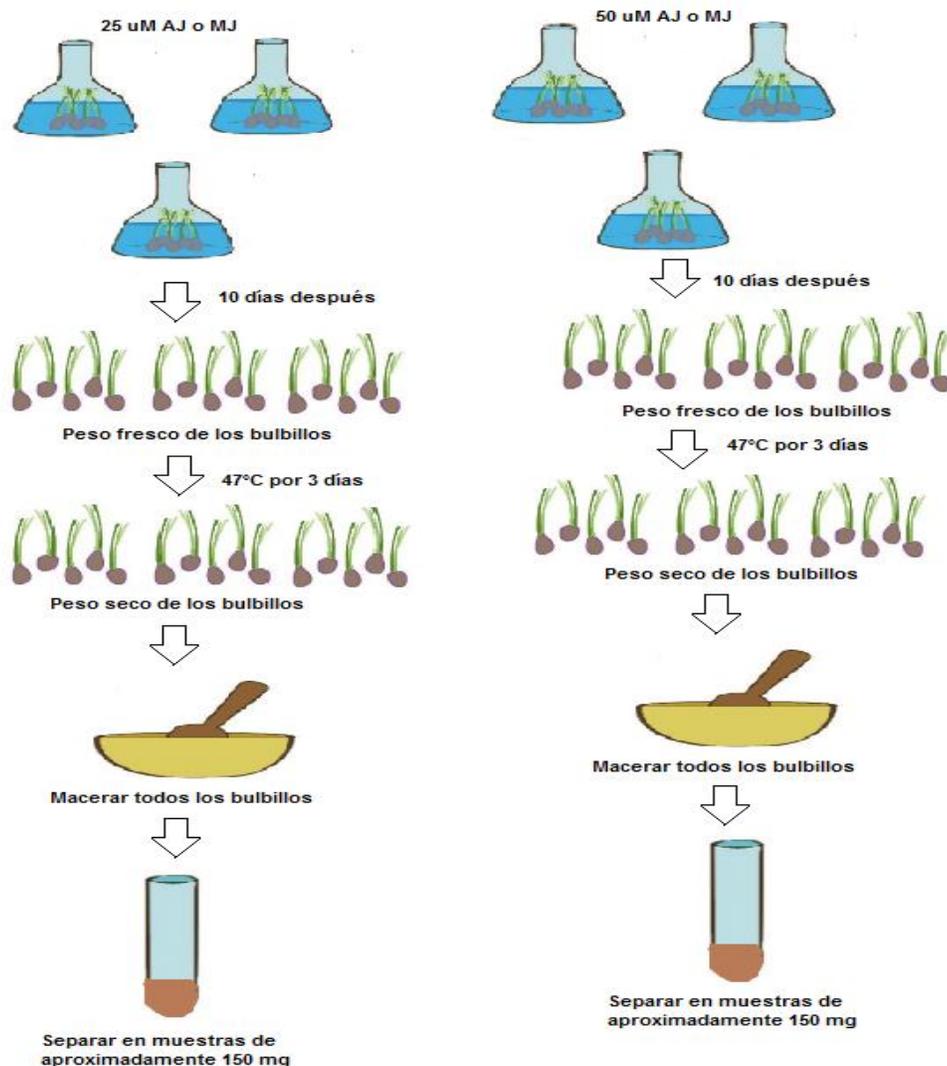


Figura 14. Esquema experimental de tratamientos con MJ o AJ por repeticiones

Cuadro 4. Repeticiones obtenidas a partir de los tratamientos realizados

Material	Tratamiento	Total de Erlenmeyers por tratamiento	No de repeticiones consolidadas en el UPLC/MS	Peso seco total evaluado (mg)	Volumen total evaluado (mL)
Vegetal	25 μ M de Ácido Jasmónico	7	3	1634,2	NA
	50 μ M de Ácido Jasmónico	7	2	1113,3	NA
	25 μ M de Metil Jasmonato	17	2	879,2	NA
	50 μ M de Metil Jasmonato	16	3	717,6	NA
	Control	6	2	711,0	NA
Medio líquido	25 μ M de Ácido Jasmónico	7	2	NA	30
	50 μ M de Ácido Jasmónico	7	2	NA	30
	25 μ M de Metil Jasmonato	17	4	NA	40
	50 μ M de Metil Jasmonato	16	4	NA	60
	Control	6	3	NA	40

2.4.6 Extracción de alcaloides

2.4.6.1 Extracción del material vegetal

Después de realizar el subcultivo de los bulbillos por 10 días en los medios líquidos que contenían las concentraciones correspondientes a cada inductor, se retiró el material vegetal, se hizo la medición del peso fresco y se llevó el material a secar en una estufa con temperatura de 47°C. Después de 3 días de secado, se procedió

con la extracción de alcaloides del material vegetal (Figura 14). El proceso de extracción de alcaloides se efectuó con el protocolo descrito a continuación. Este protocolo fue previamente estandarizado por (Guillermo Montoya, 2016, Universidad Icesi, Departamento de ciencias farmacéuticas, comunicación personal)

1. Retirar el material vegetal del medio de cultivo líquido que contenía cada inductor químico.
2. Llevar el material vegetal a una estufa a una temperatura de 47° por 3 días
3. Confirmar, después de los 3 días, que el material este completamente seco, es decir, el material se fragmenta con facilidad.
4. Macerar material vegetal
5. Pesar, en un tubo Falcón, aproximadamente 150 mg del material vegetal macerado.
6. Adicionar al tubo Falcón que contiene el material vegetal 5 ml de metanol grado HPLC.
7. Sonicar o colocar en agitador vortex por 5 min.
8. Centrifugar por 5 min a una temperatura de 24°C y 5000 rpm.
9. Agregar el sobrenadante en un Erlenmeyer de 50 ml.
10. Agregar al pellet 5 ml de metanol grado HPLC
11. Repetir el paso 7 y 8
12. Agregar el sobrenadante al mismo Erlenmeyer del paso 9
13. Agregar al pellet 5 ml de HCl 0.1 N
14. Sonicar o colocar en agitador vortex por 5 min
15. Centrifugar por 5 min a una temperatura de 24°C y 5000rpm
16. Agregar el sobrenadante al Erlenmeyer del paso
17. Agregar 10 ml de Cloroformo al Erlenmeyer que contiene los sobrenadantes de los pasos 9, 12 y 16.
18. Agregar la muestra difásica del paso 17 en un embudo de separación.
19. Separar la fase acuosa de la fase orgánica. Descartar la fase orgánica
20. A la fase orgánica, agregar 2 gotas de hidróxido de amonio al 30%
21. Medir pH. El pH debe estar entre 9 y 10
22. Agregar 10 ml de cloroformo
23. Agregar la muestra difásica producida en el paso 22 a un embudo de separación
24. Separar la fase orgánica de la acuosa. Descartar la fase acuosa
25. Secar la fase orgánica en rapidvap con las siguientes condiciones; Temperatura: 40°C, Vacío: 300bares, Velocidad 40rpm, Tiempo 120 minutos.
26. Preparar una solución de Boldina a una concentración de 50ppm en metanol grado HPLC

27. Reconstituir muestras previamente secadas con 1 ml de solución Boldina 50ppm
28. Filtrar muestra reconstituidas con un filtro de membrana de 0.22 μ m
29. Colocar filtrado en viales de UPLC
30. Llevar muestras para cuantificación mediante UPLC/MS

2.4.6.2 Extracción de medio líquido

Para la extracción del medio líquido con o sin inductores se realizó el procedimiento que a continuación se describe. Este protocolo fue estandarizado por (Guillermo Montoya, 2016, Universidad Icesi, Departamento de ciencias farmacéuticas, comunicación personal).

1. Tomar 10ml de muestra y agregarle 5ml de HCl 0.1N.
2. Sonicar o agitar en vortex por 5 min.
3. Centrifugar por 5 min a una temperatura de 24°C y 5000rpm.
4. Agregar el sobrenadante a un Erlenmeyer de 50ml.
5. Al sobrenadante, agregar 10ml de cloroformo.
6. En un embudo de separación, separar la fase acuosa de la fase orgánica. Descartar la fase orgánica.
7. A la fase orgánica, agregar 2 gotas de hidróxido de amonio al 30%.
8. Medir el pH. El pH debe estar entre 9 y 10.
9. Agregar 10 ml de cloroformo.
10. En un embudo de separación, separar la fase orgánica de la fase acuosa. Descartar la fase acuosa.
11. Secar la fase orgánica en rapidvap con las siguientes condiciones; Temperatura: 40°C, Vacío: 300bares, Velocidad 40rpm, Tiempo 120 minutos.
12. Reconstituir muestras previamente secadas con 1 ml de Boldina 50ppm
13. Filtrar muestra reconstituidas con un filtro de membrana de 0.22 μ m
14. Colocar filtrado en viales de UPLC
15. Llevar muestras para cuantificación mediante UPLC/MS.

2.4.7 Análisis y cuantificación de alcaloides

Se realizó la cuantificación de alcaloides utilizando el equipo UPLC acoplado a masas presente en la Universidad Icesi. Las condiciones para la cuantificación fueron tomadas del trabajo de grado de Marcela Rivera, en el cual se realiza una biblioteca espectral de alcaloides de *Amaryllidaceae* y se definen los reactivos a utilizar para el análisis por UPLC/MS. La referencia del equipo UPLC/MS utilizado

es Waters® (SQD2). En los Cuadros 5 y 6 se reportan los reactivos y condiciones del análisis cromatográfico realizado.

Cuadro 5. Reactivos para análisis por UPLC/MS

Reactivo	Pureza	Marca
Acetonitrilo grado hypergrade	99,9%	MERCK
Ácido fórmico	85%	ALDRICH Chemistry

Cuadro 6. Condiciones para el análisis por UPLC/MS

Columna	ACQUITY CSH (Charged Surface Hybrid) 2.1 mm x 100. Tamaño de partícula 1.7 um
Temperatura	25°C
Fase Móvil	Solvente A: Agua (0.05% de Ácido fórmico) Solvente B: Acetonitrilo
Flujo	0.3ml/min
Voltaje Cono	70 V
Flujo gas	650L/ Nitrógeno
Masas	10-600m/carga
SIR	265.3 m/z, 328.3m/z
ES+	Ionización +

2.4.7.1 Identificación de alcaloides

Para la identificación de alcaloides se analizaron los espectros cromatográficos y de masas de cada muestra obtenida. Se tuvo como referencia el artículo “Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS” (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012), y el proyecto de grado de Marcela Rivera (Rivera, 2015). Estos documentos fueron utilizados porque hasta la fecha no se han reportado estudios realizados en la especie *Zephyranthes carinata* que permitan determinar específicamente el tipo de alcaloides que produce esta especie. Sin embargo, sí se han reportado cierto grado de similitud entre las estructuras alcaloidales de cada especie.

Se compararon los parámetros de identificación de cada muestra con los reportados en los documentos mencionados anteriormente. Dentro de los parámetros analizados se encuentran: el tiempo de retención de cada molécula, el ion molecular

y el pico base. Adicionalmente, se tuvieron en cuenta algunos picos característicos para cada molécula en el espectro de masas. En las Figuras 15 y 16 se muestra un ejemplo de lo descrito anteriormente. Estos espectros se obtuvieron con el equipo UPLC/MS referencia Waters® (SQD2) y el software masslinx. En la Figura 15, es posible observar los picos correspondientes a las diferentes moléculas retenidas a cada tiempo de retención. Para poder determinar si las moléculas retenidas tenían una posiblemente estructura alcaloidal se obtuvo, con el software masslinx, el espectro de masas (Figura 16) para cada molécula retenida en los diferentes tiempos de retención. Debido a que el modo de ionización es positivo, la molécula es protonada y se espera que la relación carga/masa (m/z) siempre sea un número par, lo cual es un indicativo, teniendo en cuenta que las estructuras alcaloidales de esta familia solo poseen un nitrógeno intracíclico.

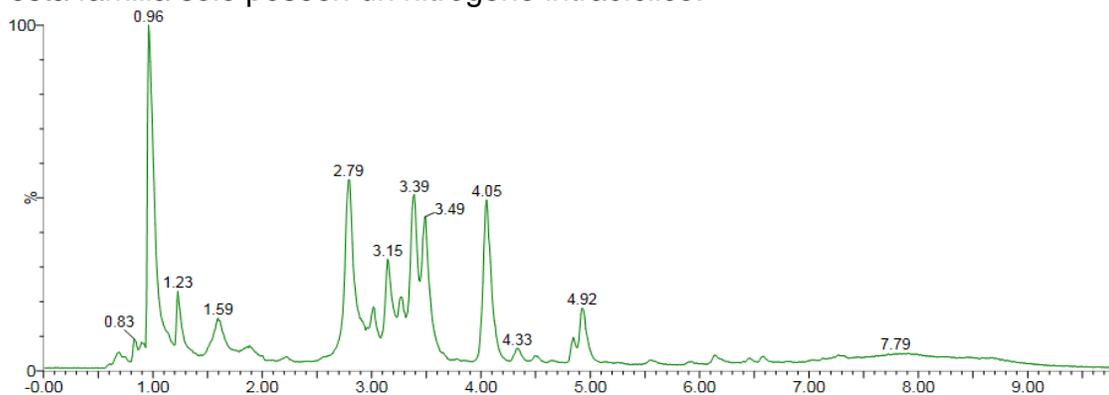


Figura 15. Ejemplo de espectro cromatográfico obtenido en la identificación de alcaloides de la especie *Zephyranthes carinata*. En el eje x se tiene el tiempo de retención y en el eje Y se tiene el porcentaje de cada pico retenido. Este espectro se obtuvo con el UPLC/MS Waters® (SQD2) y el software masslinx.

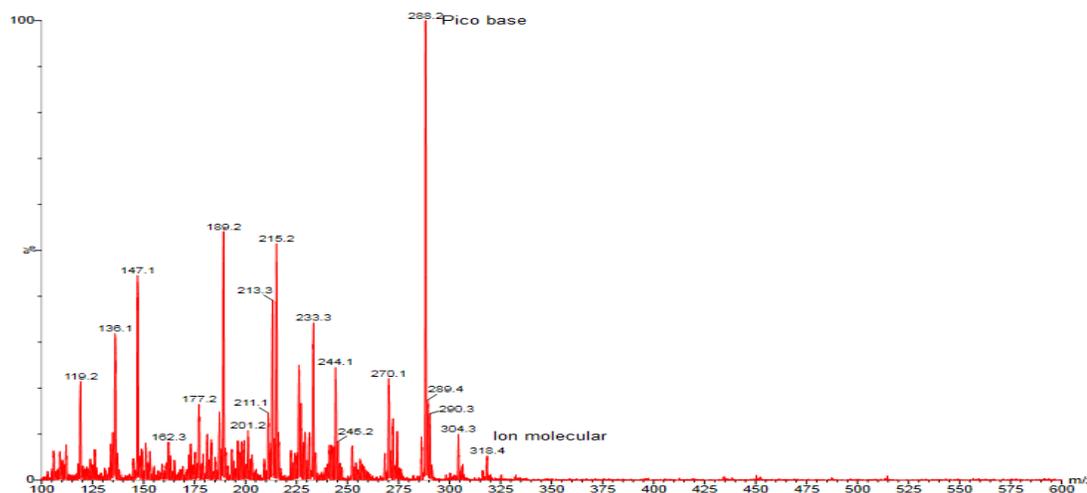


Figura 16. Ejemplo espectro de masas obtenido en la identificación de alcaloides de la especie *Zephyranthes carinata*. Espectro obtenido de la molécula retenida al tiempo 0,96. En el eje X se tiene la relación masa carga (m/z) y en el eje Y el porcentaje de abundancia de las diferentes fragmentaciones de la molécula retenida al tiempo 0,96. Este espectro se obtuvo con el UPLC/MS Waters® (SQD2) y el software masslinx.

2.4.7.2 Semicuantificación de alcaloides.

Para la semicuantificación de alcaloides totales se utilizó como estándar: Boldina, a una concentración de 50ppm. Se utilizó esta molécula como estándar ya que es un alcaloide con una estructura similar a los alcaloides de *Amaryllidaceae* (Wagner & Bladt, 1996). Esto permitió hacer una relación entre el área bajo la curva del pico de la Boldina y el área bajo la curva de los demás alcaloides presentes para cada tiempo de retención. Las áreas bajo la curva, diferenciada por los colores de la Figura 17, se obtuvieron a partir del software masslinx y son reportadas en la parte superior de cada pico.

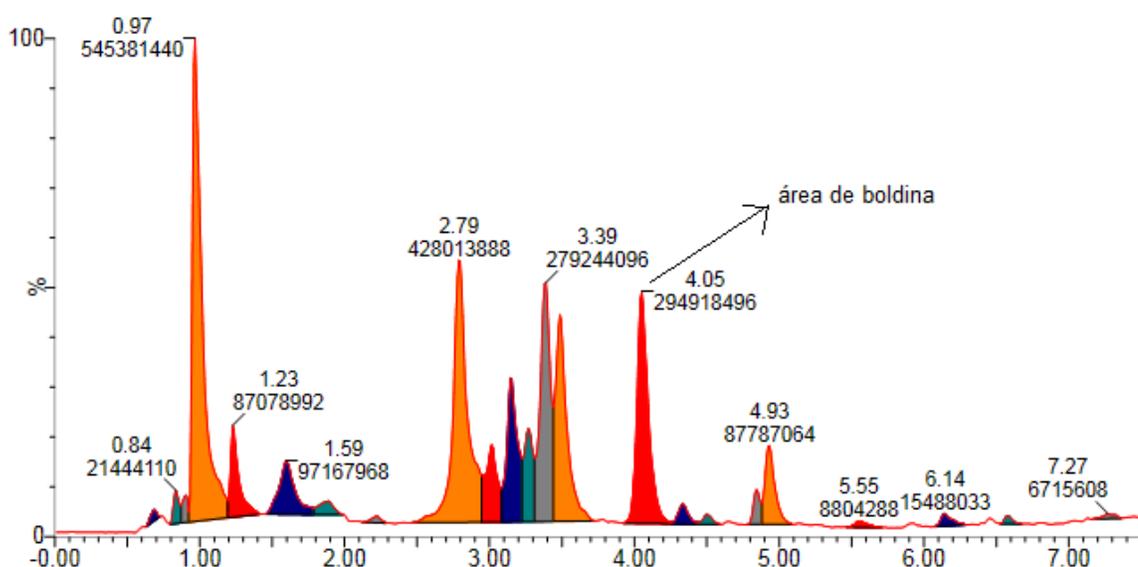


Figura 17. Áreas de cada molécula retenida a los diferentes tiempos de retención. En el eje X se encuentra el tiempo de retención y en el eje Y el porcentaje de cada pico retenido. Este espectro se obtuvo con el UPLC/MS Waters® (SQD2) y el software masslinx

Para determinar la concentración (ppm) del alcaloide retenido al tiempo 0,97 se realizó el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Área del alcaloide al Tr } 0,97 \times 50\text{ppm}}{\text{Área de la boldina}} = \text{Concentración (ppm) del alcaloide al Tr } 0,97$$

Para determinar la concentración porcentual en peso del alcaloide retenido al tiempo 0,97 se realizó el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Area del alcaloide}}{\text{Area de la boldina}} \times \frac{\text{al Tr } 0,97 \times 50\text{ppm}}{1000\text{ml}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} \times \frac{1\text{ml}}{\text{Peso del material vegetal seco de cada muestra}} = \% \frac{p}{p} \text{ de alcaloide retenido al Tr } 0,97$$

Este cálculo se realizó para todas las moléculas alcaloidales presentes en el espectro cromatográfico y comprobadas con el espectro de masas. Posteriormente, se realizó la suma de todas las concentraciones por muestra para determinar la cantidad de alcaloides totales para cada muestra. En el caso de la cuantificación en medio líquido no se divide por el peso del material vegetal seco de cada muestra sino por el volumen tomado inicialmente para la extracción, es decir, 10 ml.

2.4.8 Análisis estadísticos de los resultados

El análisis estadístico se realizó para los datos obtenidos de la cuantificación de los alcaloides, es decir, para las concentraciones encontradas a partir de las áreas de cada cromatograma. En este caso, se utilizó el promedio, la desviación estándar y el error estándar. El promedio permitió determinar un valor aproximado de la concentración de alcaloides para cada tratamiento y en cada repetición realizada. En el caso de la desviación estándar y el error estándar se pudo analizar la variabilidad de cada muestra y entre las medias de las muestras respectivamente (Minitab, 2016).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Inducción de bulbillos en medio MSA1 a partir de bulbos provenientes del invernadero

Se cultivaron un total de 242 escamas de las cuales 164 presentaron la inducción de al menos un bulbillo, teniendo así 67.8% de respuesta, después de un mes de cultivo *in vitro*. En total se produjeron 265 bulbillos de 164 escamas que presentaron respuesta. El porcentaje de respuesta se calculó contabilizando el número de escamas que produjeron al menos un bulbillo respecto al total de explantes (twin scales) cultivados. Las escamas sin respuesta no mostraron cambios en tamaño ni en coloración respecto al día de siembra (Figura 16-A), mientras que las escamas que indujeron bulbillos, inicialmente mostraron un cambio de coloración de blanco a café a las 2 semanas del cultivo (Figura 16-B), las escamas se abrieron a las 3 semanas de cultivo y posteriormente se observó el crecimiento de brotes. Los bulbillos y hojas fueron observados después de un mes de cultivo (Figura 16-C).



Figura 18. Inducción de bulbillos después de un mes del cultivo de las escamas (twin scales) en condiciones *in vitro*. A) Escamas sin cambio de color. B) Escamas que presentan cambio de color. C) Escamas con formación de bulbillos.

2.5.2 Evaluación del peso fresco, seco y porcentaje de humedad del material vegetal producido.

En el momento de aplicar los tratamientos con ácido jasmónico y metil jasmonato, los bulbillos tenían un tamaño similar entre ellos y respecto al control. Sin embargo, después de 10 días de tratamiento se observan diferencias significativas en el crecimiento de los bulbillos según el tratamiento aplicado; variaciones que se traducen en diferencias tanto en peso fresco como en peso seco respecto al control (Cuadro 7 y Figura 19). En general, las mayores diferencias en crecimiento se

registraron en el peso seco respecto al control, es decir en la producción de material vegetal. El mayor peso seco por bulbillo se obtuvo con el tratamiento 25 uM de ácido jasmónico, donde se obtienen bulbillos con un incremento de 1.7 veces mayor de peso seco respecto al control (Figura 19). En contraste, los bulbillos tratados con metil jasmonato se desarrollaron menos, mostrando una reducción de 0.6 veces en peso seco respecto al control (Figura 19). En general el tratamiento con metil jasmonato indujo un menor porcentaje de humedad en los bulbillos respecto al peso seco, y en relación al control y a los tratamientos con ácido jasmónico, entre los cuales no se encontraron diferencias significativas (Figuras 20 y 21). Los tratamientos con metil jasmonato muestran un leve porcentaje de deshidratación respecto al control (Figura 20).

En el Cuadro 7 se muestran los pesos fresco y seco promedio por tratamiento, es decir, se tomaron todos los datos obtenidos durante todos los experimentos realizados y se promediaron para conocer el valor medio de los pesos frescos y secos.

Cuadro 7. Peso fresco y seco promedio después de 10 días de tratamiento con o sin inductores

	Tratamientos									
	Ácido Jasmónico				Metil Jasmonato				Control Con Plantas	
	25 uM		50 uM		25 uM		50 uM			
	Peso Fresco (mg)	Peso Seco (mg)	Peso Fresco (mg)	Peso Seco (mg)						
Promedio	4948,5	489,2	3763,1	423,8	1369,3	268,5	1381,3	195,8	1808,6	237
Desviación Estándar	1798,4	373,5	2025,5	158,5	431,1	153,8	469,1	81,7	1528,6	217,7
Error Estándar	1271,7	264,1	1432,3	112,1	176,0	62,8	191,5	33,3	882,6	125,7

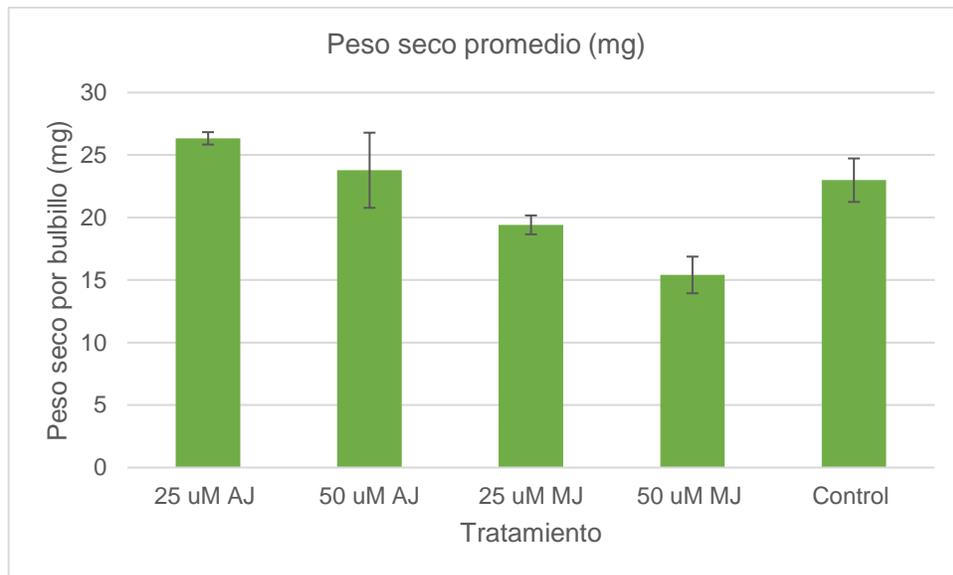


Figura 19. Peso seco promedio por bulbilllo después de 10 días de tratamiento con o sin inductores

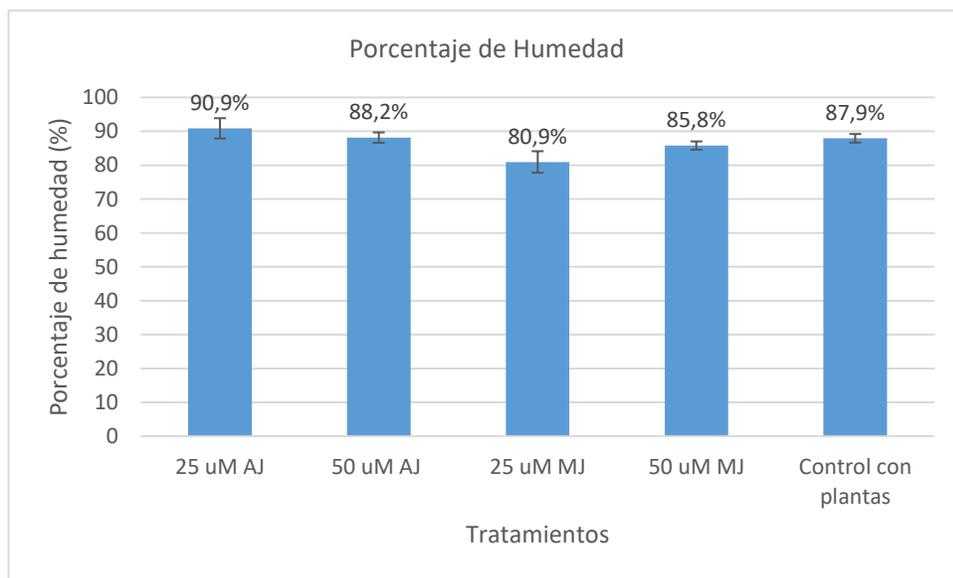


Figura 20. Porcentaje de humedad por bulbilllo después de 10 días de tratamiento con o sin inductores

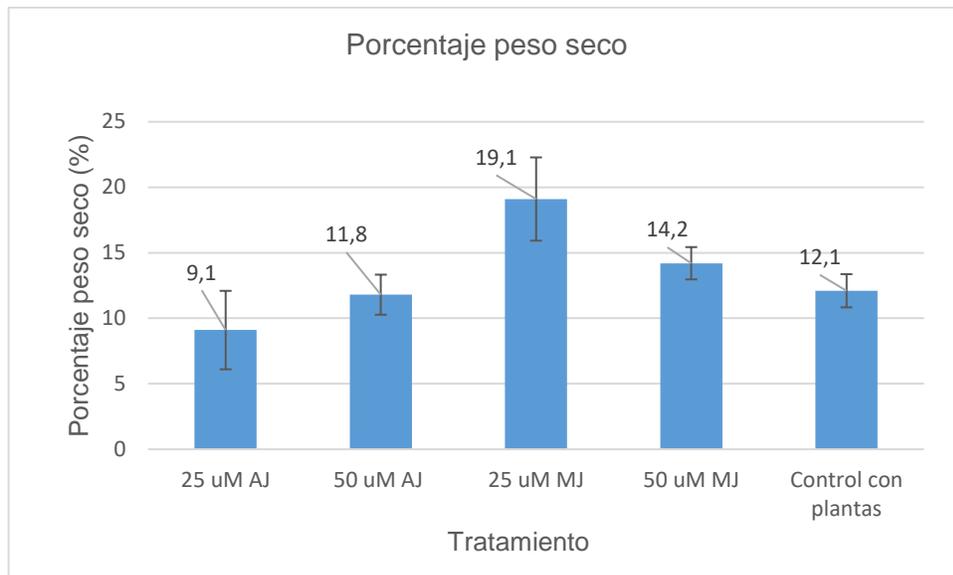


Figura 21. Porcentaje de peso seco por bulbillo después de 10 días de tratamiento con o sin inductores

2.5.3 Evaluación del efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico

Además de los efectos en peso fresco y peso seco, también se observaron cambios en la coloración de los tejidos después de 10 días de tratamiento con los inductores. En los tratamientos con ácido jasmónico además de presentarse un mayor desarrollo de los bulbillos y las hojas respecto al control, los tejidos presentaron una coloración verde rojiza (Figura 22). En contraste, en los tratamientos con metil jasmonato los tejidos no se desarrollaron más que el control, y el tratamiento con 50 uM de metil jasmonato, los bulbillos perdieron completamente la clorofila, luciendo blanquecinos (Figura 22). Los tejidos control lucieron verdes, túrgidos y saludables (Figura 22).



Figura 22. Bulbillos después del tratamiento con o sin inductores

Para la evaluación del efecto inductor del metil jasmonato y del ácido jasmónico se evaluaron los tipos y cantidad de alcaloides producidos en cada tratamiento en relación al control.

2.5.3.1 Identificación de alcaloides

La identificación de alcaloides se realizó teniendo en cuenta el artículo de Katoch y colaboradores en 2012 (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012), el proyecto de grado de Marcela Rivera, egresada del programa de Química Farmacéutica, Universidad Icesi, “Creación de una biblioteca espectral de alcaloides de Amaryllidaceae” (Rivera, 2015), y el proyecto de grado realizado en simultaneidad en el mismo laboratorio con este PDG por Camila Tofiño titulado “Optimización de la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata* por medio de Organogénesis o Embriogénesis Somática *in vitro*”. Los alcaloides fueron tentativamente identificados tomando en cuenta el tiempo de retención y las fragmentaciones comunes en los espectros de masas obtenidos en cada muestra. Se llamó fragmentaciones comunes a aquellas relaciones masa/carga (m/z) generadas por la división de la molécula y obtenidas en las muestras analizadas. Utilizando este análisis, se muestran un total de 19 alcaloides potenciales que, probablemente, se encuentran en la especie *Zephyranthes carinata* (Cuadro 8). Aquellos alcaloides cuyos patrones de espectro no mostraron similitud con los alcaloides reportados por Katoch y colaboradores en 2012, ni en el proyecto de grado de Rivera 2015, se denominaron como Desconocidos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Identificación de alcaloides producidos en condiciones *in vitro* por *Zephyranthes carinata* después de 10 días de tratamiento con o sin inductores. Se utilizó como referencia los tiempos de retención y fragmentaciones (m/z) de los alcaloides reportados

Clasificación	Tiempo de Retención	Fragmentaciones comunes	Pico Base	Tiempo de Retención del Artículo, Katoch y colaboradores 2012	Fragmentaciones comunes, Katoch y colaboradores 2012	Tiempo de retención Rivera 2015	Fragmentaciones comunes, Rivera 2015
Desconocido 1	0,78-0,84	291, 290, 272, 254, 215, 180, 179, 147, 119	290	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Desconocido 2	0,89	290, 276, 219, 175, 147, 121, 103	103	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Desconocido 3	0,9	318, 288, 270, 233, 215, 147, 136	288	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Licorina	1,21	288, 270, 252, 213, 189, 147, 136, 119	147	1,91	288, 270, 252, 147, 119	No reportado	No reportado
Licoramina	1,5	290, 288, 233, 215, 189, 149, 135	215	2,11	290, 233, 215, 189	2,09	290, 233, 215, 189

Desconocido 4	1,48 - 1,51	119, 136, 189 215, 268, 288	136	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Desconocido 10	2,03	290, 274, 120, 103	103	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Hamaina	2,4 -2,7	288, 270, 244, 226, 211, 196, 181	288	2,74	288, 270, 226, 196, 181, 153	No reportado	No reportado
Zaideina	2,9 -3,1	318, 287, 268, 227,199, 167, 141	227	3,52	318, 287, 268, 258, 239, 199, 167	No reportado	No reportado
Galantina	2,9 - 3,0	318, 286, 237, 193, 162, 126, 113	193	2,61	318, 286, 268, 237, 193, 162, 147	2,59	318, 286, 268, 237, 193, 162
Hemantamina	3,1 -3,3	318, 303, 302, 286, 272, 270, 252, 227, 226, 211, 196, 181, 149, 136	302	3,95	302, 270, 226, 211, 181, 153	3,30	302, 270, 226, 211, 181
Vitatina	3,2- 3,4	303, 302, 288, 272, 254, 226,196, 149, 118	272	4,12	272, 254, 226, 196, 149, 118	3,31	272, 254, 226, 196
Desconocido 5	4,4-4,8	338, 337, 336, 318, 304,257, 114	336	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Desconocido 6	4,6-5,0	336, 329,292, 260, 114	320	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Desconocido 11	3,8-4,4	330, 270, 226, 181, 155, 113	330	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Desconocido 12	7,0- 7,9	285, 273, 255, 234, 208, 177, 154, 149, 120	149	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Desconocido 13	0,6	290, 272, 267, 181, 151, 109	109	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Desconocido 14	3,3-3,4	302, 298, 272, 226, 209, 136, 119	136	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado
Desconocido 15	0,68 - 0,70	251, 235, 213, 130, 104	104	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado

Los resultados sugieren que se producen una gran diversidad de alcaloides en esta especie y en los tratamientos evaluados. Se detectaron un total de 13 alcaloides en el control del material vegetal (Cuadro 9). Es decir, que hay 6 alcaloides que fueron

detectados en los tratamientos y no en el material vegetal (Cuadro 9). Estos son la Licoramina, los Desconocidos 2, 6, 13, 14, y 15. Adicionalmente, la galantina fue solo detectada en el material vegetal. Llama la atención que el desconocido 2 solo fue detectado en el medio líquido del tratamiento 50 uM de ácido jasmónico (Cuadro 9). En general, se detectaron un mayor número de alcaloides en las muestras de tejido vegetal independientemente del tratamiento (entre 11 y 13 tipos de alcaloides) en relación a sus respectivas muestras de medio líquido (entre 7 y 13 tipos de alcaloides). Los tratamientos en material vegetal con ácido jasmónico produjeron la mayor diversidad (mayor número) de alcaloides respecto al tratamiento con metil jasmonato (Cuadro 9). Sin embargo, se presentó mayor cantidad de alcaloides en el medio líquido tratado con metil jasmonato comparado con el ácido jasmónico y el control. El tratamiento en material vegetal con el mayor número de alcaloides (13 en total) fue 25 uM de ácido jasmónico. En el caso de los tratamientos en medio líquido se encontró mayor número de alcaloides en el tratamiento de 50 uM de metil jasmonato. Es importante destacar que hay 8 alcaloides que se detectaron en todas las muestras y en todos los tratamientos, incluyendo a los controles, el material vegetal y medio líquido, estos son los alcaloides Desconocido 3, Desconocido 6, Licorina, Licoramina, Hemantamina, Hamaina, Zaideina y Vitatina (Cuadro 9). Estos 8 alcaloides fueron seleccionados y denominados en este trabajo como representativos, para realizar análisis cuantitativos comparativos más específicos como se muestran en las secciones a continuación.

Cuadro 9. Diversidad de estructuras alcaloidales presentes en los tratamientos con y sin inductor para la especie *Zephyranthes carinata*.

Alcaloide	Material Vegetal					Medio Líquido				
	Ácido Jasmónico		Metil Jasmonato		Control	Ácido Jasmónico		Metil Jasmonato		Control
	25 uM	50 uM	25 uM	50 uM		25 uM	50 uM	25 uM	50 uM	
Desconocido 1	X	X	X		X			X	X	
Desconocido 2							X			
Desconocido 3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Licorina	X	X	X	X	X	X		X	X	X
Licoramina	X	X	X	X		X		X	X	X
Desconocido 4	X	X		X	X					
Desconocido 10					X				X	
Hamaina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Zaideina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Galantina					X					
Hemantamina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vitatina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Desconocido 5	X				X					
Desconocido 6	X	X	X	X		X	X	X	X	X
Desconocido 11			X		X			X	X	
Desconocido 12				X	X			X	X	
Desconocido 13		X		X					X	X
Desconocido 14	X	X								
Desconocido 15	X		X					X		
Total de Alcaloides	13	12	11	11	13	8	7	12	13	9

2.5.3.2 Cuantificación de alcaloides totales

La cuantificación total de alcaloides por tratamiento se realizó cuantificando el área obtenida bajo la curva de cada cronograma. Los resultados indican que en general se obtiene una mayor concentración total de alcaloides en el medio líquido en relación a su respectivo material vegetal (Figura 23). La mayor concentración total de alcaloides se encontró en el medio líquido con 50 uM de metil jasmonato, y la mayor concentración total en tejido vegetal con 25 uM de metil jasmonato (Figura 23), aunque hay que destacar que también fue en este tratamiento que se obtuvo el mayor error estándar.

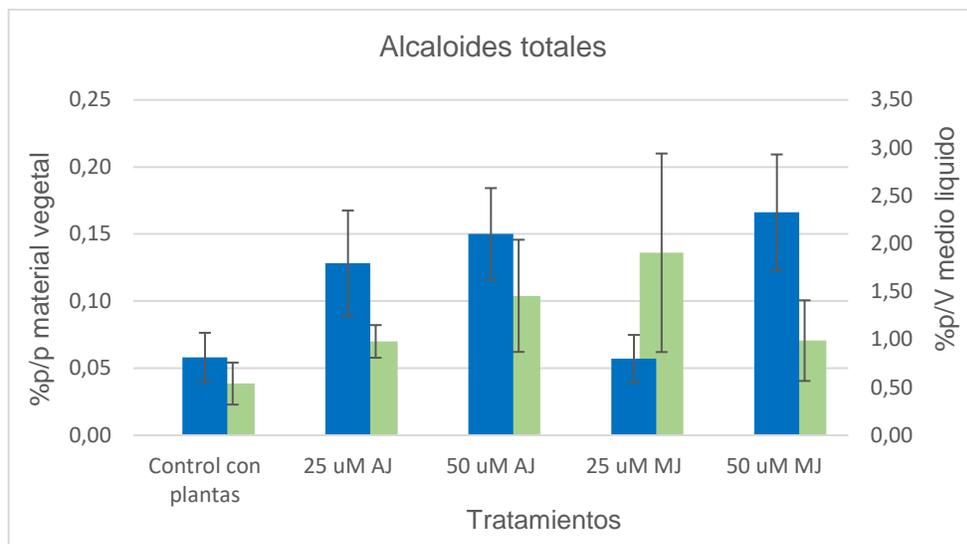


Figura 23. Concentración total de alcaloides obtenidos por tratamiento en el medio líquido (% p/V, Barras Azules) y tejido vegetal (% p/p, Barras Verdes). Se presentan los resultados con el error estándar de cada tratamiento.

2.5.4 Efecto inductor del ácido jasmónico y el metil jasmonato

Se realizó la cuantificación de los alcaloides más representativos, es decir, de aquellas moléculas que se presentaron en la mayoría de muestras analizadas, teniendo en cuenta el tiempo de retención y los picos característicos de los espectros de masas. En el Cuadro 10 se resumen las concentraciones específicas de estos alcaloides en términos de %p/p y %p/V y las actividades farmacológicas que han sido reportadas en diferentes estudios. En general, con base a los análisis en el material vegetal y en el medio líquido para cada uno de estos alcaloides, el orden decreciente de las concentraciones de los alcaloides representativos es Desconocido 3 > Hamaina > Hemantamina = Vitatina > Zaideina > Licorina = Licoramina = Desconocido 6 (Cuadro 10). En general, la concentración en el medio líquido para estos alcaloides fue en promedio 20 veces mayor que para el material vegetal (de 17X a 25X dependiendo del alcaloide) (Cuadro 10). Adicionalmente, se obtuvo mayor concentración de alcaloides, de 2X a 6X más, en los tratamientos con los inductores químicos respecto al control.

Cuadro 10. Concentraciones de los alcaloides representativos presentes en los tratamientos evaluados y efecto farmacológico reportado.

Alcaloide	Tratamiento	%p/p	%p/V	Efecto farmacológico
Desconocido 3	25 uM AJ	0,0320	0,5414	No se reporta
	50 uM AJ	0,0344	0,6717	
	25 uM MJ	0,0426	0,2999	
	50 uM MJ	0,0247	0,7392	
	control con plantas	0,0212	0,3060	
	TOTAL	0,1549	2,5582	17X
Hamaina	25 uM AJ	0,0053	0,3097	Reportado con actividad antimicrobiana (Adesanya, Olugbade, Odebiyi, & Aladesanmi, 1992)
	50 uM AJ	0,0128	0,3498	
	25 uM MJ	0,0232	0,1069	
	50 uM MJ	0,0123	0,5211	
	control con plantas	0,0041	0,1342	
	TOTAL	0,0576	1,4217	25X
Hemantamina	25 uM AJ	0,0105	0,3800	Reportado con actividad citotóxica y antimicótica (Katoch & Singh, 2015)-
	50 uM AJ	0,0132	0,4049	
	25 uM MJ	0,0152	0,1281	
	50 uM MJ	0,0092	0,2824	
	control con plantas	0,0042	0,1223	
	TOTAL	0,0523	1,3176	25X
Vitatina	25 uM AJ	0,0087	0,3230	No se reporta
	50 uM AJ	0,0142	0,2953	
	25 uM MJ	0,0144	0,0657	
	50 uM MJ	0,0100	0,2548	
	control con plantas	0,0067	0,1169	
	TOTAL	0,0539	1,0556	20X
Zaideina	25 uM AJ	0,0045	0,1182	No se reporta
	50 uM AJ	0,0065	0,1570	
	25 uM MJ	0,0106	0,1108	
	50 uM MJ	0,0104	0,2170	
	control con plantas	0,0035	0,0691	

	TOTAL	0,0355%	0,6720%	19X
Licoramina	25 uM AJ	0,0034	0,1807	Reportado con acciones neurofarmacológicas (Irwin & Smith III, 1960)
	50 uM AJ	0,0082	0,1466	
	25 uM MJ	0,0108	0,0411	
	50 uM MJ	0,0039	0,1913	
	control con plantas	0,0000	0,0705	
	TOTAL	0,0262	0,6301	24X
Licorina	25 uM AJ	0,0030	0,0960	Reportado con actividad antiproliferica en células cancerígenas. (Liu, Hu, Fang He, Ye, & Li, 2004)
	50 uM AJ	0,0046	0,1223	
	25 uM MJ	0,0077	0,0566	
	50 uM MJ	0,0056	0,2055	
	control con plantas	0,0021	0,0953	
	TOTAL	0,0230	0,5756	25X
Desconocido 6	25 uM AJ	0,0030	0,0728	No se reporta
	50 uM AJ	0,0046	0,0730	
	25 uM MJ	0,0077	0,0641	
	50 uM MJ	0,0056	0,1930	
	control con plantas	0,0021	0,0297	
	TOTAL	0,0230	0,4326	19X

Se encontró que el alcaloide clasificado como Desconocido 3, presentó las mayores concentraciones en el medio líquido indistintamente del tratamiento evaluado (Figura 24), y la mayor concentración registrada para todos los tratamientos ($739,2 \times 10^{-3} \% \text{ p/V}$, Cuadro 10) . En el caso de los alcaloides para los cuales se ha reportado actividad farmacológica (Cuadro 10), se observa que la mayor concentración del alcaloide se obtuvo con el tratamiento de 50 uM de metil

jasmonato para los alcaloides Licorina, Licoramina, Hamaina y de 50 uM de ácido jasmónico para Hemantamina.

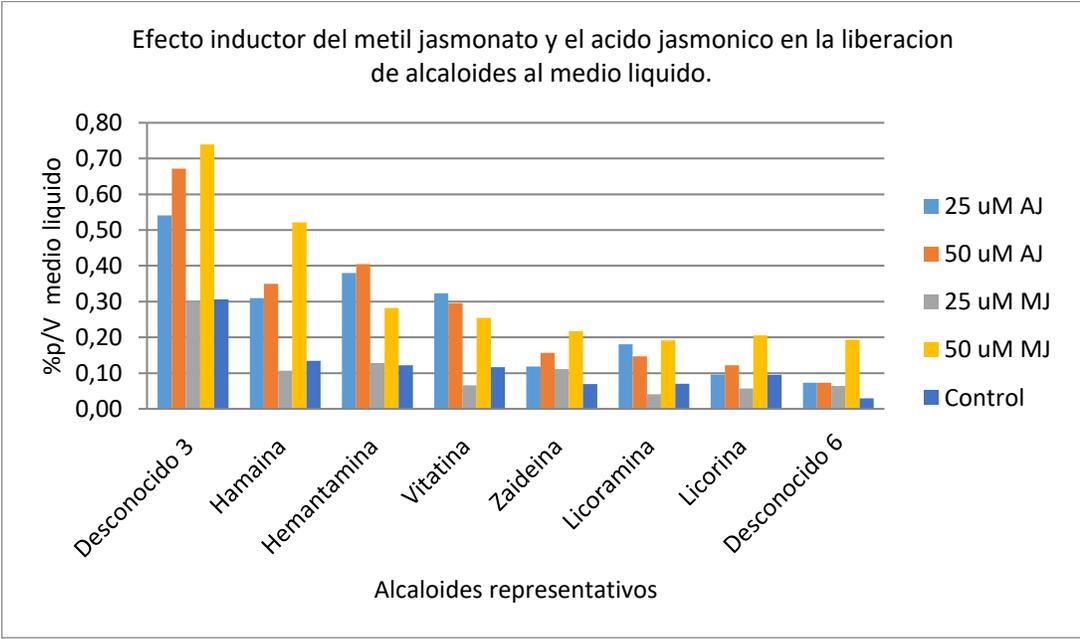


Figura 24. Efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la liberación de alcaloides producidos in vitro al medio líquido de cultivo.

2.6 DISCUSIÓN

Para la evaluación del efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico, primero se realizó la inducción de bulbillos a partir de bulbos de invernadero. El 67,8% de las escamas generaron al menos un bulbillio en el medio MSA1. Este resultado, es similar al reportado por el grupo de Investigación de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi y los obtenidos en el proyecto de grado de Daniel Chamorro, en los cuales se reportan porcentajes de respuesta del 71,0% y 70,7% respectivamente (Geraldine Restrepo, 2016, Universidad Icesi, Facultad de Ciencias Naturales, Comunicación personal) (Chamorro, 2016). Las escamas internas presentan menor longitud en su parte basal, lo cual tiene una relación con la cantidad de bulbillos desarrollados. La placa basal contiene células meristemáticas que permiten el desarrollo de bulbillos (Chow, Selby, Fraser, & Harvey, 1993). Al tener menos área superficial de la placa basal en contacto con el medio de cultivo, esto podría disminuir las posibilidades de formación de bulbillos. Se ha reportado también que el número de bulbillos generados *in vitro* decrece desde las escamas externas hacia las escamas internas. El porcentaje de respuesta en la inducción de bulbillos de otros géneros de la familia *Amaryllidaceae* como *Hippeastrum* es de 87% (Vargas, Oropeza, & de Garcia, 2006.) Y en otro estudio realizado en la especie *Narcissus confusus* en donde se cultivó callo embriogénico con benciladenina para inducir bulbillos se reportó un 85% de respuesta (Sellés, Viladomat, Bastida, & Codina, 1999). Estas diferencias en el porcentaje de respuesta podrían deberse a la variabilidad de la respuesta entre géneros, la composición del medio de cultivo y el tiempo de inducción (Hussey, 1975). Con base a estos resultados e información reportada en otros estudios, se concluye que valdría la pena evaluar en *Zephyranthes carinata* si existen diferencias en respuesta en la formación de bulbillos de acuerdo a la posición de la escama.

Los bulbillos que se utilizaron para cada experimento tenían 2 meses de cultivo, en el cual, el primer mes consistió en la inducción de los bulbillos y el segundo mes el crecimiento de estos. Se seleccionó esta edad debido a que en estudios realizados por Ivanov y colaboradores (2013) y por Colque y colaboradores (2004) se reportó que el estado de crecimiento óptimo para obtener mejores resultados en la inducción del metil jasmonato y el ácido jasmónico, es la fase exponencial, que correspondía al mes posterior al desarrollo de los bulbillos.

En relación al crecimiento de los bulbillos respecto al control después de 10 días de tratamiento, se observó que el material vegetal tratado con ácido jasmónico fue el que generó la mayor producción de material vegetal medido en términos de miligramos de material orgánico seco. Además, se observó que durante el tiempo de tratamiento, los bulbillos que fueron evaluados con ácido jasmónico presentaron un mayor desarrollo de los bulbillos y las hojas respecto al control y, los tejidos presentaron una coloración verde rojiza. El aumento en la biomasa fue casi 1.14 y 1.03 veces en los tratamientos con ácido jasmónico, 25 uM y 50 uM

respectivamente, en comparación con el control. En contraste, se pudo observar que los bulbillos que fueron tratados con metil jasmonato presentaron una reducción (0,8 y 0,6 veces menos) del peso seco, en miligramos de material orgánico seco, respecto al control, del 15% y 33%, para las concentraciones de 25 uM y 50 uM respectivamente. Adicionalmente, en los tratamientos con metil jasmonato se observó un leve porcentaje de deshidratación (menor porcentaje de peso fresco 81% al 86%) en el tejido vegetal y descoloración (ausencia de clorofila) respecto al control (88% de peso fresco). Una posible explicación de estos resultados, es que en los tratamientos con metil jasmonato los tejidos fueron posiblemente afectados por la mayor concentración de etanol en los medios de cultivos líquidos. Para los tratamientos, las soluciones stocks de los inductores fueron disueltos en etanol absoluto acorde a la metodología encontrada en la literatura (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013), para luego tomar alícuotas que fueron adicionadas al medio de cultivo. En el caso del metil jasmonato, la concentración final de etanol en el medio de cultivo fue de 2,7% y 5,4% para los tratamientos con 25 uM y 50 uM de metil jasmonato respectivamente. Mientras que para el caso de los tratamientos con 25 uM y 50 uM de ácido jasmónico, la concentración final de etanol fue de 0,51% y 1,02% %. Es por esto que se puede inferir que quizás, el etanol pudo haber causado un efecto de deshidratación mayor del material vegetal tratado con metil jasmonato, justificando así la reducción del tamaño de los bulbillos comparados con el tratamiento control y produciendo la descoloración del material vegetal en la concentración más alta de metil jasmonato evaluada. Se ha reportado que altas concentraciones de etanol pueden disminuir el crecimiento del material vegetal, afectar la membrana lipídica de las células y la actividad metabólica de la planta (Hallsworth, 1998). Sin embargo, es importante aclarar que en los estudios encontrados no se reportan estos tipos de cambios. Al contrario, en esos estudios realizados con otros géneros de la familia *Amaryllidaceae*, como es el caso de *Leucojum aestivum*, se encontró que un aumento en la biomasa de 1,32 veces para los bulbillos en tratamiento con metil jasmonato y 1,26 veces para el material vegetal tratado con ácido jasmónico, comparados con el control (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013) (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004). Los resultados reportados en esos estudios sugieren que los resultados varían dependiendo del tipo de componente químico y la concentración del mismo. Se ha reportado que altas concentraciones de inductores químicos como ácido jasmónico y metil jasmonato afectan negativamente el crecimiento de los bulbillos (Schumann, y otros, 2013) (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013) (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en este proyecto de grado, donde se observó que con la mayor concentración evaluada del inductor metil jasmonato se obtuvo menor porcentaje de peso seco. Por el contrario, con el inductor ácido jasmónico, se obtuvo menor porcentaje de peso seco con la menor concentración evaluada.

En cuanto a la producción total de alcaloides, los resultados indican que en general se obtiene una mayor concentración de alcaloides en el medio líquido en relación a su respectivo material vegetal. La mayor concentración de alcaloides se encontró

en el medio líquido con 50 uM de metil jasmonato, y la mayor concentración en tejido vegetal con 25 uM de metil jasmonato. Sin embargo, hay que destacar que también fue en este tratamiento que se obtuvo el mayor error estándar. Este resultado coincide con el obtenido por Colque y colaboradores (2004), quienes reportan mayores concentraciones de alcaloides totales en el tejido vegetal de la especie *Narcissus confusus* con el tratamiento de 25 uM de metil jasmonato respecto al control. Sin embargo, estos autores también reportan una mayor liberación al medio líquido de galantamina y otros alcaloides relacionados a una concentración de 25 uM de metil jasmonato, mientras que en este proyecto de grado se encontró la mayor liberación de alcaloides con 50 uM de metil jasmonato. Es posible que al tratarse de diferentes especies, la respuesta sea diferente. De otro lado, hay que destacar que en este proyecto la galantina fue detectada solamente en el material vegetal control sin tratamiento y en concentraciones muy pequeñas, sin embargo, no se reportan estudios en los cuales se haya cuantificado galantina para poder comparar y establecer si se encuentra dentro de los rangos promedio de producción o si la especie y las condiciones de tratamiento influyen los resultados. Adicionalmente, el tratamiento de 50 uM de metil jasmonato es el que presentó un mayor porcentaje de etanol en el medio líquido. Este alcohol puede afectar la composición de la membrana lipídica donde se encuentran los transportadores dependientes de ATP (Elvir, 1993). Estos transportadores pudieron verse afectados por la alta concentración de etanol, permitiendo una mayor liberación de los alcaloides al medio líquido de cultivo. Es importante mencionar, que respecto a los demás tratamientos, el control y el medio líquido con concentración 25 uM de metil jasmonato, no presentaron diferencias significativas en la concentración total de alcaloides obtenida. En el caso de los tratamientos con ácido jasmónico, se encontró que a mayor concentración de inductor se obtenía mayor concentración de alcaloides totales en el medio líquido de cultivo. Estos resultados coinciden con los encontrados en la especie *Leucojum aestivum*, en la cual se encontró que con la adición de ácido jasmónico se producía mayor cantidad del alcaloide galantamina y licorina, mientras que con la adición de metil jasmonato se encontró un aumento en la concentración de norgalantamina, precursor directo de la galantamina *Amaryllidaceae* (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013). Esto puede deberse a un mayor estrés producido por los inductores lo cual, induce la expresión de las enzimas encargadas de catalizar los primeros pasos de la ruta biosintética de los alcaloides de *Amaryllidaceae* (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013) (Sharan, y otros, 1998).

La identificación de las posibles moléculas con estructura alcaloidal presente en los diferentes tratamientos se realizó teniendo en cuenta los espectros de masas y tiempos de retención arrojados en los cromatogramas por UPLC/ masas, y realizando comparaciones con la información equivalente reportada por Katoch y colaboradores (2012), y Marcela Rivera (2015) egresada del programa de Química Farmacéutica, Universidad Icesi, en la especie *Zephyranthes grandiflora*. Además, los alcaloides nombrados como Desconocido 1, 2, 3, 4, 5, 6, Licorina, Licoramina, Hamaina, Hemantamina, Vitatina y Zaideina también se presentaron e identificaron

en el proyecto de grado de la estudiante María Camila Tofiño, el cual se titula “Optimización de la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata* por medio de organogénesis o embriogénesis somática *in vitro*” y fue realizado paralelamente al presente proyecto. Estos resultados podrían indicar que independiente de la condición de estrés en la cual se encuentren los bulbillos, se producirán este tipo de moléculas alcaloidales. En total se identificaron 19 moléculas con posible estructura alcaloidal, de las cuales, 8 se presentaron en todas las muestras analizadas y 12 no pudieron ser identificados al no presentar un perfil alcaloidal similar a los reportados. Comparando estos resultados con los de Katoch y colaboradores (2012), se encontró que había 7 moléculas con estructura alcaloidal que presentaban similitudes con los alcaloides reportados por estos investigadores y los encontradas en este proyecto (Licorina, Licoramina, Hemantamina, Hamaina, Zaideina, Galantina y Vitatina). En el caso de los resultados reportados por Marcela Rivera (2015), se encontró que había similitud con 4 moléculas alcaloidales (Galantina, Licoramina, Hemantamina y Vitatina). Es importante resaltar que los estudios anteriormente mencionados se realizaron en la especie *Zephyranthes grandiflora*, lo cual indica que es posible que estos alcaloides se presenten en ambas especies, pertenecientes al mismo género. En general, se detectaron un total de 13 alcaloides en el material vegetal control, es decir, que hay 6 alcaloides que fueron detectados específicamente en los tratamientos con los inductores. Estos alcaloides son la Licoramina, los Desconocidos 2, 6, 13, 14, y 15. Adicionalmente, la galantina fue solo detectada en el material vegetal y el desconocido 2 solo fue detectado en el medio líquido del tratamiento con 50 uM de ácido jasmónico.

La concentración de Licorina, alcaloide que ha sido estudiado por sus actividades farmacológicas en la enfermedad del cáncer, fue identificado en casi todas las muestras, exceptuando el tratamiento con 50 uM de ácido jasmónico. Este alcaloide presento mayor concentración en el medio líquido en el tratamiento con 50 uM de metil jasmonato y mayor concentración de alcaloides en el material vegetal en el tratamiento de 25 uM metil jasmonato. Sin embargo, en el estudio realizado por Ivanov y colaboradores (2013) se encontró que utilizando ácido jasmónico se obtienen mejores resultados tanto para la producción como en la liberación de alcaloides. Este resultado reportado por Ivanov y colaboradores y que no concuerda con lo obtenido en este proyecto se puede justificar por la diferencia de la especie evaluada (*Leucojum aestivum*). Esta especie aunque pertenece a la familia *Amaryllidaceae* no es del mismo género que la estudiada en este proyecto, por lo tanto, se pueden ver afectadas las rutas biosintéticas en cada especie y la respuesta a los diferentes inductores.

En general, se encontró que la diversidad de alcaloides era mayor en el tejido vegetal independientemente del tratamiento (entre 11 y 13 tipos de alcaloides) en relación a sus respectivas muestras de medio líquido. Este resultado podría indicar que la expresión de enzimas por acción de los elicitores puede ser mayor a la expresión de los diferentes transportadores de la membrana lipídica, posibles encargados de la liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo (Colque,

Viladomat, Bastida, & Codina, 2004) (Cai, Kastell, & Knorr, 2012). Es importante destacar que hay 8 alcaloides que se detectaron en todas las muestras y en todos los tratamientos, incluyendo a los controles, el material vegetal y medio líquido, estos son los alcaloides Desconocido 3, Desconocido 6, Licorina, Licoramina, Hemantamina, Hamaina, Zaideina y Vitatina. Estos 8 alcaloides fueron seleccionados y denominados en este trabajo como representativos para realizar análisis cuantitativos más específicos.

Con base a los análisis en el material vegetal y en el medio líquido para cada uno de estos alcaloides, el orden decreciente de las concentraciones de los alcaloides representativos es Desconocido 3 > Hamaina > Hemantamina = Vitatina > Zaideina > Licorina = Licoramina = Desconocido 6. En general, la concentración en el medio líquido para estos alcaloides fue en promedio 20 veces mayor que para el material vegetal (de 17X a 25X dependiendo del alcaloide). Adicionalmente, se obtuvo mayor concentración de alcaloides, de 2X a 6X más, en los tratamientos con los inductores químicos respecto al control. Esto indica que el metil jasmonato y el ácido jasmónico si presentan un efecto inductor en la liberación de dichos alcaloides al medio líquido de cultivo, ya que se observó una mayor concentración de cada alcaloide en los tratamientos que tenían alguno de los dos inductores químicos evaluados. Sin embargo, también se pudo observar que el tratamiento control liberó alcaloides al medio líquido de cultivo. Esto puede sugerir que el estrés generado por el cultivo *in vitro*, el movimiento del shaker y demás condiciones de evaluación pueden inducir la expresión de enzimas y proteínas relacionadas tanto como la producción como con la liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo (Cai, Kastell, & Knorr, 2012). Se ha reportado que estos dos inductores tienen una acción en la transducción de señales intracelulares que incrementan la transcripción y traducción de las enzimas PAL (phenylalanine ammonia-lyase); y TD (tyrosine decarboxylase) las cuales catalizan los primeros pasos de la ruta metabólica de los alcaloides de *Amaryllidaceae* (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013) (Sharan, y otros, 1998). Sin embargo, la acción transductora se genera dependiendo de varios factores, por ejemplo el tipo de inductor, la concentración de inductor, el tiempo de tratamiento y el estadio de crecimiento del material vegetal. Por lo tanto, se pudo presentar variaciones en la producción de los diferentes y posibles alcaloides identificados debido a la transducción de una de las enzimas en mayor o menor proporción, que pudo afectar directamente la ruta biosintética de los alcaloides. (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013) (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004) (Sharan, y otros, 1998).

Se encontró que el alcaloide clasificado como Desconocido 3, presentó las mayores concentraciones en el medio líquido indistintamente del tratamiento evaluado, y la mayor concentración registrada para todos los tratamientos ($739,2 \times 10^{-3} \% p/v$). Por otro lado, se encontró que de los 8 alcaloides clasificados como representativos, algunos han sido reportados por su acción farmacológica. Estos alcaloides con actividad farmacológica son: Licorina, Licoramina, Hamaina y Hemantamina (Irwin & Smith III, 1960) (Katoch & Singh, 2015) (Adesanya, Olugbade, Odebiy, &

Aladesanmi, 1992) (Liu, Hu, Fang He, Ye, & Li, 2004). Estos alcaloides, a excepción de la Hemantamina, se presentaron en mayor concentración (%p/V), en los tratamientos con 50 uM de metil jasmonato. El alcaloide Hemantamina se liberó en mayor proporción en el tratamiento de concentración 50 uM de ácido jasmónico. Esto indica que la liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo obtuvo mejores resultados con los inductores en su mayor concentración evaluada. En contraste, Ivanov y colaboradores (2013) reportan que la mejor concentración para la liberación de alcaloides, utilizando como inductores químicos al metil jasmonato y el ácido jasmónico, es 25 uM. Además, reportan que la mayor concentración de licorina se obtiene con el inductor ácido jasmónico a 25 uM, lo cual difiere de los resultados de este proyecto. Es importante mencionar que no se reportan otros estudios en los cuales se relacione la liberación de alcaloides diferentes a Licorina y Galantamina, por lo cual no se tiene una referencia de resultados con las que comparar.

Teniendo en cuenta lo mencionado durante toda la discusión, los resultados muestran que si se presenta un efecto inductor por parte de los dos elicitores evaluados, tanto en el material vegetal como en el medio líquido comparados con el control, el cual presentó a su vez producción y liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo *in vitro* sin necesidad de inductores. Además, se presentó mayor concentración total de alcaloides en el medio líquido comparado con el material vegetal evaluado, lo cual podría indicar que el estrés al que están sometidos los bulbillos permite la activación de los transportadores de membrana dependientes de ATP que a su vez liberan estos metabolitos secundarios al medio líquido de cultivo. Se encontró que la mayor concentración total de alcaloides en el medio líquido se produjo en el tratamiento con 50 uM de metil jasmonato, y la mayor concentración total de alcaloides en el material vegetal con el tratamiento con 25 uM de metil jasmonato. También se observó que el inductor ácido jasmónico indujo un mayor crecimiento de los bulbillos y las hojas respecto al control, en estos tratamientos se produjo una mayor producción de materia seca. Adicionalmente, se observó que la concentración total de alcaloides tanto en el tejido vegetal como su liberación al medio líquido fue mayor respecto al control, en la medida que se incrementó la concentración de ácido jasmónico.

En relación a la diversidad de alcaloides, fue posible identificar 19 moléculas con posible estructura alcaloidal, de las cuales 7 mostraron similitud con estudios de identificación previa en la especie *Zephyranthes grandiflora*. Por otro lado, se presentó, en general, mayor diversidad de alcaloides en el material vegetal comparado con el medio líquido. Es importante mencionar que algunos resultados requieren mayor estudio con el fin de obtener información acerca de la producción y liberación de los alcaloides al medio líquido de cultivo. Por ejemplo, la galantina fue detectada solamente en los tejidos del material vegetal control. Aunque hay que destacar que a muy bajas concentraciones ($1,21 \times 10^{-3}\%$). Este resultado sugiere que los inductores podrían también tener efecto en el tipo de alcaloides que se

producen y liberan al medio líquido. Respecto a los alcaloides que no fueron posible identificar, se recomienda utilizar técnicas como RMN-H y RMN-C con el fin de elucidar la estructura de las moléculas y poder comparar con otros estudios. En particular, valdría la pena identificar al alcaloide Desconocido 3, dado que este fue el que se produjo en mayor concentración en todos los tratamientos, incluyendo el control.

2.7 CONCLUSIONES

Cultivo *in vitro*

1. Se obtuvo un 67,8% de respuesta para la inducción de bulbillos a partir de escamas de bulbos provenientes del invernadero. Las escamas internas del bulbo no presentaron respuesta en comparación con las escamas intermedias del bulbo.

Evaluación del efecto del metil jasmonato y el ácido jasmonico.

2. La técnica UPLC/MS permitió identificar 19 posibles alcaloides presentes en la especie *Zephyranthes carinata*, 7 de ellos presentes en *Zephyranthes grandiflora*. Estos alcaloides que se presentan en ambas especies son: Licoramina, Licorina, Hamaina, Hemantamina, Vitatina, Zaideina y Galantina. Lo anterior indica que es posible que estas dos especies compartan algunas rutas biosintéticas para la producción y liberación de alcaloides característicos de esta familia de plantas.
3. No fue posible identificar la estructura de algunas moléculas con estructura alcaloidal. Estas moléculas fueron denominadas "Desconocido".
4. De los 19 alcaloides, se detectaron un total de 13 alcaloides en el control del material vegetal. La galantamina fue solo detectada en el material vegetal. Es decir, que hay 6 alcaloides que fueron detectados en los tratamientos y no en el material vegetal. Estos son la Licoramina, los Desconocidos 2, 6, 13, 14, y 15.
5. Se presentaron 8 alcaloides representativos, es decir, que fueron identificados en todas las muestras evaluadas. Estos alcaloides, en orden decreciente de concentración, son Desconocido 3, Hamaina, Hemantamina, Vitatina, Zaideina, Licorina, Licoramina y Desconocido 6.
6. De los 8 alcaloides representativos, 5 de ellos han sido reportados por sus actividades farmacológicas. En orden decreciente de concentración son: Hamaina, Hemantamina, Vitatina, Licorina y Licoramina.
7. En general, se detectaron un mayor número de alcaloides en las muestras de tejido vegetal independientemente del tratamiento (entre 11 y 13 tipos de alcaloides) en relación a sus respectivas muestras de medio líquido (entre 7 y 13 tipos de alcaloides).
8. Los tratamientos con ácido jasmónico produjeron la mayor diversidad (mayor número) de alcaloides en material vegetal. Sin embargo, la mayor

concentración de alcaloides totales se obtuvo en el medio líquido con metil jasmonato.

9. El alcaloide llamado Desconocido 3 fue el de mayor concentración en todos los tratamientos evaluados.
10. En general, el metil jasmonato fue el elicitador que indujo una mayor producción de alcaloides en el material vegetal como en su liberación al medio líquido, teniendo como concentración óptima 25 μM para el primer caso y 50 μM para su liberación al medio líquido.
11. Es necesario realizar más estudios en los cuales se pueda determinar si efectivamente el efecto inductor del metil jasmonato en la liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo está dado por este elicitador, o si hubo alguna influencia por la mayor concentración de etanol en el medio de cultivo, respecto a los tratamientos con ácido jasmónico.
12. El ácido jasmónico indujo una mayor producción de alcaloides y liberación al medio de cultivo en la medida que se incrementó la concentración de 25 μM a 50 μM , y respecto al control. Adicionalmente, se observó una mayor producción de biomasa con estos tratamientos respecto al control.
13. En los tratamientos control, en los cuales no se adicionó ningún inductor químico, se obtuvo liberación de alcaloides en el medio líquido de cultivo, pero a una menor concentración comparada con los demás tratamientos en los cuales sí se utilizó elicitadores.
14. Se obtuvo en todos los tratamientos evaluados, mayor concentración de alcaloides totales en el medio líquido de cultivo comparado con el material vegetal analizado. Lo anterior indica que sí existe un efecto inductor por parte de los elicitadores metil jasmonato y ácido jasmónico.
15. Se pudo demostrar el efecto inductor del metil jasmonato y ácido jasmónico en la liberación de alcaloides producidos *in vitro* por la especie *Zephyranthes carinata*, utilizando como método analítico la cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) y la espectrometría de masas.

2.8 RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuros trabajos mejorar el diseño experimental para evitar la variabilidad de los datos en cada repetición y por tratamiento. En este proyecto se evaluaron los experimentos por pools o agrupaciones de muestra, lo cual no proporciona un resultado exacto de lo evidenciado en cada material analizado. Por lo tanto, se recomienda evaluar cada Erlenmeyer como una muestra aislada y no realizar pools que aumentan la variabilidad de los resultados. Para realizar esto, se deben agregar más bulbillos en cada Erlenmeyer con el fin de tener la cantidad, en miligramos de peso seco, necesaria para ser detectada por el equipo cromatográfico. Teniendo en cuenta los resultados de este proyecto, se deben agregar mínimo 10 bulbillos por Erlenmeyer para obtener 150 mg de peso seco.

Además, no se tuvo en cuenta la influencia que puede tener la adición de solventes como el etanol en los medios líquidos de cultivo. Por lo tanto, se recomienda disolver los inductores químicos en pequeñas volúmenes de etanol y completar a volumen con agua destilada, esto evitara la deshidratación de los bulbillos y posibles alteraciones de los resultados obtenidos. Si hay problemas de precipitación del inductor con esta práctica, otra alternativa, es hacer diluciones seriadas para que el stock sea menos concentrado.

También se recomienda que todas las muestras que son analizadas en el UPLC/MS se realicen el mismo día, con el fin de evitar variabilidad en las condiciones del experimento. Por ejemplo, que las concentraciones del estándar, en este caso boldina, presenten ligeras diferencias representadas en un desplazamiento del tiempo de retención.

Por otro lado, se recomienda utilizar técnicas complementarias o acopladas al UPLC que tengan alta resolución y sensibilidad. Por ejemplo, en este proyecto se utilizó la técnica acoplada de espectrometría de masas, sin embargo, este equipo no presentaba alta resolución y sensibilidad, lo cual dificultaba la identificación de las moléculas que fueron analizadas. Es posible utilizar otras técnicas como RMN-H y RMN-C con el fin de elucidar la estructura de las moléculas y poder comparar con otros estudios. Sin embargo, estas técnicas presentan un mayor costo.

Adicionalmente, se recomienda evaluar diferentes tiempos de tratamientos, estadios de crecimiento y concentraciones para determinar el punto óptimo de producción y liberación de alcaloides de la familia *Amaryllidaceae* en el material vegetal y en el medio líquido de cultivo. De ser posible, tener en cuenta aquellos tratamientos que generaron mayor producción y liberación de posibles alcaloides con actividad farmacológica. Por ejemplo, ciertos autores recomiendan evaluar el efecto inductor del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la fase exponencial de crecimiento por máximo 24 días de tratamiento (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013) (Colque, Viladomat, Bastida, & Codina, 2004). Lo anterior puede proporcionar

información sobre el efecto de los inductores y el tiempo en la producción y liberación de alcaloides al medio líquido de cultivo.

Finalmente, se recomienda evaluar otro tipo de inductores químicos como Ácido Araquidónico, Ácido salicílico y Quitosan para obtener información acerca de la influencia de estos en la producción y liberación de alcaloides en el medio líquido de cultivo para la especie *Zephyranthes carinata*. Estos elicitores fueron evaluados previamente por Colque y colaboradores (2004), sin embargo, este estudio se realizó en *Narcissus confusus*, especie perteneciente a la familia *Amaryllidaceae*.

BIBLIOGRAFIA

- AccuWeather. (26 de Noviembre de 2016). *AccuWeather*. Obtenido de AccuWeather: <http://www.accuweather.com/es/co/cali/111732/june-weather/111732>
- Adesanya, S., Olugbade, T., Odebiy, O., & Aladesanmi, J. (1992). Antibacterial Alkaloids in *Crinum jagus*. *Int. J. Pharmacog*, 303-307.
- Al-Te, T. H., Abu Zarga, M. H., Sabri, S. S., & Freyer, A. J. (1990). New Natural Colchicinoids: Indications of two possible catabolic routes for the colchicine alkaloids . *Journal of Natural Products*, 623-629.
- Arango, G. J. (2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados. *Universidad de Antioquia*, 2-10.
- Barnhoorn, F. (2005). Propagation Techniques. *Herbetia*, 115-122.
- Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Belen , N., De Andrade, J., Martinez, V., . . . Viladomat, F. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 65-100.
- Bianchi, E., Guarna, M., & Tagliamonte, A. (1994). Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine. *Advances in Neuroimmunology* , 83-92.
- Bogdanova, Y., Pandova, B., Yanev, S., & Stanilova, M. (2009). BIOSYNTHESIS OF LYCORINE BY IN VITRO CULTURES OF PANCRATIUM MARITIMUM L. (AMARYLLIDACEAE). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 919-922.
- Braithwaite, A., & Smith, F. J. (1999). *Chromatographic Methods*. Londres: Kluwer Academic Publishers .
- Cabezas, F., Argoti, J., Martinez, S., Codina, C., Bastida, J., & Viladomat, F. (2007). Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de amaryllidaceae. *Scientia Et Technica 2007 XIII*, 237-241. Obtenido de Sistema de Información CientíficaRed de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal.
- Cai, Z., Kastell, A., & Knorr, D. (2012). Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspensionand hairy root cultures. *Plant Cell Rep*, 461–477.

- Chaichana, N., & Dheeranupattana, S. (2012). Chaichana, N., & Dheeranupattana, S. (2012). Effects of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on Alkaloid Production from in vitro Culture of *Stemona* sp. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 146–150.
- Chamorro, D. (2016). *Optimización de las condiciones in vitro para la producción de alcaloides a partir de plántulas de Zephyranthes carinata (Amaryllidaceae)*. Cali: Universidad Icesi, Facultad de Ciencias Naturales, Tesis de Química farmacéutica.
- Cheong, J., & Choi, Y. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*, 409-413.
- Chida, N. (2011). Recent Advances in the Synthesis of Morphine. *Top Curr Chem*, 1–28.
- Chow, Y. N., Selby, C., Fraser, T. W., & Harvey, M. R. (1993). Basal plate tissue in Narcissus Bulbs and in shoot Clump Cultures: Its structure and Role in Organogenic Potencial of single leaf cultures. *Annals of Botany*, 437-443.
- 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*, 1180-1188.
- de Andrade, J. P. (2014). broussonetii y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Universitat de Barcelona, Departament de productes naturals, biologia vegetal i edafologia.*, 3-8.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 303–336.
- El Tahchy, A., Bordage, S., Ptak, A., Dupire, F., Barre, E., Guillou, C., . . . Chapleur, Y. (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.
- Elvir, J. R. (1993). Efecto del Etanol sobre las Membranas Biológicas. *REVISTA MEDICA HONDUREÑA*, 20 - 24.
- Escobar, A. (2014). *Caracterización química de alcaloides del género Zephyranthes spp.* Cali: Universidad Icesi, Facultad de Ciencias Naturales.
- Fernandez, J. L., & Groenendijk, J. (2004). A new species of *Zephyranthes* herb S.L (Amaryllidaceae, Hippeastreae), with notes on the genus in Colombia. *Rev. Acad.Colomb.Cienc*, 177-186.

- Fernández-Alonso, J. L., & Groenendij, J. P. (2004). A new specie of *Zephyranthes* Herb. sl (Amaryllidaceae, Hippeastreae) with notes on the genus in Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 177-186.
- Fuster, S. B. (1994). Aislamiento y caracterizacion quimica de alcaloides tipo Amaryllidaceae, produccion de galantamina por cultivos in vitro de *Narcissus confusus*. *Universitat de Barcelona, Facultad de Farmacia*, 14- 19.
- Gotti, R. (2006). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17–24.
- Gross, J. H. (2011). *Mass Spectrometry*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Haller, C., Jacob III, P., & Benowitz, N. (2002). Pharmacology of ephedra alkaloids and caffeine after single-dose dietary supplement use. *CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*, 421–432.
- Hallsworth, J. E. (1998). Ethanol-Induced Water Stress in Yeast. *Journal of fermentation and bioengineering*, 125-137.
- Huang, C. W., Okubo, H., & Uemoto, S. (1990). Comparison of Bulblet Formation from Twin Scales and Single Scales in *Hippeastrum hybridum* Cultured In Vitro. *Scientia Horticulturae*, 151-160.
- Hussey, G. (1975). Totipotency in Tissue Explants and Callus of SomeMembers of the Liliaceae, Iridaceae, and Amaryllidaceae. *Journal of Experimental Botany*, 253-262.
- Irwin, R. L., & Smith III, H. J. (1960). Cholinesterase inhibition by Galanthamine and Lycoramine. *Biochemical Pharmacolog*, 147-148.
- Ivanov, I., Georgieva, V., & Pavlov, A. (2013). Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. *Journal of Plant Physiology*, 1122– 1129.
- Jin, Z. (2007). Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*, 111–126.
- Katoch, D., & Singh, B. (2015). Phytochemistry and Pharmacology of Genus *Zephyranthes*. *Medicinal & Aromatic Plants*, 23-26.
- Katoch, D., Kumar, S., Kumar, N., & Singh, B. (2012). Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 187–192.

- Krayer, O., & Acheson, G. (1946). The pharmacology of the veratrum alkaloids. *The Department of Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts* , 383-446.
- Lam, C., Ho, C., Cheung, R., Law, L., & Suen, M. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews*, 3-12.
- Lamoral-Theys, D., Andolfi, A., Van Goietsenoven,, G., Cimmino, A., Le Calvé, B., Wauthoz, N., . . . Evidente, A. (2009). Lycorine, the Main Phenanthridine Amaryllidaceae Alkaloid, Exhibits Significant Antitumor Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 6244–6256.
- Liu, J., Hu, W.-X., Fang He, L., Ye, M., & Li, Y. (2004). Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *Federation of European Biochemical Societies*, 245–250.
- Loberant, B., & Altman, A. (2010). Micropropagation of Plants. En B. Loberant, & A. Altman, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* (pág. 442). Rehovot, Israel: The Hebrew University of Jerusalem, Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture.
- M.C. Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). LA CROMATOGRAFÍA DE GASES Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CAUSANTES DE MAL OLOR. *BOLETÍN INTEXTER*, 35 -41.
- Marcano , D., & Hasegawa, M. (2002). Alcaloides. En D. Marcano, & M. Hasegawa, *Fitoquímica organica* (págs. 382-385). Caracas: Editorial Torino.
- Marinangeli, P., Hernandez, L. F., Pellegrini, C., & Curvetto , N. (2003). Bulblet Differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum* . *Journal of the American Society for Horticultural Science* , 324 - 329.
- Minitab. (12 de Diciembre de 2016). *Minitab* . Obtenido de Minitab : <http://support.minitab.com/es-mx/minitab/17/topic-library/basic-statistics-and-graphs/hypothesis-tests/tests-of-means/what-is-the-standard-error-of-the-mean/>
- Montoya, G. (2 de Septiembre de 2016). Extraccion de alcaloides de Amaryllidaceae . (F. d. Universidad Icesi, Entrevistador)
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 473-497.

- Nordstrom, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K., & Sandberg, G. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *The National Academy of Sciences of the USA*, 8039–8044.
- Novakova, L., Matysova, L., & Solich, P. (2005). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 908–918.
- Olafsdóttir, E. S., Halldorsdottir, E. S., Pich, N. M., & Omarsdottir, S. (2013). Lycopodium Alkaloids: Pharmacology. En E. S. Olafsdóttir, E. S. Halldorsdottir, N. M. Pich, & S. Omarsdottir, *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pág. 604). Reykjavik: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Peralta, L. (2014). CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES DE PLANTAS DEL GÉNERO ZEPHYRANTHES Y EVALUACIÓN DE SU PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES. *Universidad Icesi, Facultad de Ciencias Naturales, Programa de Química Farmaceutica.* , 1-60.
- Plummer, A. J., Earl, A., Schneider, J. A., Trapold, J., & Barrett, W. (1954). PHARMACOLOGY OF RAUWOLFIA ALKALOIDS, INCLUDING RESERPINE. *Research Department, Ciba Pharmaceuticd Products, Inc., Summit, N. J.* , 1-21.
- Restrepo, G. (10 de Junio de 2016). OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES PARA EL CULTIVO IN VITRO DE *Zephyrantes carinata*. (L. B. Vegetal, Entrevistador) Universidad Icesi.
- Rice, L. J., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2011). In vitro bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. *South African Journal of Botany*, 305–312.
- Rivera, M. (2015). *CREACIÓN DE UNA BIBLIOTECA ESPECTRAL DE ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE*. Cali : Universidad Icesi, Facultad de Ciencias Naturales.
- Roberts, M. F., & Wink, M. (2013). Introduction . En M. F. Roberts, & M. Wink, *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications* (pág. 485). London, England: SpringerScience+Bussines Media New York.
- Schumann, A., Torras, L., Berkov, S., Claus, D., Gerth, A., Bastida, J., & Codina, C. (2013). Elicitation of Galanthamine Production by *Leucojum aestivum* Shoots Grown in Temporary Immersion System. *Biotechnol. Prog*, 311-318.

- Sellés, M., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (1999). Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Reports*, 646–651.
- Shamma, M. (2012). *The Isoquinoline Alkaloids Chemistry and Pharmacology*. New York: Academic Press Verlag Chemie .
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N., & Okazaki, M. (1998). Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science*, 13–19.
- Sharapin, N. (2000). Extracción de los alcaloides . En N. Sharapin, *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (págs. 72 - 82). Bogota: Area de ciencia y tecnología convenio Andres Bello .
- SiB. (2016). *Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia* . Recuperado el 2016, de Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia : <http://www.sibcolombia.net/biodiversidad-en-cifras/>
- Sierra, I., Gomez, S., Perez, D., & Morante, Z. (2010). Fundamentos de Cromatografía, Aplicaciones de la cromatografía en columna . En I. Sierra, S. Gomez, D. Perez, & Z. Morante, *Análisis Instrumental* (págs. 137 - 145). La Coruña, España: Netbiblo.
- Singh B, K. D. (2015). Phytochemistry and Pharmacology of Genus *Zephyranthes*. *Medicinal & Aromatic Plants*, 161-164.
- Swartz, M. E. (2005). UPLC: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1253–1263.
- Tian, Y., Zhang, C., & Guo, M. (2015). Comparative Analysis of Amaryllidaceae Alkaloids from Three *Lycoris* Species. *Molecules*, 21854–21869.
- Unilever. (23 de 12 de 2016). *THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, CHROMATOGRAPHY* . Washington : THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, CHROMATOGRAPHY . Obtenido de THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY: <http://media.rsc.org/Modern%20chemical%20techniques/MCT5%20Chromatography.pdf>
- Unver, N. (2007). New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae. *Phytochem Rev*, 125–135.

- Van Goietsenoven, G., Andolfi, A., Lallemand, B., Cimmino, A., Lamoral-Theys, D., Gras, T., . . . Kiss, R. (2010). Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products*, 1223-1227.
- Vargas, T. E., Oropeza, M., & de Garcia, E. (2006.). MICROPROPAGATION OF *Hippeastrum* sp. *Agronomía Tropical*, 621-626.
- Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 200–201.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). Alkaloid Drugs. En H. Wagner, & S. Bladt, *Plant Drugs Analysis* (págs. 1-50). Berlin : Springer .
- Waters. (11 de Noviembre de 2016). *Waters*. Obtenido de Waters: http://www.waters.com/waters/es_CO/Original-UPLC-UHPLC-system-with-sub-2-micron-particle-technology-for-separations/nav.htm?locale=es_CO&cid=514207
- Waters. (23 de 12 de 2016). *Waters* . Obtenido de Waters: http://www.waters.com/waters/es_ES/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&lset=1&locale=es_ES&changedCountry=Y
- Wiley, J. (2013). Principles . En J. Wiley, *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (págs. 1-9). Bruselas: Wiley.
- Zhao, J., Lawrence, D., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 283–333.