



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Farmacia- Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

**Metabolitos secundarios de algunas especies de Amaryllidaceae
Chilenas promisorias para el posible tratamiento de la enfermedad de
Alzheimer**



Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

LINA MARCELA TRUJILLO CHACÓN
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

Profesor Guía: Edgar Rafael Pastene Navarrete
Laboratorio de Farmacognosia
Facultad de farmacia
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción en conjunto con el Grupo de Investigación de Química y Biotecnología de Productos Naturales Bioactivos del Departamento de Ciencias Básicas, Universidad del Bío-Bío, con el apoyo del Instituto Fundación Teófilo Hernando de la Universidad Autónoma de Madrid.

Profesor Guía

Dr. Edgar Rafael Pastene Navarrete
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía



Dr. Julio Enrique Alarcón Enos
Departamento de Ciencias Básicas
Universidad del Bío-Bío

Evaluador externo

MSc. Arnoldo Miranda Tassara
Facultad de Medicina y Ciencia
Universidad San Sebastián

Director del programa

MSc. Sigrid Mennickent Cid
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

*“Hay que disparar bien arriba para que en caso de fallar
podamos quedar entre las estrellas”*

Raúl Cuero.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los orientadores de esta tesis de magíster, Doctor Edgar Rafael Pastene Navarrete y Doctor Julio Enrique Alarcón Enos, por la dedicación y apoyo recibido durante el desarrollo de este trabajo y sobre todo por los buenos consejos y confianza depositada en mí. A ellos mi admiración.

Agradezco a la dirección de postgrado de la Universidad de Concepción por la beca otorgada durante el tiempo del magíster. Además de agradecer la financiación de la pasantía realizada durante el magíster y la asistencia a congresos.

Agradezco a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) por la financiación mediante los proyectos Fondecyt 1161157, Fondecyt 1150948 y Fondequip N° EQM 150025.

A la directora del programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas. Sigrid Mennickent Cid por la confianza depositada en mí y sobre todo por su valiosa amistad.

Al Doctor Carlos Marcelo Baeza del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, por su colaboración en el aspecto taxonómico y recolección del material vegetal de las especies estudiadas en este trabajo.

Al Doctor Luis Bustamante del Departamento de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, por la colaboración en los análisis por CG/EM.

A la Doctora Manuela García López y su equipo de trabajo del Instituto Fundación Teófilo Hernando de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, por permitirme realizar parte de esta investigación en su laboratorio y por todos los conocimientos compartidos durante mi estancia.

A mis amigas y compañeras Diana Correa, Maira Camacho, Scarlett Concha, Jeniffer Torres y Romina Carvajal, del laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, por todas las experiencias y conocimientos compartidos durante este tiempo. De corazón, gracias por ser un gran apoyo durante estos años.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Investigación en Química y Biotecnología de Productos Naturales Bioactivos del Departamento de Ciencias Básicas, Universidad del Bío-Bío. A Soledad Quiroz, Evelyn Muñoz, Igor Mayol, Fabiana Lima Silva y Fabiola Carvajal, por todas las experiencias compartidas y por los buenos momentos durante mi permanencia en el laboratorio.

Al decano de la Facultad de Farmacia Doctor Ricardo Godoy y profesores del programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, por los conocimientos compartidos durante mi formación.

A las secretarías Susana Alarcón y Fabiola Rioseco por la constante disponibilidad.

Al personal de la Facultad de Farmacia, especialmente a los señores Ivor Nova, Luis Martínez y a la señora Gabriela por la disponibilidad y colaboración en el laboratorio.

A Dios, por haber puesto en el camino personas que han sido mi soporte y compañía durante el periodo del magíster.

Finalmente quiero expresar un agradecimiento a mi familia por siempre apoyarme en la realización de mis sueños, especialmente a mi madre por el apoyo incondicional a pesar de la distancia, y por enseñarme a caminar por la vida.

A todos ellos, a los nuevos amigos, a los amigos de siempre, y a todas las personas que han sido partícipes de que hoy esté aquí. ¡Muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiv
OBJETIVOS	xvii
HIPÓTESIS	xx
CAPÍTULO 1. ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE	1
RESUMEN	2
1.1. INTRODUCCIÓN	4
1.1.1. Familia Amaryllidaceae	4
1.1.2. Amaryllidoideae en Chile	7
1.1.3. Consideraciones químicas de los alcaloides de Amaryllidaceae	8
1.1.4. Biosíntesis de alcaloides de Amaryllidaceae	10
1.1.5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)	15
1.1.6. Alcaloides tipo crinina y haemantamina	17
1.1.7. Alcaloides tipo montanina	20
1.1.8. Alcaloides tipo licorina	21
1.1.9. Alcaloides tipo homolicorina	24
1.1.10. Alcaloides tipo tazettina	26
1.1.11. Alcaloides tipo galantamina	28
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
1.2.1. Material vegetal	30

1.2.2.	Extracción de alcaloides	31
1.2.3.	Análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM)	32
1.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
1.3.1.	Alcaloides identificados en <i>Rhodophiala pratensis</i>	36
1.3.2.	Alcaloides identificados en <i>Rhodolirium speciosum</i>	40
1.3.3.	Alcaloides identificados en <i>Phycella australis</i>	42
1.3.4.	Alcaloides identificados en <i>Phaedranassa lehmannii</i>	43
1.4.	CONCLUSIONES	45
1.5.	REFERENCIAS	48
 CAPÍTULO 2. PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES POR BIOTECNOLOGÍA VEGETAL		54
RESUMEN		55
2.1.	INTRODUCCIÓN	57
2.1.1.	Importancia de la micropropagación <i>in vitro</i> en la producción de metabolitos secundarios.	61
2.1.2.	Micropropagación del material vegetal	63
2.1.3.	Micropropagación <i>in vitro</i> de especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae	65
2.1.4.	Micropropagación <i>in vitro</i> de especies de Amaryllidaceae Chilenas	66
2.1.5.	Producción de alcaloides en especies de Amaryllidaceae obtenidas por micropropagación <i>in vitro</i> .	69
2.1.6.	Técnica de obtención de escamas gemelas “twin scaling” en la micropropagación de especies bulbosas	70
2.1.7.	Nutrientes en el medio de cultivo de micropropagación	71
2.1.8.	Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)	76
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	82
2.2.1.	Protocolo de esterilización de bulbos silvestres	82

2.2.2.	Condiciones de propagación de bulbos de Amaryllidaceae	84
2.2.3.	Medio de cultivo para la inducción de brotes y callos	87
2.2.4.	Medios nutritivos para la formación de plántulas	88
2.2.5.	Medios nutritivos empleados en la multiplicación y regeneración <i>in vitro</i> de la planta	88
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
2.3.1.	Índice de contaminación de especies de Amaryllidaceae Chilenas	93
2.3.2.	Desinfección del material vegetal de <i>Rhodophiala pratensis</i>	94
2.3.3.	Cultivo de inducción de brotes y callos de <i>Rhodophiala pratensis</i> .	96
2.3.4.	Micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Rhodophiala pratensis</i> .	98
2.3.5.	Producción de alcaloides en la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Rhodophiala pratensis</i> .	100
2.4.	CONCLUSIONES	106
2.5.	REFERENCIAS	109
CAPÍTULO 3. ALCALOIDEOS DE AMARYLLIDACEAE Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER		115
RESUMEN		116
3.1.	INTRODUCCIÓN	118
3.1.1.	Enfermedad de Alzheimer	118
3.1.2.	Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer	121
3.1.3.	Importancia de galantamina en la enfermedad de Alzheimer	124
3.1.4.	Importancia de los productos naturales y el desarrollo de nuevos fármacos	128
3.1.5.	Línea celular SH-SY5Y como modelo biológico para la enfermedad de Alzheimer	129

3.1.6.	Modelo biológicos de neuroprotección en la enfermedad de Alzheimer	133
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	140
3.2.1.	Cultivo celular SH-SY5Y y tratamiento	140
3.2.2.	Incubación de muestra	141
3.2.3.	Ensayo de citotoxicidad	142
3.2.4.	Ensayo de neuroprotección frente a la muerte celular inducida por Rotenona/ Oligomicina A	142
3.2.5.	Ensayo de neuroprotección frente a ácido okadaico	143
3.2.6.	Ensayo MTT.	143
3.2.7.	Cuidado de animales y uso	144
3.2.8.	Preparación de cortes de hipocampo	145
3.2.9.	Deprivación oxígeno y glucosa (OGD) seguido por reoxigenación	146
3.2.10.	Efecto <i>in vitro</i> de ácido okadaico en cortes de hipocampo	147
3.2.11.	Cuantificación de viabilidad por MTT en cortes de hipocampo	148
3.2.12.	Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa	149
3.2.13.	Análisis estadístico	150
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	152
3.3.1.	Ensayo de citotoxicidad en células SH-SY5Y	154
3.3.2.	Neurotoxicidad generada por Rotenona/ Oligomicina A en células SH-SY5Y	156
3.3.3.	Neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en células SH-SY5Y	158
3.3.4.	Deprivación de oxígeno y glucosa (OGD) en cortes de hipocampo	161
3.3.5.	Neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en cortes de hipocampo	163
3.3.6.	Actividad inhibitoria de Acetilcolinesterasa	165
3.3.7.	Análisis estadístico de datos	166
3.4.	CONCLUSIONES	168
3.5.	REFERENCIAS	170

CONCLUSIONES	177
ANEXO 1. Cromatogramas del análisis por CG/EM de las fracciones de alcaloides de las especies estudiadas.	181
ANEXO 2. Alcaloides identificados por CG/EM	185

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO 1.

Tabla 1.1. Voucher de las especies en estudio.	31
Tabla 1.2. Tipo de alcaloides presentes en la fracción alcaloidea de <i>Rhodophiala pratensis</i> .	38
Tabla 1.3. Alcaloides presentes en la fracción alcaloidea de bulbos de las especies en estudio.	41

CAPÍTULO 2.

Tabla 2.1. Elementos esenciales para la nutrición de una planta y su importancia fisiológica.	74
Tabla 2.2. Medio de cultivo Murashige and skoog (MS)	86
Tabla 2.3. Efectos de inductores de crecimiento en la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Rhodophiala pratensis</i> .	87
Tabla 2.4. Partes de la planta de <i>Rhodophiala pratensis</i> estudiadas y alcaloides obtenidos en los explantes de micropropagación <i>in vitro</i> .	95
Tabla 2.5. Tipo de alcaloides presentes en la fracción alcaloidea de <i>Rhodophiala pratensis</i> .	103

CAPÍTULO 3.

Tabla 3.1. Fármacos aprobados por la FDA para la sintomatología de la enfermedad de Alzheimer	122
--	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

Figura 1.1. Especies de Amaryllidaceae estudiadas.	3
Figura 1.2. Distribución mundial de la familia Amaryllidaceae (subfamilia Amaryllidoideae)	6
Figura 1.3. Alcaloides de Amaryllidaceae representativos	10
Figura 1.4. Ruta biosintética hasta 4- <i>O</i> -metilnorbelladina	12
Figura 1.5. Vías alternativas del acoplamiento fenol-oxidativo de la 4- <i>O</i> -metilnorbelladina.	14
Figura 1.6. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo haemantamina	19
Figura 1.7. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo montanina	21
Figura 1.8. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo licorina	22
Figura 1.9. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo homolicorina	25
Figura 1.10. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo hipeastrina	26
Figura 1.11. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo tazettina y criwellina	27
Figura 1.12. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo galantamina	29
Figura 1.13. Procedimiento extractivo de los alcaloides de las diferentes partes de la planta para cada una de las especies en estudio	34
Figura 1.14. Estructura de los alcaloides identificados en <i>Rhodophiala pratensis</i> .	37

CAPÍTULO 2.

Figura 2.1. Procedimiento de obtención de escamas	71
Figura 2.2. Auxinas usadas en micropropagación <i>in vitro</i>	79
Figura 2.3. Citoquininas usadas en micropropagación <i>in vitro</i>	81
Figura 2.4. Cultivo de inducción. Efecto de inductores de crecimiento en la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Rhodophiala pratensis</i> .	97
Figura 2.5. Micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Rhodophiala pratensis</i> .	99

Figura 2.6. Efecto de diferentes combinaciones de inductores de crecimiento en la producción de alcaloides.	101
Figura 2.7. Estructura de alcaloides presentes en las plántulas de <i>Rhodophiala pratensis</i>	102
Figura 2.8. Análisis por CG/EM de alcaloides <i>Rhodophiala pratensis</i> en micropropagación <i>in vitro</i> .	105

CAPÍTULO 3.

Figura 3.1. Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer	120
Figura 3.2. Esquema general del proceso de neuroprotección de galantamina, derivado de su modo de acción dual.	127
Figura 3.3. Diferenciación de células SH-SY5Y.	130
Figura 3.4. Estructura química y mecanismo de AO en la inducción de neurotoxicidad.	134
Figura 3.5. Diagrama esquemático que representa el papel de las quinasas y las fosfatasas que actúan sobre la proteína Tau en la patología de la EA inducida por AO	136
Figura 3.6. Cadena respiratoria. Componentes moleculares que forman la cadena respiratoria.	139
Figura 3.7. Efecto de citotoxicidad de la fracción de alcaloides de bulbos de <i>Rhodophiala pratensis</i> , <i>Rhodolirium speciosum</i> , <i>Phycella australis</i> y <i>Phaedranassa lehmannii</i> en células SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones por 24 h, determinada por el ensayo MTT.	155
Figura 3.8. Efecto protector de la fracción de alcaloides de <i>Rhodophiala pratensis</i> , <i>Rhodolirium speciosum</i> , <i>Phycella australis</i> y <i>Phaedranassa lehmannii</i> contra la toxicidad inducida por Rotenona (10 μ M) /Oligomicina A (3.3 μ M) en la línea celular SH-SY5Y	157
Figura 3.9. Efecto protector de la fracción de alcaloides de bulbos de <i>Rhodophiala pratensis</i> , <i>Rhodolirium speciosum</i> , <i>Phycella australis</i> y <i>Phaedranassa lehmannii</i> en células SH-SY5Y tratadas con ácido okadaico (15 nM).	160
Figura 3.10. Efecto de neuroprotección determinado mediante la viabilidad celular determinada por la reducción de MTT en condiciones de neurotoxicidad inducida por deprivación de oxígeno y glucosa (OGD) en cortes de hipocampo, evaluando la presencia de	162

la fracción de alcaloides de bulbos de *Phycella australis* (3 y 6 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 3.11. Efecto neuroprotector de la fracción de alcaloides de bulbos de *Phycella australis* (6 $\mu\text{g/mL}$) contra toxicidad inducida por ácido okadaico en cultivo de cortes de hipocampo. 164

Figura 3.12. Análisis de componente principal de la fracción de alcaloides de especies de Amaryllidaceae. 167



RESUMEN

En este trabajo se estudiaron las especies de Amaryllidaceae Chilenas *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum* y *Phycella australis*, además de la especie Colombiana *Phaedranassa lehmannii*, las cuales fueron analizadas por CG/EM, encontrándose la presencia de alcaloides tipo galantamina, licorina, homolicorina, haemantamina, crinina, montanina, narciclasina y tazettina, algunos reportados por primera vez para algunas de las especies. La presencia de este tipo de alcaloides en las diferentes partes de la planta, se caracterizan por estar presente en bajas concentraciones e incluso en trazas, por lo que se ha propuesto un método de micropropagación *in vitro* de las especies de Amaryllidaceae Chilenas basado en la necesidad de incrementar el contenido de alcaloides, además de proteger y asegurar la subsistencia de estas plantas mediante las técnicas de propagación y multiplicación propuestas en este trabajo, ya que debido a la explotación de sus recursos muchas de las plantas de esta familia están comprometidas. El método de cultivo de tejidos vegetales planteado, consiste en ofrecer a partir

de la totipotencialidad de las células de estas plantas, la generación de nuevos organismos en un medio de cultivo *in vitro* a través de fitohormonas (AIA, BAP y 2,4-D) y factores de crecimiento (luz, humedad y fotoperiodo) que disminuyen el tiempo de maduración del organismo, obteniéndolo en un lapso menor al de su ciclo de vida silvestre. Los alcaloides de Amaryllidaceae juegan un papel crucial en el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas debido a su diversidad estructural y su complejidad espacial, por lo que los alcaloides encontrados en las especies *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* se evaluaron en diferentes modelos de neuroprotección en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, estudiando la neurotoxicidad inducida por rotenona/oligomicina y por el inhibidor específico de la actividad de proteínas fosfatasa ácido okadaico, donde se seleccionó la fracción alcaloidea de la especie con mayor actividad neuroprotectora, para posteriormente ser evaluada en un modelo de privación de oxígeno y glucosa, y finalmente ser probada frente a la neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en cortes de hipocampo de ratón. Los resultados encontrados en los ensayos de neuroprotección mostraron que las fracciones alcaloideas de las especies *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii*

presentan un gran efecto neuroprotector en los diferentes modelos estudiados, lo que indica que los alcaloides presentes en estas especies de Amaryllidaceae podrían ser un potencial valioso para seguir explorado en el campo neurofarmacológico.

Palabras clave: Amaryllidaceae, alcaloides de Amaryllidaceae, micropropagación, neuroprotección.



OBJETIVOS

Objetivo general

A partir de muestras de bulbos de especies de Amaryllidaceae Chilenas obtener callos mediante micropropagación *in vitro* con el objetivo de producir biomasa rica en alcaloides isoquinolínicos con potenciales aplicaciones en la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos específicos

-Analizar mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) los alcaloides presentes en la fracción alcaloidea de las especies *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii*.

-Estudiar la influencia del medio de cultivo en la micropropagación y desarrollo *in vitro* de bulbillos de *Rhodophiala pratensis*.

-Evaluar el efecto de las fitohormonas ácido indolacético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el contenido de alcaloides en bulbillos de *Rhodophiala pratensis*.

-Estudiar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa del extracto crudo de *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* por el método de Ellman.

-Cuantificar la viabilidad celular de la fracción alcaloidea de bulbos de la especie *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii*. en células SH-SY5Y por MTT.

-Evaluar la actividad neuroprotectora de los alcaloides presentes en las especies *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii*. en el modelo de neurotoxicidad inducida por Rotenona/Oligomicina en células SH-SY5Y.

-Determinar la capacidad neuroprotectora de los alcaloides presentes en las especies *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii*. en el modelo de neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en células SH-SY5Y.

-Evaluar en la especie con mayor respuesta de neuroprotección en células SH-SY5Y, el efecto de los alcaloides en un modelo de neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en cortes de hipocampo de ratón.



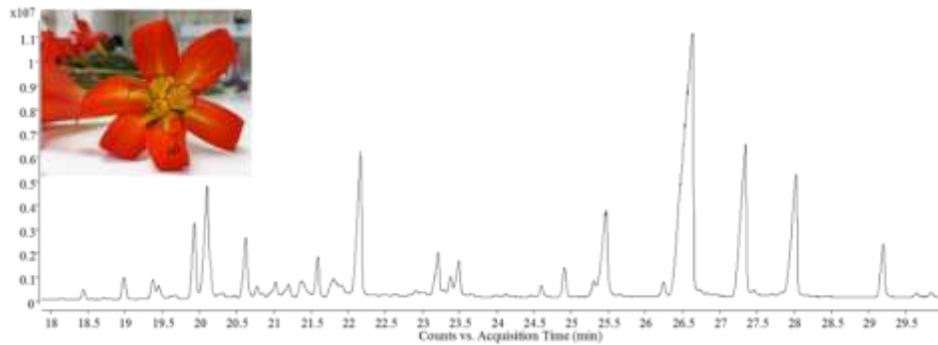
HIPÓTESIS

Existen evidencias de la presencia de alcaloides isoquinolínicos en especies de la familia Amaryllidaceae, presentes en baja cantidad, con potencial capacidad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa.

Mediante micropropagación *in vitro* es posible obtener biomasa de Amaryllidaceae Chilenas con un elevado contenido de alcaloides isoquinolínicos los cuales pueden ser aislados y caracterizados farmacológicamente usando ensayos de inhibición enzimática (acetilcolinesterasa) y de viabilidad celular (células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y cortes de hipocampo de ratón).

Capítulo 1.

Alcaloides de Amaryllidaceae



RESUMEN

Este capítulo muestra los resultados obtenidos del análisis de la fracción alcaloidea de las especies de Amaryllidaceae Chilenas *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum* y *Phycella australis* colectadas en las regiones VIII y XVI en la zona costera (Figura 1.1). Además, la identificación de algunos alcaloides en *Phaedranassa lehmannii*, especie recolectada en Colombia. Alcaloides típicos de la familia Amaryllidaceae fueron detectados, encontrándose compuestos con esqueletos tipo licorina, haemantamina, crinina, galantamina, homolicorina, montanina, narciclasina y tazettina, algunos constituyen el primer reporte para algunas de las especies estudiadas.



Rhodophiala pratensis



Rhodolirium speciosum



Phycella australis



Phaedranassa lehmannii

Figura 1.1. Especies de Amaryllidaceae estudiadas. Fuente: Fotografías tomadas por el autor.

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Familia Amaryllidaceae

La familia botánica Amaryllidaceae, es un grupo de monocotiledóneas pertenecientes al orden Asparagales, ha sido objeto de debate taxonómico durante mucho tiempo. Según la última clasificación actualizada del APG (*Angiosperm Phylogeny Group*), sustentada por varios análisis moleculares y morfológicos (Meerow et al., 1999; Meerow et al., 2006), la familia Amaryllidaceae J.St.-Hil. comprende tres subfamilias: Agapanthoideae, Allioideae y Amaryllidoideae las cuales, a su vez, habían sido previamente consideradas como Agapanthaceae (comúnmente conocidos como agapantos), Alliaceae (incluyendo al ajo y las especies afines) y Amaryllidaceae (APGIII, 2009; Chase et al, 2009). En este trabajo se utilizará la denominación “alcaloides de las Amaryllidaceae” la cual corresponderá, única y exclusivamente, a los alcaloides sintetizados por plantas de la subfamilia Amaryllidoideae.

La subfamilia Amaryllidoideae comprende 59 géneros y cerca de 850 especies que se distribuyen preferentemente en regiones tropicales y subtropicales, pero también en zonas templadas. Estas plantas presentan una gran capacidad de adaptación y sus principales centros de diversidad son Sudáfrica, Sudamérica, la región Mediterránea y en zonas templadas de Asia (Figura 1.2) (Rønsted et al, 2012). Estudios filogenéticos apuntan a Sudáfrica y Sudamérica como centros de diversificación primaria y secundaria, respectivamente (Ito et al, 1999). Dado que numerosas especies de este grupo son endémicas y muy vulnerables, existe la necesidad de promover su conservación y mejorar el conocimiento existente sobre las mismas. Actualmente, se cultivan como ornamentales debido a la belleza de sus flores, sin embargo, desde hace siglos vienen recibiendo una especial atención debido a sus propiedades terapéuticas (Bastida et al, 2006; Goietsenoven et al, 2010; Ingrassia et al, 2008).

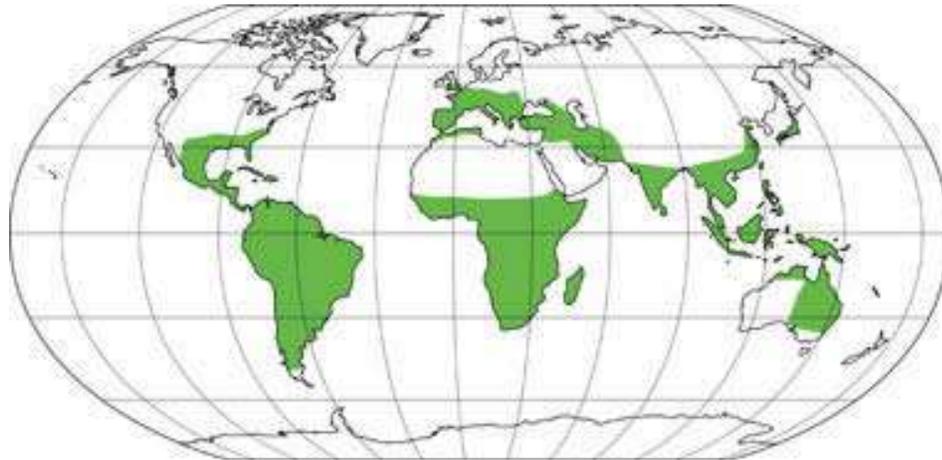


Figura 1.2. Distribución mundial de la familia Amaryllidaceae (subfamilia Amaryllidoideae). Fuente: Laboratorio de Sistemática de plantas vasculares. Amaryllidaceae J St.-Hil. subfam. Amaryllidoideae Burnett. http://www.the-compositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/amaryllidaceae_a_maryllidoideae.html.

El gran interés en el estudio de los alcaloides de Amaryllidaceae, especialmente en el ámbito de la farmacología, se debe a su amplio rango de actividades biológicas, que incluyen, entre otras, propiedades antivirales, antitumorales y antiparasitarias (Bastida et al, 2011). De hecho, estas plantas han sido utilizadas como hierbas medicinales durante miles de años. Hipócrates de Cos (IV a.C.), considerado el padre de la medicina,

recomendaba el aceite de especies de *Narcissus poeticus* (Amaryllidaceae) para el tratamiento de lo que hoy conocemos como tumores de útero (Goietsenoven et al, 2013), mientras que en el siglo I d. C., se había establecido para este fin en Oriente Medio y en el Imperio Romano (Pettit et al, 1986). En la actualidad, uno de los compuestos más interesantes del grupo es la galantamina, un inhibidor potente, reversible y competitivo de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), aprobado y comercializado como estrategia para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer (Reminyl®, Razadyne®).



1.1.2. Amaryllidoideae en Chile

La familia Amaryllidaceae en Chile está representada por 11 géneros y alrededor de 35 especies (Ravenna, 2003). La delimitación morfológica de los géneros de la familia ha sido muy difícil de establecer, dado la variabilidad de los caracteres hasta ahora usados para tal propósito. Estudios enfocados en el cariotipo han sido capaces de detectar diferencias entre algunos géneros chilenos de Amaryllidoideae, además de caracterizar

algunas de sus especies, como es el caso de *Phycella australis* (Baeza et al, 2007), *Rhodophiala pratensis* (Baeza et al, 2006) y *Rhodolirium speciosum* (Baeza et al, 2009), entre otras especies endémicas. Es importante destacar el alto grado de endemismo de los géneros de esta subfamilia en Chile. Este hecho sugiere que Chile ha sido un activo centro evolutivo para estas plantas.

1.1.3. Consideraciones químicas de los alcaloides de Amaryllidaceae



La familia Amaryllidaceae presenta entre sus metabolitos secundarios un grupo de alcaloides, que tienen como característica principal la de ser exclusivos de esta familia de plantas, lo que les confiere valor quimiotaxonómico.

Las características químicas más importantes de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae son:

- Tener una estructura base C6-C1-N-C2-C6. En la que, la fracción C6-C1 deriva del aminoácido L-fenilalanina (L-phe) y la N-C2-C6 deriva del aminoácido L-tirosina (L-tyr).
- Ser bases moderadamente débiles, con un pKa entre 6 y 9.
- Contener un solo átomo de nitrógeno, que puede ser secundario, terciario o incluso cuaternario, y generalmente el número de átomos de carbono oscila entre 16 y 20, dependiendo de los sustituyentes presentes en los anillos.



La clasificación de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae ha ido variando en función del conocimiento de sus relaciones biosintéticas. Aunque todos ellos provienen de L-phe y L-tyr, su diversidad estructural es consecuencia de los diferentes tipos de acoplamientos fenol oxidativos. En base al sistema heterocíclico que presentan, se pueden diferenciar los esqueletos tipo: norbelladina, licorina, licorenina, crinina, hemantamina, pretazetina, narciclasina, montanina y galantamina (Figura 1.3).

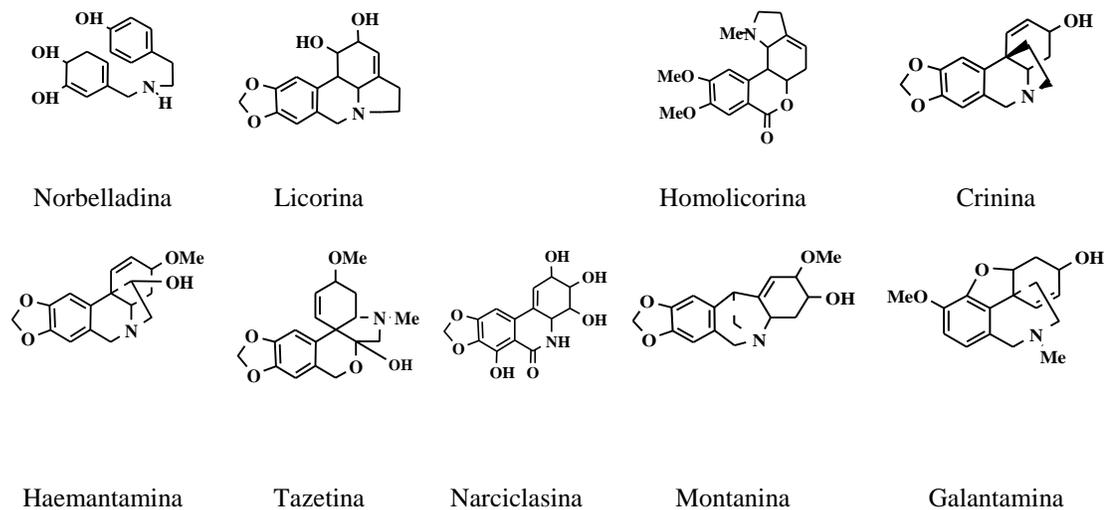


Figura 1.3. Alcaloides de Amaryllidaceae representativos. Fuente: Bastida et al, 2011.

1.1.4. Biosíntesis de alcaloides de Amaryllidaceae

La ruta biosintética que origina esta variedad de estructuras (Figura 1.3) sigue un esquema general de cuatro etapas que comienza con la preparación enzimática de los precursores a partir de los aminoácidos L-fenilalanina (L-phe) y L-tirosina (L-tyr). En los alcaloides de Amaryllidaceae, L-phe sirve como precursor primario del fragmento C6-C1, que corresponde al anillo A

y la posición bencílica (C-6), mientras que L-tyr es precursor del anillo C, la cadena lateral de dos carbonos (C-11 y C-12) y el nitrógeno, C6-C2-N. Para formar la porción C6-C1, L-phe es convertida en aldehído protocatéquico a través de la vía de ácidos cinámicos, involucrando la participación de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). Por otro lado, L-tyr es mínimamente modificada mediante un paso de descarboxilación antes de ser incorporada (Figura 1.4) (Bastida et al, 2011).

La segunda etapa de la biosíntesis implica la fusión entre tiramina y el aldehído protocatéquico, que da lugar a norbelladina por medio de la formación de una base de Schiff. Esta reacción clave representa la entrada de los metabolitos primarios a una vía metabólica secundaria. La posterior metilación de norbelladina en la posición *orto* (4') del anillo A se considera el tercer paso.

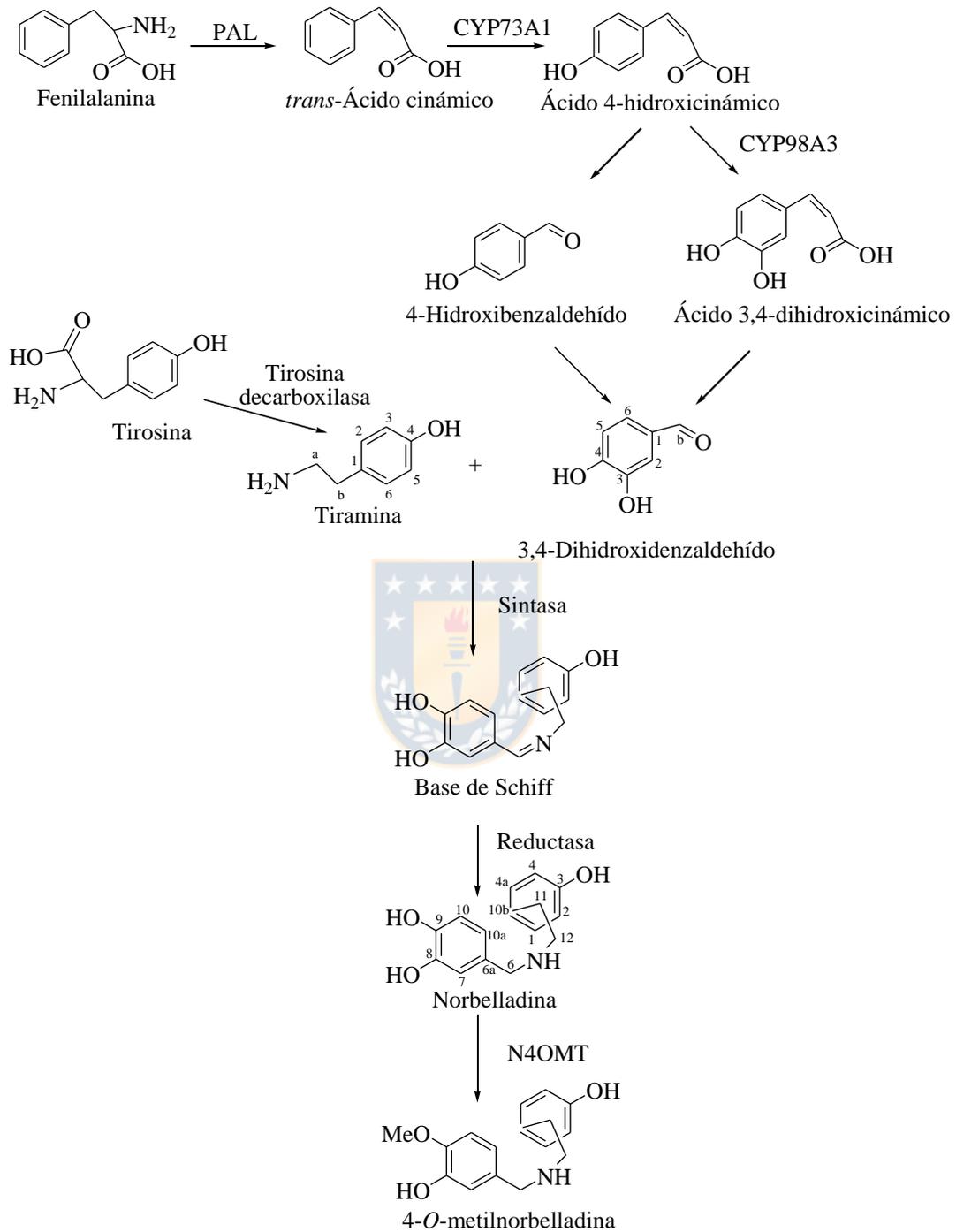


Figura 1.4. Ruta biosintética hasta 4-O-metilnorbelladina. Fuente: Kilgore,

M.B. & Kutchan, T.M., 2016.

Finalmente, la última etapa incluye una serie de reacciones secuenciales que resultan en la diversificación hacia los esqueletos restantes mostrados en la Figura 1.4. El paso inicial consiste en una ciclación secundaria producida por el acoplamiento oxidativo de *O*-metilnorbelladina, el cual puede transcurrir a través de tres vías diferentes para dar lugar a las distintas estructuras. El acoplamiento fenol oxidativo *orto-para'* resulta en la formación del esqueleto tipo licorina, a partir del cual se originan los compuestos de tipo homolicorina. Por otro lado, la ciclación secundaria *para-para'* produce los alcaloides con estructura base 5,10b-etanofenantridina (tipos crinina y hemantamina), los cuales pueden sufrir ciertas modificaciones para generar las estructuras de tipo tazetina, narciclasina y montanina. De manera similar, los alcaloides de tipo galantamina, con su núcleo dibenzofurano característico, derivan de un acoplamiento fenol oxidativo *para-orto'* (Figura 1.5).

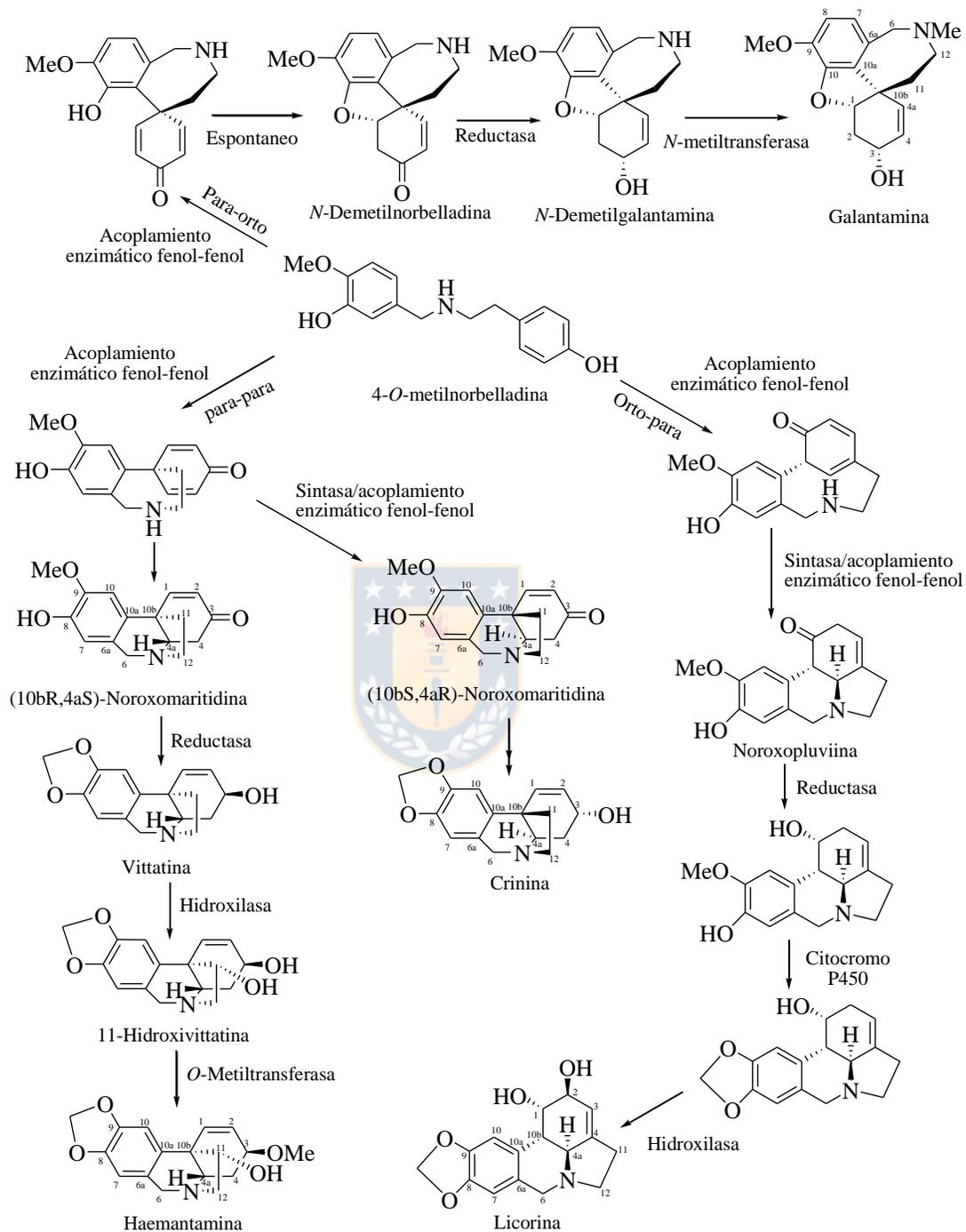


Figura 1.5. Vías alternativas del acoplamiento fenol-oxidativo de la 4-O-metilnorbelladine. Fuente: Kilgore, M.B. & Kutchan, T.M., 2016.

1.1.5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

La cromatografía de gases es una herramienta analítica utilizada para separar mezclas de compuestos volátiles a través de una columna como fase estacionaria y un gas inerte como fase móvil, siendo la temperatura una importante variable a considerar. Únicamente las moléculas capaces de ser vaporizadas sin experimentar descomposición son adecuadas para este tipo de análisis. Un espectrómetro de masas es básicamente un instrumento que mide la relación masa-carga (m/z) de iones en fase gaseosa, proporcionando información sobre la abundancia de cada especie iónica, y que ofrece la posibilidad de ser acoplado como detector a la separación de los compuestos obtenidos por cromatografía de gases (Kitson et al, 1996).

Estudios de CG/EM de extractos de especies de la familia Amaryllidaceae revelan que estas pueden contener un número bastante variado de alcaloides. Cada planta metaboliza una mezcla de alcaloides formada por un pequeño

número de alcaloides mayoritarios y un gran número de alcaloides minoritarios. Esto normalmente resulta de la diferencia en la especificidad del sustrato y del nivel de la expresión génica de las enzimas involucradas en los procesos de biosíntesis (Berkov et al, 2013; Berkov et al, 2011; Takos and Rook, 2013).

Generalmente, los compuestos orgánicos presentan patrones de fragmentación característicos al ser ionizados, lo que permite su identificación mediante comparación con datos obtenidos previamente. De esta manera, la CG/EM es una poderosa herramienta analítica para la obtención del perfil químico de compuestos naturales volátiles. Mediante numerosos estudios de espectrometría de masas de impacto electrónico (EIMS) de los alcaloides de Amaryllidaceae, ha sido posible establecer los patrones de fragmentación característicos para los diferentes tipos de esqueletos (Bastida et al, 2006).

1.1.6. Alcaloides tipo crinina y haemantamina

Un primer hecho destacable es la presencia del hidroxilo en C-11 afecta bastante a los procesos de fragmentación de la molécula (Figuras 1.6). La fragmentación de este tipo de alcaloide ha sido estudiada en detalle para varias estructuras. En la mayoría de los casos, el ión molecular corresponde al pico base, el anillo aromático tiene un papel fundamental en la estabilización de los fragmentos, mientras que el átomo de nitrógeno suele perderse, y el paso inicial en los mecanismos de fragmentación implica la apertura del puente de dos carbonos 11-12. Se han descrito varios patrones característicos teniendo en cuenta la presencia de sustituyentes en diversas posiciones, la saturación del anillo C, y la influencia de la estereoquímica (Bastida et al., 2006; Longevialle et al., 1973).

Haemantamina presenta un pico molecular de poca intensidad a m/z 301, así como tres modos fundamentales de fragmentación: pérdida de MeOH, pérdida de $\text{CH}_2=\text{NH}$ y pérdida de CHO. En general, para los alcaloides del

tipo crinano (α o β indistintamente) la pérdida de metanol (Figura 1.6) está más favorecida en las moléculas en las que el puente y el sustituyente en C-3 están en *cis*. El fragmento de $m/z = 269$ se forma entonces, pero mucho más fácilmente que cuando no se cumple esta condición. Los picos más importantes derivados de este tipo de pérdida son los de $m/z = 269$, el cual deriva de un proceso tipo retro Diels-Alder para su formación, $m/z = 240$ que se produce por pérdida de un radical tipo formaldehído, $m/z = 211$, que procede del anterior por fragmentación de una unidad de metilenimina, $m/z = 210$ y $m/z = 209$, que deriva por pérdida sucesiva de dos radicales hidrógeno y, finalmente, el que es el pico base a $m/z = 181$, derivado de la pérdida de una molécula de formaldehído. Otra posibilidad para el ion $m/z = 269$ incluye la pérdida de su cadena cetónica como consecuencia de un reordenamiento de McLafferty con uno de los hidrógenos del esqueleto llevando al ion de $m/z = 225$ que puede experimentar una subsiguiente eliminación de hidrógeno (Bergoñón, S., 1994).

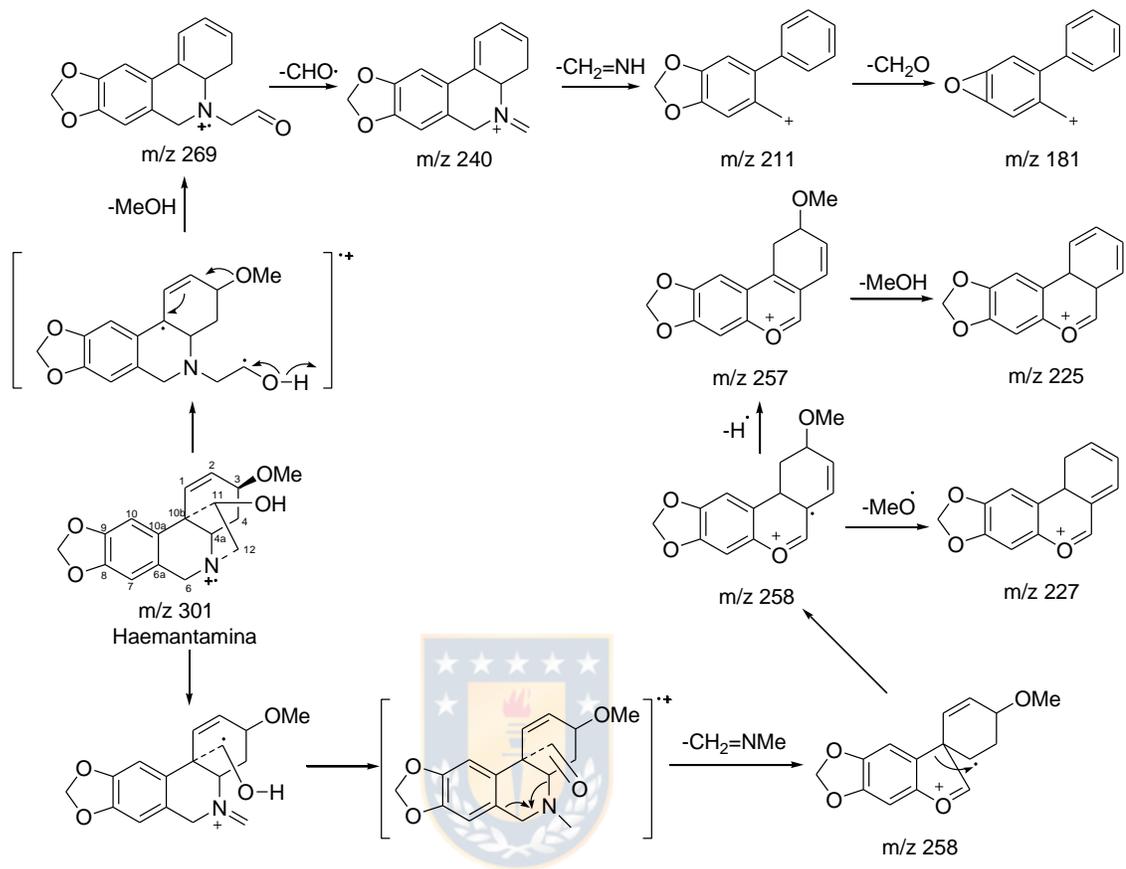


Figura 1.6. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo haemantamina.

Fuente: Tallini, L.R., 2018.

1.1.7. Alcaloides tipo montanina

El patrón de fragmentación de alcaloides con el núcleo 5,11-metanomorfantridina depende en gran medida de la naturaleza y configuración de los sustituyentes en C-2 y C-3. Las estructuras que contienen un grupo metoxilo dan lugar a un fragmento 31 unidades menor que el ión molecular (Figura 1.7). Por otra parte, la configuración del sustituyente en C-2 tiene una considerable influencia en la medida en cómo transcurre la fragmentación de tipo retro-Diels-Alder, que se ve aumentada cuando el sustituyente se encuentra en posición α (Bastida et al., 2006).

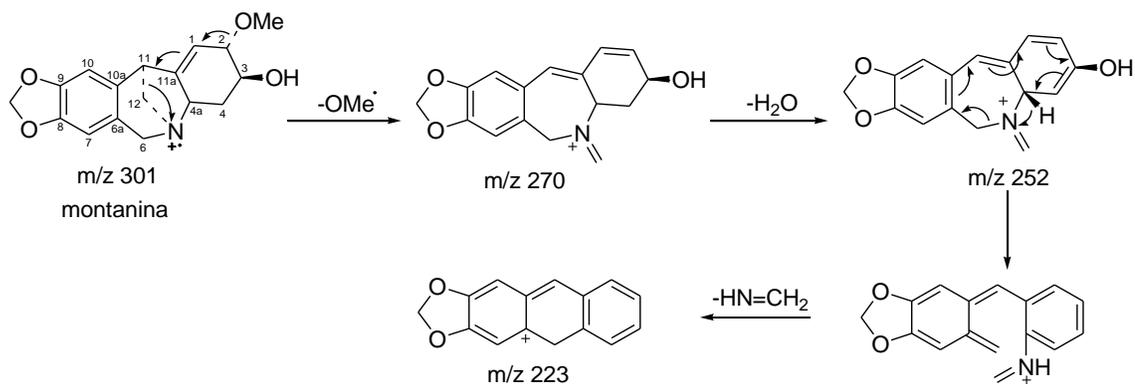


Figura 1.7. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo montanina. Fuente: Pigni N. B., 2013.



1.1.8. Alcaloides tipo licorina

El patrón de fragmentación de este esqueleto tipo licorina se mantiene en condiciones de cromatografía de gases. El pico molecular aparece con una intensidad apreciable y suele experimentar la pérdida de agua, así como de C-1 y C-2, junto con los respectivos sustituyentes, por medio de una fragmentación de tipo retro-Diels-Alder (Figura 1.8). Curiosamente, la pérdida de agua a partir del ión molecular depende de la estereoquímica del grupo hidroxilo en C-2, y no ocurre en derivados acetilados (Bastida et al.,

2006). En estructuras con dos grupos metoxilo en el anillo A en lugar del grupo metilendioxi de licorina (como es el caso de galantina) el pico base del espectro es 16 unidades mayor que m/z 226, apareciendo a m/z 242.

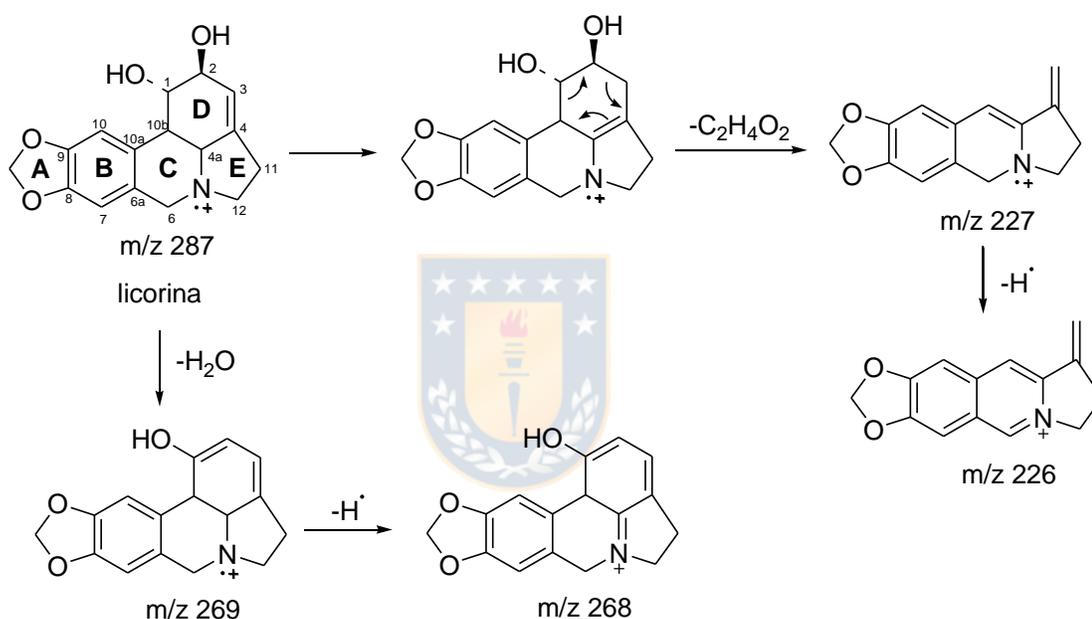


Figura 1.8. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo licorina. Fuente: Pigni N. B., 2013.

El alcaloide hallado con más frecuencia dentro de este grupo es licorina, que fue el primero en ser aislado. Se ha reportado su actividad como potente

inhibidor de la biosíntesis del ácido ascórbico, del crecimiento y división celular, y de la organogénesis en plantas superiores, algas y levaduras. En animales, ha demostrado una importante actividad antitumoral, siendo considerado un agente quimioterapéutico prometedor debido a su efecto antiproliferativo selectivo, más marcado en células cancerosas que en células normales (Lamoral-Theys et al, 2009; McNulty et al, 2009). Otra actividad destacable de los alcaloides de tipo licorina es su potente efecto inhibidor sobre parásitos, habiéndose reportado que su actividad frente a *Trichomonas vaginalis* transcurre a través de la muerte celular mediada por un mecanismo conocido como parapoptosis (Giordani et al, 2011), además de numerosos ensayos que señalan la inhibición de *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei* (Toriizuka et al, 2008). Licorina y pseudolicorina también han demostrado, entre otras propiedades, efectos antivirales, así como la capacidad de interaccionar con el ADN. Al igual que otros tipos de alcaloides del grupo, licorina y sus derivados presentan efectos analgésicos e hipotensores (Bastida et al, 2011).

1.1.9. Alcaloides tipo homolicorina

Esta molécula presenta un tipo de fragmentación dominante, consistente en la rotura de enlaces débiles en el anillo C y obtención de dos fragmentos, siendo el más característico y abundante el correspondiente al anillo de pirrolidina, unido a los sustituyentes de la posición 2 (Bastida et al, 2006).



El fragmento más característico de homolicorina y sus derivados se observa a $m/z = 109$ (Figura 1.9), mientras que hipeastrina (con un grupo hidroxilo en C-2) lo presenta a $m/z = 125$ (Figura 1.10). Los alcaloides de esta serie suelen ser difíciles de diferenciar debido a la reducida abundancia del ión molecular ($m/z = 315$) y los demás fragmentos ($m/z = 206, 178$) (Pigni N. B., 2013).

Un mecanismo explicativo para la fragmentación de homolicorina surge de la rotura de los enlaces lábiles del anillo C por una reacción retro Diels- Alder con formación del fragmento de $m/z = 109$, que experimenta una pérdida subsiguiente de hidrógeno radical para dar el pico a $m/z = 108$. A

continuación puede tener lugar la eliminación del CO del ion radical de $m/z = 206$ dando el fragmento benzofuranilo $m/z = 178$. Una eliminación posterior de CO y de metilo daría las especies de $m/z = 150$ y $m/z = 135$ respectivamente. La pérdida de un radical hidrógeno, metilo o etilénico del fragmento de $m/z = 109$ puede dar lugar, respectivamente, a los picos a $m/z = 108$, $m/z = 94$ y $m/z = 82$ (Bergoñón, S., 1994).

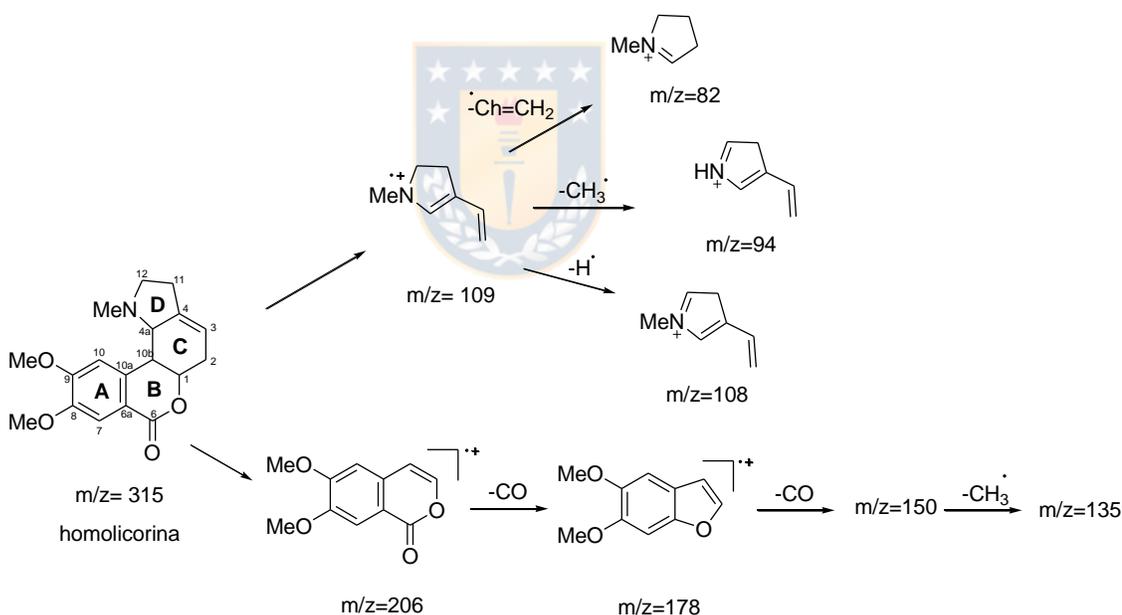


Figura 1.9. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo homolicorina. Fuente: Bergoñón, S., 1994.

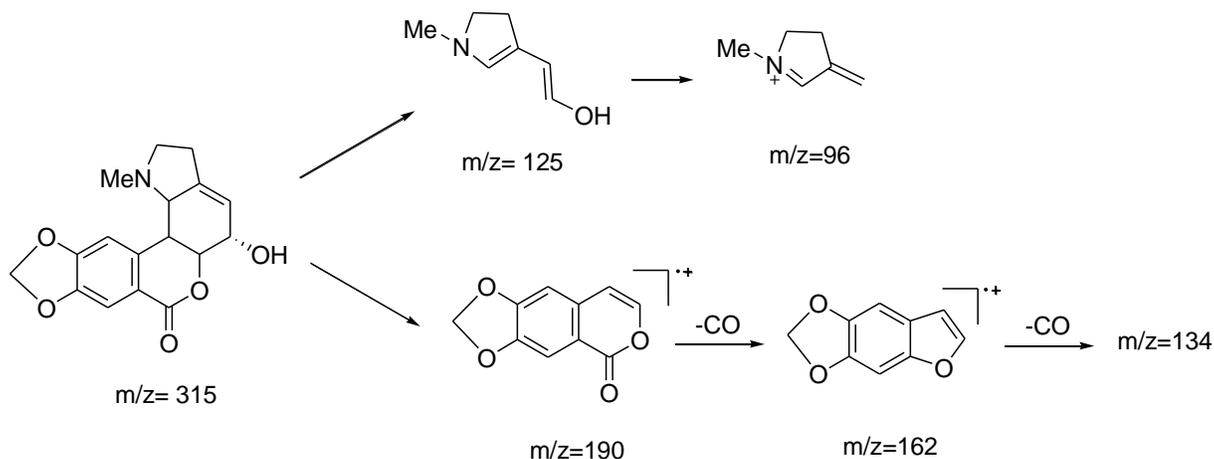


Figura 1.10. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo hipeastrina. Fuente:

Bergoñón, S., 1994.



1.1.10. Alcaloides tipo tazettina

El esqueleto de tipo tazettina es un buen ejemplo para ilustrar cómo pequeños cambios en la estereoquímica pueden verse reflejados en los patrones de fragmentación. Tazettina y criwellina difieren sólo en la configuración del grupo metoxilo en C-3, pero ello es suficiente para producir variaciones notables en sus espectros de masas. La reacción principal involucra una fragmentación de tipo retro-Diels-Alder, la cual en criwellina está precedida

por la pérdida del grupo metoxilo, dado que su configuración la favorece, mientras que en tazettina ocurre tras una simple reorganización de protones (Figura 1.11). Además, ambas estructuras experimentan la pérdida sucesiva de un radical metilo y agua, resultando en la formación de iones a m/z 316 y m/z 298, así como posteriores fragmentaciones (Duffield et al., 1965).

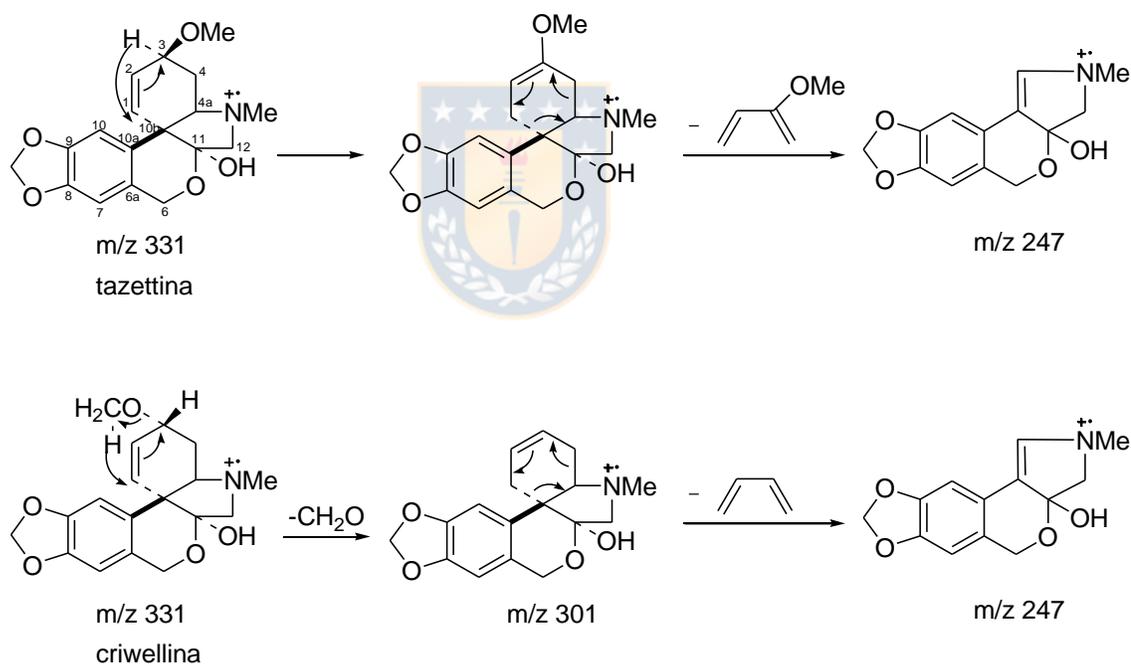


Figura 1.11. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo tazettina y criwellina.

Fuente: Pigni N. B., 2013.

1.1.11. Alcaloides tipo galantamina

Las estructuras de esta serie son probablemente las más estudiadas entre los alcaloides de Amaryllidaceae. Durante la década de 1970, se propuso que la fragmentación de algunos compuestos de este grupo incluía tres pasos principales que comprenden la eliminación del sustituyente en C-3, del anillo C, y del átomo de nitrógeno (Figura 1.12). Más recientemente, se ha utilizado de CG/EM para el análisis detallado del comportamiento de varios esqueletos de tipo galantamina, demostrando que sus patrones de fragmentación se mantienen en dichas condiciones. Esto ha permitido su establecimiento como una técnica de rutina para el estudio de extractos vegetales que contienen este tipo de alcaloides (Berkov et al, 2012).

Diferentes factores influyen en la fragmentación de estos alcaloides, como por ejemplo, la posición de diversos sustituyentes y la modificación estereoquímica, los cuales puede afectar el espectro de masas de un compuesto, como es el caso de galantamina y el epímero en posición 3 (Pigni

N. B., 2013). Ambos presentan diferentes tiempos de retención bajo las mismas condiciones cromatográficas, junto a una sutil, pero significativa, diferencia en sus espectros: la abundancia del fragmento a m/z 216, la cual se explica por la presencia de un puente de hidrógeno intramolecular que estabiliza el ión molecular de galantamina (Figura 1.12).

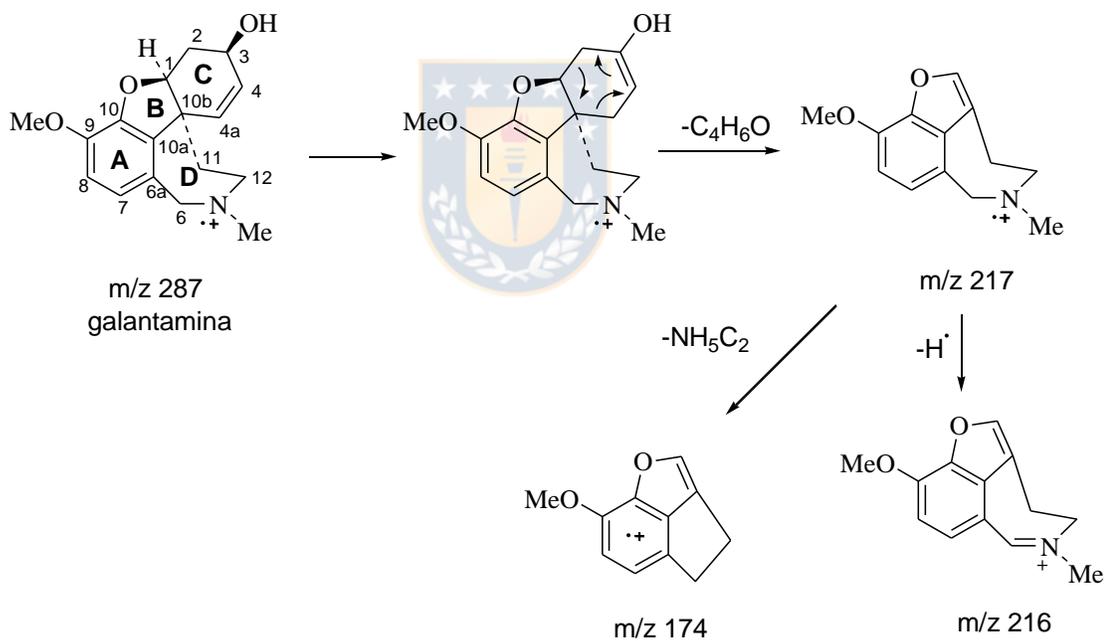


Figura 1.12. Patrón de fragmentación de alcaloides tipo galantamina. Fuente:

Pigni N. B., 2013.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Material vegetal

Las especies *Rhodophiala pratensis* y *Rhodolirium speciosum* se colectaron en la VIII región del Bio-Bío (Chile) en la Provincia de Concepción. *Rhodophiala pratensis* se recolectó en Hualpén. Recinto de la Universidad de Concepción, 60 m s.n.m., (36°47'S/73°10'W), 5 de Septiembre 2017, C. Baeza 4340 (CONC). *Rhodolirium speciosum* se recolectó en la comuna de Coronel, camino a Santa Juana, 49 m s.n.m., (37°10'S/72°58'W) 27 de Octubre 2017, C. Baeza 4350 (CONC). *Phycella australis* en la XVI región de Ñuble (Chile) en la provincia de Itata, Cobquecura, 5 m s.n.m., (36°05'S/72°08'W) 6 de Octubre 2018. J. Alarcón s.n. (CONC) y *Phaedranassa lehmannii* en el Departamento del Cauca (Colombia), Municipio de Rosas, 1900 m s.n.m., (2°15'S/76°36'W) 21 de Julio 2016. Alzate 5106. Voucher (Tabla 1.1) de las especies se encuentran en el herbario de la Universidad de Concepción y de la Universidad de Antioquia.

Tabla 1.1. Voucher de las especies en estudio. Fuente: Elaboración propia.

Especie	Ubicación	Numero de voucher	Parte de la planta	Numero de alcaloides identificados
<i>Rhodophiala pratensis</i>	Concepción. VIII región del Bio-Bío. Chile	Baeza 4340 (CONC)	Hojas Tallo Bulbos Raíz	20 25 27 26
<i>Rhodolirium speciosum</i>	Santa Juana. VIII región del Bio-Bío. Chile	Baeza 4350 (CONC)	Bulbos	25
<i>Phycella australis</i>	Chillan. XVI región de Ñuble. Chile	J.Alarcón s.n.(CONC)	Bulbos	27
<i>Phaedranassa lehmannii</i>	Departamento del Cauca. Colombia	Alzate 5106	Bulbos	12

1.2.2. Extracción de alcaloides

Las diferentes partes de la planta de las especies en estudio fueron colectadas, lavados con agua potable, cortados en trozos de 3 cm aproximadamente y liofilizados. El material vegetal liofilizado (500 g) fue extraído con metanol, evaporando el solvente a presión reducida. El residuo fue disuelto en 10 mL de H₂SO₄ al 2%, retirando los compuestos neutros con éter etílico (3x10 mL) ajustando el pH de la fracción acuosa en un rango de 9.5 a 10.0 con hidróxido de amonio al 25 % (Figura 1.13). Los alcaloides fueron extraídos de la

fracción acuosa con cloroformo (3x50 mL), el solvente orgánico fue evaporado a presión reducida, y el residuo fue disuelto en metanol (5 mg de extracto de alcaloides en 250 μ L de metanol) para el análisis por CG/EM.

1.2.3. Análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM).

El análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM), fue desarrollado considerando el método descrito por Bozkurt-Sarikaya et al, 2014, donde se utilizó un equipo Agilent 7890 A GC (Agilent, Palo Alto, CA) con inyector multimodal, detector Agilent triple Quad 7000 CG/EM (análisis SCAN por un cuadrupolo). Se utilizó una columna capilar HP-5 MS (30m x 0,250 mm x 0,25 μ m, Agilent J&W, Palo Alto, CA). La temperatura utilizada fue: 100-180°C a 15°C/minuto, 180-300°C a 5°C/minuto y 10 minutos caliente a 300°C. La inyección se realizó a 250°C. El flujo del gas carrier (helio) fue 0.8 mL/min. Un microlitro de la muestra fue inyectado. Se registraron los índices de retención de Kovats (RI) de los compuestos con una mezcla de calibración estándar de n-hidrocarburos (C8-C32). El

porcentaje TIC (total ion current) se determinó para cada alcaloide. La abundancia de cada compuesto fue calculada considerando codeína como estándar interno. Los compuestos se identificaron por comparación de su fragmentación espectral de masas con el espectro de referencia estándar, usando la biblioteca de masas (NIST 2.0). Además, se utilizaron datos obtenidos de la literatura para la identificación de los compuestos. La proporción de cada compuesto en los extractos probados fue denominada como el porcentaje del contenido total de los alcaloides. El área de los picos de CG/EM depende no sólo de la concentración de los compuestos relacionados, sino también de la intensidad de su fragmentación espectral de masas.

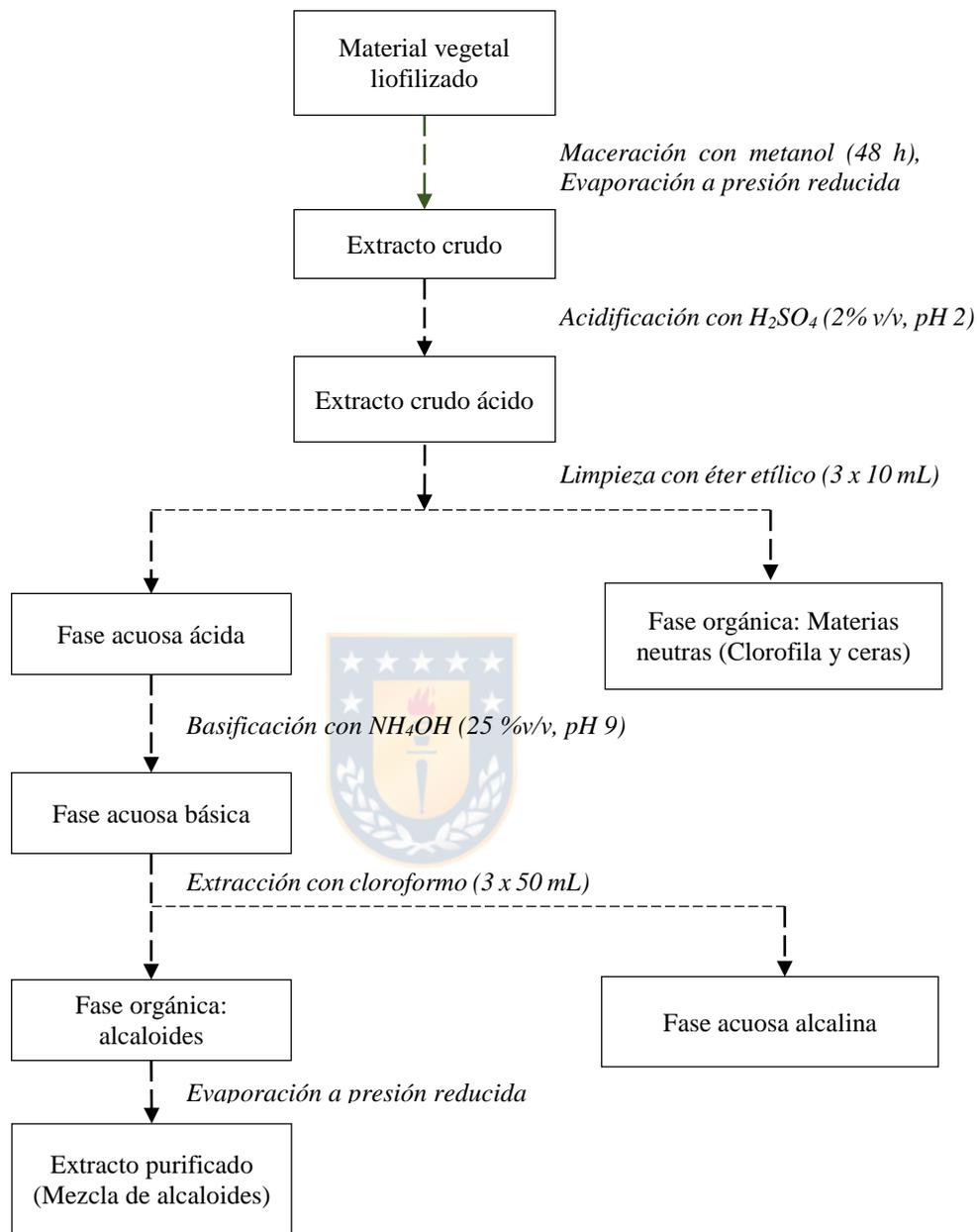


Figura 1.13. Procedimiento extractivo de los alcaloides de las diferentes partes de la planta para cada una de las especies en estudio. Fuente: Acosta K., 2013.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el perfil alcaloideo de las distintas especies de Amaryllidaceae colectadas en la zona costera de las regiones VIII y XVI de Chile. Donde las especies seleccionadas para este trabajo fueron *Rhodophiala pratensis*, *Phycella australis* y *Rhodolirium speciosum*, además incluyendo en este estudio a la especie Colombiana *Phaedranassa lehmannii*. La fracción alcaloidea de bulbos de cada una de las especies, fue analizada por CG/EM, detectándose 41 alcaloides conocidos y 15 no identificados (Tabla 2.1, Anexo 2). Algunos de los alcaloides, ya reportados en estudios previos, y otros detectados por primera vez.

En general los alcaloides de Amaryllidaceae derivan de los aminoácidos fenilalanina y tirosina vía *O*-metilnorbelladina. Principalmente tres tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae son biosintetizados alternativamente por rutas de acoplamiento fenol oxidativo, siendo la base en la formación de la diversidad de alcaloides en Amaryllidaceae, como se

muestra en la Figura 1.14 para los alcaloides identificados en diferentes partes de la planta de *Rhodophiala pratensis*.

1.3.1. Alcaloides identificados en *Rhodophiala pratensis*

Mediante CG/EM se identificó 34 alcaloides característicos de la familia Amaryllidaceae, presentes en la fracción alcaloidea de las diferentes partes de la planta (hojas, tallos, bulbos y raíz) de *Rhodophiala pratensis* como se muestra en la tabla 1.2. Los alcaloides derivados de licorina, homolicorina y haemantamina predominan en las diferentes partes de la planta, mostrando que los alcaloides obtenidos mediante el acoplamiento fenol oxidativo *orto-para* de 4-*O*-metilnorbellaína se generan mayoritariamente en los bulbos y en menores cantidades en el resto de la planta. En el caso de los alcaloides derivados de haemantamina provenientes del acoplamiento *para-para* de 4-*O*-metilnorbellaína, se sintetizan y acumulan en mayores porcentajes en la parte aérea de la planta, predominantemente en las hojas. Los alcaloides identificados en las diferentes partes de la planta, se describen en la tabla 2.2 del anexo 2.

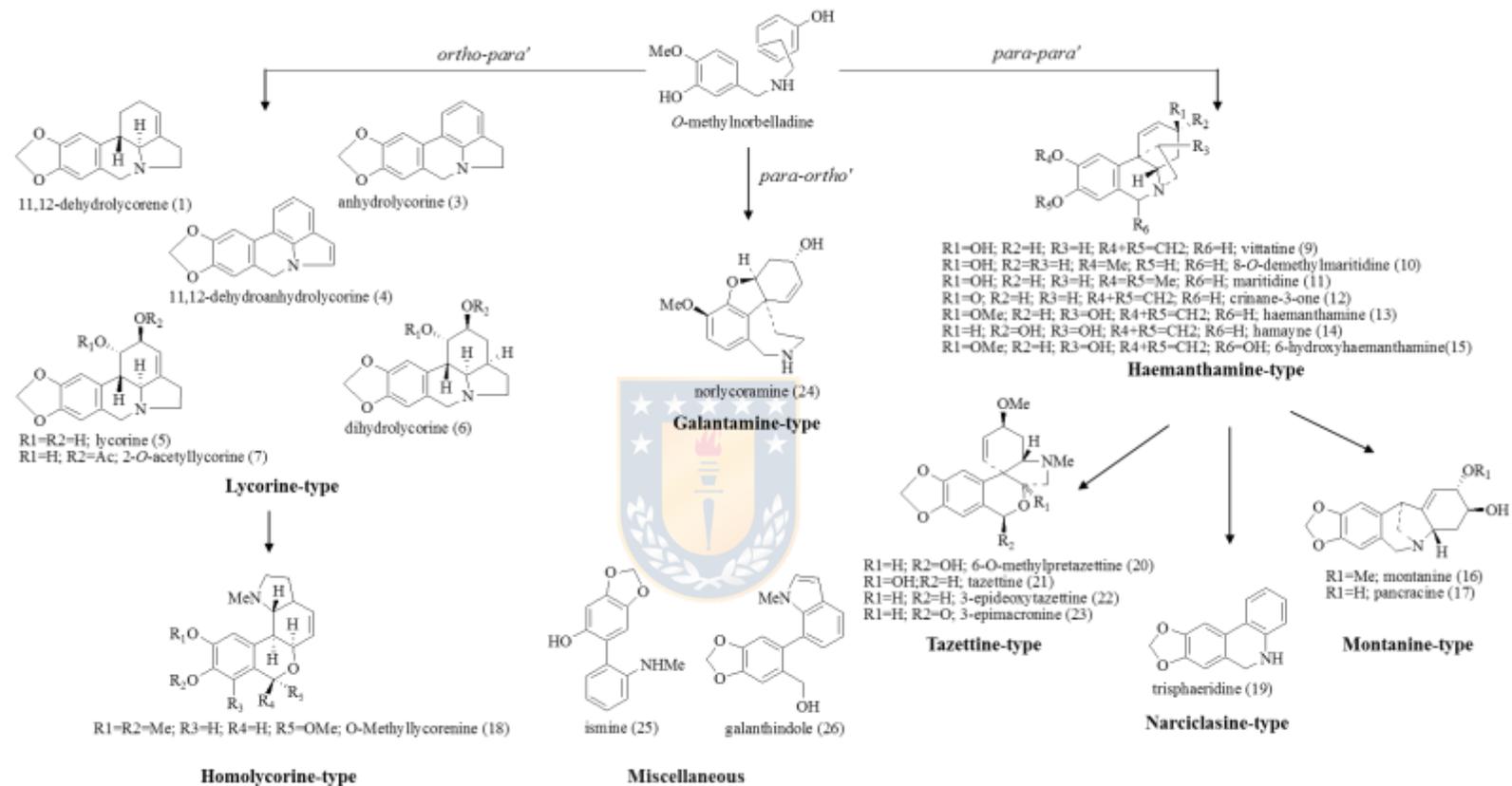


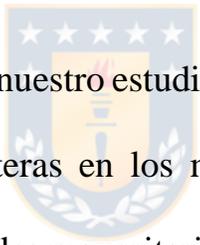
Figura 1.14. Estructura de los alcaloides identificados en *Rhodophiala pratensis*. La numeración de los alcaloides corresponde a la mostrada en la tabla 2.1 del Anexo 2. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 1.2. Tipo de alcaloides presentes en la fracción alcaloidea de *Rhodophiala pratensis*. Fuente: Elaboración propia.

Tipo de alcaloide	% relativo de la fracción de alcaloides (%, p/p)			
	Raíz	Bulbo	Tallo	Hojas
<i>Orto-para</i>				
Licorina	8.24	17.05	14.56	12.54
Homolicorina	45.94	41.31	40.67	31.56
<i>Para-orto</i>				
Galantamina	0.18	0.27	0.21	-
<i>Para-para</i>				
Haemantamina	10.77	24.30	29.19	41.10
Montanina	0.48	1.39	1.41	1.07
Narciclasina	0.75	1.03	0.71	4.32
Tazetina	21.48	6.48	7.78	5.52
Misceláneos	2.15	1.87	1.36	0.57
No identificados	9.92	6.28	3.95	3.27

Investigaciones recientes realizadas en el género *Rhodophiala* reportan la presencia de 37 alcaloides conocidos y 40 no identificados, en especies recolectadas diferentes puntos geográficos de Chile (Tallini et al, 2018). En dicho estudio se reporta que los alcaloides tipo licorina y haemantamina, predominan en un 70 % en las especies de *Rhodophiala*, confirmando de esta manera los resultados encontrados en este trabajo para *Rhodophiala pratensis*. Sin embargo, hay que decir que en el estudio de Tallini y colaboradores, las muestras de *Rhodophiala* fueron colectadas en los Arcos de Calan (Maule), Nevado de Chillán, Las Trancas, Malalcahuello, Volcán Lonquimay, y Sierra

Nevada exclusivamente en zonas cordilleranas. Por otro lado, Lizama-Bizama et al, 2018, analizaron muestras de diferentes especies de *Rhodophiala* colectadas en Atacama (Huasco), Antuco (Bio Bío) y playa Colmuyao (Bio Bío). Ellos reportaron la presencia de alcaloides derivados de licorina, crinina, galantamina, homolicorina, tazetina y montanina. Entre ellos, se observó un predominio de los derivados de crinina y montanina, aunque no se precisa de la identificación de los alcaloides específicos.



Las muestras analizadas en nuestro estudio fueron obtenidas en la VIII región del Bio Bío en zonas costeras en los meses de septiembre. En términos generales, el tipo de alcaloides mayoritarios coinciden en ambos estudios. La principal diferencia observada está dada por la presencia de dos alcaloides derivados haemantamina, maritidina y 6-hidroxyhaemantamina los cuales no habían sido reportados en *Rhodophiala* Chilenas.

1.3.2. Alcaloides identificados en *Rhodolirium speciosum*

En las muestras de bulbos de *Rhodolirium speciosum* colectadas para este estudio, se encontró que los alcaloides derivados de licorina predominan en la fracción alcaloidea, al igual que lo encontrado para las otras especies, logrando identificar 15 alcaloides de un total de 25, quedando 10 de ellos como no identificados, los cuales representan un 87.64 % del porcentaje relativo del contenido de alcaloides totales (Tabla 1.3), lo que sugiere que *Rhodolirium speciosum* podrían tener un elevado potencial en la búsqueda de nuevos alcaloides de Amaryllidaceae. Los alcaloides tipo galantamina se detectaron en esta especie, al igual que en las otras plantas de Amaryllidaceae Chilenas contempladas en este trabajo, destacando los alcaloides de *Rhodolirium speciosum*, ya que el porcentaje de alcaloides tipo galantamina, está representado por galantamina, mientras que en las otras especies predominan los derivados de este alcaloide. Los alcaloides identificados en esta especie se describen en la tabla 2.1 del anexo 2.

Tabla 1.3. Alcaloides presentes en la fracción alcaloidea de bulbos de las especies en estudio. Fuente: Elaboración propia.

Tipo de alcaloide	% relativo de la fracción de alcaloides (% p/p)			
	<i>Rhodophiala pratensis</i>	<i>Rhodolirium speciosum</i>	<i>Phycella australis</i>	<i>Phaedranassa lehmannii</i>
Orto-para				
Licorina	17.05	12.15	16.28	87.32
Homolicorina	41.31	-	39.42	-
Para-orto				
Galantamina	0.27	0.09	0.05	4.53
Para-para				
Haemantamina	24.30	0.08	34.36	8.15
Montanina	1.39	-	0.33	-
Narciclasina	1.03	0.04	0.56	-
Tazetina	6.48	-	6.26	-
Misceláneos	1.87	-	1.37	-
No identificados	6.28	87.64	1.37	-

Por otro lado, plantas del género *Rhodolirium* nativas de Chile han sido estudiadas recientemente, determinándose la presencia de 13 alcaloides típicos de la familia Amaryllidaceae (Moraga-Nicolás et al, 2018). Estas muestras fueron colectadas en diciembre en el Parque Nacional Coguillio (sector cordillerano de los andes). En relación con nuestro estudio, la presencia de galantamina es común en las muestras, sin embargo, nosotros observamos que en las muestras de *Rhodolirium speciosum* colectadas en Santa Juana predominan los alcaloides derivados de licorina. Logramos identificar 15 alcaloides de un total de 25, quedando 10 de ellos como no

identificados. Por el contrario, en el trabajo de Moraga-Nicolás predominan los alcaloides tipo galantamina, tazettina y crinina. En efecto, la potente actividad inhibitoria *in vitro* de acetilcolinesterasa reportada por estos autores se relaciona con la presencia de los alcaloides galantamina, licoramina, 6 α -deoxy-tazettina y diacetato norpluvina, los cuales además *in silico* muestran una gran afinidad por la AChE de *Electrophorus electricus* (1C2B), lo que fue demostrado mediante docking en el sitio catalítico de su estructura cristalina.



1.3.3. Alcaloides identificados en *Phycella australis*

En la fracción alcaloidea de bulbos de *Phycella australis* se detectaron 27 alcaloides (Tabla 1.1), de los cuales, los alcaloides isoquinolinicos tipo licorina y homolicorina detectados en esta especie, provienen del acoplamiento fenol oxidativo *orto-para* de *O*-metilnorbelladina, siendo una ruta predominante para la producción de este tipo de alcaloides, representado por 16.28 % y 39.42 % respectivamente (Tabla 1.3). Los alcaloides tipo haemantamina detectados, provienen de una ciclación secundaria *para-para*,

representando el 34.36 % del contenido de alcaloides totales, siendo la especie con el mayor porcentaje de este tipo de alcaloides, integrado mayoritariamente por haemantamina. Los 27 alcaloides identificados se describen en la tabla 2.1 del anexo 2.

1.3.4. Alcaloides identificados en *Phaedranassa lehmannii*

Los resultados obtenidos en la identificación de alcaloides por CG/EM de la fracción alcaloidea de bulbos de *Phaedranassa lehmannii*, mostraron que en esta especie predominan los alcaloides provenientes del acoplamiento fenol oxidativo *orto-para* de *O*-metilnorbellaadina representados por un 87.32 % del porcentaje relativo de alcaloides totales, destacando la presencia de los alcaloides licorina y pseudolicorina (Tabla 1.3). Además, se detectaron los alcaloides galantamina y sanguinina, los cuales se conocen como potentes inhibidores de acetilcolinesterasa, e incluso Bastida y colaboradores reportan que sanguinina, presenta una actividad enzimática diez veces mayor que galantamina, por lo que podría ser un candidato a nuevo fármaco para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En *Phaedranassa lehmannii* se

identificaron 12 compuestos, lo cuales se describen en la tabla 2.1 del anexo 2.

En especies del género *Phaedranassa*, como es el caso de *Phaedranassa dubia* se han identificado siete alcaloides conocidos y un compuesto nuevo (Phaedranamina), reportándose resultados de actividad antiprotozoal *in vitro* (Osorio et al, 2010). Además, se ha determinado la relación entre la actividad neuroprotectora y la capacidad antioxidante de los alcaloides de *Phaedranassa lehmannii* en un modelo de excitotoxicidad de glutamato en neuronas corticales de rata (Cortes et al, 2018), reportando la presencia de 6 alcaloides, entre los que se destaca sanguinina y 8-*O*-demetilmaritidina, mientras que en la fracción alcaloidea de *Phaedranassa lehmannii* analizada en el presente trabajo, se identificaron 12 compuestos, predominando la presencia de licorina, pseudolicorina, hamayna y sanguinina.

1.4. CONCLUSIONES

- En el estudio de la composición de alcaloides de la especie *Rhodophiala pratensis* se encontró la presencia de 34 alcaloides, distribuidos en raíz, bulbos, tallo y hojas, detectándose entre 20 y 27 alcaloides en cada una de las fracciones alcaloideas, destacándose la presencia de compuestos cuyas estructuras se clasifican dentro de los alcaloides tipo licorina, homolicorina y haemantamina, los cuales son alcaloides característicos de la familia Amaryllidaceae. Además, se logró identificar de acuerdo a la ruta de biosíntesis, que los alcaloides se acumulan en diferentes partes de la planta. En los bulbos se acumulan mayoritariamente los alcaloides tipo licorina y homolicorina provenientes del acoplamiento fenol oxidativo *orto-para*, mientras que en las hojas predominan alcaloides tipo haemantamina del acoplamiento *para-para*.
- Los resultados encontrados en el estudio de la fracción alcaloidea de la especie *Rhodolirium speciosum* indican que la presencia de

alcaloides isoquinolinicos, característicos de la familia Amaryllidaceae predomina para los alcaloides de la serie de licorina, detectándose un total de 25 alcaloides, de los cuales se lograron identificar 15 compuestos conocidos y 10 no identificados, sugiriendo que esta especie sería una fuente de nuevos productos bioactivos de la familia Amaryllidaceae. Entre las especies de Amaryllidaceae Chilenas estudiadas, *Rhodolirium speciosum* es la única que contiene galantamina.



- En el análisis de la especie de Amaryllidaceae *Phycella australis* se lograron identificar 27 alcaloides, destacando la presencia del alcaloide haemantamina proveniente del acoplamiento fenol oxidativo *para-para*, el cual predomina en mayor porcentaje en esta especie, comparado con las cantidades reportadas para las otras especies estudiadas, lo que le confiere valor farmacológico.
- Finalmente, hemos obtenidos el perfil alcaloideo de la especie silvestre *Phaedranassa lehmannii* (Amarillidaceae) recolectada en Colombia, donde se identificaron los alcaloides licorina, pseudolicorina,

galantamina y sanguinina, siendo los más representativos del grupo de 12 alcaloides detectados en la fracción alcaloidea de bulbos de esta planta.



1.5. REFERENCIAS

- Acosta, K. (2013). Identificación de los alcaloides de *Stenomesson aurantiacum* (kunth) herb. *Tesis de magíster. Universidad de Barcelona*. 7-8.
- APGIII. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105-121.
- Baeza, C., Schrader, O., Escobar, I. (2006). Estudio del cariotipo en *Rhodophiala* aff. *advena* (Ker-Gawl.) Traub de la VIII Región de Chile. *Kurtziana*, 32, 45-51.
- Baeza, M., Mariaangel, C., Ruiz., E., Negritto, M. . (2009). El cariotipo fundamental en *Rhodolirium speciosum* (herb.) Ravenna y *R. andicola* (poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica*, 66, 99-102.
- Baeza, M., Ruiz, E., Negritto, M. (2007). El número cromosómico de *Phycella australis* Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica*, 64, 117-120.
- Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Pigni, N.B., de Andrade, J.P., Martínez, V., Codina, C., Viladomat, F. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. En D. Muñoz-Torrero (Ed.), *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences. Kerala, India: Transworld Research Network.*, 65-100.

- Bastida, J., Lavilla, R., Viladomat, F. (2006). Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In *The Alkaloids*; Cordell, G.A., Ed. Elsevier Inc. Amsterdam Elsevier Scientific Publishing: Amsterdam, The Netherlands., 63, 87-179.
- Berkov, S., Viladomat, F., Codina, C., Suárez, S., Ravelo, A., Bastida, J. (2012). GC/MS of Amaryllidaceous Galanthamine type alkaloids. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 1065-1073.
- Berkov, S., Georgieva, L., Kondakova, V., Viladomat, F., Bastida, J., Atanassov, A., Codina, C. (2013). The geographic isolation of *Leucojum aestivum* populations leads to divergation of alkaloids biosynthesis. *Biochem. Syst. Ecol.*, 46, 152-161.
- Berkov, S. B., J.; Sídjimova, B.; Viladomat, F.; Codina, C. (2011). Alkaloid diversity in *Galanthus elwessi* and *Galanthus nivalis*. *Chem. Biodivers.*, 8, 115–130.
- Bergoñón, S., (1994). Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Producción de galantamina por cultivos "in vitro" de *Narcissus confusus*. *Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona*. 66-68.
- Bozkurt-Sarikaya, B., Kaya, G.I., Onur, M.A., Bastida, J., Berkov, S and Unver-Somer, N. (2014). GC/MS Analysis of Amaryllidaceae alkaloids in *Galanthus gracilis*. *Chemistry of Natural Compounds.*, 50(3), 573-575.
- Cortes, N., Castañeda, C., Osorio, E.H., Cardona-Gomez, G.P., Osorio, E. (2018). Amaryllidaceae alkaloids as agents with protective effects against oxidative neural cell injury. *Life Sciences* 203, 54–65.

- Chase, M. W., Reveal, J.L., Fay, M.F. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 132-136.
- Duffield, A.M., Aplin, R.T., Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Murphy, C.F., Wildman, W.C. (1965). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXXII. A study of the fragmentation of some Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*, 87(21), 4902-4912.
- Giordani, R. B., Vieira, P.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., Souza, A.P., Bonorino, C., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T. (2011). Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, 72, 645-650.
- Goietsenoven, G. V., Andolfi, A.A., Lallemand, A.C., Lamoral-Theys, D., Gras, T., Abou-Donia, A., Dubois, J., Lefranc, F., Mathieu, V., Kornienko, A., Kiss, R., Evidente, A. (2010). Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products*, 73, 1223-1227.
- Goietsenoven, G. V., Mathieu, V.; Lefranc, F.; Kornienko, A.; Evidente, A.; Kiss, R. (2013). Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isobarbostyrils are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers. *Medicinal Research Reviews*, 33, 439-455.
- Ingrassia, L., Lefranc, F., Mathieu, V., Darro, F., Kiss, R. (2008). Amaryllidaceae isocarbostryril alkaloids and their derivatives as promising antitumor agents. *Transl. Oncol*, 1, 1-13.

- Ito, M., Kawamoto, A., Kita, Y., Yukawa, T., Kurita, S. (1999). Phylogenetic relationships of Amaryllidaceae based on matK sequence data. *Journal of Plant Research*, 112, 207-216.
- Kilgore, M.B. & Kutchan, T.M., (2016). The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochem*, 15, 317–337.
- Kitson, F. G., Larsen, B.S., McEwen, C.N. (1996). Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *A practical guide*. San Diego: Academic Press.
- Lamoral-Theys, D. A., A.; Van Goietsenoven, G.; Cimmino, A.; Le Calvé, B.; Wauthoz, N.; Mégalizzi, V.; Gras, T.; Bruyère, C.; Dubois, J.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Evidente, A. (2009). Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *J. Med. Chem.*, 52, 6244-6256.
- Longevialle, P., Smith, D.H., Burlingame, A.L., Fales, H.M., Highet, R.J. (1973). High-resolution mass spectrometry in molecular structure studies9V: The fragmentation of Amaryllis alkaloids in the crinine series. *Organic Mass Spectrometry*, 7, 401-415.
- McNulty, J. N., J.J.; Bastida, J.; Pandey, S.; Griffin, C. (2009). Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry*, 70, 913-919.
- Meerow, A. W., Fay, M.F., Guy, C.L., Li, Q-B., Zaman, F.Q., Chase, M.W. (1999). Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid rbcL and trnL-F sequence data. *Am. J. Bot.* 86, 86(1325-1345).

Meerow, A. W., Snijman, D.A. (2006). The never-ending story: multigene approaches to the phylogeny of Amaryllidaceae. *Aliso* 22, 355-366.

Moraga-Nicolás, F., Jara, C., Godoy, R., Iturriaga-Vásquez, P., Venturini, H., Quiroz, A., Becerra, J., Mutis, A., Hormazábal, E. (2018). *Rhodolirium andicola*: a new renewable source of alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity, a study from nature to molecular docking. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28, 34–43.

Osorio, E. J., Berkov, S., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F., Cabezas, F., Bastida, J. (2010). *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry Letters* 3, 161–163.

Pettit, G. R., Gaddamidi, V., Herald, D.L., Singh, S.B., Cragg, G.M., Schmidt, J.M. (1986). Antineoplastic agents, 120. *Pancreaticum littorale*. *Journal of Natural Products*, 46, 995-1002.

Pigni N. B. (2013) Biodiversidad y conservación de recursos fitogenéticos. Las Amarillidáceas como fuente de productos bioactivos. *Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona*. 25-32.

Ravenna, P. (2003). Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. *Botanica Australis*, 2, 1-21.

Rønsted, N., Symonds, M.R., Birkholm, T., Christensen, S.B., Meerow, A.W., Molander, M., Molgaard, P., Petersen, G., Rasmussen, N., van Staden, J., Stafford, G.I., Jäger, A.K. (2012). Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of Amaryllidaceae. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 182.

- Takos, A. M., Rook, F. (2013). Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *Int. J. Mol. Sci.*, *14*, 11713–11741.
- Tallini, L. R., Bastida, J., Cortes, N., Osorio, E.H., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G. (2018). Cholinesterase Inhibition Activity, Alkaloid Profiling and Molecular Docking of Chilean Rhodophiala (Amaryllidaceae). *Molecules* *23*, 1532.
- Tallini, L. R. (2018). Estudio de los alcaloides de las Amaryllidaceae como fuente de nuevas moléculas bioactivas. *Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona*. 27-34.
- Toriizuka, Y. K., E.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Ishiyama, A.; Otoguro, K.; Yamada, H.; Omura, S.; Takayama, H. (2008). New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *16*, 10182-10189.

Capítulo 2.

Producción de alcaloides por biotecnología vegetal



RESUMEN

Las plantas de *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum* y *Phycella australis*, pertenecientes al grupo de monocotiledóneas de la familia Amaryllidaceae, fueron recolectadas en diferentes regiones de Chile con el fin de establecer un método de micropropagación *in vitro* para cada especie, lográndose establecer un método para *Rhodophiala pratensis*, la cual se recolectó en la VIII región del Bío-Bío, conocida popularmente como ñañañuca. A pesar de tener gran potencial ornamental, por las características llamativas de sus flores, no hay estudios de micropropagación que contribuyan a la conservación e incremento de la producción de alcaloides isoquinolínicos en esta especie. El objetivo del siguiente trabajo fue establecer un protocolo de micropropagación *in vitro* para *Rhodophiala pratensis* en el cual se evaluó el efecto del ácido indolacético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones y combinaciones, además de evaluar si los bulbillos obtenidos *in vitro* producen los alcaloides característicos de Amaryllidaceae.

Los resultados encontrados, evidencian la formación de callos y bulbillos a partir de explantes de bulbos de *Rhodophiala pratensis*, resultando exitosa la presencia de alcaloides, ya que se lograron detectar por CG/EM entre 10 y 12 alcaloides tipo licorina. Por otro lado, la inducción de brotes, callos y bulbillos a partir de secciones de escamas obtenidos por la técnica “Twin scaling”, indicaron que las concentraciones 10 μM AIA y 10 μM BAP son las ideales para el cultivo de inducción, mientras que en el cultivo de multiplicación las concentraciones óptimas fueron 5 μM BAP y 16 μM 2,4-D. Finalmente el cultivo de regeneración, se logró con una combinación de 10 μM AIA, 5 μM BAP y 16 μM 2,4-D. El protocolo desarrollado podría ser el punto de partida para futuras estrategias de conservación y de mejoramiento genético de la especie, además de ser un método de producción de alcaloides isoquinolínicos, los cuales se caracterizan por su gran importancia farmacológica en el tratamiento de diferentes patologías como la enfermedad de Alzheimer.

2.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas sintetizan una gran variedad de compuestos químicos que presentan roles vitales en su fisiología, ecología e interacciones con el medio ambiente. Muchos de los compuestos son producidos en respuesta a estrés tanto biótico, como abiótico que sufren las plantas y por lo tanto muchos de estos compuestos, también llamados metabolitos secundarios, presentan actividades biológicas relevantes (Morales-Rubio et al, 2016; Pauwels et al, 2016).



Los metabolitos secundarios se producen típicamente a bajas concentraciones en tejidos específicos de las plantas a través de rutas biosintéticas complejas, resultando en una amplia variedad de estructuras con diferentes grados de complejidad (Oksman-Caldentey & Inze, 2004). Sin embargo, la complejidad estructural de los metabolitos secundarios activos hace que su síntesis sea imposible o económicamente poco viable. Esto contribuye a que

la fuente principal de los metabolitos sean las plantas (Bart, 2011; Rout et al, 2000).

La extracción de los metabolitos secundarios activos a partir de fuentes vegetales presenta varias limitantes, entre las que destacan (Bart, 2011; Ochoa-Villarreal et al, 2015; Rout et al, 2000).

- Grado de crecimiento lento de la planta.
- Baja concentración de las moléculas activas en el material vegetal.
- La mayoría de las plantas no han sido domesticadas, por lo que se deben recolectar de fuentes silvestres.
- Sobre explotación de las plantas silvestres y plantas en peligro de extinción.

Por lo tanto, es necesario buscar alternativas de producción de los metabolitos secundarios que sean a la vez altamente productivos y sustentables como la micropropagación *in vitro* (Dagla, 2012).

La técnica de micropropagación *in vitro* permite cultivar células, tejidos y órganos vegetales en medios sintéticos bajo condiciones asépticas y controladas de luz, temperatura y humedad. La totipotencialidad de la célula vegetal, permite el desarrollo *in vitro* de cultivos celulares y tejidos, siendo esta una herramienta importante para la agricultura y la industria farmacéutica. La micropropagación *in vitro* permite obtener plantas sanas, mejoramiento genético, conservación de especies, propagación de material vegetal y la producción de metabolitos secundarios, además de ser un prerrequisito de la ingeniería genética vegetal (Dagla, 2012; Hussain et al, 2012).



La micropropagación *in vitro* asegura que se tenga una buena disposición de plantas medicinales usando cantidades mínimas de espacio y tiempo (Prakash & Van Staden, 2007). Con ella se pueden realizar diferentes tipos de cultivos de tejidos y órganos de plantas como: cultivo de células, cultivo de brotes y cultivo de callos.

El cultivo de células vegetales es una alternativa atractiva al cultivo de la planta completa como fuente de metabolitos secundarios de alto valor. Las

células vegetales son biosintéticamente totipotenciales, lo que significa que cada célula en cultivo retiene la información genética completa y es por lo tanto capaz de producir todo el rango de compuestos químicos producidos por la planta madre. Las ventajas de esta tecnología por sobre la agricultura convencional se mencionan a continuación (Ramachandra-Rao & Ravishankar, 2002):

- Es independiente de variaciones estacionales y geográficas así como de los factores ambientales.
- Ofrece un sistema definido de producción, lo que asegura un suministro continuo de los productos, así como una calidad y rendimiento uniforme.
- Es posible producir nuevos compuestos que no se encuentran normalmente en la planta madre.
- Es independiente de interferencias políticas.
- Producción rápida.

Por estas razones la micropropagación *in vitro* de tejidos vegetales es una alternativa viable para la producción sustentable de metabolitos secundarios útiles para los seres humanos.

2.1.1. Importancia de la micropropagación *in vitro* en la producción de metabolitos secundarios.

La manipulación del ambiente de cultivo debe de ser efectiva en el incremento de la acumulación del metabolito de interés. La expresión de muchas rutas biosintéticas de metabolitos secundarios pueden ser alteradas por factores externos como niveles de nutrientes, factores de estrés y reguladores del crecimiento, los cuales son fáciles de manipular al hacer cambios en la composición del medio de cultivo. Entre los nutrientes que pueden ser manipulados están: niveles de azúcar, nitratos, fosfato, reguladores del crecimiento y adición de precursores (Ramachandra-Rao & Ravishankar, 2002).

La adición de precursores ha sido una estrategia popular para el incremento de la producción de metabolitos secundarios en la micropropagación *in vitro*. El concepto se basa en la idea de que cualquier compuesto, que es un intermediario de la ruta metabólica tiene buenas posibilidades de aumentar el rendimiento final del producto. La suplementación de precursores o compuestos intermediarios al medio de cultivo ha sido efectivo para aumentar la producción de los metabolitos secundarios en muchos casos (Ramachandra-Rao & Ravishankar, 2002).



Muchas plantas producen metabolitos secundarios como mecanismo de defensa contra el ataque de patógenos, por lo cual la producción de estos se puede ver reprimida en ausencia de una infección. Se ha encontrado que las plantas pueden producir las mismas respuestas que tienen contra los patógenos cuando se ponen en contacto con compuestos de origen patogénico conocidos como elicitores, los cuales son señales que promueven la formación de metabolitos secundarios, la mayoría de estos son de origen fúngico o bacteriano, o constituyen activadores inmunológicos como el metil-jasmonato (Pauwels et al, 2016).

2.1.2. Micropropagación del material vegetal

La propagación clonal de plantas mediante cultivo *in vitro* es llamada micropropagación. En esta se aprovecha de la habilidad natural que poseen las plantas para regenerarse, ya sea por embriogénesis u organogénesis. Mediante micropropagación se obtienen plantas genéticamente idénticas (clones) a partir de un fragmento (explante) de una planta madre. La micropropagación está conformada por varias etapas (Razdan, 2003; Roca & Mroginski, 1991):

- **Etapa 0:** Selección y preparación de la planta madre
- **Etapa I:** Iniciación y establecimiento de condiciones asépticas
- **Etapa II:** Multiplicación de brotes o rápida formación de embriones somáticos mediante un medio de cultivo
- **Etapa III:** Enraizamiento
- **Etapa IV:** Aclimatación

Actualmente la micropropagación tiene múltiples aplicaciones, como por ejemplo: Propagación masiva de plantas difíciles de propagar por otros métodos o en vía de extinción, clonación de individuos de características deseadas, obtención de plantas libres de virus, conservación de germoplasma, obtención de metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos, mejora genética de plantas, germinación de semillas y estudios fisiológicos.

Como se mencionó anteriormente esta técnica aprovecha la capacidad natural de las plantas para regenerarse, ya que a diferencia de los animales, tienen la capacidad de desdiferenciarse y posteriormente rediferenciarse en órganos o plantas nuevas. Esta característica se va perdiendo con el grado de diferenciación de las células, sin embargo la diferenciación puede ser revertida con determinadas condiciones de cultivo, como el tipo de regulador de crecimiento empleado (Razdan, 2003).

2.1.3. Micropropagación *in vitro* de especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae

Las especies de Amaryllidaceae pertenecientes al grupo de las monocotiledóneas, son consideradas como material de difícil manejo en la micropropagación *in vitro*, sin embargo en las últimas décadas las técnicas de micropropagación *in vitro* de monocotiledóneas han sido todo un éxito (Zaidi et al, 2000). La mayoría de los bulbos y cormos de las Amarilidáceas son de crecimiento lento, lo que las clasifica como especies de propagación natural lenta, siendo los bulbos y cormos responsables de la producción de flores, las cuales son cultivadas con fines ornamentales en diferentes países como Holanda, Reino Unido, Estados Unidos y Japón al igual que en muchos otros países. En América del sur, muchas de las especies endémicas se encuentran en peligro de extinción por la sobreexplotación y la expansión de la población humana. Ante estos problemas, la tecnología de cultivo de tejidos influye grandemente en la demanda de rápida multiplicación y la

propagación clonal de monocotiledóneas de crecimiento lento y en peligro de extinción (Pascual, 2007).

Como se mencionó anteriormente, las plantas de la familia Amaryllidaceae poseen una baja tasa de propagación natural (Santos et al, 1998), por lo que varios autores han propuesto técnicas de producción de plantas en mayor cantidad, en un período de tiempo menor. Angulo *et al.* 2003 demostraron que el sistema de micropropagación de *Cyrtanthus loddigesianus* y *C. speciosus* (Amaryllidaceae) a través de escamas gemelas constituye un eficiente sistema de micropropagación (Angulo et al, 2003).

2.1.4. Micropropagación *in vitro* de especies de Amaryllidaceae Chilenas.

Algunas de las especies de Amaryllidaceae Chilenas se han investigado, debido a su importancia en la floricultura. Algunos autores han propuesto métodos de rescate y multiplicación de plantas bulbosas nativas con valor comercial, proponiendo rescatar especies bulbosas nativas de la zona

mediterránea de Chile con problemas de conservación, estudiando su propagación y difundiendo métodos de multiplicación en forma vegetativa (Schiappacasse et al, 2003).

Seemann et al, 2004 en el marco del proyecto FIA “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento de especies de *Rhodophiala* Chilenas” se estableció que el número y longitud de brotes fue mayor en medio Murashige and Skoog (MS) completo independiente de la adición de reguladores de crecimiento en condiciones de incubación de 16 horas luz, 23°C y 3000 lux de luminancia. El medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa fue el más favorable para la formación de brotes, bulbos y mejorar la tasa de multiplicación, siendo ésta mayor en microbulbillos en los cuales se realizó una incisión en su base con un bisturí.

Otros autores señalan que al comparar el empleo del sistema de multiplicación en medio líquido con respecto al cultivo tradicional en medio semisólido se observó que los coeficientes de multiplicación fueron estadísticamente superiores en medio líquido. La adición de citoquininas no afectó significativamente la formación de nuevos brotes, pero se presentó una

tendencia a observar los mejores resultados en el medio adicionado con 2,2 μM de Metatopolina (MTP) (Seemann et al, 2005).

En cuanto a la prevención del pardeamiento, se ha reportado que la adición de 60 mg/L de cisteína al medio de cultivo, fue estadísticamente más eficiente en la prevención de la liberación de fenoles determinado mediante la visualización de coloración rojiza en el medio de cultivo. Mediante este tratamiento se alcanzó un valor promedio de 0,6 en la escala de apreciación visual de coloración del medio la cual fluctúa entre 0 y 2 (Seemann et al, 2004; Seemann et al, 2005).

Por otro lado, algunos autores reportan que para aumentar el peso de los bulbos de *Rhodophiala phycelloides* por micropropagación *in vitro*, resulta apropiado agregar sacarosa en concentración de 30 g/L a 90 g/L al medio MS suplementado con vitaminas y pH 5,7 (Barraza & Olate, 2002).

2.1.5. Producción de alcaloides en especies de Amaryllidaceae obtenidas por micropropagación *in vitro*.

Algunas investigaciones sobre el incremento de la producción de alcaloides isoquinolinicos en especies de Amaryllidaceae han sido realizadas, encontrándose que estudios desarrollados en plantas de la especie *Leucojum aestivum*, muestran que la producción de alcaloides característicos de Amaryllidaceae incrementa por la estimulación producida por los inductores metil jasmonato y ácido jasmónico (Ivanov et al, 2013). Además del metil jasmotano, se han empleado el ácido araquidónico (AA), ácido salicílico y quitosano, en estudios realizados en plantas de la especie *Narcissus confusus* (Colque et al, 2004). Así, la manipulación de las condiciones externas por medio de la administración de sustancias químicas afecta el metabolismo de la planta, lo cual estimula la producción de sus metabolitos secundarios, incluso excretándolos al medio de cultivo.

En la especie *Zephyranthes carinata* se ha reportado el efecto de los inductores químicos (ácido jasmónico y ácido araquidónico) durante la micropropagación *in vitro*, donde se evaluó el estímulo de estos compuestos en la producción endógena de metabolitos secundarios de interés como los alcaloides (Peralta, 2014).

2.1.6. Técnica de obtención de escamas gemelas “twin scaling” en la micropropagación de especies bulbosas



Uno de los métodos más utilizados en la obtención de explantes de plantas bulbosas es la técnica *Twin-Scale*, la cual permite la propagación y multiplicación de la especie a partir de pares de escamas gemelas provenientes de uno o varios bulbos. Lo anterior favorece un rápido crecimiento de las plantas disminuyendo la presión sobre poblaciones silvestres. El procedimiento general de cultivo por *Twin-Scale* consiste en realizar un corte transversal del bulbillo donde se utiliza la parte donde se encuentra la zona del tejido basal para realizar dos cortes longitudinales (Figura 2.1). A partir de esos cortes, se extraen de los segmentos 5 milímetros

de la placa basal los cuales son sembrados en orientación adaxial referente al medio de cultivo (Rice et al, 2011).

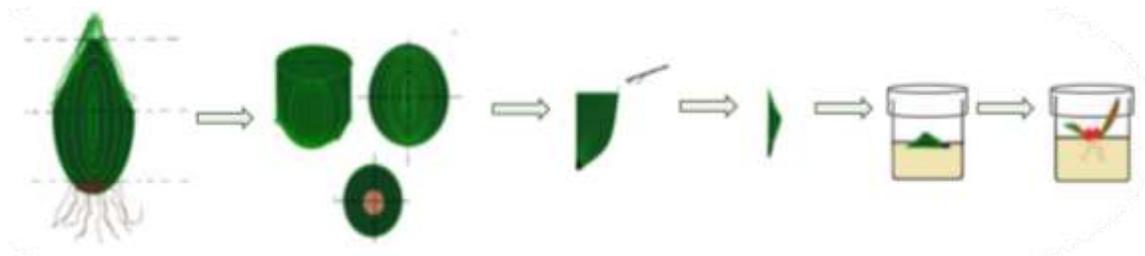


Figura 2.1. Procedimiento de obtención de escamas. Fuente: Tomado de Chamorro, 2016 (Chamorro, 2016).

2.1.7. Nutrientes en el medio de cultivo de micropropagación

Los medios de cultivo usados en micropropagación deben contener todos los nutrientes necesarios para que la planta sobreviva. Generalmente, el medio de cultivo se encuentra compuesto de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, una fuente de carbono, agua y un agente gelificante. La composición de sales minerales básicas que necesitan las plantas fue

propuesta por Murashige y Skoog (Murashige & Skoog, 1962) y es conocida universalmente como el medio MS. La fuente de carbono habitualmente empleada es la sacarosa, esta regula diferentes procesos en la planta como la tuberización, la regeneración de raíces adventicias y la maduración de embriones somáticos. El estado de solidificación del medio se regula mediante el uso de un agente gelificante, es importante regular este estado porque afecta la intensidad del intercambio gaseoso entre el explante y el medio ambiente, así como la disponibilidad del agua y los iones presentes en el medio, además proporciona el soporte para el posicionamiento del explante. Adicionalmente se debe tener un control sobre el pH, el cual debe ajustarse entre 5.5 y 6.0, pues es el pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de las plantas.

La respuesta de las células vegetales al medio puede ser de dos tipos: mediante organogénesis directa u organogénesis indirecta. La organogénesis directa consiste en la formación directa de los órganos, mientras que la organogénesis indirecta consiste en la formación de un callo, el cual es un conjunto de células indiferenciadas, que posteriormente puede generar órganos.

El medio de cultivo constituye un elemento fundamental para la micropropagación *in vitro* de células, tejidos, y desarrollo de embriones durante la organogénesis y la micropropagación. Existen respuestas diferentes de la planta a cada medio específico, lo cual pone de manifiesto los requisitos particulares nutricionales y hormonales de una especie vegetal determinada (González, 2001). Los minerales son esenciales para la vida de una planta y cumplen funciones específicas durante su desarrollo. En la tabla 2.1 se mencionan algunos elementos importantes para la nutrición de una planta (Kyte & Kleyn, 1996).



Los carbohidratos son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos; los más usados son: sacarosa, glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa, galactosa, manosa y lactosa; aunque se ha demostrado que la manosa al 3 % inhibe la inducción de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros de plantas de paraíso (*Melia azedarach* L.), mientras que la glucosa favorece la formación de estos (Bedoya & Ríos, 2010; Vila et al, 2003).

Tabla 2.1. Elementos esenciales para la nutrición de una planta y su importancia fisiológica. Fuente: Bedoya & Ríos, 2010.

Elemento	Importancia
Nitrógeno	Componente de proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, vitaminas y algunas coenzimas.
Potasio	Regula el potencial osmótico, y es el catión inorgánico principal.
Calcio	Componente integral de la pared celular, participa en el control de la permeabilidad y facilita el movimiento de carbohidratos y aminoácidos a través de la planta. Modula la acción de todas las hormonas vegetales, regulando la germinación, el crecimiento y la senescencia. El calcio citoplasmático se une a proteínas receptoras (calmodulinas), que al ser activadas pueden modificar enzimas constitutivas.
Magnesio	Cofactor enzimático, componente de la clorofila.
Fósforo	Interviene en la transferencia de energía, es componente de intermediarios en la respiración y fotosíntesis.
Azufre	Presente en varios aminoácidos y algunos cofactores; promueve el desarrollo de raíces y follaje verde.
Cloro	Estimula la fotosíntesis.
Hierro	Participa en la conversión de energía durante la fotosíntesis.
Manganeso	Cofactor enzimático.
Cobalto	Componente de varias vitaminas, permite la fijación de nitrógeno.
Cobre	Cofactor enzimático, interviene en reacciones de transferencia de electrones.
Zinc	Cofactor enzimático, involucrado en la biosíntesis de la clorofila.
Molibdeno	Cofactor enzimático, ayuda en la fijación de nitrógeno y su conversión a amonio.

Para obtener un mejor crecimiento de los tejidos vegetales, es importante adicionar al medio de cultivo una o más vitaminas y aminoácidos; la tiamina (vitamina B1) ha sido catalogada como ingrediente esencial; otras vitaminas como: piridoxina (vitamina B6), ácido nicotínico (vitamina B3) e inositol (nutrientes del complejo de la vitamina B), son empleadas para mejorar el

crecimiento del material vegetal en condiciones *in vitro*; glicina, arginina, asparagina, ácido aspártico, alanina, ácido glutámico, glutamina y prolina, son los aminoácidos más empleados. Además de los componentes antes mencionados, es necesario adicionar una o más hormonas de crecimiento, como auxina y citoquininas para inducir el crecimiento de los órganos y tejidos (Kyte & Kleyn, 1996).

El medio de cultivo puede ser líquido o tener un soporte sólido; entre las sustancias más utilizadas para proporcionar el soporte sólido, se encuentra el agar, el cual forma un complejo coloidal con poder de retención iónica débil, pero ofrece una aireación insuficiente que puede afectar el crecimiento de algunos tejidos; sin embargo, su composición es variable y en ocasiones mal definida, por lo cual puede aportar oligoelementos que actúan favorablemente en el crecimiento de los explantes (González, 2001).

Los resultados obtenidos por medio de micropropagación están influenciados por muchos factores, como las condiciones ambientales, el genotipo, el tipo de explante y los medios de cultivo. Por ello se debe tener un control de las condiciones ambientales como la luz y la temperatura, ya que este parámetro

influye directamente sobre la regulación del metabolismo primario o secundario de tejidos vegetales cultivados *in vitro*, debido a que influye en el desarrollo de los procesos fisiológicos. Se debe tener en cuenta la relación entre esta variable y eventos como la morfogénesis, la concentración y la acción de los reguladores de crecimiento (Palomares et al, 2003).

2.1.8. Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)



Las hormonas vegetales o fitohormonas son sustancias orgánicas producidas por la plantas que se encuentran a muy baja concentración, se sintetizan en un lugar determinado de la planta y se translocan hacia otras partes de la misma (Lluna, 2006); intervienen en la fisiología de la planta, modulando sus funciones, particularmente multiplicación y elongación de las células, la floración y el crecimiento (Bedoya & Ríos, 2010).

Los productos químicos sintéticos con actividades fisiológicas similares a las sustancias de crecimiento orgánicas, o compuestos que tienen una capacidad de modificar el crecimiento de plantas por algún otro medio, se denominan

usualmente reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Algunas de las sustancias de crecimiento natural se preparan sintéticamente o por medio de procesos de fermentación y se pueden adquirir de proveedores de productos químicos.

Las sustancias que intervienen en la regulación del crecimiento de las plantas actúan en forma conjunta, jerárquica y coordinada. La interacción entre la hormona y el receptor genera una cascada de eventos, como la activación o desactivación de proteínas de la membrana celular, el movimiento de calcio, cloro o potasio a través de proteínas transportadoras específicas, y cambios en el potencial de membrana y el pH en el citoplasma, así como en el medio externo. Estos procesos conforman una red de mensajes secundarios que amplifican la señal recibida y provocan una respuesta específica (Arratia, 2014). En general los reguladores se clasifican en cinco grupos: citoquininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Reyes, 2014).

En la micropropagación *in vitro*, los reguladores de crecimiento más importantes son las auxinas y las citoquininas; es necesario un balance adecuado entre éstas en el medio de cultivo, para la formación de plántulas a

partir de cualquier tejido vegetal. Dicho balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el tejido, las cuales dependen de la especie, del tipo y naturaleza del explante. En la práctica no es posible establecer una concentración particular para ser utilizada con todas las especies, esto se determina analizando la fisiología de cada planta (Pérez, 1998). A continuación se describen las características principales de las auxinas y las citoquininas:

- **Auxinas**



Generalmente estimulan o reprimen la expresión de los genes, producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias y usualmente embriogénesis somática (ES) en los cultivos en suspensión. Las auxinas: ácido 3-indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido 3-indolbutírico (AIB) o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Figura 2.2), se añaden frecuentemente a los medios nutritivos. El AIA se produce de forma natural en las plantas, las otras tres son sintéticas y relativamente más activas. La utilización del 2,4-D es efectivo para la inducción y crecimiento de callos; sin embargo, el uso

prolongado de 2,4-D para algunas especies es problemático debido a la inducción de la variación somaclonal o una fase de callo extensa (Von Arnold et al, 2002).

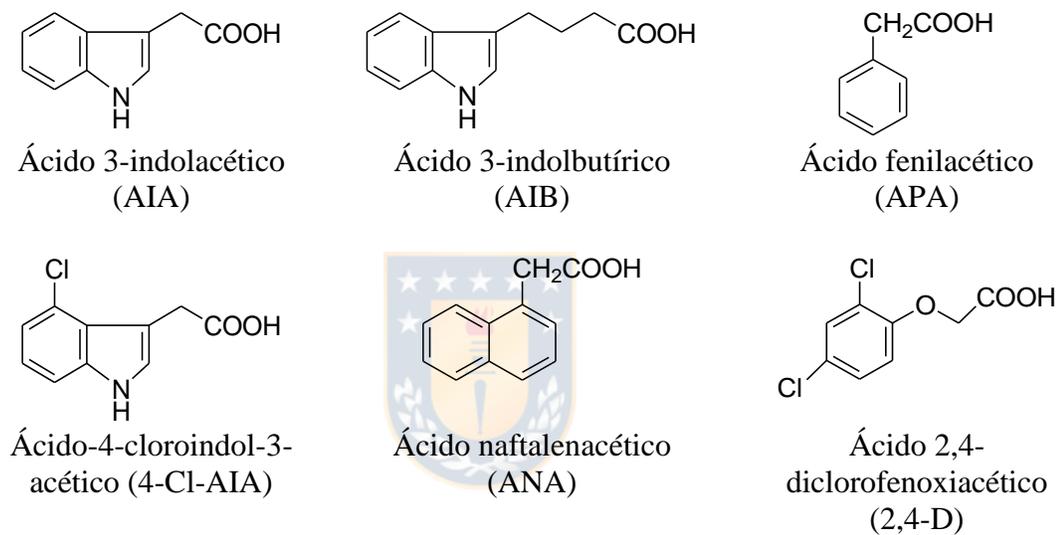


Figura 2.2. Auxinas usadas en micropropagación *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

Las auxinas naturales como el AIA se enlazan a un receptor de naturaleza proteica, formando un complejo receptor-hormona de carácter reversible, específico, con alta afinidad y saturable; este complejo activa un promotor que controla la expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas

que catalizan los compuestos de la pared celular. Durante la elongación celular inducida por la auxina se considera que actúan por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones ATPasa (subconjunto de enzimas que producen la desfosforilación del ATP) en la membrana plasmática y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas (Soberón et al, 2005). Aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las concentraciones más altas se localizan en las regiones meristemáticas, siendo éste el sitio de síntesis.



- **Citoquininas**

Son un grupo de fitohormonas naturales particularmente abundantes en los granos, frutas y raíces; participan en la regulación de la división celular e intervienen al igual que las auxinas, en el crecimiento y el desarrollo de las plántulas. Promueven la formación de yemas axiales, puesto que disminuyen la dominancia apical; están implicadas en la diferenciación de cloroplastos, el metabolismo de nutrientes y el retardo de la senescencia de las hojas (Werner et al, 2001).

Las citoquininas son derivados de la adenina, como la 6-bencilaminopurina (6-BAP), algunas de estas hormonas se han encontrado en forma natural en las plantas y otras como la kinetina son sintéticas (Figura 2.3) (Werner et al, 2001). Como derivan de una purina se unen a la cromatina del núcleo, presentando un efecto promotor en la transcripción y traducción del mensaje genético, estimulan el estado de transición del estado G2 en la mitosis, actúan en la traducción del ARN e incrementan la rapidez de síntesis de proteínas (Soberón et al, 2005).

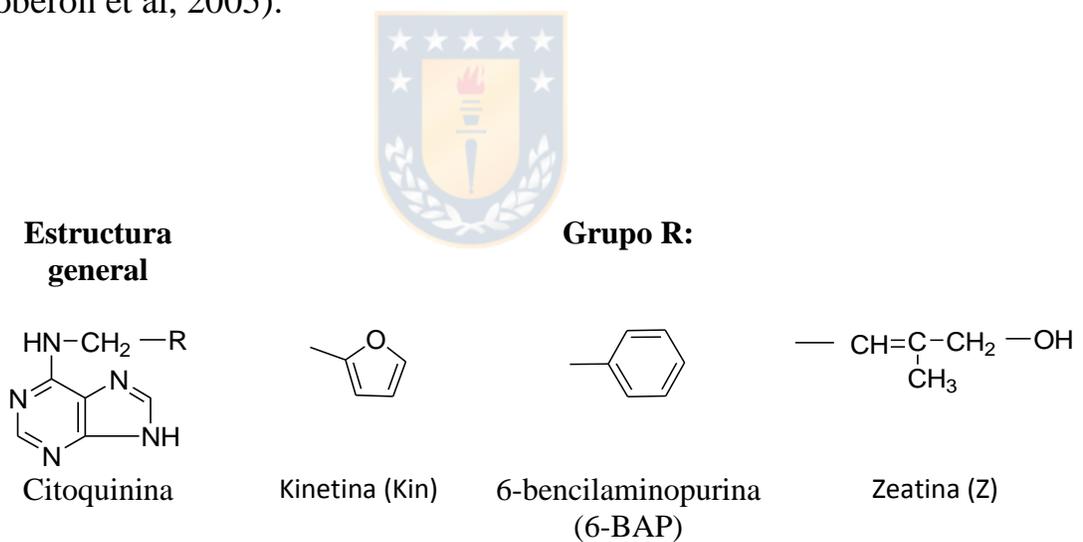


Figura 2.3. Citoquininas usadas en micropropagación *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La información sobre la recolección del material vegetal, el procedimiento de extracción de alcaloides y el método de identificación por CG/EM se describe en el capítulo 1 en la sección de materiales y métodos, apartado 1.2.

2.2.1. Protocolo de esterilización de bulbos silvestres



- Lavado con agua potable

De forma previa al tratamiento de esterilización, los bulbos se lavaron con agua potable mediante flujo continuo durante 2 o 3 minutos con el fin de disminuir las posibles trazas de contaminación en el material vegetal, colocándose los bulbos en un recipiente con agua destilada.

- **Esterilización de la superficie de los bulbos**

Tras la recolección y lavado con agua potable de los bulbos de *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum* y *Phycella australis* (2.5 cm de diámetro, 2.0 g de peso), se procedió a un lavado inicial con agua estéril y posteriormente se utilizó hipoclorito de sodio al 4 % como agentes esterilizante, para evitar contaminaciones provocadas por la presencia de microorganismos o esporas de hongos en la superficie de las mismas previo a su micropropagación *in vitro*. El proceso de esterilización de la superficie de los bulbos se realizó en condiciones asépticas en una cabina de flujo laminar y el instrumental utilizado se esterilizó mediante el uso de autoclave (121 °C, 1 atm. 20 min) y/o flameo (Cequier, 2011).

- **Lavado con etanol**

Este agente se usó en una disolución acuosa del 70 % (v/v). Los bulbos una vez lavados con agua potable, se sumergieron en dicha disolución durante aproximadamente 30 s.

- **Lavado con agua esterilizada**

Finalmente los bulbos se lavaron con agua esterilizada (3 veces), para su posterior manipulación en la obtención de las escamas.

2.2.2. Condiciones de propagación de bulbos de Amaryllidaceae

Tras la aplicación del protocolo de esterilización, las secciones de escamas de los bulbos se separaron dependiendo del diámetro de los bulbos, cortando longitudinalmente en 8 partes, obteniendo explantes de doble escama de 0.4 – 0.6 cm de ancho y 0.7 – 1.3 cm de largo unidos por un segmento delgado de la placa basal obteniendo 16 explantes de cada bulbo. Todos los explantes se cultivaron individualmente en placas de petri de 90 mm de diámetro que contenían aproximadamente 15 mL de medio de cultivo Murashige and Skoog (MS) (Tabla 2.2). Estas, fueron selladas con papel parafilm y depositadas en la cámara de cultivo bajo las condiciones de luz y temperatura descritas a continuación.

El período de luz en la cámara de cultivo tenía una duración de 12 horas, con una intensidad luminosa de $25 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Las condiciones de temperatura tuvieron un carácter constante, de forma que el material vegetal en la cámara de cultivo se encontraba a una temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad de 80 %.

- **Medidas de pH antes del autoclavado**

Las medidas de pH de los medios nutritivos utilizados en la micropropagación *in vitro* del material vegetal se realizaron con cintas indicadoras de pH. Los ajustes del pH de los medios nutritivos a un valor de 5.5 se realizaron con una disolución de NaOH 0.5 M, o con una disolución de HCl 1 M previo al autoclavado y antes de añadir el agar.

- **Esterilización del material y medios de cultivo**

La esterilización del instrumental y de los medios de cultivo utilizados se realizó en un autoclave (NÜVE, Turkey) en las condiciones estándar de 1 atm. de presión y 120°C , durante 20 min. Los cultivos se manipularon en

condiciones asépticas bajo una campana de flujo laminar (ESCO), previa esterilización con luz UV y etanol al 70 %.

Tabla 2.2. Medio de cultivo Murashige and Skoog (MS). Fuente: Tomado de Chamorro, 2016.

Macroelementos	
	mg/L
Nitrato de amonio	1.650
Nitrato de potasio	1.900
Sulfato de magnesio (anhidro)	180.700
Fosfato de potasio monobásico	170.00
Microelementos	
Ácido bórico	6.200
Sulfato de manganeso monohidratado	16.900
Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Molibdato de sodio dihidratado	0.250
Sulfato cúprico pentahidratado	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
Yoduro de potasio	0.830
Cloruro de calcio anhidro	332.200
EDTA disódico dihidratado	37.260
Sulfato ferroso heptahidratado	27.800
Vitaminas	
Acido nicotínico	0.500
Hidrocloruro de Piridoxina	0.500
Hidrocloruro de Tiamina	0.100
Glicina	2.000
<i>myo</i> -Inositol	100.000
Regulador de crecimiento	
BAP	
AIA	Diferentes concentraciones
2,4-D	
Fuente de carbón	
Sacarosa	30000
Agente gelificante	
Agar	9000
pH	5.5

2.2.3. Medio de cultivo para la inducción de brotes y callos

Los bulbos de las distintas especies de Amaryllidaceae empleadas en esta investigación fueron sembradas asépticamente en placas de petri de 90 mm de diámetro, que contenían aproximadamente 15 mL de medio nutritivo MS. A estos, se añadió sacarosa en una proporción del 3 % (p/v) y agar 9%, además de adicionar los reguladores de crecimiento ácido indolacético (IAA) y 6-bencilaminopurina (BAP). En el caso de *Rhodophiala pratensis* se probaron 5 combinaciones de IAA y BAP a diferentes concentraciones (Tabla 2.3), sembrando 16 explantes en cada experimento.

Tabla 2.3. Efectos de inductores de crecimiento en la micropropagación *in vitro* de *Rhodophiala pratensis*. Fuente: Elaboración propia.

Inductores de crecimiento	Cultivo de inducción					Cultivo de multiplicación					Regeneración <i>in vitro</i>		
IAA (μM)	10,0	15,0	10,0	10,0	20,0	-	-	-	-	-	10,0	-	10,0
BAP (μM)	5,0	5,0	10,0	15,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	10,0	5,0	5,0
2,4-D (μM)	-	-	-	-	-	9,0	12,0	14,0	16,0	18,0	-	16,0	16,0

2.2.4. Medios nutritivos para la formación de plántulas

Los explantes obtenidos asépticamente en la inducción de callos fueron subcultivados individualmente en frascos de cultivo (100 mL) con 40 mL de medio nutritivo sólido compuesto por el medio base MS suplementado con 3 % de sacarosa (p/v), conteniendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones (Tabla 2.3). Se probaron 5 combinaciones, cultivando 8 explantes por cada experimento.



2.2.5. Medios nutritivos empleados en la multiplicación y regeneración *in vitro* de la planta

La inducción de brotes (organogénesis) se realiza utilizando el medio base MS suplementado con sacarosa al 3 %. La estabilización de los explantes obtenidos, se realizó considerando las concentraciones óptimas de los reguladores de crecimiento empleados en la formación y multiplicación de los explantes (Tabla 2.3). Se seleccionaron tres combinaciones: cultivo

control C0 (10 μ M IAA/10 μ M BAP), cultivo C1 (16 μ M 2,4-D/10 μ M BAP) y cultivo C2 (16 μ M 2,4-D/10 μ M IAA/10 μ M BAP). En cada experimento se cultivaron 6 explantes por 8 semanas. Al final del periodo de cultivación, se liofilizaron y se extrajeron los metabolitos, evaluando el contenido de alcaloides isoquinolicos por CG/EM.



2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo están reflejados en el siguiente artículo científico:

Enviado a: *Phytochemical Analysis*



***In vitro* micropropagation and alkaloids of Chilean Amaryllidaceae
plants: *Rhodophiala pratensis***

Lina M. Trujillo-Chacón¹, Edgar R. Pastene-Navarrete¹, Carlos L.
Céspedes-Acuña², Luis Bustamante³, Marcelo Baeza⁴, Julio E. Alarcón-
Enos^{2*}

¹Laboratorio de Farmacognosia, Dpto. de Farmacia, Facultad de Farmacia,
P.O. Box 237, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

² Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales, Dpto. Ciencias Básicas, Universidad del Bio-Bio, Chillan, Chile.

³ Dpto. de análisis instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

⁴ Dpto. Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

*Corresponding author. Tel +56-42-2463156; fax: +56-42-2463046.

jualarcon@ubiobio.cl



Abstract

Plants of the family Amarillidaceae are of interest since they produce a particular type of alkaloids, some of which are used for the treatment of neurodegenerative diseases of the central nervous system, such as galanthamine. Given the low content of these secondary metabolites, it is necessary to study mechanisms to increase the productivity of these. In this work, a propagation protocol was developed for the *in vitro* cultivation of vegetative organs for these species. Gas chromatography-mass spectrometry

analysis (GC/MS) showed alternation in the alkaloids type ratio and number of compounds between wild bulbs, *in vitro* bulbs and callus. The results show the high biosynthetic potential of in vitro grown bulbs and callus tissue that are able to produce significant amounts of pharmacologically relevant alkaloids from *R. pratensis* in various proportions that depend on the culture conditions such as supplementation with growth substances. The *in vitro* grown bulbs produce an alkaloidal extract that contain a 52.6% w/w of alkaloids.



Keyword: Amaryllidaceae, acetylcholinesterase, isoquinoline alkaloids, micropropagation

2.3.1. Índice de contaminación de especies de Amaryllidaceae Chilenas

El estudio de las especies de Amaryllidaceae Chilenas *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum* y *Phycella australis* mostró que la micropropagación *in vitro* depende principalmente de la desinfección del material vegetal, por lo que las especies *Rhodolirium speciosum* y *Phycella australis* se retiraron del estudio de micropropagación por el alto nivel de contaminación de los explantes, donde se observó el desarrollo de micelio algodonoso, de color blanco, rosado y verdoso, producto del ataque de hongos. Además, se observó el ataque de bacterias, el cual se presentó como una masa mucilaginosa de individuos que formaron colonias. Se observaron también levaduras, las cuales se caracterizaron por formar sobre el tejido vegetal y el medio de cultivo una masa endurecida de color amarillo crema. La especie *Rhodophiala pratensis* se seleccionó debido a que presentó un índice de contaminación menor, el cual no afectó significativamente la micropropagación de esta especie.

2.3.2. Desinfección del material vegetal de *Rhodophiala pratensis*

Un aspecto crítico que se evaluó durante la observación del material vegetal en la micropropagación *in vitro* fue el proceso de desinfección del tejido, ya que en este paso se debe garantizar la inocuidad del explante, pero a su vez no matar las células meristemáticas, las cuales son las encargadas de la totipotencia de las plantas.



Los bulbos silvestres de *Rhodophiala pratensis* se recolectaron (Tabla 2.4), y se sometieron a un protocolo de limpieza y desinfección establecido por Cequier (Cequier, 2011). Donde se logró evaluar la efectividad sanitizante del hipoclorito de sodio comercial, encontrándose que para este tipo de plantas la concentración y el tiempo de exposición a este agente desinfectante es determinante, debido a la toxicidad que esta sustancia genera en tejido vegetal. El protocolo de desinfección aplicado brindó mejoras relevantes en la relación contaminación/respuesta, condiciones que se desconocían para la

especie *Rhodophiala pratensis*, indicando que la concentración óptima de hipoclorito es de 4%, con un tiempo de exposición de 10 minutos.

Tabla 2.4. Partes de la planta de *Rhodophiala pratensis* estudiadas y alcaloides obtenidos en los explantes de micropropagación *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

Especie	Ubicación	Numero de voucher	Parte de la planta	Número de alcaloides identificados en este estudio
<i>Rhodophiala pratensis</i>	Concepción. VIII región del Bio-Bío. Chile	Baeza 4340 (CONC)	Hojas	20
			Tallo	25
			Bulbos	27
			Raíz	26
Micropropagación <i>in vitro</i>			AIA/BAP	12
			AIA/BAP/2,4-D	10
			BAP/2,4-D	11

2.3.3. Cultivo de inducción de brotes y callos de *Rhodophiala pratensis*.

Para la obtención de brotes y callos de *Rhodophiala pratensis*, inicialmente se obtuvieron los explantes por la técnica “twin scales”, la cual requiere de gran destreza dado que se requiere cortar pequeños explantes en los cuales se garantice la presencia de células meristemáticas, necesarias para el desarrollo de nuevos tejidos en el explante.



Los explantes obtenidos se cultivaron en el medio de cultivo MS, enriquecido con las fitohormonas ácido indolacético (AIA) y 6-bencilaminopurina (BAP). Estos inductores de crecimiento, se evaluaron en cinco combinaciones de concentraciones diferentes como se muestra en la Figura 2.4, donde se cultivaron 16 explantes en cada uno de los experimentos, encontrándose resultados favorables en la formación de brotes y callos a las tres semanas de incubación, observando diferencias en el tipo de tejido formado. La combinación de la auxina AIA (10 μ M) y la citoquinina BAP (10 μ M) fue

seleccionada como la relación hormonal óptima para la obtención de la mayor cantidad de brotes en el cultivo de inducción.

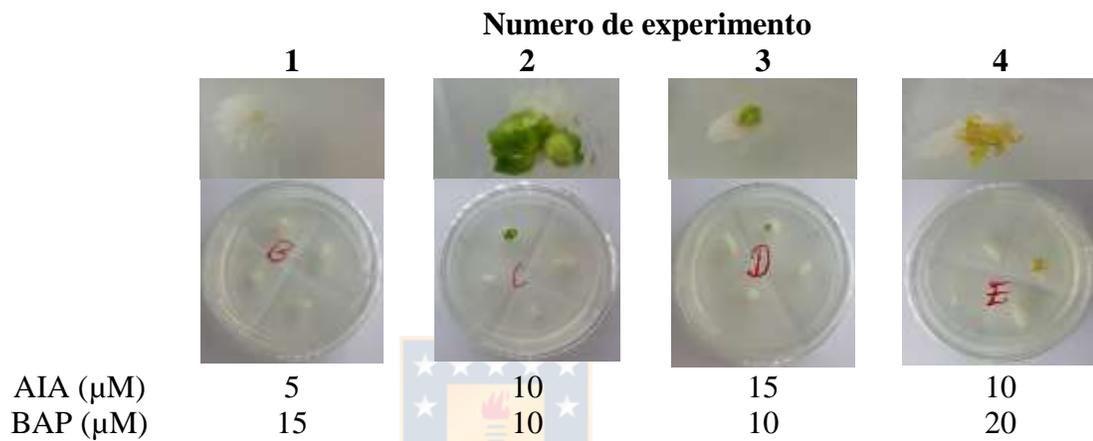


Figura 2.4. Cultivo de inducción. Efecto de inductores de crecimiento en micropropagación *in vitro* de *Rhodophiala pratensis*. Fuente: Fotografías tomadas por el autor.

2.3.4. Micropropagación *in vitro* de *Rhodophiala pratensis*.

En el estudio de micropropagación, se logró la obtención de plántulas a partir de los brotes generados en el cultivo de inducción, obteniendo un desarrollo organogénico, cuantificable como: callo, brote, hoja, microbulbillo y raíz. Para la obtención de los tejidos formados, los brotes se cultivaron en un medio MS enriquecido con los inductores de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (BAP), evaluando cinco combinaciones diferentes de 2,4-D y conservando fija la concentración de BAP. La mayor respuesta en la generación de plántulas se logró obtener con 16 μM de 2,4-D y 5 μM de BAP, generando plántulas con raíz, bulbillo y hojas como se observa en la figura 2.5 C.

Las plántulas obtenidas, se cultivaron en un medio de cultivo MS enriquecido con las hormonas AIA (10 μM), 2,4-D (16 μM) y BAP (5 μM), observándose un incremento en el número de microbulbillos generados en una plántula, produciéndose un total de 6 microbulbillos por plántula (Figura 2.5 D).

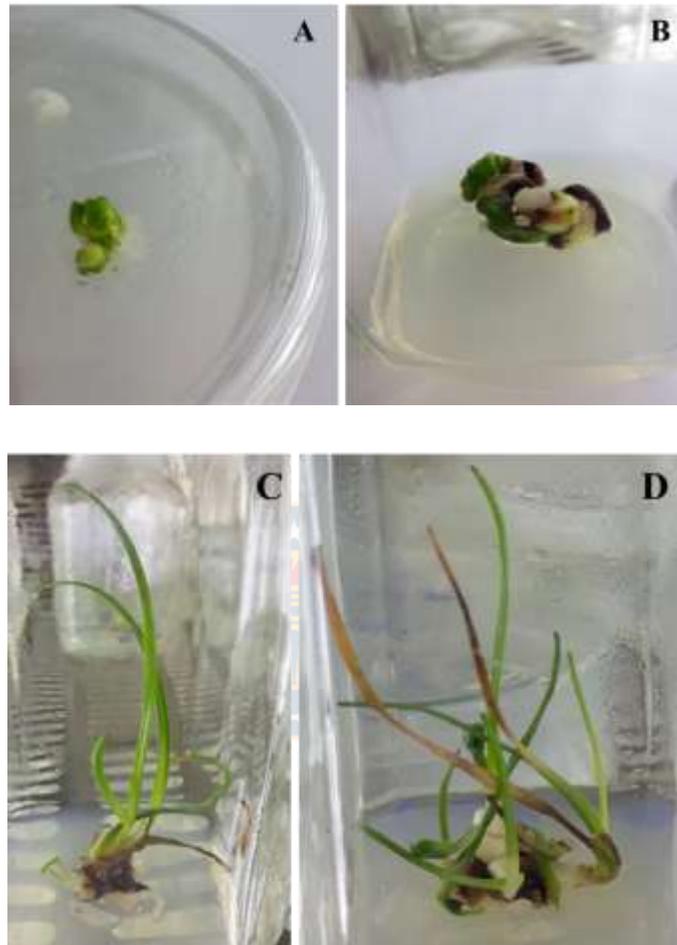


Figura 2.5. Micropropagación *in vitro* de *Rhodophiala pratensis*. **A.** Inducción de callos; **B.** Formación de brotes; **C.** Regeneración de la planta; **D.** multiplicación de la planta. Fuente: Fotografías tomadas por el autor.

2.3.5. Producción de alcaloides en la micropropagación *in vitro* de *Rhodophiala pratensis*.

Las plántulas obtenidas de los diferentes tratamientos hormonales fueron liofilizadas y extraídas, obteniéndose la fracción alcaloidea, la cual se analizó por CG/EM. La técnica de extracción y el método cromatográfico se detallan en el capítulo 1 (apartado 1.2).



En este análisis se observó que las plántulas obtenidas en los tratamientos presentan diferencias morfológicas, lo que indica que la combinación hormonal influye tanto en la forma de los diferentes tejidos de la plántula, como en el contenido de metabolitos (Figura 2.6).

En la identificación de alcaloides por CG/EM de las fracciones alcaloideas de cada una de las plantulas, obtenidas mediante micropropagación *in vitro* con diferentes tratamientos de inductores de crecimiento, se observó que la presencia de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo influye

positivamente en el contenido de alcaloides, ya que se lograron identificar entre 10 y 12 alcaloides isoquinolinicos caracteristicos de la familia Amaryllidaceae como se mencionó anteriormente en la tabla 2.4 del apartado 2.3.1.

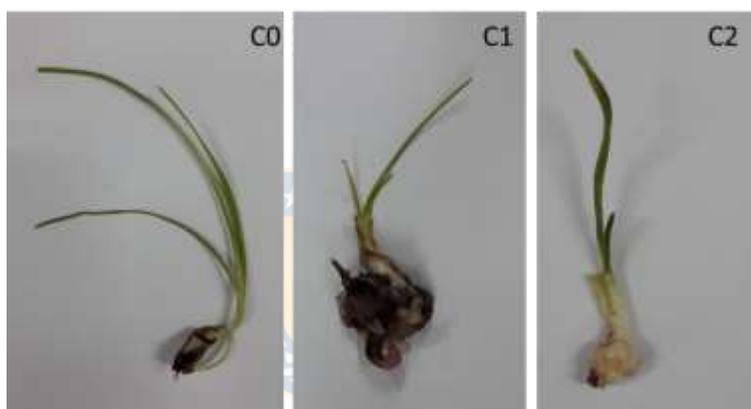


Figura 2.6. Efecto de diferentes combinaciones de inductores de crecimiento en la producción de alcaloides. **C0.** Cultivo control (10 μ M IAA / 10 μ M BAP); **C1.** Cultivo con 16 μ M 2,4-D / 10 μ M BAP; **C2.** 16 μ M 2,4-D / 10 μ M IAA / 10 μ M BAP. Fuente: Fotografías tomadas por el autor.

Los alcaloides detectados en la fracción alcaloidea de las plantulas obtenidas en los diferentes tratamientos, muestran que el tipo de alcaloides presentes

en las muestras corresponden mayoritariamente a alcaloides provenientes del acoplamiento fenol oxidativo *orto-para* de 4-*O*-metilnorbelladina y de la ciclación secundaria *para-para* de este precursor, encontrándose los alcaloides tipo licorina, homolicorina, haemantamina, tazetina y narciclasina (Figura 2.7).

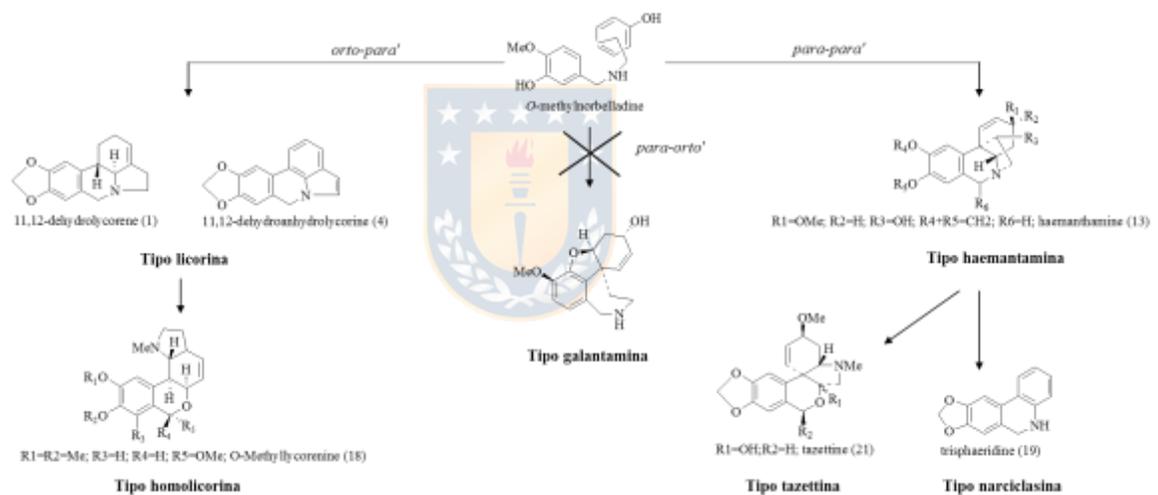


Figura 2.7. Estructura de alcaloides presentes en las plántulas de *Rhodophiala pratensis*. Fuente: Elaboración propia.

Los alcaloides tipo licorina, homolicorina y haemantamina predominan en las plantulas obtenidas en los cultivos enriquecidos con las fitohormonas

AIA/BAP y BAP/2,4-D, demostrando que la producción de alcaloides se ve alterada con la presencia de las tres hormonas en un mismo medio de cultivo, como es el caso de la combinación AIA/BAP/2,4-D, donde los alcaloides tipo haemantamina están ausentes, mientras que los tipo homolicorina y licorina se sintetizan en bajas cantidades, comparado con los otros tratamientos (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Tipo de alcaloides presentes en la fracción alcaloidea de *Rhodophiala pratensis*. Fuente: Elaboración propia.

Tipo de alcaloide	% relativo de la fracción de alcaloides (%, p/p)			
	Bulbo silvestre	Micropropagación <i>in vitro</i>		
		AIA/BAP	AIA/BAP/2,4- D	BAP/2,4-D
Orto-para	58.36	3.10	0.37	2.35
Licorina	17.05	0.76	0.37	0.83
Homolicorina	41.31	2.34	-	1.52
Para-orto	0.27			
Galantamina	0.27	-	-	-
Para-para	33.20	3.36	0.42	3.67
Haemantamina	24.30	0.22	-	2,94
Montanina	1.39	-	-	-
Narciclasina	1.03	2.63	0.42	0.73
Tazetina	6.48	0.51	-	-
Misceláneos	1.87	0.40	0.75	0.59
No identificados	6.28	93.16	98.28	93.38

Alcaloides tipo tazetina fueron encontrados en la fracción alcaloidea de las plantulas obtenidas por micropropagación *in vitro* con la combinación hormonal de AIA/BAP, confirmando que la presencia de estos inductores de crecimiento, estimulación de la ruta de biosíntesis de alcaloides generados por el acoplamiento de ciclación secundaria *para-para* de 4-*O*-metilnorbelladina. Los alcaloides no identificados corresponden mayoritariamente a compuestos derivados de alcaloides tipo licorina como se muestra en la tabla 2.2 del Anexo 2.



En la figura 2.8 se muestra la diferencia en la intensidad de los picos de los alcaloides detectados en cada una de las fracciones estudiadas, donde se observa que en el cromatograma C, correspondiente a la combinación hormonal AIA/BAP/2,4-D la presencia del alcaloides número 32 perteneciente a un alcaloides tipo licorina no identificado, solo está presente en esta muestra, indicando que la producción de alcaloides esta mediada por la presencia del tipo de auxina o citoquinina en el medio nutritivo de la planta.



Figura 2.8. Análisis por CG/EM de alcaloides de *Rhodophiala pratensis* obtenida por micropropagación *in vitro*. **B).** AIA/BAP, **C).** AIA/BAP/2,4-D, **D).** BAP/2,4-D. **1).** 11,12-dihidrolicoreno, **4).** 11,12-dihidroanhidrolicorina, **13).** haemantamina, **18).** *O*-metil licorenina, **19).** trisfaeridina, **21).** tazetina, **27).** 9-Octadecenamide, **28).** alcaloide tipo nerinina, **29).** alcaloide no identificado, **30).** alcaloide tipo tazetina, **31).** alcaloide tipo homolicorina, **32).** alcaloide tipo licorina y **33).** alcaloide tipo homolicorina. IS: estándar interno (Codeína). Fuente: Elaboración propia.

2.4. CONCLUSIONES

- Se determinó que la contaminación de los explantes obtenidos a partir de bulbos silvestres de las especies de Amaryllidaceae Chilenas *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum* y *Phycella australis* es un punto crítico en la micropropagación de estas plantas, debido al elevado índice de contaminación, lográndose establecer un método de esterilización para *Rhodophiala pratensis*, donde se encontró que las escamas internas de la placa basal del bulbo presentan el tejido con mayor totipotencia y menor contaminación.
- Se encontró que la presencia de los reguladores de crecimiento AIA, BAP y 2,4-D en el medio nutritivo MS influye positivamente en la inducción y formación de brotes, callos, microbulbillos y plántulas mediante micropropagación *in vitro* de *Rhodophiala pratensis*.

- En el estudio del efecto de la presencia de las fitohormonas AIA y BAP en la micropropagación *in vitro*, se encontró que la combinación hormonal AIA (10 μM)/BAP (10 μM) es la ideal para la inducción de brotes de *Rhodophiala pratensis*.
- Se logró obtener la mejor combinación hormonal para la formación y multiplicación de microbulbillos y plántulas de *Rhodophiala pratensis*, donde la combinación de BAP (5 μM)/2,4-D (16 μM) es la óptima para lograr la regeneración de la plantas, mientras que la presencia de AIA (10 μM)/BAP (5 μM)/ 2,4-D (16 μM) incrementa el número de plántulas.
- En el análisis por CG/EM de los alcaloides presentes en las plántulas obtenidas mediante micropropagación *in vitro* con diferentes tratamientos hormonales, se encontró que las plántulas producen entre 10 y 12 alcaloides, los cuales están presente de igual manera en la planta silvestre.

- Se obtuvo plántulas productoras de alcaloides isoquinolínicos característicos de la familia Amaryllidaceae, destacando la presencia de los alcaloides tipo licorina, homolicorina, haemantamina, tazetina y narciclasina, los cuales se caracterizan por su importante actividad biológica.



2.5. REFERENCIAS

- Angulo, M., Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. Y Codina, C. (2003). In vitro production of bulblets of *Cyrtanthus loddigesianus* and *Cyrtanthus speciosus*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78 (4), 441 – 446.
- Arratia, R. G. (2014). Efecto del ácido giberélico, kinetina y benciladenina en la morfogénesis in vitro de *Eustoma Exaltatum*. *Tesis de pregrado. Universidad Politécnica de Puebla.*, 97.
- Barraza, C., Olate, E. (2002). Efecto de la concentración de sacarosa en el peso de bulbos de *Rhodophiala phycelloides* en cultivo *in vitro.*, *Simiente* 72 (3-4), 128.
- Bart, H. J. (2011). Extraction of Natural Products from Plants- An Introduction. *En H.-J. Bart, & S. Pilz, Industrial Scale Natural Products Extractions*, 1-25.
- Bedoya, C., Ríos, A.M. (2010). Inducción de la embriogénesis somática en *Crinum x powellii* “album” (Amaryllidaceae). *Tesis de pregrado. Universidad Tecnológica de Pereira.*
- Cequier, E. (2011). Biotecnología de género *Echium*: aplicación para la producción de ácidos grasos de interés en medicina, acuicultura y nutrición *Tesis de Doctorado. Universidad de la Laguna* 36-45.

- 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*, 170 (12), 1180-1188.
- Chamorro, D. A. (2016). Optimización de las condiciones in vitro para la producción de alcaloides a partir de plántulas de *Zephyranthes carinata* (Amaryllidaceae). *Universidad Icesi*.
- Dagla, H. R. (2012). Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects. *Resonance*, 17(8), 759-767.
- González, S. S. (2001). Tema 5: Medios de cultivo. Facultad de biología., departamento de Biología Vegetal, Universidad de la Habana. Texto tomado de: <http://fbio.uh.cu/webfv/docencia/tema%205.doc>. Visita 25/12/18
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. En A. Leva, & L. M. Rinaldi, *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, 1-28.
- Ivanov, I., Georgiev, V., & Pavlov, A. (2013). Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. *Journal of Plant Physiology*, 170 (12), 1122-1129.
- Kyte, L., and Kleyn, J. (1996). Plants from test tubes. . *An introduction to Micropropagation. Tercera edición.*, 240.
- Lluna, R. (2006). Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. *Revista de Horticultura. Madrid*, 196, 22-26.

- Morales-Rubio, M. E., Espinosa-Leal, C., & Garza-Padrón, R.A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. *En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: OmniaScience., 351-410.*
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. . *Plant Physiology, 15*, 473-497.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Jang, M.O., Kim, I.S., Jin, Y.W., Lee, E.K. et al. . (2015). Cambial meristematic cells: A platform for the production of plant natural products. *New Biotechnology, 32(6)*, 581-587.
- Oksman-Caldentey, K.-M., & Inze, D. (2004). Plant cell factories in the postgenomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science, 9(9)*, 433-440.
- Palomares, M., Fernández, I., Andrade, H., Salgado, R. (2003). Influencia de espacios de crecimiento, temperaturas e intensidades de luz en la conservación *in vitro* de germoplasma de aguacate. . *Actas V Congreso Mundial del Aguacate*, 103-109.
- Pascual, E. P. (2007). Propagación *in vitro* de *Ismene amancaes* (R.&P.) Herbert "Amancay" (Amaryllidaceae). *Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor De San Marcos.*
- Pauwels, L., Inzé, D., & Goossens, A. (2016). Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Science, 14(2)*, 87-91.

- Peralta, L. A. (2014). Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de plantas del género *Zephyranthes* y evaluación de su producción de alcaloides. *Universidad ICESI*.
- Pérez, J. N. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. *Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba., 1*, 400.
- Prakash, S., & Van Staden, J. (2007). Micropropagation of *Hoslundia opposita* Vahl—a valuable medicinal plant. *South African Journal of Botany*, *73(1)*, 60-63.
- Ramachandra-Rao, S., & Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, *20(2)*, 101-153.
- Razdan, M. (2003). Introduction to Plant Tissue Culture. (Segunda edición). *Science Publishers*, 375.
- Reyes, M. J. E. (2014). Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de plantas de la familia *Amaryllidaceae*. *Tesis de pregrado. Universidad ICESI.* , 43.
- Rice, L. J., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2011). *In vitro* bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. *77*, 305-312.
- Roca, W., M. & Mroginski, L., A. (1991). Establecimiento de cultivos vegetales *in vitro* y Propagación clonal *in vitro*. En Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. *CIAT*, 19- 36, 95-117.

- Rout, G. R., Samantaray, S., & Das, P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18(2), 91-120.
- Santos, J., Santos, I. Y Salema, R. (1998). *In vitro* Production of bulbs of *Narcissus bulbocodium* flowering in the first season of growth. . *Scientia Horticulturae*, 76, 205 – 217.
- Schiappacasse, E., Peñailillo, P., Ynez, P. (2003). Propagación de bulbosas chilenas ornamentales. *EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA. Talca - Chile*, 128.666, 48-51.
- Seemann, P., Schiappacasse, F., Riegel, R., , Peñailillo, P., Muñoz, M., Jara, G., Vico, V. (2004). Informe de Avance Técnico y de Gestión N° 6 de Proyecto FIA “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala* chilenas”. *Valdivia, Chile.*, 58.
- Seemann, P., Schiappacasse, F., Riegel, R., , Peñailillo, P., Muñoz, M., Jara, G., Vico, V. (2005). Informe de Avance Técnico y de Gestión N° 7 de Proyecto FIA “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala* chilenas”. *Valdivia, Chile.*, 81.
- Soberón, J. R., Quiroga, E.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. (2005). Reguladores vegetales. Texto tomado de: http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/Reguladores_vegetales_2005.htm. Visita 28/12/2018.
- Vila, S. K., Rey, H.Y., Mroginski, L.A. . (2003). Influencia de carbohidratos sobre la embriogénesis somática y regeneración de plantas de Paraíso (*Melia azedarach* L.). *Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumn*, A-036.

- Von Arnold S., S. I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 233 – 249.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. . *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 98, 10487-10492.
- Zaidi, N., Habib Khan, N., Iqbal Zafar, S. (2000). Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants in vitro. *Quarterly Science Vision*, 6(1), 58 – 73.



Capítulo 3.

Alcaloides de Amaryllidaceae y la enfermedad de Alzheimer



RESUMEN

Las fracciones de alcaloides de bulbos de las especies de Amaryllidaceae *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* se analizaron por CG/EM como se mencionó en los capítulos anteriores, detectando la presencia de alcaloides tipo licorina, haemantamina, crinina, galantamina, homolicorina, montanina, narciclasina y tazettina. Los alcaloides de Amaryllidaceae mencionados se caracterizan por su amplio espectro de actividades biológicas, entre las que se destaca la capacidad neuroprotectora que algunos de ellos presentan, por lo que en este trabajo se evaluó el efecto neuroprotector de los alcaloides presentes en cada especie en diferentes modelos de neurotoxicidad, donde inicialmente se determinó la citotoxicidad de la fracción alcaloidea en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con el fin de determinar las concentraciones en las que la viabilidad celular no se ve alterada, encontrándose que el rango de concentraciones donde la citotoxicidad es inferior al 20 % está entre 0.375 y 3.0 µg/mL, definiendo este rango de

concentraciones como óptimas para la determinación de la actividad neuroprotectora de las fracciones alcaloideas en los modelos de neurotoxicidad inducida por rotenona/oligomicina y ácido okadaico en células SH-SY5Y, encontrando que los alcaloides de las especies *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* son los que presentan mayor respuesta de neuroprotección, por lo que se eligió la fracción alcaloidea de *Phycella australis* para ser estudiada en un modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) en cortes de hipocampo de ratón, observándose un efecto neuroprotector en concentraciones de 3.0 y 6.0 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, se estudió un modelo de neurotoxicidad con ácido okadaico en cortes de hipocampo de ratón, donde este inhibidor específico de la actividad de proteínas fosfatasas fue evaluado, determinando el efecto de la fracción alcaloidea de *Phycella australis* a una concentración de 6.0 $\mu\text{g/mL}$, la cual mostró una respuesta positiva de neuroprotección incluso mayor que la encontrada para el control positivo con melatonina. Por lo tanto los resultados encontrados en este trabajo, indican que los alcaloides de las especies Amaryllidaceae presentan efectos neuroprotectores, por lo que sería un potencial valioso para seguir siendo explorado.

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo crónico multifactorial, caracterizado por el deterioro irreversible de las funciones como la memoria, lenguaje y otras funciones cognitivas (Kumar & Singh, 2015; Selkoe, 1997). Después de los 65 años de edad, el riesgo de desarrollar la enfermedad se duplica cada 5 años y algunos estudios sugieren que alrededor de los 85 años, aproximadamente 50 % de los individuos desarrollan la enfermedad (Felsenstein et al, 2014). Mundialmente, un nuevo caso aparece cada siete segundos; la enfermedad se ha convertido en una lenta pandemia (Ferri et al, 2006) y para el año 2050 se espera que uno de cada 85 individuos sufra la EA (Brookmeyera et al, 2007).

Mundialmente, la prevalencia de la EA era de más de 35 millones de personas en el año 2010, con proyecciones de 65 millones para el año 2030 y 115

millones de personas afectadas por la enfermedad o desordenes relacionados para el año 2050. Este aumento desmedido en el número de pacientes es consecuencia directa del aumento de la esperanza de vida y edad promedio de la población mundial. La EA representa un problema social y financiero, no solo para el paciente y su familia, sino también para la sociedad entera (Goure et al, 2014).

Neuropatológicamente la EA está caracterizada por depósitos extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) llamados placas seniles, depósitos intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada (conocidos como ovillos neurofibrilares o NFTs), pérdida neuronal y sináptica (Figura 3.1). Además, estudios anatómicos en pacientes con EA han mostrado pérdida de materia blanca y una reducción específica de neuronas colinérgicas en el cerebro (Lombardo & Maskos, 2015). Estas evidencias han llevado a establecer varias hipótesis a fin de explicar la generación de esta enfermedad. Las más aceptadas son la hipótesis de la cascada amiloide, la de la proteína tau y la hipótesis colinérgica.

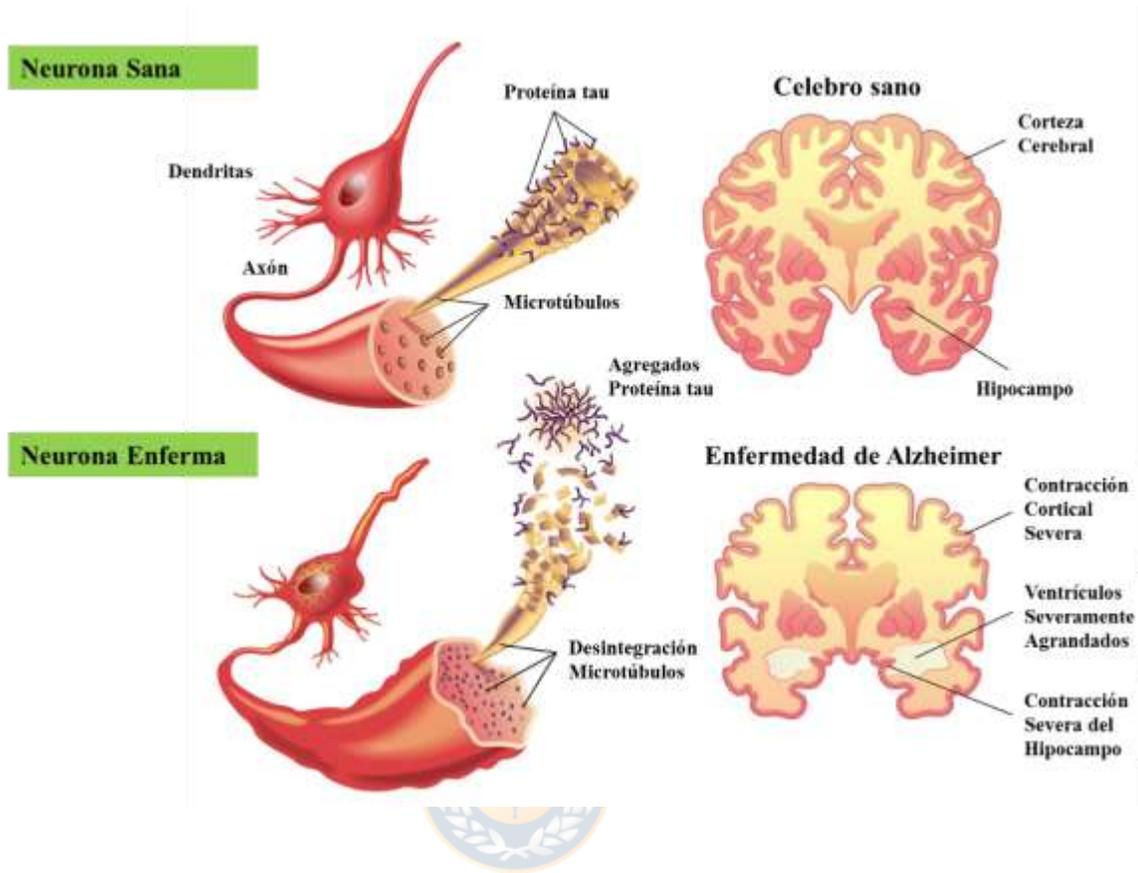


Figura 3.1. Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. Fuente: <http://sicotecnologia.com/ALZques.htm>.

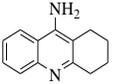
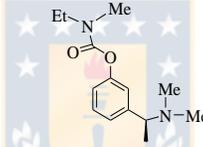
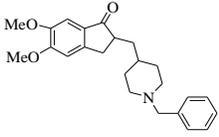
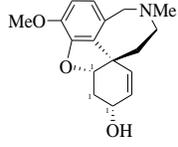
3.1.2. Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer

Los medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento de la EA se clasifican en dos grandes grupos, de acuerdo a su mecanismo de acción:

- Inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEi), entre los que encuentran: tacrina (Cognex®), donepezilo (Aricept®), galantamina (Razadina®, Reminyl®) y rivastigmina (Exelon®), siendo los primeros en ser aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) y comercializados para el tratamiento de la EA (Tabla 3.1). El primer AChEi comercializado, tacrina, se encuentra actualmente en desuso por su corta vida media, pero sobre todo por sus efectos hepatotóxicos (Davenport & Dennis, 2000).
- Antagonista no competitivo de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), memantina (Namenda®) posteriormente comercializado y aprobado por la FDA para el tratamiento de la EA (Tabla 3.1) (Dirnagl

et al, 1999). Memantina está indicada en las fases avanzadas de la enfermedad, mientras que los AChEi en los estadios leve-moderado (Auld et al, 2002).

Tabla 3.1. Fármacos aprobados por la FDA para la sintomatología de la enfermedad de Alzheimer. Fuente: Elaboración propia.

Fármacos				
Inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEi)				
	Tacrina: (Cognex®)	Rivastigmina: (Exelon®)	Donepezilo: (Aricept®)	Galantamina: (Reminyl®)
Glutamatérgico				
Memantina: (Clorhidrato de memantina)				

Es interesante destacar el hecho de que cada vez esté tomando más importancia la necesidad de utilizar combinación de fármacos, así como fármacos multidiana, que no sólo están dirigidos a corregir una diana, sino que intentan abordar más de una alteración (Kumar & Singh, 2015; Leon et

al, 2013; Persson et al, 2014). En ese sentido, cada vez son más los ensayos preclínicos y clínicos en los que se combinan fármacos para tratar la EA. Por ejemplo, la combinación de memantina con donepecilo para tratar la EA de moderada a severa (NCT00866060); la asociación de SB-742457 (un novedoso agonista de receptores 5-HT₆) con donepecilo, que ha mostrado resultados interesantes en un ensayo en fase II (Maher-Edwards et al, 2011) y la asociación de la vitamina E (como antioxidante) con memantina, que se encuentra en ensayo clínico en fase III (Dysken et al, 2014).

Sin embargo, otros candidatos farmacológicos dirigidos a diferentes estrategias terapéuticas están en desarrollo y muchos han progresado en los ensayos clínicos (Jia et al, 2013; Rafii et al, 2011; Zheng et al, 2015). La limitación en la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de la enfermedad obedece a las múltiples vías implicadas en la patogénesis, creando una dificultad sustancial para la producción de un tratamiento eficaz, reportándose que todos los fármacos anti-EA desarrollados desde 2003 fallaron (Anand et al, 2014). Las enfermedades complejas como el Alzheimer, están relacionadas con la alteración por diferentes vías y raramente son

causadas por la disfunción en un único gen o en una única vía de señalización (Zheng et al, 2015).

Pese a que durante los últimos 15-20 años se ha realizado un gran esfuerzo científico y económico por encontrar nuevos medicamentos para tratar esta devastadora enfermedad, lo cierto es que desde que se comercializó la memantina en el año 2007, aun no se ha aprobado ningún nuevo medicamento para la EA.



3.1.3. Importancia de galantamina en la enfermedad de Alzheimer

La galantamina como se mencionó anteriormente es comercializada con el nombre genérico de Remynil® para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La producción de galantamina en el ámbito farmacológico es generada a partir de especies de la familia Amaryllidaceae, siendo el alcaloide más importante de esta familia botánica. Su estructura fue determinada por primera vez a partir del alcaloide aislado de la planta *Galanthus woronowii* en la década de los 50 y fue aprobada por la FDA en

el 2001 para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer en sus grados de leve a moderado (Heinrich & Teoh, 2004; Maelicke et al, 2001). De manera general, se ha descrito la presencia de galantamina en plantas de diversos géneros de la familia Amaryllidaceae, incluyendo *Haemanthus*, *Lycoris*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Narcissus* y *Leucojum* (Berkov et al, 2009). A pesar de que se conoce su síntesis química, Janssen-Cilag - la empresa propietaria de la patente - siguió utilizando el producto natural para sus formas farmacéuticas y su demanda ha provocado un gran interés en la búsqueda de nuevas especies que sean altamente productoras de galantamina.

Curiosamente, una investigación publicada en 1996, reveló que el alcaloide sanguinina (9-*O*-demetilgalantamina) presenta una actividad inhibitoria de la AChE cerca de 10 veces mayor que galantamina, sin embargo, también expusieron que galantamina presenta una mejor permeabilidad para atravesar la barrera hematoencefálica que sanguinina (Bores et al, 1996). En estudios recientes, se ha mostrado que el compuesto 11 α -hidroxi-*O*-metilleucotamina presenta una concentración de inhibición de la AChE (EC₅₀ de 3.5 μ M) muy próxima a la galantamina (EC₅₀ de 1.5 μ M), aunque se desconoce su nivel de permeabilidad para pasar la barrera hematoencefálica (Iannello et al, 2014).

La galantamina presenta un mecanismo de acción dual, combinando la modulación alostérica de los receptores nicotínicos con la inhibición competitiva reversible de la AChE (Marco-Contelles et al, 2006; Mulder et al, 2005) (Figura 3.2). Adicional a los efectos colinérgicos, la galantamina posee propiedades antioxidantes, neuroprotectoras y acción antiapoptótica (Arias et al, 2004; Arias et al, 2005). Este alcaloide estimula la actividad colina acetiltransferasa y potencializa la liberación del neurotransmisor ACh, aumentando su concentración en las hendiduras sinápticas por unirse al sitio activo de la AChE evitando la degradación del neurotransmisor al mismo tiempo que interacciona alostéricamente con los nAChRs para potencializar la sensibilidad de los receptores de ACh, a fin de mejorar la cognición en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Tsvetkova et al, 2013; Woodruff-Pak & Wenk, 2001).

El bloqueo de AChE conduce a la estimulación de los receptores muscarínicos (mAChR) y a la disminución en la producción de β -amiloide ($A\beta$), reduciendo así la toxicidad. Galantamina a través de su positiva interacción con los receptores nicotínicos, proporciona una gran neuroprotección. La neurotoxicidad de $A\beta$ y glutamato, probablemente se

encuentre mediada por un incremento del proto-oncogen bcl-2 localizado en el cromosoma 18.

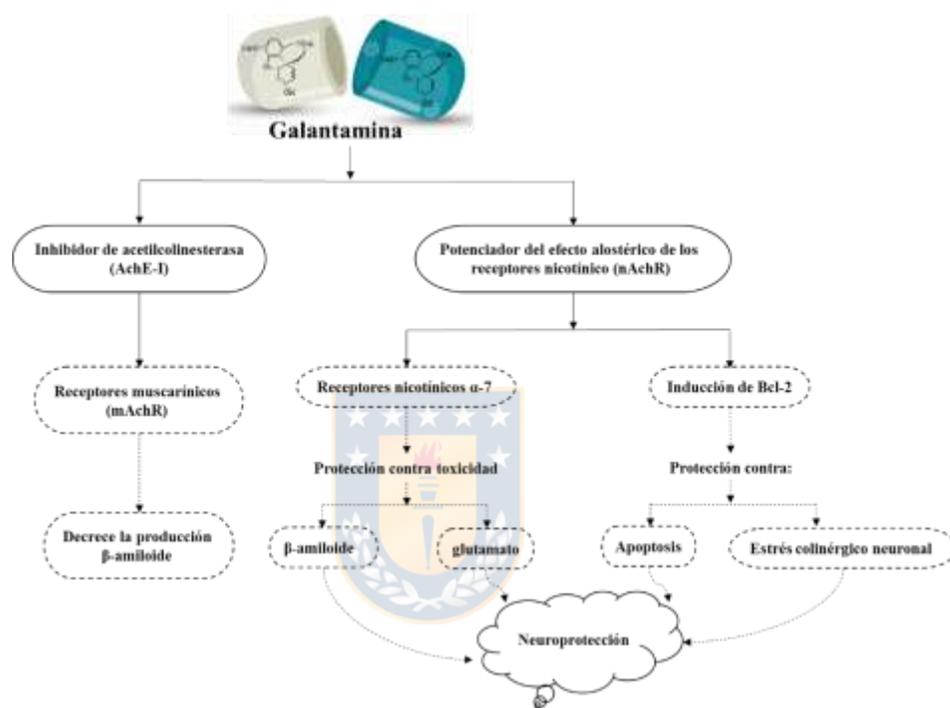


Figura 3.2. Esquema general del proceso de neuroprotección de galantamina, derivado de su modo de acción dual. Fuente: <http://tajdearobpharma.com/episodic-memory-recounts-the-memory-of-autobiographical-event-can-galantamine-help/>

3.1.4. Importancia de los productos naturales y el desarrollo de nuevos fármacos

Los productos naturales representan uno de los pilares básicos en el desarrollo de nuevos fármacos debido a su diversidad estructural y potencial biológico (Feher & Schmidt, 2013; Newman & Cragg, 2016). Entre 1940 y 2014, alrededor del 50% de las pequeñas moléculas aprobadas para el tratamiento del cáncer se desarrollaron directa o indirectamente a partir de productos naturales (Newman & Cragg, 2016), siendo la riqueza estructural de estos compuestos una guía inestimable en la investigación de nuevos medicamentos (Lee & Schneider, 2001).

Las plantas poseen una amplia influencia en la medicina tradicional y, en consecuencia, la búsqueda de especies utilizadas popularmente para el tratamiento de alguna enfermedad constituye una de las líneas más importantes para el desarrollo de nuevos fármacos (Harvey, 2000). Los alcaloides, metabolitos secundarios encontrados principalmente en las

plantas, juegan un papel crucial en el descubrimiento de nuevos fármacos debido a su diversidad estructural y su complejidad espacial (Newman & Cragg, 2016; Rodrigues et al, 2016; Stratton et al, 2015). En la medicina actual, diversos fármacos se desarrollaron en base a sus usos en la medicina popular, como por ejemplo la atropina, morfina y quinina (Verpoorte, 1998).

3.1.5. Línea celular SH-SY5Y como modelo biológico para la enfermedad de Alzheimer



Estudios para elucidar los mecanismos que relacionan la edad humana y algunas enfermedades asociadas a ella, usualmente presentan dificultades por la falta de un modelo que permita recrear los eventos que ocurren en la población humana. Sin embargo, las células SH-SY5Y son un tercer subclon obtenido del linaje parental SK-N-SH el cual fue establecido inicialmente de una biopsia de médula ósea de neuroblastoma de un paciente de sexo femenino. El neuroblastoma humano es uno de los tumores sólidos más comunes en niños y se cree que se origina a partir de las células de la cresta neural durante el desarrollo embrionario. Debido a su origen, estas células

presentan una importante plasticidad biológica (Ciccarone et al, 1989). El linaje parental SK-N-SH origina dos fenotipos morfológicos y bioquímicamente distintos: una forma no neuronal (tipo-S) unida a un substrato que lleva a un subclon SH-EP (como epitelial) y un linaje neuroblástico (tipo-N), que lleva a un subclon SH-SY5Y como neuroblasto.

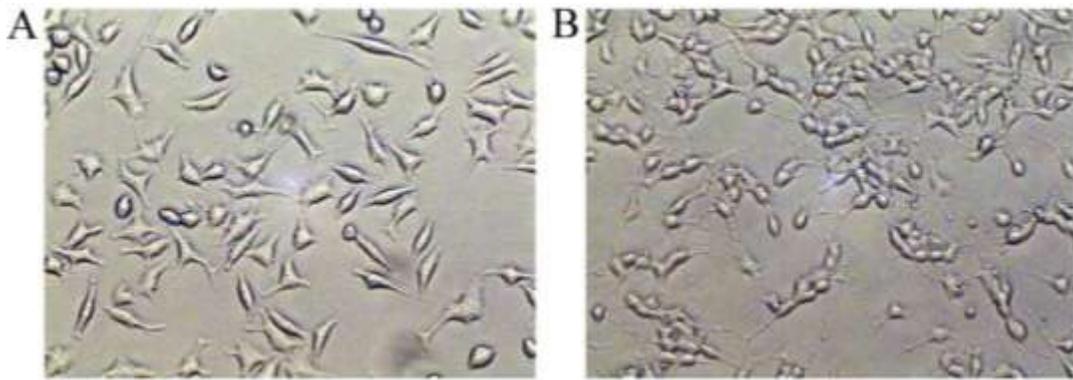


Figura 3.3. Diferenciación de células SH-SY5Y. (A) células no diferenciadas SH-SY5Y cultivadas en 10 % medio completo por 5 días. (B) células diferenciadas SH-SY5Y cultivadas en 1% de medio de cultivo con ácido retinoico (10 μ M) por 5 días. Fuente: Imagen tomada de Meng y colaboradores (Meng et al, 2018).

Entre las características más importantes de las células SH-SY5Y esta su capacidad para diferenciarse en un fenotipo neuronal funcionalmente maduro (Figura 3.3), además de expresar enzimas biosintéticas noradrenérgicas, receptoras del factor de crecimiento nervioso, opioide y muscarínico. Estas propiedades han hecho de estas células una herramienta importante y alternativa a las limitaciones experimentales causadas por la inhabilidad de las neuronas primarias de ser propagadas *in vitro* (Castillo, 2016; Yusuf et al, 2013).



Las células SH-SY5Y diferenciadas y no diferenciadas han sido utilizadas como modelo neuronal desde 1980 para evaluar enfermedades como Parkinson, Alzheimer, enfermedades de desarrollo neuronal, autismo, y metabolismo mitocondrial (Constantinescu et al, 2007). Sin embargo, existe controversia sobre la necesidad de diferenciar o no las células SH-SY5Y. Algunos estudios sugieren que la diferenciación confiere a las células SH-SY5Y una tolerancia mayor frente a los diferentes estímulos, y como consecuencia, no es posible evaluar con precisión los efectos de la neurotoxicidad o la neuroprotección. Las células SH-SY5Y indiferenciadas se vuelven apropiadas para estudiar la neurotoxicidad, la neuroprotección y

la neurodiferenciación, recreando por lo tanto eventos próximos a los sucedidos en el cerebro.

Por lo tanto, las ventajas de la línea celular SH-SY5Y tanto indiferenciadas como diferenciadas en los estudios de las enfermedades neurodegenerativas, se ha convertido en un modelo clásico en el descubrimiento de nuevos objetivos terapéuticos con grande significancia biológica y clínica.

Si bien se puede argumentar que aún no se comprende por completo la patología de la EA o los mecanismos internos, dentro de la línea celular SH-SY5Y, se encuentra presente la proteína Tau (Castillo, 2016).

3.1.6. Modelo biológicos de neuroprotección en la enfermedad de Alzheimer

- Neurotoxicidad inducida por ácido okadaico

El ácido okadaico (AO), es un políéter termoestable perteneciente a un grupo de toxinas liposolubles, extraído por primera vez de la esponja negra *Hallichondria okadaei*. El AO y sus análogos se consideran potentes inhibidores selectivos de las proteínas fosfatasas de serina y treonina (PP), principalmente de la tipo 1 (PP1) y 2A (PP2A). Estas fosfatasas son un grupo de enzimas que llevan a cabo la desfosforilación de numerosas proteínas, una función esencial para la mayoría de los procesos metabólicos en células eucariotas incluyendo el transporte y secreción en la membrana, contractilidad, división celular, replicación de ADN, diferenciación celular y oncogénesis entre otras. En estudios *in vitro*, se ha reportado que las proteínas Serina/Treonina fosfatasas (PP1 y PP2A) son capaces de defosforilar la proteína Tau (Figura 3.4) (Kamat et al, 2013).

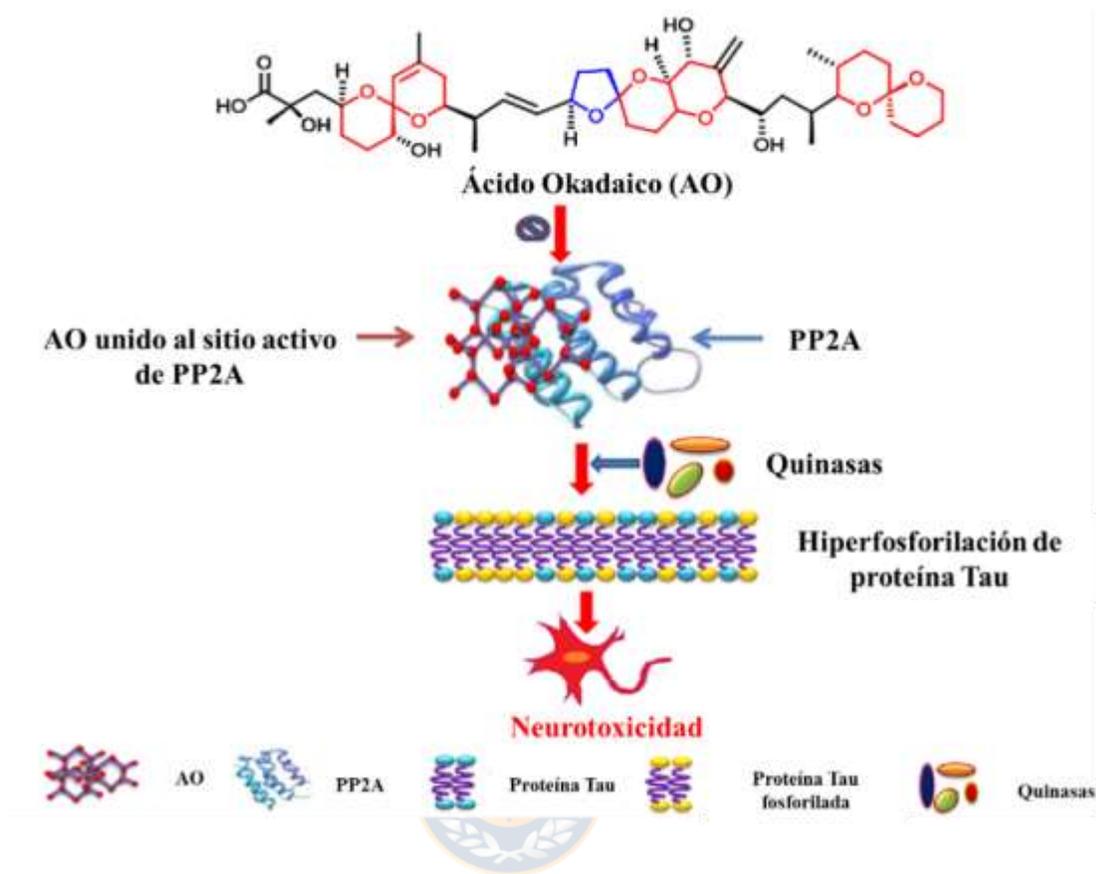


Figura 3.4. Estructura química y mecanismo de AO en la inducción de neurotoxicidad. El AO inhibe selectivamente las proteínas serina/treonina (Ser/Thr) fosfatasa 2A y de este modo induce hiperfosforilación de Tau por la activación de quinasas. Fuente: Kamat et al, 2014.

Aunque el AO causa neurotoxicidad por varias vías, el mecanismo de acción exacto aún no se conoce claramente. La activación de la mayoría de quinasas,

como Ser/Thr, MAPK, ERK, PKA, JNK, PKC, CaMKII, Calpain, y GSK3 β , en neuronas se encuentra asociado con la patología de la EA. Estas quinasas, asociadas con hiperfosforilación anormal de tau, indican que la cascada de estas quinasas podría estar exclusivamente involucrada en la patología de la EA (Figura 3.5). La actividad de la proteína serina/treonina fosfatasa necesita un amplio estudio ya que estas enzimas son potenciales objetivos para nuevas terapias con aplicaciones en muchas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades inflamatorias, y neurodegenerativas (Kamat et al, 2013).



La acción inhibitoria sobre PP1 y PP2A producida por el ácido okadaico se aprovecha para el estudio de patologías en las que se alteran procesos celulares que comprenden la fosforilación de proteínas. Las proteínas Tau son proteínas microtubulares que dan lugar a la formación de ovillos neurofibrilares que abundan en el interior de las neuronas siendo reflejo de la destrucción de microtúbulos y neurofilamentos lo que finalmente ocasiona daño y muerte neuronal, siendo su principal función la estabilización de los microtúbulos axonales a través de la interacción con la tubulina. En cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer, se ha observado una disminución

de la actividad de las fosfatasas. Esta disminución de la actividad parece estar relacionada con una ralentización del proceso de defosforilación de Tau.

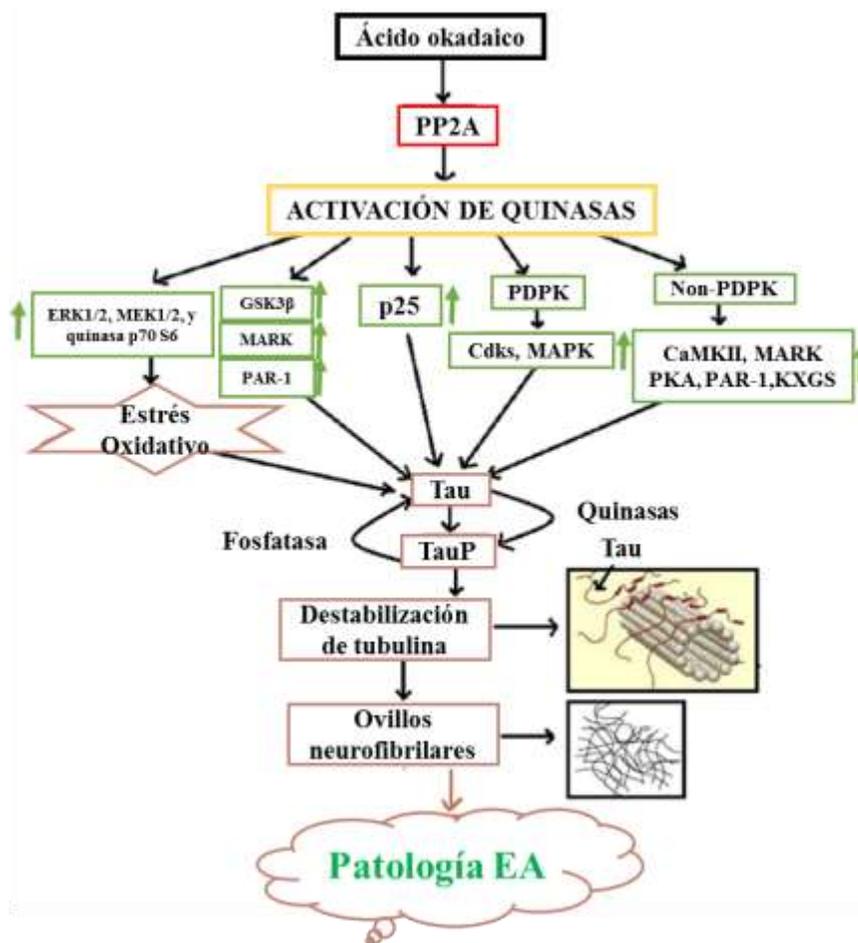


Figura 3.5. Diagrama esquemático que representa el papel de las quinasas y las fosfatasas que actúan sobre la proteína Tau en la patología de la EA inducida por AO. Fuente: Kamat et al, 2013.

Algunos investigadores han reportado que la administración intracerebroventricular de ácido okadaico en ratas provoca disfunciones en la memoria, cambios neuropatológicos que incluyen: neurodegeneración del hipocampo, hiperfosforilación de Tau y formación de placas β -amiloide. Por lo que, el ácido okadaico podría ser una herramienta útil en la investigación de patologías que alteran procesos celulares regulados por fosforilaciones reversibles de proteínas, como la transducción de señales, división celular y memoria. Además, el OA ha demostrado ser una poderosa sonda para el estudio de varios mecanismos regulatorios y neurotóxicos. Debido a la propiedad de inhibir la actividad de las fosfatasas. La hiperfosforilación de la proteína Tau inducida por ácido okadaico *in vivo* es un modelo aceptado de muerte neuronal.

- **Neurotoxicidad inducida por Rotenona / Oligomicina A**

La rotenona bloquea la entrada de electrones en la cadena de transporte electrónica de la membrana interna de las mitocondrias, lugar donde inicia la fosforilación oxidativa (Figura 3.6). Cada uno de los complejos I, III y IV de

la cadena respiratoria actúan como una bomba de protones. La membrana interna es impermeable a los iones en general, pero en particular a los protones, los cuales se acumulan en el exterior de la membrana y crean una diferencia de potencial electroquímico a través de la membrana ($\Delta\mu_{H^+}$). Esta diferencia consta de un potencial químico (diferencia en el pH por los protones) y un potencial eléctrico debido a las cargas (Chaban et al, 2014; Martorell-Riera, 2014). La diferencia de potencial electrónico se utiliza para impulsar una ATP sintasa localizada en la membrana, la cual forma ATP en presencia de $P_i + ADP$.



La oligomicina, bloquea el paso de protones a través de los complejos de ATP sintasa, donde se lleva a cabo la formación de ATP a partir de $ADP + P_i$ (Figura 3.6).

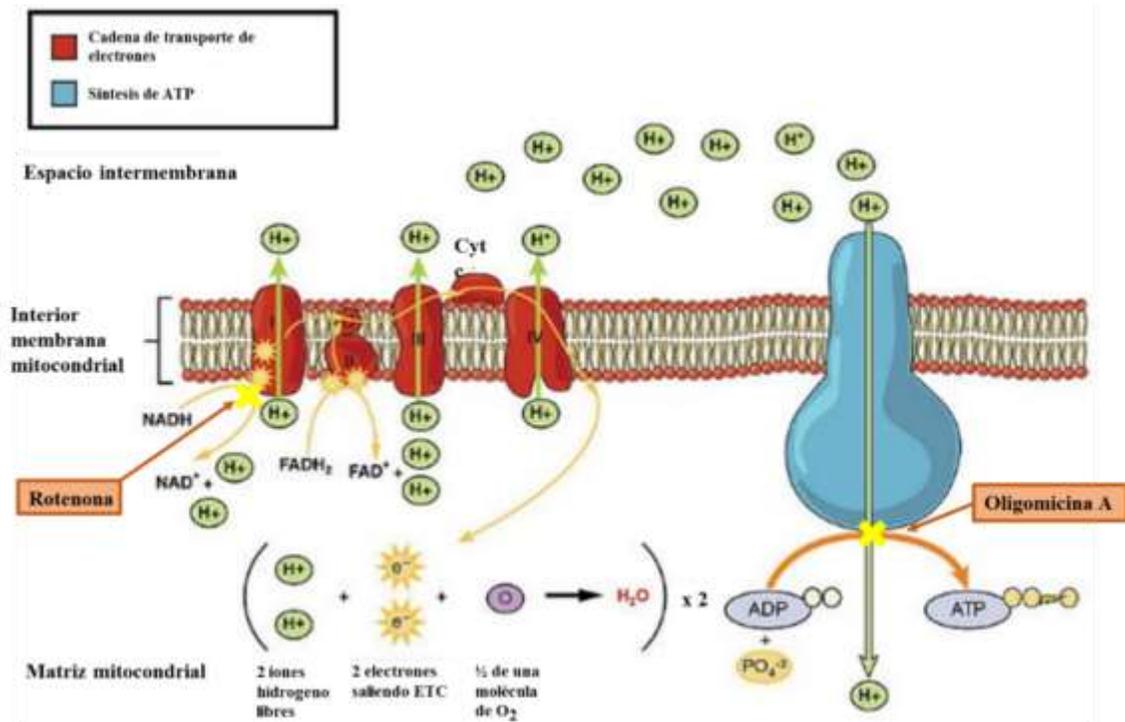


Figura 3.6. Cadena respiratoria. Componentes moleculares que forman la cadena respiratoria. Los electrones son transportados desde el complejo I hasta el IV donde el oxígeno es convertido a H_2O . En tres de los cuatro complejos se liberan protones (H^+) al espacio intermembranal que después son vueltos a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa generando, de este modo, ATP. Fuente: <https://sciencebitesperu.weebly.com/science-bites/respiracion-aerobica>.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La información sobre la recolección del material vegetal, el procedimiento de extracción de alcaloides y el método de identificación por CG/EM se describe en el capítulo 1 en la sección de materiales y métodos, apartado 1.2.

3.2.1. Cultivo celular SH-SY5Y y tratamiento



La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) fue usada entre los pasajes 4-13. Las células fueron conservadas en una proporción 1:1 de una mezcla de nutrientes F-12 (Ham12) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 15 amino ácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, SBF inactivado al 10%, penicilina 100 U/mL, y estreptomycin 100 µg/mL (Reactivos de Invitrogen, Madrid, España) en frascos de cultivo T250, y conservado a 37 °C en una atmosfera humidificada de 5 % CO₂ y 95% de aire. Para los ensayos, las

células fueron subcultivadas en placas de 96 pocillos (TPP, Zellkultur and labortechnologie, Trasadingen, Switzerland). En cada pocillo se sembraron células en una densidad de 50.000 células/pocillo.

3.2.2. Incubación de muestra

Las soluciones concentradas (5 mg de FA/500 μ L) de la fracción de alcaloides de las cuatro especies estudiadas y galantamina (como fármacos control) se prepararon en DMSO. El grupo control (DMSO), fue incubado en DMSO al 0.1 %, manteniendo las mismas concentraciones de DMSO para todas las muestras estudiadas. Las diferentes concentraciones de las fracciones de alcaloides y de galantamina se administraron 24 horas antes de agregar los estímulos tóxicos (rotenona/oligomicina A, ácido okadaico). Las células se co-incubaron por otras 24 horas con los extractos y galantamina en presencia del estímulo. Todos los estímulos tóxicos fueron incubados en el medio de cultivo MEM con 1% de suero bovino fetal (SBF).

3.2.3. Ensayo de citotoxicidad

Galantamina y la fracción de alcaloides se disolvieron en DMSO, posteriormente las soluciones se diluyeron en medio de cultivo a seis concentraciones (6.0; 3.0; 1.5; 0.75; 0.375 $\mu\text{g/mL}$). Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO_2 por 24 horas. Después del tiempo de incubación, se adicionó 10 μL de MTT (5 $\mu\text{g/mL}$) y nuevamente se incubó a 37 °C por 2 h, determinándose la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas. Todas las muestras se cultivaron tres veces por triplicado.

3.2.4. Ensayo de neuroprotección frente a la muerte celular inducida por Rotenona/ Oligomicina A

Una vez que las células crecieron a 75–80 % de la confluencia, fueron pre-incubadas con el extracto de alcaloides por 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con el tóxico Rotenona (10 μM) / Oligomicina A (3.3

μM) (R/O) durante 24 horas. Al final del experimento, la viabilidad celular fue determinada por la reducción de MTT.

3.2.5. Ensayo de neuroprotección frente a ácido okadaico

Una vez que las células crecieron a 75–80 % de la confluencia, las células fueron pre-tratadas con el extracto de alcaloides por 24 horas. Posteriormente, se adicionó del ácido okadaico (AO) 20 nM durante 24 horas. Al final del experimento, la viabilidad celular fue determinada por la reducción de MTT.

3.2.6. Ensayo MTT.

El ensayo MTT descrito por Mossmann (1983) fue usado para la determinación de la viabilidad celular. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan) determinado por

espectrofotometría. Después de cultivadas las células en placas de 96 pocillos en presencia del extracto de alcaloides en concentraciones de 3.0 µg/mL a 0.375 µg/mL, posteriormente se adicionó una solución de 10 µL de MTT (5 µg/mL). La placa se incubó a 37 °C por 2 h. Se determinó la absorbancia a 540 nm usando un lector de microplacas.

3.2.7. Cuidado de animales y uso



Los ratones (C57BL/6n) se conservaron bajo condiciones de temperatura e iluminación controlada. El agua y la comida fue proporcionada *ad libitum*. Los animales empleados en los experimentos fueron tratados haciendo el mayor esfuerzo para minimizar el sufrimiento del animal, además de utilizar el menor número de animales posible. Se siguió el protocolo para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, considerando que inicialmente todos los experimentos fueran pre-aprobados por el comité de ética para el cuidado y uso de animales de investigación de la Universidad Autónoma de Madrid con el decreto Real Español del 1 de Febrero de 2013 (53/2013) y de acuerdo con la directiva de la Unión Europea de 22 de Septiembre de 2010 (2010/63/UE).

3.2.8. Preparación de cortes de hipocampo

Los experimentos se realizaron en cortes de hipocampo de ratones de la colonia de animales del bioterio de la Universidad Autónoma de Madrid. Los ratones fueron decapitados rápidamente bajo anestesia con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.). La parte frontal del cráneo fue removida con rapidez y adicionada en una solución tampón de disección de bicarbonato de Krebs enfriado con hielo (pH 7.4), conteniendo: NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 0.5 mM, NaHCO₃ 26 mM, MgSO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, glucosa 11 mM y sucrosa 200 mM. El hipocampo fue diseccionado con rapidez y cortado en rodajas transversales de 300 µm de espesor usando un Chopper de Tejido McIlwain. Después de esto, fueron introducidos en un baño a 34 °C con burbujeo continuo de una mezcla 95 % O₂ / 5% CO₂ por un periodo de estabilización de 45 min.

3.2.9. Deprivación oxígeno y glucosa (OGD) seguido por reoxigenación

Para los experimentos de OGD, después del periodo de preincubación inicial (30 minutos), los cortes de hipocampo correspondiente al grupo control se incubaron por 15 minutos en una solución Krebs con la siguiente composición: NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 26 mM, MgSO₄ 1.19 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM y glucosa 11 mM (pH 7.2) equilibrada con 95% O₂/ 5% CO₂. La OGD se indujo por incubación de los cortes en una solución Krebs libre de glucosa, equilibrada con una mezcla de gas de 95 % N₂ y 5% CO₂. La glucosa se reemplazó por 2-deoxyglucosa. Después del periodo de OGD, los cortes se regresaron a una solución oxigenada Krebs normal conteniendo glucosa (periodo de reoxigenación) por 120 minutos. Durante la OGD y el periodo de reoxigenación, PNU-282,987 (como fármaco control) y extracto del crudo de alcaloides de *Phycella australis* en diferentes concentraciones (3 y 6 µg/mL), se adicionaron a los diferentes grupos. Los experimentos fueron realizados a 37 °C. Los experimentos del control y OGD

se realizaron usando cinco cortes del mismo animal para cada ensayo. El fármaco PNU-282,987 se utilizó como control, ya que es un agonista potente y selectivo en los receptores nicotínicos $\alpha 7$ de acetilcolina.

3.2.10. Efecto *in vitro* de ácido okadaico en cortes de hipocampo

Para analizar el efecto directo y agudo del ácido okadaico (AO) en los cortes de hipocampo se usaron seis ratones (n=6) Nox4 de tres meses. Después del periodo de preincubación inicial (30 minutos), en una placa de 48 pocillos se adicionaron los cortes de hipocampo en presencia de 1 μ M de AO, 6 μ g/mL el extracto del crudo de alcaloides de *Phycella australis*, 10 μ M de melatonina (como fármaco control) y el grupo control, se incubaron por 360 minutos en una solución de 50% de medio de cultivo MEM enriquecido con piruvato y glutamina, y 50 % de una solución Krebs con la siguiente composición: NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 26 mM, MgSO₄ 1.19 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM y glucosa 11 mM (pH 7.2) equilibrada con 95% O₂/ 5% CO₂. Los experimentos fueron realizados a 37 °C. En cada uno de los experimentos se utilizaron cinco rodajas del mismo animal.

3.2.11. Cuantificación de viabilidad por MTT en cortes de hipocampo

La viabilidad celular fue determinada mediante la habilidad de las células para reducir el MTT como se describió previamente. Los cortes de hipocampo se colectaron inmediatamente después del tratamiento e incubados con MTT (0.5 mg/mL) en la solución de bicarbonato Krebs por 30 minutos a 37 °C. La reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa generando un precipitado formazan. El formazan producido en los cortes de hipocampo fue solubilizado con la adición de 200 µL de DMSO, resultando un compuesto coloreado con una densidad óptica determinada en un lector de microplacas ELISA a 540 nm. Los valores de absorbancia obtenidos en los cortes control fueron tomadas como 100 % de viabilidad.

3.2.12. Actividad inhibitoria de Acetilcolinesterasa.

La actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) fue determinada espectrofotométricamente en microplacas de 96 pocillos por el método colorimétrico de Ellman. El procedimiento detallado del ensayo, ha sido descrito en publicaciones recientes (Alarcón et al, 2015). El buffer usado se preparó de la siguiente manera: Buffer A, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; Buffer B, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, conteniendo 0,1 % de albumina de suero bovino en buffer A; y Buffer C, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, conteniendo 0.1 M NaCl y 0.02 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en buffer A. La fracción de alcaloides de cada una de las especies en estudio, se preparó en un rango de concentraciones de 15,625 $\mu g/mL$ a 1000 $\mu g/mL$ en DMSO con diluciones seriadas en buffer A, adicionando 25 μL de la solución en la placa de 96 pocillos. Sucesivamente, yoduro de acetiltiocolina (ATCI) (25 μL , 15 mM) en agua destilada, ácido 5,5- ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) en buffer C (125 μL , 3 mM) y buffer C (50 μL) fue adicionado secuencialmente. La absorbancia fue determinada a 405 nm, usando un lector de microplacas con lecturas cada 45 s (tres

tiempos). La solución de acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* (25 μ L, 0.2 U/mL) fue adicionada, determinando nuevamente la absorbancia cada 45 s (30 minutos). Hidrobromuro de galantamina fue usado como control positivo. El porcentaje de inhibición se calculó usando la ecuación: $\text{inhibición (\%)} = ((1 - (A_{\text{Muestra}}/A_{\text{Control}})) \times 100)$ donde A_{Muestra} es la absorbancia de la muestra y A_{Control} es la absorbancia del blanco (buffer A). Los parámetros de regresión no lineal fueron trazados para cada curva y los valores de IC_{50} fueron obtenidos utilizando el software GraphPad Prism 5.0.



3.2.13. Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos *in vitro* son presentados como la media \pm S.E.M. Las diferencias entre los grupos fueron determinadas por la aplicación de un ANOVA de una vía, seguido por un análisis post hoc de Newman-Keuls, usando el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). El nivel de significancia estadística fue considerada en ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$ y # $p < 0.05$.

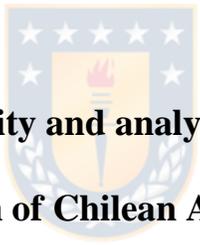
Los alcaloides identificados en cada una de las especies se sometieron a un análisis multivariable de componente principal (PCA) para determinar la significancia de la variabilidad de los factores en los resultados de la matriz, considerando las siguientes variables: especie, composición química y bioactividad (neuroprotección e inhibición de acetilcolinesterasa). Los datos fueron procesados mediante un análisis computacional usando una matriz de correlación con el software versión.



3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación se reflejan en el siguiente manuscrito científico:

Artículo en preparación.



**Neuroprotective activity and analysis by GC/MS of isoquinoline
alkaloids from of Chilean Amaryllidaceae plants**

Lina M. Trujillo-Chacón¹, Julio E. Alarcón-Enos², Carlos L. Cespedes
Acuña², Luis Bustamante³, Marcelo Baeza⁴, Manuela G. López⁵, Fabio
Cabezas⁶, Edgar R. Pastene-Navarrete^{1*}

¹Laboratorio de Farmacognosia, Dpto. de Farmacia, Facultad de Farmacia,
P.O. Box 237, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

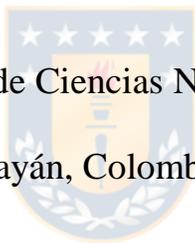
² Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales, Dpto. Ciencias Básicas, Universidad del Bio-Bio, Chillan, Chile.

³ Dpto. de análisis instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

⁴ Dpto. Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

⁵ Instituto Teófilo Hernando (ITH), Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España

⁶ Dpto. Química, Facultad de Ciencias Naturales, exactas y de la educación, Universidad de Cauca. Popayán, Colombia.



3.3.1. Ensayo de citotoxicidad en células SH-SY5Y

La citotoxicidad de las fracción alcaloidea de *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* fue estudiada en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, determinándose la concentración en la que los alcaloides presentan el mayor porcentaje de viabilidad celular respecto al basal. El nivel tóxico se determinó como 80 % de viabilidad celular (línea punteada), considerando tóxicos los valores menores a 80 % (Figura 3.7). Teniendo en cuenta lo mencionado, la concentración de 6.0 µg/mL fue descartada en las especies estudiadas, debido a que presentan una toxicidad superior al 20%, definiéndose de esta manera las concentraciones menores (0.375, 0.75, 1.5 y 3.0 µg/mL) como óptimas para el desarrollo de los ensayos de neuroprotección, ya que garantizan porcentajes de viabilidad celular superiores al 80 %.

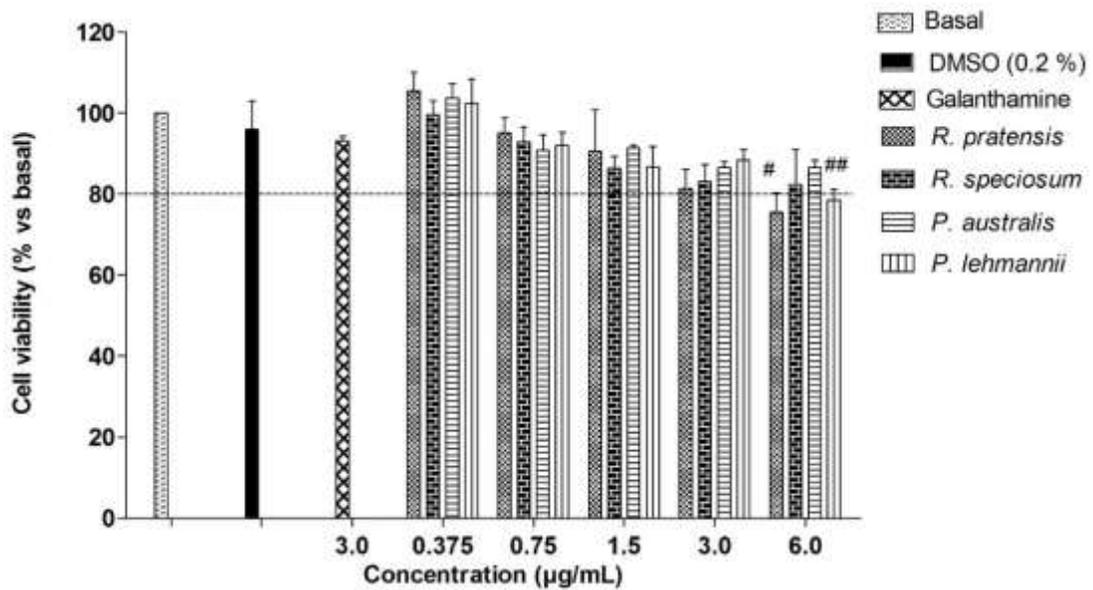


Figura 3.7. Efecto de citotoxicidad de la fracción de alcaloides de bulbos de *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* en células SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones por 24 h, determinada por el ensayo MTT. El nivel tóxico se determinó como 80 % de viabilidad celular (línea punteada), considerando tóxicos los valores menores a 80 %. Los valores son expresados como \pm SD calculada para tres experimentos individuales, cada uno realizado por triplicado. ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ respecto a DMSO. Fuente: Elaboración propia.

3.3.2. Neurotoxicidad generada por Rotenona/ Oligomicina a en células SH-SY5Y

Las fracciones alcaloides de las especies en estudio se evaluaron en un modelo de estrés oxidativo, donde se combina rotenona con oligomicina A (R/O), los cuales inhiben el complejo I y V de la cadena transportadora de electrones, respectivamente, ocasionando estrés oxidativo y muerte celular. Los resultados encontrados en este ensayo de neuroprotección, mostraron que la neurotoxicidad inducida por R/O en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se ve poco alterada con la presencia de los alcaloides (Figura 3.8), ya que al observar el porcentaje de viabilidad celular de R/O comparado con los obtenidos en las fracciones alcaloides no se observan diferencias significativas.

Aunque la diferencia del porcentaje de viabilidad celular no es significativa entre los tratamiento, se encontró que en las concentraciones 0.75 y 1.5 µg/mL los resultados de viabilidad para las especies *Phycella australis* y

Rhodophiala pratensis son mayores, indicando que los alcaloides presentes en estas muestras vegetales intervienen de cierto modo en el proceso de neurotoxicidad inducida por R/O.

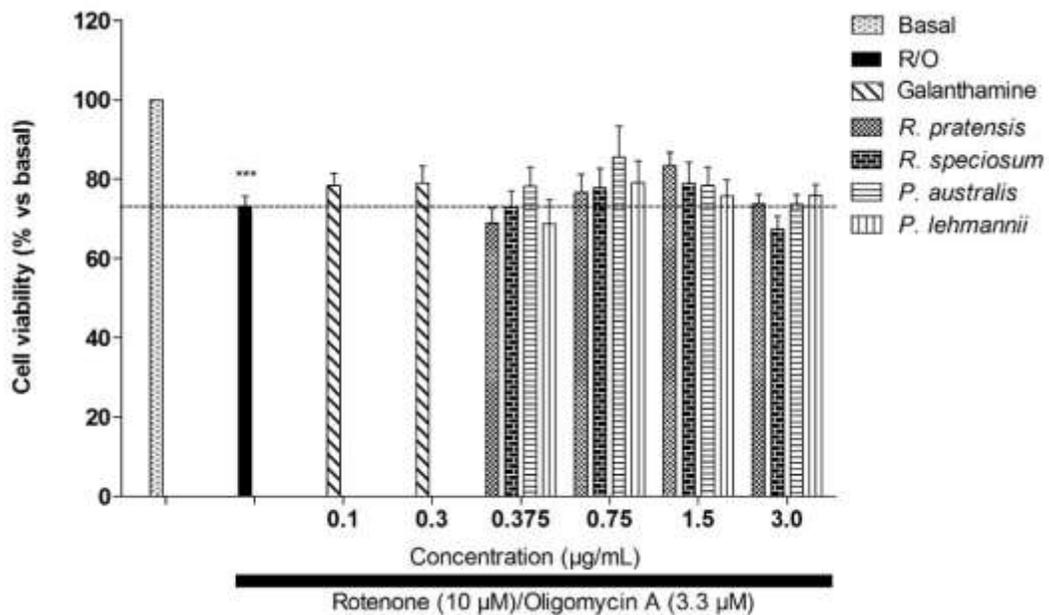


Figura 3.8. Efecto protector de la fracción de alcaloides de *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* contra la toxicidad inducida por Rotenona (10 µM)/Oligomicina A (3.3 µM) en la línea celular SH-SY5Y. El basal fue tratado con DMSO al 0.1% como vehículo. Los valores son expresados como ± S.E.M. de seis

batches de células diferentes. *** $p < 0.001$ respecto al basal. Fuente: Elaboración propia.

3.3.3. Neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en células SH-SY5Y

Para evaluar el efecto neuroprotector de la fracción alcaloidea de las cuatro especies de Amaryllidaceae, se empleó el modelo de neurotoxicidad de ácido okadaico en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, debido a que el ácido okadaico ha demostrado ser un potente inhibidor de las proteínas fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A), causando grandes incrementos en la fosforilación de numerosas proteínas, además de ser un poderoso promotor de tumores (Valdiglesias et al, 2013). Por estas razones el ácido okadaico se ha convertido en una herramienta muy útil para el estudio de procesos celulares regulados por fosforilación reversible de proteínas implicadas en la transducción de señales, procesos de memoria, división celular o apoptosis (Daranas et al, 2001).

Los resultados encontrados en este ensayo muestran que los alcaloides de Amaryllidaceae intervienen positivamente en el proceso de neurotoxicidad inducida por ácido okadaico como se observa en la figura 3.9, donde la fracción alcaloidea de *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* presentan un mayor porcentaje de viabilidad celular en las concentraciones evaluadas. La respuesta de neuroprotección de *Phaedranassa lehmannii* puede estar atribuida a la presencia de los alcaloides isoquinólicos galantamina, sanguina, licorina y pseudolicorina, los cuales por efectos sinérgicos podrían ejercer una potente acción neuroprotectora.

La fracción alcaloidea de *Phycella australis*, a diferencia de las especies estudiadas, es la que presenta el mayor contenido de alcaloides tipo haemantamina, además de poseer alcaloides tipo licorina, homolicorina y trazas de compuestos tipo galantamina, por lo que se le podría atribuir la actividad de neuroprotección ante la neurotoxicidad inducida por el ácido okadaico a la presencia de estos alcaloides, los cuales podrían actuar por efectos sinérgicos como se mencionó anteriormente. Como control positivo en este ensayo se utilizó un estándar de galantamina, encontrándose que este compuesto presenta una actividad neuroprotectora inferior a la encontrada

en las fracciones de alcaloides de las especies de Amaryllidaceae estudiadas (Figura 3.9), lo que indica que la presencia de galantamina y de compuestos derivados de los diferentes tipos de alcaloides de Amaryllidaceae, interviene de cierta manera en el proceso de hiperfosforilación de proteínas, lo que está asociado a una de las posibles hipótesis de la enfermedad de Alzheimer.

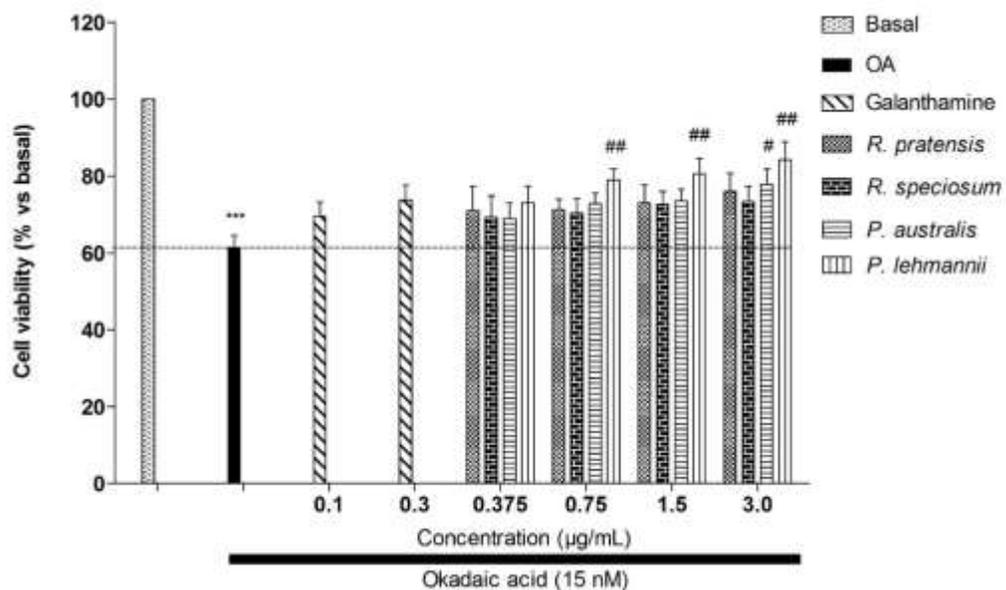


Figura 3.9. Efecto protector de la fracción de alcaloides de bulbos de *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* en células SH-SY5Y tratadas con ácido okadaico (15 nM). El basal fue tratado con DMSO al 0.1% como vehículo. Los valores

son expresados como \pm S.E.M. de seis batches de células diferentes. *** $p < 0.001$ respecto al basal; ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ en comparación a OA. Fuente: Elaboración propia.

3.3.4. Deprivación de oxígeno y glucosa (OGD) en cortes de hipocampo

Después de evaluar el efecto neuroprotector de las fracciones de alcaloides de cada una de las especies en estudio, y de seleccionar a *Phycella australis* como la planta con mayor respuesta neuroprotectora en el modelo de neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, evaluamos si se mantiene el efecto neuroprotector de los alcaloides de esta especie posterior a un proceso de injuria, en tejido cerebral, con la finalidad de evaluar un potencial uso de estos alcaloides. Para esto, se utilizó un modelo de cortes de hipocampo de ratón (Buendia et al, 2016). Los cortes fueron estresados con un sistema de deprivación de oxígeno y glucosa (OGD) durante 15 minutos con una re-oxigenación consecutiva de 2 horas, observándose un efecto neuroprotector de la fracción de alcaloides en

concentraciones de 3.0 y 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3.10). Como control positivo se utilizó PNU-282,987, un fármaco que actúa como un agonista potente y selectivo para el subtipo $\alpha 7$ de los receptores nicotínicos de acetilcolina neural.

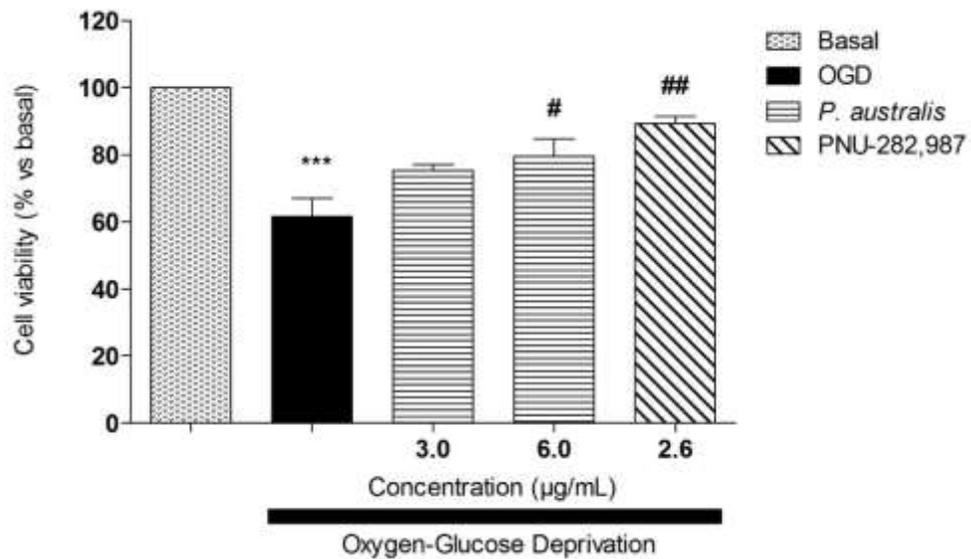


Figura 3.10. Efecto de neuroprotección determinado mediante la viabilidad celular determinada por la reducción de MTT en condiciones de neurotoxicidad inducida por privación de oxígeno y glucosa (OGD) en cortes de hipocampo, evaluando la presencia de la fracción de alcaloides de bulbos de *Phycella australis* (3 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). PNU-282,987 fue usado como

control positivo. Los datos se reportan \pm S.E.M de 2 animales (n=2). ***p< 0.001 respecto al basal; ##p< 0.01 #p< 0.05 respecto a OGD/Reox. ANOVA de una vía, seguido por un análisis post hoc de Newman-Keuls, usando el software GraphPad Prism versión 5.0. Fuente: Elaboración propia.

3.3.5. Neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en cortes de hipocampo



Considerando los resultados obtenidos para la fracción alcaloidea de *Phycella australis* en el modelo de neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se estudió el efecto de estos alcaloides en el modelo de neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en cortes de hipocampo de ratón, encontrándose que los alcaloides de esta muestra vegetal presentan una potente capacidad neuroprotectora frente a este estímulo de neurotoxicidad (Figura 3.11), destacando que la viabilidad celular respecto al basal a una concentración de 6 μ g/mL de la fracción de alcaloides estudiada, supera el porcentaje de viabilidad celular de melatonina, utilizada como control positivo. Estos

resultados confirman lo mencionado anteriormente en el ensayo de neurotoxicidad con ácido okadaico en células SH-SY5Y, por lo que se podría concluir que efectivamente el grupo de alcaloides de Amaryllidaceae presentes en *Phycella australis* juegan un papel importante en la fosforilación de proteínas.

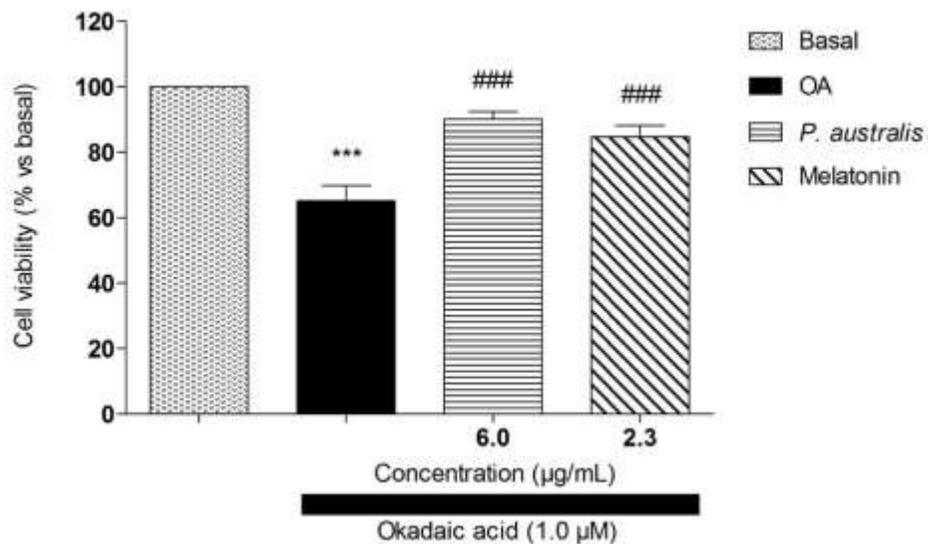


Figura 3.11. Efecto neuroprotector de la fracción de alcaloides de bulbos de *Phycella australis* (6 μg/mL) contra toxicidad inducida por ácido okadaico en cultivo de cortes de hipocampo. Melatonina (2.3 μg/mL) fue usada como control positivo. La viabilidad celular fue determinada por la técnica MTT.

Los datos corresponden a la media \pm S.E.M. de 6 animales (n=6). ***p< 0.001 en comparación al basal; ###p< 0.001 comparado a OA. ANOVA de una vía, seguido por un análisis post hoc de Newman-Keuls, usando el software GraphPad Prism versión 5.0. Fuente: Elaboración propia.

3.3.6. Actividad inhibitoria de Actilcolinesterasa

En el ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa se valoraron los extractos totales de cada una de las especies de Amaryllidaceae en estudio, expresando los resultados como valores de IC₅₀, donde se encontró que las especies *Rhodophiala pratensis* (38.13 \pm 0.95 μ g/mL), *Rhodolirium speciosum* (35.22 \pm 0.86 μ g/mL), *Phycella australis* (80.12 \pm 1.03 μ g/mL) y *Phaedranassa lehmannii* (67.73 \pm 0.52 μ g/mL) presentan una respuesta de inhibición. En este ensayo se utilizó galantamina control positivo (1.08 \pm 0.05 μ g/mL). Los resultados muestran que la diferencia entre los valores de IC₅₀ de las especies estudiadas, indican que los alcaloides presentes en cada planta interaccionan con la enzima.

3.3.7. Análisis estadístico de datos

El análisis multivariable de componente principal (PCA) se realizó con el fin de correlacionar la presencia de los alcaloides isoquinolinicos con los resultados de neuroprotección encontrados, indicando que efectivamente las especies con mayor actividad neuroprotectora son *Phycella australis* y *Phaedranassa lehamnnii*, además de confirmar que los alcaloides licorina, pseudolicorina y haemantamina podrían ser los responsables de la actividad biológica como se muestra en la figura 3.12.



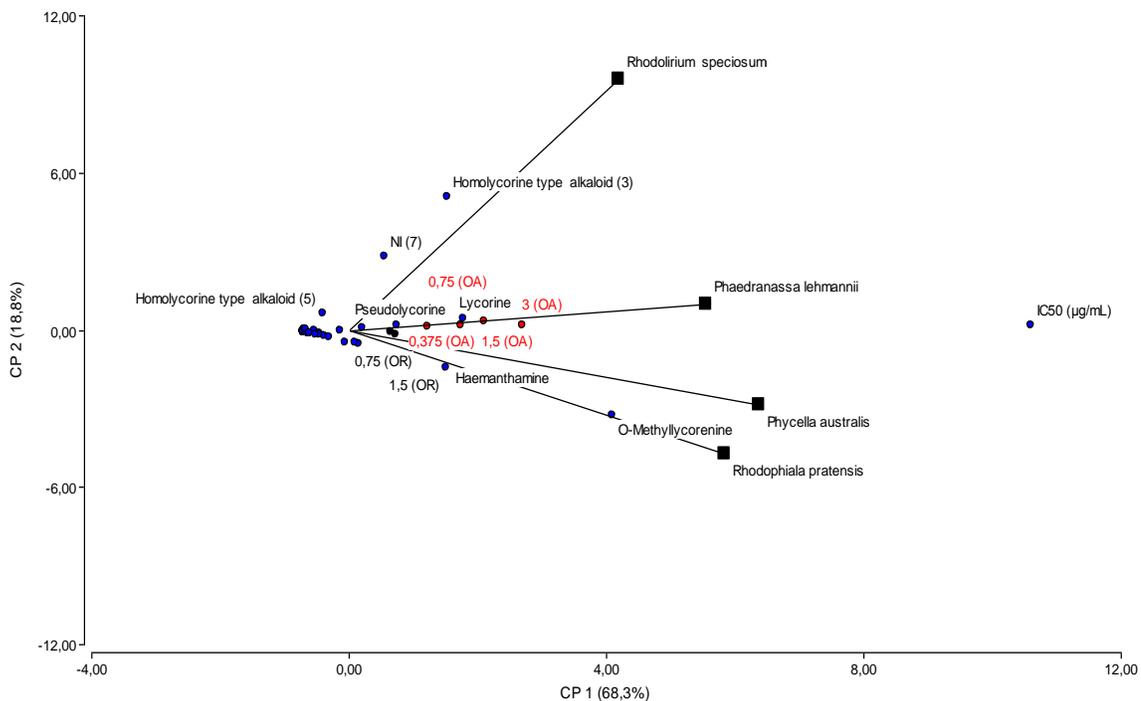


Figura 3.12. Análisis de componente principal de la fracción de alcaloides de especies de Amaryllidaceae. Los factores evaluados fueron: Especie, composición química y bioactividad (neuroprotección y actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa). Fuente: Elaboración propia.

3.4. CONCLUSIONES

- En el modelo de citotoxicidad empleado, las fracciones alcaloideas de las especies estudiadas mostraron que a concentraciones inferiores a 3.0 µg/mL, se previene la muerte celular y aparición de las alteraciones histopatológicas descritas en este modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer.



- El tipo de alcaloides de Amaryllidaceae presentes en *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* ejercen acciones neuroprotectoras frente al daño celular causado por ácido okadaico en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
- Los alcaloides isoquinolinicos presentes en las cuatro especies estudiadas, mostraron mayor respuesta de neuroprotección en el modelo de neurotoxicidad inducida por ácido okadaico que en la

generada por rotenona/oligomicina, confirmando que este tipo de alcaloides interviene en la fosforilación de proteínas.

- En la neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en cortes de hipocampo de ratón, los alcaloides presentes en la fracción alcaloidea de *Phycella australis* mostraron que por efectos sinérgicos podrían intervenir en la formación de agregados de β A e hiperfosforilación de Tau, estrés oxidativo, inflamación, alteraciones gliales y muerte neuronal generada por ácido okadaico.



3.5. REFERENCIAS

Alarcón, J., Cespedes, C.L., Muñoz, E., Balbontin, C., Valdes, F., Gutierrez, M., Astudillo, L and Seigler, D.S. (2015). Dihydroagarofuranoid sesquiterpenes as acetylcholinesterase inhibitors from Celastraceae plants: *Maytenus disticha* and *Euonymus japonicus*. *J. Agric. Food Chem.* 63, 10250–10256

Anand, R., Gill, K. D., Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. *Neuropharmacology*, 76, 27-50.

Arias, E., Ales, E., Gabilan, N. H., Cano-Abad, M. F., Villarroya, M., García, A. G., López, M. G. (2004). Galantamine prevents apoptosis induced by β -amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 46, 103-114.

Arias, E., Gallego-Sandín, S., Villarroya, M., García, A. G., López, M. G. (2005). Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315, 1346-1353.

Auld, D. S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S. et al. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*, 68, 206-245.

- Berkov, S., Georgieva, L., Kondakova, V., Atanassov, A., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. (2009). Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. . *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(2), 1170-1176.
- Bores, G. M., Huger, F.P., Petko, W., Mutlib, A.E., Camacho, F., Rush, D.K., Selk, D.E., Wolf, V., Kosley, R.W., Davis, L. Jr., Vargas, H. M. (1996). Pharmaceutical evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. . *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277, 728-738.
- Brookmeyera, R., Johnsona, E., Ziegler-Grahamb, K., Arrighic, H.M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 3, 186-191.
- Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., Leon, R., Negredo, P., et al. (2016). Subthreshold Concentrations of Melatonin and Galantamine Improves Pathological AD Hallmarks in Hippocampal Organotypic Cultures. . *Molecular neurobiology*, 53, 3338-3348.
- Castillo, W. O. (2016). Evaluation of neuroprotective effects of ethanolic extract of *Caliphurria subedentata* and drug galanthamine on undifferentiated SH-SY5Y cells exposure to amyloid beta peptide(1-42). *Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto*, 109.
- Ciccarone, V., et al. (1989). Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer research*, 49(1), 219-225.

- Constantinescu, R., et al. (2007). Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *In: (Ed.). Neuropsychiatric Disorders An Integrative Approach: Springer*, 17-28.
- Chaban, Y., et al. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilization. *BBA*, 1837, 418-426.
- Daranas, A. H., et al. (2001). Toxic marine microalgae *Toxicon* 39, 1101-1132.
- Davenport, R., Dennis, M. (2000). Neurological emergencies: acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 68, 277-288.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, Ma. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. . *Trends Neurosci*, 22, 391-397.
- Dysken, M. W., Sano, M., Asthana, S. et al. (2014). Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial. *JAMA*, 311, 33-44.
- Feher, M., Schmidt, J.M. (2013). Property Distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. . *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 43, 218–227.
- Felsenstein, K. M., Candelario, K.M., Steindler, D.A., Borchelt, D.R. (2014). Regenerative medicine in Alzheimer's disease. *Translational Research*, 163(4), 432-438.

Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Scazufca, M. . (2006). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, 366(9503), 2112-2117.

Goure, W. F., Krafft, G.A., Jerecic, J., Hefti, F. (2014). Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease immunotherapeutics. *Alzheimers Res Ther.*, 6, 42-57.

Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. . *Drug Discov. Today*, 5, 294–300.

Heinrich, M., Teoh, H.L. (2004). Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 147-162.

Iannello, C. P., N.B.; Antognoni, F.; Poli, F.; Maxia, A.; de Andrade, J.P.; Bastida, J. (2014). A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancfratium illyricum* L. *Fitoterapia*, 92, 163-167.

Jia, J. Y., et al. (2013). Phase I study on the pharmacokinetics and tolerance of ZT-1, a prodrug of huperzine A, for the treatment of Alzheimer's disease. . *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(7), 976-982.

Kamat, P.K., Rai, S., Swarnkar, S., Shukla, R., Nath, C. (2014). Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application. *Mol Neurobiol*, 50(3), 852-865.

- Kamat, P. K., Rai, S., Nath, C. (2013). Review. Okadaic acid induced neurotoxicity: An emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *NeuroToxicology*, 37, 163-172.
- Kumar, A., Singh, A. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195-203.
- Lee, M. L., Schneider, G. (2001). Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: application in the design of natural product- based combinatorial libraries. *J. Comb. Chem.*, 3, 284–289.
- Leon, R., Garcia, Ag., Marco-Contelles, J. (2013). Recent advances in the multitargetdirected ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease. . *Med Res Rev*, 33, 139-189.
- Lombardo, S., Maskos, U. (2015). Role of nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacol*, 96, 255-262.
- Maelicke, A., Samachocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E.X., Zerlin, M. (2001). Allosteric sensitization of nicotine receptors by galanthamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. . *Biological Psychiatry*, 49, 279-288.
- Maher-Edwards, G., Dixon, R., Hunter, J. et al. (2011). SB-742457 and donepezil in Alzheimer disease: a randomized, placebo-controlled study. . *Int J Geriatr Psychiatry*, 26, 536-544.

- Marco-Contelles, J., Carreiras, M.C., Rodríguez, C., Villarroya, M., García, A.G. . (2006). Synthesis and Pharmacology of Galantamine. *Chemical reviews*, 106 (1), 116-133.
- Martorell-Riera, A. (2014). Regulación de la dinámica mitocondrial en neuronas sometidas a excitotoxicidad. *Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona*, 50-55.
- Meng, Z., Yong-Ning, Deng., Jing-Yi, Zhang., et al. (2018). SIRT3 Protects Rotenone-induced Injury in SH-SY5Y Cells by Promoting Autophagy through the LKB1- AMPK-mTOR Pathway. *Aging and Disease*, 9(2)(273-286).
- Mulder, J., Harkany, T., Czollner, K., Cremers, T. I.F.H., Keijser, J.N., Nyakas, C., Luiten, P.G.M. (2005). Galantamine-induced behavioral recovery after sublethal excitotoxic lesions to the rat medial septum. *Behavioural brain research*, 163 (1), 33-41.
- Newman, D. J., Cragg, G.M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. . *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.
- Persson, T., Popescu, Bo., Cedazo-Minguez, A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? . *Oxid Med Cell Longev*, 318-427.
- Rafii, M., et al. (2011). A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease. . *Neurology*, 76(16), 1389-1394.
- Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., Schneider, G. (2016). Counting on natural products for drug design. . *Nat. Chem.*, 8, 531–541.

Selkoe, D. J. (1997). Alzheimer's Disease-Genotypes, Phenotype, and Treatments. *Science* 275(5300), 630-631.

Stratton, C. F., Newman, D.J., Tan, D.S. (2015). Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25, 4802–4807.

Tsvetkova, D., Obreshkova, D., Zheleva-Dimitrova, D., Saso, L. (2013). Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 4595-4608.

Valdiglesias, V., et al. (2013). Okadaic Acid: More than a Diarrheic Toxin. *Mar. Drugs* 11, 4328-4349.



Verpoorte, R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3(5), 232-238.

Woodruff-Pak, D. S. V., R. W.; Wenk, G. L. (2001). Galantamine: effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 2089-2094.

Yusuf, M., et al. (2013). Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y. *Neurogenetics*, 14(1), 63-70.

Zheng, H., Fridkin, M., Youdim, M. (2015). New Approaches to Treating Alzheimer's Disease. *Perspectives in medicinal chemistry*, 7, 1.

CONCLUSIONES

-En el análisis de la composición de alcaloides por CG/EM se lograron identificar 41 alcaloides característicos de la familia Amaryllidaceae y 15 no identificados, detectándose 27 alcaloides en la fracción alcaloidea de bulbos de *Rhodophiala pratensis*, 25 en *Rhodolirium speciosum*, 27 en *Phycella australis* y 12 en *Phaedranassa lehmannii*, encontrándose que la presencia de los alcaloides isoquinolínicos tipo licorina y haemantamina provenientes del acoplamiento fenol oxidativo *orto-para'* y *para-para'* de *O*-metilnorbelladina predominan en las especies *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum* y *Phycella australis*, mientras que para *Phaedranassa lehmannii* predomina adicionalmente los alcaloides tipo galantamina del acoplamiento *para-orto'*.

-Se logró obtener la mejor combinación fitohormonal para la inducción de brotes, formación y multiplicación de microbulbillos de *Rhodophiala pratensis* mediante micropropagación *in vitro*, considerando las

combinaciones AIA (10 μM)/BAP (10 μM) en el cultivo de inducción, BAP (5 μM)/2,4-D (16 μM) en el cultivo de regeneración, y AIA (10 μM)/BAP (5 μM)/ 2,4-D (16 μM) en el cultivo de multiplicación, incrementando el número de bulbillos.

-En el análisis por CG/EM de los alcaloides presentes en las plántulas obtenidas mediante micropropagación *in vitro* con diferentes tratamientos fitohormonales, se encontró que las plántulas producen entre 10 y 12 alcaloides, los cuales están presente de igual manera en la planta silvestre, detectándose los alcaloides tipo licorina y haemantamina provenientes del acoplamiento fenol oxidativo *orto-para'* y *para-para'* de *O*-metilnorbelladina respectivamente.

-En el estudio de la actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa, se observó que los alcaloides presentes en el extracto crudo de *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* muestran afinidad con el sitio activo de la enzima, siendo *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* las plantas con mayor actividad enzimática.

-Se logró determinar que a concentraciones inferiores a 3.0 µg/mL la viabilidad celular de las fracciones alcaloideas de las cuatro especies en células SH-SY5Y, no se ve alterada por la toxicidad generada por los alcaloides presentes en cada planta, previniendo la aparición de alteraciones histopatológicas en el modelo celular, además de evitar interferencias en los modelos de neurotoxicidad estudiados.

-Los alcaloides de Amaryllidaceae presentes en la fracción alcaloidea de *Phycella australis* y *Phaedranassa lehmannii* ejercen acciones neuroprotectoras frente al daño celular causado por ácido okadaico en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

- Los alcaloides isoquinolinicos presentes en las cuatro especies estudiadas mostraron mayor respuesta de neuroprotección en el modelo de neurotoxicidad inducida por ácido okadaico que en la generada por rotenona/oligomicina en células SH-SY5Y, indicando que la actividad de estos alcaloides podría estar mas orientada hacia la hiperfosforilación de tau, que a el daño mitocondrial.

-Se determinó que en la neurotoxicidad inducida por ácido okadaico en cortes de hipocampo de ratón, los alcaloides presentes en la fracción alcaloidea de *Phycella australis* por efectos sinérgicos podrían intervenir en la hiperfosforilación de tau y formación de agregados β A, además de ayudar a prevenir el daño celular generado por procesos de estrés oxidativo, inflamación, alteraciones gliales y muerte neuronal generada por ácido okadaico.



ANEXO 1.

Cromatogramas del análisis por CG/EM de las fracciones de alcaloides de las especies estudiadas.

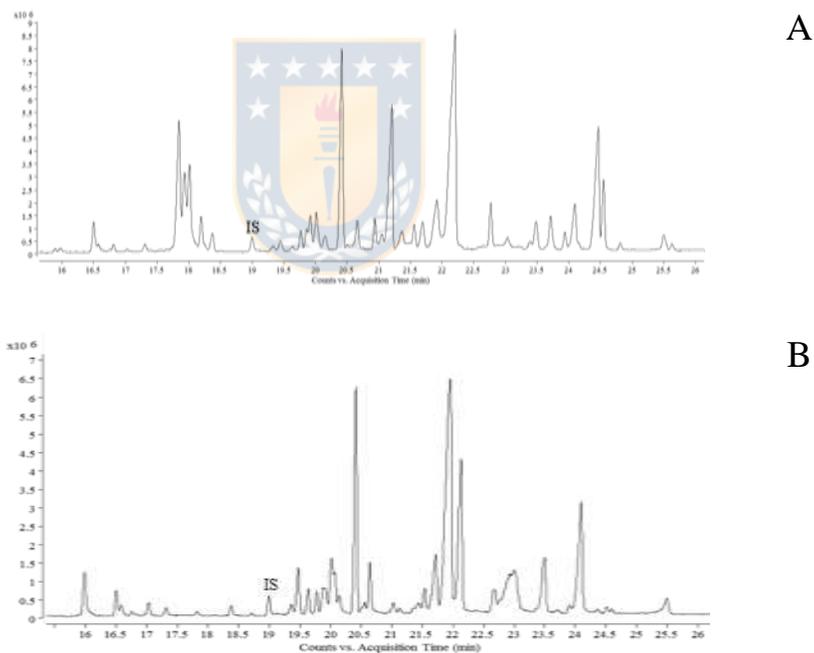
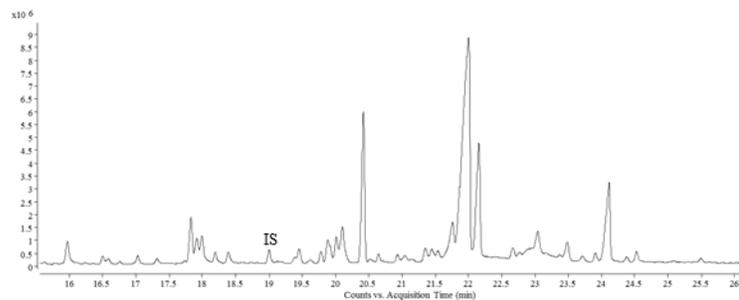
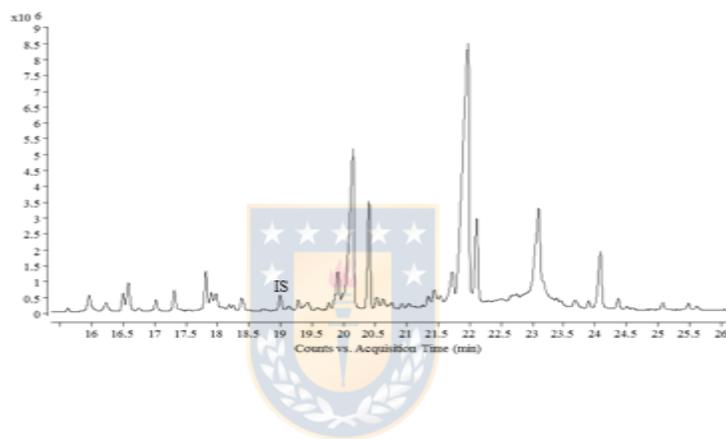


Figura 1.1. CG/EM de la fracción de alcaloides obtenida de **A).** Raíz, **B).** Bulbos de *Rhodophiala pratensis*. Estándar interno (IS): codeína. Fuente: Elaboración propia.



C



D

Figura 1.2. CG/EM de la fracción de alcaloides obtenida de **C)**. Tallo y **D)**. Hojas de *Rhodophiala pratensis*. Estándar interno (IS): codeína. Fuente: Elaboración propia.

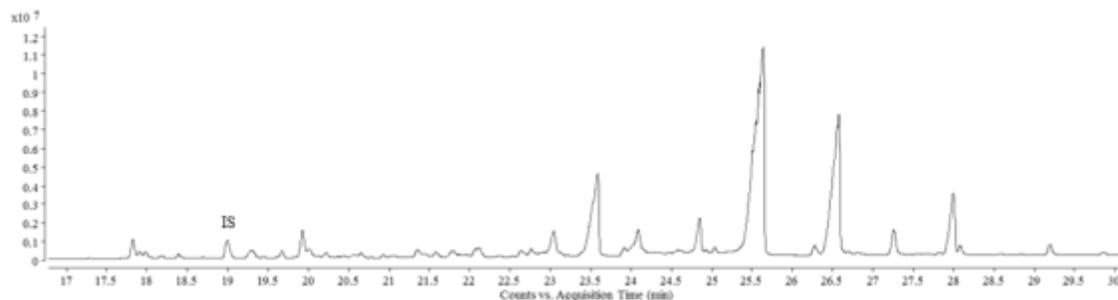


Figura 1.3. CG/EM de la fracción de alcaloides obtenida de bulbos de *Rhodolirium speciosum*. Estándar interno (IS): codeína. Fuente: Elaboración propia.

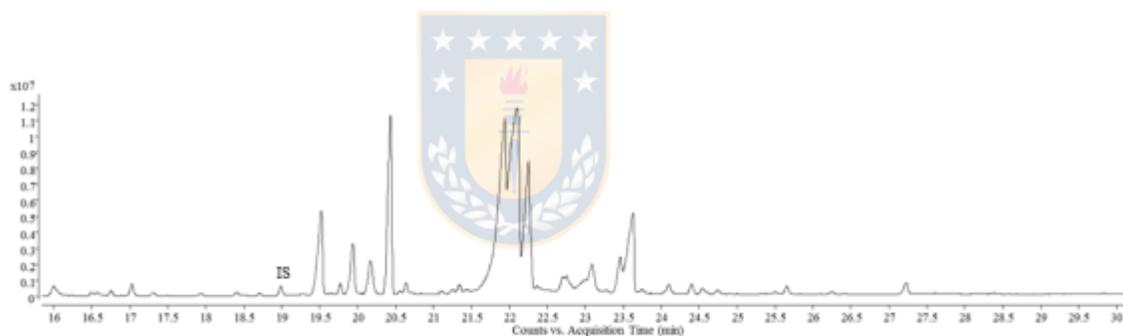


Figura 1.4. CG/EM de la fracción de alcaloides obtenida de bulbos de *Phycella australis*. Estándar interno (IS): codeína. Fuente: Elaboración propia.

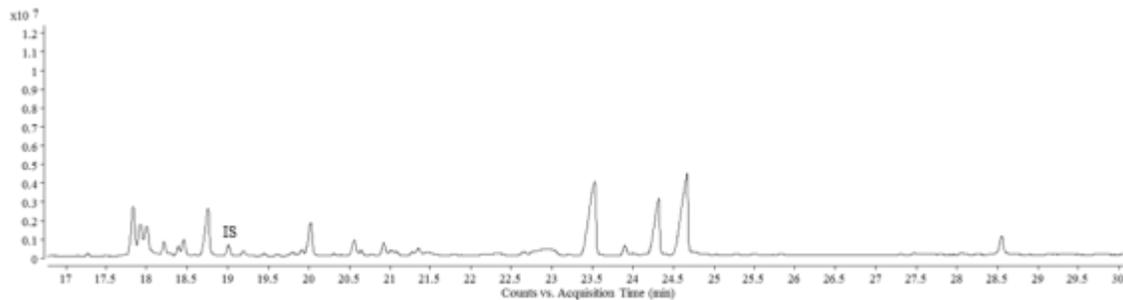


Figura 1.5. CG/EM de la fracción de alcaloides obtenida de bulbos de *Phaedranassa lehmannii*. Estándar interno (IS): codeína. Fuente: Elaboración propia.



ANEXO 2.

Alcaloides identificados por CG/EM

Tabla 2.1. Alcaloides identificados en los bulbos de las cuatro especies estudiadas por CG/EM. Fuente: Elaboración propia.

Peak No	Compound	IR	M ⁺	m/z (relative intensity %)	Alkaloids identified in bulbs							
					<i>Rhodophiala Pratensis</i>		<i>Rhodolirium Speciosum</i>		<i>Phycella Australis</i>		<i>Phaedranassa lehmannii</i>	
					% relative ^d	µg/mg	% relative	µg/mg	% relative	µg/mg	% relative	µg/mg
	Lycorine type				17,052	122,648	12,150	247,975	16,281	223,851	87,322	288,444
1	11-12-dehydrolycorene	2359	253(50)	252(100), 224(13), 166(12), 152(8), 139(11)	0,113	0,812	0,180	3,674	nd	nd	nd	nd
2	11-12-dehydrolycorene Derivative	2377	253(51)	252(100), 224(16), 166(16), 152(13), 139(15)	0,057	0,411	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	Anhydrolycorine	2495	251(43)	250(100), 220(2), 192(14), 191(13), 165(4), 124(19)	1,259	9,055	2,190	44,704	5,396	74,196	2,869	9,476
4	<i>O</i> -Acetylpluviine	2555	329(40)	328(-), 286(-), 268(64), 254(15), 242(100), 228(8), 198(-), 182(8), 151(11)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,086	0,285
5	Caranine	2583	271(41)	270(100), 252(46), 227(14), 226(20), 194(7), 154(8)	nd	nd	0,024	0,482	nd	nd	nd	nd

6	11,12-Didehydroanhydrolycorine	2602	249(61)	248(100), 190(29), 163(9), 123(18), 95(49)	0,392	2,820	0,115	2,344	0,312	4,291	nd	nd
7	Sternbergine	2731	331(15)	270(18), 252(8), 229(72), 228(100)	nd	nd	1,114	22,737	nd	nd	nd	nd
8	Lycorine	2757	287(16)	268(14), 250(8), 227(68), 226(100), 211(5), 147(15)	4,013	28,867	6,433	131,290	8,367	115,036	32,684	107,964
9	Dihydrolycorine	2792	289(36)	288(100), 272(7), 254(4), 214(6), 200(2), 187(6), 162(7), 147(16)	10,858	78,097	1,407	28,713	0,772	10,618	nd	nd
10	Pseudolycorine derivative (1)	2806	331(15)	289(-), 270(16), 252(7), 242(7), 229(69), 228(100), 147(5), 111(7)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	20,090	66,361
11	Pseudolycorine derivative (2)	2823	289(1)	270(1), 229(5), 228(7), 147(2), 111(2), 109(100)	nd	nd	nd	nd	1,019	14,009	nd	nd
12	Pseudolycorine	2831	289(17)	270 (13), 229(72), 228(100), 147(13), 111(19)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31,593	104,358
13	Assoanine	2837	267(52)	266(100), 250(25), 222(17), 193(14), 180(23)	nd	nd	nd	nd	0,415	5,701	nd	nd
14	2-O-Acetyllycorine	2844	329(17)	328(14), 270(42), 269(68), 268(100), 252(43), 250(68), 227(44), 226(94)	nd	nd	0,687	14,031	nd	nd	nd	nd
15	Acetyllycorine derivative	2893	331(45)	330(100), 270(65), 149(39)	0,360	2,586	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Haemanthamine type				24,305	174,816	0,077	1,574	34,360	472,424	8,148	26,915
16	Vittatine	2466	271(82)	272(13), 252(8), 199(100), 187(91), 173(32), 115(42)	0,751	5,399	0,018	0,374	2,439	33,533	0,211	0,699
17	8-O-Demethylmaritidine	2505	273(100)	230(5), 202(29), 201(74), 189(10), 175(12), 174(31), 129(13), 128(21), 115(46), 56(13)	0,684	4,921	0,056	1,139	nd	nd	2,239	7,395
18	Maritidine	2510	287(57)	270(8), 268(5), 258(7), 244(28), 215(100), 203(56), 196(7), 167(5), 128(25), 115(28), 91(14), 77(15)	0,250	1,799	nd	nd	0,452	6,217	nd	nd
19	Deacetylcantabricine	2539	275(100)	276(19), 274(26), 258(24), 250(80), 246(27), 204(88), 203(67), 202(51), 188(27), 187(54),	nd	nd	0,002	0,032	nd	nd	0,715	2,362
20	Crinane-3-one	2579	271(64)	270(28), 240(11), 238(18), 226(14), 211(38), 181(100), 153(33), 152(35), 115(22)	nd	nd	nd	nd	0,083	1,141	nd	nd
21	Aulicine	2612	304(18)	288(39), 246(25), 233(100), 218(34), 206(48), 163(17)	nd	nd	0,001	0,029	nd	nd	nd	nd
22	Haemanthamine isomer	2637	301(70)	272(100), 257(39), 240(25), 225(31), 211(31), 181(47), 153(29)	nd	nd	nd	nd	5,078	69,816	nd	nd
23	Haemanthamine	2637	301(11)	272(100), 257(11), 240(20), 225(9), 211(22), 181(44), 153(18)	15,650	112,563	nd	nd	22,363	307,467	nd	nd
24	Hamayne	2728	287(5)	258(100), 242(9), 212(11), 211(16), 186(22), 181(23), 153(12), 128(21)	6,962	50,077	nd	nd	1,979	27,216	4,983	16,459
25	6-hydroxyhaemanthamine	2732	317(35)	284(48), 258(100), 233(67), 211(47), 201(89), 199(79), 181(71), 173(66), 115(89), 56(44)	0,008	0,057	nd	nd	1,966	27,034	nd	nd

Galanthamine type				0,273	1,961	0,095	1,942	0,046	0,626	4,530	14,964	
26	Galanthamine	2401	287(77)	286(100), 244(30), 230(17), 216(53), 174(59), 128(18), 115(36)	nd	nd	0,002	0,050	nd	nd	0,433	1,430
27	Lycoramine	2417	289(50)	288(100), 232(14), 202(23), 187(18), 159(12), 115(40)	nd	nd	nd	nd	0,046	0,626	nd	nd
28	Sanguinine	2420	273(100)	272(78), 256(21), 212(18), 202(61), 160(95)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,023	13,290
29	Norlycoramine	2459	275(57)	274(100), 202(10), 188(12), 178(5)	0,273	1,961	0,093	1,892	nd	nd	nd	nd
30	Narwedine	2475	285(66)	284(100), 216(36), 199(32), 174(67)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,074	0,244
Homolycorine type				41,310	297,133			39,424	542,044			
31	<i>O</i> -Methyllycorenine	2529	331(1)	300(-), 191(<1), 109(100), 110(8), 108(11), 94(2), 82(2), 42(1)	41,310	297,133	nd	nd	39,424	542,044	nd	nd
Montanine type				1,395	10,032			0,329	4,525			
32	Montanine	2621	301(97)	270(100), 257(45), 252(28), 223(41), 185(57), 115(50)	1,072	7,709	nd	nd	nd	nd	nd	nd
33	Pancracine	2689	287(100)	270(25), 243(34), 223(33), 199(51), 185(67), 115(51)	0,323	2,323	nd	nd	0,329	4,525	nd	nd
Narciclasine type				1,031	7,412	0,036	0,738	0,559	7,677			
34	Trisphaeridine	2279	223(100)	222(38), 167(10), 165(11), 164(16), 138(30), 111(37)	1,031	7,412	0,036	0,738	0,414	5,688	nd	nd
35	5,6-Dihydrobicolorine	2326	239(43)	238(100), 180(15), 139(9)	nd	nd	nd	nd	0,145	1,989	nd	nd
Tazettine type				6,482	46,619			6,257	86,033			
36	6- <i>O</i> -Methylpretazettine	2608	345(17)	344(19), 330(12), 261(100), 239(24), 230(14), 201(22)	1,116	8,026	nd	nd	nd	nd	nd	nd
37	Tazettine	2659	331(12)	316(7), 298(12), 247(100), 227(11), 211(12), 201(20), 181(17), 152(13), 115(23)	5,243	37,710	nd	nd	5,868	80,679	nd	nd
38	3-Epimacronine	2812	329(11)	314(12), 245(100), 244(24), 201(78), 70(29)	0,123	0,883	nd	nd	0,389	5,354	nd	nd
Miscellaneous				1,868	13,435			1,372	18,868			
39	Ismine	2274	257(30)	238(100), 225(6), 211(7), 196(10), 180(9), 168(9), 154(5)	0,483	3,473	nd	nd	0,085	1,172	nd	nd
40	Demethylmesembrenol	2308	275(2)	206(6), 205(45), 115(3), 70(100)	nd	nd	nd	nd	1,287	17,696	nd	nd
41	Galanthindole	2501	281(100)	264(14), 263(18), 262(22), 252(16), 204(12), 191(21), 132(27), 107(27)	1,385	9,962	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Not identified				6,278	45,156	87,643	1788,693	1,373	18,873			
42	Not identified (1)	2396	281(<1)	259(2), 250(2), 225(2), 157(1), 147(18), 129(100), 112(23), 83(17), 70(30), 57(41)	0,577	4,151	0,174	3,542	nd	nd	nd	nd

43	Not identified (2)	2398	259(45)	258 (65), 226 (53), 201(32), 200(100)	nd	nd	nd	nd	0,014	0,198	nd	nd
44	Nerinine type alkaloid (1)	2477	281(1)	271(3), 254(2), 238(1), 207(1), 128(2), 115(2), 109(100), 108(14)	5,032	36,192	0,850	17,348	0,407	5,591	nd	nd
45	Not identified (3)	2515	315(42)	316(8), 270(3), 254(71), 250(23), 229(44), 228(100), 222(9), 124(6)	nd	nd	0,030	0,603	nd	nd	nd	nd
46	Not identified (4)	2539	313(9)	312(20), 289(21), 267(100), 266 (59), 252(37), 250(39), 238(25), 223(15), 202(16), 192(11), 185(39)	nd	nd	0,047	0,958	nd	nd	nd	nd
47	Not identified (5)	2595	345(38)	344(100), 319(7), 252 (7), 248(5), 226(10), 161(11), 147(5), 129(10), 115(9)	nd	nd	0,665	13,563	nd	nd	nd	nd
48	Homolycorine type alkaloid (1)	2626	345(3)	256(52), 226(3), 207(3), 191(7), 175(3), 168(2), 151(2), 139(100), 124(41), 94(6)	nd	nd	0,203	4,134	nd	nd	nd	nd
49	Nerinine type alkaloid (2)	2770	344(2)	281(3), 250(2), 226(4), 207(7), 191(2), 155(2), 141(2), 127(3), 109(100)	0,669	4,813	nd	nd	0,783	10,763	nd	nd
50	Homolycorine type alkaloid (2)	2851	286(<1)	281(1), 270(10), 221(1), 207(1), 178(1), 147(1), 139(100), 124(61)	nd	nd	0,303	6,175	nd	nd	nd	nd
51	Homolycorine type alkaloid (3)	2903	331(<1)	330(1), 270(1), 254(<1), 226(<1), 174(<1), 162 (1), 125(100), 96(40)	nd	nd	50,114	1022,788	nd	nd	nd	nd
52	Lycorine type alkaloid (1)	2905	357(28)	356(63), 270(100), 254(43), 227(30), 147(15), 69(72)	nd	nd	nd	nd	0,084	1,159	nd	nd
53	Not identified (6)	2948	388(75)	284(32), 254(100), 226(18), 207(38), 147(24), 135(22)	nd	nd	nd	nd	0,068	0,929	nd	nd
54	Homolycorine type alkaloid (4)	2977	206(<1)	178(1), 125(100), 115(1), 108(1), 96(37), 82 (3)	nd	nd	28,219	575,937	nd	nd	nd	nd
55	Lycorine type alkaloid (2)	3011	375(46)	374(100), 330(5), 270(67), 254(67), 226(18), 214(8), 207(12), 177(10), 147 (25)	nd	nd	nd	nd	0,017	0,233	nd	nd
56	Homolycorine type alkaloid (5)	3042	281(6)	270(2), 253(3), 207(18), 177(3), 156(2), 139(6), 125(100), 108(1), 96(40), 73(7)	nd	nd	7,038	143,645	nd	nd	nd	nd

^a Peak number of signals in the chromatograms. ^b IR: Kovats retention index. ^c Quantitative values obtained by response factor of codeine internal standard (μg alkaloid per mg of alkaloidal fraction). ^d Percentages of relative peak area of compounds in the samples analyzed. nd: not detected. Values less than 0.01 % are described as “traces” (tr).

Tabla 2.2. Alcaloides identificados en diferentes partes de la planta y en explantes obtenidos por micropropagación *in vitro* de *Rhodophiala pratensis* por CG/EM. Fuente: Elaboración propia.

Peak No ^a	Compound	IR ^b	M ⁺	m/z (relative intensity %)	Wild plants								<i>In vitro</i> cultures						
					Roots		Bulbs		Stem		Leaves		IAA/ BAP		IAA/ BAP/2,4-D		BAP/ 2,4-D		
					µg/mg ^c	% relative ^d	µg/mg	% relative	µg/mg	% relative	µg/mg	% relative	µg/mg	% relative	µg/mg	% relative	µg/mg	% Relative	
Lycorine type																			
1	11-12-dehydrolycorine	2360	253(50)	252(100), 224(13), 166(12), 152(8), 139(11)	nd	nd	0,81	0,11	nd	nd	nd	nd	1,77	0,34	0,39	tr	0,55	0,24	
2	11-12-dehydrolycorine Isomer	2377	253(51)	252(100), 224(16), 166(16), 152(13), 139(15)	0,28	tr	0,41	tr	0,10	tr	0,69	0,13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
3	Anhydrolycorine	2494	251(43)	250(100), 220(2), 192(14), 191(13), 165(4), 124(19)	16,91	1,87	9,05	1,26	8,01	1,09	15,13	2,75	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
4	11,12-Dehydroanhydrolycorine	2602	249(64)	248(100), 190(29), 163(11), 123(18), 95(53)	nd	nd	2,82	0,39	5,15	0,70	7,19	1,31	2,19	0,42	1,62	0,37	1,38	0,59	
5	Lycorine	2744	287(16)	268(14), 250(8), 227(68), 226(100), 211(5), 147(15)	14,55	1,61	28,87	4,01	13,14	1,79	1,28	0,23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
6	Dihydrolycorine	2789	289(36)	288(100), 272(7), 254(3), 214(6), 200(2), 187(6), 162(6), 147(15)	39,78	4,40	78,10	10,86	80,56	10,98	44,60	8,12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
7	2-O-Acetyllycorine	2842	329(17)	328(14), 270(42), 269(68), 268(100), 252(43), 250(68), 227(44), 226(94)	1,77	0,20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
8	Acetyllycorine Derivative	2892	331(45)	330(100), 270(65), 147(39)	1,42	0,16	2,59	0,36	0,29	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Haemanthamine type																			
9	Vittatine	2464	271(82)	272(13), 252(8), 199(100), 187(91), 173(32), 115(42)	1,58	0,18	5,40	0,75	2,38	0,32	0,88	0,16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
10	8-O-Demethylmaritidine	2511	273(64)	230(21), 201(100), 189(62), 174(20)	nd	nd	4,92	0,68	6,78	0,92	37,58	6,84	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
11	Maritidine	2512	287(57)	270(8), 268(5), 258(7), 244(28), 215(100), 203(56), 196(7), 167(5), 128(25), 115(28), 91(14), 77(15)	2,41	0,27	1,80	0,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	

12	Crinane-3-one	2586	271(73)	270(30), 240(8), 238(9), 226(4), 211(21), 181(100), 153(27), 152(27), 115(15)	65,35	7,23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	Haemanthamine	2640	301(11)	272(100), 257(12), 240(21), 225(10), 211(23), 181(47), 153(20)	27,90	3,09	112,56	15,65	184,88	25,21	181,04	32,95	1,16	0,22	nd	nd	6,90	2,94
14	Hamayne	2707	287(5)	258(100), 242(9), 212(11), 211(16), 186(22), 181(23), 153(12), 128(21)	nd	nd	50,08	6,96	18,91	2,58	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	6-hydroxyhaemanthamine	2718	317(35)	284(48), 233(67), 211(47), 201(89), 199(79), 181(71), 173(66), 115(89), 56(44)	0,32	tr	0,06	tr	1,19	0,16	6,30	1,15	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Montanine type																		
16	Montanine	2622	301(97)	270(100), 257(45), 252(28), 223(41), 185(57), 115(50)	4,32	0,48	7,71	1,07	8,14	1,11	5,87	1,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17	Panpracine	2687	287(100)	270(25), 243(34), 223(33), 199(51), 185(67), 115(51)	0,42	tr	2,32	0,32	2,20	0,30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Homolycorine type																		
18	<i>O</i> -Methyllycorenine	2529	331(1)	300(-), 221(3), 191(0,5), 110(8), 109(100), 108(11), 94(2), 82(2), 42(1)	415,23	45,94	297,13	41,31	298,27	40,67	173,42	31,56	12,30	2,34	nd	nd	3,57	1,52
Narciclasine type																		
19	Trisphaeridine	2279	223(100)	222(38), 167(10), 165(11), 164(16), 138(30), 111(37)	6,79	0,75	7,41	1,03	5,20	0,71	23,74	4,32	13,85	2,63	1,84	0,42	1,71	0,73
Tazettine type																		
20	6- <i>O</i> -Methylpretazettine	2606	344(100)	345(44), 330(9), 261(79), 239(29), 230(13), 201(20)	13,65	1,51	8,03	1,12	14,94	2,04	5,10	0,93	nd	nd	nd	nd	nd	nd
21	Tazettine	2649	331(12)	316(7), 298(12), 247(100), 227(11), 211(12), 201(20), 181(17), 152(13), 115(23)	113,56	12,56	37,71	5,24	40,36	5,50	22,01	4,01	2,68	0,51	nd	nd	nd	nd
22	3-Epideoxytazettine	2902	315(9)	232(13), 231(100), 185(6), 115(14), 70(9)	2,23	0,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
23	3-Epimacronine	2810	329(11)	314(12), 245(100), 244(24), 201(78), 70(29)	64,70	7,16	0,88	0,12	1,73	0,24	3,16	0,58	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Galanthamine type																		
24	Norlycoramine	2461	275(57)	274(100), 202(10), 188(12), 178(5)	1,65	0,18	1,96	0,27	1,53	0,21	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Miscellaneous																			
25	Ismine	2274	257(30)	238(100), 211(7), 180(9), 154(5)	225(6), 196(10), 168(9)	6,27	0,69	3,47	0,48	1,83	0,25	3,15	0,57	nd	nd	nd	nd	nd	nd
26	Galanthindole	2500	281(100)	264(14), 262(22), 204(12), 132(27)	263(18), 252(16), 191(21), 107(27)	11,28	1,25	9,96	1,39	8,14	1,11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
27	9-Octadecenamide	2565	281(2)	126(12), 98(10), 59(100)	112(10), 72(71)	1,86	0,21	0,06	tr	0,68	tr	0,39	tr	2,10	0,40	3,31	0,75	1,39	0,59
Not identified																			
28	Not identified	2396	281(0.7)	259(2), 225(2), 147(18), 112(23), 70(30), 57(41)	250(2), 157(1), 129(100), 83(17)	9,95	1,10	4,15	0,58	6,38	0,87	4,44	0,81	394,66	74,95	367,24	83,22	198,47	84,65
29	Nerinine type alkaloid (1)	2476	281 (2)	252 (2), 191 (5), 164 (3), 125 (14), 110 (15), 109 (100), 108 (16), 97 (33)	207 (17), 179 (2), 141 (5), 117 (4), 109 (100), 108 (16), 97 (33)	10,68	1,18	36,19	5,03	10,59	1,44	3,09	0,56	81,82	15,54	3,11	0,70	11,35	4,84
30	Tazettine type alkaloid	2607	329(4)	261 (44), 207 (24), 139(16), 70(100)	245(24), 201(14), 82(22)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,60	0,30	0,38	tr	0,64	0,27
31	Homolycorine type alkaloid (1)	2717	315(< 1)	206(< 1), 109(100), 108(22), 82(3)	178(2), 150(1)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,67	0,13	1,50	0,34	0,66	0,28
32	Lycorine type alkaloid	2744	279(4)	261 (17), 179 (< 1), 167(36), 112 (56), 70(100)	207(1), 149 (53)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	41,76	9,46	nd	nd
33	Homolycorine type alkaloid (2)	2761	315(< 1)	206(< 1), 109(100), 108(22), 82(3)	178(2), 150(1)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	11,78	2,24	20,12	4,56	7,84	3,34
34	Nerinine type alkaloid (2)	2761	344 (2)	281 (3), 226 (4), 191 (2), 141 (2), 109 (100), 85 (6), 71 (8), 57 (10)	250 (2), 207 (7), 155 (2), 127 (3), 96 (4)	69,05	7,64	4,81	0,67	12,00	1,64	10,41	1,90	nd	nd	nd	nd	nd	nd

^a Peak number of signals in the chromatograms. ^b IR: Kovats retention index. ^c Quantitative values obtained by response factor of codeine internal standard (μg alkaloid per mg of alkaloidal fraction). ^d Percentages of relative peak area of compounds in the samples analyzed. nd: not detected. Values less than 0.1 % are described as "traces" (tr).

