

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE ALCALOIDES A PARTIR DE  
BULBILLOS DE *ZEPHYRANTHES CARINATA* UTILIZANDO EL SISTEMA DE  
INMERSIÓN TEMPORAL

Isabela Barragan Anzola

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
BIOLOGIA  
CALI  
2017

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE ALCALOIDES A PARTIR DE  
BULBILLOS DE *ZEPHYRANTHES CARINATA* UTILIZANDO EL SISTEMA DE  
INMERSIÓN TEMPORAL

Isabela Barragan Anzola

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE BIOLOGÍA

Tutora: Zaida Lentini Gil, Ph.D

Co-tutora: María Eugenia Buitrago

UNIVERSIDAD ICESI

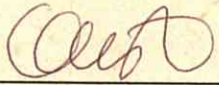
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE BIOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

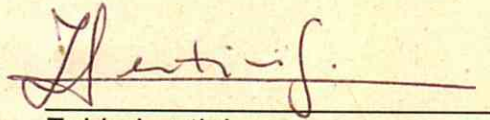
SANTIAGO DE CALI

2017

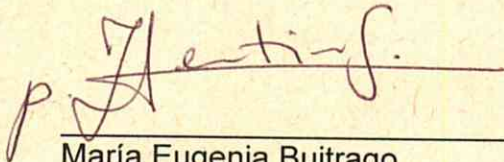
APROBADO POR:



María Camila Pizano  
Evaluador



Zaida Lentini  
Tutor del Proyecto.



María Eugenia Buitrago  
Co-Tutor del Proyecto.

Santiago de Cali, 12-Dic-2017

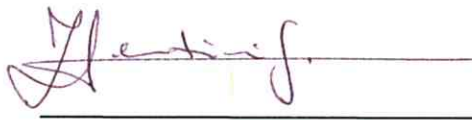
Universidad Icesi

Asunto:

Carta aval Proyecto de grado II

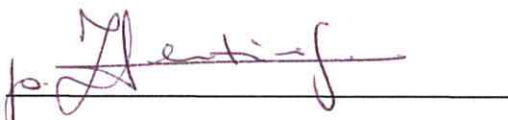
La presente carta es constancia de que la estudiante Isabela Barragan Anzola del programa de pregrado de Biología de la Universidad Icesi, cumplió en su totalidad con la entrega del documento final de Proyecto de grado II y realizo las correcciones pertinentes, siguiendo las recomendaciones indicadas por la tutora Zaida Lentini y la cotutora María Eugenia Buitrago.

Atentamente



---

Zaida Lentini



---

María Eugenia Buitrago

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dr. Zaida Lentini por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de grado, y por su apoyo durante este proceso. A mi cotutora Maria Eugenia Buitrago por todo el apoyo y conocimiento brindado.

Al Centro de Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por permitirme realizar el proyecto de grado en sus instalaciones. A Roosevelt Escobar, investigador del CIAT por guiarme en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de semillero de Biotecnología Vegetal, Geraldine Restrepo, Sebastián Rey y Camila Gómez por apoyarme en este proceso.

A Freddy Vanegas y Eddie Tabares por dar su conocimiento en cultivo *in vitro* y apoyo constante.

A mis padres por brindarme la oportunidad de estudiar y apoyarme incondicionalmente.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
<b>2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Amarilidáceas .....	14
2.2.3 Cultivo <i>in vitro</i> .....	15
2.2.3 Sistema de inmersión temporal .....	15
2.2.4 Metabolitos secundarios .....	17
2.2.5 Alcaloides .....	20
2.2.6 Elictores o inductores químicos .....	22
2.2.7 Extracción y cuantificación de alcaloides.....	23
2.2.8 Contaminación <i>In vitro</i> .....	23
<b>2.3 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>24</b>
Objetivos específicos.....	24
<b>2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Recolecta del material vegetal en el invernadero para la inducción de bulbillos <i>in vitro</i> .....	26
2.4.2 Desinfección del material vegetal .....	26
2.4.3 Inducción de bulbillos <i>in vitro</i> a partir de twin-scales aislados de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero.....	27
2.4.4. Preparación de los medios MS y MSA1 para la inducción y crecimiento de bulbillos <i>in vitro</i> .....	29
2.4.5 Evaluación del material vegetal inducido <i>in vitro</i> antes del cultivo en sistemas de inmersión .....	31
2.4.6 Cultivo de bulbillos <i>in vitro</i> para producción de alcaloides .....	32
2.4.6.2 Cultivo de bulbillos <i>in vitro</i> para producción de alcaloides en el sistema de inmersión temporal (SIT). .....	33
2.4.6.1 Cultivo de bulbillos <i>in vitro</i> para producción de alcaloides en sistema de inmersión permanente (SIP, control) .....	36
2.4.7 Preparación del medio MSAJ líquido con o sin ácido jasmónico para el cultivo de bulbillos <i>in vitro</i> en el SIT y SIP .....	36
2.4.9 Evaluación y procesamiento del material antes de la extracción de alcaloides.....	37

2.4.10 Comprobación de la contaminación del medio líquido MS y MS con AJ .....	37
2.4.11 Extracción de alcaloides .....	37
2.2.12 Análisis, cuantificación e identificación de alcaloides .....	39
2.4.13 Diseño experimental y análisis estadísticos.....	43
<b>2.5 RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
2.5.1 Inducción de bulbillos a partir de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero.....	43
2.5.3 Evaluación del material <i>in vitro</i> antes del cultivo en sistemas de inmersión .....	44
2.5.5 Evaluación y procesamiento del material antes de la extracción de alcaloides.....	46
2.5.6 Comprobación de la contaminación del medio líquido MS control y MS con AJ .....	50
2.5.7 Análisis, cuantificación e identificación de alcaloides .....	51
2.5.8 Identificación de alcaloides .....	51
2.5.9 Semicuantificación de alcaloides .....	55
2.6 DISCUSIÓN .....	58
2.7 CONCLUSIONES .....	65
2.8 RECOMENDACIONES .....	67
2.9 BIBLIOGRAFÍA .....	68

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Flor de la especie <i>Zephyranthes carinata</i> .....	14
<b>Figura 2</b> Sistema de inmersión temporal " SIT". 1. Inicio del ciclo de inmersión de los explantes. 2. Inmersión o paso del medio de cultivo del frasco reservorio al frasco donde están los explantes. 3. Retorno del medio de cultivo al frasco reservorio luego de cumplir el tiempo de inmersión establecido. ....	17
<b>Figura 3</b> . Modelo que muestra la señalización que induce el ácido jasmónico para la biosíntesis de metabolitos secundarios.....	18
<b>Figura 4</b> . Ruta biosintética de los principales alcaloides. ....	19
<b>Figura 5</b> . Biosíntesis del ácido jasmónico .....	20
<b>Figura 6</b> . Tipos de alcaloides producidos por la familia de plantas Amaryllidaceae .....	21
<b>Figura 7.</b> Plantas de la familia Amaryllidaceae creciendo bajo condiciones de invernadero en la Universidad Icesi. ....	25
<b>Figura 8.</b> Esquema general del procedimiento para la inducción y formación de bulbillos, y los tratamientos empleados. Sistema de inmersión permanente (SIP) y sistema de inmersión temporal (SIT) ubicados en el Centro de Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) o en la Universidad Icesi.....	25
<b>Figura 9.</b> Bulbo de <i>Zephyranthes carinata</i> seleccionado y colectado en el invernadero.....	26
<b>Figura 10.</b> (A) Cortes realizados al bulbo para la desinfección del material vegetal. (B) Separación de las escamas del bulbo, dos por vez unidas en su base por la placa basal, para la siembra e inducción de la formación de bulbillos in vitro mediante la técnica twin-scale. ....	28
<b>Figura 11.</b> Bulbillos in vitro con sus respectivas hojas jóvenes y expandidas .....	32
<b>Figura 12.</b> Proceso de ensamblaje del sistema de inmersión temporal (SIT). A) tapón insertado con tubos de vidrio. B) Ensamble de mangueras en los tubos de vidrio. C) Sistemas ensamblados y conectados a las mangueras. ....	35
<b>Figura 13.</b> Espectro cromatógrafo donde se observa el tiempo de retención y área de cada molécula en una muestra. Además del tiempo de retención (3,10) y área de la boldina En el eje X se encuentra el tiempo de retención y en el eje Y el el valor del pico de retención.....	41
<b>Figura 14.</b> Espectrometría de masa donde se observa el pico base y el ion molecular de una molécula en específica, en un tiempo de retención de 6,9. En el eje X se tiene la relación masa carga (m/z) y en el eje Y indica las fragmentaciones más abundantes de la molécula. ....	42
<b>Figura 15.</b> Inducción de bulbillos in vitro a partir de la siembra de escamas de bulbos del invernadero utilizando la técnica twin-scale. A) Escamas sin respuesta de color verde oscuro. B) Escamas con respuesta en medio MSA1, mostrando coloración rojiza y formación de brotes. C) Sub-cultivo al medio MS para el desarrollo y crecimiento de los bulbillos y hojas formados in vitro. ....	44
<b>Figura 16.</b> Formación de hojas y desarrollo a partir de bulbillos de distintas edades. de inducción in vitro. Los bulbillos de menor edad (5, 6 y 7 meses) presentan un menor número de hojas totales, y la mayoría de sus hojas son jóvenes. Los bulbillos de mayor edad (16,18 y 26 meses) presentan un mayor número de hojas totales y sus hojas tienen una mayor longitud.....	45



<b>Figura 17.</b> Número de hojas jóvenes, expandidas y totales promedio de cada edad de bulbillos.....	45
<b>Figura 18.</b> Largo y diámetro de los bulbillos de cada edad de inducción. ....	46
<b>Figura 19. Peso fresco por bulbilllo por cada tratamiento después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico.</b> SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50µM de ácido jasmónico, C= control, medio MS sin ácido jasmónico. Se presentan los resultados con la desviación estándar de cada tratamiento. ....	47
<b>Figura 20. Peso seco por bulbilllo de cada tratamiento después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico.</b> SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50µM de ácido jasmónico, C= control, medio MS sin ácido jasmónico. Se presentan los resultados con la desviación estándar de cada tratamiento. ....	48
<b>Figura 21. Porcentaje de humedad por bulbilllo de cada tratamiento después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico.</b> SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50µM de ácido jasmónico, C= control, medio MS sin ácido jasmónico. Se presentan los resultados con la desviación estándar de cada tratamiento. ....	49
<b>Figura 22. Desarrollo del tejido vegetal a finalizar el experimento después de 13 días de cultivo.</b> B = bulbilllo, H = hoja. SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50µM de ácido jasmónico, Control = medio MS sin ácido jasmónico. ....	50
<b>Figura 23. Prueba de contaminación de bacterias y hongos del medio líquido de cada repetición por tratamiento al finalizar el experimento.</b> Se sembró una alícuota de las respectivas muestras en medio LB MILLER. A) muestra de control RI SIT no contaminada. B) Muestra de SIP AJ contaminada .....	50
<b>Figura 24. Evaluación cualitativa por presencia de alcaloides en muestras del material vegetal y del medio líquido utilizando cromatografía de capa fina (TLC).</b> (A) Revelado con reactivo Dragendorff, donde se observa la coloración naranja indicativo de la presencia de alcaloides. Boldina control (+). (B) TLC evaluado por fluorescencia con el analizador de geles LW215 Martgel®. Presencia de alcaloides (+), ausencia de alcaloides (-).....	51
<b>Figura 25. Concentración total promedio de alcaloides obtenidos por tratamiento en el medio líquido (% p/V, Barras Azules) y tejido vegetal (% p/p, Barras Verdes) después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico.</b> SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50µM de ácido jasmónico, CONT= control, medio MS sin ácido jasmónico. Se presentan los resultados con la desviación estándar de cada tratamiento. ....	55
<b>Figura 26. Concentración de los alcaloides más representativos obtenidos por tratamiento en el medio líquido después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico.</b> SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50µM de ácido jasmónico, CONT= control, medio MS sin ácido jasmónico.....	57

## LISTADO DE TABLAS

<b>Cuadro 1.</b> Número y edad de los bulbillos utilizados en el presente estudio. Los bulbillos de 5, 6 y 7 meses de edad fueron inducidos en este proyecto de grado, mientras los bulbillos 16, 18 y 26 meses de edad fueron subcultivados de materiales anteriores que se tenían en el laboratorio.....	28
<b>Cuadro 2.</b> Composición de los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y MSA1 utilizados para la inducción de bulbillos in vitro y posterior subcultivo. ....	29
<b>Cuadro 3.</b> Distribución de bulbillos por edad por repetición (Erlenmeyer de 250 ml) por tratamiento utilizados para la producción de alcaloides.....	33
<b>Cuadro 4.</b> Condiciones para la cuantificación de alcaloides ingresadas en UPLC/MS .....	40
<b>Cuadro 5.</b> Reactivos para el análisis de alcaloides en el UPLC/MS .....	40
<b>Cuadro 6.</b> Peso seco y peso fresco total de los 20 bulbillos por repetición después de 13 días de cultivo en SIT o SIP con o sin ácido jasmónico.....	47
<b>Cuadro 7.</b> Evaluación de presencia de contaminación con bacterias u hongos en muestras del medio líquido de cada repetición.....	50
<b>Cuadro 8.</b> Identificación de alcaloides producidos a partir de bulbillos de <i>Zephyranthes carinata</i> después de 13 días de cultivo en SIT o SIP con o sin ácido jasmónico 50 µM.....	53
<b>Cuadro 9.</b> Diversidad de estructuras alcaloidales identificados en el tejido vegetal y medio líquido a partir de bulbillos de <i>Zephyranthes carinata</i> después de 13 días de cultivo en SIT o SIP con o sin ácido jasmónico 50 µM.....	54
<b>Cuadro 10.</b> Concentración de los alcaloides más representativos, mostrados tanto en el material vegetal como en el medio líquido. ....	56

## RESUMEN

La familia de las amarilidáceas se caracteriza por producir metabolitos secundarios conocidos como alcaloides, que tienen propiedades farmacológicas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como son el Alzheimer, y diferentes tipos de cáncer. Además, esta familia tiene como característica presentar flores estrelladas y llamativas que las hacen ideales para el uso ornamental. Dos obstáculos principales han limitado la investigación en esta familia; muchas especies se encuentran en vida de extinción, y, por otro lado, la producción de alcaloides es baja en las plantas. Por lo tanto, se han evaluado nuevas metodologías que permitan aumentar la producción masiva de alcaloides, entre las cuales está, el cultivo *in vitro* que permite la propagación y conservación del material vegetal, y la adición de inductores químicos, que generan estímulos permitiendo una mayor producción de alcaloides. En este proyecto se evalúa la producción de metabolitos secundarios en *Zephyranthes carinata*, especie presente en el Valle del Cauca en condiciones naturales, que no se encuentra amenazada y se puede adquirir fácilmente en viveros. Para ello, se evaluó el efecto del sistema de inmersión temporal (SIT) en la producción de alcaloides a partir de bulbillos de *Zephyranthes carinata* producidos *in vitro*; y se determinó si el inductor ácido jasmónico (AJ) incrementa su producción y liberación al medio de cultivo líquido, teniendo en cuenta como control el sistema de inmersión permanente (SIP) con y sin inductor. Como resultado se encontró una mayor concentración y diversidad de alcaloides en el medio líquido (hasta 15 alcaloides) respecto al tejido vegetal (hasta 7 alcaloides), independientemente del tipo de cultivo utilizado (SIT o SIP). Entre los 23 alcaloides identificados se encuentran la ambalina, hamaina, hemantatina licorina, vitatina y zaideina, previamente reportados en otros trabajos con amarilidáceas. La mayor concentración de alcaloides liberados al medio líquido se obtuvo con el SIP con AJ, obteniéndose concentraciones de hasta 0,55%p/v, mientras que con el sistema SIT, se evidenció concentración de alcaloides más baja, 0.39 %p/v en el medio líquido SIT control y 0.26 %p/v en el SIT con AJ.

**Palabras claves:** amarilidáceas, alcaloides, sistema de inmersión temporal, sistema de inmersión permanente, ácido jasmónico

## ABSTRACT

The plants in the family Amaryllidaceae are characterized by their production of secondary metabolites known as alkaloids, which have pharmacological properties for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, and different types of cancer. In addition, plants in this family have striking flowers that make them ideal for ornamental use. Two main obstacles have limited research in this family; many species are in danger of extinction, and, on the other hand, the production of alkaloids is low in plants. Therefore, new methodologies have been developed to increase the massive production of alkaloids, among which is the in vitro culture that allows the propagation and conservation of plant material, and the addition of chemical inducers that generate stimuli allowing a greater production of alkaloids. This project evaluated the production of secondary metabolites in *Zephyranthes carinata*, a species present in Valle del Cauca under natural conditions, which is not threatened and can be easily acquired in nurseries. To this end, the effect of the temporary immersion system (SIT) on the production of alkaloids from bulbils of *Zephyranthes carinata* produced in vitro was evaluated. In particular, this study determined whether the inductor jasmonic acid (AJ) increases the production and release to the alkaloid liquid culture medium, taking into account as a control the permanent immersion system (SIP) with and without inductor. A higher concentration and diversity of alkaloids was found in the liquid medium (up to 15 alkaloids) compared to the plant tissue (up to 7 alkaloids), regardless of the type of culture used (SIT or SIP). Among the 23 alkaloids identified were ambaline, hamaine, haemantaimene, lycorine, vitatine and zaidein previously reported in other works with Amaryllidaceae. The highest concentration of alkaloids released to the liquid medium was obtained with the SIP with AJ, obtaining concentrations of up to 0.55% w / v, while with the SIT system, lower alkaloid concentration was evidenced, 0.39% w / v in the liquid medium SIT control and 0.26% p / v in the SIT with AJ.

**Keywords:** Amaryllidaceae, alkaloids, temporary immersion system, permanent immersion system, jasmonic acid.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las Amaryllidaceae son una familia de plantas herbáceas, perennes y bulbosas, que presentan flores estrelladas y llamativas que las hacen ideales para el uso ornamental. La especie *Zephyranthes carinata* conocida comúnmente como “lirio de lluvia”, hace parte de esta familia que abarca alrededor de 79 géneros y 1600 especies, distribuidas principalmente en áreas tropicales y subtropicales. En Colombia se encuentra una alta diversidad botánica debido a su situación en el trópico húmedo ecuatorial (Otero, 2014) con poblaciones representativas de los géneros como *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes*, *Hippeastrum* y *Crinum*. Por otro lado, los géneros *Eucharis* y *Caliphruria* presentan una distribución restringida, considerándose en vía de extinción (Cabezas, Martínez, & Codina, 2007).

Una de las características de las amarilidáceas es la producción de metabolitos secundarios conocidos como alcaloides, los cuales poseen diversas actividades farmacológicas. Entre estos está la galantamina que es un inhibidor competitivo acetilcolinesterasa (AChE) y que se comercializa como sal bromhidrato, conocida comercialmente con el nombre de Razadine, y utilizada para tratar enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Berkov, Ivanov, Georgiev, & Pavlov, 2014). Otro compuesto de interés extraído de dicha familia es la licorina, destacándose debido a su actividad anticancerígena, antiviral, antimalarica y antifúngica. No obstante, la cantidad de metabolitos secundarios extraídos de las plantas es baja, por lo tanto, se han estudiado alternativas para optimizar la obtención de estos compuestos de interés (Niño & Correa, 2005). Una de estas alternativas es el cultivo *in vitro*, ya que el material vegetal se puede exponer a condiciones ambientales controladas y óptimas, realizar tratamientos con inductores químicos, para inducir una mayor producción de metabolitos secundarios, además de poder propagar masivamente el material vegetal ( Montoliu & Perez, 2011).

El grupo de investigación de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi se ha enfocado en el estudio de especies de la familia Amaryllidaceae. En la región del Valle del Cauca se encuentran al menos 10 especies nativas de los géneros *Calicharis*, *Caliphruria*, *Eucharis*, *Hippeastrum*, *Phaedranassa* y *Plagiolirion*, que están amenazados por la destrucción de su hábitat (Silverstone-Sopkin, 2011). La investigación se ha orientado a la caracterización, conservación y futuro uso sostenible de estas especies nativas de Colombia. Estudios realizados en el grupo han permitido establecer un protocolo óptimo para la introducción de material vegetal desde condiciones de invernadero a *in vitro*, obteniendo una alta tasa de respuesta para la formación y propagación de bulbillos a partir de *Zephyranthes carinata*, especie que es utilizada como modelo al no encontrarse en vía de extinción. Por otro lado, investigaciones desarrolladas por Tofiño (2017) y Alizandre (2017) han revelado la presencia de alcaloides tanto en los bulbillos y hojas del material *in vitro*, así como en callos embriogénicos inducidos a partir de estos

tejidos. Dando como resultado la identificación de 16 alcaloides presentes en *Zephyranthes carinata* entre los cuales se encuentran: licorina, licoramina, hamayna, zaideina, ambellina, hemantamina, vitattina y galantamina (Alizandre, 2017) (Tofiño, 2017). Asimismo, la implementación de inductores químicos como el metil jasmonato y el ácido jasmónico en el medio líquido utilizado en cultivo *in vitro* de los tejidos bajo sistema de inmersión permanente, producen una mayor diversidad de alcaloides en material vegetal y una mayor concentración de alcaloides totales (Alizandre, 2017). No obstante, el sistema de inmersión permanente presenta ciertas dificultades como la hiperhibrididad de los tejidos vegetales, y la acumulación de gases tóxicos, lo que puede afectar la respuesta del tejido a largo plazo. Por lo tanto, se deben buscar alternativas que resuelvan dicha problemática. Una posibilidad es utilizar el sistema de inmersión temporal, que renueva constantemente la atmósfera y que ha mostrado en la especie *Leucojum aestivum* una mayor producción de alcaloides y liberación al medio líquido (Ivanov , Georgiev , Georgiev, Ilieva , & Pavlov, 2010). El sistema de inmersión temporal, adicionalmente tiene como ventaja, que no se necesita la destrucción del material vegetal, y que permite su escalamiento para la producción en biorreactores. Este proyecto de grado tiene como propósito evaluar el efecto del sistema de inmersión temporal (SIT) en la producción de alcaloides a partir de bulbillos de *Zephyranthes carinata* producidos *in vitro*; comparar la respuesta respecto al sistema de inmersión permanente (SIP), y determinar si el inductor químico ácido jasmónico incrementa su producción y liberación al medio de cultivo líquido.

En este estudio se analizan las concentraciones y tipos de alcaloides producidos por bulbillos inducidos *in vitro* de *Zephyranthes carinata*, y su liberación al medio líquido de cultivo utilizando los sistemas SIT y SIP con o sin el tratamiento de ácido jasmónico. Las evaluaciones incluyen una caracterización del material vegetal propagado bajo esas condiciones.

La finalidad del proyecto es generar conocimiento que permita en primera instancia optimizar la producción de alcaloides de *Zephyranthes carinata* a gran escala en biorreactores, y a futuro de otras especies de amarilidáceas nativas de Colombia, como una alternativa para no depender del material en condiciones naturales o de invernadero. Adicionalmente, se desarrolló una metodología que permite un uso sostenible de este recurso vegetal amenazado debido al deterioro de su hábitat, y con gran potencial en el desarrollo de productos farmacéuticos.

# 1. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

## 2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

La familia Amaryllidaceae se caracteriza por producir alcaloides, que son metabolitos secundarios vegetales que se sintetizan mediante aminoácidos. Estos compuestos orgánicos de tipo nitrogenado generan efectos fisiológicos de distintas clases, y son importantes por sus propiedades farmacológicas. Los alcaloides más relevantes producidos por las amarilidáceas son la galantamina y la licorina. La primera se utiliza actualmente para el tratamiento en las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer, debido a sus propiedades de inhibición de la acetilcolinesterasa; y la segunda ha mostrado tener un efecto antiviral contra el poliovirus, el sarampión y Herpes, así como fuertes actividades antimetabólicas y citotóxicas (Johannes Van Staden, 2016)

No obstante, la producción de dichos metabolitos secundarios en condiciones ambientales es baja, por lo cual, la recolección de la biomasa vegetal en ambientes naturales causaría el agotamiento de las plantas silvestres. Por lo tanto, métodos como el cultivo *in vitro* ofrecen un enfoque alternativo para dicha problemática, puesto que permite micropropagar la planta y así incrementar su número exponencialmente. Por otro lado, se han estudiado varias estrategias para aumentar la producción de alcaloides en el cultivo *in vitro*, tales como la optimización de los medios nutritivos, los reguladores del crecimiento, el tratamiento químico y el empleo de inductores químicos (Santos, 2001).

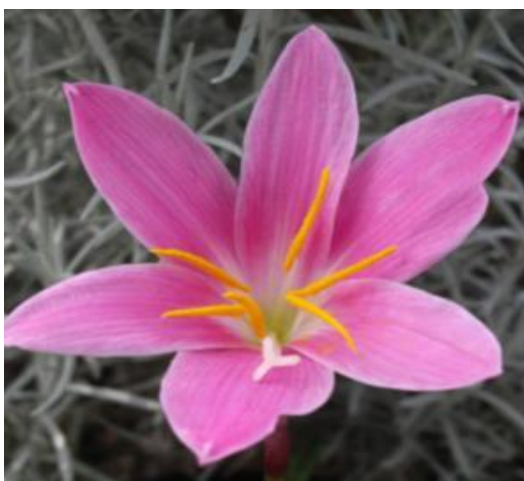
Estudios realizados por el grupo de investigación de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi, han mostrado que en la especie *Zephyranthes carinata*, el uso de inductores químicos como el metil jasmonato y el ácido jasmónico en el sistema de inmersión permanente (SIP), aumentan la producción de alcaloides y su liberación al medio líquido *in vitro* (Alizandre, 2017). Sin embargo, el SIP presenta inconvenientes como la hiperhibrididad de los tejidos vegetales, y la acumulación de gases tóxicos, y como consecuencia una posible alteración de la respuesta por el daño del material vegetal. Para mitigar dichas dificultades, se propone el uso del sistema de inmersión temporal, basado en el contacto intermitente del medio líquido con los explantes por un corto periodo de tiempo, el cual, renueva la atmósfera y evita la alta retención de agua (Muñoz, 2006). No obstante, métodos de extracción con solventes miscibles en agua y cuantificación de alcaloides por medio de la técnica UPLC acoplado a masas, son eficientes para realizar la identificación de alcaloides (Alizandre; Tofiño, 2017).

Siguiendo la línea de investigación, este proyecto tiene como objetivo evaluar el efecto del sistema de inmersión temporal en la producción y liberación de alcaloides *in vitro*, al igual que su eficacia junto al ácido jasmónico, a partir de bulbillos de *Zephyranthes carinata*, con el fin de escalar su producción en biorreactores.

## 1.2 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

### 2.2.1 Amarilidáceas

La familia Amaryllidaceae consiste en plantas terrestres, raramente acuáticas o epifitas, y hierbas perennes. Los tallos son bulbos y están cubiertos por una membrana base denominada túnica. Las plantas tienen hojas alternas y simples, y flores hermafroditas, actinomorfas de diversos colores (Simpson, 2010) (Figura 1), lo cual hace que sean muy llamativas como plantas ornamentales. Esta familia se compone de 79 géneros y 1600 especies (Yusti & Velandia, 2013) entre los géneros más representativos se encuentran; *Crinum*, *Hippeastrum*, *Zephyranthes*, *Hymenocallis*, *Cyrtanthus*. Se distribuyen geográficamente en regiones tropicales y subtropicales principalmente (Simpson, 2010). Las amarilidáceas tienen una gran importancia económica y cultural, ya que muchas de estas especies son usadas como condimento, horticolas, plantas ornamentales y medicinales. Este último se debe a que esta familia produce como metabolitos secundarios compuestos químicos denominados alcaloides, los cuales son de gran utilidad para la industria farmacéutica, puesto que son empleados para la fabricación de medicamentos dirigidos a tratar enfermedades neurodegenerativas (Johannes Van Staden, 2016).



**Figura 1.** Flor de la especie *Zephyranthes carinata*

La especie *Zephyranthes carinata* conocida comúnmente como zefirante o lirio de lluvia, es una planta bulbosa herbácea que no supera los 30 cm de altura y presenta hojas de color verde claro, estrechas. No está en vía de extinción, y es nativa de México, Colombia y América Central, además de ser usada ornamentalmente en Colombia, Perú, Argentina, Brasil, entre otros. Esta especie no se encuentra amenazada y su uso no representa ningún impacto ambiental negativo, por lo que, el grupo de investigación en biotecnología vegetal de la Universidad Icesi la ha seleccionado como especie de modelo para optimizar protocolos que luego puedan ser aplicables a otras especies silvestres de la familia.



### 2.2.3 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas es aquel realizado en medios nutritivos asépticos y con condiciones ambientales controladas y específicas. El cultivo puede ser de plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, células y protoplastos, las cuales son células sin pared celular. Además, el cultivo *in vitro* tiene numerosas aplicaciones. Entre las más importantes está la propagación masiva de plantas o micropropagación, producción de semillas sintéticas, obtención de metabolitos secundarios y mejora genética de plantas, entre otros (Castro & Londoño, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la micropropagación es uno de las aplicaciones más importantes, puesto que, es un sistema de clonación, en el cual, a través de un fragmento de una planta madre se obtiene una descendencia genéticamente idéntica, denominada clon. Dicha técnica ha permitido incrementar de forma exponencial el número de plantas en microexplantes (Zayed, El-Sham, Berkov, Bastida, & Codina, 2011). La reproducción asexual de plantas es posible gracias a que algunas células vegetales poseen la capacidad de regenerar una planta completa. Este proceso se denomina totipotencialidad celular, y es característica de un conjunto de células situadas en ápice de la raíz y del tallo, conocidos como meristemos (Greb & Lohmann, 2016.).

La formación de plantas completas u órganos vegetales dependen del tipo de hormonas implementadas en el medio y del tejido de partida. Se pueden inducir dos tipos de respuesta; regeneración de plantas de forma directa, es decir, regenerar plantas por la formación de brotes (organogénesis) o embriones somática (embriogénesis), o mediante la inducción de colonias de células indiferenciadas, llamadas callos, a partir de los cuales bajo condiciones adecuadas son capaces de generar órganos o embriones hasta formar una planta (Mujib, Banerjee, & Maqsood, 2013)

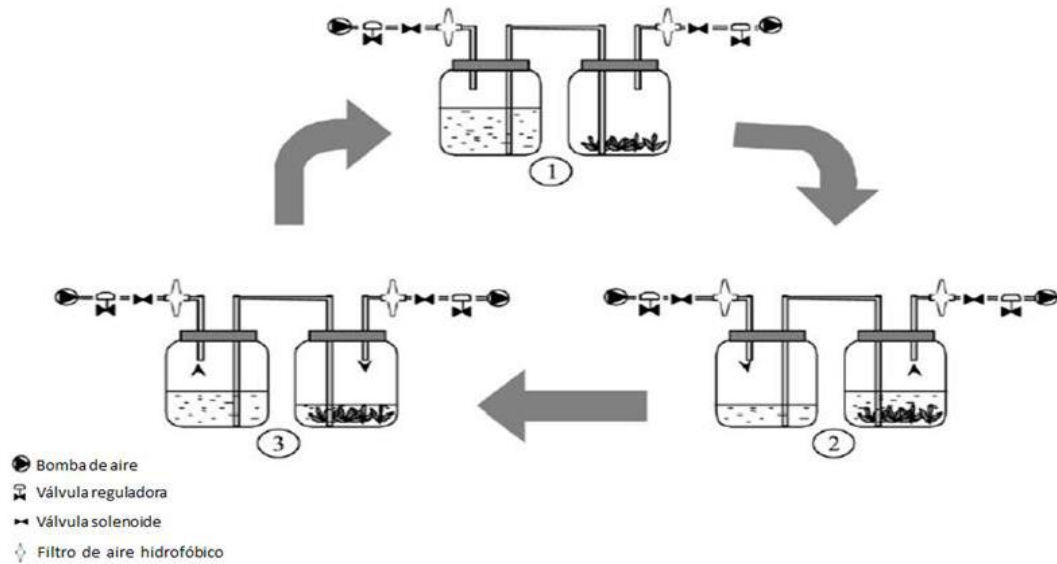
En el caso de la amarilidáceas, para la formación de plantas completas, se utiliza la técnica *twin scale* que consiste en cultivar 2 escamas extraídas del bulbo de la planta original incluyendo una porción de la placa basal, la cual contiene células meristemáticas que posteriormente se diferenciarán y darán a la formación de bulbillos *in vitro*. Para este proyecto se utiliza la vía de organogénesis empleando la técnica *twin scale*, ya que hasta ahora en el grupo de investigación, ésta ha sido la mejor metodología para producir mayores niveles de alcaloides a partir de bulbillos *in vitro* (Alizandre, 2017). Además, se evaluó el sistema de inmersión temporal, ya que otros estudios han demostrado una mayor producción de alcaloides y liberación al medio líquido cuando se utiliza este sistema (Ivanov, Georgiev, Georgiev, Ilieva, & Pavlov, 2010), teniendo como ventaja, que no se necesita la destrucción del material vegetal, y permite su escalamiento para la producción en biorreactores.

### 2.2.3 Sistema de inmersión temporal

Los sistemas de cultivo en medio líquido poseen varias ventajas sobre los medios sólidos. Algunas de las ventajas son que reducen el costo del medio, simplifican el manejo a gran escala y aceleran el crecimiento del tejido vegetal (Muñoz, 2006). Además, permite la liberación de metabolitos secundarios al medio líquido, permitiendo la extracción y cuantificación de alcaloides sin la necesidad de destruir el material vegetal. Sin embargo, este tipo de cultivos presenta ciertas desventajas: complejidad de los sistemas mecánicos necesarios para manejar el oxígeno, mantenimiento de las relaciones hídricas del tejido vegetal, se debe tener agitación constante y se pueden generar pérdidas por contaminación. No obstante, existen sistemas para superar dichas desventajas, los cuales se pueden agrupar en dos tipos: sistemas de cultivo sumergido y de inmersión parcial (Muñoz, 2006). Una forma de inmersión parcial se basa en la utilización de flujos de aire a presión que mueven fluidos entre reservorios y frascos de cultivo, conocidos como sistemas de inmersión temporal.

El sistema de inmersión temporal (SI) es un sistema semi-automatizado en la propagación *in vitro*. Está basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los tejidos (explantos) por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la hiperhidricidad, definida como un trastorno fisiológico que se produce en las plantas caracterizado por alta retención de agua de los tejidos (García , Benavides , & Escobedo , 2011). Este tipo de sistema evita la acumulación de gases tóxicos, ya que remueve la atmósfera al momento de inyectar aire al sistema. Experimentos realizados en caña de azúcar muestran que los tratamientos con sistemas de inmersión temporal estimulan la multiplicación del material vegetal, induciendo la formación de nuevos brotes, además de incrementar la producción de tejido al compararlos con sistemas tradicionales en medio semisólido (Bernal, Occeguera, Jimenez, & Rivera, 2002)

El SIT consiste en emplear dos frascos: uno para el crecimiento de los explantes y otro como reservorio del medio líquido de cultivo, conectados entre sí por una manguera de silicona mediante conectores de vidrio que atraviesan la tapa de los frascos (Figura 2). En la parte interna del frasco, una manguera de silicona desciende hasta el fondo para poder absorber el medio líquido. Como consecuencia, el medio de cultivo circula de un frasco a otro, que depende de un temporizador programable para la determinación la frecuencia y duración de la inmersión. En la tapa de los frascos se colocan filtros hidrofóbicos (0,22  $\mu\text{m}$ ) para garantizar la esterilidad del aire que se inyecta al sistema, para remover los gases tóxicos que emanan de los tejidos y para mantener la presión del aire que permite circular el medio líquido de un frasco al otro (Basail, 2005).



**Figura 2** Sistema de inmersión temporal " SIT". 1. Inicio del ciclo de inmersión de los explantes. 2. Inmersión o paso del medio de cultivo del frasco reservorio al frasco donde están los explantes. 3. Retorno del medio de cultivo al frasco reservorio luego de cumplir el tiempo de inmersión establecido.

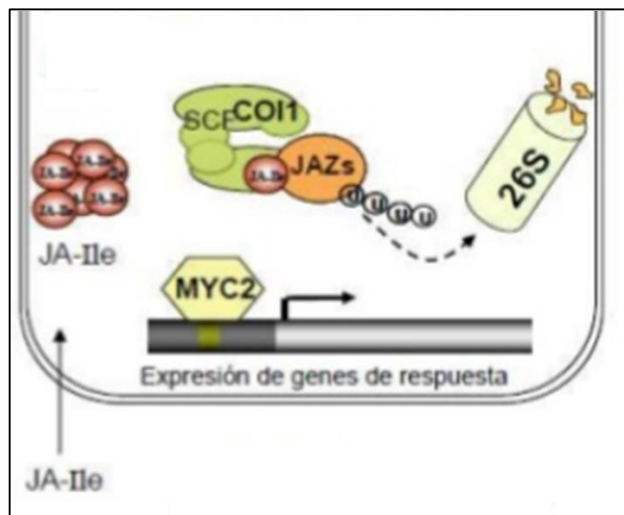
Los autores Ivan Ivanov y colaboradores (2010) evaluaron la producción de galantamina y otros alcaloides de *Leucojum astivum* empleando el sistema de inmersión temporal, y establecieron que tanto la frecuencia de inmersión y la temperatura tuvieron un efecto significativo sobre la acumulación de biomasa y la concentración de los alcaloides (Ivanov, Georgiev, Ilieva, & Pavlov, 2010). En este proyecto se evaluó el sistema de inmersión temporal, además de evaluar su efecto junto con el inductor químico ácido jasmónico, el cual ha demostrado aumentar la producción de alcaloides y su liberación del tejido vegetal al medio líquido (Alizandre, 2017) para facilitar la automatización de su producción y extracción sin tener que destruir el tejido vegetal.

#### 2.2.4 Metabolitos secundarios

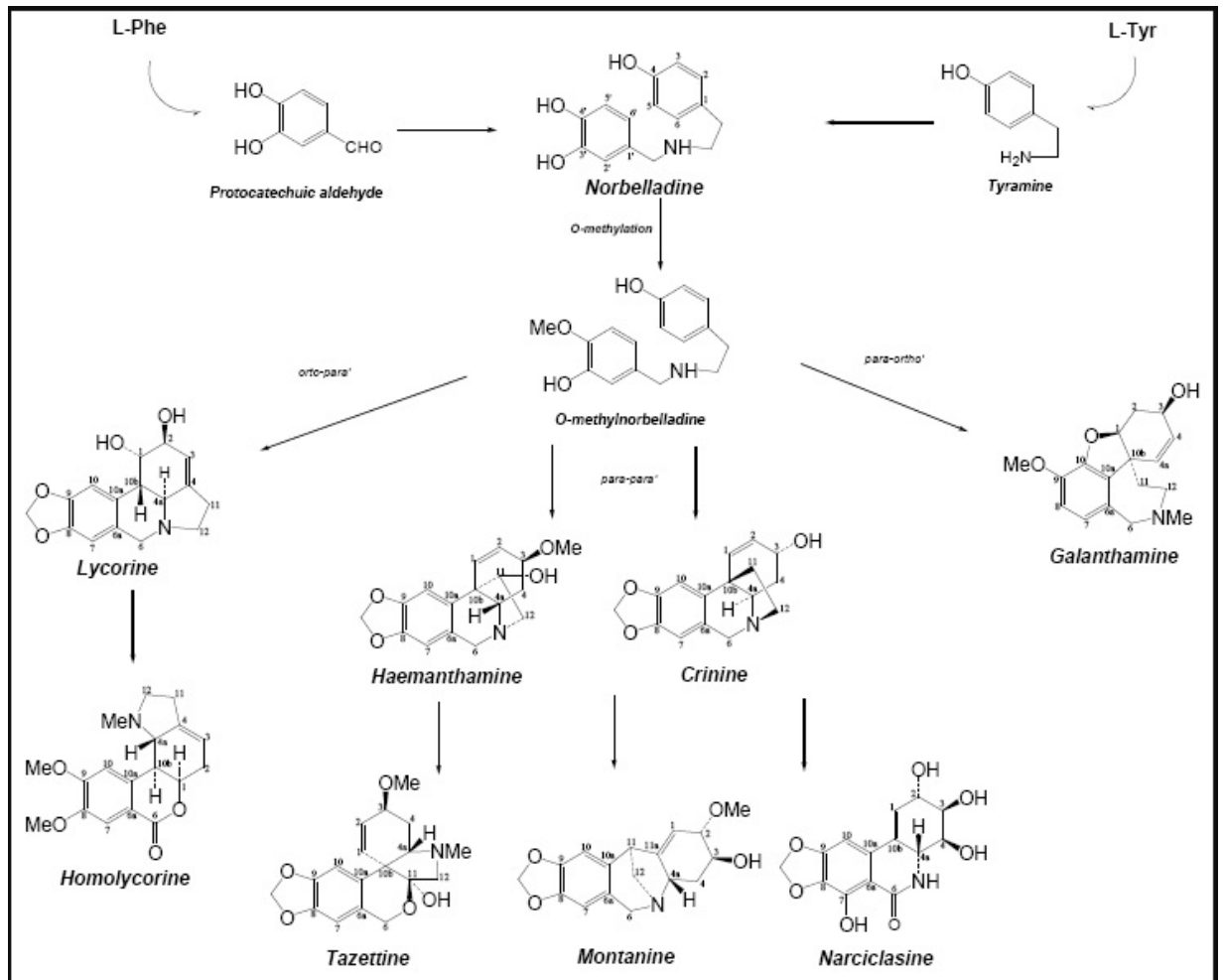
En ambientes naturales las plantas están expuestas a múltiples factores abióticos y bióticos como son la sequía y organismos como bacterias, virus, hongos, insectos entre otros, que afectan la fisiología y adaptación de la planta (Montes, 2009). No obstante, las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra estas condiciones de estrés, entre las cuales se incluyen la síntesis de metabolitos secundarios (Sepúlveda & Rocha, 2005 ). La biosíntesis de los metabolitos secundarios se realiza en estados específicos del desarrollo y períodos de estrés de las plantas, y se diferencian del metabolismo primario porque no desempeñan

una función esencial en la planta, tal como la fotosíntesis, la respiración y el transporte de solutos. Además no son universales en el reino vegetal, son vías metabólicas que llevan a la formación de compuestos característicos de un grupo taxonómico (Sedici, 2012).

Una importante vía de señalización contra los insectos herbívoros es la vía octadecanoide, que conduce a la producción de una hormona vegetal conocida como ácido jasmónico (AJ), la cual aumenta su concentración en la planta en respuesta al daño causado por herbívoros, y como consecuencia la producción de proteínas involucradas en la defensa de la planta. Además, induce genes que codifican enzimas principales para la biosíntesis de metabolitos secundarios, aunque no es del todo claro el proceso, se conoce que el AJ se conjuga con la isoleucina por la enzima JAR 1 (resistente al jasmonato 1), y el conjugado resultante JA-Ile se une a COI1 (coronatine insensitive) (Lincoln & Zeiger, 2010). Luego, dicho complejo se une a JAZ, un represor de la transcripción que conduce la poliubiquitinación, proceso de degradación de proteínas en el proteosoma 26S (Zamudio & Peña, 2012). MYC2 (factor de transcripción) inicia la transcripción de genes dependientes de ácido jasmónico (Figura 3) El ácido jasmónico induce la expresión de las enzimas PAL (phenylalanine ammonia-liase); y TD (tyrosine decarboxylase) las cuales catalizan los primeros pasos de la ruta metabólica de los alcaloides de Amaryllidaceae (Figura 4), empezando por la formación del intermediario O-metilnorbelladina. El acoplamiento oxidativo de -*Ortho-para* fenol con el intermediario, resulta en la formación de licorina, y de *para-orto* fenol, en la formación de galantamina.

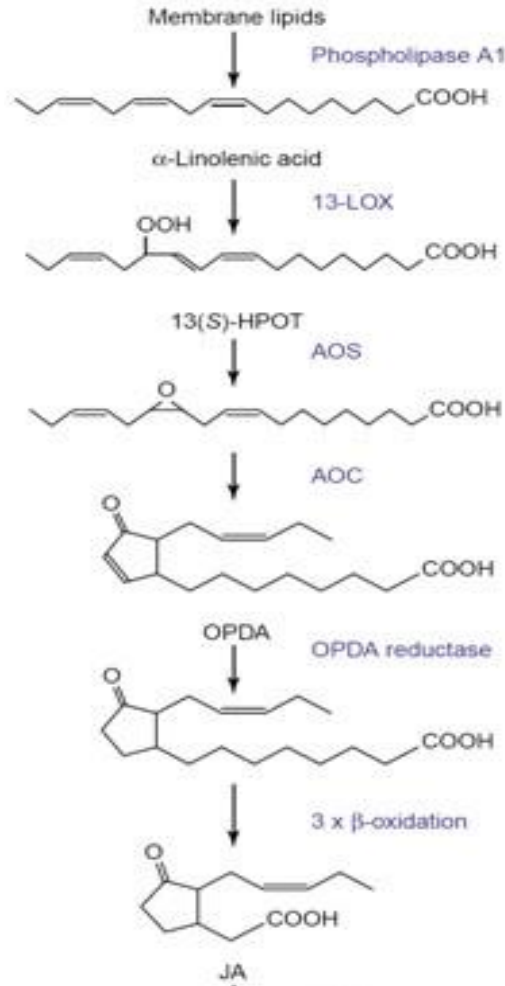


**Figura 3** . Modelo que muestra la señalización que induce el ácido jasmónico para la biosíntesis de metabolitos secundarios.



**Figura 4 .** Ruta biosintética de los principales alcaloides.

El ácido jasmónico es sintetizado a partir del ácido linolénico, que se libera de los lípidos de la membrana vegetal (Lincoln & Zeiger, 2010). Posteriormente, el producto de esta ruta es transportado del cloroplasto al peroxisoma donde se oxida y se convierte en ácido jasmónico (Figura 5)



**Figura 5 .** Biosíntesis del ácido jasmónico

La presencia de ácido jasmónico en los tratamientos tiene como objetivo aumentar la concentración de alcaloides, como lo reportó Alizandre (2017). En este proyecto de grado se empleó una concentración de 50  $\mu$ M de ácido jasmónico, puesto que fue la concentración para la cual se produjo una mayor concentración de alcaloides (Alizandre, 2017).

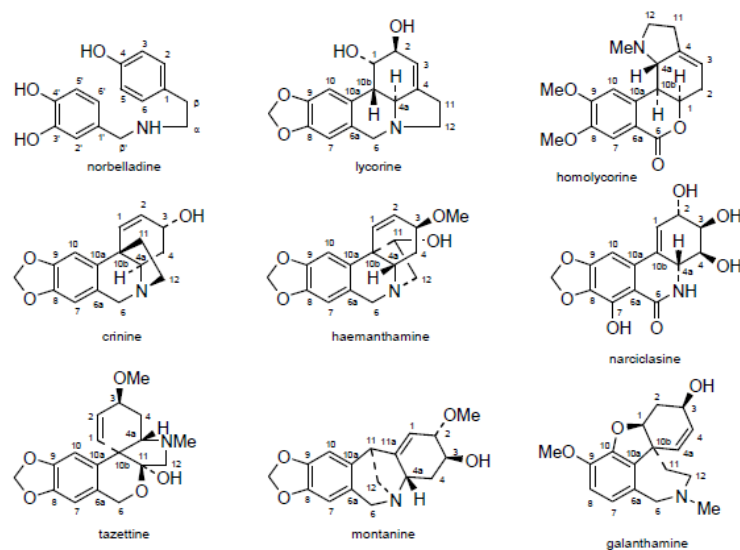
### 2.2.5 Alcaloides

Los alcaloides de Amaryllidaceae constituyen un grupo importante de bases naturales que poseen una diversidad de estructura y funcionalidad. Estos compuestos han atraído la atención generalizada debido a sus múltiples propiedades biológicas. Se han aislado más de 100 alcaloides de miembros de Amaryllidaceae, pudiéndose clasificar en su mayoría en ocho subgrupos

principales; licorina, licorenina, narciclasina, galantamina, crinina, pretazetina, latisodina y montanina (Figura 6) (Martin, 2008).

Los alcaloides más relevantes son la galantamina y la licorina. La primera es un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE) de acción prolongada, selectiva, reversible y competitiva comercializada como una sal de bromhidrato con los nombres de Razadine y Nivalin y que sirven para tratar enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Ptak, y otros, 2008). La licorina, y de interés mayor en este proyecto por sus amplias actividades biológicas y farmacológicas, como la Inhibición de la AChE y supresión de la biosíntesis del ácido ascórbico, la convierten en un fármaco prometedor, con el objetivo de producir nuevos agentes contra el cáncer. Además, se ha empleado en la inactividad contra una serie de virus de la gripe MDCK (Zhong Jin, 2016). Del mismo modo, se ha encontrado evidencia de ser producida por la especie *Zephyranthes carinata* (Alizandre, 2017).

Investigaciones realizadas por Alizandre (2017) y Tofiño (2017) en el grupo de investigación de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi han demostrado que la especie *Zephyranthes carinata* presenta diversos tipos de alcaloides: licorina, licoramina, hemantamina, hamaina, zaideina y vitatina, entre otros desconocidos (Figura 5). Si bien su concentración *in vitro* es menor (0,0022% p/p) que la obtenida a partir de material cultivado en condiciones de invernadero (0,0047% p/p) es necesario optimizar otras metodologías para aumentar la producción de estos alcaloides, para realizar investigaciones dirigidas a determinar la acción de estos compuestos con fines terapéuticos. El inductor químico; ácido jasmónico además de que aumenta la concentración de los alcaloides, también inducen su liberación al medio líquido (Alizandre, 2017). Este tratamiento, en combinación con la inmersión temporal podrían permitir desarrollar una metodología de producción que no dependa de destruir el material vegetal para la extracción y purificación de los alcaloides de interés



**Figura 6** . Tipos de alcaloides producidos por la familia de plantas *Amaryllidaceae*

## 2.2.6 Elicitores o inductores químicos

A los metabolitos secundarios se les atribuye muchas funciones asociadas con la protección de la planta contra agentes patógenos, así como su resistencia a factores de estrés biótico y abiótico; por lo tanto, varias estrategias se implementan para aumentar dichos metabolitos secundarios por medio de elicitores o estrés abiótico. Los elicitores son compuestos químicos o biofactores derivados de varias fuentes que pueden inducir cambios fisiológicos y/o morfológicos en el organismo vegetal (Berkov, Ivanov, Georgiev, & Pavlov, 2014).

Algunos estudios han evaluado el efecto de inductores químicos con distintas especies de la familia Amaryllidaceae. Uno de éstos es el compuesto 4-O-metilnorbelladina, que es un precursor común de los alcaloides de esta familia. Al adicionarlo al medio líquido en diferentes concentraciones y durante diferentes periodos de tiempo, estimula altamente la biosíntesis tanto de galantamina como de la licorina en la especie *Leucojum aestivum* (Saliba, Ptak, & Laurain, 2015).

Por otro lado, un estudio realizado con la especie *Narcissus confusus* consistió en la evaluación del efecto de cuatro inductores químicos; metil jasmonato, ácido araquidónico, ácido salicílico y quitosán, en el crecimiento del tejido vegetal, la cantidad de alcaloides producidos en el material vegetal y su nivel de liberación al medio líquido (Colque, Viladomat, & bastida, 2004). Dicho experimento demostró una relación indirectamente proporcional entre la concentración de inductor y el crecimiento del material vegetal. Esto se debe a que ciertos inductores químicos inducen la expresión de las enzimas PAL (phenylalanine ammonia-lyase); y TD (tyrosine decarboxylase), las cuales catalizan los primeros pasos de la ruta metabólica de los alcaloides de Amaryllidaceae. Sin embargo, aún no se conoce su modo de acción en la liberación de alcaloides al medio de cultivo líquido. Los otros elicitores empleados no tuvieron ningún efecto significativo en la producción de alcaloides (Colque, Viladomat, & bastida, 2004). Por otro lado, estudios en la especie *Leucojum aestivum* realizado por Ivanov y colaboradores (2013), evaluaron el efecto de ácido jasmónico en el crecimiento del tejido vegetal y en la producción de alcaloides, reportando un incremento de 1.26 veces de crecimiento en relación al control, y con la adición de ácido jasmónico, una producción de mayor cantidad del alcaloide galantamina y licorina. (Ivanov, Georgieva, & Pavlov, 2013).

En el proyecto de grado de Alizandre (2017) se evaluó el efecto de los inductores químicos, metil jasmonato y ácido jasmónico, donde se demostró que las mayores concentraciones de alcaloides liberados al medio líquido con usos farmacológicos reportados son; la licorina, licoramina, hamaina y hemantamina, obtenidos en el tratamiento con 50 µM de ácido jasmónico. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto era evaluar el efecto del ácido jasmónico, conjuntamente con el sistema de inmersión temporal, como alternativa para incrementar la producción de los



alcaloides y su liberación al medio líquido, para su posterior aislamiento y purificación.

### 2.2.7 Extracción y cuantificación de alcaloides

Existen tres métodos para la extracción de alcaloides: extracción de alcaloides con solventes inmiscibles en agua, extracción con agua acidulada y extracción con soluciones de sales de reacción ácida (Sharapin, 2000). Para este proyecto de grado se empleó la extracción con solventes miscibles en agua que consiste en utilizar como solventes el metanol y el etanol, los cuales son de alta polaridad y permiten extraer alcaloides del material vegetal (Gennaro, 2000). No obstante, se requiere la adición de compuesto ácido, que permite la formación de alcaloides en su estado de sal y elimine impureza.

Para determinar la presencia se emplearon dos técnicas; la prueba de Dragendroff y la técnica UPLC/MS (cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a masas). La primera consiste en realizar una cromatografía de capa fina, y posteriormente rociar con el reactivo de Dragendroff; compuesto de nitrato de bismuto ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ), ácido tartárico y yoduro de potasio (KI). Dicho reactivo revela la presencia de alcaloides con la formación de un precipitado de color naranja rojizo (Arango, 2008). La segunda técnica (UPLC/MS) determina la identidad y cantidad de alcaloides, sin embargo, es altamente sensible y no requiere de gran cantidad de muestra. Además, la ventaja de esta técnica reside en su capacidad para separar compuestos no volátiles (Skoog, 2007).

Los proyectos de grado de Alizandre (2017) y Tofiño (2017) demostraron que la concentración de los alcaloides extraídos con solventes miscibles en agua a partir de los tejidos producidos *in vitro* puede ser detectados eficientemente por método cromatográfico empleando UPLC acoplado a masas.

### 2.2.8 Contaminación *In vitro*

Uno de los problemas más importantes en el desarrollo de la biotecnología vegetal y especialmente del cultivo *in vitro* de células y tejidos ha sido la contaminación microbiana. Aunque se han establecido protocolos y metodologías para el manejo del material vegetal *in vitro*, la contaminación sigue teniendo un alto índice de afectación, sobre todo en la fase de multiplicación donde se reportan pérdidas significativas por bacterias, hongos y levaduras (Hernandez & Efrain, 2012). De tal manera, se debe detectar los microorganismos que estén afectando el material vegetal, utilizando materiales de bajo costo como el medio LB, que contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos.

## 2.3 OBJETIVO GENERAL

Incrementar la producción de metabolitos secundarios *in vitro*, bajo condiciones aplicables a biorreactores

Objetivos específicos

1. Comparar la producción de alcaloides en el sistema de inmersión temporal (SIT) con el sistema de inmersión permanente (SIP), a partir de bulbillos de *Zephyranthes carinata* producidos *in vitro*
2. Comparar el efecto del ácido jasmónico en la producción y liberación de alcaloides al medio líquido utilizando el sistema de inmersión temporal (SIT) y el sistema de inmersión permanente (SIP)

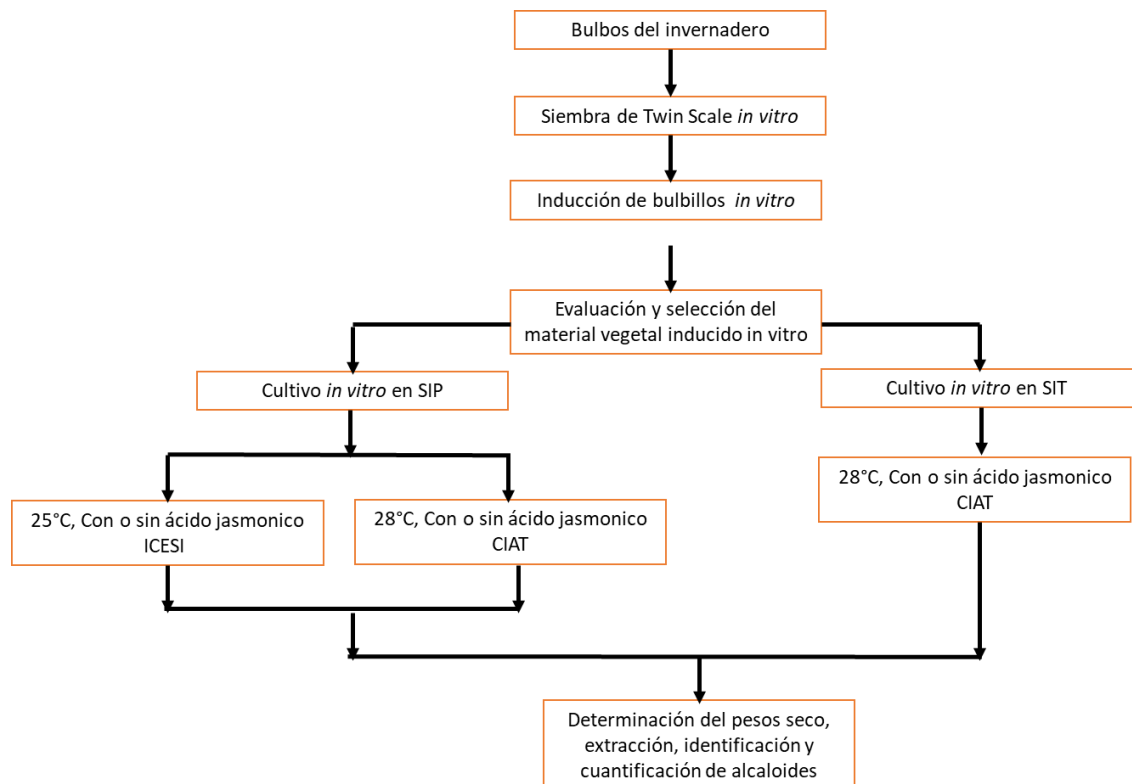
## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto de grado se desarrolló en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi. El material vegetal de partida fueron bulbos de la especie *Zephyranthes carinata* cultivados en el invernadero de la Universidad Icesi. El invernadero se mantiene en condiciones de luz atenuada con una poli-sombra para simular las condiciones de sotobosque, a las cuales están adaptadas estas especies de plantas. Las plantas se sembraron en potes de 3 kg con tierra previamente fertilizada (Figura 7), fueron regadas manualmente dos veces a la semana y se realizó mantenimiento una vez por semana para evitar el crecimiento de maleza. La temperatura del invernadero varió entre un mínimo de 19 °C (en la noche) y un máximo de 30 °C (en el día) durante los meses en los que se realizó la colecta del material vegetal.



**Figura 7.** Plantas de la familia Amaryllidaceae creciendo bajo condiciones de invernadero en la Universidad Icesi.

Los bulbos colectados del invernadero fueron empleados para la inducción de bulbillos *in vitro* utilizando la técnica de *twin-scales*. Posteriormente, los bulbillos formados *in vitro* se utilizaron para realizar los diferentes tratamientos para la evaluación de producción de alcaloides tanto bajo el sistema de inmersión temporal (SIT) con y sin la adición del inductor ácido jasmónico (AJ), y su comparación con el sistema de inmersión permanente (SIP, control y AJ) (Figura 8)



**Figura 8.** Esquema general del procedimiento para la inducción y formación de bulbillos, y los tratamientos empleados. Sistema de inmersión permanente (SIP) y sistema de inmersión temporal (SIT) ubicados en el Centro de Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) o en la Universidad Icesi.

#### 2.4.1 Recolecta del material vegetal en el invernadero para la inducción de bulbillos *in vitro*

Se seleccionaron bulbos de 15 a 20 mm de diámetro de plantas que no estuvieran florecidas, dado que es el estado fisiológico óptimo para inducir la formación de bulbillos *in vitro* (Geraldine Restrepo, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Icesi, comunicación personal). Los bulbos fueron cosechados en toallas de papel humedecido (Figura 9) para evitar su deshidratación y posteriormente desinfectados superficialmente para iniciar el cultivo *in vitro*. La colecta se realizó en los meses de febrero, marzo, abril y mayo del 2017



**Figura 9.** Bulbo de *Zephyranthes carinata* seleccionado y colectado en el invernadero.

#### 2.4.2 Desinfección del material vegetal

El protocolo de desinfección superficial utilizado fue el optimizado por Gómez (2017). Este proceso se divide en dos secciones:

##### A. En el cuarto de lavado:

1. Se retiraron las hojas y las raíces de los bulbos. Al igual que las escamas externas.
2. Los bulbos se lavaron con abundante agua y detergente Extran® al 50% para eliminar el exceso de tierra.

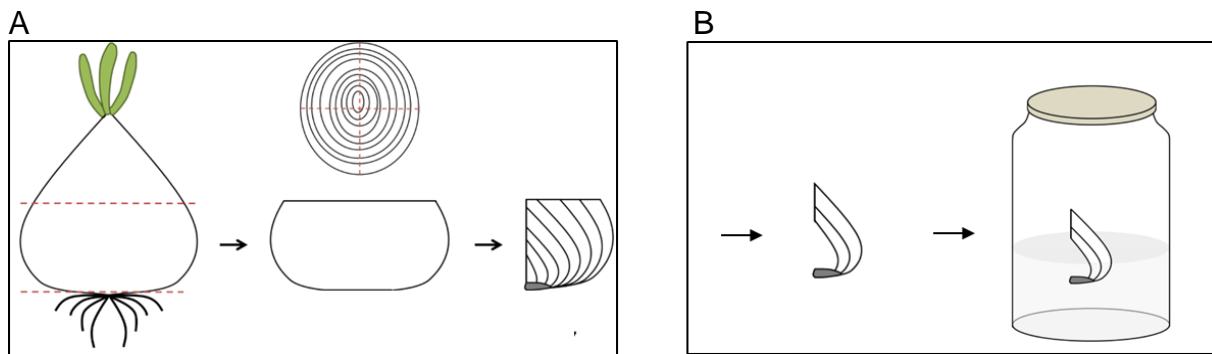
3. Por cada 3 bulbos se utilizó 200 ml de una solución que contenía MERCK TEGO 51 (Dodecil Dietilen Diaminoglicina y Dodecilano Propilglicina 9.0%, Excipientes C.S.P.100%) al 2%. Los bulbos se sumergieron en esa solución por 5 minutos con agitación.
4. Posteriormente, los bulbos se lavaron con agua para eliminar el exceso de jabón

B. En la cabina de flujo laminar:

5. Se sumergieron los bulbos en etanol al 70% por 1 minuto con agitación constante.
6. Se realiza enjuague con agua estéril por 1 minuto, y con agitación constante para eliminar el exceso de etanol.
7. Se retira el agua y se adiciona agua estéril de nuevo para evitar la deshidratación de los bulbos.
8. Se corta transversalmente el bulbo retirando la parte apical, y se corta la parte basal en 4 partes iguales conservando la placa basal (Figura 10A).
9. Se enjuagaron con agua estéril con el fin de retirar el mucilago producido.
10. Se sumergieron los bulbos cortados en etanol al 70% por 1 minuto con agitación constante.
11. Se realizó enjuague con agua estéril por 1 minuto, y con agitación constante para eliminar el exceso de etanol
12. Luego se sumergió en 150 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% con 4 gotas de Tween 20 por cada 100 mL de solución durante 20 minutos con agitación constante.
13. Se realizan 3 enjuagues con agua destilada por 3, 10 y 15 minutos consecutivamente
14. Se retira el agua y se adiciona nuevamente agua destilada para evitar la deshidratación de los bulbillos mientras se procede con el protocolo para su respectivo cultivo *in vitro*.

#### 2.4.3 Inducción de bulbillos *in vitro* a partir de twin-scales aislados de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero

Después del proceso de desinfección de los bulbos del invernadero, se empleó la técnica twin scale (Gomez, 2017) para la inducción de formación de bulbillos *in vitro*. Esta técnica consiste en separar de a dos escamas por vez de cada cuarto del bulbo, asegurándose de que estén unidas por la placa basal con la ayuda de un estereoscopio (Nikon model C-LEDS). Cada par de escamas se siembra en una compota con medio MSA1, para un total de dos o tres pares de escamas por recipiente, asegurando que el área de la placa basal del explante esté en contacto con el medio de cultivo para garantizar la apertura de las escamas y la formación de los nuevos bulbillos (Figura 10B).



**Figura 10.** (A) Cortes realizados al bulbo para la desinfección del material vegetal. (B) Separación de las escamas del bulbo, dos por vez unidas en su base por la placa basal, para la siembra e inducción de la formación de bulbillos *in vitro* mediante la técnica *twin-scale*.

En este proyecto se procesaron un total de 5 bulbos del invernadero para la siembra de 70 pares de escamas, las cuales indujeron alrededor de 126 bulbillos. De los bulbillos inducidos se seleccionaron un total de 115 bulbillos para realizar las evaluaciones en este proyecto (bulbillos de 5, 6 y 7 meses de edad, Cuadro 1). Sin embargo, para poder evaluar todas las variables propuestas en este trabajo, se requerían un total de 240 bulbillos. La falta del material disponible en el invernadero, y la restricción de tiempo para ejecutar esta investigación, obligó a utilizar otros bulbillos que se habían propagado con anterioridad en el laboratorio (bulbillos de 16, 18 y 26 meses de edad, Cuadro 1). En todos los casos, los bulbillos fueron propagados en medio MSA1 y sub-cultivados cada mes y medio. Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto a una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 h bajo luz blanca 8h de oscuridad y humedad relativa de 44%. Después de 1 mes de inducción, los bulbillos fueron sub-cultivados en frascos con 25 ml de medio MS para su crecimiento. Posteriormente, se sub-cultivaron en MS cada mes y medio, y finalmente un mes antes de su uso.

**Cuadro 1.** Número y edad de los bulbillos utilizados en el presente estudio. Los bulbillos de 5, 6 y 7 meses de edad fueron inducidos en este proyecto de grado, mientras los bulbillos 16, 18 y 26 meses de edad fueron subcultivados de materiales anteriores que se tenían en el laboratorio.

EDAD	Número de bulbillos
26	124
18	50
16	26
7	38

6	49
5	28

#### 2.4.4. Preparación de los medios MS y MSA1 para la inducción y crecimiento de bulbillos *in vitro*

El medio MSA1 consiste en el medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962) al cual se le adiciona 0.6 mg/L BAP (Cuadro 2). Este medio por lo general induce la formación de uno o más bulbillos a partir del 70% al 100% de las escamas (twin-scale) cultivadas (Chamorro, 2016, Alizandre, 2017, Tofiño, 2017, y Gómez, 2017).

**Cuadro 2.** Composición de los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y MSA1 utilizados para la inducción de bulbillos *in vitro* y posterior subcultivo.

	MS		MSA1	
	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L
<b>MACRO-ELEMENTOS</b>				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,61	165	20,61
KNO <sub>3</sub>	1900	18,79	1900	18,79
MgSO <sub>4</sub>	180,7	1,50	180,7	1,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25	170	1,25
<b>MICRO-ELEMENTOS</b>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	0,100	6,2	0,100
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	16,9	0,10	16,9	0,10
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6	0,0299	8,6	0,0299
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,0010	0,25	0,0010
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,00010	0,025	0,00010
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0001	0,025	0,0001
KI	0,83	0,0050	0,83	0,0050

CaCl <sub>2</sub>	332,2	2,99	332,2	2,99
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,26	0,1052	37,26	0,1052
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,80	0,1000	27,80	0,1000
<b>VITAMINAS</b>				
Ácido nicotínico	0,50	0,0024	0,50	0,0024
Piridoxina. HCL	0,1	0,0003	0,1	0,0003
Tiamina X HCL	2	0,0266	2	0,0266
Glicina	100	0,5551	100	0,5551
Mioinositol	0,50	0,0041	0,50	0,0041
<b>REGULADORES DE CRECIMIENTO</b>				
BAP (citoquinina sintética 6-bencilaminopurina)			0,6	
<b>Fuente de Carbón</b>				
Sacarosa	30000	87,64	30000	87,64
<b>Agente gelificante</b>				
gellan gum	2000		2000	
pH	5,8		5,8	

Para la elaboración de medio MS o MSA1 sólido, primero se esterilizan en la autoclave los recipientes donde se va a servir el medio, en este caso frascos de compotas con tapas de pasta o aluminio. Para 1 L de medio MS se necesitan 40 compotas estériles. Posteriormente se preparan por separado el agente gelificante que se esteriliza por autoclave, y el medio base que se esteriliza por filtración para evitar afectar los reguladores de crecimiento. Finalmente reconstituir el medio, uniendo estos dos componentes como se describe a continuación.



### **Preparación del gelificante:**

1. Se agregó a un frasco Schott de 1 L, 2g de agente gelificante en 500 ml de agua destilada, y se tapa.
2. Después de la preparación, se esteriliza la solución en una autoclave TUTTNAUER 3150EL a temperatura 121°C y 120 PSI, con un tiempo de esterilización de 15 minutos y con un tiempo de secado hasta que el equipo llegue a 85°C.
3. Posteriormente, se preparó el medio en un beaker de 1 L disolviendo 4,43 g/L de sales de Murashige & Skoog (MS) (PhytoTech Laboratories) en 200 ml de agua desionizada tipo 2, en una plancha con agitación constante hasta disolver las sales.
4. En el caso del medio MSA1, se adicionó de la solución stock de BAP un volumen suficiente para alcanzar una concentración final de 0,6 mg/L BAP. En el caso del medio MS, no se agregó regulador de crecimiento.
5. Se agregó 30 g de sacarosa y se llevó el volumen final a 500 ml, se agitó hasta obtener una solución homogénea
6. Se calibra el pH a 5.8.
7. En un frasco Schott estéril de 1 L dentro de la cabina de flujo laminar, se esterilizó la solución filtrándola al vacío con una membrana de celulosa de 0.22um.

### **Adición del gelificante al medio base de cultivo**

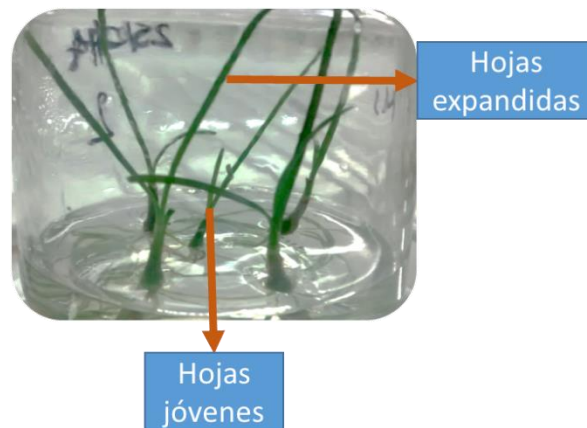
8. El medio base esterilizado por filtración se calentó en el horno microondas por un lapso de 2 minutos, y se mezcló dentro de la cabina de flujo laminar con el gelificante ya esterilizado por autoclave, hasta homogenizar con agitación manual
9. Posteriormente, se sirvieron 25 ml de medio en cada compota estéril
10. Se deja enfriar por un tiempo de 40 minutos, después se sella y rotula.

Después de preparar el medio, se debe esperar al menos dos días para descartar posibles fuentes de contaminación.

#### **2.4.5 Evaluación del material vegetal inducido *in vitro* antes del cultivo en sistemas de inmersión**

Se realizó una caracterización fenotípica de los bulbillos utilizados acorde a la edad de inducción *in vitro*. Se cuantificó el número de hojas jóvenes y expandidas por bulbillito. Adicionalmente, se determinó el largo y el diámetro de cada bulbillito. Para ello se utilizó un calibrador Pie de Rey Discover®. Las medidas se realizaron a través del frasco de compota para evitar contaminar el material vegetal antes de su cultivo en el sistema de inmersión. Estas mediciones tenían por objeto dar un

estimado relativo de las diferencias en tamaño de los bulbillos utilizados. El largo del bulbillo corresponde a la longitud entre la base de la placa basal y el inicio donde emergen las hojas. Se definió como hojas jóvenes a las hojas recién emergidas y de menor longitud, y a hojas expandidas a las que su tamaño llegara hasta la tapa del frasco de cultivo (Figura 11). Una vez evaluados los bulbillos, se procedió a eliminar todas las hojas del material bajo condiciones de asepsia, y se cultivaron los bulbillos desprovistos de hojas de acuerdo a los tratamientos descritos a continuación.



**Figura 11.** Bulbillos *in vitro* con sus respectivas hojas jóvenes y expandidas

#### 2.4.6 Cultivo de bulbillos *in vitro* para producción de alcaloides

El número de bulbillos necesarios por cada tratamiento se determinó teniendo en cuenta la investigación realizada por Alizandre (2017). En ese trabajo se utilizaron Erlenmeyer de 50 ml, y se colocaron 5 bulbillos en 10 ml de medio líquido. Los 5 bulbillos dieron en promedio al menos 11.500 mg de material fresco, cantidad límite para poder detectar la producción de alcaloide por repetición de cada tratamiento.

Sin embargo, en este proyecto de grado fue necesario utilizar Erlenmeyers cinco veces más grandes, de 250 ml, dado que el sistema de inmersión temporal requiere una mayor cantidad de medio líquido de al menos 40 ml para funcionar eficientemente. Con base a este requerimiento y el trabajo previo de Alizandre (2017), se decidió mantener la misma proporción de medio líquido por bulbillo (1 bulbillo: 2 ml de medio). Es decir, cultivar 20 bulbillos *in vitro* por 40 ml de medio en Erlenmeyers de 250 ml.

Debido a la falta de disponibilidad de suficientes bulbillos de una sola edad para todos los tratamientos, en cada repetición se realizó una mezcla de 20 bulbillos *in vitro* de distintas edades de inducción (Cuadro 3). Las edades de los bulbillos las podemos dividir en dos categorías: menores de 16 meses de edad, y de 16, 18 o 26 meses de edad. Para evitar posibles variaciones en la producción de alcaloides

entre los tratamientos debido a las diferencias de edad de los bulbillos, se decidió distribuir equitativamente los bulbillos en cada repetición por tratamiento según su edad como se muestra en el Cuadro 3. La proporción de cada edad por recipiente se definió acorde a la disponibilidad del material.

**Cuadro 3.** Distribución de bulbillos por edad por repetición (Erlenmeyer de 250 ml) por tratamiento utilizados para la producción de alcaloides

Edad	No. Bulbillos
26	10
18	3
16	1
7	2
6	3
5	1
<b>TOTAL</b>	20

2.4.6.2 Cultivo de bulbillos *in vitro* para producción de alcaloides en el sistema de inmersión temporal (SIT).

El sistema de inmersión temporal (SIT) consiste en dos recipientes de cultivo (en nuestro caso Erlenmeyers), en uno está el tejido vegetal y en el otro está el medio de cultivo (Figura 9). Estos recipientes están interconectados con mangueras, y a su vez, conectados a una bomba que cuando se activa, permite la inyección de aire al sistema para movilizar el medio líquido de un recipiente a otro por presión. De esta forma, el tejido puede estar inmerso en el medio líquido por un tiempo determinado y controlado. Para instalar el SIT, se necesitan dos “controladores de tiempo” que son programados para las establecer las frecuencias de inmersión durante el día. Uno de los controladores abre una válvula solenoide que permite la penetración del aire a uno de los Erlenmeyers, y como resultado el líquido se pasa por medio de las mangueras, de un recipiente a otro. Después del tiempo establecido de inmersión, se cierra esta válvula y se abre otra mediante el segundo controlador de tiempo, permitiendo la entrada de aire y de este modo, el líquido pasa de nuevo al recipiente inicial (Rosales, Rodriguez, & Omar, 2003).

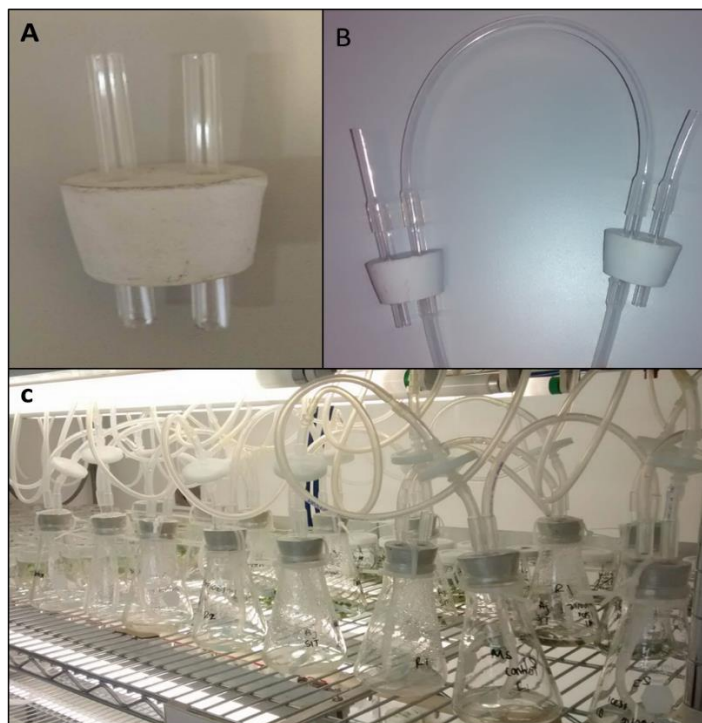
El montaje del sistema de inmersión temporal (SIT) se realizó en las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos de la Unidad de Investigación en Biotecnología

del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, bajo la coordinación y supervisión de Roosevelt Escobar, investigador que tiene amplia experiencia con este tipo de sistemas, y que cuenta con las instalaciones necesarias.

Para el ensamblaje del SIT se utilizaron Erlenmeyers de 250 ml, mangueras de silicona autoclavable de 1/8"ID x 1/4"OD y de 3/16"ID x 5/16"OD (*Tygon Silicone Tubing*), filtros hidrofóbicos de 0,22 mm para filtrar el aire de entrada al sistema, y tapones de Erlenmeyer especiales para alimentos, en los cuales se insertan por corte y presión dos tubos de vidrio de 72mm de largo y 5mm de diámetro atravesando cada tapón, con los que se sellan los Erlenmeyer (Figura 12A).

El proceso de ensamblaje por cada set (repetición) de SIT consistió en lo siguiente:

1. Cortar la manguera de 1/8"ID x 1/4"OD a una longitud aproximada de 5cm
2. Cortar la manguera de 3/16"ID x 5/16"OD mm en dos longitudes diferentes; una de aproximadamente 15 cm y la otra de 10 cm.
3. Introducir una parte de la manguera de 1/8"ID x 1/4"OD dentro de la de mayor diámetro (3/16"ID x 5/16"OD) y de menor longitud (10 cm de longitud), y el otro extremo de la manguera de 3/16"ID x 5/16"OD se conectó a uno de los tubos de vidrio insertado en el tapón por el lado interno
4. Dicho proceso se realizó con todos los tapones, y para cada montaje se necesitó un par Erlenmeyer de 250 ml con su respectivo tapón.
5. Cada sistema SIT consiste en dos Erlenmeyers por repetición, que están unidos por la manguera de 15 cm de longitud en el exterior de los tapones, insertadas en el tubo de vidrio por el lado externo del tapón, que por el lado interno tiene unida la manguera de 10 cm de longitud (Figura 12B) conexión por la cual se absorbe y se pasa el medio líquido de un recipiente a otro.
6. En el tubo de vidrio que se encuentra libre, se coloca la manguera de mayor diámetro con una longitud aproximada de 5cm, a la cual, en su otro extremo se le coloca el filtro de aire.
7. Por último, el extremo del filtro se conecta con el sistema de mangueras del cuarto de cultivo *in vitro*, que tiene una temperatura de 28°C con un fotoperiodo de 12 h luz blanca: 12h oscuridad (figura 12C)



**Figura 12.** Proceso de ensamblaje del sistema de inmersión temporal (SIT). A) tapón insertado con tubos de vidrio. B) Ensamble de mangueras en los tubos de vidrio. C) Sistemas ensamblados y conectados a las mangueras.

Cada sistema SIT se esterilizó en la autoclave durante 1 hora antes de colocar los respectivos medios de cultivo dentro del Erlenmeyer. En la cabina de flujo laminar, para cada SIT se adiciono 40 ml del medio de cultivo previamente esterilizado en uno de los Erlenmeyer, y se dejó almacenado en la oscuridad a temperatura ambiente por dos días para descartar los posibles medios contaminados antes de colocar los bulbillos *in vitro* en cada tratamiento. Para el momento de la siembra de los bulbillos, se llevó cada sistema SIT dentro de la cabina de flujo laminar y se colocaron los bulbillos previamente desarrollados *in vitro* (acorde a la sección 2.4.6.) dentro de Erlenmeyer que contenía el medio de cultivo. Este procedimiento se realizó con cuidado de no tocar la boquilla del recipiente, posteriormente la boquilla de cada Erlenmeyer se flameó, se selló con el tapón respectivo, y se colocaron amarras alrededor del tapón para que éste no se saliera debido a alta presión que se genera al circular aire por el sistema. Se evaluaron dos tipos de medios líquidos, el MS sin (control) o con 50 uM de ácido jasmónico (MSAJ). Para cada medio se evaluaron 3 repeticiones, cada una con 20 bulbillos de acuerdo a la composición de edades indicadas en el Cuadro 3, para un total de 60 bulbillos evaluados por cada medio, y de 120 bulbillos evaluados para los dos tratamientos (MS y MSAJ). El temporizador se programó para que los bulbillos estuvieran sumergidos en el medio de cultivo líquido respectivo por 15 minutos con una frecuencia de inmersión cada 8 horas. El sistema estuvo en un cuarto de cultivo a 28°C con un fotoperiodo de 12 h luz blanca 12h oscuridad, Se realizaron evaluaciones visuales periódicas cada 7

días aproximadamente para confirmar el estado de desarrollo de los bulbillos y confirmar si había contaminación del medio líquido. El experimento duro 13 días, tiempo aproximado al utilizado por Alizandre (2017)

#### 2.4.6.1 Cultivo de bulbillos *in vitro* para producción de alcaloides en sistema de inmersión permanente (SIP, control)

Este proyecto de grado se basó en el trabajo previo realizado por Alizandre (2017), en el cual se empleó el sistema de inmersión permanente (SIP) para evaluar la producción y liberación de alcaloides del material vegetal al medio líquido, experimentos realizados en la Universidad Icesi. Por lo tanto, el SIP se utilizó como tratamiento control para comparar la eficacia del SIT. Dado que el SIT se encontraba en las instalaciones del CIAT, fue necesario incluir un control SIP adicional en la Universidad Icesi, debido a las diferencias en temperaturas y fotoperíodo entre los cuartos de cultivo de las dos localidades, factores que pueden afectar la síntesis de alcaloides.

En el caso de SIP, los Erlenmeyer se taparon con papel aluminio, se esterilizaron en la autoclave y el medio de cultivo líquido esterilizado por filtración fue servido en la cabina de flujo laminar. Una vez cultivados los bulbillos *in vitro* como se describió en la sección 2.4.5, los Erlenmeyer se colocaron en un skaker Heidolph tipo Unimax 1010DT a 110 rpm por 13 días. Se evaluaron 2 repeticiones para cada medio de cultivo líquido, cada repetición con 20 bulbillos, para un total de 40 bulbillos por medio MS sin ácido jasmónico (control) o con 50  $\mu\text{M}$  de ácido jasmónico (MSAJ) en el CIAT bajo las mismas condiciones de temperatura, fotoperíodo y humedad relativa utilizadas con el sistema SIT en el CIAT (28°C con un fotoperíodo de 12h luz blanca; 12h oscuridad); y una sola repetición de medio MS (control) y una de MSAJ para un total de 20 bulbillos por tratamiento en las instalaciones de la Universidad Icesi a 16 h de luz blanca y 8 h de oscuridad, temperatura de 25°C y humedad relativa de 44%.

#### 2.4.7 Preparación del medio MSAJ líquido con o sin ácido jasmónico para el cultivo de bulbillos *in vitro* en el SIT y SIP

El medio MSAJ es un medio MS líquido que contiene 50  $\mu\text{M}$  de ácido jasmónico. Para preparar la solución stock de 1000 ppm (1mg/ml) de ácido jasmónico (AJ), se disolvió el AJ en el menor volumen posible de etanol absoluto y se llevó al volumen final con agua deionizada tipo 2. El stock fue esterilizado por filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu$ , proceso que se realizó en la cabina de flujo laminar. Posteriormente, el stock estéril se alícuotó en tubos Eppendorf y se almacenó en la nevera hasta su uso. Para preparar 1 L de medio MSAJ 50  $\mu\text{M}$ , se preparó el medio MS sin BAP y sin gelificante, y se esterilizó por filtración de acuerdo al Cuadro 2 y la Sección 2.4.4. Posteriormente, se agregó 10,5 ml del stock AJ 1 ppm por cada 1 L de medio líquido en la cabina de flujo laminar, se homogenizó bien manualmente, y se sirvió 40 ml de medio MSAJ por cada Erlenmeyer de 250 ml.

$$\frac{1ml}{mg} \times \frac{210,27 mg}{1mmol} \times \frac{1mmol}{1 \times 10^3 \mu mol} \times \frac{50 \mu mol}{l} \times \frac{1 l}{10000ml} \times 1000ml$$

*= 10,5 ml de AJ 1 ppm por cada 1L de solución*

#### 2.4.9 Evaluación y procesamiento del material antes de la extracción de alcaloides

Después de 13 días de cultivo en SIP o SIT, se procedió a traspasar en tubos Falcón® estériles el material vegetal y el medio líquido donde estuvieron cultivados los bulbillos en la cabina de flujo laminar, para ser procesados posteriormente. El peso fresco del material vegetal (bulbillos y hojas) por repetición de cada tratamiento fue determinado el mismo día de finalización del experimento. Posteriormente, el material vegetal fue secado en un horno a 45°C por 3 días, y se determinó su peso seco además de ser procesado para la extracción de alcaloides (sección 2.4.11). El medio líquido fue primero evaluado por contaminación (sección 2.4.10) y posteriormente procesado para la extracción de alcaloides (sección 2.4.11).

#### 2.4.10 Comprobación de la contaminación del medio líquido MS y MS con AJ

Se realizó una prueba de contaminación de bacterias y hongos sembrando una alícuota de las respectivas muestras de medio líquido de cada repetición por tratamiento, en un medio LB MILLER (Merck®), que contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos. La preparación se hizo pesando 25g de caldo LB MILLER (Merck®), y 15g de agar-agar (Scharlau®) y posteriormente se adicionó a un frasco Shott con 1L de agua y se autoclavó. Después de su esterilización, se sembró 100µl de las muestras de medio líquido de cada repetición por tratamiento colectadas en tubos Falcón® con ayuda de asas estéril en forma de L, por último, se dejó encubando por 48 horas en un horno a 37°C. Pasado el lapso del tiempo se observó la presencia o ausencia de bacterias y hongos.

#### 2.4.11 Extracción de alcaloides

Para la extracción de alcaloides tanto del material vegetal como del medio líquido, se utilizó el protocolo de extracción optimizado por el profesor Guillermo Montoya, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Icesi (comunicación personal).

**Para la extracción del material vegetal se realizó el siguiente protocolo:**

1. El material vegetal obtenido después de la experimentación, se incubó por 3 días al horno a una temperatura de 45°. Una vez cumplido este tiempo, se retiró el material del horno y se revisó si se fragmentaba con facilidad para confirmar que estaba bien seco.
2. Se maceró el material vegetal en morteros con la adición de nitrógeno líquido para facilitar su fragmentación.
3. Se pesó en un tubo Falcón, aproximadamente 150 mg del material vegetal macerado.
4. Posteriormente se adicionó al tubo Falcón 5 ml de metanol grado HPLC.
5. Se agitó con vortex o en el sonicador por 5 min.
6. Se centrifugó por 5 min a una temperatura de 24°C y 5000 rpm.
7. En un Erlenmeyer de 50 ml se adicionó el sobrenadante.
8. Se agregó al pellet 5 ml de metanol grado HPLC
9. Se repitió el paso 7 y 8
10. Al mismo Erlenmeyer del paso 7 se le agregó el sobrenadante
11. Al pellet se le adicionó 5 ml de HCl 0.1 N
12. Se agitó con vortex o en el sonicador por 5 min
13. Se agregó el sobrenadante al Erlenmeyer del paso 7
14. Se añadió 10 ml de cloroformo al Erlenmeyer que contiene los sobrenadantes de los pasos 7, 10 y 13.
15. Se adicionó la muestra difásica del paso 14 a un embudo de separación.
16. Se separó la fase acuosa de la fase orgánica. Descartando la fase orgánica
17. Posteriormente a la fase acuosa, se le agregó 2 gotas de hidróxido de amonio al 30% para modificar el pH, el cual debe estar entre 9 y 10
18. Se agregó 10 ml de cloroformo y se traspasa la fase difásica a un Erlenmeyer de 150ml
19. Se colocó en un shaker VWR a una velocidad de 160 rpm por un lapso de tiempo de 3 horas.
20. Pasado el tiempo, se agregó la muestra difásica a un embudo de separación
21. Se separó la fase orgánica de la acuosa, descartando la fase acuosa
22. La fase orgánica se pasó a secar en un rapidvap con las siguientes condiciones; Temperatura: 40°C, Vacío: 280 bares, Velocidad 12 rpm, Tiempo 120 minutos.
23. Se preparó una solución de Boldina a una concentración de 100 ppm en metanol grado HPLC
24. Se reconstituyó las muestras previamente secadas con 1 ml de solución Boldina 100 ppm
25. Se filtraron las muestras reconstituidas con un filtro de membrana de 0.22 µm de nylon
26. Se colocaron las muestras filtradas en viales de UPLC
27. Se colocaron los viales en el equipo de cuantificación UPLC/MS



### **Para la extracción del medio líquido se realizó el siguiente protocolo**

1. Se tomó 40ml de muestra y se añade 5ml de HCl 0.1N.
2. Se colocó en agitador vortex o en el sonicador por 5 min
3. Se centrifugo por 5 min a una temperatura de 24°C y 5000 rpm.
4. Se agregó el sobrenadante a un embudo de separación.
5. Después, se agregó 10ml de cloroformo al embudo.
6. Se separó la fase acuosa de la fase orgánica. Descartando la fase orgánica
7. Posteriormente a la fase acuosa, se le agrega 2 gotas de hidróxido de amonio al 30% para modificar el pH, el cual debe estar entre 9 y 10
8. Se agregó 10 ml de cloroformo y se traspasa la fase difásica a un Erlenmeyer de 150ml
9. Se colocó en un Shaker VWR a una velocidad de 160 rpm por un lapso de tiempo de 3 horas
10. Pasado el tiempo, se agregó la muestra difásica a un embudo de separación
11. Se separó la fase orgánica de la acuosa, descartando la fase acuosa
12. La fase orgánica se pasó a secar en un rapidvap con las siguientes condiciones; Temperatura: 40°C, Vacío: 280bares, Velocidad 12rpm, Tiempo 120 minutos.
13. Se preparó una solución de Boldina a una concentración de 100ppm en metanol grado HPLC
14. Se reconstituyó las muestras previamente secadas con 1 ml de solución Boldina 100ppm
15. Se filtró las muestras reconstituidas con un filtro de membrana de 0.22 um de nylon
16. Se colocó las muestras filtradas en viales de UPLC
17. Se colocaron los viales en el equipo de cuantificación UPLC/MS

#### 2.2.12 Análisis, cuantificación e identificación de alcaloides

Se emplearon dos tipos de análisis para la detección de alcaloides. Primero, se utilizó la prueba de Dragendorff, la cual se define como un análisis cualitativo de alcaloides que consiste en realizar una cromatografía de capa fina, y posteriormente revelar la presencia de alcaloides con una prueba colorimétrica con el reactivo de Dragendorff. Este reactivo está compuesto nitrato de bismuto ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ), ácido tartárico y yoduro de potasio (KI) (Cortes, 2013). Dicho reactivo revela la presencia de alcaloides con la formación de un precipitado de color naranja rojizo. La prueba de Dragendorff se empleó como evaluación preliminar para conocer si las muestras tenían presencia o no de alcaloides. Posteriormente, y como prueba final, se identificaron y cuantificaron los alcaloides utilizando el equipo UPLC acoplado a masas [Waters, Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ), Universidad Icesi].

### Cuantificación de alcaloides por medio de la prueba de Dragendorff

Para realizar la cromatografía de capa fina se empleó una placa de silicato de 10 x 10 cm, y se marcó con lápiz a 1 cm del borde inferior de la placa, líneas de 7mm de largo, separadas por 5 mm de distancia. Posteriormente, con ayuda de un capilar, se sembró una cantidad de 30 µl de cada una de las muestras en las líneas trazadas. Después, la placa se introdujo en una cubeta cromatográfica, de forma que sólo la parte inferior de la placa queda sumergida en la solución de metanol 95: 5 de acetato de etilo. Se dejó que el solvente suba por capilaridad hasta unos 7 cm del punto donde se encuentran las muestras. Luego, se dejó secar y se roció con el reactivo de Dragendorff. Por último, se utilizó un revelador para observar la coloración naranja en la placa.

### Cuantificación de alcaloides por UPLC-masas

Como prueba final, se cuantificaron los alcaloides empleando el equipo UPLC/MS Waters® (SQD2) utilizando las condiciones indicadas en el Cuadro 4. Estas condiciones fueron tomadas del trabajo de grado de Marcela Rivera que realizó una biblioteca espectral de alcaloides de Amaryllidaceae y definió los reactivos a utilizar para el análisis por UPLC/MS (Cuadro 5).

**Cuadro 4.** Condiciones para la cuantificación de alcaloides ingresadas en UPLC/MS

Columna	Temp.	Fase móvil	Flujo	Voltaje de cono	Flujo gas	Masas	SIR	ES+
ACQUITY CSH (Charged Surface Hybrid) 2.1 mm x 100. Tamaño de partícula 1.7 µm	25°C	Solvente A: Agua (0.05% de Ácido fórmico) Solvente B: Acetonitrilo	0.3ml/min	50 V	650L/ Nitrógeno	10-600m/carga	265.3 m/z, 328.3m/z	Ionización Positiva

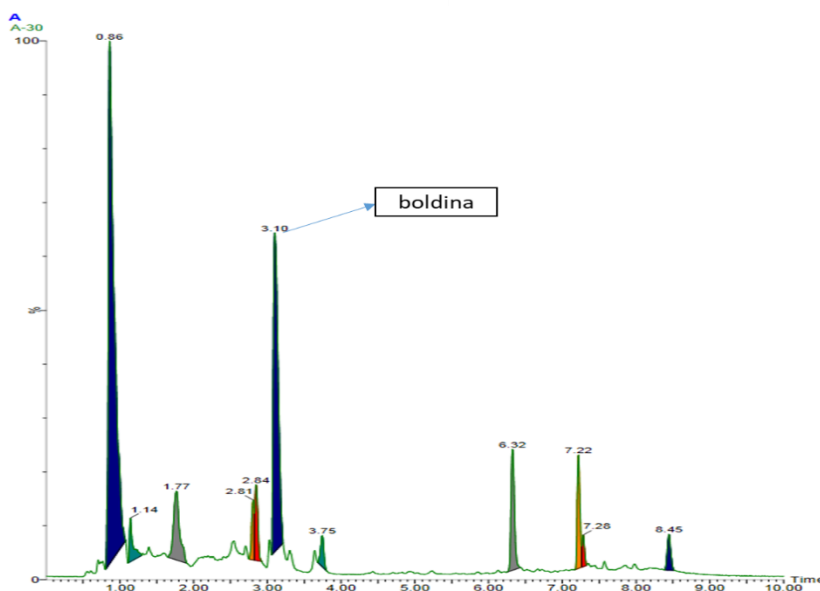
**Cuadro 5.** Reactivos para el análisis de alcaloides en el UPLC/MS

Reactivo	Pureza	Marca
Acetonitrilo grado hypergrade	99,9%	MERCK

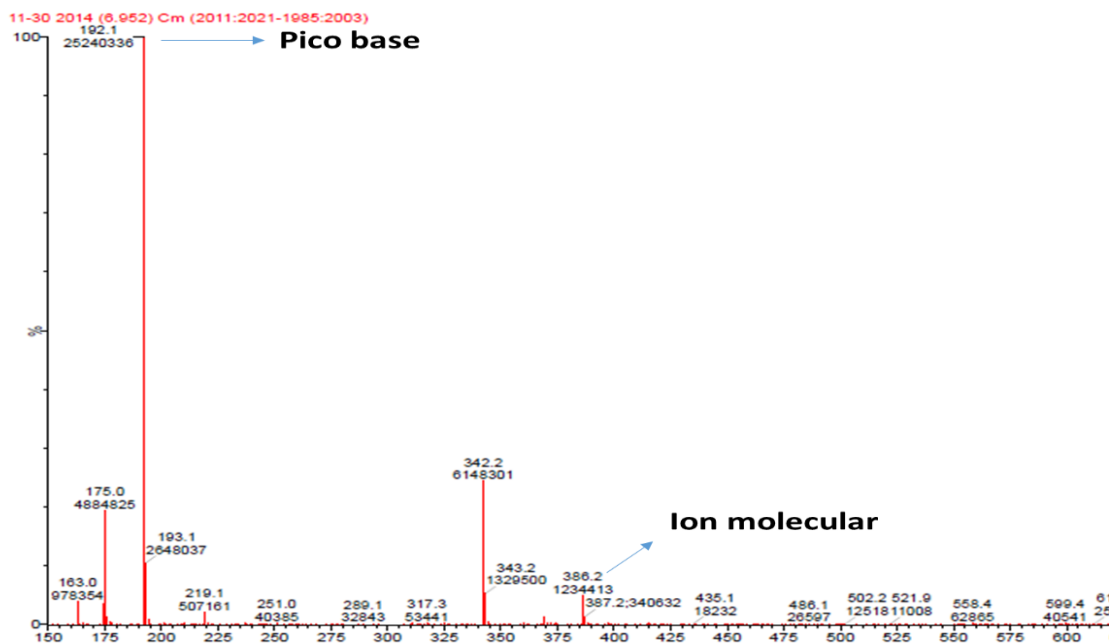
Ácido fórmico	85%	ALDRICH Chemistry
---------------	-----	-------------------

## Identificación de alcaloides

Para la identificación de alcaloides se comparó con los resultados obtenidos en el proyecto de grado de Daniela Alizandre (2017), el artículo de Katoch y colaboradores (2012), el proyecto de grado de Marcela Rivera (2015) y el artículo de Zhan y colaboradores (2017), donde se comparó los espectros arrojados por el cromatógrafo y el espectrómetro de masas de cada muestra obtenida con el equipo UPLC/MS referencia Waters® (SQD2) y el software masslinx. Para dicho análisis se evaluó el tiempo de retención, el pico base y el ion molecular de cada molécula obtenida en las muestras. Como ejemplo el espectro cromatográfico de la Figura 13 que muestra el tiempo de retención y el área de cada molécula presente en la muestra. De igual forma, el espectro de masas (Figura 14) muestra el peso molecular y el pico base de la molécula.



**Figura 13.** Espectro cromatográfico donde se observa el tiempo de retención y área de cada molécula en una muestra. Además del tiempo de retención (3,10) y área de la boldina. En el eje X se encuentra el tiempo de retención y en el eje Y el valor del pico de retención.



**Figura 14.** Espectrometría de masas donde se observa el pico base y el ion molecular de una molécula en específica, en un tiempo de retención de 6,9. En el eje X se tiene la relación masa carga ( $m/z$ ) y en el eje Y indica las fragmentaciones más abundantes de la molécula.

### Semicuantificación de alcaloides

Como estándar para la cuantificación de alcaloides se empleó la boldina, utilizado en los proyectos de grado de Daniela Alizandre (2017) y Camila Tofiño (2017), ya que es un alcaloide con estructura similar a los encontrados en la familia de las Amaryllidaceae (Alizandre, 2017). Para la semicuantificación de alcaloides, se analizó el área bajo la curva de la boldina (Figura 10), que se encontraba a una concentración de 50ppm. En contraste, con el área bajo la curva de los otros compuestos presentes en la muestra y se calculó la concentración de cada molécula (ecuación 2). Esta información la provee el software masslinx. Adicionalmente, se determinó la concentración porcentual peso en el material vegetal y en el medio líquido, utilizando la ecuación 3 y 4 respectivamente.

$$\frac{\text{Area del alcaloide} \times 50\text{ppm}}{\text{Area de la boldina}} = \left(\frac{mg}{L}\right) \text{ concentración del alcaloide (2)}$$

$$\% \frac{p}{p} = \left(\text{concentración del alcaloide} \frac{[mg]}{L} \times \frac{1 L}{1000 mL} \times \frac{1 mL \text{ metanol HPLC}}{\text{peso seco muestra vegetal}}\right) * 100 \text{ (3)}$$

$$\% \frac{p}{v} = \left(\text{concentración del alcaloide} \frac{[mg]}{L} \times \frac{1 L}{1000 mL} \times \frac{1 mL \text{ metanol HPLC}}{\text{Vol muestra medio líquido}}\right) * 100 \text{ (4)}$$

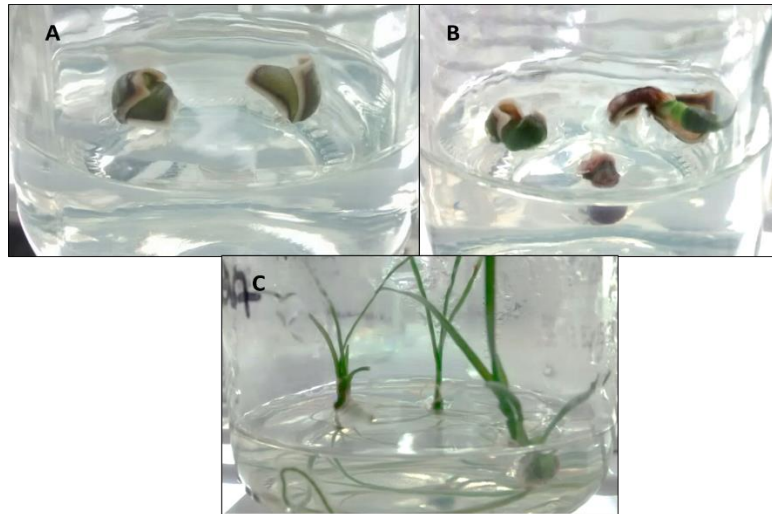
#### 2.4.13 Diseño experimental y análisis estadísticos

Para la determinar la concentración de cada alcaloide en las muestras, se calculó el promedio, la desviación estándar y el error estándar de las repeticiones por cada tratamiento. Para obtener el contenido total de alcaloides por repetición y tratamiento, se realizó la sumatoria de los diferentes tipos de alcaloides obtenidos. Los resultados se compararon para tener un estimado de los contenidos de alcaloides en las muestras vegetales (peso seco) y sus respectivos medios líquidos (volumen de extracción). Se empleó Excel para generar las tablas y los distintos cálculos necesarios para el análisis estadístico. Además del software Masslinx® que provee los espectros de cromatógrafo y de masas de cada muestra.

### 2.5 RESULTADOS

#### 2.5.1 Inducción de bulbillos a partir de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero

De los 70 pares de escamas cultivadas, se contaminaron 4 pares (6% de contaminación), y de las no contaminadas, el 60% (40 escamas) formaron bulbillos. La respuesta en inducción de bulbillos varió entre 2 a 3 bulbillos por cada par de escamas, lo que dio como resultado un total 126 bulbillos. Las escamas que no tuvieron respuesta, cambiaron su coloración a un verde oscuro a las 3 semanas de cultivo (Figura 15A). En contraste, las escamas con respuesta primero se tornaron de color rojizo, y a las 3 semanas de siembra, el par de escamas se separaron y se observó la formación de brotes (Figura 15B). Después de un mes de inducción en el medio semi-sólido MSA1 se desarrollaron en bulbillos y hojas, y posteriormente fueron sub-cultivados en el medio MS para su crecimiento (Figura 15C).

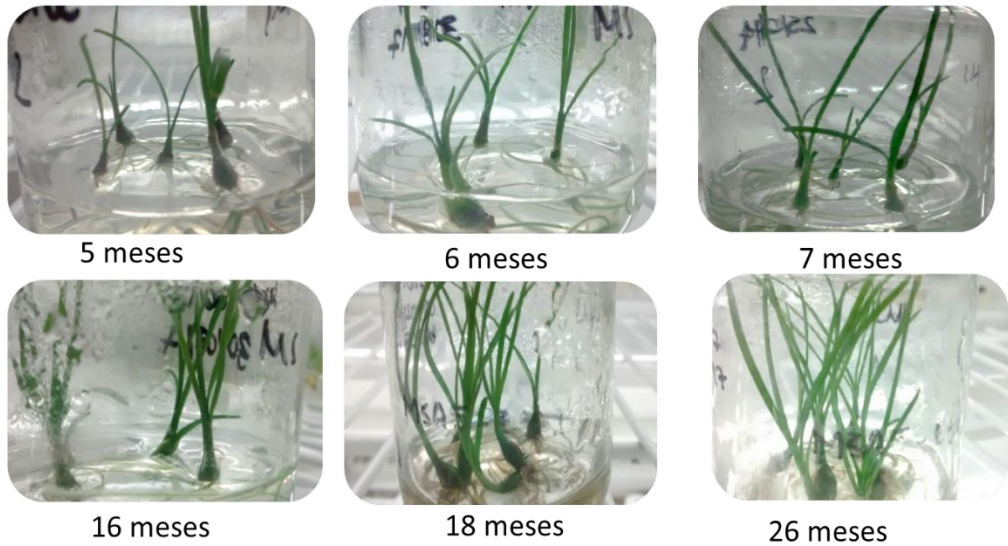


**Figura 15.** Inducción de bulbillos *in vitro* a partir de la siembra de escamas de bulbos del invernadero utilizando la técnica *twin-scale*. A) Escamas sin respuesta de color verde oscuro. B) Escamas con respuesta en medio MSA1, mostrando coloración rojiza y formación de brotes. C) Sub-cultivo al medio MS para el desarrollo y crecimiento de los bulbillos y hojas formados *in vitro*.

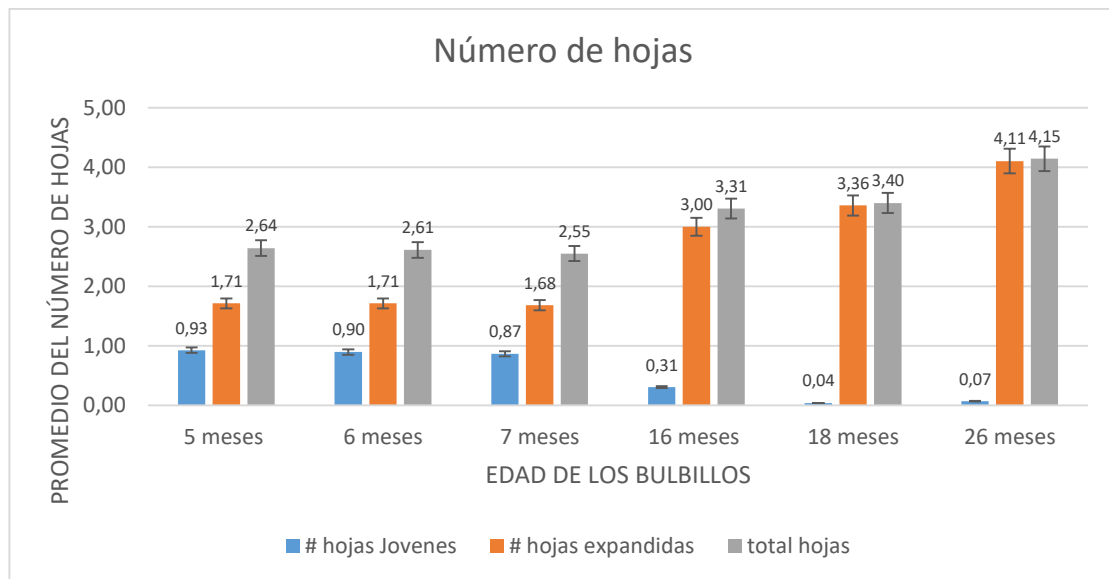
Las escamas fueron sembradas en los meses de febrero, marzo y abril del 2017 para asegurar que se tuvieran bulbillos bien desarrollados para iniciar los tratamientos que estimularan la producción de alcaloides. Los bulbillos inducidos en este proyecto tenían 5, 6 y 7 meses de edad al momento de iniciar los tratamientos. Sin embargo, fue necesario incluir otro set de bulbillos, al no disponer de suficiente material vegetal para realizar todos los tratamientos del proyecto. De manera que se subcultivaron bulbillos *in vitro* que habían sido inducidos anteriormente en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi. Estos bulbillos tenían 16, 18 y 26 meses de edad al momento de la experimentación. Motivo por el cual se realizaron mezclas de los bulbillos de las diferentes edades, compuestas por la misma proporción de bulbillos de cada edad por repetición, para así distribuir el posible efecto que la edad del bulbillito puede tener en los factores evaluados.

### 2.5.3 Evaluación del material *in vitro* antes del cultivo en sistemas de inmersión

En general se observó que a mayor edad de inducción, se incrementa el número de hojas totales y expandidas, y se disminuye el número de hojas jóvenes (Figura 16). Esta tendencia es marcada a partir de los 16 meses de edad en adelante. El material vegetal más joven, de 5 a 7 meses de edad, tuvo un 40% menos de hojas respecto al de mayor edad (26 meses), y aproximadamente el 50% de sus hojas son jóvenes. (Figura 17).

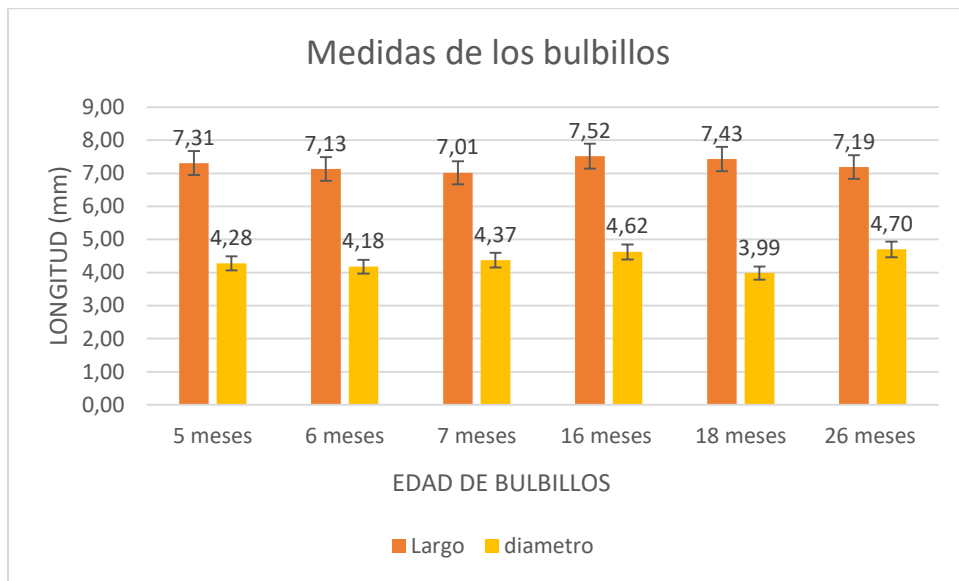


**Figura 16.** Formación de hojas y desarrollo a partir de bulbillos de distintas edades de inducción *in vitro*. Los bulbillos de menor edad (5, 6 y 7 meses) presentaron un menor número de hojas totales, y la mayoría de sus hojas eran jóvenes. Los bulbillos de mayor edad (16,18 y 26 meses) presentaron un mayor número de hojas totales y sus hojas tuvieron una mayor longitud.



**Figura 17.** Número de hojas jóvenes, expandidas y totales promedio de cada edad de bulbillos.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ni en el tamaño ni en el diámetro de los bulbillos respecto a la edad del cultivo (Figura 18).



**Figura 18.** Largo y diámetro de los bulbillos de cada edad de inducción.

Dado que el número y desarrollo de las hojas mostró grandes diferencias dependiendo de la edad de los bulbillos, se procedió a retirar todas las hojas de cada bulbillo antes de su cultivo en el SIT o SIP, para evitar que esta variable influenciara las comparaciones entre los diferentes tratamientos aplicados posteriormente.

### 2.5.5 Evaluación y procesamiento del material antes de la extracción de alcaloides

En general, se encontró un mayor desarrollo de los bulbillos en el medio sin ácido jasmónico (medio MS control). La adición de 50  $\mu$ M en el medio redujo el crecimiento de los bulbillos independientemente del sistema de cultivo utilizado (SIT o SIP), o las condiciones de cultivo (temperatura o fotoperiodo en CIAT o Icesi) (Cuadro 6, Figuras 19 y 20). Los bulbillos en el medio control presentaron en promedio un incremento total del 20% y 42% en peso fresco y peso seco respectivamente, en comparación con el medio con ácido jasmónico (Cuadro 6). Los bulbillos en el medio control presentaron un promedio de peso fresco por bulbillo que osciló entre 212 y 225 mg, mientras que con ácido jasmónico el peso fresco varió entre 115 y 200 mg por bulbillos (Figura 19). Estas diferencias fueron más marcadas en el peso seco por bulbillo. Los bulbillos presentaron en promedio de 35 a 38 mg en peso seco en el medio control, y entre 22 y 25 mg en peso seco en el medio con ácido jasmónico (Figura 20). Los bulbillos con menor peso fresco se presentaron en el sistema de inmersión temporal con ácido jasmónico, mientras que el tratamiento con mayor

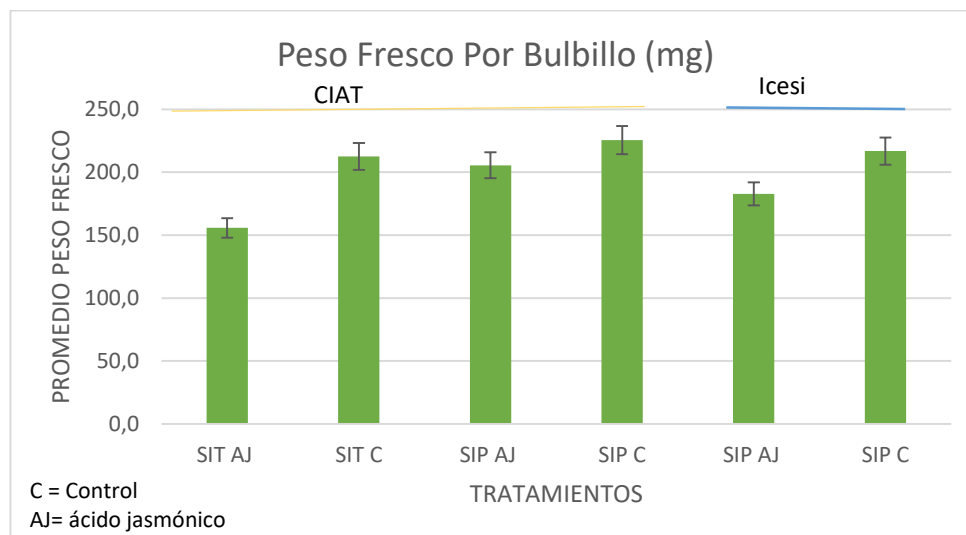


peso fresco y seco fue el control en sistema de inmersión permanente, ambos en las condiciones del CIAT (Figuras 19 y 20).

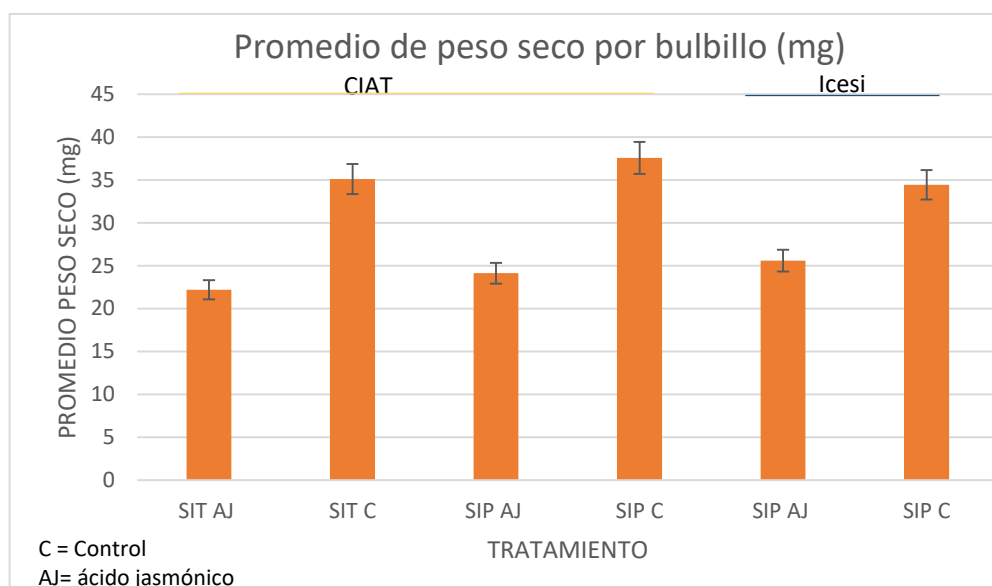
**Cuadro 6.** Peso seco y peso fresco total de los 20 bulbillos por repetición después de 13 días de cultivo en SIT o SIP con o sin ácido jasmónico.

	CIAT (28°C, 12 hr luz/ 12 hr oscuridad)								Icesi (25°C, 16 hr luz/ 8 hr oscuridad)			
	SIT				SIP				SIP			
	AJ		Control		AJ		Control		AJ		control	
	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS
PROMEDIO (g)	3,12	0,44	4,25	0,70	4,11	0,48	4,51	0,75	3,66	0,58	4,34	0,69
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,26	0,09	0,50	0,03	0,42	0,04	0,63	0,01	NA	NA	NA	NA
REPETICIONES (N)	3		3		2		2		1		1	

SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50 µM de ácido jasmónico, Control= medio MS sin ácido jasmónico. NA = no aplica, no fue posible incluir mas de una repetición por falta de material vegetal.

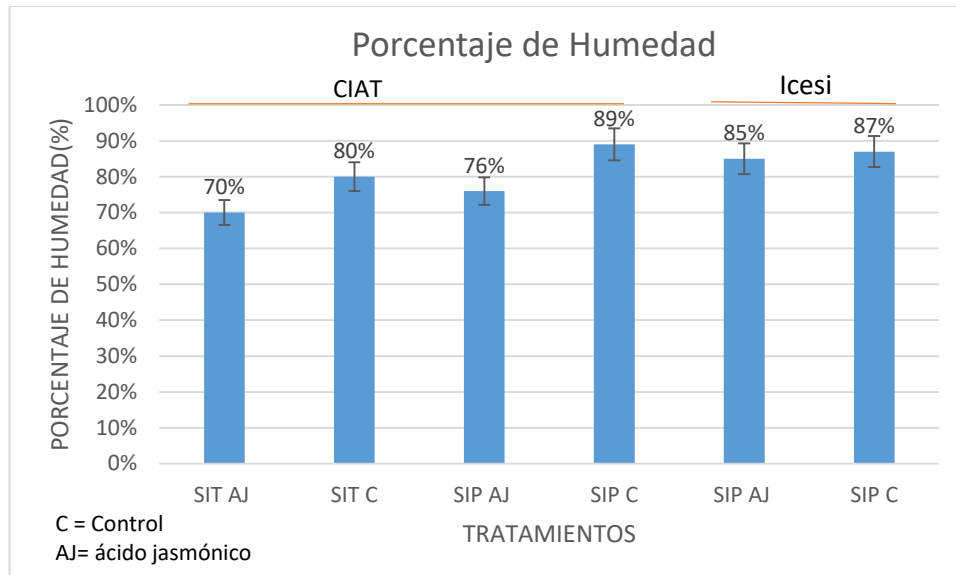


**Figura 19.** Peso fresco por bulbillo por cada tratamiento después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico. SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50µM de ácido jasmónico, C= control, medio MS sin ácido jasmónico. Promedio y desviación estándar.



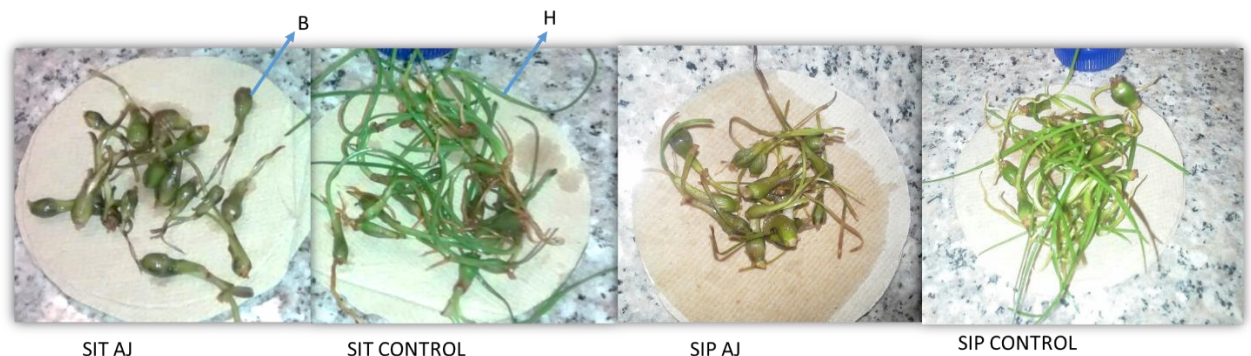
**Figura 20. Peso seco por bulbillo de cada tratamiento después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico.** SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50 $\mu$ M de ácido jasmónico, C= control, medio MS sin ácido jasmónico. Promedio y desviación estándar.

Se observaron diferencias similares entre los distintos tratamientos en cuanto al porcentaje de humedad de los bulbillos (Figura 21). Los bulbillos cultivados en SIT con ácido jasmónico fueron los que mostraron el menor porcentaje de humedad respecto al resto de los tratamientos (Figura 21). En general, los bulbillos en el SIT mostraron un menor porcentaje de humedad respecto a los de SIP. Sin embargo, el efecto del ácido jasmónico fue significativo solo en los tratamientos cultivados a mayor temperatura en el CIAT (28°C), mientras que, a 25°C, temperatura de cultivo en Icesi, estas diferencias no son significativas (Figura 21).



**Figura 21. Porcentaje de humedad por bulbillo de cada tratamiento después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico.** SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50 $\mu$ M de ácido jasmónico, C= control, medio MS sin ácido jasmónico. Promedios y desviación estándar.

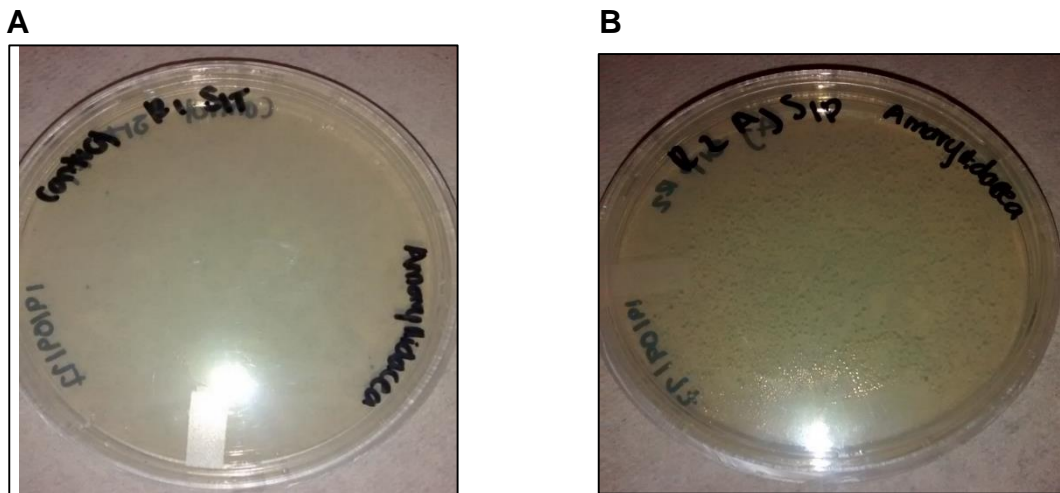
Además de las diferencias en el crecimiento de los bulbillos dependiendo del tratamiento, también se observaron diferencias en el desarrollo de las hojas. A la semana de experimentación, se observó que los bulbillos en el SIT o SIP con ácido jasmónico presentaban una coloración rojiza en sus hojas, y poco crecimiento de éstas con respecto al control. Este patrón se observó tanto en los tratamientos en el CIAT como en la Universidad Icesi. Estas diferencias entre los tratamientos con ácido jasmónico y control fueron mayores al finalizar el experimento a los 13 días de cultivo. Se observó que para los tratamientos controles tanto en SIT como en SIP, las hojas y raíces del material vegetal mostraron un mayor desarrollo respecto a la primera semana de cultivo, mientras que no se observaron cambios aparentes en los tratamientos con ácido jasmónico (Figura 22). Vale la pena destacar también que al finalizar el experimento, en el tratamiento SIT control, las hojas mostraron un mayor desarrollo y un color verde más intenso respecto a las del tratamiento SIP control a pesar que en este tratamiento los bulbillos parecen mostrar un mayor desarrollo (son más gruesos) (Figura 22).



**Figura 22. Desarrollo del tejido vegetal a finalizar el experimento después de 13 días de cultivo.** B = bulbillo, H = hoja. SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50µM de ácido jasmónico, Control = medio MS sin ácido jasmónico.

### 2.5.6 Comprobación de la contaminación del medio líquido MS control y MS con AJ

Una vez finalizado los experimentos y antes de procesar el medio líquido para la extracción de alcaloides, cada repetición fue evaluada por la presencia de bacterias y hongos (Figura 23). Los resultados sugieren que gran parte (75%) de las repeticiones se encontraban contaminadas con bacterias (Cuadro 7).



**Figura 23. Prueba de contaminación de bacterias y hongos del medio líquido de cada repetición por tratamiento al finalizar el experimento.** Se sembró una alícuota de las respectivas muestras en medio LB MILLER. A) muestra de control RI SIT no contaminada. B) Muestra de SIP AJ contaminada

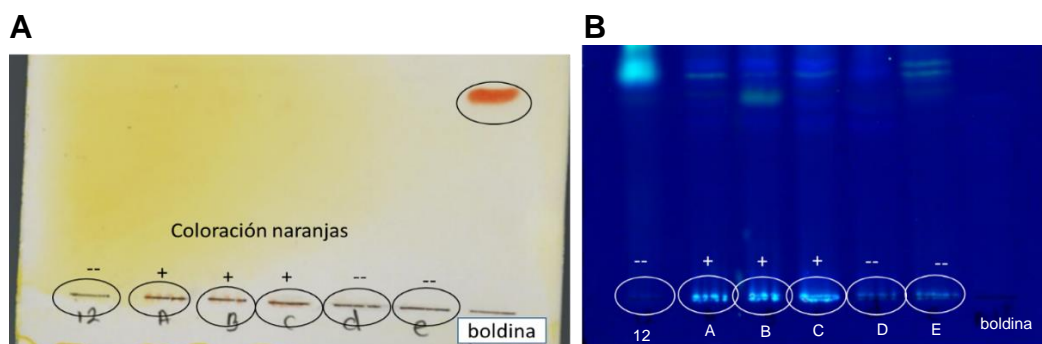
**Cuadro 7.** Evaluación de presencia de contaminación con bacterias u hongos en muestras del medio líquido de cada repetición.

CONTAMINACIÓN CON BACTERIAS		
	SI	NO
SIT AJ R1	X	
SIT AJ R2		X
SIT AJ R3	X	
SIT CT R1		X
SIT CT R2	X	

SIT CT R3	X	
SIP AJ R1	X	
SIP AJ R2	X	
SIP CT R1	X	
SIP CT R2	X	
SIP AJ R1 (ICESI)		X
SIP CT RI (ICESI)	X	
<b>TOTAL 12 REPETICIONES</b>	<b>9</b>	<b>3</b>

### 2.5.7 Análisis, cuantificación e identificación de alcaloides

El material vegetal se identificó con letras que van de la A a la M, y las muestras del medio líquido se identificaron con números de 1 a 12. El alcaloide boldina se utilizó como control (+) para el revelado de la presencia de alcaloides. Esta prueba colorimétrica permitió detectar la presencia de alcaloides en algunas de las muestras (Figura 24). Sin embargo, la sensibilidad de esta prueba es muy baja, por lo que la interpretación de los resultados solamente se presenta con base a los análisis realizados por cromatografía líquida de alta resolución, UPLC-masas.



**Figura 24. Evaluación cualitativa por presencia de alcaloides en muestras del material vegetal y del medio líquido utilizando cromatografía de capa fina (TLC). (A)** Revelado con reactivo Dragendorff, donde se observa la coloración naranja indicativo de la presencia de alcaloides. Boldina control (+). **(B)** TLC evaluado por fluorescencia con el analizador de geles LW215 Martgel®. Presencia de alcaloides (+), ausencia de alcaloides (-).

### 2.5.8 Identificación de alcaloides

Para la identificación de los alcaloides se utilizó como referencia los tiempos de retención y fragmentaciones ( $m/z$ ) de los alcaloides reportados en otros proyectos con *Zephyranthes carinata* (Alizandre, 2017), y otras especies de la familia amarilidáceas (Katoch y colaboradores, 2012; Rivera, 2015). En las muestras analizadas se identificaron un total de 23 alcaloides potenciales (Cuadro 8). No obstante, no todos los posibles alcaloides mostraron un patrón similar a los otros previamente reportados en los otros trabajos, por lo tanto, estos nuevos alcaloides

potenciales fueron denominados como “*Desconocidos*”. Dado que en los trabajos previos realizados en el grupo de investigación ya se habían reportado otros alcaloides desconocidos, se decidió denominar los nuevos alcaloides desconocidos con un número diferente y consecutivo a los utilizados en los trabajos previos (Alizandre 2017, Tofiño, 2017). Se utilizó la misma denominación reportada en Alizandre (2017) y Tofiño (2017), solo en los casos que los espectros de los alcaloides obtenidos en este proyecto coincidieran con los de esos trabajos.

En el material vegetal se encontraron 7 posibles alcaloides de un total de 23 alcaloides identificados en todas las muestras analizadas. Mientras que en el medio líquido se identificaron hasta 21 alcaloides potenciales (Cuadros 8 y 9). La mayor diversidad de alcaloides en el medio líquido (total 15) se obtuvo con SIP con ácido jasmónico a 28°C (CIAT), mientras que la menor diversidad de alcaloides se observó en el SIP control a 25°C (Icesi) (Cuadro 9). La hemantamina y la vitatina se detectaron en todos los tratamientos, tanto en el material vegetal como en el medio líquido. Mientras que el desconocido 30, la licoramina, y la ambellina fueron únicos del tejido vegetal. Se identificaron 13 alcaloides únicos en el medio líquido: zaideina, los desconocidos del 16 al 22, 24, 28 y 29. No obstante, se observó que la zaideina, y los desconocidos 17, 21 y 22, solo estuvieron presentes en el SIP AJ a 28°C. Por otro lado, el desconocido 29 fue solo detectado en el SIT AJ en medio líquido a 28°C. En general se observa mayor diversidad de alcaloides en el medio líquido en los tratamientos a 28°C (entre 6 y 15 alcaloides) respecto a los correspondientes a 25°C (entre 4 y 7 alcaloides).



**Cuadro 9.** Diversidad de estructuras alcaloidales identificados en el tejido vegetal y medio líquido a partir de bulbillos de *Zephyranthes carinata* después de 13 días de cultivo en SIT o SIP con o sin ácido jasmónico 50 µM.

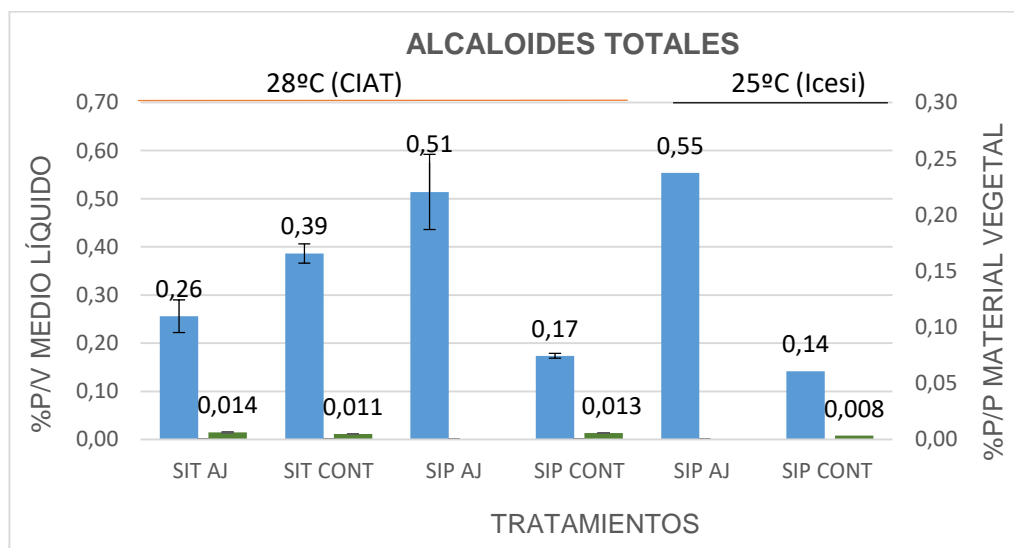
ALCALOIDE	MATERIAL VEGETAL						MEDIO LÍQUIDO					
	28°C				25°C		28°C				25°C	
	SIT AJ	SIT C	SIP AJ	SIP C	SIP AJ	SIP C	SIT AJ	SIT C	SIP AJ	SIP C	SIP AJ	SIP C
LICORAMINA												
HAMAYNA												
ZAIDEINA												
HEMANTAMINA												
VITATINA												
AMBELLINE												
DESCONOCIDO 16												
DESCONOCIDO 11 (ALIZANDRE,2017)												
DESCONOCIDO 17												
DESCONOCIDO 18												
DESCONOCIDO 19												
DESCONOCIDO 20												
DESCONOCIDO 21												
DESCONOCIDO 22												
DESCONOCIDO 23												
DESCONOCIDO 24												
DESCONOCIDO 25												
DESCONOCIDO 26												
DESCONOCIDO 27												
DESCONOCIDO 6 (ALIZANDRE, 2017)												
DESCONOCIDO 28												
DESCONOCIDO 29												
DESCONOCIDO 30												
<b>TOTAL DE ALCALOIDES (23)</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>ND</b>	<b>7</b>	<b>ND</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>4</b>



ND = no se pudo analizar las muestras debido al bajo volumen disponible después de las pruebas de estandarización con el equipo UPLC-masas. Tratamientos: 28°C (CIAT); 25°C (Icesi).

### 2.5.9 Semicuantificación de alcaloides

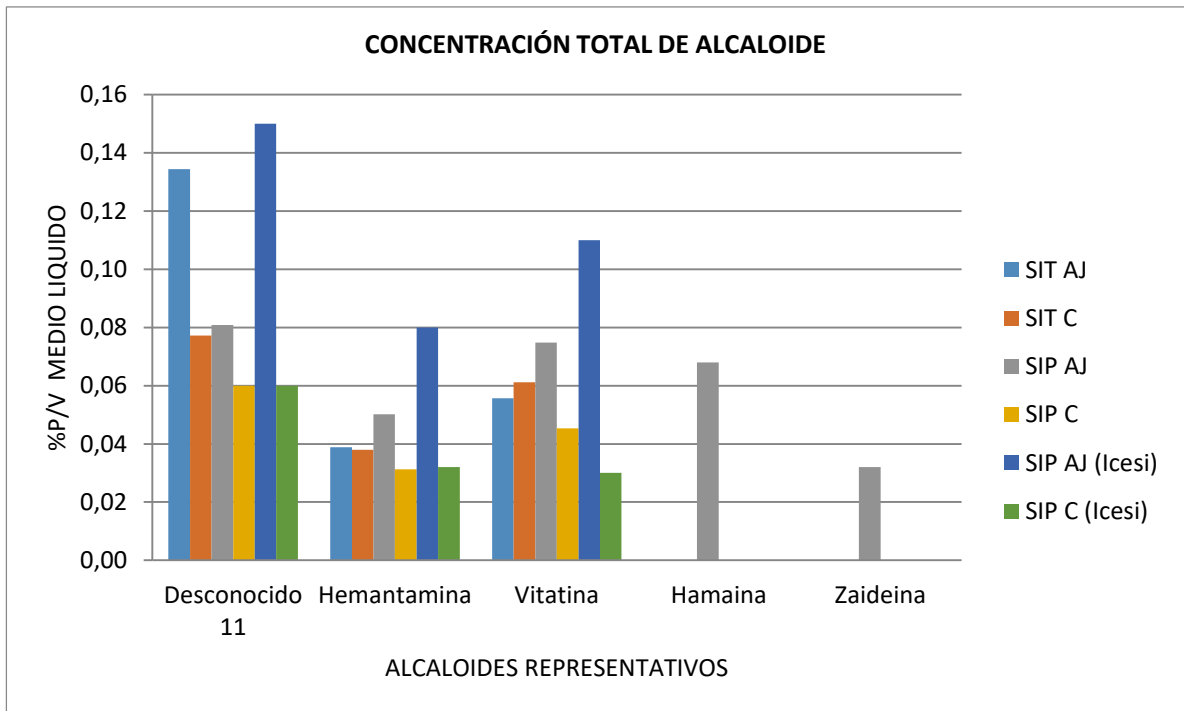
En general, se encontró que la concentración total de alcaloides en el medio líquido fue significativamente mayor que la obtenida en el tejido vegetal (Figura 25). La mayor concentración de alcaloides totales en el medio líquido (aproximadamente 0,5 %p/v) se obtuvo en el sistema de inmersión permanente con ácido jasmónico tanto en los tratamientos realizados en el CIAT y la Icesi (Figura 25). El tratamiento SIP con ácido jasmónico muestra el doble de producción de alcaloides en el medio líquido respecto al SIT AJ (Figura 25). No es posible comentar en relación a las diferencias en producción de alcaloides entre los diferentes tratamientos para las muestras vegetales, debido a que no se pudieron analizar las muestras de todos los tratamientos dado el bajo volumen disponible después de las pruebas de estandarización con el equipo UPLC-masas.



**Figura 25. Concentración total promedio de alcaloides obtenidos por tratamiento en el medio líquido (% p/v, barras azules) y tejido vegetal (% p/p, barras verdes) después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico. SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50µM de ácido jasmónico, CONT= control, medio MS sin ácido jasmónico. Promedio y desviación estándar.**

**Cuadro 10.** Concentración de los alcaloides más representativos, mostrados tanto en el material vegetal como en el medio líquido.

ALCALOIDE		% P/P	% P/V	TOTAL
<b>Desconocido 11 (Alizandre 2017)</b>	SIT AJ	0	0,1344	
	SIT C	0	0,07722	
	SIP AJ	0	0,08082	
	SIP C	0	0,05996	
	SIP AJ (icesi)	0	0,15	
	SIP C (icesi)	0	0,06	
	<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>0,5624</b>	<b>0,5624</b>
<b>Hemantamina</b>	SI T AJ	0,00156	0,03884	
	SIT C	0,00234	0,03797	
	SIP AJ	0	0,05020	
	SIP C	0,00173	0,031310	
	SIP AJ (icesi)	0	0,08	
	SIP C (icesi)	0	0,03208	
	<b>TOTAL</b>	<b>0,11931</b>	<b>0,2704</b>	<b>0,3831</b>
<b>Vitatina</b>	SI T AJ	0,00247	0,05569	
	SIT C	0,00205	0,061190	
	SIP AJ	0	0,07477	
	SIP C	0,00186	0,04529	
	<b>SIP AJ (icesi)</b>	<b>0</b>	<b>0,11</b>	
	<b>SIP C (icesi)</b>	<b>0</b>	<b>0,03</b>	
	<b>TOTAL</b>	<b>0,00563</b>	<b>0,37694</b>	<b>0,3826</b>
<b>Hamaina</b>	SI T AJ	0,00419	0	
	SIT C	0,00255	0	
	SIP AJ	0	0,06801	
	SIP C	0,00158	0	
	SIP AJ (icesi)	0	0	
	SIP C (icesi)	0,02568	0	
	<b>TOTAL</b>	<b>0,02651</b>	<b>0,06801</b>	<b>0,0945</b>
<b>Zaideina</b>	SIT AJ	0	0	
	SIT C	0	0	
	SIP AJ	0	0,03208	
	SIP C	0	0	
	SIP AJ (icesi)	0	0	
	SIP C (icesi)	0	0	
	<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>0,03207778</b>	<b>0,03207778</b>
<b>Ambellina</b>	SI T AJ	0	0	
	SIT C	0,00387	0	
	SIP AJ	0	0	
	SIP C	0,00287	0	
	SIP AJ (icesi)	0	0	
	SIP C (icesi)	0	0	
	<b>TOTAL</b>	<b>0,00674</b>	<b>0</b>	<b>0,0067</b>



**Figura 26. Concentración de los alcaloides más representativos obtenidos por tratamiento en el medio líquido después de 13 días de cultivo en SIT o SIP, con o sin ácido jasmónico.** SIT = sistema de inmersión temporal, SIP = sistema de inmersión permanente, AJ = medio MS con 50 $\mu$ M de ácido jasmónico, CONT= control, medio MS sin ácido jasmónico.

El alcaloide Desconocido 11 presentó la mayor concentración de todos los alcaloides y en el medio líquido (0,56 % p/v), seguidos de la vitatina (0,38 % p/v) y la hemantamina (0,27 % p/v) (Cuadro 10). El Desconocido 11 también fue el alcaloide que mostró la mayor concentración independientemente del tratamiento (Figura 25), y fue anteriormente reportado por Alizandre (2017). La mayor concentración en el tejido vegetal fue el del alcaloide hemantamina (0,11 % p/p) (cuadro 10).

## 2.6 DISCUSIÓN

En este proyecto se encontraron 25 posibles moléculas alcaloideas, de las cuales se obtuvieron una mayor concentración de en el medio líquido que en el tejido vegetal. Este resultado sugiere que la producción de alcaloides en biorreactores es viable. No obstante, se encontraron distintas problemáticas que pudieron afectar la respuesta en los tratamientos, por un lado, las condiciones evaluadas, el material de partida (edad de los bulbillos) y, por otro lado, la contaminación, fueron identificados como factores claves a estudiar para poder a futuro optimizar la producción de estos alcaloides *in vitro*.

El material de partida para la producción de alcaloides, los bulbillos formados *in vitro*, se inducen a partir de escamas extraídas de bulbos desarrollados en plantas en el invernadero. Una amplia variedad de microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y bacterias, endófitas o superficiales del tejido vegetal en condiciones naturales, han sido identificadas como contaminantes *in vitro*. (Alvarado , Cruz , & portal, 2010). Por lo tanto, se buscan alternativas para disminuir la pérdida del material vegetal por contaminación en el proceso de desinfección. Para este proyecto se empleó el protocolo modificado por Gómez (2017) donde se emplea MERCK TEGO 51 (2%) (dodecilano propilglicina), desinfectante líquido perteneciente a clase de los jabones anfolitos, que tienen un efecto contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y levaduras (Alba & Arujo, 2008). Como resultado, el uso de TEGO (51) permitió obtener un bajo nivel de contaminación (6%) inicial similar al reportado por Gómez (2017) durante el proceso de inducción de los bulbillos a partir de las escamas (*twin scales*) de los bulbos obtenidos en el invernadero. Estos resultados sugieren que la efectividad del protocolo de desinfección es reproducible.

En este trabajo se obtuvo que el 68% de las escamas cultivadas *in vitro* indujeron la formación de al menos un bulbillito, resultado similar al reportado en los proyectos de grado previos realizados en el grupo de investigación, donde se reportan porcentajes de respuesta entre el 67% y 71% (Chamorro, 2016, Alizandre, 2017, Gómez, 2017, y Tofiño, 2017). Por otro lado, las escamas que tuvieron respuesta formaron en total 126 bulbillos, es decir, que por cada par de escama se generaron entre 2 a 3 bulbillos nuevos. Ésta respuesta es un poco mayor a la reportada anteriormente, en donde cada *twin-scale* generó de 1 a 2 bulbillos por explante (Chamorro, 2016, Alizandre, 2017, Gómez, 2017, y Tofiño, 2017). Esos porcentajes de respuesta son similares a los reportados en otras especies de Amaryllidaceae, como la especie *Traubia modesta*, en la que se reporta una tasa de multiplicación de 1 a 2 bulbillos por cada par de escamas (Paredes, Delaveau, & Carrasco, 2014). Hay que destacar que, el nivel de respuesta para cada especie es diferente, ya que los requerimientos óptimos de reguladores de crecimiento pueden variar entre las especies; algunas necesitan mayores concentraciones de citoquininas, mientras

que otras requieren auxinas y distintas condiciones de cultivo *in vitro* (Pascual , 2009).

Las evaluaciones del material vegetal antes de ser cultivado en los tratamientos de SIP o SIT mostraron como era de esperarse, que a medida que aumenta la edad de los bulbillos, hay una reducción en el número de hojas jóvenes (de hojas sin expandir) y el número de hojas totales bien desarrolladas aumenta. En contraste, no se encontraron diferencias en el desarrollo de los bulbillos acorde a la edad de inducción. El diámetro de los bulbillos varió 0,6 mm, mientras que el largo osciló entre 7- 8 mm no importando la edad de los bulbillos. Chamorro (2016) reportó que en general los bulbillos de 2 a 4 meses de inducción, midieron entre 8 mm y 11 mm de largo. Estos resultados sugieren que las condiciones del cultivo *in vitro* proporcionan todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta, y al ser el bulbo un órgano de almacenamiento de nutrientes, y estar en condiciones *in vitro*, no requerirá absorber y almacenar los nutrientes y por lo tanto no crecerá, pero si lo harán las otras partes de la planta como las hojas y raíces (Salgado, 2016).

Si bien las diferencias en edad de los bulbillos afectaron el número de hojas total y completamente desarrolladas, esta variable fue eliminada en los experimentos siguientes, al cortar las hojas en la base de los bulbillos antes de incubarlos en los sistemas SIP o SIT con o sin ácido jasmónico. Al finalizar los diferentes tratamientos en SIP o SIT, se determinó el peso fresco y seco del material vegetal. Es decir, que los cambios en producción de biomasa y niveles de hidratación de los tejidos evaluados fueron producto de los diferentes tratamientos aplicados, ya que el material de partida fueron bulbillos del mismo tamaño independientemente de la edad y desprovistos de hojas al momento del inicio del experimento. En todos los casos, la mayor biomasa por bulbilllo (peso seco) se obtuvo en los tratamientos sin ácido jasmónico (control) independientemente del tratamiento en SIP o SIT y en las dos condiciones de temperatura evaluada. La disminución en la producción de biomasa por el efecto del ácido jasmónico fue mayor que el tipo de sistema de cultivo empleado, SIP o SIT, entre los cuales no se vieron diferencias en respuesta. Si bien no se observaron diferencias en el porcentaje de humedad de los tejidos cultivados con o sin ácido jasmónico a 25 °C (Icesi), en general los tejidos cultivados con ácido jasmónico a 28 °C (CIAT) si mostraron una reducción en el porcentaje de humedad independientemente del tipo del sistema SIT o SIP utilizado. Lo que sugiere un posible mayor efecto del ácido jasmónico a mayores temperaturas, ocasionando un mayor nivel de estrés a los tejidos.

Del mismo modo, otros estudios han reportado que altas concentraciones de inductores químicos, como el ácido jasmónico, pueden afectar negativamente el crecimiento de los bulbillos (Schumann, y otros, 2013). Puesto que, las fitohormonas participan en variadas respuestas morfogénicas y de crecimiento de manera pleiotrópica, esto quiere decir, que una misma hormona participa en diferentes procesos y, además, que, dependiendo de su concentración, la misma hormona puede ser estimuladora o inhibitoria de una misma respuesta (Cruz, Melgarejo, & Romero, 2009). Por lo tanto, la concentración de ácido jasmónico de 50 µM pudo afectar el desarrollo de los bulbillos, ya que en los dos sistemas (SIP o SIT) con

ácido jasmónico se observó una menor biomasa. Por otro lado, no se evidenció una diferencia en el desarrollo y crecimiento de los bulbillos en el SIP y SIT cuando se utilizó el medio sin ácido jasmónico (control). En este proyecto se emplearon las condiciones óptimas reportadas por Ivanov y colaboradores (2010) en SIT, donde la mayor acumulación de biomasa se presentó a una frecuencia de inmersión de 8 horas cada 15 minutos a 26°C, para la especie *Leucojum aestivum*. No obstante, en dicho trabajo los bulbillos fueron subcultivados por 28 días en el SIT. Esto podría sugerir que los bulbillos para *Zephyranthes carinata* no estuvieron el tiempo suficiente en el SIT (13 días de cultivo) para inducir un mayor desarrollo de los bulbillos. No obstante, distintas especies de plantas pueden tener una respuesta diferente para el SIT, por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el SIP, se sugiere que un mayor tiempo de inmersión y una mayor frecuencia podrían generar mejores resultados. Por otro lado, se encontró que no hay diferencias en el crecimiento y acumulación de biomasa en los bulbillos que se encontraban a distintos fotoperiodos y temperatura en el medio control en SIT o SIP. Estos resultados indican que probablemente las diferencias en la temperatura entre 25°C y 28°C, no tuvieron un efecto en el desarrollo del tejido vegetal pero sí en la producción de los alcaloides como se discute más adelante.

Al comparar los resultados obtenidos en este proyecto con los reportados por Alizandre (2017), se evidencia que la biomasa obtenida en SIP con el tratamiento de 50 µM de ácido jasmónico, fue de 3,8 g, similar al reportado en este proyecto (3,7 g). Por otro lado, al comparar el peso seco en SIP control y SIP con AJ, se observa que dichos tratamientos no presentan diferencias significativas. En contraste con lo reportado por Alizandre (2017), que sí se evidencia una tendencia de mayor biomasa en el tratamiento con AJ. Sin embargo, Colque y colaboradores (2012) reportan que las diferencias en biomasa con o sin inductores químicos no son significativas, corroborando los resultados obtenidos en este proyecto.

Además de las diferencias en el crecimiento de los bulbillos dependiendo del tratamiento, también se observaron diferencias en el desarrollo de los bulbillos. A la semana de experimentación, se observó que los bulbillos en el SIT o SIP con ácido jasmónico, presentaban una coloración rojiza en sus hojas, y poco crecimiento de éstas en comparación al control. Alizandre (2017), también reportó una coloración rojiza en los bulbillos de *Zephyranthes carinata* tratados con ácido jasmónico y efecto negativo en el crecimiento de las hojas. Estos resultados sugieren que la coloración rojiza se debe al efecto del ácido jasmónico, el cual posiblemente esté estimulando la biosíntesis de antocianinas e inhibiendo el crecimiento de las hojas. Por otro lado, para los tratamientos control tanto en SIP como en SIT, se notó un mayor desarrollo foliar. Además, al finalizar el experimento, se observó mayor desarrollo respecto a la primera semana de cultivo de los controles SIP o SIT, mientras que no se observan cambios aparentes en los tratamientos con ácido jasmónico. Otros estudios reportan que no hay un cambio significativo en el crecimiento del bulbillito en la especie *Narcissus confusus* con el uso de inductores químicos, (Colque, Viladomat, & Bastida, 2004). En este proyecto, no obstante, se observó que la coloración de los bulbillos era diferente en los controles, el SIT presentaba un color verde más intenso al SIP, lo cual,

probablemente indica mayor contenido de clorofila en el SIT al ser un sistema que permite una mejor aireación del material vegetal.

En este proyecto se encontraron un total de 23 posibles moléculas alcaloidales, de las cuales 6 se identificaron como alcaloides ya conocidos reportados anteriormente en *Zephyranthes carinata* como son: hamaina, zaideina, hemantamina, vitatina, licoramina y ambellina Alizandre (2017). Por otro lado, los desconocidos 6 y 11 también fueron reportados en el estudio realizado por Alizandre (2017). No obstante, 15 estructuras alcaloidales no pudieron ser identificadas al no presentar un perfil alcaloidal similar a los reportados en los artículos de referencia. Cabe resaltar que el estudio realizado por Rivera (2015) y Katoch y colaboradores (2012) se realizó en la especie *Zephyranthes grandiflora*, por lo tanto, la diversidad de alcaloides puede ser diferente entre estas especies. Del mismo modo, al comparar los resultados reportados por Alizandre (2017) se encuentra que 7 perfiles alcaloidales coinciden con los obtenidos en este proyecto. Así mismo, al comparar con el artículo de Zhan y colaboradores (2017) se analiza que solo uno de los alcaloides reportados para la especie *Zephyranthes carinata* es obtenido en este proyecto (licoramina), sin embargo, es importante tener en cuenta que dicho estudio no implementa ningún tipo de estrés para optimizar la producción de alcaloides.

En general, se encontró que hay mayor diversidad de alcaloides en el medio líquido que en el material vegetal, donde se obtuvieron 21 y 7 posibles alcaloides respectivamente. Estas diferencias son mayores bajo el tratamiento con ácido jasmónico y a 28°C. En contraste, con el estudio realizado por Alizandre (2017) donde reportó igual número de alcaloides (13) para el tejido vegetal y el medio líquido. Lamentablemente, en este trabajo no fue posible evaluar el efecto del AJ con SIP sobre la diversidad y cantidad de alcaloides producidos en el tejido vegetal debido a problemas de estandarización en el uso del equipo UPLC-masas, lo que agotó las muestras disponibles. Sin embargo en general, al comparar las muestras que se pudieron analizar, se podría concluir que aparentemente a 25°C (Icesi) no hay diferencias en el número de alcaloides entre el tejido vegetal y el medio líquido cuando se utiliza el sistema SIP, similar a lo que reporta Alizandre (2017). En contraste a 28°C, la diversidad de alcaloides se duplica en el medio líquido respecto al tejido vegetal, y la mayor diversidad se obtuvo en SIP con AJ en medio líquido. Es decir, que el posible mayor estrés al que están sometidos los tejidos con el tratamiento con ácido jasmónico el cual reduce la producción de biomasa, sino que además reduce la hidratación de los tejidos a 28°C (CIAT), incrementa la diversidad de alcaloides, como es de esperarse, dado que la producción de metabolitos secundarios incrementa bajo condiciones de estrés (Sepúlveda & Rocha, 2005).

Otros estudios realizados empleando el sistema de inmersión temporal para la especie *Pancratium maritimum* reportaron 22 estructuras alcaloidales intracelularmente y 15 en el medio de cultivo líquido (Berkov, Georgiev, & Ivanov, 2012). Se debe tener en cuenta que distintos géneros de amarilidácea pueden sintetizar en mayor o menor medida distintos tipos de alcaloides. Los resultados de este proyecto sugieren, que se está liberando mayor diversidad de alcaloides al medio líquido, en comparación al encontrado en el material vegetal, y que tanto los

tratamientos con SIT como el ácido jasmónico afecta la liberación de alcaloides al medio líquido. Por un lado, el ácido jasmónico podría estar induciendo la expresión de las enzimas que catalizan los primeros pasos de la ruta metabólica de los alcaloides, empezando por la formación del intermediario O-metilnorbelladina, que al parecer si está siendo promovido y metaboliza distintos tipos de alcaloides (Saliba, Ptak, & Laurain, 2015). Por otro lado, en el SIP con AJ a una temperatura de 25°C, se observó una baja diversidad de alcaloides, puesto que, puede que dicha temperatura no sea la óptima para el intermediario, y por lo tanto no metabolice otras estructuras alcaloidales o, por otro lado, que la temperatura sea un factor de estrés que se observa a temperaturas más elevadas (28 °C) que a 25°C. Con respecto a la acumulación de biomasa puede no estar relacionada con la diversidad de alcaloides, ya que, los tratamientos con AJ fueron los de menor peso, pero fueron los que mayor diversidad de alcaloides presentaron.

En cuanto a las concentraciones de alcaloides, en este trabajo se encontró que hay una mayor concentración en el medio líquido que en el tejido vegetal, la cual puede oscilar entre 13 a 35 veces mayor en el medio líquido respecto al tejido dependiendo del tratamiento. Alizandre (2017) reportó resultados similares al utilizar el SIP. Estos resultados sugieren que los alcaloides son liberados preferentemente al exterior cuando los tejidos son cultivados en medio líquido, lo que infiere la posibilidad de optimizar su producción en biorreactores. Al igual que en el trabajo de Alizandre (2017), en este trabajo la concentración de alcaloides en el medio líquido en SIP con AJ fue aproximadamente 3 veces mayor respecto al tratamiento control. Sin embargo, esta tendencia se invierte cuando se utiliza el sistema SIT y AJ, donde la concentración total de alcaloides se redujo respecto al control, y fue la menor registrada de todos los tratamientos. Aparentemente los tratamientos aplicados tienen una mayor influencia sobre la diversidad de alcaloides que se producen y liberan al medio líquido, que en su concentración total. Lo que sugiere que es posible a futuro optimizar no solo la cantidad de alcaloides sino modular que tipo de alcaloides se producen, según el tratamiento que se aplique.

La mayor concentración de alcaloides totales obtenida en este trabajo fue en el medio líquido en el sistema de inmersión permanente con ácido jasmónico a 25°C o 28°C (0,51% p/v - 0,55 %p/v). Al contrastar estos resultados con los del proyecto de grado de Alizandre (2017), se evidencia que la concentración máxima de alcaloides reportada en el medio líquido con ácido jasmónico fue de 2,1 %p/v, es decir, 4 veces mayor que lo encontrado en este proyecto. En este proyecto se empleó material vegetal con distintas edades y de mayor edad (entre 5 y 23 meses de edad) de inducción, mientras que Alizandre (2017) evaluó un material vegetal homogéneo y más joven, se utilizó bulbillos de 2 meses de edad. Las diferencias de edad del material vegetal puede ser un factor importante a considerar en la producción de alcaloides. Los bulbillos de mayor edad han sido subcultivados por varios ciclos, es posible que éstos ya estén completamente desarrollados y sus



tejidos hayan alcanzado la madurez fisiológica y estén bien adaptados a las condiciones *in vitro*, dado que se les provee todos los nutrientes y demás condiciones para su óptimo desarrollo. Mientras que, los bulbillos de corta edad de inducción, aún se encuentran en etapa de desarrollo y diferenciación, y cualquier cambio de las condiciones *in vitro* tales como variables de temperatura, humedad relativa, y nutricionales, variaciones en los tratamientos, e les puede generar un mayor estrés y por lo tanto, inducir una mayor producción de metabolitos secundarios, respecto a los bulbillos de mayor edad de inducción. En este proyecto, adicionalmente, gran parte (75%) de las repeticiones mostraron contaminación con bacterias al final del experimento, lo cual, también pudo generar un efecto negativo en el crecimiento del material vegetal y de este modo, afectar la producción de metabolitos secundarios respecto a lo reportado por Alizandre (2017). Por otro lado, los resultados de este proyecto sugieren que la producción de alcaloides se da mayoritariamente en los bulbillos, puesto que el desarrollo foliar fue mínimo en los tratamientos con AJ y aun así fueron los de mayor concentración y diversidad de alcaloides. Estos resultados concuerdan con los reportados por (Chamorro, 2016), donde se encontró que los bulbillos producen aproximadamente el doble de alcaloides respecto al tejido foliar (Chamorro, 2016).

En este estudio en el sistema de inmersión temporal sin ácido jasmónico, control, se reportó una diferencia en concentración de alcaloides en el medio líquido de 35 veces mayor respecto a la del tejido vegetal. Al contrario de otros estudios donde se emplea SIT, donde se reporta una concentración mayor en el material vegetal que en el medio líquido, utilizando el mismo ciclo de inmersión ( frecuencia de inmersión de 8 horas cada 15 minutos) (Ivanov , Georgiev , Georgiev, Ilieva , & Pavlov, 2010), lo cual indica que posiblemente, hay que optimizar el ciclo de inmersión acorde a los requerimientos fisiológicos de cada especie y tejido a utilizar para la producción de alcaloides. A diferencia del trabajo de Alizandre (2017) donde se reportó que el ácido jasmónico incrementa la producción de alcaloides en la especie *Zephyrantes carinata*, en este proyecto este efecto solo se observó cuando se empleó el SIP, al combinar el cultivo en SIT con el ácido jasmónico, se observó un efecto antagónico del AJ. La concentración de alcaloides en SIT AJ fue inferior al SIT control. Aunque no se logró aumentar la producción de alcaloides empleando el SIT respecto al SIP, si se obtuvo una gran diversidad de alcaloides con este sistema sin AJ. Quizá es posible a futuro evaluar otras variables que permita optimizar la producción de alcaloides con este sistema. Como resultado de esta investigación, se puede considerar que el sistema de inmersión temporal puede ser una herramienta adecuada para estimular la diversidad y producción de alcaloides en condiciones *in vitro*, con la finalidad de escalar su producción en biorreactores. No obstante, se debe seguir investigando sobre el uso del sistema de inmersión temporal, teniendo en cuenta posibles cambios en la edad del material vegetal, y condiciones del sistema, como el tiempo de inmersión y la frecuencia. Además, se abre todo un campo de investigación para identificar las posibles moléculas alcaloidales encontradas en este proyecto.



## 2.7 CONCLUSIONES

En este proyecto se encontraron 25 posibles moléculas alcaloideas, de las cuales se obtuvieron una mayor concentración y diversidad en el medio líquido que en el tejido vegetal. Seis de estos alcaloides son conocidos y los otros potencialmente podrían ser moléculas nuevas que hay que estudiar en más profundidad. Este resultado sugiere que la producción de alcaloides a partir de bulbillos inducidos *in vitro* de la especie *Zephyranthes carinata* en biorreactores es viable y que, además, el resultado respecto a la diversidad de alcaloides, abre todo un campo de investigación para identificar nuevas posibles moléculas alcaloidales, y un uso potencial para producir alcaloides de interés y de uso farmacéutico como lo son la hemantamina y licoramina.

Este proyecto planteaba como premisa incrementar la producción de alcaloides mediante el uso del sistema de inmersión temporal (SIT) conjuntamente con tratamientos con ácido jasmónico. Sin embargo, la mayor producción y diversidad de alcaloides se obtuvo con el sistema de inmersión permanente (SIP) con ácido jasmónico. Otros autores han reportado una mayor producción de alcaloides en otras especies de amarilidáceas al aplicar el SIT. En este proyecto se encontraron distintas problemáticas que pudieron afectar la respuesta en los tratamientos con SIT: el ciclo de inmersión utilizado que aparentemente tiende a deshidratar más los tejidos respecto al SIP, y en particular cuando se tratan con ácido jasmónico; la heterogeneidad y avanzada edad del material vegetal utilizado; y la contaminación. Estos resultados preliminares no permiten descartar el uso del SIT. Es necesario realizar otros estudios donde se tomen en cuenta estas limitaciones identificadas en este trabajo.

A pesar que no se encontró un efecto sinérgico en la producción de metabolitos secundarios al combinar el sistema de inmersión temporal con inductor químico ácido jasmónico, este trabajo claramente demostró que el ácido jasmónico, si bien por un lado disminuye la producción de biomasa de los tejidos vegetales, por el otro incrementa en forma significativa la concentración total y diversidad de los alcaloides que son liberados al medio líquido. Estas diferencias fueron más marcadas a 28°C respecto a 25 °C, y cuando se utiliza el SIP. Lo que sugiere que la temperatura puede ser un factor ambiental que amerita mayor estudio. Igualmente, resalta la importancia del período de inmersión en la producción de alcaloides a partir de tejidos de *Zephyranthes carinata*. En ensayos futuros con SIT, es necesario evaluar diferentes ciclos de inmersión, y en particular, aquellos dirigidos a prolongar el tiempo y frecuencia de inmersión. Los resultados de este trabajo, también apoyan la importancia de utilizar inductores químicos conjuntamente con tratamientos de inmersión de los tejidos para estimular la producción de los alcaloides y su liberación al medio líquido, lo que facilitará su

extracción y purificación. Estos resultados apoyan la idea de realizar estudios donde se explore el uso de diversos tipos de inductores químicos para optimizar la producción de metabolitos secundarios.

## 2.8 RECOMENDACIONES

Se recomienda que en futuras investigaciones se realice un diseño experimental que utilice bulbillos jóvenes de no más de 2 meses de edad para evitar afectar la producción de alcaloides al emplear los distintos tratamientos. Por otro lado, debido a la alta posibilidad de contaminación, se recomienda realizar con anticipación el medio líquido. De igual modo, se recomienda esterilizar 3 veces las mangueras del SIT para poder realizar el ensamblaje. Además, se recomienda un manejo adecuado de este SIT en la cabina de flujo laminar, puesto que la contaminación es alta. Por último, se recomienda emplear distintos tiempos de inmersión y frecuencia para aumentar la producción de metabolitos secundarios

## 2.9 BIBLIOGRAFÍA

- Castro, D., & Londoño, S. (2008). *producción in vitro de microbulbos de lirio (Lilium sp)*. Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología, Rionegro - Antioquia.
- Montoliu, A., & Perez, M. (2011). *Utilización del cultivo de tejidos vegetales in vitro para el estudio de la respuesta al estrés salino*. Valencia: Universitat Jaume I.
- Alba, N., & Arujo, F. (2008). *evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza del área fitoterapéutica*. Javeriana, ciencias microbiológicas, Bogotá.
- Alizandre, D. (2017). *evaluación del efecto del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la liberación de alcaloides producidos in vitro EN Zephyranthes carinata*. Cali: Universidad Icesi.
- Alizandre, D. (2017). *evaluación del efecto del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la liberación de alcaloides producidos in vitro en zephyranthes carinata*. cali: universidad icesi.
- Alvarado, Y., Cruz, M., & Portal, N. (2010). *Estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu".
- Arango, G. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Universidad Nacional, química, Medellín.
- Basail, M. (2005). *Multiplificación en Sistema de Inmersión Temporal del cultivar híbrido 'FHIA 21' (AAAB)*. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Berkov, S., Georgiev, V., & Ivanov, I. (2012). *Temporary immersion systems for Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis by Pancratium maritimum L. shoot culture*. Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Bulgaria.
- Berkov, S., Ivanov, I., Georgiev, V., & Pavlov, A. (2014). Galanthamine biosynthesis in plant vitro. *engineering in life sciences*, 643-650.
- Bernal, O., Occeguera, Z., Jimenez, M., & Rivera, O. (2002). Empleo de los sistemas de inmersión temporal para la producción de vitropatas de caña de azúcar. *FERIA*, 201-206.

- Cabezas, F., Martínez, S., & Codina, C. (2007). . *Alcaloides y actividad biológica en Eucharis amazonica, E. grandiflora, Caliphruria subedentata y crinum Kunthianum, especies Colombianas de Amaryllidaceae*. Universidad tecnológica de pereira . Pereira: Scientia Et .
- Chamorro, D. (2016). *optimizacion de las condiciones In vitro para la produccion de alcaloides a partir de plantulas de Zephyrantes carinata*. Univeridad Icesi, Ciencias Naturales , Cali.
- Chamorro, D. (2016). *Optimización de las condiciones in vitro para la producción de alcaloides a partir de plántulas de Zephyrantes carinata (Amaryllidaceae)*. Cali: Universidad Icesi, Facultad de Ciencias Naturales, Tesis de Química farmaceutica .
- Colque, r., Viladomat, f., & bastida, j. (2004). *improved production of galanthamine and related alkaloids by methyl jasmonate in narciss confusus*. barcelona.
- Cortes, M. (2013). *Reconocimiento y separación de alcaloides presentes en la hojas Brugmansia arborea usando cromatografía de capa fina (TLC)*. Universidad del Tolima, Programa de Biología, Tolima.
- García , O., Benavides , A., & Escobedo , L. (diciembre de 2011). Hyperhydricity control of in vitro shoots of Turbinicarpus valdezianus. *SCIELO*.
- Gennaro, a. (2000). *remington farmacia* (20 ed., Vol. 1). buenos aires: panamericana.
- Gomez, M. (2017). *Optimizacion de embriogenesis somatica en Zephyranthes Carinata*. Tesis, Universidad Icesi, Facultad de ciencias naturales , Cali .
- Greb, T., & Lohmann , J. (2016.). Plant Stem Cells. *NCBI*.
- Hernandez, r., & Efrain, J. (2012). *Detección de microorganismos contaminantes del cultivo in vitro de la malanga*. Mexico.
- Ivanov , i., Georgiev , V., Georgiev, M., Ilieva , M., & Pavlov, A. (2010). *Galanthamine and Related Alkaloids Production by Leucojum aestivum L. Shoot Culture using a Temporary Immersion Technology*. bulgaria: Springer Science+Business Media.
- Ivanov, I., Georgieva, V., & Pavlov, A. (2013). Elicitation of galanthamine biosynthesis by Leucojum aestivum liquid shoot cultures. *Journal of Plant Physiology*, 1122– 1129.
- Johannes Van Staden, J. B. (2016). Cytotoxic Alkaloid Constituents of the Amaryllidaceae. En *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 49, págs. 107-156). barcelona.

- Katoch, D., Kumar, S., Kumar, N., & Singh, B. (2012). Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 187–192.
- Lincoln, T., & Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* (Fifth ed.). USA: Copyright Sinauer Associates.
- Martin, S. (2008). The Amaryllidaceae Alkaloids. En *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Vol. 30, págs. 251-376). Texas: The Department of Chemistry The University of Texas Austin,.
- Montes, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra. *revista mexicana de micología*.
- Mujib, A., Banerjee, S., Maqsood, M., & . (2013). *Somatic Embryogenesis of Some Member Ornamental Genera of Amaryllidaceae and Allied Families: the Similarities and Differences*. Hamdard University, Cellular Differentiation and Molecular Genetics Section, Department of Botany. India: The Open Horticulture Journal.
- Muñoz, M. A. (2006). *Estudio de sistemas de cultivo in vitro, aclimatización de plántulas y*. Chile: universidad austral de chile.
- Niño, J., & Correa, Y. (2005). *cuantificación de licorina en callos y raíces cultivados in-vitro de crinum x powelli "album" (amaryllidaceae) por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)*. Universidad Tecnológica de pereira, Grupo de Investigación biotecnológica, pereira.
- Niño, J., & correa, Y. (s.f.). *cuantificación de licorina en callos y raíces cultivados in-vitro de crinum x powelli "album" (amaryllidaceae) por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)*. Universidad Tecnológica de pereira, Grupo de Investigación biotecnológica, pereira.
- Otero, L. (2014). *diversidad genética de especies pertenecientes a la familia amaryllidaceae del valle del cauca*. tesis pregado, universidad icesi, facultad de ciencias naturales, cali.
- Paredes, K., Delaveau, C., & Carrasco, P. (2014). In vitro bulbing for the propagation of *Traubia modesta* (Amaryllidaceae), a threatened plant endemic to Chile. *Ciencia e investigacion agraria*, 207-214.
- Pascual, E. (2009). *Propagación in vitro de Ismene amancaes (R.&P.) Herbert "Amancay" (Amaryllidaceae)*. Universidad nacional mayor de san marcos, lima.
- Ptak, A., Tahchy, A., Dupire, F., Boisbrun, M., Henry, M., Chapleur, Y., . . . Laurain-Mattar, D. (2008). *LCMS and GCMS for the Screening of Alkaloids in Natural*



*and in Vitro Extracts of Leucojum aestivum*. Agricultural University, Department of Plant Breeding and Seed Science , France.

- Restrepo, G. (2016). *optimización de condiciones para el cultivo in VITRO DE Zephyranthes carinata*. Univerisdad Icesi, ciencias biologicas , Cali.
- Rivera, M. (2015). *creación de una biblioteca espectral de alcaloides de amaryllidaceae*. Cali : Universidad Icesi, Facultad de Ciencias Naturales.
- Rosales, e., Rodriguez, L. E., & Omar, A. (2003). *Diseño y construccion del sistema de inmersion temporal*. Cuba.
- Salgado, R. (2016). la propagacion in vitro, un excito biotecnologico . *Revista de divulgacion de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*.
- Saliba, S., Ptak, A., & Laurain, D. (2015). 4'- O -Methylnorbelladine feeding enhances galanthamine and lycorine production by *Leucojum aestivum* L. shoot cultures. *Engineering in Life Sciences*, 1-6.
- Santos, f. s. (2001). *In vitro bulb formation of Narcissus asturiensis, a threatened species of the Amaryllidaceae*. Portugal.
- Schumann, A., Torras, L., Berkov, S., Claus, D., Gerth, A., Bastida, J., & Codina, C. (2013). Elicitation of Galanthamine Production by *Leucojum aestivum* Shoots Grown in Temporary Immersion System. *Biotechnol. Prog*, 311-318.
- SEDICI. (2012). *Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de La Plata*. Recuperado el octubre de 2107, de producción de metabolitos: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/5\\_-\\_Producci%C3%B3n\\_de\\_metabolitos.pdf?sequence=7](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/5_-_Producci%C3%B3n_de_metabolitos.pdf?sequence=7)
- Sepúlveda, G., & Rocha, M. (2005 ). *La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa*. Centro de Desarrollo de Productos, Depto. de Biotecnología, Mexico.
- Sharapin, N. (2000). Extraccion de los alcaloides . En N. Sharapin, *Fundamentos de tecnologia de productos fitoterapeuticos* (págs. 72 - 82). Bogota: Area de ciencia y tecnologia convenio Andres Bello .
- Silverstone-Sopkin, P. A. (2011). *Los muertos vivientes: la historia natural de cuatro lirios amazónicos del suroccidente de Colombia (Eucharis y Plagiolirion, Amaryllidaceae)*. Cali: Universidad del Valle.
- Simpson, M. (2010). *Plant systematics* (second ed.). Amsterdam: Elsevier Inc.
- Skoog, D. H. (2007). Cromatografia de Liquidos. En *Principios de Analisis Instrumental* (sexta ed., págs. 816–817).

- St-hill, J. (2013). *Sistematica de plantas vasculares* . Obtenido de [http://www.thecompositaehut.com/www\\_tch/webcurso\\_spv/familias\\_pv/amaryllidaceae\\_amaryllidoideae.html](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/amaryllidaceae_amaryllidoideae.html)
- The plant list.* (2010). Obtenido de <http://www.theplantlist.org/browse/A/Amaryllidaceae/>
- Tofiño, M. (2017). *Optimizacion de la produccion de alcaloides por medio de organogenesis o embriogenesis somatica*. Tesis de pregrado, Universidad Icesi, Ciencias naturales, cali.
- Tofiño, M. (2017). *Optimizacion de la produccion de alcaloides por medio de organogenesis o embriogenesis somatica*. Tesis de pregrado, Universidad Icesi, Ciencias naturales, cali.
- Yusti, A., & Velandia, J. (2013). first record of the amazon lily eucharis sanderi (amaryllidaceae) for isla gorgona, colombia\*. *boletin cienfitico museo de historia natural*.
- Zamudio, J., & Peña, M. (2012). *La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos*. Neurobiología, Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Mexico.
- Zayed, R., El-Sham, H., Berkov , S., Bastida, J., & Codina, C. (2011). *In vitro micropropagation and alkaloids of Hippeastrum vittatum*. The Society for In Vitro Biology, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, . Egypt: S. Murch . Obtenido de <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html>
- Zhan, G., Zhou, J., Liu, J., & Huang, J. (2017). Acetylcholinesterase Inhibitory Alkaloids from the Whole Plants of Zephyranthes carinata. *Journal of Natural Production*.
- Zhong Jin. (May de 2016). Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Royal society of chemistry*, 849–868.

