



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
ESPECIES DE AMARYLLIDACEAE OBTENIDOS EN CULTIVO *in vitro* Y SU
ACTIVIDAD ANTITUMORAL**



DIANA ISABEL CORREA OTERO

Tesis presentada a la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

Profesor Guía: Dr. Edgar Pastene Navarrete.

Prof. co-Guía: Dr. Julio Alarcón Énos.

Enero de 2020
Concepción-Chile

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.



Profesor Guía

Dr. Edgar Rafael Pastene Navarrete
Departamento de Ciencias Básicas
Universidad del Bío-Bío

Profesor Co-Guía

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

Evaluador externo



Dr. Luis Espinoza
Departamento de Química.
Universidad Técnica Federico Santa María

Director del programa

MSc. Sigrid Mennickent Cid
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción



A Dios y a mi familia, gracias por hacer posible este sueño.

AGRADECIMIENTOS.

A los Proyectos Fondecyt 1150948; 1161157, Fondequip EQM150025 y al proyecto VRID UDEC 218.074.060-1, por el financiamiento de todo este trabajo de investigación.

A la dirección de postgrado de la Universidad de Concepción por las becas de arancel y estipendio, así como el financiamiento para la participación en eventos para la difusión de resultados.

A mi tutor de tesis, Dr. Edgar Rafael Pastene Navarrete, profesor a quien admiro, respeto y tengo gran aprecio. Contribuyó activamente con mi formación durante todo este proceso con su dedicación y espíritu investigador. Gracias por su apoyo, sus consejos, paciencia, humor, compañía, cariño y el inmenso conocimiento brindado.

A mi co-tutor de tesis, Dr. Julio Enrique Alarcón Enos, profesor a quien tengo gran estima, su direccionamiento y disciplina han sido de gran ayuda para llevar a término este trabajo. Gracias por la confianza, apoyo y paciencia afectuosa en todo este tiempo.

Al laboratorio de Farmacognosia y al Centro de Espectroscopía y Microscopía Electrónica (CESMI) de la Universidad de Concepción.

Al laboratorio de síntesis y biotransformación de productos naturales de la Universidad del Bio-Bio sede Chillán.

Al profesor Luis Bustamante y el Departamento de Análisis instrumental de la Universidad de Concepción.

A la profesora Marta de Diego con quien he podido realizar diferentes proyectos, gracias por la confianza, amistad y por todo lo que me ha enseñado.

A la profesora Sigrid Mennickent directora del programa, gracias por la amistad y apoyo brindado.

A mi familia por su apoyo económico y emocional.

Contenido.

Índice de tablas.....	x
Índice de figuras.....	xi
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	19
1 MARCO TEÓRICO.....	23
1.1 Familia Amaryllidaceae.....	23
1.2 Alcaloides de Amaryllidaceae.....	25
1.3 Aspectos químicos y biológicos de los alcaloides Amaryllidaceae.....	30
1.3.1 Alcaloides tipo licorina y homolicorina.....	30
1.3.2 Alcaloides tipo galantamina.....	32
1.3.3 Alcaloides tipo crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina y montanina.....	33
1.4 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	35
1.4.1 Organogénesis somática.....	37
1.4.2 Reguladores de crecimiento.....	39
1.4.3 Fuentes de carbono.....	43

1.4.4	Macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y aminoácidos.	43
1.5	Cromatografía de partición centrífuga (CPC).....	44
1.5.1	Refinamiento por zona de pH.	45
1.5.2	Selección de retenedor y eluyente.....	48
1.5.3	Selección del sistema de solventes.	49
1.6	Cáncer.	50
2	ANTECEDENTES.	53
2.1	Género <i>Rhodophiala</i>	53
2.2	Género <i>Rhodolirium</i>	57
3	HIPÓTESIS.	59
4	OBJETIVOS.	60
4.1	Objetivo general.	60
4.2	Objetivos específicos.	60
5	SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	61
5.1	Recolección y tratamiento del material vegetal.	61
5.2	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.	62
5.2.1	Obtención de explantes y esterilización de bulbos.....	62
5.2.2	Medio basal de cultivo.	63
5.2.3	Medio de inducción, crecimiento y multiplicación.....	65
5.3	Obtención de extracto crudo de alcaloides.....	66



5.4	Determinación del perfil de alcaloides por CG-EM.	67
5.5	Aislamiento preparativo de alcaloides por refinamiento de zona de pH... ..	69
5.5.1	Análisis de fracciones por CG-EM.	70
5.5.2	Análisis de fracciones por CLAR-UV.	70
5.5.3	Determinación del coeficiente de partición (KD).	71
5.5.4	Determinación de pureza.....	71
5.6	Actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa.	71
5.7	Determinación de citotoxicidad <i>in vitro</i> sobre células epiteliales de adenocarcinoma gástrico (AGS).	74
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
6.1	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.	76
6.2	Identificación de alcaloides por CG-EM.....	84
6.2.1	Alcaloides identificados en <i>Rhodolirium speciosum</i>	89
6.2.2	Alcaloides identificados en <i>Rhodophiala advena</i>	91
6.2.3	Alcaloides identificados en <i>Rhodophiala splendens</i>	94
6.2.4	Alcaloides identificados en <i>Rhodophiala prantesis</i>	96
6.3	Aislamiento de alcaloides.....	98
6.4	Citotoxicidad <i>in vitro</i> sobre células epiteliales de adenocarcinoma gástrico (AGS)	100
6.	CONCLUSIONES.....	103

7. GLOSARIO.....	105
8. REFERENCIAS.....	106
9. ANEXOS.....	123



Índice de tablas.

Tabla 1. Usos y estructuras de algunas auxinas.	41
Tabla 2. Citoquininas, estructura y función.	42
Tabla 3. Componentes medio de cultivo según Murashige y Skoog.	64
Tabla 4. Tratamientos empleados con diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y citoquininas en fase de inducción.	65
Tabla 5. Tratamientos empleados con diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y citoquininas en fase de crecimiento y multiplicación.	66
Tabla 6. Preparación de soluciones para llevar a cabo la actividad inhibitoria sobre acetilcolinestrerasa.	72
Tabla 7. Contenido de alcaloides presentes en bulbos silvestres y cultivo <i>in vitro</i> según el tipo de alcaloide para las especies <i>Rhodolirium speciosum</i> , <i>Rhodophiala advena</i> , <i>Rhdophiala pratensis</i> y <i>Rhodophiala splendens</i>	88

Índice de figuras.

Figura 1. Distribución de especies de Amaryllidaceae.	24
Figura 2. Biosíntesis de norbelladina en plantas de la familia Amaryllidaceae....	27
Figura 3. Acoplamiento fenol oxidativo en la biosíntesis de alcaloides de Amaryllidaceae.	28
Figura 4. Principales estructuras de alcaloides de Amaryllidaceae.	29
Figura 5. Alcaloides procedentes de acoplamiento fenol oxidativo orto-para'	31
Figura 6. Biosíntesis de galantamina y sus derivados por acoplamiento fenol oxidativo para-orto'. Tomado de Eichhorn et al. (1998).....	33
Figura 7. Biosíntesis de alcaloides tipo crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina y montanina. Tomado de Fuganti (1975).	34
Figura 8. Formación de brotes en el cultivo de tejidos vegetales por twin-sacaling.	38
Figura 9. Esquema general de organogénesis.....	39
Figura 10. Ilustración esquemática del proceso de separación en refinamiento por zona de pH.	46
Figura 11. Cambio en células normales que puede conllevar a cáncer.....	50
Figura 12. Mortalidad anual por diferentes tipos de cáncer a nivel mundial.....	51

Figura 13. Flores de <i>Rhodophiala advena</i>	54
Figura 14. Flores de <i>Rhodophiala splendens</i> en su hábitat natural.	55
Figura 15. Flores de <i>Rhodophiala pratensis</i> en su hábitat natural.....	56
Figura 16. Flores de <i>Rhodolirium speciosum</i>	58
Figura 17. Corte de bulbo para obtener twin-scales.	62
Figura 18. Ensayo de inhibición enzimática por el método de Ellman.	73
Figura 19. Porcentaje de contaminación de cada una de las especies evaluadas. Valores expresados como promedio \pm SEM (n=5) p <0.05.	78
Figura 20. A, B C) Brotes obtenidos con el tratamiento de inducción 2,20 μ M BAP y 5,40 μ M NAA. D, E, F) Crecimiento del brote en diferentes combinaciones en fase de multiplicación y crecimiento de <i>R. pratensis</i>	79
Figura 21. Efecto de las hormonas en las concentraciones 4,44 μ M BAP y 2,70 μ M NAA en la inducción de brote y formación de planta en la especie <i>R. advena</i>	80
Figura 22. Formación de brote y callo en tratamiento de inducción con 2,20 μ M BAP y 5,40 μ M NAA en la especie <i>R. splendens</i> . A) Brote. B) Brote con hojas. C) Formación de callo indiferenciado.	81
Figura 23. A y B) Efecto del tratamiento de inducción con 10 μ M BAP y 12,5 μ M IAA sobre escamas de <i>Rhodolirium speciosum</i> C) Diferenciación de brote en 5 μ M BAP, 10 μ M IAA y 16 μ M 2,4-D.	82
Figura 24. Producción de alcaloides de diferente especies de Amaryllidaceae en cultivo <i>in vitro</i> bajo diferentes condiciones hormonales. <i>R. pratensis</i> (2,20 μ M BAP	

y 5,40 μM NAA), <i>R. splendens</i> (2,20 μM BAP y 5,40 μM NAA), <i>R. speciosum</i> (5 μM BAP, 10 μM IAA y 16 μM 2,4-D) y <i>R. advena</i> (4,44 μM BAP y 2,70 μM NAA).	84
Figura 25. Patrón de fragmentación y espectro de masas típico para la galantamina.	86
Figura 26. Ruta de fragmentación de la licorina.	87
Figura 27. CG-EM del crudo de alcaloides obtenido de A) bulbos silvestres y B) brotes en cultivo <i>in vitro</i> con BAP 5 μM , 10 μM AIA y 16 μM 2,4-D de <i>Rhodolirium speciosum</i> .	89
Figura 28. Biosíntesis de alcaloides en <i>R. speciosum</i> .	90
Figura 29. Ruta biosintética para la producción de alcaloides en <i>R. advena</i> .	92
Figura 30. CG-EM del crudo de alcaloides obtenido de A) bulbos silvestres y B) brotes en cultivo <i>in vitro</i> con BAP 4,44 μM y NAA 2,70 μM <i>Rhodophiala advena</i> .	93
Figura 31. CG-EM del crudo de alcaloides obtenido de A) bulbos silvestres y B) brotes en cultivo <i>in vitro</i> con BAP 2,20 μM y NAA 5,40 μM de <i>R. splendens</i> .	94
Figura 32. Alcaloides producidos por <i>R. splendens</i> producto del acoplamiento fenol oxidativo orto-para' y para-para'.	95
Figura 33. Estructura química de los alcaloides de tipo licorina (1, 2 y 3) aislados de <i>Rhodolirium speciosum</i> y licorina (4).	99

Figura 34. CG-EM de A) Crudo de alcaloides de *R. speciosum* y compuestos aislados por CPC. B) Alcaloide 1, C) Alcaloide 2 y D) Alcaloide 3. Los espectros UV-VIS se obtuvieron directamente del detector DAD del aparato de CPC. ... 100

Figura 35. Citotóxicidad de crudos de alcaloides sobre células AGS a las 6 horas de exposición. A) Curva DMSO 6 y 24 horas. B) *Rhodophiala pratensis* C) *Rhodolirium speciosum* D) *Rhodophiala splendens*. Las concentraciones varían entre 0,51 y 5,2 μM en equivalentes de licorina. 101

Figura 36. CG-EM del crudo de alcaloides obtenido de A) bulbos silvestres y brotes en cultivo *in vitro* con B) BAP 2,20 μM y NAA 5,40 μM . C) BAP 2,20 μM y NAA 10,80 μM y D) BAP 8,80 μM y NAA 10,80 μM de *R. pratensis*. 123



RESUMEN.

TÍTULO: ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPECIES DE AMARYLLIDACEAE OBTENIDOS EN CULTIVO *in vitro* Y SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL

PALABRAS CLAVE: Alcaloides, Amaryllidaceae, CG-MS, cultivo de tejidos, viabilidad celular *in vitro*.

La familia Amaryllidaceae está formada por plantas bulbosas, que se caracterizan por ser productoras de alcaloides. Estos metabolitos secundarios están biogénicamente relacionados y exhiben potente actividad farmacológica. Ciertos alcaloides como los del tipo licorina y homolicorina han sido estudiados por sus propiedades antitumorales. Sin embargo, el estudio de dichas propiedades biológicas en estas moléculas se ve limitado debido a su baja disponibilidad y producción en la planta. En el presente trabajo se estudiaron cuatro especies de Amaryllidaceae endémicas de Chile; *Rhodophiala pratensis*, *Rhodophiala splendens*, *Rhodophiala advena* y *Rhodolirium speciosum*. Uno de los principales objetivos de esta tesis fue mejorar la producción de alcaloides mediante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales por organogénesis somática. Mediante CG-EM se analizó comparativamente la biosíntesis de alcaloides obtenidos *in vitro* y en su hábitat natural. Otro de los objetivos fue desarrollar un método rápido y eficiente de aislamiento para algunos de los alcaloides mayoritarios, lo cual se abordó

usando Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC) con refinamiento de zona de pH. Para los extractos y sus metabolitos secundarios aislados, se evaluó la capacidad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa y toxicidad sobre células epiteliales de adenocarcinoma gástrico (AGS).

Los brotes obtenidos mediante cultivo *in vitro*, presentaron un perfil alcaloideo diferente al que exhibe la planta en estado natural. Este resultado sugiere que la combinación de auxinas como ácido 1- naftalenacético y citoquininas como 6-bencilaminopurina permite modular rutas bioquímicas de la planta que regulan la biogénesis de determinados grupos de alcaloides. Se determinó que estas plantas presentan un variado perfil de alcaloides tipo licorina, haemantamina, homolicorina y galantamina. Estos compuestos disminuyeron la viabilidad de células AGS en concentraciones entre 0,5 y 5,2 μM .

Usando refinamiento por zona de pH, se aislaron tres alcaloides tipo licorina con pureza mayor a 84%, los cuales presentaron actividad inhibitoria sobre AChE con IC_{50} entre 17,1 y 203,5 $\mu\text{g/mL}$.

ABSTRACT.

TITLE: STUDY OF THE COMPOSITION OF SECONDARY METABOLITES OF AMARYLLIDACEAE SPECIES OBTAINED IN *in vitro* CULTURE AND ITS ANTITUMORAL ACTIVITY

KEY WORDS: Alkaloids, Amaryllidaceae, tissue culture, GC-MS, cell viability *in vitro*.

The Amaryllidaceae family is formed by bulbous plants, which are characterized as producing alkaloids. These secondary metabolites are biogenetically related and exhibit potent pharmacological activity. Some alkaloids such as lycorin and homolycorin type have been studied for their antitumor properties. However, the study of these biological properties in these molecules is limited due to their low availability and production in the plant. In the present work, four species of endemic Amaryllidaceae from Chile were studied; *Rhodophiala pratensis*, *Rhodophiala splendens*, *Rhodophiala advena* and *Rhodolirium speciosum*. One of the main objectives of this thesis was to improve the production of alkaloids by *in vitro* culture of plant tissues by somatic organogenesis. Using GC-MS, the alkaloid biosynthesis obtained *in vitro* and in its natural habitat was analyzed comparatively. Another objective was to develop a fast and efficient method of isolation for some of the major alkaloids, which was approached using Centrifugal Partition Chromatography (CPC) with pH zone refinement. For extracts and their isolated secondary metabolites, the inhibitory capacity on the

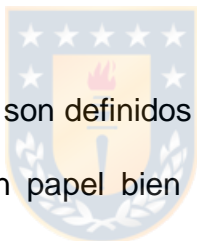
acetylcholinesterase enzyme and toxicity on gastric adenocarcinoma epithelial cells (AGS) was evaluated.

The calluses obtained by *in vitro* culture, presented a different alkaloid profile than the plant exhibits in its natural state. This result suggests that the combination of auxins such as 1- naphthalenacetic acid and cytokinins such as 6-benzylaminopurine allows modulating biochemical pathways of the plant that regulate the biogenesis of certain groups of alkaloids. It was determined that these plants have a varied profile of alkaloids type lycorine, haemantamine, homolycorin and galanthamine. These compounds decreased the viability of AGS cells in concentrations between 0,5 and 5,2 μM .

Using pH zone refining, three lycorine alkaloids with purity greater than 84% were isolated, which exhibited inhibitory activity on AChE with IC50 between 17,1 and 203,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$

INTRODUCCIÓN.

Los productos naturales han sido una parte importante en la historia de la medicina humana, debido al contenido de metabolitos secundarios presentes tanto en el reino vegetal como animal, muchos de los cuales han sido incorporados en la medicina occidental (Cordell 2000). Dentro de los fármacos existentes, el 25% provienen de plantas ya sea como un compuesto puro o derivado.



Los metabolitos secundarios son definidos como un variado grupo de moléculas orgánicas, que no tienen un papel bien establecido en el mantenimiento de procesos vitales fundamentales como el crecimiento en plantas. Algunos de ellos son subproductos extraños de rutas metabólicas debido a la actividad enzimática promiscua, o bien, biosintetizados a partir de uno o más metabolitos generales en una amplia variedad de reacciones propias del metabolismo de cada individuo (Bahmani et al. 2014; Zhong y Tong 2011; Verpoorte y Alfermann 2000).

Algunos de estos metabolitos son alcaloides, compuestos nitrogenados biosintetizados en diferentes plantas con diversas características estructurales, las cuales hacen que su síntesis sea dificultosa y con altos costos. Además en la mayoría de las ocasiones es infructuosa.

Los alcaloides presentan un amplio espectro de propiedades farmacológicas derivados de su interacción con receptores o como inhibidores enzimáticos. Así, se ha reportado su efecto como antibacterianos, analgésicos, antipiréticos, antiasmáticos, anticancerígenos, antiarrítmico, neuroprotectores, antihipertensivos (McNulty et al. 2009; J. Liu et al. 2004; Trujillo-Chacón et al. 2019; Nair et al. 2017).

Una fuente promisorio de alcaloides tipo isoquinolínicos son las plantas de la familia Amaryllidaceae, sin embargo la cantidad presente de estos metabolitos en diferentes partes de la planta es baja (Z. M. Liu et al. 2015), alcanzando rendimientos de extracción entre 0,01-1% por lo que es necesario implementar técnicas y metodologías que nos permitan incrementar la concentración de estos metabolitos.

Entre las técnicas más conocidas para inducir la producción de diferentes metabolitos están la micropropagación *in vitro* y el cultivo de tejidos vegetales. Así por ejemplo, para la especie *Narcissus confusus* se ha reportado un incremento significativo en la concentración de alcaloides a través de esta técnica (Sellés et al. 1999).

El objetivo de este trabajo de investigación fue producir alcaloides con esqueleto isoquinolínico a través de cultivo de tejidos *in vitro* usando diferentes concentraciones de fitohormonas. Por otro lado, mediante diferentes técnicas espectroscópicas se procedió a identificar los alcaloides mayoritarios presentes

en plantas silvestres y en las obtenidas por cultivo *in vitro*. Además, se realizaron experimentos citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales.

En este contexto, se logró establecer el cultivo *in vitro* en medio semisólido de cuatro especies de Amaryllidaceae Chilenas, usando la técnica twin-scaling.

Las condiciones de cultivo y propagación para las tres especies de *Rhodophiala* se establecieron bajo diferentes combinaciones de 6-bencilamonopurina y ácido 1-naftalenacético, mientras que para la especie *Rhodolirium speciosum* se estableció con una combinación de 6-bencilaminopurina, ácido indolacético y ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Para determinar la composición de los extractos alcaloideos obtenidos de bulbos silvestres y de brotes de cultivo *in vitro*, se realizó una extracción ácido-base a partir de un extracto metanólico total de cada muestra, los que se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Para la identificación de los compuestos se tuvieron en cuenta varios criterios como los índices de Kovats, patrón de fragmentación y relación entre iones característicos.

A través de CPC con refinamiento por zona de pH, se logró aislar tres de los alcaloides mayoritarios de *Rhodolirium speciosum* que corresponden a derivados de licorina. La elucidación estructural de estos compuestos se hizo mediante el uso de diferentes técnicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS), infrarrojo (IR) y ultravioleta (UV).

Finalmente se determinó la citotoxicidad de los extractos alcaloideos sobre células epiteliales de adenocarcinoma gástrico (AGS) mediante el ensayo con resazurina, los resultados mostraron una disminución en la viabilidad celular a concentraciones micromolares.



1 MARCO TEÓRICO.

1.1 Familia Amaryllidaceae.

Amaryllidaceae es una familia de plantas bulbosas, herbáceas, perennes, pertenecientes al orden Asparagales de las monocotiledóneas, con flores bisexuales generalmente grandes y vistosas (Dahlgren 1980).

Hasta la fecha se conocen alrededor de 1100 especies y más de 75 géneros (Jin 2016) distribuidas en las siguientes tribus: Amaryllideae, Calostemmateae, Cyrtantheae, Haemantheae, Lycoridae, Galantheae, Pancratieae, Narcisseae, Griffinieae, Hippeastreae, Eustephieae, Hymenocallideae, Stenomesseae, Eucharidae (Stevens 2001).

Las especies de esta familia se encuentran entre 0 y 4000 m.s.n.m, en variados hábitats, como valles secos interandinos, bosques andinos, litoral seco y húmedo. Aunque la evidencia de su evolución filogenética se sitúa originalmente en África, esta familia botánica tiene una amplia distribución geográfica como se ilustra en la figura 1, con poblaciones especialmente importantes en África, centro y sur América, con una distribución restringida en el Mediterráneo, Cáucaso y Oceanía.

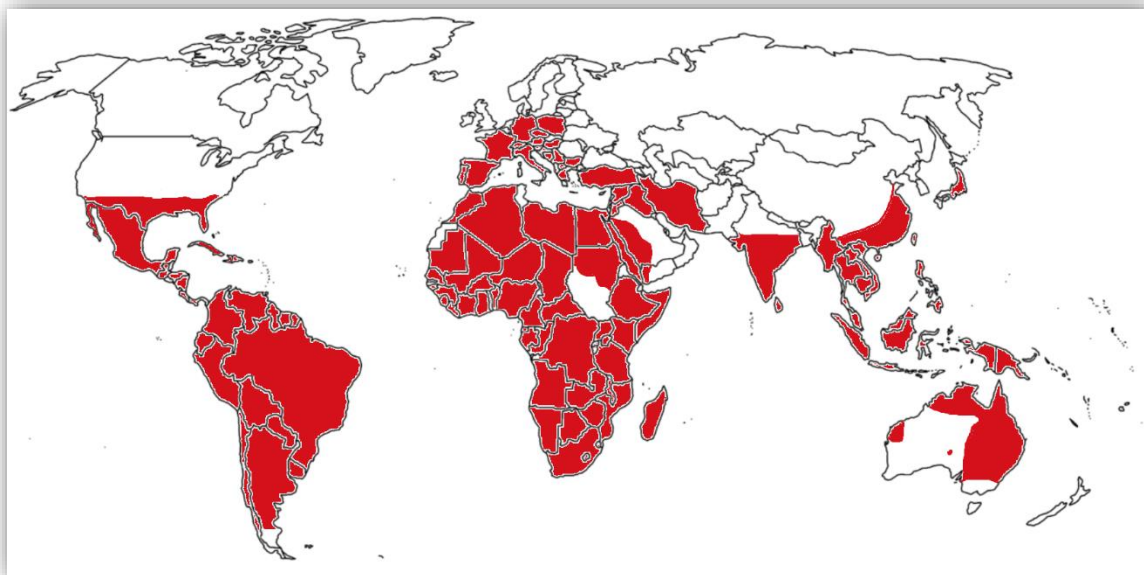


Figura 1. Distribución de especies de Amaryllidaceae. Modificado de (Stevens 2001).

Hippeastreae, Griffinieae, Eucharideae, Hymenocallideae y Stenomesseae son tribus tropicales originarias de América con numerosos representantes en Los Andes, costas tropicales y altiplanos (García et al. 2017).

En Chile esta familia se encuentra representada por 11 géneros, 5 de los cuales son endémicos (Ravenna 2003). Esto sugiere que Chile ha sido un activo centro evolutivo para estas de plantas, por lo que se puede localizar como un “hotspot” de biodiversidad, caracterizado por una alta diversidad de especies y altos niveles de endemismo, por tanto se puede considerar como un sitio prioritario de conservación (Arroyo-Leuenberger y Dutilh 2008).

Hasta el momento se han descrito 35 especies dentro de esos 11 géneros, que se encuentran distribuidas desde la región de Arica y Parinacota hasta la Región de los Lagos (Baeza, Novoa, et al. 2009; Paredes et al. 2014; Baeza, Eduardo, y Negritto 2007).

Estas plantas además presentan un gran valor ornamental, debido a sus flores vistosas de diversos colores y formas, característica que las hace vulnerables a la industria de la floricultura y pone en riesgo su conservación. Otros factores como la deforestación y el cambio de uso del suelo también generan una gran pérdida de poblaciones de Amaryllidaceae (Johnson et al. 2018).



1.2 Alcaloides de Amaryllidaceae.

La característica fundamental de las diferentes especies de Amaryllidaceae además de los distintivos taxonómicos, es la producción de un tipo exclusivo de metabolitos secundarios. Los alcaloides tipo isoquinolina constituyen un grupo de estructuras quimiotaxonómicamente reducido y que están biogenéticamente relacionados.

El estudio de los alcaloides de Amaryllidaceae se inició en 1877 con el aislamiento de licorina desde plantas de *Narcissus pseudonarcissus* L. Desde entonces hasta la fecha se han aislado y caracterizado alrededor de 500 alcaloides estructuralmente diferentes en cuanto a los sustituyentes del esqueleto principal (De Andrade et al. 2014).

El tipo y la cantidad de alcaloides en estas plantas es muy variable, debido principalmente al hecho, que los alcaloides presentan un equilibrio dinámico entre biosíntesis y degradación, de manera que en una misma planta tiene lugar importantes fluctuaciones debidas a factores ecológicos, climáticos y fisiológicos. Por lo tanto, los alcaloides en un vegetal se encuentran en función de la situación ambiental, órgano de la planta y momento de la ontogénesis en que se realice el estudio.

De manera general, estos metabolitos se encuentran restringidos a una estructura carbonada base $C_6-C_1-N-C_2-C_6$ derivada de los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina. La biosíntesis del precursor de norbelladina, su posterior metilación y acoplamiento fenol oxidativo se detallan a continuación.

La biosíntesis de la norbelladina (Figura 2) se inicia con la desaminación oxidativa de la L-fenilalanina por acción de la enzima PAL (fenilalanina amonio-liasa), dando lugar al ácido cinámico, el cual a su vez se hidroxila en posición *para*, dando lugar al ácido *p*-cumárico, el cual es oxidado en posición *orto* con respecto al grupo hidroxilo, por lo que en el anillo aromático se incorpora un segundo grupo hidroxilo, formándose el ácido cafeico. El siguiente paso incluye la formación del aldehído protocatéquico (3,4- dihidroxibenzaldehído), por la oxidación y pérdida del ácido glioxílico del ácido cafeico.

Por otra parte, la L-tirosina se descarboxila por la acción de tirosina-decarboxilasa dando lugar a la tiramina, que reacciona con el aldehído protocatéquico dando lugar a la norbelladina.

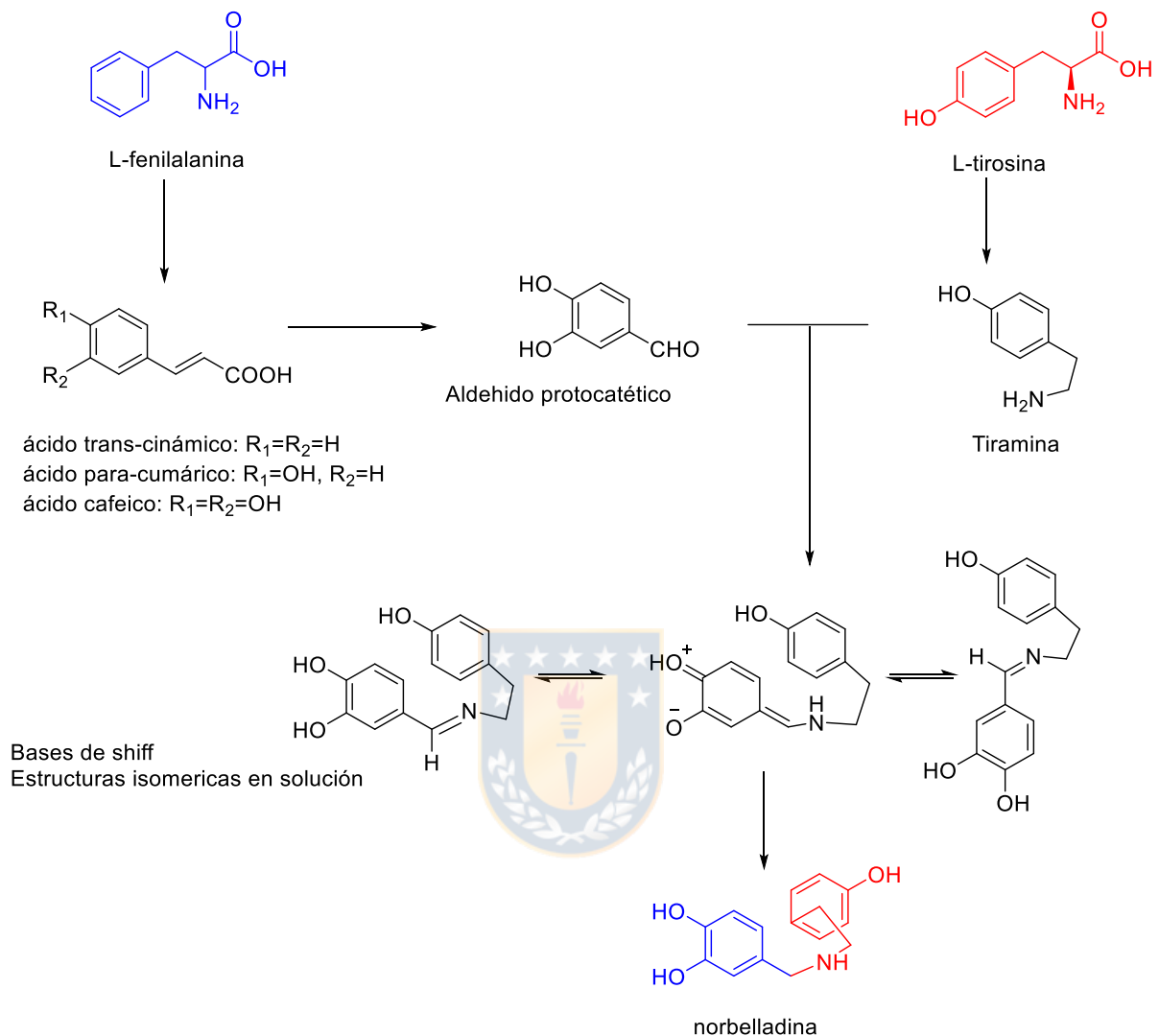


Figura 2. Biosíntesis de norbelladina en plantas de la familia Amaryllidaceae. Tomado de Singh y Desgagne-Penix (2014).

Estudios con aminoácidos marcados isotópicamente han permitido determinar que la fracción de C₆-C₁ (anillo A, posición bencílica) corresponde a los carbonos provenientes de la L-fenilalanina, mientras que el residuo C₆-C₂-N (cadena lateral

de carbonos y residuo de nitrógeno) proviene de L-tirosina (Suhadolnik, Fischer, y Zulalian 1962).

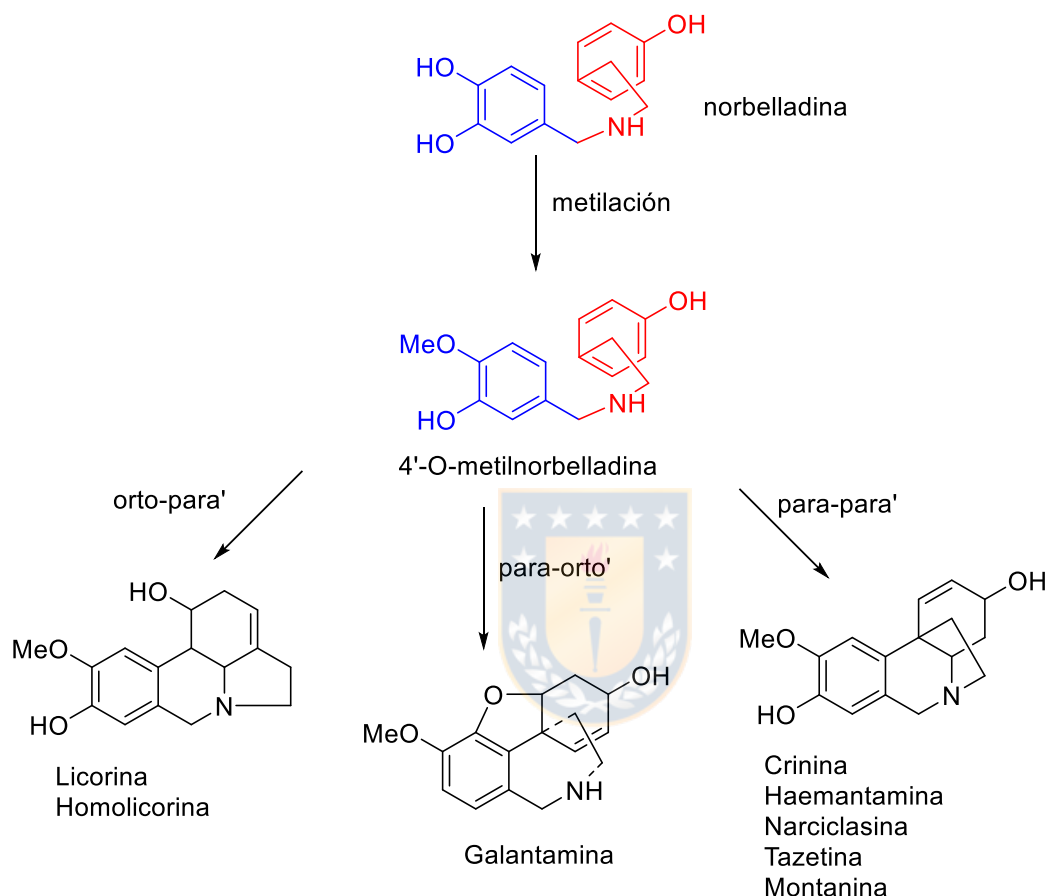


Figura 3. Acoplamientos fenol oxidativo en la biosíntesis de alcaloides de Amaryllidaceae. Tomado de Bastida et al. (2011).

La ruta biosintética de los alcaloides de Amaryllidaceae continúa con la metilación de la norbelladina (Figura 3) en la posición *orto* de un OH fenólico por la acción de la enzima S-adenosilmetionina (SAM) por lo que se obtiene la O-metilnorbelladina (Bastida et al. 2011).

Un acoplamiento fenólico-oxidativo sobre la O-metilnorbellaadina da lugar a una ciclación secundaria y a los diferentes tipos de alcaloides, así el acoplamiento *para-orto'* deriva en alcaloides tipo galantamina, acoplamiento *para-para'* tipo hemantamina/crinina y acoplamiento *orto-para'* tipo licorina/homolicorina, a partir de estas estructuras base, la planta biosintetiza diversas moléculas farmacológicamente activas. La notación ['] hace referencia a la posición en el anillo bencénico procedente del aminoácido L-fenilalanina (Kilgore y Kutchan 2015).

Los alcaloides de Amaryllidaceae se clasifican según el esqueleto carbonado en 9 tipos, los cuales se presentan en la Figura 4 (Bastida et al. 2011):

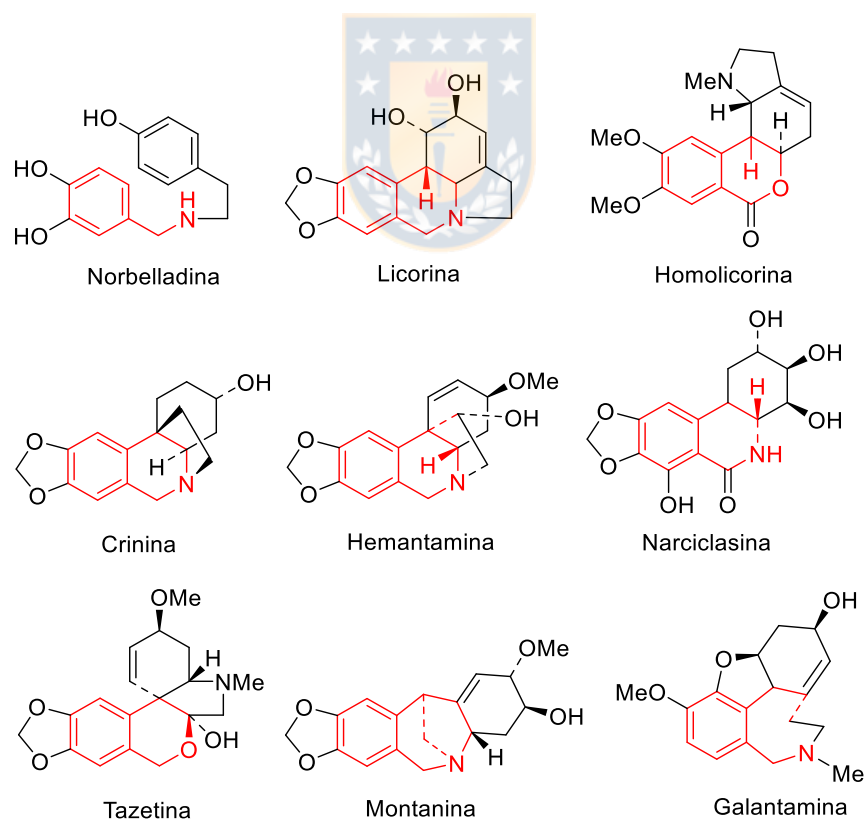
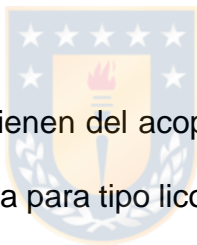


Figura 4. Principales estructuras de alcaloides de Amaryllidaceae.

1.3 Aspectos químicos y biológicos de los alcaloides Amaryllidaceae.

Los alcaloides de Amaryllidaceae exhiben una actividad farmacológica importante, dentro de las cuales se destacan actividad anticancerígena (Evidente y Kornienko 2009), antitumoral (Zupkó et al. 2009; Lamoral-Theys et al. 2009), antioxidante (Johnson et al. 2018), neuroprotectora (Cortes et al. 2015) e inhibición enzimática (Kaya et al. 2017). Esta actividad está ligada al tipo de estructura y sustitución de grupos R.

1.3.1 Alcaloides tipo licorina y homolicorina.



Los alcaloides de este grupo provienen del acoplamiento fenol-oxidativo *orto-para'* derivados del pirrolo de fenantridina para tipo licorina y de 2-benzopirano-indol para estructuras tipo homolicorina. La ruta biosintética de estos dos alcaloides se ilustra en la Figura 5, en la cual se forman más de 6 intermediarios, algunos resultantes de estructuras resonantes. Además por esta ruta se obtienen alcaloides como galantina, norpluvina entre otros (Bastida et al. 2011).

La licorina quizá es uno de los alcaloides de Amaryllidaceae más estudiado probablemente por su abundancia en la naturaleza e inmenso potencial terapéutico. (Cimmino et al. 2017).

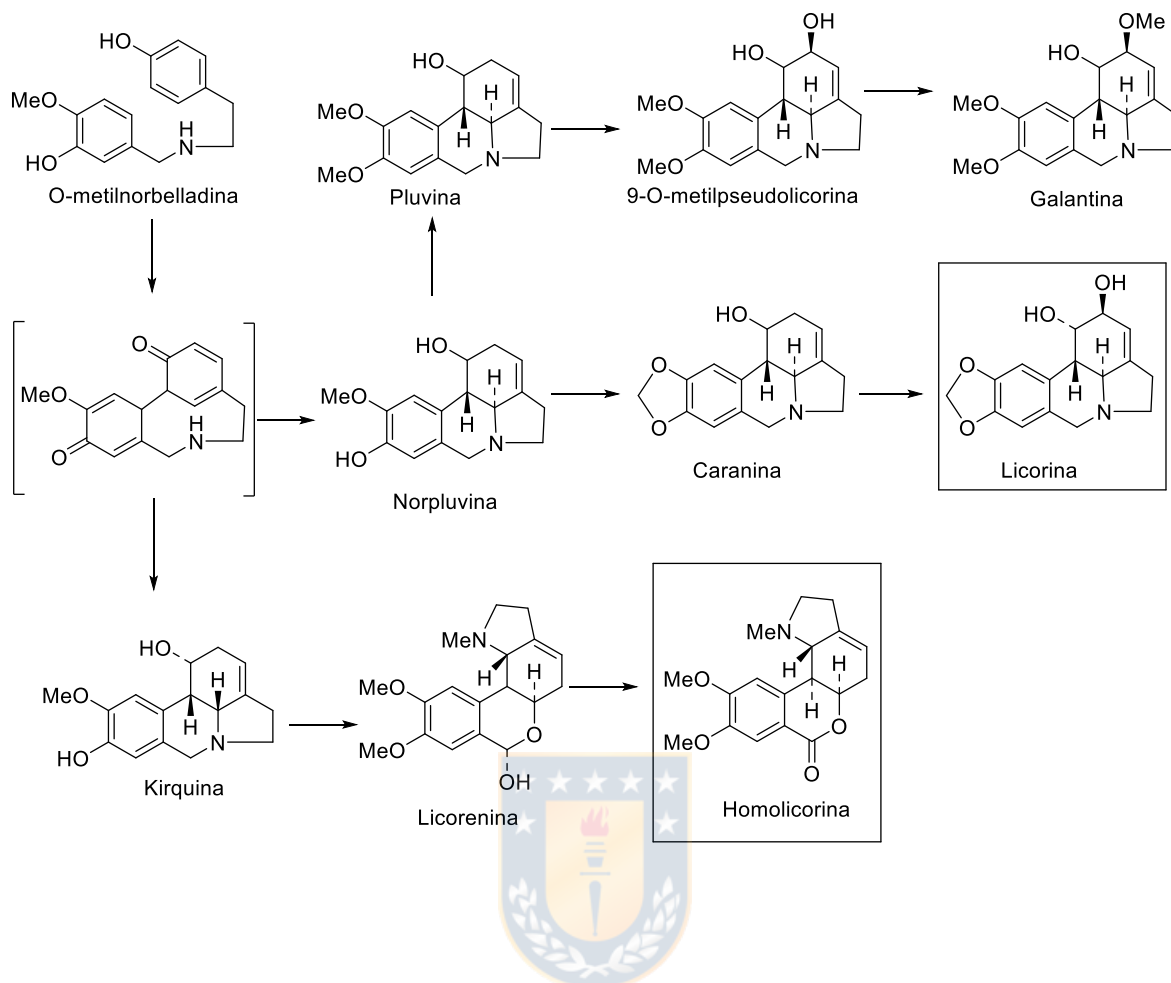


Figura 5. Alcaloides procedentes de acoplamiento fenol oxidativo *orto-para*'. Modificado de Bastida et al. (2011).

Licorina es activa en la mayoría de los casos en concentraciones menores a 5 μM , con alta especificidad contra varios tipos de cáncer tanto *in vivo* como *in vitro*, y contra diversas células cancerosas resistentes a medicamentos. Este alcaloide natural es un compuesto importante para el diseño de fármacos de nueva generación contra el cáncer y proporciona la base para el desarrollo de estrategias biológicas en el tratamiento del cáncer. El estudio SAR describe los parámetros estructurales que contribuyen significativamente a su actividad, tales como la

presencia de planaridad de la molécula, anillo de olefina o dioxol, la función de los grupos hidroxilo y la presencia de una carga positiva en el nitrógeno y el grupo amina (Roy et al. 2018; Hohmann et al. 2002; Li et al. 2019).

Para los alcaloides licorina y homolicorina, además se han descrito actividades antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias (Szlávik et al. 2004; Z. M. Liu et al. 2015; Lamoral-Theys et al. 2009; Roy et al. 2018).

1.3.2 Alcaloides tipo galantamina.

Este tipo de alcaloides tienen un núcleo de dibenzofurano y se forman por un acoplamiento fenol oxidativo del tipo *para-orto* desde *O*-metilnorbellaína a una dienona que sufre un cierre espontáneo formando un éter para producir *N*-dimetilnarwedina, dando norgalantamina y después una reducción estereoselectiva (Bastida et al. 2011). La norgalantamina sufre una *N*-metilación a galantamina en el paso final de la biosíntesis. La ruta biosintética de este grupo de alcaloides se ilustra en la Figura 6.

La galantamina es por excelencia un inhibidor selectivo, competitivo y reversible de la acetilcolinesterasa con IC_{50} menor a 2 μ M. Esta característica, sumada a la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica y específicamente aumentar las funciones colinérgicas, explica por qué fue de los primeros fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del Alzheimer en fase leve a moderada, (Cortes et al. 2015; Castillo et al. 2016; Harvey 1995).

Se ha demostrado también que la galantamina ayuda a mejorar la cognición previa en enfermedades del neurodesarrollo (Shao et al. 2014).

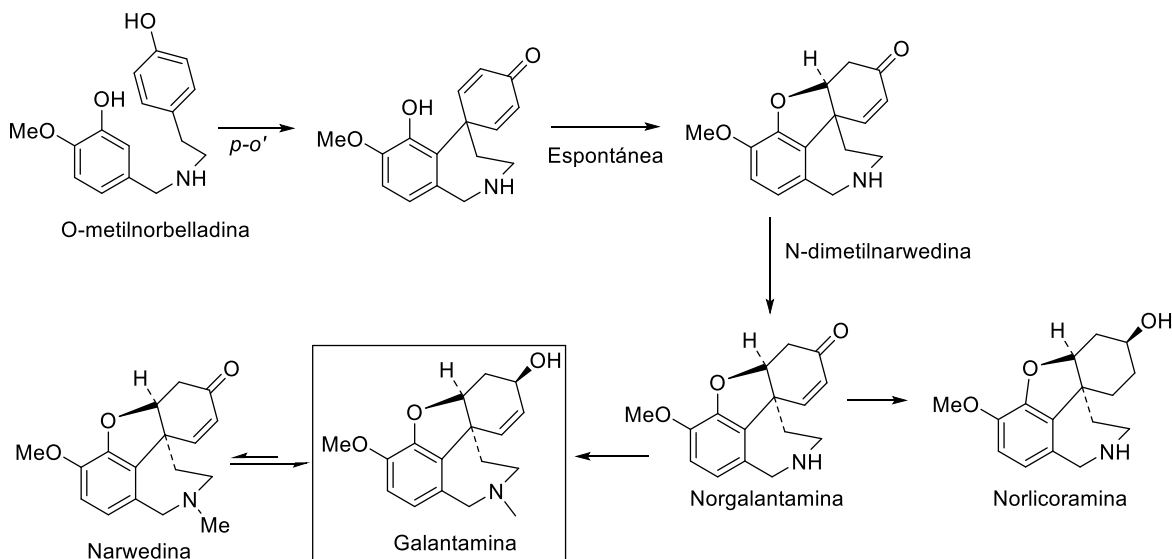


Figura 6. Biosíntesis de galantamina y sus derivados por acoplamiento fenol oxidativo *para-orto'*. Tomado de Eichhorn et al. (1998).

1.3.3 Alcaloides tipo crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina y montanina.

Este grupo de alcaloides que se origina por acoplamiento fenol-oxidativo *para-para'*, incluye estructuras derivadas de 5,10b-etanofenantridino para los tipos crinina y haemantamina, 2-benzopirano [3,4-c]-indol para los tipo tazetina, fenantridina para los tipo narciclasina y metanomorfantridina para los alcaloides tipo montanina (Figura 7).

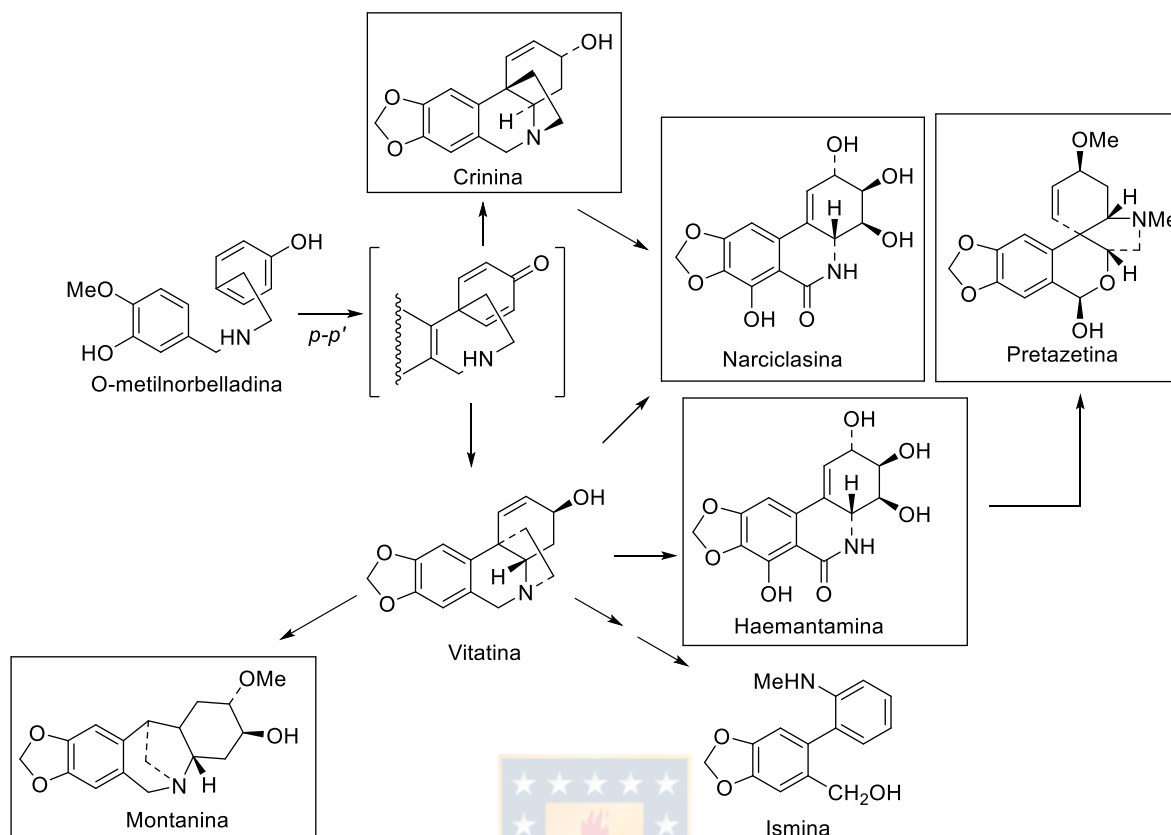


Figura 7. Biosíntesis de alcaloides tipo crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina y montanina. Tomado de Fuganti (1975).

Este acoplamiento fenol-oxidativo presenta estructuras más diversas y en ese sentido variadas actividades biológicas.

La actividad antiplasmodial, es una de las más estudiadas en los alcaloides derivados de crinina, en donde el farmacóforo apunta al núcleo completo de crinina como esencial para la actividad, además la estereoquímica del puente etano del átomo de nitrógeno al carbono 10 del anillo B, puede tener un efecto modulador en concentraciones menores a 10 µg/mL (Nair y van Staden 2019).

En el caso de haemantamina se han descrito en numerosos artículos la capacidad que tiene para inducir apoptosis y efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales (Havelek et al. 2017; Zupkó et al. 2009; Cimmino et al. 2017), incluso este alcaloide podría tener efecto citotóxico selectivo sobre células cancerígenas vía estabilización del gen p53, denominado el “guardián del genoma” (Pellegrino et al. 2018).

1.4 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la regeneración de una nueva planta completamente idéntica a partir de una pequeña parte de una planta madre en estado natural, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos, esto se da por la característica totipotencial de las células vegetales. El primero en hablar sobre esta capacidad de las células fue Gottlieb Haberlandt quien también señaló la posibilidad del cultivo de tejidos aislados o el cultivo de tejidos vegetales (Krikorian y Berquam 2003).

La totipotencia es la potencia celular máxima, que le confiere a la célula la capacidad de dirigir el desarrollo total de un organismo. Esto sucede si el núcleo de una célula es idéntico al de un cigoto (Slack 2005).

Haberlandt además, describió algunos de los impedimentos del cultivo de tejidos, como: 1. Las paredes celulares actúan como obstáculos para la absorción de los nutrientes, lo que restringe el número de compuestos que se pueden usar con el propósito de inducir la formación de brotes, 2. El crecimiento en plantas superiores está restringido a regiones meristemáticas, 3. Las células tomadas de fuentes

distintas de los meristemos primarios y laterales probablemente presenten menor totipotencialidad para el crecimiento celular y 4. Las plantas monocotiledóneas presentan gran dificultad para producir cultivos de células, tejidos u órganos.

A través de diversas investigaciones se ha logrado controlar y revertir la mayoría de los inconvenientes de esta técnica, logrando no solo conservar un gran número de especies, sino también aprovechar el cultivo para la producción de metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos, esteroides, fenoles entre otras moléculas farmacológicamente activas (Santoro et al. 2013; Ahuja et al. 2005; Amoo, Aremu, y van Staden 2012; Shilpashree y Rai 2009).

También se ha logrado cultivar grandes cantidades de material vegetal, sin fluctuación en el suministro y sin factores ambientales como la sequía, que puedan acabar la producción dado que los cultivos celulares muestran altas tasas de crecimiento en relación con los sistemas convencionales, lo que facilita una alta producción en comparación con otras fuentes (Parr 1989).

El cultivo de tejidos *in vitro*, consiste en incubar una pequeña parte de una planta, en condiciones estériles en un medio nutritivo constituido por azúcares como fuente de carbono, nutrientes como minerales, vitaminas y hormonas vegetales que estimulan el crecimiento de la nueva planta que a su vez puede ser propagada. Las características genéticas de las plantas resultantes se mantienen y todas son genéticamente iguales con ausencia de patógenos al realizarse en condiciones asépticas, por lo que es una técnica de conservación de recursos fitogenéticos.

Esta técnica ha sido usada para la multiplicación rápida de bulbos de *Leucojum aestivum* como una estrategia de producción dirigida de galantamina a escala industrial (Pavlov et al. 2007). Los autores desarrollaron un protocolo que les permitía obtener callos y plantas con una capacidad biosintética estable y rápido crecimiento de biomasa, características deseables para reducir el precio de costo del producto (galantamina).

1.4.1 Organogénesis somática.

La organogénesis en un sistema de propagación *in vitro* comprende la formación de brotes adventicios o de raíz a partir de explantes, sin pasar por el estado embrionario. Los órganos o partes de planta que tienen células con mayor capacidad para la producción de meristemas adventicios son usados para organogénesis (Reis et al. 2019).

Existen varias técnicas empleadas para la propagación por organogénesis, una de ellas y la más usada con este propósito en plantas de la familia Amaryllidaceae es twin-sclae (Paredes et al. 2014; Morán et al. 2003; Fennell, Crouch, y van Staden 2001; Rice, Finnie, y Van Staden 2011; Zhang et al. 2013; Reis et al. 2019).

En esta técnica se usan las escamas internas del bulbo, ya que estas presentan una mayor totipotencialidad, y consiste en realizar al bulbo cortes que permitan obtener 2 escamas de bulbo unidas entre sí por placa basal y de un tamaño

aproximado de 4 -7 mm. El crecimiento del brote se observa en medio de las dos escamas (Figura 8), por lo tanto este es un paso limitante y que requiere expertiz.

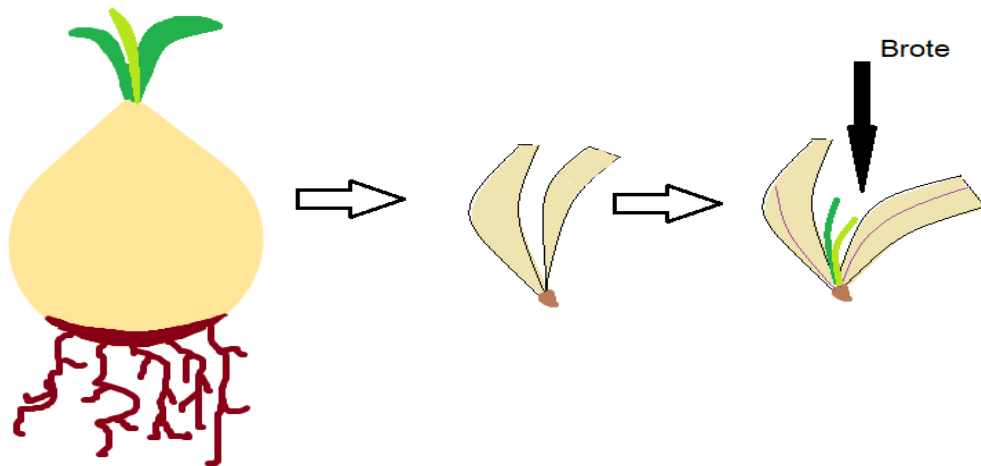


Figura 8. Formación de brotes en el cultivo de tejidos vegetales por twin-scaling.

Esta técnica además debe ser acompañada por suministro constante de macro y micronutrientes, así como un de una fuente de carbono y proporciones de auxinas y citoquininas como hormonas vegetales reguladoras de crecimiento. Estos efectos estimulantes fueron estudiados por Murashige y Skoog (1962) en función de la respuesta morfogénica *in vitro* observada.

La Figura 9, esquematiza el proceso de organogénesis para la obtención de clones de plantas:

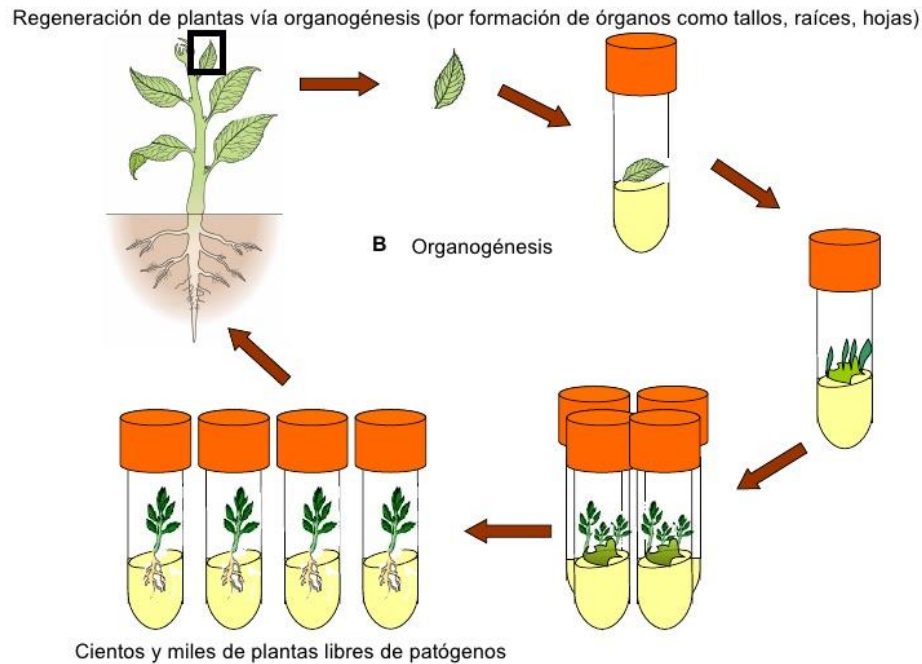


Figura 9. Esquema general de organogénesis. Tomado de Tofiño (2017).



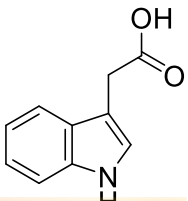
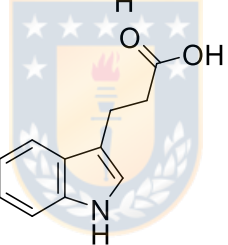
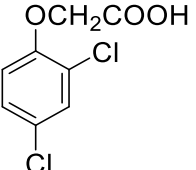
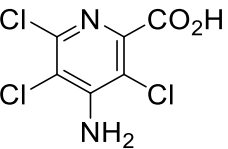
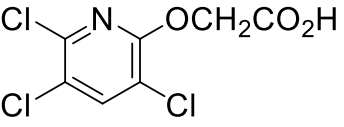
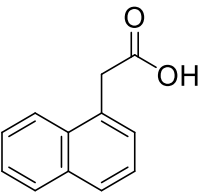
1.4.2 Reguladores de crecimiento.

- Auxinas.

Las auxinas son hormonas vegetales naturales, moléculas orgánicas móviles que se transportan de célula a célula y de órgano a órgano para señalar y coordinar el crecimiento y el desarrollo de una planta. Darwin en 1880 fue el primero en concluir que existían moléculas en las plantas las cuales presentaban gran movilidad y mediaban el crecimiento (Korver, Koevoets, y Testerink 2018).

La principal auxina natural en todas las plantas es el ácido indol-3-acético (IAA) y se sintetiza principalmente en células meristemáticas en división (Srivastava y Srivastava 2002). En la tabla 1 se presenta algunas de las auxinas más usadas en cultivo de tejido y su función.

Tabla 1. Usos y estructuras de algunas auxinas.

Auxina (abreviación)	Estructura	Usos
Ácido indol-3-acético (IAA)		Auxina natural Desarrollo de raíces y frutos
Ácido indol-3-butírico (IBA)		Auxina natural. Enraizamiento
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)		Herbicida selectivo
Picloram (Tordon, Grazon)		Herbicida selectivo
Triclopyr (Garlon)		Herbicida selectivo, antiabscisión de fruta de huerta
Ácido 2-(1-Naftil)acético (NAA)		Enraizamiento. Inductor de raíces

Las auxinas son un requisito para la división celular de la planta y median el control sobre muchos otros eventos durante el desarrollo. Estos incluyen, el crecimiento asimétrico durante el fototropismo y el gravitropismo, el dominio apical y ramificación, el desarrollo de la fruta, el inicio de raíces laterales y adventicias. Por lo tanto, las concentraciones de auxina en la planta deben ser controladas cuidadosamente, así como es necesario que exista una maquinaria sofisticada para su transporte (Napier 2003; Barbez et al. 2012; Di Mambro et al. 2017).

En el cultivo de células y tejidos, las concentraciones de auxinas y citoquininas se manipulan para promover el crecimiento proliferativo de callos, la regeneración y la inducción de la raíz. Por ejemplo, para la inducción de la raíz se elevan las concentraciones de auxina; para regeneración las concentraciones de auxina se reducen y las citoquininas aumentan (Napier 2003).



- **Citoquininas.**

Las citoquininas son moléculas derivadas de la adenina con una cadena lateral unida al grupo amino 6 del anillo purínico que afectan muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas y la respuesta a factores bióticos y abióticos (Hallmark y Rashotte 2019).

Desde su descubrimiento en 1950, las citoquininas han estado implicadas en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluida la división

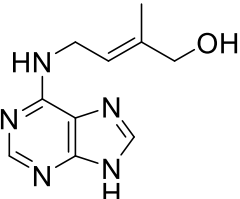
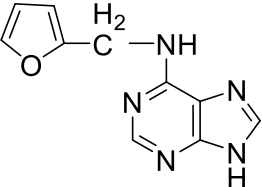
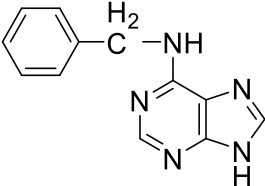
celular, el inicio y el crecimiento de los brotes, la senescencia de las hojas, el dominio apical, la absorción de nutrientes y la filotaxis (Savelieva et al. 2018).

Clásicamente, se pensaba que las citoquininas se sintetizaban en las raíces y se transportaban a los brotes, pero estudios más recientes indican que las citoquininas se producen en toda la planta, incluso en los tejidos aéreos. Cabe resaltar que la función de la citoquinina es regulada además por la presencia de auxina (Kieber y Schaller 2014; Barpete et al. 2014).

Algunas citoquininas se muestran en la Tabla 2.



Tabla 2. Citoquininas, estructura y función.

Citoquinina	Estructura	Función
Zeatina		Inductor en la división celular. Ruptura de la dominancia apical. Neoformación de órganos en cultivo de tejidos vegetales.
Kinetina		En presencia de auxina promueve la división celular
6-bencilamino purina		Crecimiento y desarrollo de plantas, estimula floración y riqueza del fruto.

1.4.3 Fuentes de carbono.

En el cultivo de tejidos *in vitro* generalmente se usa sacarosa, glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa y galactosa entre otros. La fuente de carbono se necesita porque los explantos y todos los órganos y tejidos desarrollados son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar *in vitro*.

1.4.4 Macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y aminoácidos.

Los macro y micronutrientes son elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de los brotes y explantes. Los macronutrientes son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales debido a que intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas. Estos macronutrientes son nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre y son usados por la planta en mayor proporción.

El hecho que las concentraciones de los micronutrientes son mucho más bajas, en comparación con los macronutrientes, en los tejidos de las plantas implica que cada uno de estos grupos de nutrientes tiene diferente papel en el crecimiento y metabolismo de las plantas y no necesariamente que tengan menor importancia.

Algunos micronutrientes son el hierro, manganeso, cobre, níquel, zinc, boro y están implicados en activación de enzimas, constituyen las metaloproteínas, incluso están involucrado en la tolerancia del cultivo al estrés y crecimiento de tejidos (Aguirre, Baudoin, y Leigue 2016).

Las vitaminas son utilizadas como catalizadores en varios procesos metabólicos y son añadidas al medio de cultivo para estimular procesos de crecimiento específicos en los tejidos, la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante en los fenómenos de organogénesis. Por ejemplo, la tiamina es imprescindible en el cultivo *in vitro* para un buen crecimiento del cultivo y el *m*-inositol estimula el crecimiento y división celular en muchas especies vegetales (Murashige y Skoog 1962).

Los aminoácidos, aunque en menor proporción, también favorecen la proliferación de callos en organogénesis y en la multiplicación vegetativa *in vitro*. Así, se ha observado en diferentes cultivos, que mezclas de aminoácidos presentan efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación (Aguirre, Baudoin, y Leigue 2016).

1.5 Cromatografía de partición centrífuga (CPC).

La cromatografía en contracorriente es una técnica de cromatografía de partición líquido-líquido que emplea dos fases líquidas inmiscibles. Una fase se designa como la fase estacionaria y se retiene por fuerzas gravitacionales o centrífugas, mientras que la segunda fase, la fase móvil, pasa a través de la fase estacionaria impulsada por una bomba. La separación de los componentes de una mezcla se logra

mediante la introducción de la muestra en un extremo de la fase estacionaria con la fase móvil. Cada componente es retenido por la fase estacionaria en un grado dependiente de su coeficiente de partición para el sistema de dos fases. Los compuestos individuales se eluyen del otro extremo del fase estacionaria junto a la fase móvil. El componente con el coeficiente de partición más a favor de la fase móvil se eluirá primero.

La cromatografía de partición centrífuga de desplazamiento (CPC), se ha utilizado cada vez más para aislar y purificar grandes cantidades de compuestos bioactivos (Friesen y Pauli, 2007). Una de las metodologías más utilizadas para el aislamiento de alcaloides es el refinamiento por zona de pH. Este protocolo está restringido a compuestos ionizables, que tienen una gran diferencia en la solubilidad entre sus formas ionizadas y neutras. Esta cromatografía de separación y desplazamiento líquido-líquido sin soporte tiene muchas ventajas, tales como; alta capacidad de carga de muestras con adsorción irreversible mínima o saturación de fase estacionaria y alta selectividad. Lo anterior permite la separación de compuestos con estructuras muy similares con alta pureza y bajo consumo de solvente, en comparación con las técnicas preparativas convencionales.

1.5.1 Refinamiento por zona de pH.

En refinamiento por zona de pH los analitos son separados por un mecanismo similar al que ocurren en cromatografía de desplazamiento, es decir, la fase móvil

orgánica (eluyente) desplaza a los analitos desde la fase estacionaria hacia la fase móvil en la parte posterior de las zonas de soluto. Debido a esta acción, el "eluyente" en el modo de desplazamiento normal se denomina "desplazador". En el modo de desplazamiento inverso, el proceso anterior se alterna: un componente en la fase estacionaria orgánica ("retenedor") transfiere los analitos de la fase móvil a la fase estacionaria en la parte frontal de las zonas de soluto en función del pH, por lo que en esta técnica es necesaria la adición de agentes que modifiquen el pH de los sistemas de solventes desde en rango ácido al básico (o viceversa) según el compuesto diana y la elución del mismo (Ito 2005).

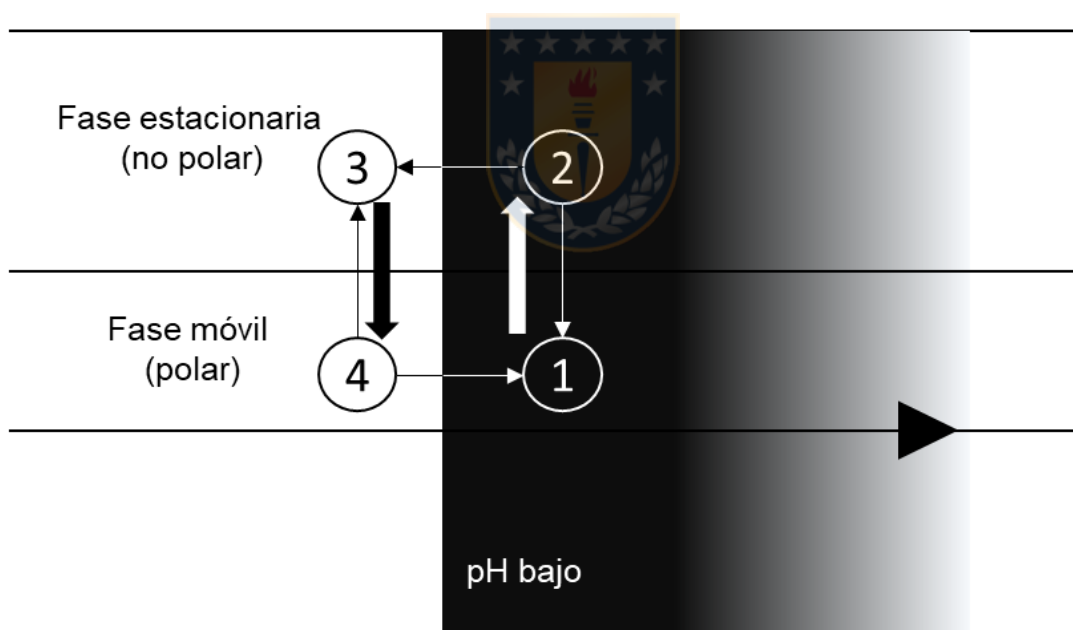


Figura 10. Ilustración esquemática del proceso de separación en refinamiento por zona de pH. Modificado de Ito y Ma (1996).

Los perfiles de elución resultantes de estos dos modos de elución son bastante similares, excepto que el orden de elución de los analitos se invierte. La Figura 10 ilustra el mecanismo de la separación en refinamiento por zona de pH, en el cual una parte de la columna contiene fase estacionaria no polar en la mitad superior y la fase móvil polar en la mitad inferior donde las moléculas de soluto circulan en el “borde” de la región de pH bajo. El analito ácido circula alrededor del “borde” de retención repitiendo la protonación y la desprotonación.

Este método puede aplicarse eficazmente para la separación y concentración de una pequeña cantidad de iones orgánicos presentes en un gran volumen de la solución de muestra, sin embargo la aplicación más útil de esta técnica es para una separación preparativa a gran escala (Ito 2013).


Diversos estudios reportan la eficiencia de esta técnica en el aislamiento de alcaloides isoquinolínicos como isocoridina, coridina (Hu et al. 2010), huperzinas A y B (Toribio et al. 2007), bicucullina, protopina (Wang et al. 2006), magnoflorina, berberina (Kukula-Koch et al. 2016), y palmatina (Jiang y Wang 2018).

Esta técnica tiene muchas ventajas respecto de otras técnicas preparativas, algunas de ellas son: alta capacidad de carga de muestra sin adsorción irreversible ni saturación de fase estacionaria, tiempos cortos de separación y fácil obtención de aislados, alta selectividad lo que permite la separación de compuestos muy puros con estructuras muy similares y poco consumo de solvente comparado con las técnicas preparativas convencionales (Renault et al. 1997).

Los alcaloides de Amarillydaceae al ser bases débiles son una diana ideal en una matriz compleja para ser aislados por este tipo de técnicas, sobre todo si se tiene en cuenta la reducida concentración de alcaloides presentes en el material vegetal.

Existen algunos criterios básicos para llevar a cabo una operación de refinamiento por zona de pH, uno de ellos es la selección del retenedor y el eluyente, debido a que la concentración del mismo determina la concentración de soluto en la fracción, mientras que la relación entre la concentración del retenedor y la del eluyente determina el tiempo de retención de los analitos.

1.5.2 Selección de retenedor y eluyente.



Los retenedores más utilizados para los analitos ácidos son los ácidos orgánicos como el ácido trifluoroacético (TFA), y los de los analitos básicos son las bases orgánicas como la trietilamina (TEA). La TEA además posee la particularidad de ser una de las pocas bases soluble en solventes orgánicos, por lo que es muy usada en este tipo de separación. Para compuestos altamente polares como los colorantes de ácido sulfónico, el ácido sulfúrico se usa como retenedor junto con un ligando básico (contraíón hidrófobo) como la dodecilamina que retiene al ácido sulfúrico en la fase orgánica superior.

Los eluyentes para los analitos ácidos son bases inorgánicas tales como NH_3 , Na_2CO_3 y NaOH , dependiendo de la acidez del analito. Entre ellos, el NH_3 se usa más comúnmente para la separación de ácidos carboxílicos, mientras que Na_2CO_3

y NaOH se usan para compuestos fenólicos. Los eluyentes para los analitos básicos son ácidos inorgánicos como el HCl (Weisz, Mazzola, y Ito 2011).

1.5.3 Selección del sistema de solventes.

La selección del sistema de solventes es mucho más limitada que para CPC convencional, dado que las muestras son ácidas o básicas las fases se limita a unos pocos sistemas de solventes de dos fases, tales como metil *tert*-butil éter (MTBE)/agua o MTBE/acetonitrilo (ACN)/*n*-butanol/agua para la mayoría de las muestras hidrofílicas (Zou et al. 2018).

Hay una serie de experimentos que se deben realizar previamente, para facilitar la selección de fase, los cuales se resumen a continuación:

1. Seleccionar un sistema solvente de dos fases que proporcione un valor K del compuesto objetivo cercano a uno.
2. Equilibrar las dos fases con una pequeña cantidad de muestra y agregar retentor, en un experimento diferente agregar eluyente.
3. Determinar el K del compuesto a pH básico y ácido. Si uno de los K determinados es mucho mayor que uno, el sistema solvente de dos fases se puede usar efectivamente para el refinamiento por zona de pH (Ito 2013).

1.6 Cáncer.

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la formación y crecimiento desmesurado de células anormales que amenazan la vida de un individuo al interferir con las funciones vitales del cuerpo. Aunque se sabe que el cáncer es causado por una proliferación celular descontrolada desencadenada por un proceso inflamatorio progresivo. De acuerdo con un modelo de carcinogénesis, generalmente conocido como la teoría de la mutación somática, los cambios en el ADN son mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores. Las mutaciones en los oncogenes activan la proliferación celular, mientras que las mutaciones en los genes supresores de tumores inhiben la muerte celular. El cáncer sería el resultado de la acumulación gradual de mutaciones del gen conductor que aumentan sucesivamente la proliferación celular (López-Lázaro 2018). Además cambios en solo una célula puede generar alteraciones progresivas como hiperplasia y displasia, las que conllevan finalmente al desarrollo de cáncer (Figura 11).

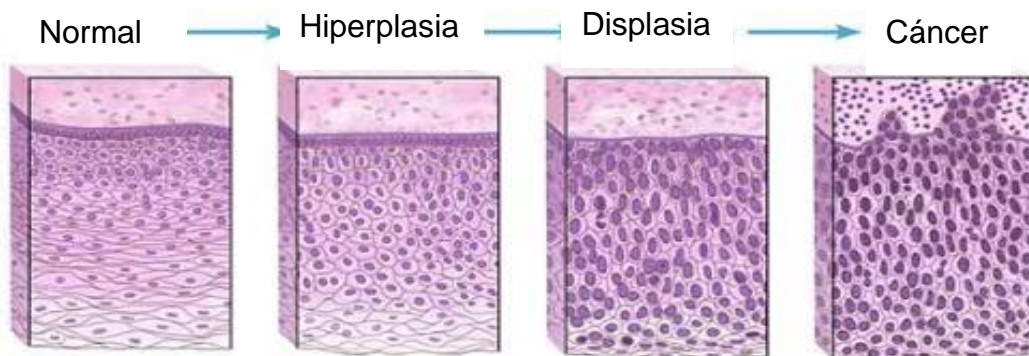


Figura 11. Cambio en células normales que puede conllevar a cáncer.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En el 2015 la enfermedad causó 8,8 millones de defunciones, lo que corresponde aproximadamente al 13% de todas las muertes en todo el mundo. Los tipos principales de cáncer que contribuyen a la mortalidad mundial son el cáncer de pulmón, de estómago, de colon, hepático y de mama, la Figura 12, muestra las defunciones por año.

Se proyecta que las muertes debido al cáncer a nivel mundial continuarán incrementándose, llegando a 12 millones de defunciones en el 2030.

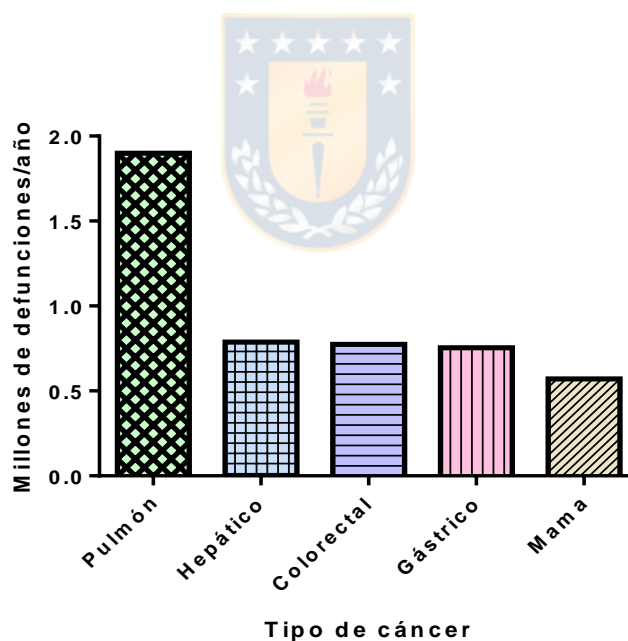


Figura 12. Mortalidad anual por diferentes tipos de cáncer a nivel mundial. Tomado de “Organización Mundial de La Salud. OMS” (2019).

En el continente americano el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares. Las tasas de mortalidad más elevadas en América latina se observan en Uruguay, Perú, Argentina y Chile, se proyecta que 1,6 millones de personas morirán de cáncer para el 2030, un aumento atribuido a cambios demográficos y mayor contacto con factores de riesgo como, exposición a sustancias químicas, la luz ultravioleta y la presencia de contaminantes en el agua y/o aire. A lo anterior se suma el incremento de malos hábitos como tabaquismo, consumo de alcohol, mala alimentación y obesidad (“Organización Panamericana de La Salud. Organización Mundial de La Salud” 2007; Seifi et al. 2018).

En Chile, el cáncer es responsable de 23% del total de muertes anuales, constituyendo la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades del aparato circulatorio. Se estima que anualmente se diagnostican más de 30.000 casos nuevos de cáncer.



2 ANTECEDENTES.

Las especies botánicas que fueron objeto de estudio en esta tesis, pertenecen a la familia de las Amaryllidaceae, específicamente a los géneros *Rhodophiala* y *Rhodolirium*, las características y estudios de cada especie se mencionan a continuación.

2.1 Género *Rhodophiala*.

Rhodophiala C. Presl (Amaryllidaceae) es un género que pertenece a la tribu Hippeastreae, con un número aproximado de 40 especies de Sudamérica tropical y subtropical. Su rango de distribución se encuentra en Uruguay, Argentina, Bolivia y Chile (Belov 2009).

Las plantas de *Rhodophiala* tienen un bulbo tunicado de 4–6 cm de diámetro, que se establece a 20–30 cm bajo tierra, una umbela simple que contiene hasta seis flores, cada flor tiene 4–6 cm de ancho y un tallo de flor de 35 a 50 cm de largo, además son plantas con alto valor ornamental (Naranjo y Poggio 2000).

- *Rhodophiala advena*.

La especie *Rhodophiala advena* (Figura 13) es endémica de Chile. Crece en zonas costeras planas o laderas de exposición norte (entre 0-500 m.s.n.m) con precipitaciones anuales de 400 - 800 mm (invierno). Se encuentra distribuida en la región de Valparaíso (Belov 2009).



Figura 13. Flores de *Rhodophiala advena*. Fuente: fotografía tomada por J. Alarcón. Lugar: Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales.

De esta especie solo hay dos investigaciones en las cuales se estudian el cariotipo, la hibridación y el marco filogenético de la planta (Baeza, Schrader, y Escobar 2006; García et al. 2017). Respecto del tipo y contenido de alcaloides de esta especie de Amaryllidaceae, hasta la fecha no hay ningún reporte, así como tampoco hay investigaciones sobre su actividad biológica.

- *Rhodophiala splendens*.

Rhodophiala splendens (Figura 14) es una Amaryllidaceae endémica de Chile, crece en terrenos de elevación media (hasta el límite del bosque) o elevación baja en valles del interior. Generalmente en suelos rocosos y ambientes secos, donde el período sin precipitaciones dura 3 - 5 meses. En Chile se distribuye entre la región del Maule y la región del Ñuble (Belov 2009).

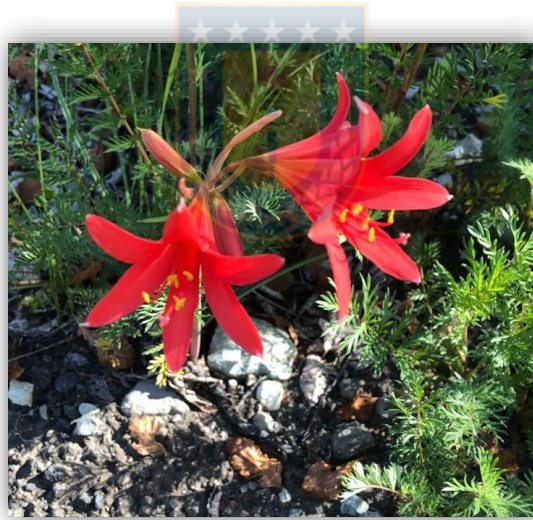


Figura 14. Flores de *Rhodophiala splendens* en su hábitat natural. Tomada por J. Alarcón (Valle las trancas, Región del Ñuble).

Para esta especie solo hay un estudio en el que identificaron alcaloides tipo licorina, haemantamina tazetina, narciclasina y miselaneos en extractos metanólicos de

hojas y bulbos (Tallini et al. 2018) y determinaron la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa.

- *Rhodophiala pratensis*.

Rhodophiala pratensis (Figura 15) es una especie endémica de Chile, distribuida entre las regiones del Maule y Bio Bio en sectores de baja elevación (Costa, 0 - 500 m.s.n.m) y valles secos del interior (Belov 2009).



Figura 15. Flores de *Rhodophiala pratensis* en su hábitat natural. Fuente: fotografía tomada por la autora. Lugar: Parque Botánico Hualpén. Universidad de Concepción.

Existen antecedentes que indican disminución de su abundancia; además, sus poblaciones están amenazadas por transformación del hábitat por actividades

agrícolas y urbanización. De esta especie se ha estudiado su contenido de alcaloides, actividad anti acetilcolinesterasa y su cariotipo (Naranjo y Poggio 2000; Lizama-Bizama et al. 2018). Además, hay un estudio sobre su propagación *in vitro* y actividad neuroprotectora (Trujillo-Chacón et al. 2019; Trujillo-Chacón et al. 2019).

2.2 Género *Rhodolirium*.

Rhodolirium es un género sudamericano endémico de Chile y Argentina, compuesto por seis especies (Baeza, Mariangel, et al. 2009) que se distribuyen desde el norte de Chile, en zonas de vegetación de neblina costera, hasta la provincia de Osorno por el sur, y desde el cinturón costero hasta el lado oriental de los Andes, en Argentina, a alturas entre 150-2500 m s.n.m. (Muñoz et al. 2011) Este género pertenece a la tribu Hippeastreae. Se caracteriza por tener flores individuales o pluriflor, en forma de embudo con tubo floral alargado, así como bulbos acampanados de 5 a 6 cm de largo (Baeza et al. 2017). Las plantas de este género presentan alto valor ornamental.

- *Rhodolirium speciosum*.

R. speciosum (Herb.) Ravenna (Figura 16) es endémica de Chile, con una distribución fundamentalmente en el valle central de la Región del Bío-Bío y de La Araucanía, con flores acampanadas, rojo-amarillentas. En literatura se encuentran dos estudios en el contexto filogenético y de cariotipo fundamental (Muñoz et al.

2011; Baeza, Mariangel, et al. 2009). Además se han logrado identificar algunos alcaloides como galantamina en bajas concentraciones y de tipo licorina, haemantamina entre otros (Trujillo-Chacón et al. 2019).



Figura 16. Flores de *Rhodolirium speciosum*. Fuente: fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales.

3 HIPÓTESIS.

Fundamentación:

Las Amaryllidaceae son una familia de plantas que se caracterizan por la presencia exclusiva de un tipo de alcaloide (derivados isoquinolínicos), se han determinado aproximadamente quinientos alcaloides los cuales presentan múltiples actividades biológicas y farmacológicas, a pesar de esto, solo galantamina es usada terapéuticamente y la información sobre los demás alcaloides es escasa, sin mencionar los que aún se desconocen (Bastida et al. 2011).

Uno de los mayores inconvenientes para el estudio de estos compuestos es la baja disponibilidad en las plantas y el reducido material vegetal disponible.

Factores ambientales han disminuido notablemente el número de especies e individuos de esta familia sin contar con el hecho de que la propagación en su estado natural es muy lenta.

Hipótesis.

A través de la micropropagación *in vitro* de cuatro especies de plantas de la familia Amaryllidaceae (*Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Rhodophiala splendens* y *Rhodophiala advena*) se puede inducir la producción de alcaloides mediante el uso de hormonas vegetales y evaluar su actividad antitumoral *in vitro*.

4 OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Propagar *in vitro* bulbos de especies de Amaryllidaceae chilenas, identificar los alcaloides por CG-EM/EM y evaluar su actividad antitumoral *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos.

- Propagar *in vitro* bulbos de *Rhodophiala pratensis*, *Rhodolirium speciosum*, *Rhodophiala splendens* y *Rhodophiala advena* por el método twin-scaling.
- Evaluar el efecto de combinaciones hormonales en la biosíntesis de los alcaloides.
- Identificar los alcaloides mayoritarios en los explantes obtenidos por cultivo de tejidos *in vitro* por CG-EM/EM según su patrón de fragmentación.
- Aislar los principales alcaloides de *Rhodolirium speciosum* mediante refinamiento de zona de pH y elucidar sus estructuras por CG-EM/EM, RMN ^1H , ^{13}C y bidimensional.
- Determinar la actividad citotóxica de los extractos alcaloideos sobre células AGS de extractos alcaloideos.

5 SECCIÓN EXPERIMENTAL.

5.1 Recolección y tratamiento del material vegetal.

El material vegetal estudiado se colectó en diferentes Regiones de Chile y todas las especies se encontraban en periodo de floración.

Rhodophiala pratensis se colectó en Octubre de 2018, en la Península de Hualpén (Región del Bio Bio), en el parque botánica Hualpén, en las coordenadas 36°47'S 73°10'O, a 60 m.s.n.m y voucher de colecta C. Baeza 4340 (CONC).

Rhodolirium speciosum fue colectado en Noviembre de 2018, en la comuna de Coronel, Camino a Santa Juana (Región del Bio Bio), en las coordenadas 37°10'S 72°58'W, a 49 m.s.n.m y voucher de colecta C. Baeza 4350 (CONC).

Rhodophiala splendens fue colectada en Noviembre de 2018 en la comuna de Pinto, las Trancas (Región del Ñuble), en las coordenadas 36°54'13.6"S 71°29'10.7"W, a 1240 m.s.n.m.

Rhodophiala advena fue colectada en Octubre de 2018 camino a la comuna de Tilama desde Guanguali, los Vilos (Región del Coquimbo), en las coordenadas 32°05'14.5"S 71°10'29"W, a 486 m.s.n.m.

El material vegetal colectado fue sembrado en macetas, para preservar los bulbos administración a utilizar en el cultivo de tejidos *in vitro*.

Rhodophiala pratensis y *Rhodolirium speciosum* fueron identificadas por el profesor Carlos Baeza de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción y los voucher de colecta se encuentran en el herbario de la Universidad de Concepción.

5.2 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

5.2.1 Obtención de explantes y esterilización de bulbos.

Para obtener los explantes de los bulbos se usó el método twin-scaling, como se muestra en la Figura 17, en ambiente estéril el bulbo se cortó a la mitad (conservando la placa basal), y este a su vez se partió en cuartos, para finalmente obtener explantes. Cada uno con dos escamas unidas a la placa basal. Por cada bulbo se obtuvieron de 8 a 16 escamas. Las escamas exteriores del bulbo se eliminaron, debido a que presentan baja totipotencialidad.

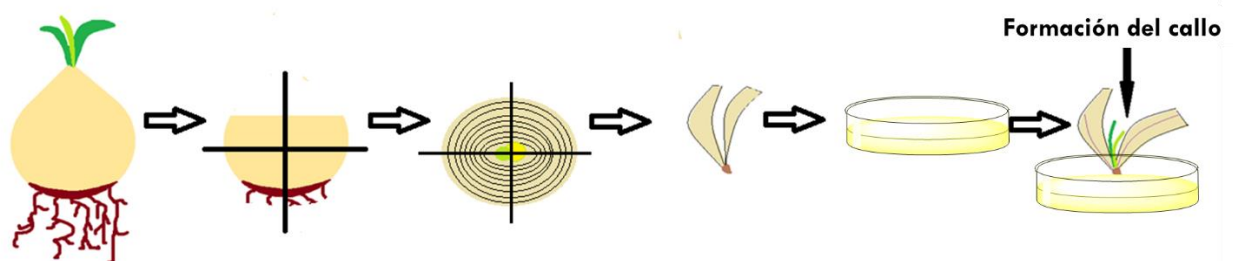


Figura 17. Corte de bulbo para obtener twin-scales.

Los explantes obtenidos mediante esta técnica requieren de altos niveles de asepsia, haciéndose necesaria la esterilización del material de trabajo y la desinfección de los explantes obtenidos, por lo que un protocolo de esterilización fue implementado y estandarizado teniendo en cuenta lo reportado por diferentes autores (Paredes et al. 2014; Fennell, Crouch, y van Staden 2001; Rice, Finnie, y Van Staden 2011; Pereira da Costa et al. 2019; Trujillo-Chacón et al. 2019).

1. Los bulbos cultivados en macetas fueron lavados con abundante agua destilada y jabón, posteriormente se retiró el catáfilo, se cortaron las hojas, tallos (zona apical) y raíces.
2. El bulbo se llevó a la cámara de flujo laminar y se sumergió en hipoclorito de sodio al 4% por 5 minutos, posterior a esto se sumergió en etanol al 70% por 1 minuto y se lavó por tres veces consecutivas con agua destilada estéril.
3. Una vez el bulbo esterilizado, se llevó a una placa petri estéril y se procedió a obtener twin-scales con material quirúrgico previamente esterilizado.
4. Con las escamas dobles se realizó el mismo proceso de esterilización mencionado en el numeral 2.

5.2.2 Medio basal de cultivo.

Los explantes estériles se sembraron individualmente en medio de cultivo compuesto por sales y vitaminas (Murashige y Skoog 1962), en placas de vidrio estériles para la fase de inducción y en frascos de vidrio estériles para la fase de multiplicación y crecimiento.

La composición exacta del medio se describe en la tabla 3:

Tabla 3. Componentes medio de cultivo según Murashige y Skoog (1962).

Compuesto	mg/L
Nitrato de amonio	1650,0
Ácido bórico	6,2
Cloruro de calcio (Anhidro)	332,2
Cloruro de cobalto hexahidratado	0,025
Sulfato cuprico pentahidratado	0,025
Dihidrato EDTA disodio	37,26
Sulfato ferroso heptahidratado	27,8
Glicina	2,0
Sulfato de magnesio (Anhidro)	180,7
Sulfato de manganeso monohidratado	16,9
<i>myo</i> -Inositol	100,0
Ácido nicotínico	0,5
Yoduro de potasio	0,83
Nitrato de potasio	1900
Fosfato de potasio monobasico	170,0
Hidrocloruro de piridoxina	0,5
Molibdato de sodio monohidratado	0,25
Hidrocloruro de tiamina	0,1
Sulfato de zinc heptahidratado	8,6
Sacarosa (fuente de carbono)	30000
Agar	9000
pH	5,8-6

5.2.3 Medio de inducción, crecimiento y multiplicación.

Con el fin de evaluar las combinaciones hormonales más apropiadas para la inducción del brote las especies de Amaryllidaceae estudiadas, el medio basal fue suplementado con diferentes concentraciones de auxinas como ácido indol acético (IAA), ácido naftalenacético (NAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y citoquinina como 6-benzilaminopurina (BAP) las cuales se encuentran detalladas en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos empleados con diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y citoquininas en fase de inducción.

	BAP (μM)	IAA (μM)	NAA (μM)	Numero de escamas
Tratamiento 1	10,00	6,25	--	30
Tratamiento 2	10,00	10	--	30
Tratamiento 3	10,00	12,5	--	30
Tratamiento 4	10,00	18,75	--	30
Tratamiento 5	4,44	--	2,70	30
Tratamiento 6	2,20	--	5,40	30
Tratamiento 7	4,44	--	5,40	30
Tratamiento 8	2,20	--	2,70	30
Tratamiento 9	--	--	--	30

Los brotes obtenidos en fase de inducción fueron subcultivados en frascos individuales y bajo los siguientes tratamientos de hormonas (Tabla 5).

Tabla 5. Tratamientos empleados con diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y citoquinas en fase de crecimiento y multiplicación.

	BAP (μM)	IAA (μM)	2,4-D	NAA (μM)
Tratamiento 1R	5,00	10,00	16,00	--
Tratamiento 2R	5,00	--	16,00	--
Tratamiento 3R	10,00	10,00	16,00	--
Tratamiento 4R	10,00	--	16,00	--
Tratamiento 1M	13,32	--		2,70
Tratamiento 2M	8,88	--		2,70
Tratamiento 3M	8,88	--		10,8
Tratamiento 4M	2,20	--		10,8
Tratamiento 5M	--	--		--

El medio y todo el material usado en el cultivo (frascos de 50, 100 250 y 500 mL, placas de Petri capacidad 30 mL) se esterilizó en un autoclave de calor húmedo NÜVE modelo OT 40 L, en un ciclo completo de 15 minutos a 1 atm y 121 °C.

El cultivo se conservó en condiciones de dos ciclos, el primer ciclo con temperatura de 24°C, humedad relativa de 80 % y un fotoperiodo de 12 horas de luz, y un segundo ciclo con temperatura de 20°C, humedad relativa de 60 % y 12 horas de oscuridad en una cámara climática BIOBASE modelo BJPX-A450.

El mantenimiento del cultivo se realizó cada 8 días, en el cual las plantas se higienizaban y se cambiaban a medio nuevo.

5.3 Obtención de extracto crudo de alcaloides.

Los bulbos de cada una de las especies colectadas se lavaron, se cortaron y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para luego liofilizarlos por 24 horas.

100 g de bulbos liofilizados se pulverizaron y se llevaron a maceración pasiva con 300 mL de metanol comercial por 48 horas. Este proceso se repitió por 3 veces consecutivas con igual volumen de metanol, posteriormente el extracto se sonicó (42 kHz, 70 W; Branson ultrasonic corporation, USA) en intervalos de 30 minutos y se sometió a microondas por 15 segundos. Los extractos resultantes se reunieron y se secaron a presión reducida a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El extracto metanólico total de bulbos se disolvió en 50 mL de H_2SO_4 al 2%, se realizó extracciones sucesivas con acetato de etilo (4 x 40 mL), la fracción acuosa se llevó a pH 10 con NH_4OH al 25% y se extrajo sucesivamente con cloroformo (4 x 40 mL). La fracción sobrante de acetato de etilo se llevó a sequedad y el residuo se extrajo nuevamente con H_2SO_4 al 2% repitiendo el procedimiento anterior. El crudo de alcaloides obtenido se concentró a presión reducida y se almacenó en un desecador.

Este proceso además se realizó para los brotes y plantas obtenidos por cultivo *in vitro* con el fin de identificar los alcaloides.

5.4 Determinación del perfil de alcaloides por CG-EM.

El análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometro de masas (CG-EM/EM) fue realizado en un equipo Agilent 7890a GC (Agilent, Palo Alto, CA) con inyector multimodal, acoplado a un detector Agilent triple Quad 7000 GC/MS. El

análisis de los alcaloides se efectuó en una columna capilar con fase estacionaria 5%-fenil-poli (dimetilsiloxano) HP-5 MS con dimensiones 30 m x 0.250 mm I.D x 0.25 μm di, (Agilent J&W, Palo Alto, CA). Se empleó helio (99.9999% pureza) como gas de arrastre con un flujo de 0,8 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C, el volumen de inyección de 0,8 μL . El programa de temperatura inicialmente fue de 100-180 °C (15 °C/minuto), luego incrementó a 180-300 °C (5 °C/minuto) y finalizó con 10 minutos de calentamiento a 300 °C. El tratamiento de datos y control del instrumento se realizó con el software Agilent MassHunter GC/MS (Version B.05.00 / Build 5.0.291.0).

Para este análisis, 5 mg de crudo de alcaloides se disolvieron en 500 μL de metanol, se agregó estándar de codeína en metanol para obtener una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se centrifugó por 5 minutos a 4000 rpm, para el análisis se usó el sobrenadante.



Los alcaloides se identificaron comparando el patrón de fragmentación de cada molécula según reportes de diferentes autores y el índice de retención de Kovats (RI), el cual se calcula para cada compuesto teniendo en cuenta los tiempos de retención de patrones de *n*-parafinas $\text{C}_8\text{-C}_{28}$ analizados bajo las mismas condiciones operacionales que las muestras.

Se realizó la determinación semicuantitativa de los alcaloides, teniendo en cuenta la relación entre el área y la intensidad de la fragmentación de cada uno de los compuestos, para tal propósito se tuvieron en cuenta 3 iones representativos para cada alcaloide.

5.5 Aislamiento preparativo de alcaloides por refinamiento de zona de pH.

La separación preparativa de los alcaloides se realizó en un Spot-CPC-250-B Bio 250-L Centrifugal Partition Chromatograph (Armen, France) con una capacidad total de columna de 250 mL y un volumen de loop de 10 mL. Los solventes fueron introducidos al CPC por un sistema HPLC preparativo SPOT-PREP II (Armen, France), equipado con una bomba cuaternaria, detector UV y colector de fracciones.

El sistema bifásico de solventes usado en la separación fue metil *tert*-butil éter/acetonitrilo/agua en las proporciones 400/100/500, el cual se agitó vigorosamente en un embudo de decantación con capacidad para 2 L. Una vez separadas las 2 fases se añadió a la fase orgánica superior (upper) trietilamina (concentración final, 15 mM) como agente retentor y a la fase acuosa inferior (lower) ácido fórmico (concentración final, 6 mM) como agente desplazante.

Para llevar a cabo el refinamiento por zona de pH, se bombeó fase orgánica a 30 mL/min y 500 rpm, posterior a esto y sin equilibrio de fases, 10 mL de muestra se inyectaron en del sistema. La fase inferior (lower), fue bombeada dentro del sistema en modo descendente a un flujo de 12 mL/min y con una rotación de 1800 rpm. Se colectaron 26 fracciones de 30 mL cada una, las cuales fueron monitoreadas con un barrido de 200-600 nm y las longitudes de onda específicas de 280 y 310 nm. Además, se determinó el pH en cada una de ellas y posteriormente se llevaron a sequedad a presión reducida a 55 °C.

Para llevar a cabo el aislamiento se pesaron 556,2 mg de crudo de alcaloides de *Rhodolirium speciosum* los cuales fueron disueltos en 5 mL de fase orgánica con retentor y 5 mL de fase acuosa con desplazante.

5.5.1 Análisis de fracciones por CG-EM.

Cada una de las fracciones obtenidas se reconstituyó con 1 mL de metanol y sin adición de estándar de codeína. Se analizaron por CC-EM bajo los mismos parámetros cromatográficos mencionados en el numeral 4.4.

5.5.2 Análisis de fracciones por CLAR-UV.



Las fracciones colectadas fueron analizadas preliminarmente por cromatografía líquida en un cromatógrafo Waters (Norteamérica USA), modelo Alliance 2695 el sistema consistió en una bomba cuaternaria LC20AT, horno de columna CTO-20AC, unidad desgasificadora DGU-20AR 5R, detector UV-VIS Waters dual- λ modelo 2487 (USA) y un autosampler SIL-20AC. Para la recopilación y tratamiento de datos se usó el software YL Clarity Waters. Para el estudio cromatográfico se empleó una columna kromosil C18 (4.6 x 250 mm; 5 μ m) (USA). La fase móvil consistió en ACN (0,2 % dietilamina) y agua (0,2% dietilamina, a pH 3 con adición de ácido fórmico), en proporciones 16: 84 y elución isocrática, la longitud de onda de detección fue 310 nm. El flujo fue de 1 mL/min, y la temperatura del horno de columna fue de 35 °C. El volumen de inyección fue de 5 μ L de la respectiva fracción.

5.5.3 Determinación del coeficiente de partición (KD).

La determinación del coeficiente de partición (KD) se llevó a cabo siguiendo una metodología ya descrita con algunas modificaciones (Zou et al. 2018) . Se disuelven 5 mg de alcaloide en 3 mL de la fase superior (upper) sin TEA y de la fase inferior (lower), sin ácido fórmico equilibrados previamente. La mezcla se agitó en un embudo de decantación, una vez separadas se llevaron a sequedad. Para determinar la K_{acid} y K_{basic} se realizó el mismo procedimiento y además se agregó ácido fórmico (6 mM) y TEA (15 mM), respectivamente.

Los residuos se reconstituyeron en 1 mL de fase móvil y se analizaron por HPLC siguiendo el método anteriormente descrito en el numeral 5.4.2 e inyectando 5 μ L.

El valor de K_D fue calculado como el área del pico del compuesto en fase inferior (lower) dividido entre el área del pico en la fase superior (upper).

5.5.4 Determinación de pureza

La pureza fue determinada por HPLC, disolviendo 3 mg de alcaloide en 3 mL de fase móvil e inyectando 10 μ L de muestra, el porcentaje de pureza se calculó con la ecuación: $\%P = (\text{Area peak} / \sum \text{Area peaks}) \times 100$.

5.6 Actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa.

La actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa fue determinada espectrofotométricamente usando un método espectrofotométrico en microplaca, descrito anteriormente con algunas modificaciones (Ellman et al. 1961). Para llevar a cabo el método se prepararon las siguientes soluciones (Tabla 6):

Tabla 6. Preparación de soluciones para llevar a cabo la actividad inhibitoria sobre acetilcolinestrerasa.

Solución de Acetilcolinesterasa	4 μ L de solución de acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i> (250 U/mL, Sigma-Aldrich) se disuelven en 5 mL de solución de albumina de suero bovino a 0,1%.
Solución tampón Base-Tris 50 mM pH 8,0	3,0 g de base tris en 500 mL de agua destilada.
Preparación sustrato	4,0 mg de DNTB y 3,4 mg de ATCI se disolvieron en 5 mL tampón A.
Solución de tampón A	0,146 g NaCl, 0,102 g MgCl ₂ diluidos en 50 mL de tampón base tris
Solución de tampón B Albumina 0,1%	20, 0 mg de albumina de suero bovino en 20 mL de tampón base-tris 50 mM pH 8,0.
Solución de extracto vegetal	Los extractos etanólicos fueron diluidos en una solución de tampón A - metanol (10:1). La concentración de cada extracto fue ajustada a 1mg/mL.

El método propuesto por Ellman para la medición de actividad de acetilcolinesterasa (AChE), se realizó con algunas modificaciones, donde el iodato de acetiltiocolina (ATCI) fue el sustrato. En una microplaca de 96 pozos (Figura 18) se adicionaron los siguientes reactivos en este orden: 25 μ L de ATCI en agua destilada, 15 mmol/L, 125 μ L de DTNB en tampón A, 3 mmol/L (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, conteniendo 0.1

mol/L NaCl y 0.02 mol/L MgCl₂. 6H₂O), 50 µL de tampón B (50 mmol/L, pH 8, conteniendo 0.1 % albumina de suero bovino) y 25 µL de extracto vegetal en solución tampón Tris 50mM, pH 8, conteniendo 10% de metanol (15,625µg/mL, 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL). La absorbancia fue determinada espectrofotométricamente (Lector de microplacas Epoch™ spectrophotometer microplate (BioTek)) en seguida, fueron adicionados 25 µL de solución de acetilcolinesterasa y la absorbancia nuevamente determinada. Un posible aumento en absorbancia, es debido a la hidrolisis espontanea del sustrato, por lo tanto la absorbancia fue corregida por la sustracción de absorbancia antes de la adición de la enzima por la absorbancia después de la adición de la enzima.

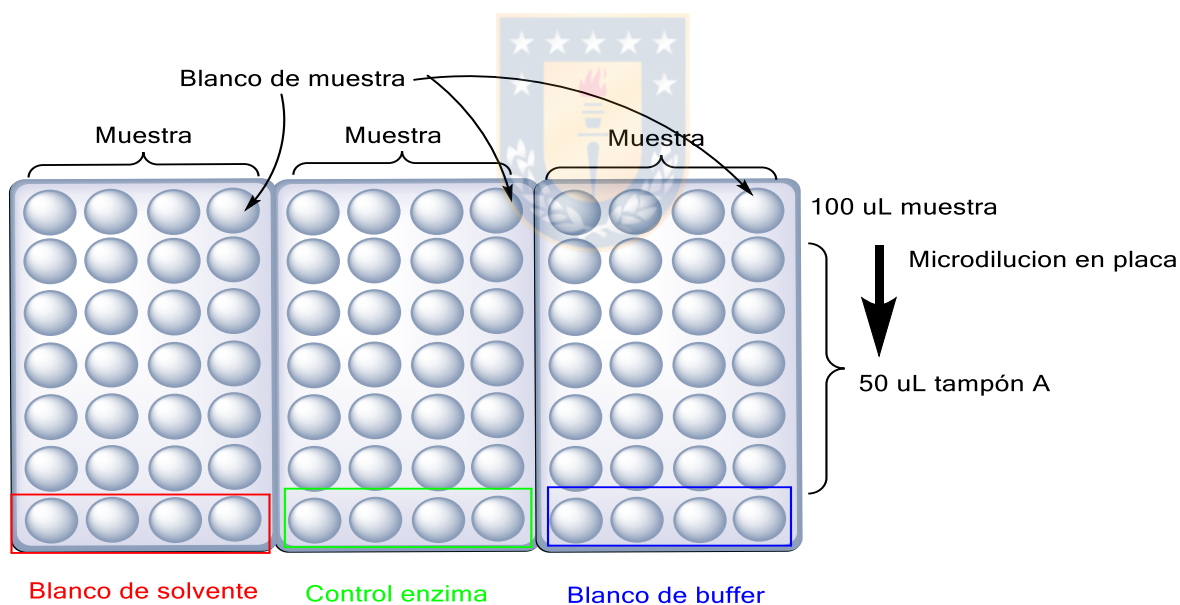


Figura 18. Ensayo de inhibición enzimática por el método de Ellman. Elaboración autora.

5.7 Determinación de citotoxicidad *in vitro* sobre células epiteliales de adenocarcinoma gástrico (AGS).

Células AGS ATCC® CRL-1739 (adenocarcinoma gástrico) fueron cultivadas en frascos de cultivo celular T75 en medio DMEM (Gibco) con 10% v/v de suero fetal bovino (Gibco) y estreptomina 100 µg/mL, penicilina 100 U/mL y anfotericina B 100 µg/mL, a 37 °C, atmósfera al 5% de CO₂. Para el mantenimiento de las células, cada tres días se realizó reemplazo del medio previo lavado con PBS 1X pH 7,3± 0,1. La liberación de las células se realizó en placas confluentes (80-90%), lavando con PBS 1X por duplicado, se agregó 2,5 mL de tripsina 0,05 µg/mL, EDTA 0,02 µg/mL en PBS 1X y se incubaron por 5 minutos a 37 °C y atmósfera al 5% de CO₂. Se procedió a inactivar la tripsina con medio DMEM. Las células se transfirieron a tubos Falcon estériles de 15 mL para centrifugarlas por 5 minutos a 1500 rpm. El pellet fue reconstituido en 3 mL de medio completo. Las células se contaron con ayuda de una cámara de Neubauer (50 µL células homogenizadas: 50 µL azul de tripano) y además se evaluó la viabilidad celular.

Para el ensayo de viabilidad se transfirieron 40.000 células AGS por pocillo en una microplaca de 96 pocillos (100 µL de medio/pocillo). Después de 24 horas de cultivo con las células adheridas y los pocillos confluentes se agregaron los crudos alcaloideos a diferentes concentraciones preparadas en DMSO al 1%, PBS 1x y medio DMEM completo. Se incubaron durante 6 horas y se agregó resazurina 0,01%. Después de incubar por 1 hora, la absorbancia fue determinada a 570 y 600 nm. El efecto de citotoxicidad sobre el crecimiento de las células cancerosas se

expresó como el porcentaje de inhibición crecimiento celular respecto del control (Parvathaneni et al. 2014; Torres et al. 2018).



6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

El cultivo *in vitro* de las diferentes especies de Amaryllidaceae se llevó a cabo mediante el uso de la técnica twin-scaling, la cual permite la obtención de pequeñas parejas de escamas (explante) unidas a placa basal del bulbo, y que, principalmente deben ser desinfectadas para proceder a sembrarlas en su respectivo medio de crecimiento. Este paso en el procedimiento general del cultivo es de gran importancia, debido a que la totipotencia de las células vegetales disminuye cuando el explante está en contacto con hipoclorito o etanol por tiempos prolongados.

De manera general se evaluaron diferentes tratamientos hormonales. La fase de inducción para todas las especies se estableció de forma arbitraria por 4 semanas, en las que si no se observaba ningún cambio a nivel de escama o placa basal ya sea en cuanto a su color, desarrollo de yemas o apertura de escamas, el tratamiento se descartaba.

Al obtener brotes o callos en fase de inducción se realizó un cambio hormonal para evaluar la fase de crecimiento y/o multiplicación. En esta etapa también se estableció un tiempo arbitrario de respuesta. Uno de los parámetros usados para descartar o no un tratamiento fue la necrosis del brote, en la cual, el órgano entero presenta coloración marrón intensa lo que puede llevar a la pérdida total del brote.

En cuanto a la desinfección de las escamas aunque el protocolo de esterilización se estandarizó para estas especies de Amaryllidaceae Chilenas, cada experimento presentó un porcentaje de explantes contaminados, esto se debe a que la planta en su hábitat natural presenta alta interacción con hongos y bacterias en los tejidos internos del bulbo y de forma general en toda la planta, lo que hace que la desinfección sea un proceso limitante en esta técnica, por lo que en este trabajo se determinó la facilidad con que las especies estudiadas presentaban contaminación.

Se observó que cada planta responde de forma diferente al protocolo de asepsia, algunos explantes fueron más sensibles al contacto con hipoclorito o etanol, así como algunas especies son más propensas a la contaminación con hongos y/o bacterias (Paredes et al. 2014), y esto obedece a la interacción que la planta tiene con el medio.



En la Figura 19 se presentan los porcentajes de contaminación que se observaron durante 12 meses de estudio para cada planta. Como se observa *Rhodolirium especiosum* presentó un mayor índice de contaminación, siendo significativo comparado con las demás especies estudiadas y sobrepasando el 60% de contaminación. Cabe recalcar que los porcentajes fueron calculados teniendo en cuenta todos los tipos de patógenos, fueran provenientes del explante o por contaminación cruzada con el medio.

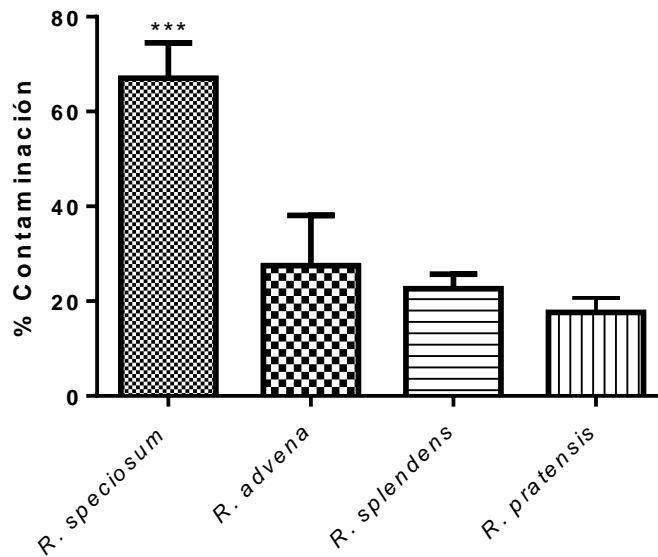


Figura 19. Porcentaje de contaminación de cada una de las especies evaluadas. Valores expresados como promedio \pm SEM (n=5) $p < 0.05$.

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores de mayor relevancia en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es la asepsia de escamas, brotes, callos y plantas, lo que indica que si una planta es menos susceptible a contaminación, la evaluación en diferentes tratamientos hormonales se hace mucho más fácil y puede tener mayor continuidad, esto ocurrió con *R. pratensis* (Figura 20), la cual presentó un bajo índice de contaminación y así mismo fue posible evaluar un mayor número de combinaciones.

La especie *Rhodophiala pratensis* respondió al tratamiento de 2,20 μ M BAP y 5,40 μ M NAA, en el cual se observaron brotes a la primera semana de siembra (Figura 20, A), en la semana 4 (Figura 20, B) se pudo observar un brote diferenciado con

bulbo, tallo y hojas, en la semana 16 se completó la diferenciación de la planta (Figura 20, C), y además se observó la multiplicación de pequeños bulbillos, entre 10 y 14 por cada planta.

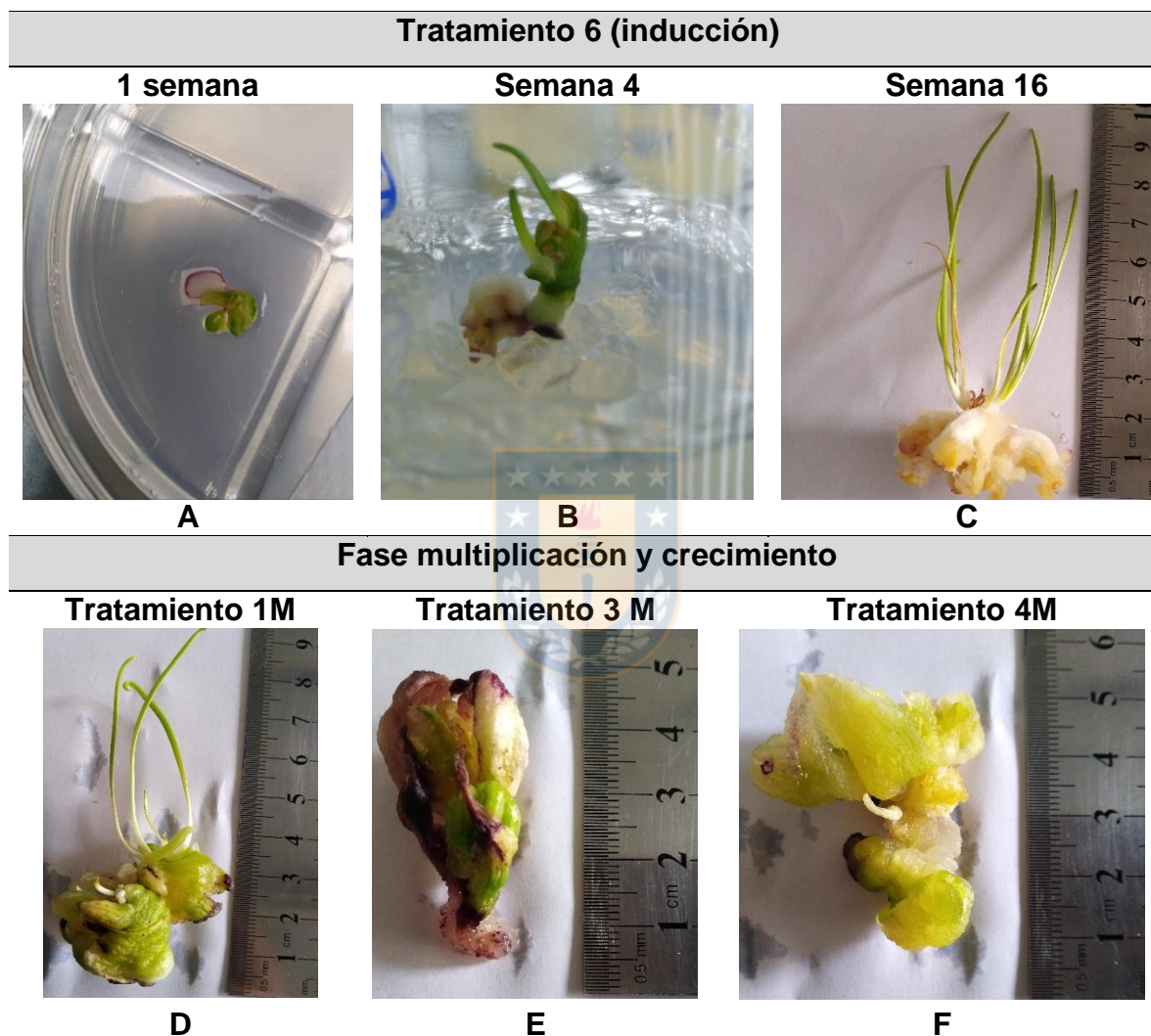


Figura 20. A, B C) Brotes obtenidos con el tratamiento de inducción 2,20 μM BAP y 5,40 μM NAA. D, E, F) Crecimiento del brote en diferentes combinaciones en fase de multiplicación y crecimiento de *R. pratensis*

Los brotes obtenidos en la fase de inducción se sembraron en diferentes medios, en los que de igual forma se observaron cambios físicos y químicos. En todos los tratamientos de fase de multiplicación y crecimiento, los brotes no formaron bulbillos, solo se observó rápido crecimiento de las estructuras no ordenadas (callos).

Para la especie *Rhodophiala advena* respondió favorablemente a la combinación hormonal 4,44 μM BAP y 2,70 μM NAA, el desarrollo del primer brote se observó a las 3 semanas de siembra (Figura 21, A), esta especie respecto de *R. pratensis* tuvo un desarrollo y crecimiento más lento. En la semana 12 el brote había crecido en tamaño pero no estaba diferenciado (Figura 21, B).

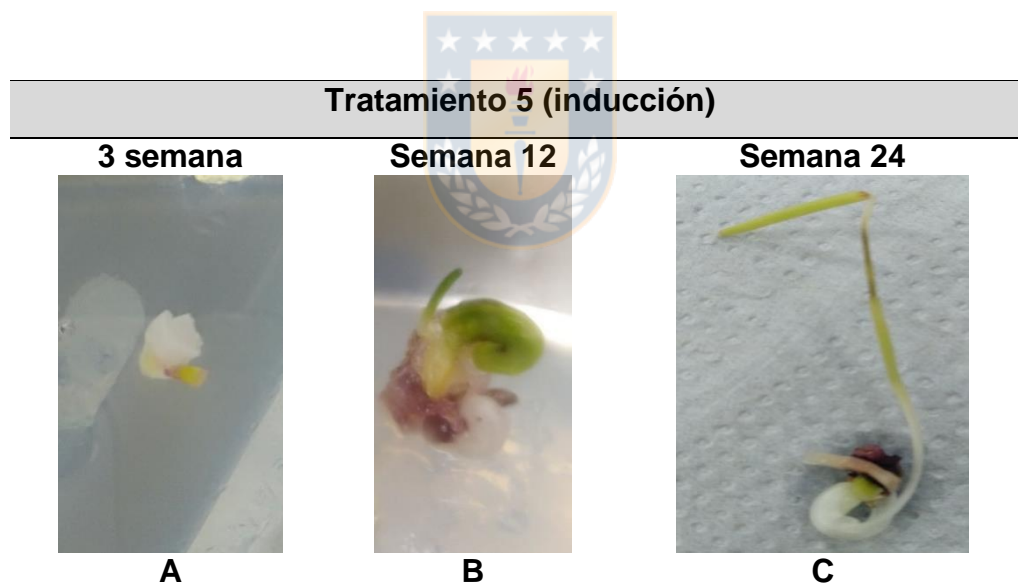


Figura 21. Efecto de las hormonas en las concentraciones 4,44 μM BAP y 2,70 μM NAA en la inducción de brote y formación de planta en la especie *R. advena*

Debido al escaso material vegetal que se tenía de esta especie, los brotes obtenidos se mantuvieron en medio de inducción. En la semana 24 se logró observar un brote diferenciado el cual presentaba desarrollo de hojas, tallo y bulbo.

La especie *Rhodophiala splendens* mostró respuesta de formación de brote en dos combinaciones hormonales, sin embargo en el medio 4,44 μM BAP y 2,70 μM NAA, se observó mayor crecimiento, por esto se escogió como medio de inducción.

Como se observa en la Figura 22, A y B, en 3 semanas el brote primario se encontraba de gran tamaño, con desarrollo de 4 hojas y un pequeño bulbo en la base del brote.

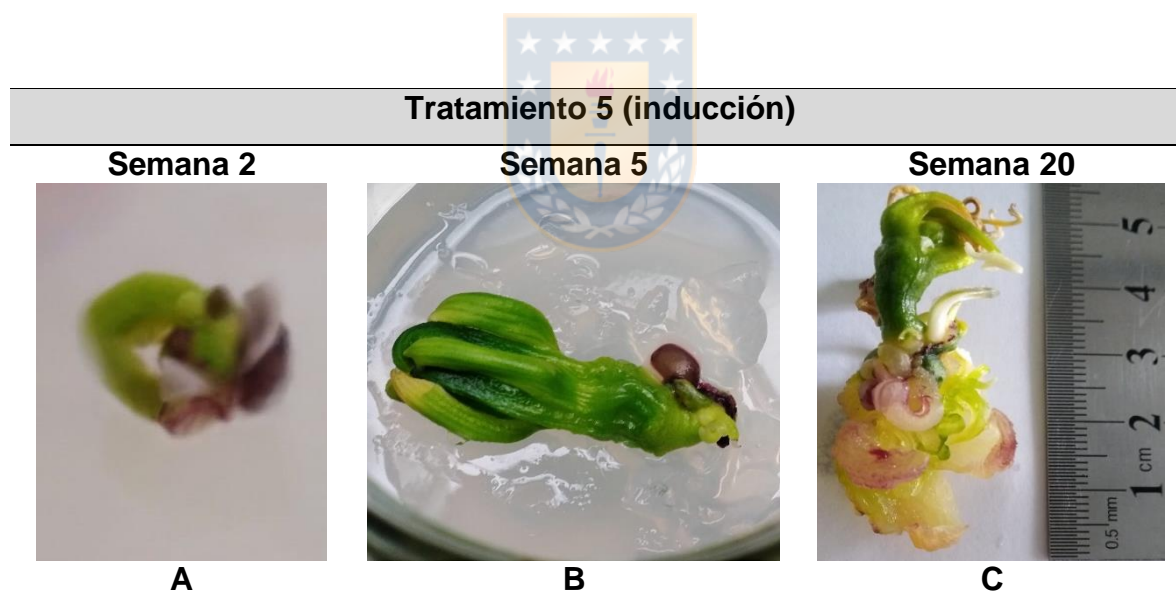


Figura 22. Formación de brote y callo en tratamiento de inducción con 2,20 μM BAP y 5,40 μM NAA en la especie *R. splendens*. A) Brote. B) Brote con hojas. C) Formación de callo indiferenciado.

De esta especie se tenía limitado material vegetal por lo que los brotes obtenidos se mantuvieron en medio de inducción. A diferencia de *R. advena*, la cual después de 24 semanas de tratamiento logró diferenciar los órganos de la planta, *R. splendens* pasó de una etapa de mayor diferenciación a una de mayor crecimiento con tejidos indiferenciados o callos. Las hojas que se habían desarrollado en la semana 5 de cultivo, después de 20 semanas se secaron, se observó crecimiento rápido y de tejidos desordenados del bulbo (formación de callo).

En el caso de *Rhodolirium speciosum*, la combinación que indujo la formación de brote fue 10 μM BAP y 12,5 μM IAA (Figura 23, A) la cual se observó en la semana 3, este medio se mantuvo por 15 semanas más, y posteriormente se transfirió a diferentes medios de multiplicación.

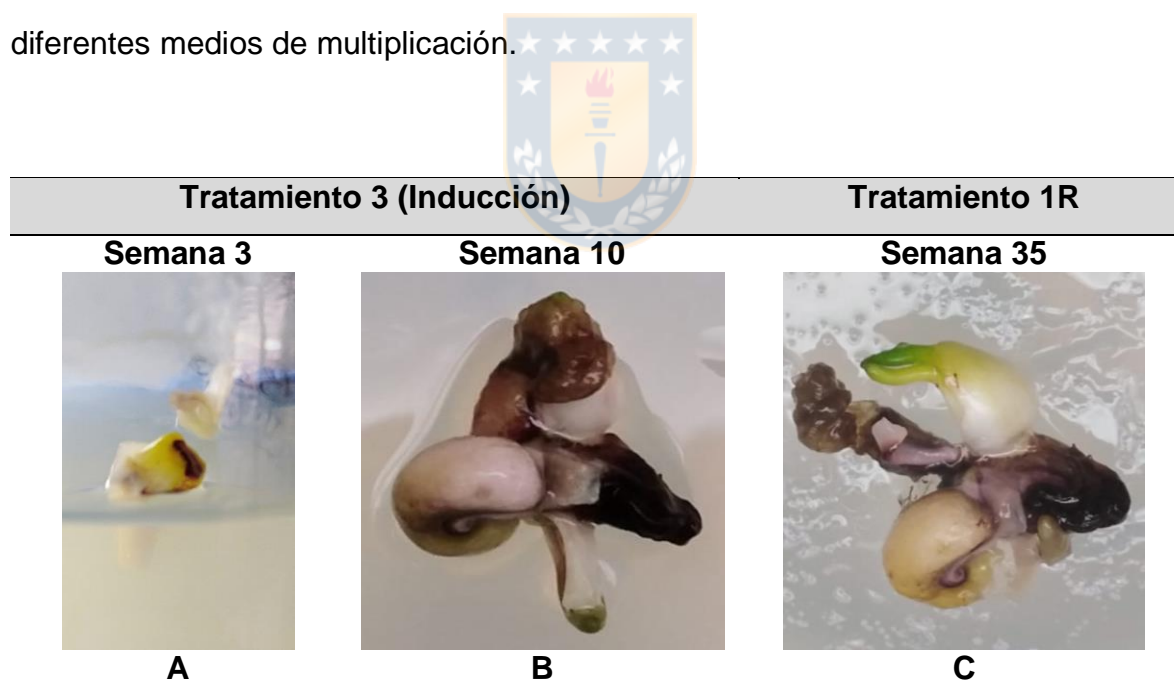


Figura 23. A y B) Efecto del tratamiento de inducción con 10 μM BAP y 12,5 μM IAA sobre escamas de *Rhodolirium speciosum* C) Diferenciación de brote en 5 μM BAP, 10 μM IAA y 16 μM 2,4-D.

El medio que se eligió para continuar la fase de crecimiento fue 5 μM BAP, 10 μM IAA y 16 μM 2,4-D, en el cual se logró completa diferenciación de la planta, en la Figura 23, C se pueden observar formación de raíces, 2 bulbos y tallos bien formados. Sin embargo, esta especie presentó un desarrollo y crecimiento muy lento, por lo que esto sugiere que a futuro se deben probar más tratamientos en fase de inducción y de multiplicación.

Todos los brotes de las especies de Amaryllidaceae obtenidos en cultivo *in vitro* se liofilizaron y se sometieron a extracción con metanol por maceración y ultrasonido, el filtrado se concentró a presión reducida y posteriormente se realizó una extracción ácido-base para luego analizarlos por CG-EM.

Uno de objetivos de este trabajo era poder determinar la producción de alcaloides de isoquinolina en el cultivo *in vitro*, en la Figura 24 se presenta el porcentaje de alcaloides producidos por las diferentes especies estudiadas. Para *Rhodophiala pratesis* la combinación de inducción de brote con 6-bencilaminopurina 2,20 μM y ácido 1-naftalenacético 5,40 μM se observó un rendimiento de extracción de alcaloides superior a la de los demás tratamientos, los tratamientos 1M y 3M, presentaron los rendimientos más bajos de alcaloides. Con estos resultados se puede observar claramente la susceptibilidad de la planta a pequeñas variaciones de concentración en las hormonas vegetales y se confirma la hipótesis que es factible influir de forma directa en el metabolismo de la planta y en este caso más preciso en la biosíntesis de los alcaloides.

La especie que presentó mayor contenido de alcaloides fue *Rhodophiala advena* en su fase de inducción y la especie que presentó menor producción fue *Rhodolirium speciosum*.

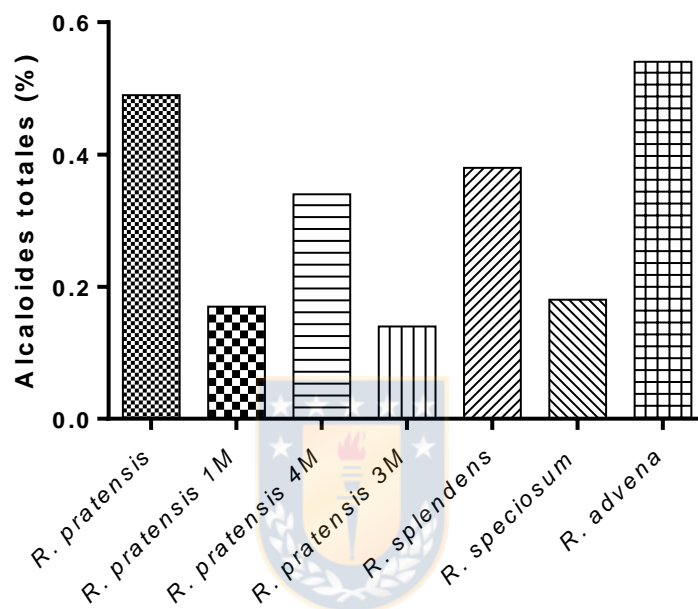


Figura 24. Producción de alcaloides de diferente especies de Amaryllidaceae en cultivo *in vitro* bajo diferentes condiciones hormonales. *R. pratensis* (2,20 μM BAP y 5,40 μM NAA), *R. splendens* (2,20 μM BAP y 5,40 μM NAA), *R. speciosum* (5 μM BAP, 10 μM IAA y 16 μM 2,4-D) y *R. advena* (4,44 μM BAP y 2,70 μM NAA).

6.2 Identificación de alcaloides por CG-EM

Con el fin de identificar los alcaloides producidos por diferentes especies de Amaryllidaceae en su estado natural y compararlos con los producidos en cultivo *in vitro*, el crudo alcaloideo tanto de bulbos silvestres como de brotes se analizó por CG-IE-EM, para este análisis se usó codeína como estándar interno.

Treinta y dos alcaloides fueron identificados en las cuatro especies de Amaryllidaceae Chilenas estudiadas, diecisiete alcaloides no lograron ser identificados, sin embargo ochos de ellos fueron clasificados dentro de grupos generales como alcaloides tipo galantamina, homolicorina, nerinina y montanina (Tabla 8, ANEXOS).

Todos los alcaloides fueron identificados en función del tiempo de retención y la relación entre la intensidad de la fragmentación de cada uno de los compuestos, para este propósito se tomaron en cuenta 3 iones representativos para cada alcaloide, un ión cuantitativo y dos iones cualitativos.

Además se estudió el patrón de fragmentación de cada alcaloide comparando con lo reportado por diferentes autores, por ejemplo para galantamina (Figura 25) el espectro de masas característico muestra el ion molecular $[M^+-1]$ (Figura 25) con intensidad relativa importante, la ruta de fragmentación de este alcaloide se inicia con la pérdida de un grupo C_4H_6O del anillo C y la eliminación del átomo de nitrógeno de anillo B, con iones característicos en m/z 217 y m/z 174 (Berkov et al. 2012).

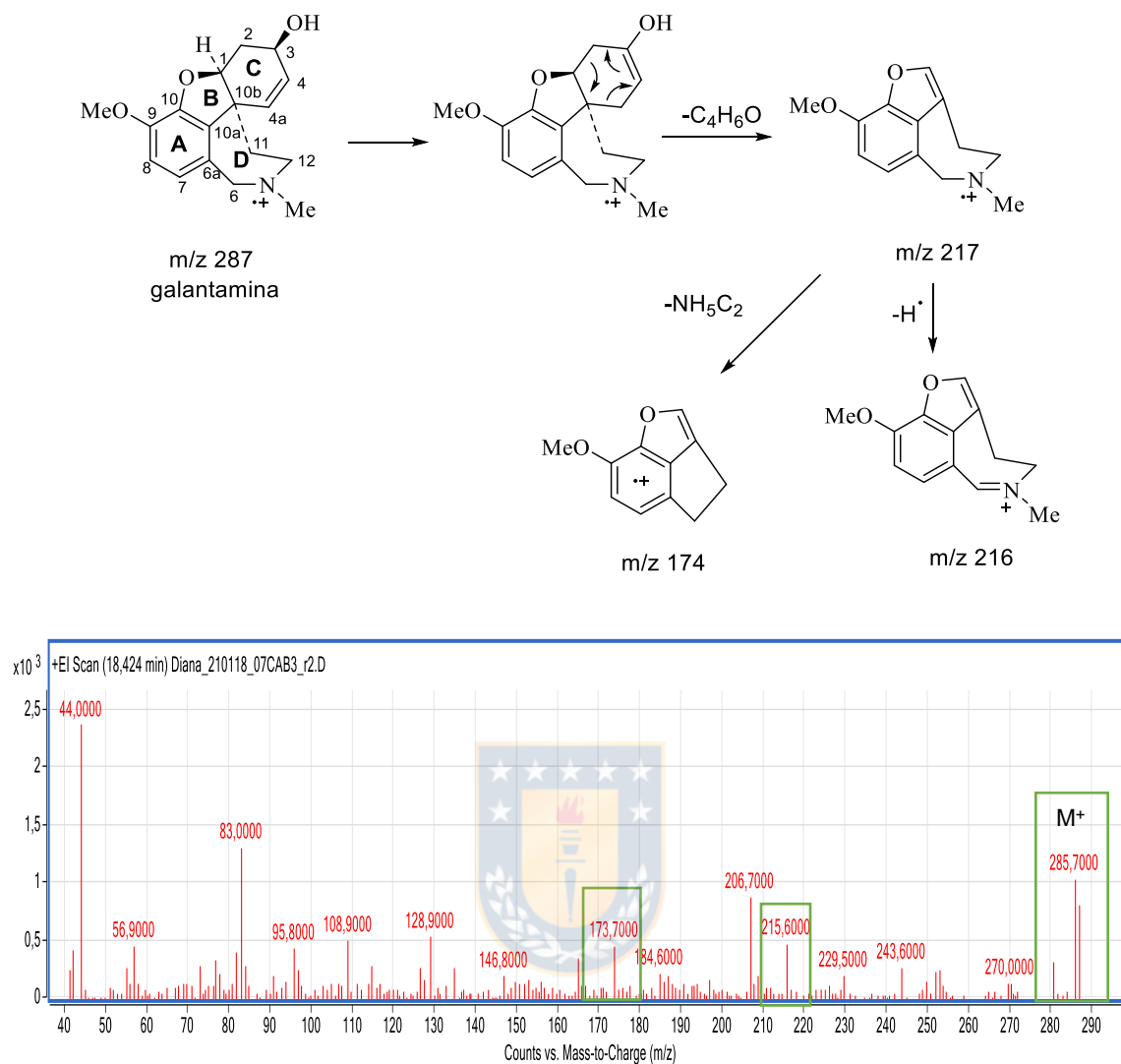


Figura 25. Patrón de fragmentación y espectro de masas típico para la galantamina. Tomado de (Guo 2015).

Alcaloides tipo licorina presentan otras características determinantes para su identificación, por ejemplo este grupo de estructuras, presentan un ion $[M^+ - 18]$, debido a una pérdida de agua, la cual viene dada por la estereoquímica de grupo hidroxilo en C-2, en el caso concreto de licorina, se observa un fragmento m/z 269

(Figura 26), y a diferencia de galantamina el $[M^+-1]$ presenta una intensidad menor que el fragmento m/z 226 y m/z 227 el cual es el pico base, esto supone una pérdida importante de un grupo $C_2H_4O_2$ (Figura 26), y al ser el ion más abundante indica que es el fragmento más común y estable para este tipo de moléculas (Bastida et al. 2011) lo que puede atribuirse a estructuras resonantes.

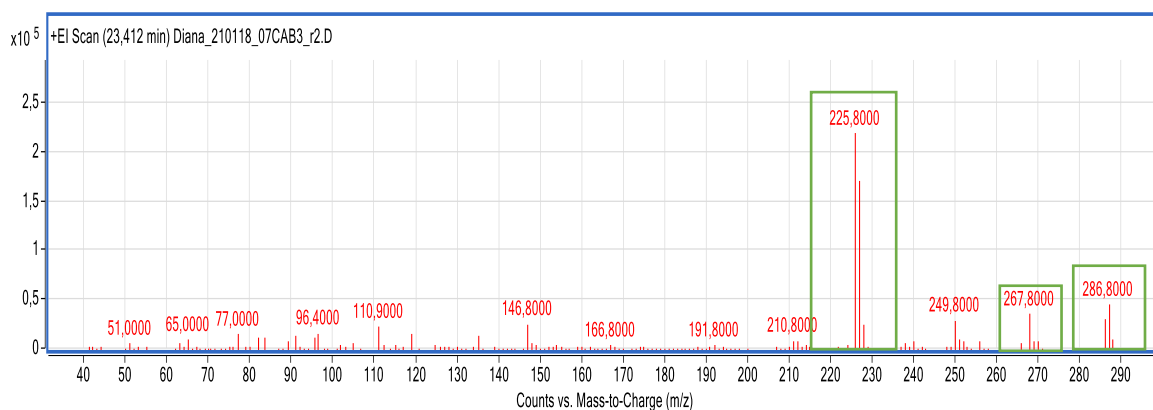
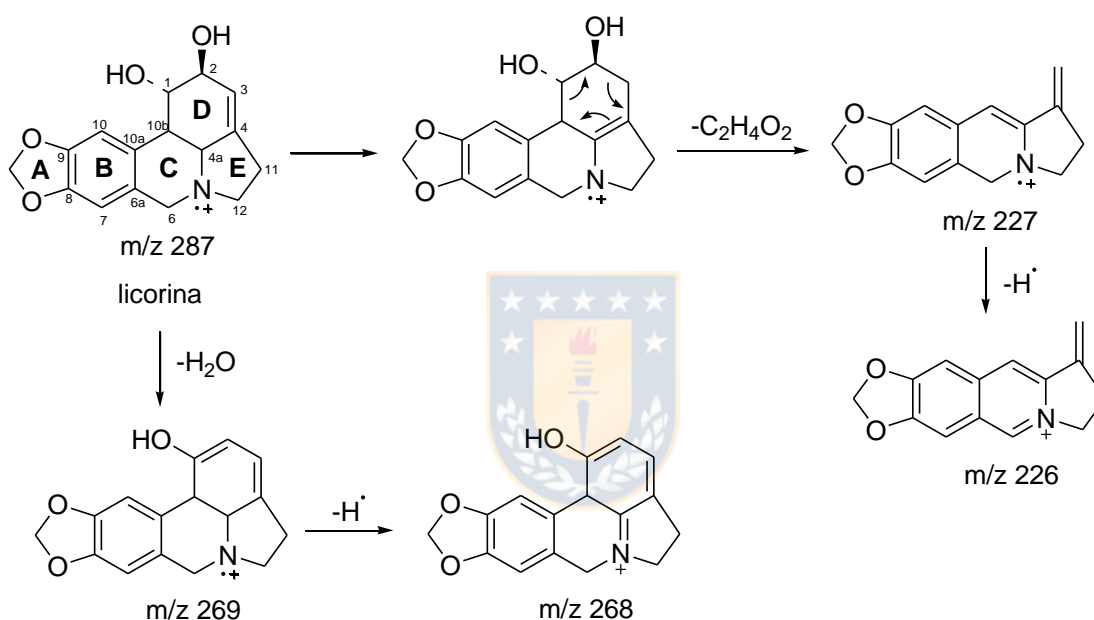


Figura 26. Ruta de fragmentación de la licorina. Tomado de (Guo 2015).

Los demás alcaloides se estudiaron de la misma forma para llegar a identificarlos. Alcaloides con espectros de masas donde no se logró observar un fragmento representativo y una ruta coherente de fragmentación, se consignaron como “*unknown*” (Tabla 8). Esta situación se presenta principalmente debido a que además del gran y variado número de sustituciones de grupos R que puede sufrir un mismo esqueleto base, la estereoquímica de este juega un papel importante en la estabilidad de la molécula y la ruta de fragmentación.

La información de los alcaloides, índice de Kovats, relación masa/carga (intensidad relativa) y cantidad relativa, se encuentran consignados en la Tabla 8 (ANEXOS).

Tabla 7. Contenido de alcaloides presentes en bulbos silvestres y cultivo *in vitro* según el tipo de alcaloide para las especies *Rhodolirium speciosum*, *Rhodophiala advena*, *Rhodophiala pratensis* y *Rhodophiala splendens*.

Tipo alcaloide	<i>R. speciosum</i> % Relative		<i>R. advena</i> % Relative		<i>R. splendens</i> % Relative		<i>R. pratensis</i> % Relative			
	Wild bulbs	Culture <i>in vitro</i> ^a	Wild bulbs	Culture <i>in vitro</i> ^b	Wild bulbs	Culture <i>in vitro</i> ^c	Wild bulbs	Culture <i>in vitro</i> ^d	Culture <i>in vitro</i> ^e	Culture <i>in vitro</i> ^f
Licorina	89,29	1,38	5,37	19,19	4,75	1,89	17,18	-	42,89	26,23
Haemantamina	3,01	-	29,54	0,51	1,86	23,00	25,38	-	-	-
Galantamina	1,54	-	1,63	-	-	-	0,31	-	-	13,80
Homolicorina	-	-	13,39	-	-	-	42,10	-	-	-
Tazetina	-	-	3,99	10,50	6,59	3,84	6,30	-	-	-
Narciclasina	-	-	-	-	-	-	1,00	1,80	-	29,25
Montanina	-	-	19,33	17,88	-	-	1,32	33,65	35,04	-
Miselaños	-	-	-	-	-	-	1,77	1,36	1,39	14,71
No identified	6,16	95,60	3,53	61,57	87,44	71,26	4,84	62,88	21,41	16,01

% Relative: cantidad relativa del compuesto
 (-) Alcaloide no presente en la muestra
 a: Cultivo *in vitro* BAP 5 µM, 10 µM AIA y 16 µM 2,4-D
 b: Cultivo *in vitro* BAP 4,44 µM y NAA 2,70 µM
 c: Cultivo *in vitro* BAP 2,20 µM y NAA 5,40 µM
 d: Cultivo tratamiento 6
 e: Cultivo tratamiento 4M
 f: Cultivo tratamiento 3M

6.2.1 Alcaloides identificados en *Rhodolirium speciosum*.

En este estudio se determinó la presencia de 25 alcaloides en el crudo obtenido a partir de bulbos silvestre por CG-EM (Figura 27), dentro de los cuales 17 son conocidos y 8 no se lograron identificar. Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente por (Trujillo-Chacón et al. 2019). De los alcaloides identificados el 89,3% (Tabla 7) corresponden a estructuras de tipo licorina, 3,0% a alcaloides tipo haemantamina y 1,5 a alcaloides tipo galantamina, es decir, en esta especie el acoplamiento fenol oxidativo que predomina es *orto-para*'. La Figura 28 muestra la biogénesis de los alcaloides identificados en bulbos silvestres de *R. speciosum*.

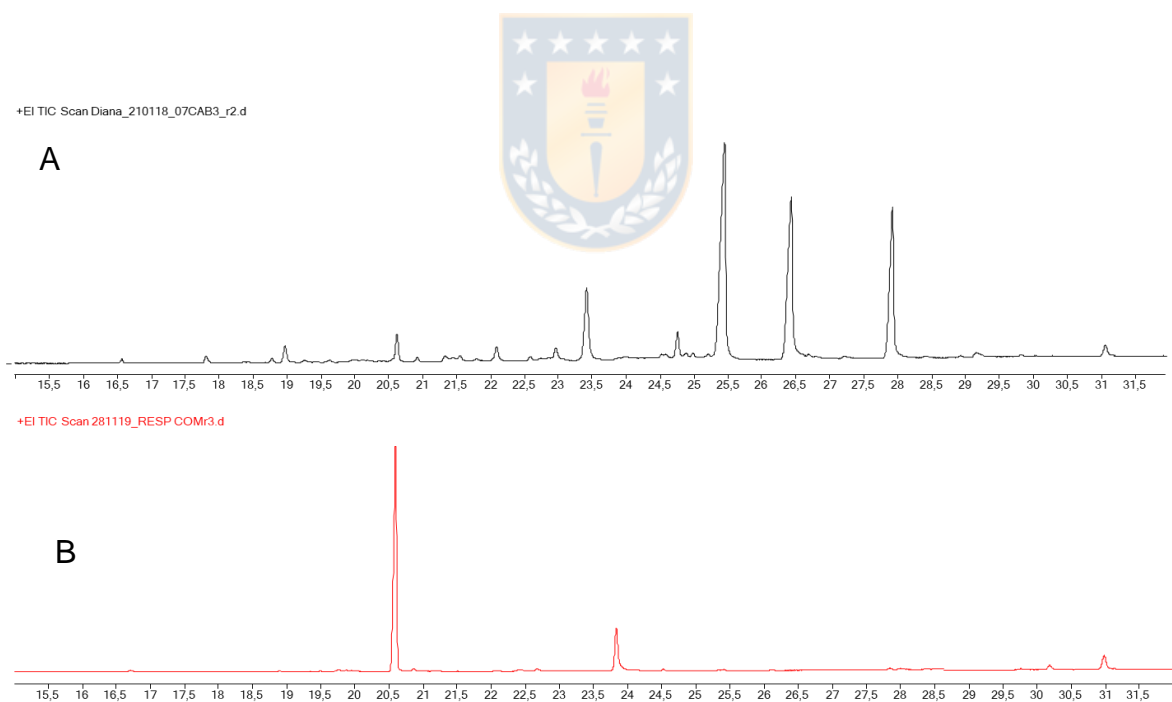


Figura 27. CG-EM del crudo de alcaloides obtenido de A) bulbos silvestres y B) brotes en cultivo *in vitro* con BAP 5 μ M, 10 μ M AIA y 16 μ M 2,4-D de *Rhodolirium speciosum*.

En cuanto al cultivo *in vitro* se identificaron 7 alcaloides de los cuales el 95,6% corresponden a alcaloides desconocidos y dentro de este grupo el 73,9% corresponde a la producción de un solo alcaloide. Por lo que a futuro es indispensable aislar este compuesto para poder elucidar su estructura y tener una mejor aproximación de la influencia de dicha combinación hormonal sobre la ruta de biosíntesis de este compuesto.

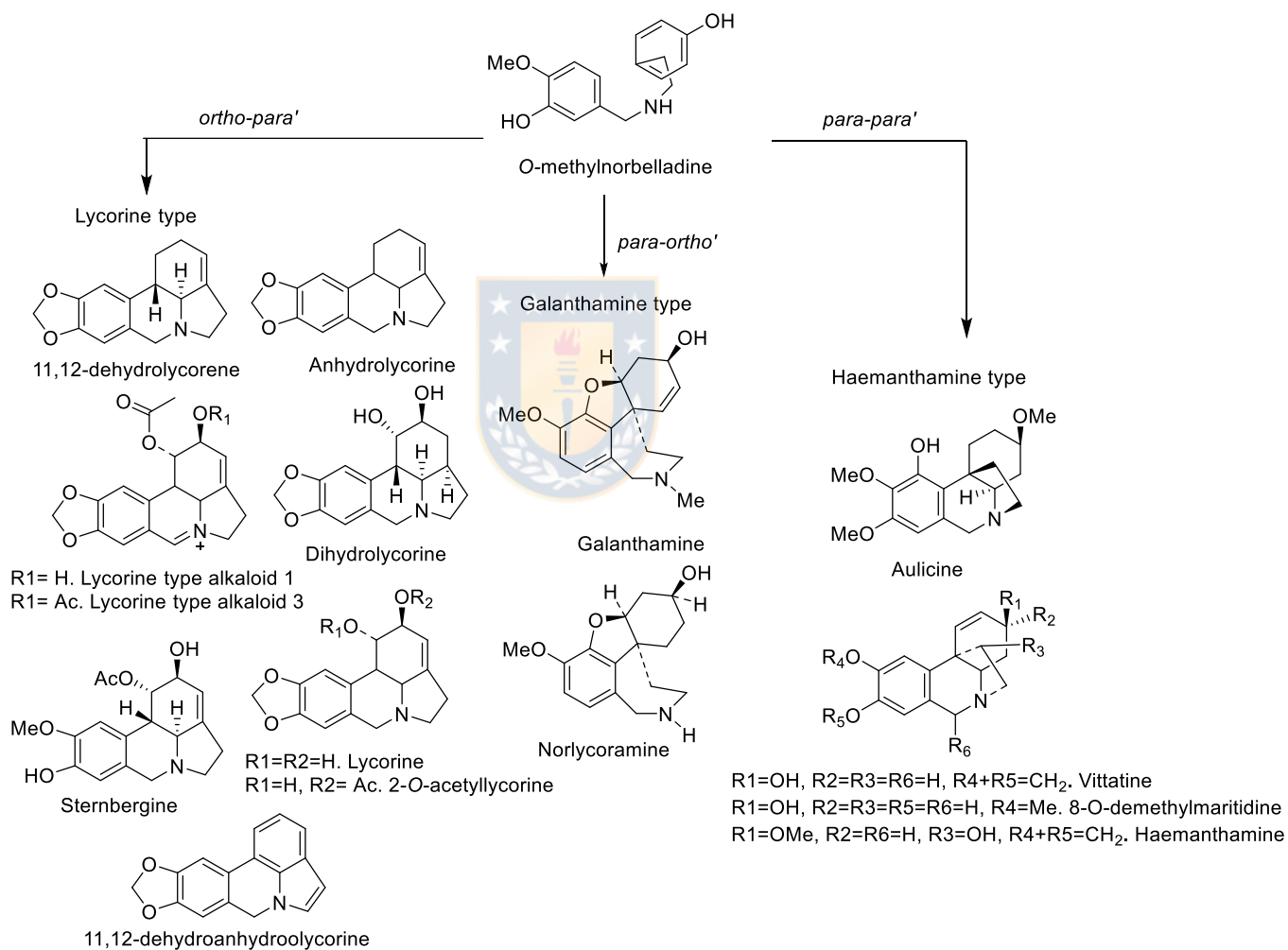


Figura 28. Biosíntesis de alcaloides en *R. speciosum*.

Además, solo el 1,38% de los alcaloides identificados pertenecen a esqueletos tipo licorina, mientras que en bulbos salvajes correspondía al 89,3%.

La ruta de acoplamiento fenol oxidativo *para-orto'* en la que se producen alcaloides tipo galantamina posiblemente se inhibió, ya que no se logró identificar alcaloides de este tipo.

6.2.2 Alcaloides identificados en *Rhodophiala advena*.

Para esta especie se determinó un total de 11 alcaloides conocidos y 3 alcaloides desconocidos. Esta planta mostró un mayor contenido de alcaloides tipo haemantamina (29,5%), sin embargo se identificaron alcaloides tipo montanina (19,3), tipo homolicorina (13,4%), tipo licorina (5,4%), tipo tazetina (3,9%) y galantamina (1,63%) con cantidades relativas importantes (Tabla 7). Esto indica que la planta sintetiza estos metabolitos a través de las tres rutas de acoplamiento fenol oxidativo predominando la vía *para-para'*.

La Figura 29 muestra las relaciones biosintéticas entre los alcaloides identificados en bulbos silvestres de *R. advena*, esta especie a diferencia de *R. speciosum* produce un menor número de alcaloides.

En el cultivo *in vitro* se encontró un aumento sustancial en el contenido de alcaloides tipo licorina (19,2%) y tazetina (10,5%) el cual cuadruplicó y triplicó respectivamente la cantidad relativa encontrada en bulbo silvestre. La producción de montanina permaneció constante.

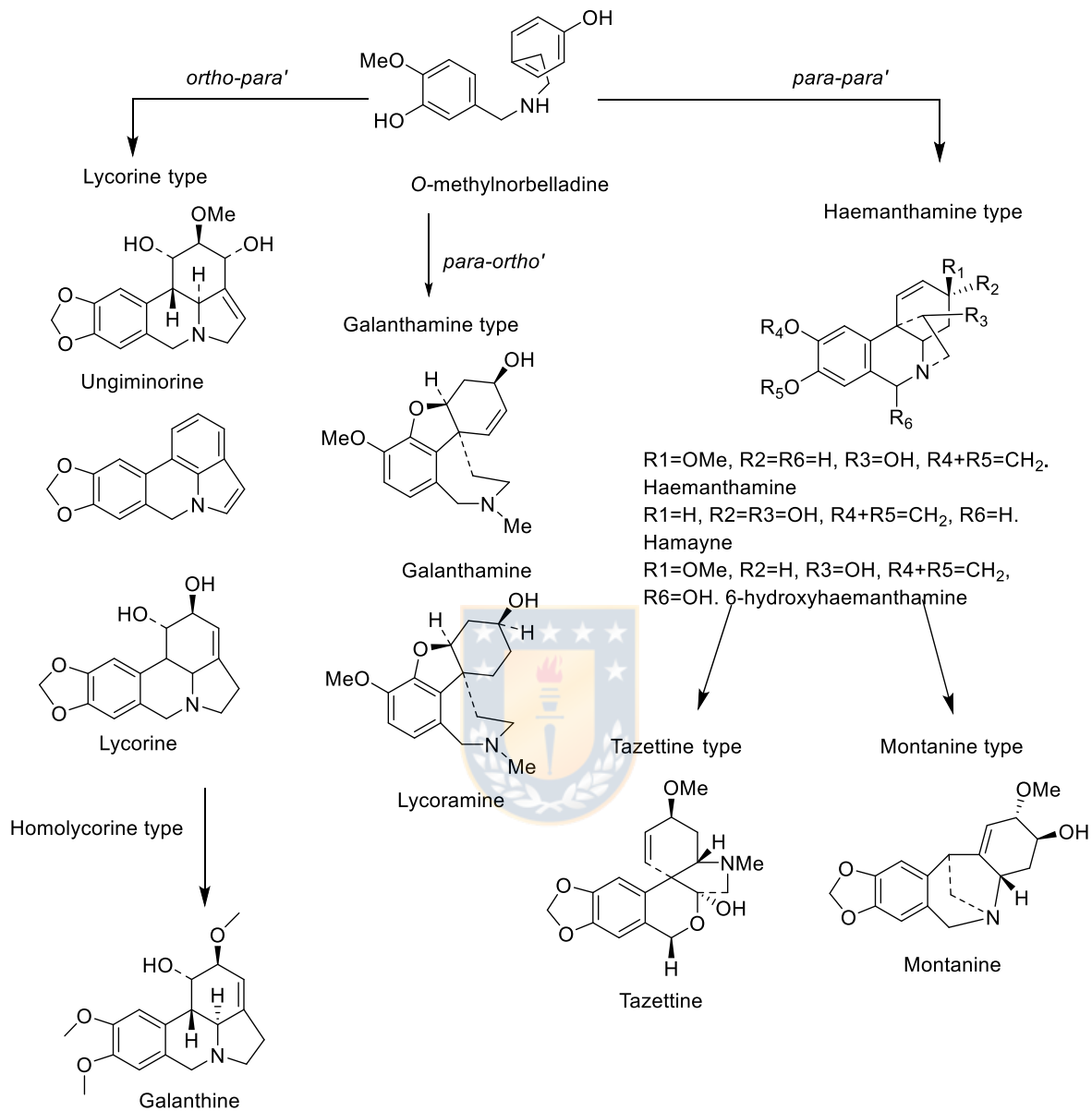


Figura 29. Ruta biosintética para la producción de alcaloides en *R. advena*.

Los alcaloides tipo homolycorina, galantamina y haemantamina no se identificaron en los callos obtenidos *in vitro*, por lo que, la combinación hormonal inhibe

selectivamente el acoplamiento fenol oxidativo *para-orto'* y modifica las rutas *orto-para'* y *para-para'*.

Además, se determinó un alto porcentaje de alcaloides desconocidos (61,6%). En los CG-EM (Figura 30) de bulbos silvestres e *in vitro*, se observa la gran diferencia de composición de extractos.

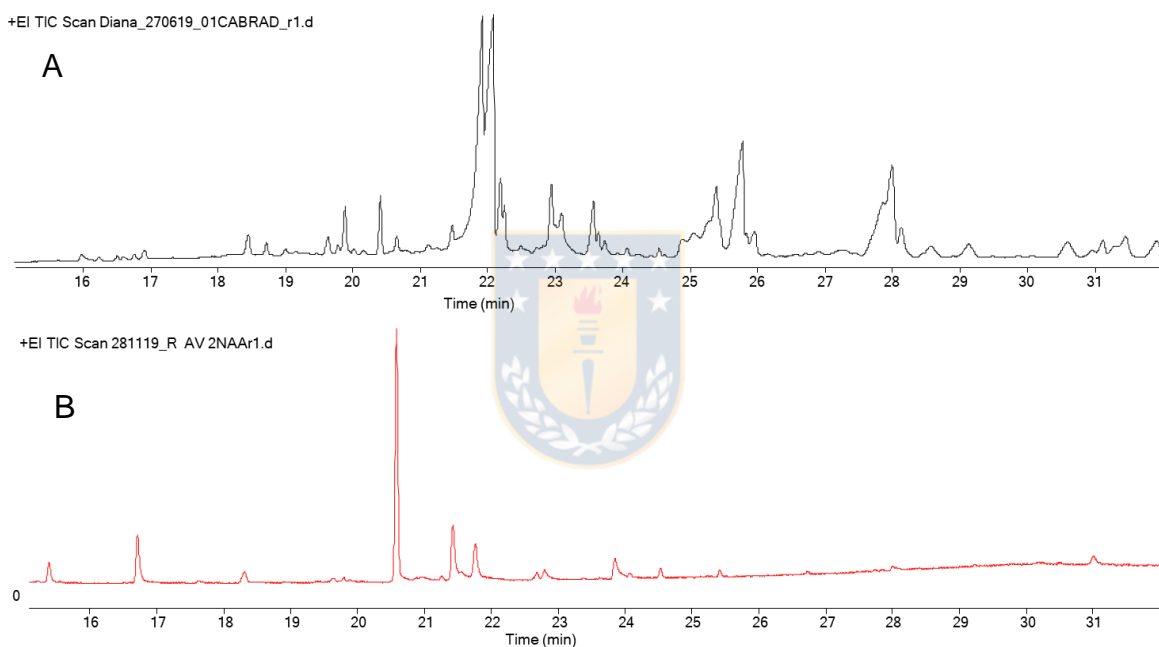


Figura 30. CG-EM del crudo de alcaloides obtenido de A) bulbos silvestres y B) brotes en cultivo *in vitro* con BAP 4,44 μ M y NAA 2,70 μ M *Rhodophiala advena*.

Además se observa un alcaloide con tiempo de retención de 20,5 minutos, el cual es desconocido y que también está presente en las especies *R speciosum* (Figura 27) y *R. splendens* (Figura 31).

6.2.3 Alcaloides identificados en *Rhodophiala splendens*.

En la especie *R. splendens* se identificaron los alcaloides: licorina, haemnatamina, 6-O-metilpretazetina y tazetina (tabla 8), otros 7 compuestos no se lograron identificar y corresponden al 87,4% del total del crudo de alcaloides. Esta planta en su estado natural produce alcaloides por acoplamiento fenol-oxidativo *p-p'* y *o-p'* (Figura 32) en cantidades menores al 10%

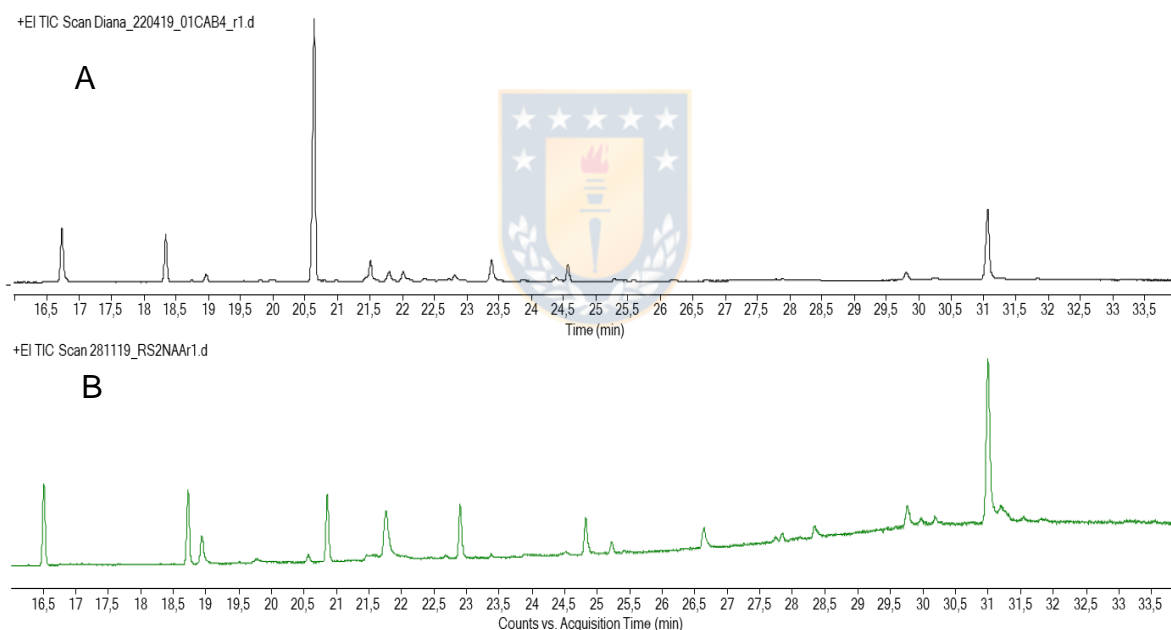


Figura 31. CG-EM del crudo de alcaloides obtenido de A) bulbos silvestres y B) brotes en cultivo *in vitro* con BAP 2,20 μM y NAA 5,40 μM de *R. splendens*.

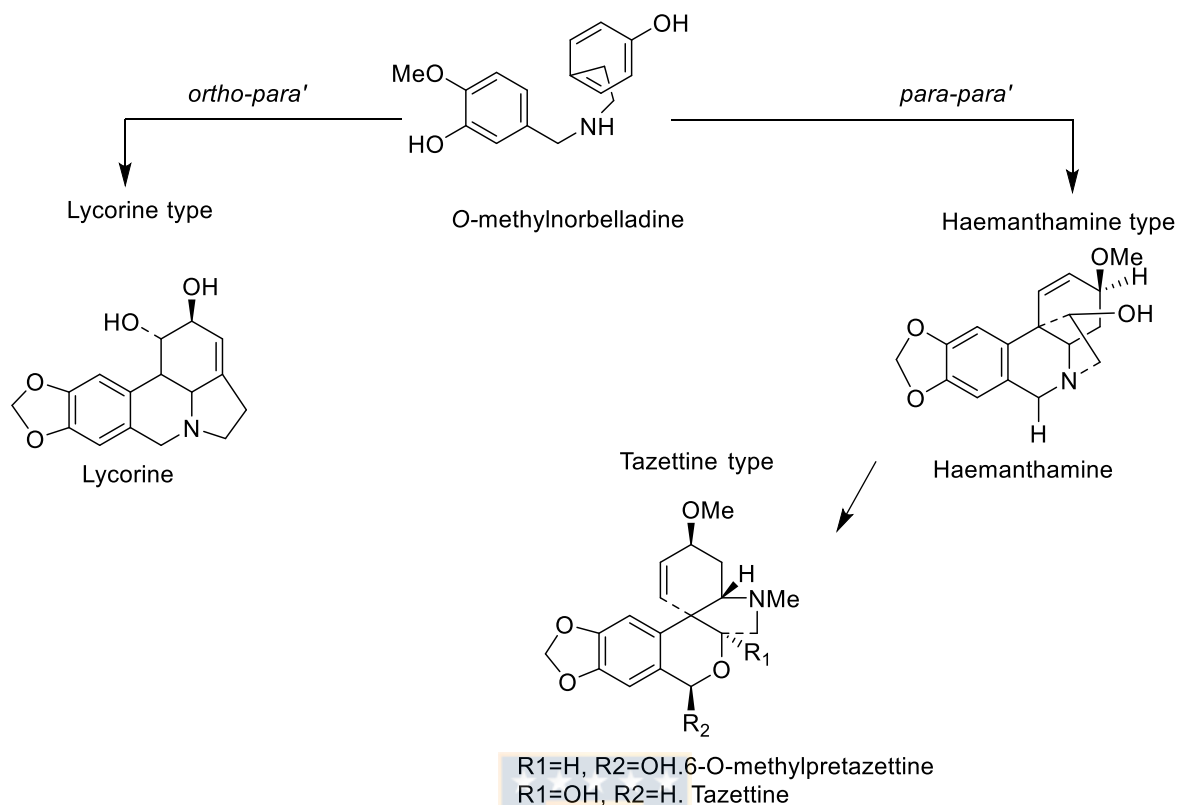


Figura 32. Alcaloides producidos por *R. splendens* producto del acoplamiento fenol oxidativo orto-para' y para-para'.

En cultivo *in vitro* la producción de haemantamina incrementa de 1,9% a 23,0% (Tabla 8) y disminuye a la mitad la cantidad de derivados de tazetina (Tabla 7). En general el acoplamiento fenol oxidativo no difiere al de la planta en estado silvestre, sin embargo la ruta *para-para'* es la de mayor importancia. Estos resultados no son concluyentes en cuanto a cómo influyen las hormonas en la biosíntesis de los alcaloides en *R. splendens* debido a que el 71,3% de los alcaloides producidos por callos en cultivo *in vitro* pertenece a estructuras no identificadas y no es posible

asignar un ruta de producción, pero si demuestran la variabilidad en tipo y cantidad de alcaloides en función de combinaciones hormonales (auxinas + citoquininas).

6.2.4 Alcaloides identificados en *Rhodophiala prantesis*.

En investigaciones anteriores se hizo un análisis detallado de la composición de alcaloides en bulbos, hojas, tallos y flores silvestres de *R. pratensis* (Trujillo-Chacón et al. 2019) en el que se describe detalladamente la relación entre los alcaloides identificados y las rutas biosintéticas a partir del intermediario *O*-metilnorbelladina, por lo que en este trabajo solo se discutirá lo que respecta a los resultados en cultivo *in vitro*.

Los cromatogramas CG-EM de los crudos alcaloideos tanto de bulbos silvestres como de callos obtenidos en cultivo *in vitro* bajo diferentes combinaciones hormonales de 6-bencilamonopurina y ácido 1-naftlencético, se presentan en los ANEXOS (Figura 36), donde es posible apreciar la marcada diferencia en tipo y contenido de alcaloides.

Esto sugiere que la biogénesis de estos metabolitos está fuertemente influenciada no solo por el tipo de auxina y citoquinina, sino que también por la concentración de estas. Estos resultados muestran el potencial de los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* para producir alcaloides de manera selectiva tan solo usando combinaciones hormonales adecuadas.

El tratamiento 6 en cultivo *in vitro* incrementó la producción de montanina de 1,3% a 33,65% (Tabla 8) pero además incremento la producción de alcaloides que aún no han podido ser identificados. Según lo reportado por (Trujillo-Chacón et al. 2019), la ruta biosintética de producción de alcaloides en *R. pratensis* incluye los tres acoplamientos fenol oxidativo (*orto-para'*, *para-para'*, *para-orto'*) con una mayor predominancia por alcaloides tipo licorina (*orto-para'*), sin embargo bajo estas condiciones hormonales se inhibe *orto-para'* y se estimula la producción de alcaloides vía *para-para'* (alcaloides tipo montanina y narciclasina)

El tratamiento 4M en cultivo *in vitro* duplicó la producción de alcaloides tipo licorina y los alcaloides tipo montanina se produjeron 25,5 veces más que en el bulbo silvestre. Para este tratamiento los alcaloides no identificados se presentaron en menor proporción que el tratamiento 6.

El tratamiento 3M en relación a los demás tratamientos fue menos selectivo. Aumentó la producción de alcaloides de licorina en 1,5 veces, los tipo galantamina en 44,5 veces, los tipo narciclasina 30 veces, misceláneos 8 veces y se encontró un bajo porcentaje de alcaloides no identificados (Tabla 7).

En este experimento se encontró a diferencia de las demás especies y combinaciones hormonales estudiadas, el incremento en la producción de alcaloides tipo galantamina.

Sobre propagación *in vitro* de especies de Amaryllidaceae se encuentra en literatura estudios en los cuales evalúan producción de bulbillos bajo diferentes concentraciones hormonales, por ejemplo, *Crinum variable* (Fennell, Crouch, y van

Staden 2001), *Traubia modesta* (Paredes et al. 2014), *Zephyrantes L. sp* (Smith, Burrows, y Kurten 1999), de forma general, estas investigaciones se han restringido a describir los factores que afectan la inducción de brotes, micropropagación, crecimiento de callos y protocolos de esterilización, sin embargo los estudios sobre la composición química de los callos obtenidos ha sido poco estudiada.

Hasta la fecha hay algunos reportes sobre la influencia del ácido 1-naftalenacético y 6-bencilaminopurina sobre la biosíntesis de licorina en *Hippeastrum goianum* (Pereira da Costa et al. 2019). Reis et al. (2019) estudiaron la producción de montanina en *Rhodophiala bífida* y caracterizaron las expresiones génicas que involucran la producción del alcaloide en diferentes órganos de la planta.

Este trabajo proporciona nueva evidencia sobre la regulación de vías de producción selectivas de alcaloides, mediado por auxinas y citoquininas en cultivo *in vitro*. Los resultados preliminares en todas las especies estudiadas mostraron la inhibición y/o inducción de rutas biosintéticas para la producción de los metabolitos diferentes a los de la planta silvestre.

6.3 Aislamiento de alcaloides.

En este trabajo se lograron aislar 3 alcaloides mayoritarios del crudo alcaloideo de la especie *Rhodolirum speciosum* usando refinamiento por zona de pH, los cuales no había sido posible identificar por CG-EM. Con el aislamiento y la respectiva elucidación estructural a través del EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC, ROESY, IR y UV, se determinó que los tres alcaloides corresponden a derivados tipo licorina.

Las estructuras de los alcaloides aislados se presentan en la Figura 33:

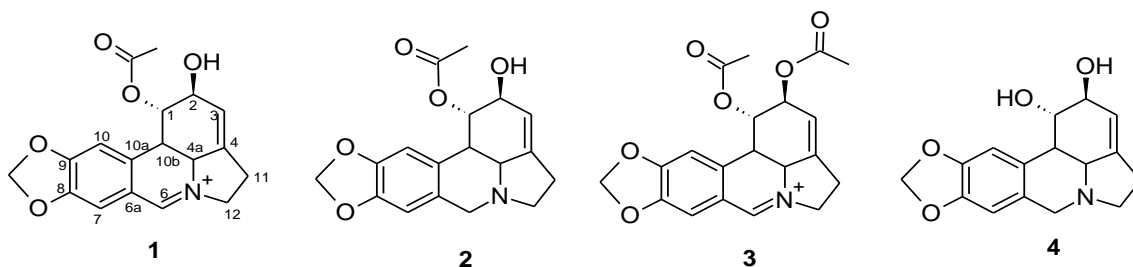


Figura 33. Estructura química de los alcaloides de tipo licorina (1, 2 y 3) aislados de *Rhodolirium speciosum* y licorina (4).



Los cromatogramas del crudo alcaloideo de *R. speciosum* y de los alcaloides aislados se presentan en la Figura 34.

Los resultados y discusión del aislamiento, elucidación y actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa de los aislados, se presentan detalladamente en el manuscrito: Isolation of three Lycorine-type Alkaloids from *Rhodolirium speciosum* using pH-zone-refining centrifugal partition chromatography and their Cholinesterase activity.

Incluido en la parte anexa de este documento

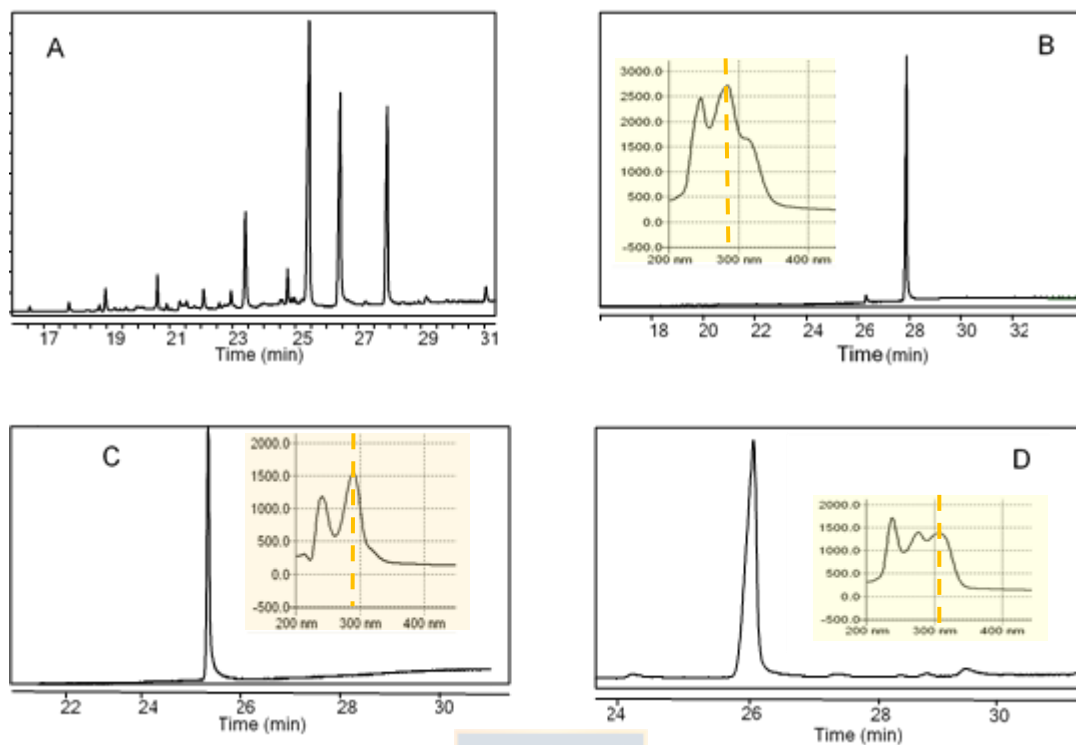


Figura 34. CG-EM de A) Crudo de alcaloides de *R. speciosum* y compuestos aislados por CPC. B) Alcaloide 1, C) Alcaloide 2 y D) Alcaloide 3. Los espectros UV-VIS se obtuvieron directamente del detector DAD del aparato de CPC.

6.4 Citotoxicidad *in vitro* sobre células epiteliales de adenocarcinoma gástrico (AGS)

La citotoxicidad *in vitro* se evaluó en células epiteliales de adenocarcinoma gástrico AGS (ATCC® CRL-1739), se probaron los crudos alcaloides de *R. pratensis*, *R. splendens* y *R. speciosum*. Se encontró que las especies que inducen la muerte celular a las 6 horas de exposición por debajo del 80% de viabilidad son *R. pratensis* y *R. splendens* con concentraciones 5,1 y 4,6 μM (Figura 35). Cabe resaltar que

aunque los crudos de alcaloides de estas especies no tienen estudios de actividad antitumoral *in vitro* ni *in vivo*, en el análisis por CG-EM se determinaron alcaloides como haemantamina y licorina, para los que se ha reportado efectos citotóxicos selectivos sobre células tumorales (Li et al. 2019; Pellegrino et al. 2018).

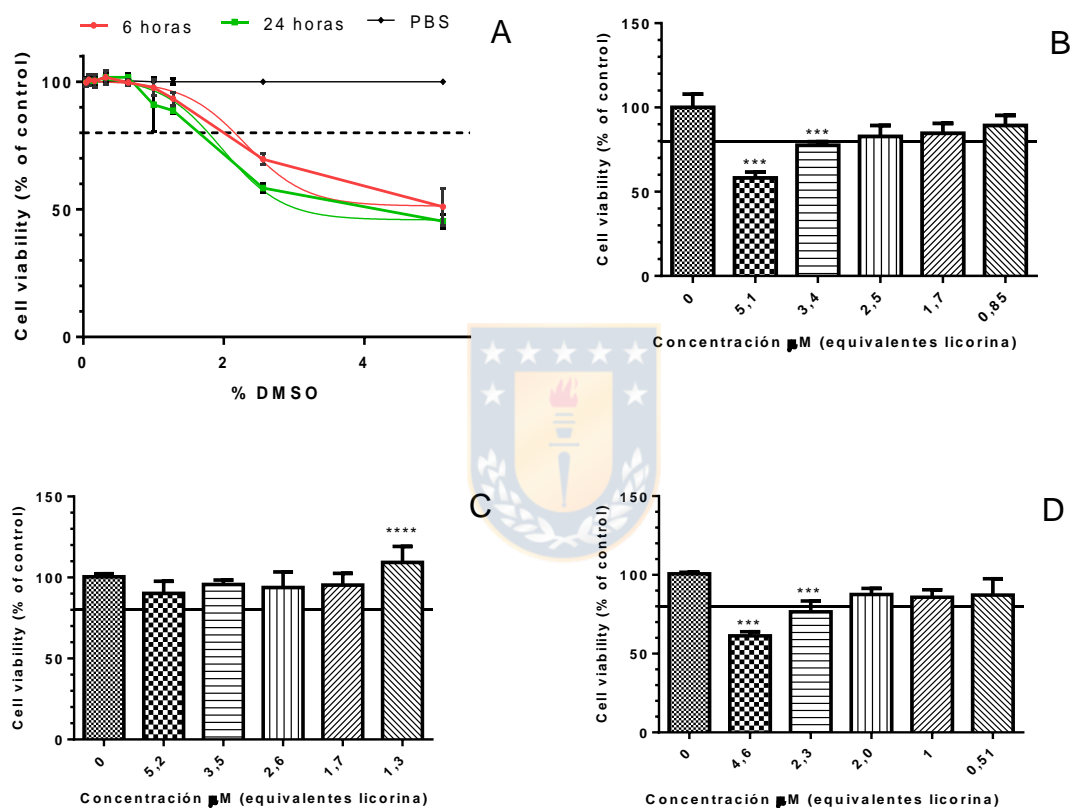
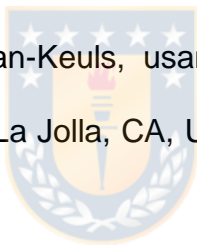


Figura 35. Citotóxicidad de crudos de alcaloides sobre células AGS a las 6 horas de exposición. A) Curva DMSO 6 y 24 horas. B) *Rhodophiala pratensis* C) *Rhodolirium speciosum* D) *Rhodophiala splendens*. Las concentraciones varían entre 0,51 y 5,2 μ M en equivalentes de licorina. Los valores se expresan como el promedio \pm SEM de 6 experimentos independientes realizados por triplicado. *** $p < 0.05$.

Es importante destacar que para dichas moléculas se tiene aproximación sobre el farmacóforo responsable de la actividad que en el caso de alcaloides con similitudes estructurales a la haemantamina corresponde al esqueleto metilenedioxi-fenantridina, mientras que para alcaloides tipo licorina se ha descrito que es fundamental el anillo B y C de la fenantridina (Roy et al. 2018; Pellegrino et al. 2018).

En la Figura 35 además se muestra la curva de viabilidad del DMSO, se observa que hasta el 2% se mantiene la viabilidad celular por encima del 80% a las 6 y 24 horas, este dato es relevante, debido a que fue el vehículo (no más de 1% de DMSO en pocillo) que se usó para disolver los extractos.

Las diferencias significativas se determinaron mediante un ANOVA de una cola y una prueba post hoc de Newman-Keuls, usando el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Con un nivel de significancia $p < 0.05$



6. CONCLUSIONES

1. Mediante la técnica cultivo de tejidos *in vitro*, se lograron propagar cuatro especies de Amaryllidaceae chilenas; *Rhodophiala pratensis*, *Rhodophiala splendens*, *Rhodophiala advena* y *Rhodolirium speciosum*.
2. Las tres especies de *Rhodophiala* como *R. pratensis*, *R. splendens* y *R. advena* se propagaron en un mismo rango de combinaciones hormonales de 6-bencialminopurina (2,20-4,40 μM) y con ácido 1-naftalenacético (2,70-5,40 μM) y presentaron un bajo índice de contaminación respecto de la especie *Rhodolirium speciosum*
3. *R. speciosum* se logró propagar en una combinación hormonal de 6-bencialminopurina 10 μM y ácido indolacético 12,5 μM . Se determinó para esta especie un alto índice de contaminación lo cual dificulta en gran medida su propagación a través de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.
4. Todos los resultados en cultivo *in vitro* sugieren que es posible dirigir la producción de alcaloides según las hormonas y su concentración. En este contexto en el cultivo de *R. pratensis* se logró aumentar significativamente la producción de alcaloides tipo galatamina, montanina y narciclasina, así como en el cultivo *in vitro* de *R. splendens* se observó incremento en la producción de alcaloides tipo haemantamina.
5. Se aislaron tres alcaloides tipo licorina en una sola etapa cuyos porcentajes de pureza superaron el 85%. El refinamiento por zona de pH, demostró ser

una técnica robusta y eficiente para llevar a cabo la separación preparativa de moléculas con solubilidad dependiente de pH, con poco uso de solvente y tiempo.

6. Los crudos de alcaloides de *R. splendens* y *R. pratensis* disminuyeron significativamente la viabilidad de células epiteliales de adenocarcinoma gástrico (AGS) en forma concentración-dependiente. Dicho efecto está relacionado con la composición de alcaloides. *R. pratensis* que se caracteriza por tener un alto contenido de alcaloides tipo homolicorina, haemantamina y licorina, alcaloides con propiedades anti-cáncer y antitumorales.



7. GLOSARIO

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AChE	Aetilcolinesterasa
AIA	Ácido indolacético
BAP	6-Bencilaminopurina
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
IE	Ionización por impacto electrónico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
NAA	Ácido 1-naftalenacético
IR	Infrarrojo
TEA	Trietilamina



8. REFERENCIAS

- Aguirre, G, J Baudoin, and L Leigue. 2016. "Aplicación Del Cultivo de Tejidos En La Multiplicación y Conservación de Recursos Fitogenéticos." Bolivia.
- Ahuja, Ashok, S. K. Bakshi, S. K. Sharma, R. K. Thappa, S. G. Agarwal, S. K. Kichlu, R. Paul, and M. K. Kaul. 2005. "Production of Volatile Terpenes by Proliferating Shoots and Micropropagated Plants of *Santolina Chamaecyparissus* L. (Cotton Lavender)." *Flavour and Fragrance Journal* 20 (4): 403–6.
- Amoo, S. O., A. O. Aremu, and J. van Staden. 2012. "In Vitro Plant Regeneration, Secondary Metabolite Production and Antioxidant Activity of Micropropagated *Aloe Arborescens* Mill." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111 (3): 345–58.
- Andrade, Jean Paulo De, Ying Guo, Mercè Font-Bardia, Teresa Calvet, Jullie Dutilh, Francesc Viladomat, Carles Codina, Jerald J. Nair, Jose A. Silveira Zuanazzi, and Jaume Bastida. 2014. "Crinine-Type Alkaloids from *Hippeastrum Aulicum* and *H. Calyptratum*." *Phytochemistry* 103: 188–95.
- Arroyo-Leuenberger, S, and J Dutilh. 2008. *Catálogo de Las Plantas Asculares Del Cono Sur*. Edited by F Zuloaga, O Morrone, and M Belgrano. Volumen I.
- Baeza, Carlos, Ruiz Eduardo, and María Negritto. 2007. "The Chromosome Number of *Phycella australis* Ravenna (Amaryllidaceae)." *Gayana Botánica* 64 (1): 119–22.

- Baeza, Carlos, Fernanda Herrera, Eduardo Ruiz, Marcelo Rosas, and Nicolás García. 2017. "Chromosomal Characterization of *Rhodolirium laetum* (Phil.) Ravenna (Amaryllidaceae) through Karyotyping and in-Situ Hybridization of Ribosomal DNA." *Gayana - Botanica* 74 (1): 240–44.
- Baeza, Carlos, Camila Mariangel, Eduardo Ruiz, and María Negritto. 2009. "El Cariotipo Fundamental En *Rhodolirium Speciosum* (Herb.) Ravenna Y R. Andicola (Poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae)." *Gayana. Botánica* 66 (1): 99–102.
- Baeza, Carlos, Patricio Novoa, Eduardo Ruiz, and Maria Negritto. 2009. "The Fundamental Karyotype in *Traubia Modesta* (Phil) Ravenna (Amaryllidaceae)." *Gayana Botánica* 66(1): 1–4.
- Baeza, Carlos, Otto Schrader, and Inelia Escobar. 2006. "Estudio Del Cariotipo En *Rhodophiala* Aff. *Advena* (Ker-Gawl.) Traub de La VIII Región de Chile Karyotype of *Rhodophiala* Aff. *Advena* from the VIII Region of Chile." *Kurtziana* 32: 45–51.
- Bahmani, Mahmoud, Hannaneh Golshahi, Kouros Saki, Mahmoud Rafieian, Bahram Delfan, and Tahereh Mohammadi. 2014. "Medicinal Plants and Secondary Metabolites for Diabetes Mellitus Control." *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4 (S2): S687–92.
- Barbez, Elke, Martin Kubeš, Jakub Rolčik, Chloé Béziat, Aleš Pěňčík, Bangjun Wang, Michel Ruiz Rosquete, et al. 2012. "A Novel Putative Auxin Carrier

Family Regulates Intracellular Auxin Homeostasis in Plants.” *Nature* 485 (7396): 119–22.

Barpete, Surendra, Muhammad Aasim, Khalid Mahmood Khawar, Sancar Fatih Özcan, and Sebahattin Özcan. 2014. “Preconditioning Effect of Cytokinins on in Vitro Multiplication of Embryonic Node of Grass Pea (*Lathyrus Sativus* L.) Cultivar Gürbüz.” *Turkish Journal of Biology* 38 (4): 485–92.

Bastida, Jaume, Strahil Berkov, Laura Torras, Natalia Pigni, Jean Paulo De Andradre, Vanessa Martínez, Carles Codina, and Francesc Viladomat. 2011. Chemical and Biological Aspects of Amaryllidaceae Alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. Vol. 661.

Belov, Michail. 2009. “ChileFlora.” 2009. <http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/HighResPages/SH1926.htm>.

Berkov, Strahil, Francesc Viladomat, Carles Codina, Sergio Suárez, Angel Ravelo, and Jaume Bastida. 2012. “GC-MS of Amaryllidaceous Galanthamine-Type Alkaloids.” *Journal of Mass Spectrometry* 47 (8): 1065–73.

Castillo, Willian O., Andrés F. Aristizabal-Pachon, Ana P. de Lima Montaldi, Elza T. Sakamoto-Hojo, and Catarina S. Takahashi. 2016. “Galanthamine Decreases Genotoxicity and Cell Death Induced by β -Amyloid Peptide in SH-SY5Y Cell Line.” *NeuroToxicology* 57: 291–97.

Cimmino, Alessio, Marco Masi, Marco Evidente, Stefano Superchi, and Antonio

- Evidente. 2017. "Amaryllidaceae Alkaloids: Absolute Configuration and Biological Activity." *Chirality*.
- Cordell, Geoffrey. 2000. "Biodiversity and Drug Discovery - A Symbiotic Relationship." *Phytochemistry* 55 (6): 463–80.
- Cortes, Natalie, Rafael Andrés Posada-Duque, Rafael Alvarez, Fernando Alzate, Strahil Berkov, Gloria Patricia Cardona-Gómez, and Edison Osorio. 2015. "Neuroprotective Activity and Acetylcholinesterase Inhibition of Five Amaryllidaceae Species: A Comparative Study." *Life Sciences* 122: 42–50.
- Dahlgren, R. 1980. "A Revised System of Classification of the Angiosperms. Bot. J. Linn." *Botanical Journal of the Linnean Society* 1975: 91–124.
- Eichhorn, Jörg, Takeshi Takada, Yasuyuki Kita, and Meinhard H. Zenk. 1998. "Biosynthesis of the Amaryllidaceae Alkaloid Galanthamine." *Phytochemistry* 49 (4): 1037–47.
- Ellman, George L., K.Diane Courtney, Valentino Andres, and Robert M. Featherstone. 1961. "A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity." *Biochemical Pharmacology* 7 (2): 88–95.
- Evidente, Antonio, and Alexander Kornienko. 2009. "Anticancer Evaluation of Structurally Diverse Amaryllidaceae Alkaloids and Their Synthetic Derivatives." *Phytochemistry Reviews* 8 (2): 449–59.
- Fennell, C. W., N. R. Crouch, and J. van Staden. 2001. "Micropropagation of the River Lily, *Crinum Variabile* (Amaryllidaceae)." *South African Journal of Botany*

67 (1): 74–77.

Fuganti, Claudio. 1975. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. Edited by Richard Helmuth Fred Manske. XV. United Kingdom: Academic Press Inc. (London) Ltd.

García, Nicolás, Ryan A Folk, Alan W Meerow, Srikar Chamala, Matthew A Gitzendanner, Renata Souza de Oliveira, Douglas E Soltis, and Pamela S Soltis. 2017. “Deep Reticulation and Incomplete Lineage Sorting Obscure the Diploid Phylogeny of Rain-Lilies and Allies (Amaryllidaceae Tribe Hippeastreae).” *Molecular Phylogenetics and Evolution* 111: 231–47.

Guo, Ying. 2015. “Research on the Alkaloids of Amaryllidaceae Plants : Genera *Lycoris* and *Hippeastrum*.” Universitat de Barcelona.

Hallmark, H. Tucker, and Aaron M. Rashotte. 2019. “Review – Cytokinin Response Factors: Responding to More than Cytokinin.” *Plant Science* 289 (December): 110251.

Harvey, Alan L. 1995. “The Pharmacology of Galanthamine and Its Analogues.” *Pharmacology and Therapeutics* 68 (1): 113–28.

Havelek, Radim, Darina Muthna, Pavel Tomsik, Karel Kralovec, Martina Seifrtova, Lucie Cahlikova, Anna Hostalkova, Marcela Safratova, Maria Perwein, and Martina Rezacova. 2017. “Anticancer Potential of Amaryllidaceae Alkaloids Evaluated by Screening with a Panel of Human Cells, Real-Time Cellular Analysis and Ehrlich Tumor-Bearing Mice Radim.” *Chemico-Biological Interactions* 275: 121–32.

- Hohmann, Judit, Peter Forgo, Joseph Molnár, Krisztina Wolfard, Annamária Molnár, Theresia Thalhammer, Imre Máthé, and Derek Sharples. 2002. "Antiproliferative Amaryllidaceae Alkaloids Isolated from the Bulbs of *Sprekelia Formosissima* and *Hymenocallis x Festalis*." *Planta Medica* 68 (5): 454–57.
- Hu, Ruilin, Xiaojing Dai, Yanbin Lu, and Yuanjiang Pan. 2010. "Preparative Separation of Isoquinoline Alkaloids from *Stephania Yunnanensis* by pH-Zone-Refining Counter-Current Chromatography." *Journal of Chromatography B* 878 (21): 1881–84.
- Ito, Yoichiro. 2005. "Golden Rules and Pitfalls in Selecting Optimum Conditions for High-Speed Counter-Current Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1065 (2): 145–68.
- Ito, Yoichiro. 2013. "pH-Zone-Refining Counter-Current Chromatography: Origin, Mechanism, Procedure and Applications." *Journal of Chromatography A* 1271 (1): 71–85.
- Ito, Yoichiro, and Ying Ma. 1996. "pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography." *Journal of Chromatography A* 753 (1): 1–36.
- Jiang, Jiaojiao, and Xiao Wang. 2018. "Preparative Separation of Three Isoquinoline Alkaloids from *Berberidis Radix* by pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography" 24 (1): 1–7.
- Jin, Zhong. 2016. "Amaryllidaceae and Scelletium Alkaloids." *Natural Product Reports* 33 (11): 1318–43.

Johnson, M., P. Maharaja, N. Janakiraman, G. Adaikala Raj, I.R.A. Menezes, J.G.M. da Costa, L.C.L. Verde, and H.D.M. Coutinho. 2018. "Pancratium Triflorum Roxb. (Amaryllidaceae) and Molineria Trichocarpa (Wight) N.P. Balakr (Hypoxidaceae): Cytotoxic and Antioxidant Activities." *Food and Chemical Toxicology*, no. December 2017: 0–1.

Kaya, G. I., K. Uzun, B. Bozkurt, M. A. Onur, N. U. Somer, D. Glatzel, and R. Fürst. 2017. "Chemical Characterization and Biological Activity of an Endemic Amaryllidaceae Species: *Galanthus Cilicicus*." *South African Journal of Botany* 108 (1341): 256–60.

Kieber, Joseph J., and G. Eric Schaller. 2014. "Cytokinins." In *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 12:e0168.

Kilgore, Matthew B., and Toni M. Kutchan. 2015. "The Amaryllidaceae Alkaloids: Biosynthesis and Methods for Enzyme Discovery." *Phytochemistry Reviews* 15 (3): 317–37.

Korver, Ruud A., Iko T. Koevoets, and Christa Testerink. 2018. "Out of Shape During Stress: A Key Role for Auxin." *Trends in Plant Science* 23 (9): 783–93. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2018.05.011>.

Krikorian, A.D, and David. L Berquam. 2003. "Plant Cell and Tissue Cultures: The Role of Haberlandt." In *Plant Tissue Culture: 100 Years since Gottlieb Haberlandt*, 25–53. New York.

Kukula-Koch, Wirginia, Wojciech Koch, Apostolis Angelis, Maria Halabalaki, and

Nektarios Aligiannis. 2016. "Application of pH-Zone Refining Hydrostatic Countercurrent Chromatography (HCCC) for the Recovery of Antioxidant Phenolics and the Isolation of Alkaloids from Siberian Barberry Herb." *Food Chemistry* 203: 394–401.

Lamoral-Theys, Delphine, Anna Andolfi, Gwendoline Van Goietsenoven, Alessio Cimmino, Benjamin Le Calvé, Nathalie Wauthoz, Véronique Mégalizzi, et al. 2009. "Lycorine, the Main Phenanthridine Amaryllidaceae Alkaloid, Exhibits Significant Antitumor Activity in Cancer Cells That Display Resistance to Proapoptotic Stimuli: An Investigation of Structure-Activity Relationship and Mechanistic Insight." *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (20): 6244–56.

Li, Li, Zao Zhang, Qian Yang, and Meiyong Ning. 2019. "Lycorine Inhibited the Cell Growth of Non-Small Cell Lung Cancer by Modulating the MiR-186/CDK1 Axis." *Life Sciences* 231 (16).

Liu, Jing, Wei Xin Hu, Li Fang He, Mao Ye, and Yan Li. 2004. "Effects of Lycorine on HL-60 Cells via Arresting Cell Cycle and Inducing Apoptosis." *FEBS Letters* 578 (3): 245–50.

Liu, Zhi Ming, Xiao Yun Huang, Mao Rong Cui, Xiao De Zhang, Zhao Chen, Ben Shou Yang, and Xiao Kun Zhao. 2015. "Amaryllidaceae Alkaloids from the Bulbs of *Lycoris Radiata* with Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities." *Fitoterapia* 101: 188–93. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.003>.

Lizama-Bizama, Isabel, Claudia Pérez, Carlos Baeza, Eugenio Uriarte, and José

- Becerra. 2018. "Alkaloids from Chilean Species of the Genus *Rhodophiala* C. Presl (Amaryllidaceae) and Their Chemotaxonomic Importance." *Gayana. Botánica* 75 (1): 459–65.
- López-Lázaro, Miguel. 2018. "The Stem Cell Division Theory of Cancer." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 123: 95–113.
- Mambro, Riccardo Di, Micol De Ruvo, Elena Pacifici, Elena Salvi, Rosangela Sozzani, Philip N. Benfey, Wolfgang Busch, et al. 2017. "Auxin Minimum Triggers the Developmental Switch from Cell Division to Cell Differentiation in the Arabidopsis Root." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (36): E7641–49.
- McNulty, James, Jerald J Nair, Jaume Bastida, Siyaram Pandey, and Carly Griffin. 2009. "Structure Activity Studies on the Crinine Alkaloid Apoptosis-Inducing Pharmacophore." *Natural Product Communications* 4 (4): 483–88.
- Morán, G. P., R. Colque, F. Viladomat, J. Bastida, and C. Codina. 2003. "Mass Propagation of *Cyrtanthus Clavatus* and *Cyrtanthus Spiralis* Using Liquid Medium Culture." *Scientia Horticulturae* 98 (1): 49–60.
- Muñoz, Manuel, Ricardo Riegel, Peter Seemann, Patricio Peñailillo, Flavia Schiappacasse, and José Núñez. 2011. "Phylogenetic Relationships of *Rhodolirium Montanum* Phil. and Related Species Based on Nucleotide Sequences from ITS Region and Karyotype Analysis." *Gayana. Botánica* 68 (1): 40–48.

Murashige, T, and F Skoog. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiologia Plantarum* 15.

Nair, Jerald J., and Johannes van Staden. 2019. "The Amaryllidaceae as a Source of Antiplasmodial Crinane Alkaloid Constituents." *Fitoterapia* 134 (January): 305–13.

Nair, Jerald J., Anke Wilhelm, Susanna L. Bonnet, and Johannes van Staden. 2017. "Antibacterial Constituents of the Plant Family Amaryllidaceae." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27 (22): 4943–51.

Napier, R.M. 2003. "REGULATORS OF GROWTH | Auxins." *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, January, 985–95.★

Naranjo, Carlos A, and Lidia Poggio. 2000. "Karyotypes of Five *Rhodophiala* Species (Amaryllidaceae)." *Boletín Sociedad Argentina de Botánica* 35: 335–43.

"Organización Mundial de La Salud. OMS." 2019. 2019. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

"Organización Panamericana de La Salud. Organización Mundial de La Salud." 2007. 2007. https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=174:cancer&Itemid=1005. Consultado 01/08/2018.

Paredes, Kelly, Catherine Delaveau, Pedro Carrasco, Carlos Baeza, Freddy Mora, and Matilde E. Uribe. 2014. "In Vitro Bulbing for the Propagation of *Traubia Modesta* (Amaryllidaceae), a Threatened Plant Endemic to Chile." *Ciencia e*

Investigación Agraria 41 (2): 13–14.

Parr, A J. 1989. "The Production of Secondary Metabolites by Plant Cell Cultures."

Journal of Biotechnology 10: 1–26.

Parvathaneni, Madhukiran, Ganga Rao Battu, Alexander I. Gray, and Pitchaiah

Gummalla. 2014. "Investigation of Anticancer Potential of *Hypophyllanthin* and

Phyllanthin against Breast Cancer by in Vitro and in Vivo Methods." *Asian*

Pacific Journal of Tropical Disease 4 (S1).

Pavlov, Atanas, Strahil Berkov, Eric Courot, Tatiana Gocheva, Dimka Tuneva,

Bojidara Pandova, Milen Georgiev, et al. 2007. "Galanthamine Production by

Leucojum Aestivum in Vitro Systems." In *Process Biochemistry*, 42:734–39.

Elsevier Inc.

Pellegrino, Simone, Mélanie Meyer, Christiane Zorbas, Soumaya A. Bouchta, Kritika

Saraf, Stephen C. Pelly, Gulnara Yusupova, et al. 2018. "The Amaryllidaceae

Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer

Cell Growth." *Structure* 26 (3): 416-425.e4.

Pereira da Costa, Gabriella Gusmão, Cristian Aldemar Gasca Silva, Joao Victor

Dutra Gomes, Amanda Gomes Torres, Izulmé Imaculada Santos, Fabrício

Tavares Cunha de Almeida, Christopher William Fagg, Luis Alberto Simeoni,

Damaris Silveira, and Kicia Karinne Pereira Goez-Copelan. 2019. "Influence of

in Vitro Micropropagation on Lycorine Biosynthesis and Anticholinesterase

Activity in *Hippeastrum Goianum*." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 29 (2):

262–65.

Ravenna, Pierfelice. 2003. *Elucidation and Systematics of the Chilean Genera of Amaryllidaceae*. Edited by Pierfelice Ravenna. Botanica A.

Reis, Andressa, Kevin Magne, Sophie Massot, Luciana R Tallini, Marina Scopel, Jaime Bastida, Pascal Ratet, and José A S Zuanazzi. 2019. "Amaryllidaceae Alkaloids : Identification and Partial Characterization of Montanine Production in *Rhodophiala Bifida* Plant." *Scientific Reports* 9: 8471.

Renault, Jean Hugues, Philippe Thépenier, Monique Zèches-Hanrot, Louissette Le Men-Olivier, André Durand, Alain Foucault, and Rodolphe Margraff. 1997. "Preparative Separation of Anthocyanins by Gradient Elution Centrifugal Partition Chromatography." *Journal of Chromatography A* 763 (1–2): 345–52. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00880-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00880-1).

Rice, L. J., J. F. Finnie, and J. Van Staden. 2011. "In Vitro Bulblet Production of *Brunsvigia Undulata* from Twin-Scales." *South African Journal of Botany* 77 (2): 305–12.

Roy, Mridul, Long Liang, Xiaojuan Xiao, Peifu Feng, Mao Ye, and Jing Liu. 2018. "Lycorine: A Prospective Natural Lead for Anticancer Drug Discovery." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 107 (June): 615–24.

Santoro, Maricel Valeria, Fiorela Nieves, Julio Zygodlo, Walter Giordano, and Erika Banchio. 2013. "Effects of Growth Regulators on Biomass and the Production of Secondary Metabolites in Peppermint (*Mentha Piperita*) Micropropagated in

Vitro.” *American Journal of Plant Sciences* 04 (05): 49–55.

Savelieva, Ekaterina M., Vladimir E. Oslovsky, Dmitry S. Karlov, Nikolay N. Kurochkin, Irina A. Getman, Sergey N. Lomin, Georgy V. Sidorov, Sergey N. Mikhailov, Dmitry I. Osolodkin, and Georgy A. Romanov. 2018. “Cytokinin Activity of N6-Benzyladenine Derivatives Assayed by Interaction with the Receptors in Planta, in Vitro, and in Silico.” *Phytochemistry* 149 (May): 161–77.

Seifi, Morteza, Sadegh Niazi, Graham Johnson, Vahideh Nodehi, and Masud Yunesian. 2018. “Exposure to Ambient Air Pollution and Risk of Childhood Cancers: A Population-Based Study in Tehran, Iran.” *The Science of the Total Environment* 646: 105–10.

Sellés, M., F. Viladomat, J. Bastida, and C. Codina. 1999. “Callus Induction, Somatic Embryogenesis and Organogenesis in *Narcissus Confusus*: Correlation between the State of Differentiation and the Content of Galanthamine and Related Alkaloids.” *Plant Cell Reports* 18 (7–8): 646–51.

Shao, Shuang, Man Li, Wei Du, Feng Shao, and Weiwen Wang. 2014. “Galanthamine, an Acetylcholine Inhibitor, Prevents Prepulse Inhibition Deficits Induced by Adolescent Social Isolation or MK-801 Treatment.” *Brain Research* 1589: 105–11.

Shilpashree, H. P., and Ravishankar Rai. 2009. “In Vitro Plant Regeneration and Accumulation of Flavonoids in *Hypericum Mysorensense*.” *International Journal of Integrative Biology* 8 (1): 43–49.

- Singh, Aparna, and Isabel Desgagne-Penix. 2014. "The Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids." *Plant Science Today* 1: 114–20.
- Slack, Jonathan. 2005. "Essential Developmental Biology." *Russian Journal of Developmental Biology* 36 (6): 389.
- Smith, Roberta H., Jody Burrows, and Kristen Kurten. 1999. "Challenges Associated with Micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippesatrum* Sp. (Amaryllidaceae)." *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 35 (4): 281–82.
- Srivastava, Lalit M., and Lalit M. Srivastava. 2002. "Auxins." *Plant Growth and Development*, January, 155–69. <https://doi.org/10.1016/B978-012660570-9/50147-7>.
- Stevens, Peter Francis. 2001. "«Amaryllidaceae-Asparagales». Angiosperm Phylogeny Website. Actualizado 8/13/2019." 2001. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Suhadolnik, R.J, A.G. Fischer, and J. Zulalian. 1962. "The Biogenetic Origin of the C6-C1 Unit of Lycorine." *Journal of the American Chemical Society*, no. 13: 4348–49.
- Szlávik, László, Ágnes Gyuris, János Minárovits, Peter Forgo, József Molnár, and Judit Hohmann. 2004. "Alkaloids from *Leucojum Vernum* and Antiretroviral Activity of Amaryllidaceae Alkaloids." *Planta Medica* 70 (9): 871–73.
- Tallini, Luciana R., Jaume Bastida, Natalie Cortes, Edison H. Osorio, Cristina

- Theoduloz, and Guillermo Schmeda-Hirschmann. 2018. "Cholinesterase Inhibition Activity, Alkaloid Profiling and Molecular Docking of Chilean *Rhodophiala* (Amaryllidaceae)." *Molecules* 23 (7).
- Tofiño, Maria Camila. 2017. "Optimización de La Producción de Alcaloides En *Zephyranthes Carinata* Por Medio de Organogénesis o Embriogénesis Somática in Vitro." Universidad Icesi.
- Toribio, Alix, Eldra Delannay, Bernard Richard, Karen Plé, Monique Zèches-Hanrot, Jean Marc Nuzillard, and Jean-Hugues Renault. 2007. "Preparative Isolation of Huperzines A and B from *Huperzia Serrata* by Displacement Centrifugal Partition Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1140 (1–2): 101–6.
- Torres, Eillen, Apolinaria García, Mario Aranda, Vania Saéz, Felipe Zúñiga, Julio Alarcón, Marcia Avello, and Edgar Pastene. 2018. "One-Step Purification of Two Semi-Synthetic Epicatechin Adducts Prepared from Avocado Peels Procyanidins by Centrifugal Partition Chromatography and Evaluation of Their Anti-Inflammatory Effects on Adenocarcinoma Gastric Cells Infected with *Helicobacter*." *Journal of the Chilean Chemical Society* 63 (4): 4222–28.
- Trujillo-Chacón, Lina M, Julio E Alarcón-Enos, Carlos L Céspedes-Acuña, Luis Bustamante, Marcelo Baeza, Manuela G López, Cristina Fernández-Mendivil, Fabio Cabezas, and Edgar R Pastene-Navarrete. 2019. "Neuroprotective Activity of Isoquinoline Alkaloids from of Chilean Amaryllidaceae Plants against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity on Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells and Mouse Hippocampal Slice Culture." *Food and Chemical Toxicology*

132: 110665.

Trujillo-Chacón, Lina M., Edgar R. Pastene-Navarrete, Luis Bustamante, Marcelo Baeza, Julio E. Alarcón-Enos, and Carlos L. Cespedes-Acuña. 2019. "In Vitro Micropropagation and Alkaloids Analysis by GC–MS of Chilean Amaryllidaceae Plants: *Rhodophiala Pratensis*." *Phytochemical Analysis*, no. May: 1–11.

Verpoorte, Robert, and A. Alfermann. 2000. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Boston, London: Kluwer.

Wang, Xiao, Geng Yanling, Li Fuwei, Shi Xingang, and Liu Jianhua. 2006. "Large-Scale Separation of Alkaloids from *Corydalis Decumbens* by pH-Zone-Refining Counter-Current Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1115 (1–2): 267–70.

Weisz, Adrian, Eugene Mazzola, and Yoichiro Ito. 2011. "Preparative separation of 1,3,6-pyrenetrisulfonic acid trisodium salt from the color additive d&c green no. 8 by affinity-ligand ph-zone-refining counter-current chromatography." *Journal of Chromatography A* 45: 8249–54.

Zhang, Wei, Lina Song, Jaime A. Teixeira da Silva, and Hongmei Sun. 2013. "Effects of temperature, plant growth regulators and substrates and changes in carbohydrate content during bulblet formation by twin scale propagation in *Hippeastrum Vittatum* 'Red Lion.'" *Scientia Horticulturae* 160: 230–37.

Zhong, J., and Shanghai Tong. 2011. "Plant Secondary Metabolites." *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* Volume 3: 299–308.

Zou, Denglang, Yurong Du, Jianyuan Kuang, Shihao Sun, Jianbin Ma, and Renwang Jiang. 2018. "PH-Zone-Refining Counter-Current Chromatography with a Hydrophilic Organic/Salt-Containing Two-Phase Solvent System for Preparative Separation of Polar Alkaloids from Natural Products." *Journal of Chromatography A* 1553: 1–6.

Zupkó, István, Borbála Réthy, Judit Hohmann, Joseph Molnár, Imre Ocsovszki, and George Falkay. 2009. "Antitumor Activity of Alkaloids Derived from Amaryllidaceae Species." *In Vivo* 23 (1): 41–48.



9. ANEXOS.

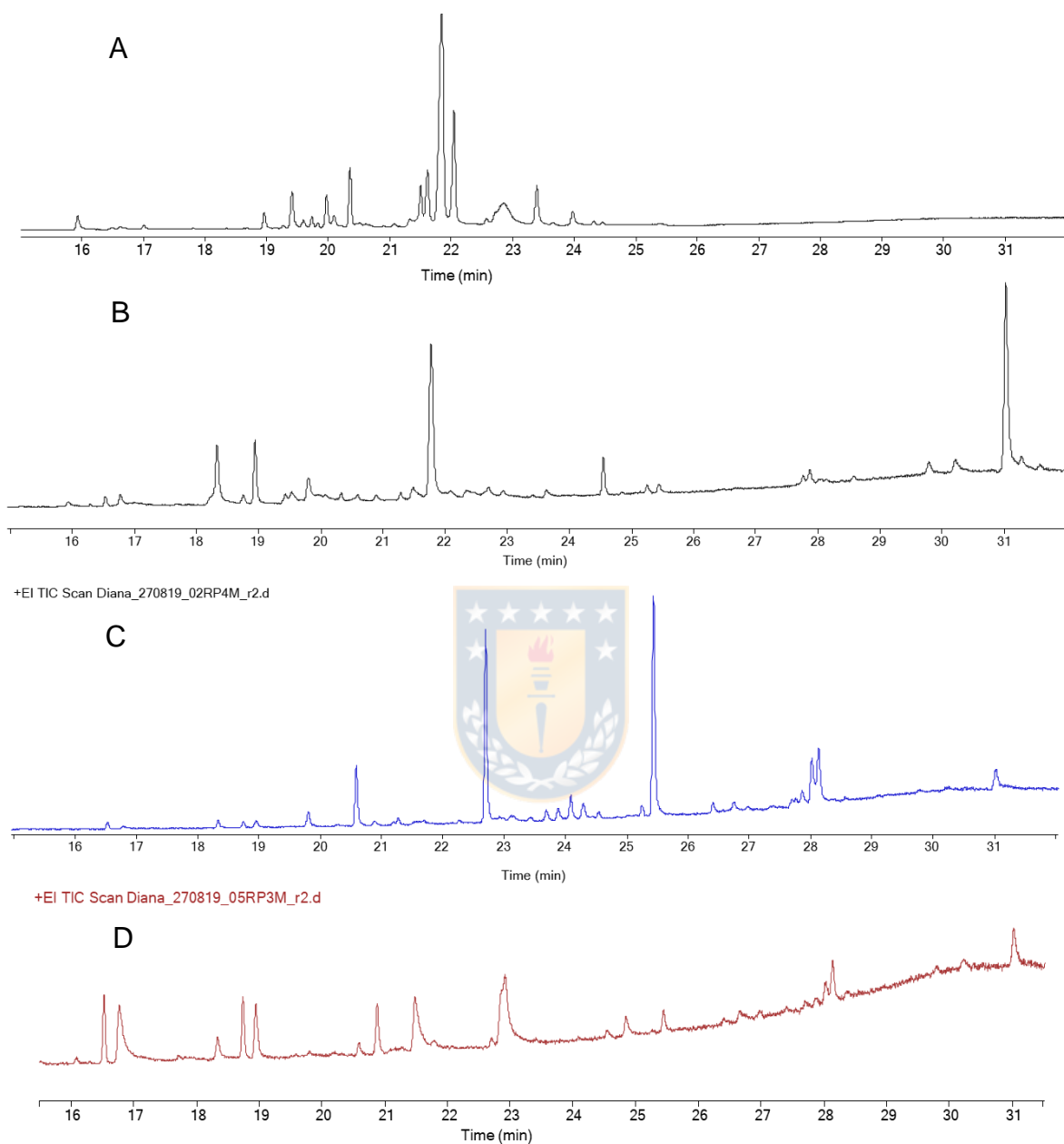


Figura 36. CG-EM del crudo de alcaloides obtenido de A) bulbos silvestres y brotes en cultivo *in vitro* con B) BAP 2,20 μM y NAA 5,40 μM . C) BAP 2,20 μM y NAA 10,80 μM y D) BAP 8,80 μM y NAA 10,80 μM de *R. pratensis*.

Tabla 8. Datos experimentales de CG-EM, índices de Kovats (RI), M⁺ y fragmentos principales m/z (intensidad relativa) para alcaloides identificados en bulbos y brotes (cultivo *in vitro*) de Amarillidaceae.

Compound	RI	M ⁺	m/z (Relative intensity %)	<i>R. speciosum</i> % Relative		<i>R. advena</i> % Relative		<i>R. splendens</i> % Relative		<i>R. pratensis</i> % Relative			
				Wild bulbis	Culture <i>in vitro</i> ^a	Wild bulbis	Culture <i>in vitro</i> ^b	Wild bulbis	Culture <i>in vitro</i> ^c	Wild bulbis	Culture <i>in vitro</i> ^d	Culture <i>in vitro</i> ^e	Culture <i>in vitro</i> ^f
Lycorine type				89,29	1,38	5,37	19,19	4,75	1,89	17,18	-	42,,89	26,23
11-12-dehydrolycorene	2365	253(62)	253(62), 252(100), 224(11), 166(7,5), 152(6), 139 (7)	0,76	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-
Anhydrolycorine	2508	251(52)	250(100), 251(52), 220(1), 201(37), 192(14), 191(17), 165(6), 124(18)	2,64	-	tr	2,79	-	-	1,37	-	-	-
11,12-Didehydroanhydrolycorine	2610	249(64)	249(64), 248(100), 190(25), 163(9), 123(18), 96(36)	0,65	-	0,83	16,40	-	-	0,40	-	-	26,23
Sternbergine	2716	331(23)	331(23), 270(22), 252(12), 229(82), 228(100)	1,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lycorine	2749	287(26)	268(16), 250(14), 227(78), 226(100), 211(5), 147(12)	8,39	-	3,41	-	4,75	1,89	4,14	-	-	-
Dihydrolycorine	2791	289(36)	288(97), 272(28), 254(40), 214(25), 200(2), 187(22), 162(15), 147(46)	0,85	-	-	-	-	-	10,69	-	-	-
2-O-Acetyllycorine	2846	329(18)	328(16), 270(42), 269(62), 268(81), 252(43), 250(100), 227(37), 226(67)	2,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ungiminorine	2750	317(1)	299(18), 268(3), 250(16), 212(10), 224(100), 225(65), 147(4)	-	-	1,13	-	-	-	-	-	-	-
Acetyllycorine derivative	2893	331(43)	330(100), 270(25), 149(7)	0,91	1,38	-	-	-	-	0,46	-	-	-

Lycorine type alkaloid(2)*	2897	331(1)	330(1), 270(1), 254(<1), 226(<1), 174(<1), 162 (1), 125(100), 96(40)	31,44	0,95	-	-	-	-	-	-	42,89	-
Lycorine type alkaloid(3)*	2972	206(1)	178(1), 125(100), 115(1), 108(1), 96(37), 82 (3)	21,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lycorine type alkaloid(1)*	3045	281(6)	270(2), 253(3), 207(18), 177(3), 156(2), 139(6), 125(100), 108(1), 96(40), 73(7)	17,39	1,84	-	-	-	-	-	-	-	-
Haemanthamine type				3,01	-	29,54	0,51	1,86	23,00	25,38	-	-	-
Vittatine	2471	271(82)	272(14), 252(16), 199(89), 187(40), 173(14), 115(22)	0,75	-	-	-	-	-	0,82	-	-	-
8-O-Demethylmaritidine	2517	273(100)	230(5), 202(29), 201(74), 189(10), 175(12), 174(31), 129(13), 128(21), 115(46), 56(13)	0,68	-	-	-	-	-	0,61	-	-	-
Aulicine	2616	304(23)	304(23), 288(47), 233(96), 206(60), 190(30), 175(11), 163(23)	0,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maritidine	2510	287(50)	270(8), 268(5), 258(7), 244(28), 215(100), 203(51), 196(5), 167(10), 128(27), 115(22)	-	-	-	-	-	-	0,23	-	-	-
Haemanthamine	2634	301(23)	272(100), 257(12), 240(26), 225(16), 211(24), 181(44), 153(13)	0,95	-	23,10	-	1,86	23,00	16,89	-	-	-
Hamayne	2728	287(1)	258(38), 242(9), 212(11), 211(16), 186(22), 181(23), 153(12), 128(21)	-	-	3,96	-	-	-	6,83	-	-	-
6-hydroxyhaemanthamine	2730	317(30)	317(30), 284(43), 233(54), 211(51), 201(78), 199(78), 181(66), 173(80), 115(100), 56(48)	-	-	2,58	0,51	-	-	tr	-	-	-
Galanthamine type				1,54	-	1,63	-	-	-	0,31	-	-	13,80



Galanthamine	2406	287(77)	287 (41), 286 (47), 244 (10), 230 (10), 216 (22), 174 (23), 128 (11), 115 (12)	0,61	-	1,10	-	-	-	-	-	-	-
Norlycoramine	2460	275(57)	274(95), 273(51), 202(53), 188(13), 173(20), 160(29), 115(20)	0,93	-	-	-	-	-	0,31	-	-	-
Lycoramine	2417	289(50)	289(5) 288(100), 232(14), 202(23), 187(18), 159(12), 115(40), 109(100)	-	-	0,53	-	-	-	-	-	-	13,80
Homolycorine type				-	-	13,39	-	-	-	42,10	-	-	-
O-Methyllycorenine	2530	331(1)	331(1), 221(3), 191(1), 110(8), 109(100), 108(11), 94(2), 82(2), 42(1)	-	-	-	-	-	-	42,10	-	-	-
Galanthine	2754	316(17)	317(7), 298(11), 268(93), 242(63), 212(100), 173(88)	-	-	13,39	-	-	-	-	-	-	-
Tazettine type				-	-	3,99	1,05	6,59	3,84	6,30	-	-	-
Tazettine	2659	331(12)	331(12), 316(7), 298(12), 247(100), 227(11), 211(12), 201(20), 181(17), 152(13), 115(30)	-	-	3,99	1,05	2,26	-	5,02	-	-	-
3-Epimacronine	2812	329(10)	314(12), 245(100), 244(20), 201(78), 70(33)	-	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-
6-O-Methylpretazettine	2613	345(13)	345 (13) 330 (12), 261 (100), 239 (23), 230 (14), 201 (21)	-	-	-	-	4,33	3,84	1,14	-	-	-
Narciclasine type				-	-	-	-	-	-	1,00	1,80	-	29,25
Trisphaeridine	2279	223(100)	222(36), 167(15), 165(11), 164(16), 138(25), 111(40)	-	-	-	-	-	-	1,00	1,80	-	29,25
Montanine type				-	-	19,33	17,88	-	-	1,32	33,65	35,04	-
Montanine	2620	301(99)	301(99), 270(50), 257(47), 252(28), 223(45), 185(61), 115(59)	-	-	19,33	17,68	-	-	1,00	33,65	-	-
Pancreatine	2686	287(100)	270(20), 243(37), 223(35), 199(59), 185(71), 115(44)	-	-	-	-	-	-	0,32	-	35,04	-
Miscellaneous				-	-	tr	-	-	-	1,77	1,36	1,39	14,71

Ismine	2274	257(30)	238(100), 225(10), 211(9), 196(11), 180(11), 168(11), 154(7)	-	-	tr	-	-	-	0,37	1,36	1,39	14,71
Galanthindole	2500	281(100)	264(12), 263(16), 262(18), 252(11), 204(12), 191(20), 132(30), 107(30)	-	-	-	-	-	-	1,20	-	-	-
Not identified				6,16	95,60	3,53	61,57	87,44	71,26	4,84	62,88	21,41	16,01
Unknown	2552	279(4)	279 (4), 167 (33), 150 (11), 149 (100), 132 (2), 113 (9), 105 (2), 93 (1), 70 (16),	0,97	73,87	-	-	45,80	1,63	-	-	-	-
Unknown	3130	327(3)	355(7), 327(10), 281(38), 267(3), 253(21), 207(100), 191(12), 177(5), 147(19)	0,37	1,51	-	-	-	-	-	-	-	-
Unknown	3171	329(5)	355(5), 329(11), 303(8), 281(38), 253(25), 231(10), 207(100), 191(16), 161(19), 135(33), 107(28)	0,20	5,55	-	-	17,50	53,92	-	45,59	8,08	11,10
Unknown	2730	338(2)	207(5), 154(5), 150(3), 137(3), 128(9), 126(18), 125(4), 112(15)	-	14,88	-	-	-	-	-	-	-	-
Unknown	2745	300(1)	300(1), 239(1), 191(4), 110(8), 109(100)	-	-	1,77	-	-	-	-	-	-	-
Unknown	2359	289(2)	289(2), 239(3), 218(1), 167(30), 149(100)	-	-	0,66	43,29	-	-	-	-	-	-
Unknown	2280	285(2)	285(2), 256(10), 237(5), 207(3), 165(6), 137(100), 120(13)	-	-	tr	10,70	9,55	1,42	-	-	-	-
Unknown	2831	281(1)	281(1), 252(0,7), 207(0,7), 161(1), 136(12), 95(17), 81(65)	-	-	-	-	3,69	5,09	-	-	-	-

Unknown	3121	341(5)	341(5), 315(9), 281(22), 255(10), 253(15), 207(72), 191(6), 163(18), 161(20), 147(27), 145(31)	-	-	-	-	3,08	7,81	-	-	-	-
Unknown	2800	281(1)	281(1), 207(16), 137(11), 121(11)	-	-	-	-	-	-	-	4,59	-	-
Galanthamine derivate	2259	281(2)	281(2), 245(2), 236(5), 207(6), 187(3), 175(60), 147(6), 107(8)	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
Montanine type alkaloid	2267	281(3)	281(3), 243(20), 224(100), 207(6), 166(14), 139(10)	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
Nerinine type alkaloid (1)	2484	281(1)	271(3), 254(2), 238(1), 207(1), 128(2), 115(2), 109(100), 108(14)	0,71	-	-	-	-	-	4,27	-	-	-
Nerinine type alkaloid (2)	2760	281(2)	281(2), 250(2), 226(3), 207(2), 191(1), 155(1), 141(2), 127(1), 109(100), 96(3), 85(1), 71(2), 57(2)	-	-	1,10	7,58	0,67	-	0,57	-	-	-
Homolycorine type alkaloid (6)	2401	281(8)	281 (8) 250 (5), 222(4), 147 (23), 129 (100), 112(25), 83 (18), 70 (33), 57(39)	0,89	-	-	-	7,15	1,39	-	12,70	1,48	4,91
Galanthamine derivate 1	2547	289(97)	289(97), 272(15), 244(10), 230(14), 218(52), 216(17), 174(11), 149(14), 128 (29), 115 (28)	1,52	-	-	-	-	-	-	-	11,13	-
Galanthamine derivate 2	2601	344(100)	345(38), 344(100), 251(2), 248(2), 226(8), 161(7), 147(3), 129(5), 101(6)	0,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Galanthamine derivate 3	2654	306(22)	306(22), 305(100),	0,78	-	-	-	-	-	-	-	-
			290(16), 288(22),									
			276(27), 248(21),									
			233(72), 206(47),									
			175(14)									

*Alcaloides aislados. R.I: índices de Kovats. % Relative: cantidad relativa del compuesto en la muestra

a: Cultivo *in vitro* con BAP 5 µM, 10 µM AIA y 16 µM 2,4-D.

b: Cultivo *in vitro* con BAP 4,44 µM y NAA 2,70 µM.

c: Cultivo *in vitro* con BAP 2,20 µM y NAA 5,40 µM.

d: Cultivo *in vitro* con BAP 2,20 µM y NAA 5,40 µM.

e: Cultivo *in vitro* con BAP 2,20 µM y NAA 10,80 µM

f: Cultivo *in vitro* con BAP 8,80 µM y NAA 10,80 µM





Isolation of three Lycorine type Alkaloids from *Rhodolirium speciosum* using pH-zone-refining centrifugal partition chromatography and their Acetylcholinesterase inhibitory activity

Journal:	<i>Journal of Separation Science</i>
Manuscript ID	jssc.201901302
Wiley - Manuscript type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	22-Dec-2019
Complete List of Authors:	Correa, Diana; Universidad de Concepción, Farmacia Pastene-Navarrete, Edgar; Universidad del Bio-Bio - Sede Chillan, Ciencias Basicas; Universidad de Concepción, Farmacia, Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT). Baeza, Marcelo; Universidad de Concepción, Botanica Bustamante, Luis; Universidad de Concepción, Análisis Instrumental Alarcón-Enos, Julio; Universidad del Bio-Bio - Sede Chillan, Ciencias Basicas
Keywords:	pH zone refining centrifugal partition chromatography, Amaryllidaceae alkaloids, Acetylcholinesterase, gas chromatography

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Isolation of three Lycorine type Alkaloids from *Rhodolirium speciosum* using pH-zone-**
2 **refining Centrifugal Partition Chromatography and their Acetylcholinesterase**
3 **inhibitory activity**

4 Diana Correa¹, Edgar R. Pastene-Navarrete^{1,2*}, Luis Bustamante³, Marcelo Baeza⁴, Julio E.
5 Alarcón-Enos^{2*}.

6 ¹Laboratorio de Farmacognosia, Dpto. de Farmacia, Facultad de Farmacia, Unidad de
7 Desarrollo Tecnológico, UDT. P.O. Box 237, Universidad de Concepción, Concepción,
8 Chile.

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

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

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

15

16 **Running Title:** Isolation of *Rhodolirium speciosum* alkaloids using pH-zone-refining CPC.

17

18 ***Corresponding authors:** Tel: +56-422463000, email address: edgar.pastene@gmail.com

19

20 **Abbreviations:** AChE: Acetylcholinesterase; AD: Alzheimer's disease; CPC: centrifugal
21 partition chromatography; FDA: Food and Drug Administration.

22 **Keywords:** Acetylcholinesterase, Amaryllidaceae alkaloids, gas chromatography, pH zone
23 refining Centrifugal Partition Chromatography.

24

25

26 **Abstract:**

27 Preparative separation of three lycorine type alkaloids from *Rhodolirum speciosum*
28 (Amaryllidaceae) were successfully carried out using pH zone refining centrifugal partition
29 chromatography using a solvent system Methyl-tert-butyl ether /Acetonitrile/Water (4: 1: 5,
30 v / v / v) . Using this system, Alkaloid **1** (165.7 mg, 88.2%, purity), **2** (60.1 mg, 97.7% purity)
31 and **3** (12.3 mg, 84.4% purity) were obtained in one-step. For structure elucidation, the pure
32 alkaloids were subjected to spectroscopy analysis using ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC,
33 ROESY and GC-MS. Alkaloids **1**, **2** and **3** were identified as 1-*O*-acetyl-5,6-dehydrolycorine,
34 1-*O*-acetyl-lycorine and 1,2-*O*-diacetyl-5,6-dehydrolycorine, respectively. The
35 acetylcholinesterase inhibitory activity of these alkaloids was IC₅₀ 151.1 µg/mL, IC₅₀ 203.5
36 µg/mL, IC₅₀ 470.0 µg/mL and IC₅₀ 17.1 µg/mL, respectively.

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47 1. INTRODUCTION

48 Amaryllidaceae are perennial bulbous herbaceous plants distributed worldwide in coasts,
49 forests and highlands, in tropical and subtropical areas. In Chile they are represented by 11
50 genera and 35 species, among which is the endemic species *Rhodolirium speciosum* [1].
51 These plants are found within the twenty families of the most important alkaloid producing
52 species. Isoquinoline type alkaloids are exclusive to this family and are biogenetically related
53 through specific oxidative phenolic couplings of the biogenetic precursor *O*-
54 methylnorbelladine derived from the amino acids L-phenylalanine and L-tyrosine. Previous
55 studies in different species of the *Rhodolirium* genus report between 20 and 30 alkaloids,
56 among which are galanthamine, lycorine, heamanthamine, undulatine, together with a high
57 number of unidentified alkaloids [2,3]. There is great evidence on the pharmacological
58 potential of these metabolites, such as anticancer [4], cytotoxicity [5], antibacterial [6] and
59 neuroprotection activity [3]. The potential for inhibition of acetylcholinesterase (AChE) that
60 amaryllidaceae alkaloids have is well known, enzyme inhibition suppresses hydrolysis of
61 acetylcholine, a neurotransmitter that mediates the synaptic activity of the nervous system.
62 Galanthamine is one of the FDA approved medications, used for the treatment of cognitive
63 decline treatment of Alzheimer's disease (AD) in mild to moderate stages, so alkaloids with
64 similar carbon nucleus could be molecules with promising AChE inhibition activity and
65 neuroprotection [7]. Approximately 500 alkaloids have been isolated from this family of
66 plants [8]. However, due to the low content, structural diversity and pH-dependent solubility,
67 their isolation and purification requires large amounts of plant material and therefore higher
68 solvent consumption. Solid support-based chromatography are the most used to isolate
69 alkaloids, however, irreversible adsorption and stationary phase limitations decreases the

70 efficiency of the purification process [9]. Displacement centrifugal partition chromatography
71 (CPC) strategy has been increasingly used to isolate and purify large amounts of bioactive
72 compounds [10]. This protocol is restricted to ionizable compounds, which have a dramatic
73 difference in solubility between their ionized and neutral forms. In this context, pH-zone-
74 refinement CPC is the preferred methodology for the isolation of alkaloids. Previous studies
75 has been report the efficiency of this technique for isolating isoquinoline alkaloids such as
76 isocorydine, corydine [11], huperzines A y B [12], bicuculline, protopine [13], magnoflorine,
77 berberine [14], and palmatine [15]. Therefore, Amaryllidaceae alkaloids are good candidates
78 to be separated and purified by pH-zone refining CPC. This support-free liquid–liquid
79 partition and displacement chromatography has many advantages such as; high sample
80 loading capacity with minimal irreversible adsorption or stationary phase saturation and high
81 selectivity. These advantages, allows the separation of compounds with very similar
82 structures with high purity and low solvent consumption compared to conventional
83 preparative techniques [16]. So far, this is the first report about the use of pH-zone refinement
84 CPC for the isolation and purification of isoquinoline alkaloids from *R. speciosum*. Thus,
85 herein we report the development of a pH-zone refinement CPC method for preparative
86 isolation and purification of three major alkaloids from *R. speciosum* (Figure 1). Their
87 identification was performed by means of chromatographic and spectroscopic methods. Also,
88 we evaluate the *in vitro* AChE-inhibiting properties of these isolated compounds.

89 2. MATERIALS AND METHODS

90 2.1 Reagents and materials

91 Methyl-tert-butyl ether (MtBE), *n*-Heptane (Hep); ethyl acetate (EtOAc); *n*-propanol (*n*-
92 PrOH); acetonitrile (ACN), hydrochloric acid (HCl), trimethylamine (TEA) used for CPC

93 were analytical grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol, water
94 and ACN used for HPLC analyses was of chromatographic grade (Darmstadt, Germany).

95 **2.2 Plant material**

96 *Rhodolirium speciosum* bulbs were collected in flowering period (October-November) in the
97 Bio-Bio Chile region, in the commune of Coronel (Santa Juana), at coordinates 37°10'S
98 72°58'W, and collecting voucher C. Baeza 4350 (CONC). The bulbs were cleaned with
99 distilled water and neutral soap, chopped and lyophilized and stored at -80 ° C.

100 **2.3 Extraction and isolation**

101 Lyophilized bulbs (75.0 g) were ground in a blender to a fine powder. The powdered plant
102 material was macerated for 24 hours with methanol. Then, methanol extract was sonicated in
103 an ultrasonic cleaner (42 kHz, 70 W; Branson ultrasonic corporation, USA) for 30 minutes,
104 and filtered. Filtrate was concentrated under vacuum to dryness to obtain the methanol extract.
105 Powdered methanol extract (13.6 g) was dissolved in 50 mL of 2% H₂SO₄ and successive
106 extractions were carried out with ethyl acetate (4 x 40 mL). The lower aqueous layer was
107 adjusted to pH 10 with 25% NH₄OH and extracted successively with chloroform (4 x 40
108 mL). The remaining ethyl acetate fractions were dried and the residue was extracted again
109 with 10 mL of 2% H₂SO₄ repeating the procedure described above. The combined extracts
110 were dried in-vacuum to afford crude alkaloids and stored in air tight container in a desiccator.

111 **2.4. CPC apparatus and separation procedures**

112 The separation was performed in a Spot-CPC-250-B Bio-Extractor 250-L centrifugal
113 partition chromatograph (Gilson, France) with a total column capacity of 250 mL. The
114 solvents were pumped by a SPOT-PREP II system (Armen, France), equipped with a

115 quaternary pump, UV detector and fraction collector. The biphasic solvent systems tested in
116 the present work for the alkaloid separations were mixtures of methyl tert-butyl ether
117 (MtBE)/acetonitrile (ACN)/water (W) and n-Heptane (Hep)/ethyl acetate (EtOAc)/n-
118 propanol (n-PrOH)/water (W) [12]. Solvent systems were vigorously shaken and once two
119 phases were separated, trimethylamine (TEA) was added as a retainer to the organic phase
120 (upper) and acid (formic, acetic or HCl) was added as a displacer to the aqueous phase (lower)
121 at different concentrations (Table 1S). Organic upper phase was used as the stationary phase
122 and aqueous lower phase was used as the mobile phase. To carry out the refinement by pH
123 zone refinement CPC, upper organic phase was firstly pumped at a flow rate of 30 mL/min
124 and the column rotated at 500 rpm without phase equilibrium. Crude *Rhodolirium speciosum*
125 alkaloid extract (556.2 mg) was dissolved in 5 mL of upper phase without retainer and 5 mL
126 of lower phase with displacer and loaded through 10 mL sample loop. Lower phase was
127 pumped into the system in descending mode at a flow rate of 12 mL/min increasing the
128 rotation speed up to 1800 rpm. Fractions (25 mL, 26 tubes) were collected, and monitored
129 with a scan of 200-600 nm and wavelengths 280 and 310 nm. Additionally, the changes in
130 the pH of the effluent were monitored during each run.

131 **2.5. HPLC Analysis of CPC fractions**

132 The collected fractions were concentrated under vacuum to dryness and 25% NH₄OH was
133 added until pH 10, extracted with chloroform (3 x 5 ml) and concentrated in vacuum t to
134 dryness. All fractions were reconstituted in 10 mL of mobile phase and were analyzed by
135 liquid chromatography on a Waters liquid chromatograph (USA), Alliance 2695 model, the
136 system consisted of an quaternary pump LC20AT, column oven CTO-20AC, degassing unit
137 DGU-20AR 5R, detector UV-VIS Waters dual- λ model 2487 (USA) and a autosampler SIL-

138 20AC. YL Clarity Waters software was used to collect and process data. For the
139 chromatographic study, separations were performed on a Kromasil column C18 (4.6 x 250
140 mm; 5 μ m) (USA). The mobile phase consisted of ACN (0.2% diethylamine) and water
141 (0.2% diethylamine, adjusted to pH 3 with formic acid), in 16: 84 v/v ratio. Separation was
142 carried out by isocratic elution chromatography with a detection wavelength set at 310 nm.
143 The flow rate was 1 mL/min, and the temperature of the column oven was set at 35 ° C. The
144 injection volume was 5 μ L of the respective fraction.

145 **2.6. Analysis of alkaloid and CPC fractions by GC-MS**

146 Gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed on an Agilent
147 7890 to GC (Agilent, Palo Alto, CA) with multimodal injector, coupled to an Agilent triple
148 Quad 7000 GC/MS detector. The analysis of the alkaloids was carried out on a capillary
149 column with a stationary phase 5%-phenyl-poly(dimethylsiloxane) HP-5 MS with
150 dimensions 30 m x 0.250 mm I.D x 0.25 μ m d_f , (Agilent J&W, Palo Alto, CA). Helium
151 (99.9999% purity) was used as carrier gas with a flow rate of 0.8 mL/min. The injector
152 temperature was 250 ° C, the injection volume of 0.8 μ L. The temperature program was
153 initially 100-180 ° C (15 °C/minute), then increased to 180-300 ° C (5 °C/minute) and ended
154 with 10 minutes of heating at 300 °C. The data processing and control of the instrument was
155 performed with the Agilent MassHunter GC/MS software (Version B.05.00 / Build
156 5.0.291.0). Five milligrams of alkaloid crude was dissolved in 500 μ L of methanol, codeine
157 standard in methanol was added to obtain a final concentration of 50 μ g/mL. Samples were
158 centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm and the supernatant was used for the GC analysis. The
159 alkaloids were identified by comparing their mass spectra and the retention indexes of Kovats
160 (RI), which were calculated taking into account the retention times of C₈-C₂₈ n-paraffin

161 standards, analyzed under the same operational conditions as the samples. In addition, each
162 alkaloid was identified as a function of retention time and the relationship between the
163 intensity of the spectral fragmentation of each of the compounds, for this purpose 3
164 representative ions were taken into account for each alkaloid, one quantitative ion and two
165 qualitative ions. To analyze the fractions obtained in the pH zone refining, they were dried
166 under reduced pressure and reconstituted in 1 mL of methanol for further analysis.

167 **2.7. Structural elucidation of isolated alkaloids**

168 The structures of the isolated compounds were elucidated by MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and
169 2D-NMR. NMR spectra were recorded on a Bruker model Ascend TM, 400 MHz equipped
170 with a liquid probe PABBI 1H/D-BB Z-GRD, inverse, multicore, with automatic tuning with
171 concentration gradient and phase correction. 10 mg of alkaloids were dissolved in CDCl_3 .

173 **2.8. Measurement of the partition coefficients (KD)**

174 The partition coefficient (KD) was determined according to Ito *et al.* [17] with slight
175 modifications. Five mg of alkaloid extracts were weighed and dissolved in 3 mL of
176 thoroughly pre-equilibrated upper organic (without TEA as retainer) and lower aqueous
177 (without acid as displacer) phases. The mixture was vigorously shaken in a 10 mL separatory
178 funnel. Once settled, upper and lower phases were separated and taken to dryness. To
179 determine K_{acid} and K_{basic} of each target, the same procedure was performed and acid and
180 TEA were added to lower and upper phases, respectively. The residues were reconstituted in
181 1 mL of mobile phase and analyzed by HPLC following the method described above injecting

182 5 μ L. Based on the ratio of HPLC peak area of each alkaloid in lower and upper phases the
183 KD values were calculated as follows:

$$184 \quad KD = \frac{\text{HPLC peak area of alkaloid in upper phase}}{\text{HPLC peak area of alkaloid in lower phase}}$$

185 **2.9. Purity determination**

186 The purity was determined by HPLC, dissolving 3 mg of alkaloid in 3 mL of mobile phase
187 and injecting 10 μ L of sample, the percentage of purity was calculated with the equation:

$$188 \quad \%P = \frac{\text{HPLC peak area}}{\text{HPLC peak total areas}} \times 100$$

189 **2.10. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity**

190 Acetylcholinesterase inhibitory activity was determined spectrophotometrically using a
191 microplate method described above for Ellman *et al.* [18] with some modifications. Fifty μ L
192 of sample prepared in methanol: 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 (1: 1), were added to a 96-
193 well microplate and serially diluted 10 times. Afterwards, 50 μ L of 0.4 U/mL *Electrophorus*
194 *electricus* AChE dissolved in 0.1% bovine serum albumin were added and the mixture was
195 stirred and incubated for 30 minutes at 37 ° C. Substrate were prepared as follows: 4 mg of
196 DNTB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) and 3,4 mg of acethylthiocholine iodide (ATCI)
197 were dissolved in 50 mL Tris-HCl buffer with 0.1 M NaCl and 0.02 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. After
198 incubation time, 100 μ L of substrate were added to the mix and the microplate was incubated
199 for additional 15 minutes. Readings were performed at 405 nm using galanthamine
200 hydrobromide as a positive control. Graphs and calculation of IC_{50} was performed in
201 GraphPad Prism 6.0.

202 3. RESULTS AND DISCUSSION

203 3.1. GC- MS analysis of *Rhodolirium speciosum*

204 Plants of the Amaryllidaceae family are an important source of alkaloids, which have varied
205 biological activities. The literature reports countless works which, through the use of LC-
206 ESI-MS-MS or GC-MS-MS, give an account of the existence of these alkaloids in the
207 different genera of this family, reaching the presence of 30 to 40 alkaloids in a plant. In a
208 previous work with *Rhodophiala pratensis* through GC-MS our group reported 34 alkaloids,
209 achieving the identification of 24 of them [3]. In the present work, the preliminary analysis
210 by GC-MS of crude alkaloid extract of *R. speciosum* revealed the presence of alkaloids with
211 lycorine, galanthamine, haemanthamine and montanine skeleton, and a set of not identified
212 alkaloids, although their fragmentation pattern suggest that they are lycorine derivatives
213 (Figure 1 and 4, Table 1).

214 3.2 Isolation of alkaloids by means of pH-zone-refinement CPC

215 The pH-zone-refining CPC technique is based on the displacement of molecules with
216 difference solubility between ionized and neutral form. According to Ito [19] an optimal
217 biphasic system for pH-zone-refining CPC must give $K_{\text{basic}} \gg 1$ and $K_{\text{acid}} \ll 1$ in descending
218 mode. An important advantage of this separation methodology is that high loads of extract
219 can be introduced in the CPC system giving irregular rectangular peaks with impurities
220 confined in the initial and outside boundaries of the main peak. This feature allow large-scale
221 separations of ionizable compounds depending on the pH variation. So, in this methodology
222 the selectivity of separation (K_a') is largely controlled by $K_a \times K_D$, where K_a is the acidity
223 constant and K_D is the distribution constant [12]. Amaryllidaceae alkaloids containing a

224 secondary, tertiary or even quaternary nitrogen atom, are moderately weak bases with
225 variable pKa between 4.0-10.0, so that their basic neutral forms and acid protonates are
226 solubilized in organic and aqueous phases, respectively. Due to the advantages of pH-zone
227 refinement CPC, the large scale purification of compounds with low yields is possible. So,
228 these advantages encouraged us to select pH-zone refinement CPC as preparative separation
229 strategy for this class of alkaloids. As mentioned above, for the present application to
230 alkaloids, a suitable two-phase solvent system was necessary which should provide ideal
231 distribution constants (KD) values in both acidic and basic condition as well as good
232 solubility of the samples in the solvent system. We start the evaluation using different
233 combination of the previously reported biphasic solvent system *n*-Hept/EtOAc/*n*-PrOH/W
234 (10:30:15:45 v/v/v/v) with 15 mM TEA and variable concentrations of formic acid, acetic
235 acid and HCl (Table 2). In such conditions is observed that alkaloids cannot be separated
236 properly. For instance, when 6 mM HCl was used, alkaloids were retained in the stationary
237 phase (Figure S1) with retention times too long (> 210 min). In the case of solvent system *n*-
238 Hept/EtOAc/*n*-PrOH/W (10:30:15:45 v/v/v/v) with 6 mM acetic acid, and 3 mM formic acid,
239 KD values only could be estimated for compound 1 and 2 and they were not good enough
240 for our purposes. This problem caused co-elution of alkaloids and neutral compounds in the
241 pH zone-refinement CPC experiment (Table 3, Figure S2 and S3). Therefore, we evaluated
242 a binary two-phase solvent system composed of MtBE–W (1:1, v/v) which has been used for
243 different types of compounds [20]. However, with this solvent system the alkaloids shown
244 solubility problems. Afterwards, we prepared the biphasic solvent system MtBE/ACN/W (4:
245 1: 5, v/v), which has been used previously for alkaloid separation [21, 22]. Interestingly, the
246 solubility of the sample was substantially improved by adding ACN to the above mentioned
247 solvent system. So, when this solvent was used with 12 mM TEA with 6 mM formic acid,

248 the separation was improved and alkaloid 1 can be purified (15-20 min). However, alkaloids
249 2 and 3 co-eluted as a single rectangular shape peak around 30-40 min (Figure S4).
250 Nevertheless, this system can be optimized in order to obtain K_{acid} and K_{base} values
251 sufficiently different to guarantee an adequate separation of the targeted alkaloids. Thus, as
252 shown in Table 4, among the different conditions tested, the solvent system MtBE/ACN/W
253 in the proportions 4: 1: 5, v / v / v with 6 mM formic acid and 15 mM TEA gave K_{acid} 33.76
254 and K_{base} 1.35 values for alkaloid 1 and K_{acid} 48.65 and K_{base} 0.74 values for alkaloid 2, while
255 for alkaloid 3 K_{acid} 0.43 and K_{base} 12.52 were calculated. This system seems more suitable
256 for purify main alkaloids, albeit higher acid concentrations could be used improve the
257 purification of other minor alkaloids. However, in order to make the separation in one-step,
258 we decided on the MtBE/ACN/W with 6 mM formic acid and 15 mM TEA system. Figure 2
259 shows the preparative pH-zone-refining CPC separation of 556.2 mg crude of alkaloids from
260 *R. speciosum* sample using the selected solvent system. The retention of stationary phase was
261 76 %. In Figure 2, Zone I has a mixture of minor alkaloids and impurities poorly resolved.
262 As the pH decreases it can be observed three clearly delimited zones named F II, III and IV.
263 After preliminary HPLC analysis of each tube, those with identical composition were
264 gathered, concentrated and cleaned to eliminate TEA. Afterwards, CPC fractions with
265 alkaloids were re-analyzed by HPLC and GC-MS in order to check the purity of each
266 compound. In Figure 3 is shown the chromatograms of crude alkaloid extract, isolated
267 alkaloids 1-3 and their respective UV spectra (taken from CPC PDA detector). After GC-MS
268 analysis, single peaks (alkaloids 1, 2 and 3) with minor neutral impurities were observed in
269 F II-IV. As result, 65.7 mg alkaloid 1 (88.2 % purity), 50.1 mg alkaloid 2 (97.7 % purity) and
270 12.3 mg alkaloid 3 (84.4 % purity), were obtained in a single step separation from zone II-
271 IV, respectively (Table 4). The elucidation of the chemical structures for each alkaloid

272 isolated from *R. speciosum* using pH-zone-refinement CPC was carried out by positive EI-
273 MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR (see below).

274 3.3 Isolated alkaloids

275 Alkaloids 1, 2, and 3 were identified by comparison of their EI-MS, NMR and
276 chromatographic data with authentic compounds isolated from other Amaryllidaceae species
277 and comparison with literature [23-25]. Compound 1 was obtained as a yellow amorphous
278 powder. The EI-MS afforded a quasimolecular ion peak at m/z 330 (calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_5^+$,
279 328.33867), corresponding to the molecular formula $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_5^+$, and show a fragmentation
280 patterns typical of lycorine-type alkaloids (Figure 4). Its UV absorption at λ_{max} 374, 309, 253,
281 and 212 nm showed an extended chromophore and a methylenedioxy substituted benzene
282 ring. The IR absorption bands at 3.410, 3.355, 1.645, 1.605 and 923 cm^{-1} indicated OH
283 groups and phenyl functions. The ^1H -NMR spectrum of alkaloid 1 exhibited two singlets for
284 two para-located aromatic protons at δH 7.07 (H-8) and 7.51 (H-11), a methylenedioxy signal
285 at δH 6.11 and a downfield singlet corresponding to the proton of an iminium salt (δH 8.47)
286 [21]. The ^{13}C -NMR spectrum showed 18 carbon signals [$\text{OCH}_2\text{O} \times 1$, CH_2 (sp^3) $\times 2$, CH
287 (sp^3) $\times 4$, CH (sp^2) $\times 4$ and C (sp^2) $\times 6$, and CH_3 (sp^3) $\times 1$, (Table 5). The above data suggested
288 that alkaloid 1 is an Amaryllidaceae alkaloid similar to lycorine [26,27], except for an imine
289 moiety located between N-5 and C-6 (δC 168.15) in compound 1, as supported by HMB Cs
290 of δH 8.47 (H-6) with δC 60.62 (C-4a), 109.64 (C-7), 136.93 (C-10a) and 55.77 (C-12). The
291 relative configuration of H-4a and H-10b in the Amaryllidaceae alkaloids isolated from the
292 genus *Lycoris* were always α - and β -orientations, respectively [26, 27]. The relative
293 configuration of alkaloid 1 was elucidated by a ROESY experiment. The ROESY
294 correlations of H-10b/H-1 and H-4a/H-2 indicated the β -orientation of H-1 and α -orientation

295 of H-2, and are consistent with those reported by Kotera *et al.* [27]. Therefore, alkaloid 1 was
296 identified as 1-*O*-acetyl-5,6-dehydrolycorine.

297 The ¹H-NMR spectrum of alkaloid 2 differed with regard to alkaloid 1 in the absence to
298 downfield singlet corresponding to the proton of an iminium salt. Analysis of the ¹³C-NMR
299 and DEPT spectra revealed the presence of one methyl carbons, four methylene carbons, and
300 seven methine carbons. Therefore, alkaloid 2 was identified as 1-*O*-acetyl-lycorine. In the
301 same way, the compound 3 has signals whose displacement is related to alkaloid 1, finding
302 that the difference is produced by the presence of one additional acetate group. ¹H-NMR
303 spectrum of alkaloid 3 exhibited two singlets for two para-located aromatic proton at δH 7.49
304 (H-7) and δH 6.62 (H-10), a methylenedioxy signal at δH 6.62, two singlets at 2.67 and 2.11
305 ppm, which integrate for three protons corresponding to two methyl groups, and a downfield
306 singlet corresponding to the proton of an iminium salt (δH 8.55). Analysis of the ¹³C-NMR
307 and DEPT spectra revealed the presence of two methyl carbons, three methylene carbons,
308 and eight methine carbons. Further analysis of the two and three bond cross-correlations
309 revealed that H-2, H-4a, H-10b, H-11, and H-12 all coupled with C-4. Therefore, alkaloid 3
310 was identified as 1,2-*O*-diacetyl-5,6-dehydrolycorine.

311 **3.4. Acetylcholinesterase inhibition assay**

312 The acetylcholinesterase inhibition curves for *R. speciosum* alkaloid crude and the three
313 isolated lycorine alkaloids are shown in Figure 5, alkaloid 3 and crude alkaloid extract have
314 the same efficacy as the clinical inhibitor galanthamine (IC₅₀ 1.3 μg/mL), however this is
315 more potent than alkaloid 3 (IC₅₀ 17.14 μg/mL) and crude alkaloid extract (IC₅₀ 151.1 μg/mL)
316 respectively. Alkaloid 1 (IC₅₀ 203.5 μg/mL) and alkaloid 2 (IC₅₀ 470.0 μg/mL), presents
317 inhibitory activity on of AChE, but their potency and efficacy are lower than alkaloid 3 and

318 crude alkaloid extract. The alkaloid 1 with two acetylated substituent groups evidently
319 showed greater activity than the other two alkaloids and that the crude alkaloid extract which
320 presented a moderate to good inhibition, this is consistent with that reported by McNulty *et*
321 *al.* [28] and other authors [29, 30].

322 **4. Concluding remarks**

323 Amaryllidaceae species constitute an important source of molecules with enzymatic
324 inhibition and varied biological activity, many of them poorly studied due to the complexity
325 of crude alkaloid extracts. Purification by pH-zone-refining CPC proved to be a useful
326 technique for the isolation of alkaloids at large-scale. Hence, in the present work we achieved
327 the isolation of three lycorine alkaloids in a single step from a complex mixture of
328 isoquinoline alkaloids of *R. speciosum* (Amaryllidaceae), all over 84% purity. In addition,
329 we found that one of these alkaloids shown higher AchE inhibition than the clinically used
330 drug, galanthamine.

331 **ACKNOWLEDGEMENTS**

332 EP wants to acknowledge to CONICYT FONDECYT 1150948; CONICYT FONDEQUIP
333 EQM-150025 and CONICYT PIA/Apoyo CCTE AFB170007 grants. JA want to
334 acknowledge to CONICYT FONDECYT N°1130463 and CONICYT FONDECYT N°
335 1161157. The authors are grateful for an internal grant from the Dirección de Investigación,
336 Universidad del Bio Bio, Chillán, Chile: DIUBB # 083009-2R, # 122509 and # 132209 GI/C.

337 **References**

- 338 1. Baeza C., Mariangel C., Ruiz E., Negritto M. The fundamental karyotype in *Rhodolirium*
339 *speciosum* (herb.) Ravenna and *R. andicola* (Poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana*
340 *Botánica*. 2009; 66(1):99–102.
- 341 2. Moraga-Nicolás F., Jara C., Godoy R., Iturriaga-Vásquez P., Venthur H., Quiroz A.,
342 Becerra J., Mutis A., Hormazábal E. *Rhodolirium andicola*: A new renewable source of
343 alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity, a study from nature to molecular
344 docking. *Brazilian J Pharmacogn*. 2018;28(1):34–43.
- 345 3. Trujillo-Chacón L M., Alarcón-Enos J E., Céspedes-Acuña CL., Bustamante L., Baeza
346 M., López MG., Fernández-Mendivil C., Cabezas F., Pastene-Navarrete E R.
347 Neuroprotective activity of isoquinoline alkaloids from of Chilean Amaryllidaceae plants
348 against oxidative stress-induced cytotoxicity on human neuroblastoma SH-SY5Y cells and
349 mouse hippocampal slice culture. *Food Chem Toxicol*. 2019;132:110665.
- 350 4. Havelek R., Muthna D., Tomsik P., Kralovec K., Seifrtova M., Cahlikova L., Hostalkova
351 A., Safratova M., Perwein M., Rezacova M. Anticancer potential of Amaryllidaceae
352 alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and
353 Ehrlich tumor-bearing mice *Radim*. *Chem Biol Interact*. 2017;275:121–32.
- 354 5. Nair J J., Rarova L., Strnad M., Bastida J., Cheesman L., van Staden J. Crinane Alkaloids
355 of the Amaryllidaceae with Cytotoxic Effects in Human Cervical Adenocarcinoma (HeLa)
356 Cells. *Nat Prod Commun*. 2014;9(4):461–6.
- 357 6. Nair J J., Wilhelm A., Bonnet SL., Van Staden J. Antibacterial constituents of the plant
358 family Amaryllidaceae. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(22):4943–51.

- 359 7. Tallini L R., Bastida J., Cortes N., Osorio E H., Theoduloz C., Schmeda-Hirschmann G.
360 Cholinesterase inhibition activity, alkaloid profiling and molecular docking of Chilean
361 *Rhodophiala* (Amaryllidaceae). *Molecules*. 2018;23(7).
- 362 8. Guo Y., Pigni N B., Zheng Y., De Andrade JP., Torras-Claveria L., De Souza Borges W.,
363 Viladomat F., Codina C., Bastida J. Analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloid profiles
364 in *Lycoris* species by GC-MS. *Nat Prod Commun*. 2014;9(8).
- 365 9. Fang L., Liu Y., Yang B., Wang X., Huang L. Separation of alkaloids from herbs using
366 high-speed counter-current chromatography. *J Sep Sci*. 2011;34(19):2545–58.
- 367 10. Friesen J B., Pauli GF. Rational development of solvent system families in counter-
368 current chromatography. *J Chromatogr A*. 2007;1151(1–2):51–9.
- 369 11. Hu R., Dai X., Lu Y., Pan Y. Preparative separation of isoquinoline alkaloids from
370 *Stephania yunnanensis* by pH-zone-refining counter-current chromatography. *J Chromatogr*
371 *B*. 2010;878(21):1881–4.
- 372 12. Toribio A., Delannay E., Richard B., Plé K., Zèches-Hanrot M., Nuzillard J M., Renault
373 J H. Preparative isolation of huperzines A and B from *Huperzia serrata* by displacement
374 centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A*. 2007;1140(1–2):101–6.
- 375 13. Wang X., Yanling G., Fuwei L., Xingang S., Jianhua L. Large-scale separation of
376 alkaloids from *Corydalis decumbens* by pH-zone-refining counter-current chromatography.
377 *J Chromatogr A*. 2006;1115:267–70.
- 378 14. Kukula-Koch W., Koch W., Angelis A., Halabalaki M., Aligiannis N. Application of pH-
379 zone refining hydrostatic countercurrent chromatography (hCCC) for the recovery of

- 380 antioxidant phenolics and the isolation of alkaloids from *Siberian barberry* herb. Food Chem.
381 2016;203:394–401.
- 382 15. Jiang J., Wang X. Preparative separation of three isoquinoline alkaloids from *Berberidis*
383 *radix* by pH-zone-refining countercurrent chromatography. 2018;24(1):1–7.
- 384 16. Renault J H., Thépenier P., Zèches-Hanrot M., Men-Olivier L L., Durand A., Foucault
385 A., Margraff R. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal
386 partition chromatography. J Chromatogr A. 1997;763(1–2):345–52.
- 387 17. Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-
388 current chromatography. J Chromatogr A. 2005;1065(2):145–68.
- 389 18. Ellman G L., Courtney K D., Andres V., Featherstone R M. A new and rapid colorimetric
390 determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961;7(2):88–95.
- 391 19. Ito Y., Ma Y. pH-zone-refining countercurrent chromatography. J Chromatogr A.
392 1996;753(1):1–36.
- 393 20. Weisz A., Mazzola E P., Murphy C M., Ito Y. Preparative separation of isomeric
394 sulfophthalic acids by conventional and pH-zone-refining counter-current chromatography.
395 J Chromatogr A. 2002;966(1–2):111–8.
- 396 21. Maurya A., Srivastava S K. Large-scale separation of clavine alkaloids from *Ipomoea*
397 *muricata* by pH-zone-refining centrifugal partition chromatography. J Chromatogr B Anal
398 Technol Biomed Life Sci. 2009;877(18–19):1732–6.

- 399 22. Renault J H., Nuzillard J M., Le Crouérou G., Thépenier P., Zèches-Hanrot M., Men-
400 Olivier L L. Isolation of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by centrifugal partition
401 chromatography in the pH-zone refining mode. *J Chromatogr A*. 1999;849(2):421–31.
- 402 23. Kinstle T H., Wildman W C., Brown C L. Mass spectra of Amaryllidaceae alkaloids. The
403 structure of narcissidine. *Tetrahedron Lett*. 1966;(39):4659–66.
- 404 24. Campbell W E., Nair J J., Gammon D W., Bastida J., Codina C., Viladomat F., Smith P
405 J., Albrecht C F. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. *Planta*
406 *Med*. 1998;64(1):91–3.
- 407 25. Tallini L R., De Andrade J P., Kaiser M., Viladomat F., Nair J J., Zuanazzi J A S., Bastida
408 J. Alkaloid constituents of the Amaryllidaceae plant *amaryllis belladonna* L. *Molecules*.
409 2017;22(9).
- 410 26. Feng T., Wang Y-Y., Su J., Li Y., Cai X-H., Luo X-D. Amaryllidaceae alkaloids from
411 *Lycoris radiata*. *Helv Chim Acta*. 2011;94(1):178–83.
- 412 27. Kotera K., Hamada Y., Tori K., Aono K., Kuriyama K. Absolute configurations and the
413 c-ring conformations of lycorine and related compounds evidenced by NMR and CD
414 spectroscopies. *Tetrahedron Lett*. 1966;7(18):2009–20.
- 415 28. McNulty J., Nair J J., Little J R L., Brennan J D., Bastida J. Structure – activity studies on
416 acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorg*
417 *Med Chem Lett*. 2010;20(17):5290-5294.
- 418 29. Nair J J., Van Staden J. Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of
419 Amaryllidaceae alkaloids. *Nat Prod Commun*. 2012;7(7):959-962.
- 420

421 30. Wang Y., Wan Q., Gu C., Luo H., Long C. Synthesis and biological evaluation of lycorine
422 derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.
423 2012;6(1):96.

424

425 **Figure legends**

426 **Figure 1.** Chemical structure of lycorine-type alkaloids (1, 2 and 3) isolated from
427 *Rhodolirium speciosum* and lycorine (4).

428 **Figure 2.** Illustrative pH zone-refinement Centrifugal Chromatography separation of main
429 alkaloids from *Rhodolirium speciosum*. Conditions: stationary phase, the upper phase of
430 MtBE/ACN/W (4: 1: 5, v / v / v); detection, 254 nm; flow-rate, 12 mL/min; revolution speed,
431 1800 rpm, 6 mM formic acid in lower stationary phase and 15 mM TEA in upper phase,
432 sample loading 556.2 mg, stationary phase retention 76%.

433 **Figure 3.** Representative GC-MS analysis of A) crude alkaloids of *Rhodolirium. speciosum*
434 and CPC isolated main compounds. B) Alkaloid 1, C) Alkaloid 2 and D) Alkaloid 3. UV-
435 VIS spectra depicted in the insets were obtained directly from the preparative PDA detector
436 of CPC apparatus.

437 **Figure 4.** Proposed MS fragmentation pattern of the alkaloids isolated from *Rhodolirium*
438 *speciosum*.

439 **Figure 5.** AChE inhibitory activity curves of isolated lycorin derivatives, crude alkaloids and
440 the reference compound galanthamine.

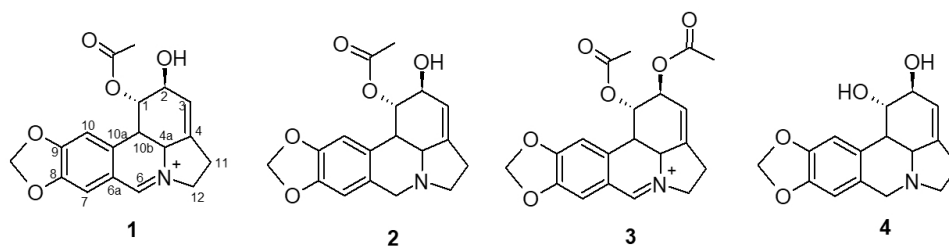


Figure 1. Chemical structure of lycorine-type alkaloids (1, 2 and 3) isolated from *Rhodolirium speciosum* and lycorine (4).

338x190mm (96 x 96 DPI)



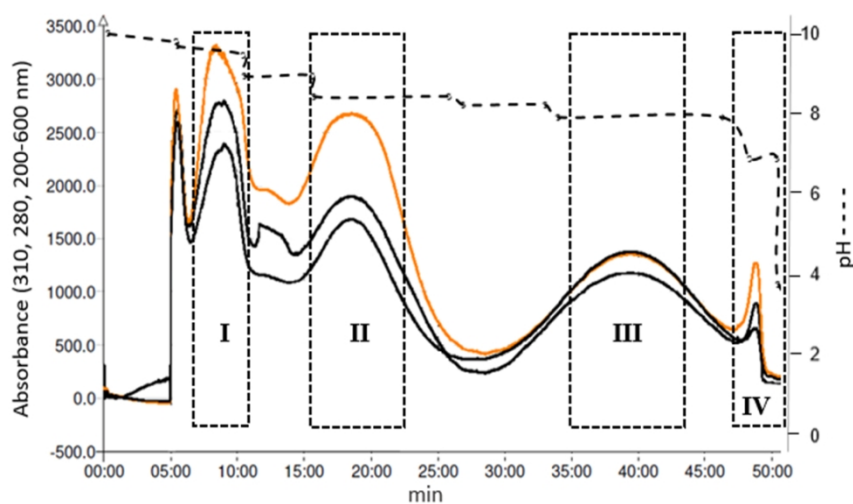


Figure 2. Illustrative pH zone-refinement Centrifugal Chromatography separation of main alkaloids from *Rhodolirium speciosum*. Conditions: stationary phase, the upper phase of MtBE/ACN/W (4: 1: 5, v / v / v); detection, 254 nm; flow-rate, 12 mL/min; revolution speed, 1800 rpm, 6 mM formic acid in lower stationary phase and 15 mM TEA in upper phase, sample loading 556.2 mg, stationary phase retention 76%.

338x190mm (96 x 96 DPI)

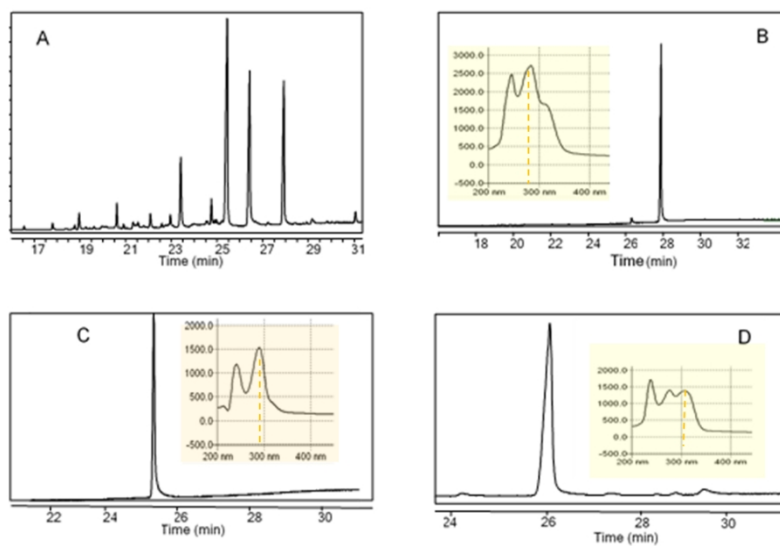


Figure 3. Representative GC-MS analysis of A) crude alkaloids of *Rhodolirium. speciosum* and CPC isolated main compounds. B) Alkaloid 1, C) Alkaloid 2 and D) Alkaloid 3. UV-VIS spectra depicted in the insets were obtained directly from the preparative PDA detector of CPC apparatus.

338x190mm (96 x 96 DPI)



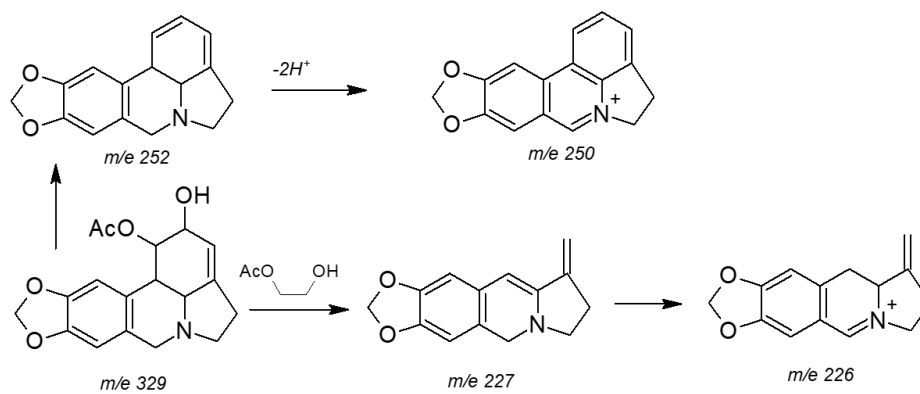


Figure 4. Proposed MS fragmentation pattern of the alkaloids isolated from *Rhodolirium speciosum*.

338x190mm (96 x 96 DPI)



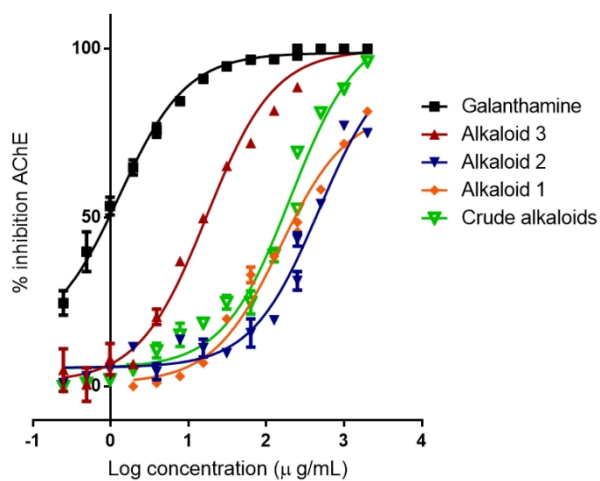


Figure 5. AChE inhibitory activity curves of isolated lycorin derivatives, crude alkaloids and the reference compound galanthamine.

338x190mm (96 x 96 DPI)



Table 1. GC-MS analysis of the alkaloids from *Rhodolirium speciosum*.

Compound	RI	M ⁺	m/z (Relative intensity %)
Lycorine type			
11-12-dehydrolycorene	2365	253(62)	253(62), 252(100), 224(11), 166(7,5), 152(6), 139 (7)
Anhydrolycorine	2508	251(52)	250(100), 251(52), 220(1), 201(37), 192(14), 191(17), 165(6), 124(18)
11,12-Didehydroanhydrolycorine	2610	249(64)	249(64), 248(100), 190(25), 163(9), 123(18), 96(36)
Sternbergine	2716	331(23)	331(23), 270(22), 252(12), 229(82), 228(100)
Lycorine	2749	287(26)	268(16), 250(14), 227(78), 226(100), 211(5), 147(12)
Dihydrolycorine	2791	289(36)	288(97), 272(28), 254(40), 214(25), 200(2), 187(22), 162(15), 147(46)
2-O-Acetyllycorine	2846	329(18)	328(16), 270(42), 269(62), 268(81), 252(43), 250(100), 227(37), 226(67)
Acetyllycorine derivative	2893	331(43)	330(100), 270(25), 149(7)
Lycorine type alkaloid (2)*	2897	330(<1)	330(1), 312(1), 286(1), 270(1), 253(1), 250(1), 226(<1), 174(<1), 162 (1), 150(1), 125(100), 96(40), 83(1)
Lycorine type alkaloid (3)*	2972	370(<1)	280(1), 254(1), 226(1), 178(1), 147(1), 146(1), 150(1), 125(100), 117(1), 108(1), 96(37), 83 (3)
Lycorine type alkaloid (1)*	3045	327(6)	311(1), 285(1), 270(2), 253(3), 226(2), 150(1), 125(100), 108(1), 96(40), 83(7)
Haemanthamine type			
Vittatine	2471	271(82)	272(14), 252(16), 199(89), 187(40), 173(14), 115(22)
8-O-Demethylmaritidine	2517	273(100)	230(5), 202(29), 201(74), 189(10), 175(12), 174(31), 129(13), 128(21), 115(46), 56(13)
Aulicine	2616	304(23)	304(23), 288(47), 233(96), 206(60), 190(30), 175(11), 163(23)
Haemanthamine	2634	301(23)	272(100), 257(12), 240(26), 225(16), 211(24), 181(44), 153(13)
Galanthamine type			
Galanthamine	2406	287(77)	287 (41) 286 (47), 244 (10), 230 (10), 216 (22), 174 (23), 128 (11), 115 (12)
Norlycoramine	2460	275(57)	274(95), 273(51), 202(53), 188(13), 173(20), 160(29), 115(20)
Not identified			
Nerinine type alkaloid (1)	2484	281(1)	271(3), 254(2), 238(1), 207(1), 128(2), 115(2), 109(100), 108(14)
Homolycorene type alkaloid (6)	2401	281(8)	281 (8) 250 (5), 222(4), 147 (23), 129 (100), 112(25), 83 (18), 70 (33), 57(39)
Galanthamine derivate 1	2547	289(97)	289(97), 272(15), 244(10), 230(14), 218(52), 216(17), 174(11), 149(14), 128 (29), 115 (28)
Galanthamine derivate 2	2601	344(100)	345(38), 344(100), 251(2), 248(2), 226(8), 161(7), 147(3), 129(5), 101(6)
Galanthamine derivate 3	2654	306(22)	306(22), 305(100), 290(16), 288(22), 276(27), 248(21), 233(72), 206(47), 175(14)

RI: Values Kovats index. *: isolated alkaloids

Table 2. Different solvent systems used for purification of *Rhodolirium speciosum* alkaloids by pH zone refinement CPC.

#	Solvent Systems ^a	Retentor (TEA)	Displacer (acid)
1	<i>n</i> -Hept/EtOAc/ <i>n</i> -PrOH/W	15 mM	HCl 6 mM
2	<i>n</i> -Hept/EtOAc/ <i>n</i> -PrOH/W	15 mM	Acetic acid 6 mM
3	<i>n</i> -Hept/EtOAc/ <i>n</i> -PrOH/W	15 mM	Formic acid 3 mM
4	MtBE/ACN/W	12 mM	Formic acid 6 mM
5	MtBE/ACN/W	15 mM	Formic acid 3 mM

^a *n*-Hept: *n*-heptane; EtOAc: ethyl acetate; *n*-PrOH: *n*-propanol; W: water; MtBE: Methyl terbutyl ether; ACN: acetonitrile.



Table 3. Partition coefficients of alkaloids 1 and 2 using pH zone-refinement CPC with the solvent system *n*-Hept/EtOAc/*n*-PrOH/H₂O (10:30:15:45 v/v) and different concentrations of acid and TEA.

	Alkaloid 1	Alkaloid 2
K_D	0,64	0,40
K_{basic} (15 mM TEA)	0,50	0,20
K_{acid} (3 mM formic acid)	24,42	4,38
K_{acid} (6 mM Acetic acid)	30,79	7,39



Table 4. Partition coefficients, purity and yields of compounds 1-3 using pH zone-refinement CPC with the solvent system MtBE/ACN/W, 6 mM formic acid and 16 mM TEA

	Alkaloid 1	Alkaloid 2	Alkaloid 3
K_D	2,99	12,24	1,42
K_{acid}	33,76	48,65	12,52
K_{base}	1,35	0,74	0,43
Dry weight (mg)	65,7	50,1	12,3
Purity (%)	88,2	97,7	84,4
Yield (%)	11,8	9,0	2,21



Table 5. ^1H and ^{13}C -NMR data of alkaloids 1, 2, and 3 (J in Hz) in CDCl_3 .

Position	1		2		3	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ	δ
1	4.66 bs	66.41	5.93 bs	67.50	4.62 s	66.8
2	4.40 bs	80.48	4.15 bs	81.56	4.38 s	
3	5.83 s	119.28	5.58 s	120.05	5.77 s	120.1
4	-	152.68	-	141.98	-	151.7
4a	2.90 d (10)	60.62	2.75 d (10)	66.42	3.90 d (10)	60.7
6α	8.47 s	168.15	4.23 d (13)	56.4	8.55 s	164.7
6β	-		3.70 d (14)	-	-	
6a	-	139.73	-	138.4	-	139.2
7	7.07	109.64	6.96 s	110.08	7.01	109.8
8	-	145.55	-	152.05	-	146.2
9	-	143.48	-	148.20	-	143.1
10	7.51	103.45	7.50 s	108.74	7.49 s	102.9
10a	-	136.93	-	118.5	-	136.5
10b	2.99 bd (10.7)	43.00	2.87 d (10)	42.79	2.99	42.8
11 α,β	2.66 m	27.60	2.77 s	27.46	2.85	27.6
12 α	2.53 dd (15.1, 9.0)	55.77	3.24 m	55.59	3.75	56.1
12 β	3.49 m	-	-	-	-	-
O-CH₂-O	6.11 d (1.2)	101.9	6.10 d (1.1)	102.26	6.05 bs	102.2
O-CO-CH₃	2.30 s	39.66	2.07 s	37.55	2.67	20.9
		161.33		164.38		169.7
O-CO-CH₃					2.11	21.1
						170.0