



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
Dirección De Postgrado
Facultad De Ciencias Forestales
Programa de Magíster en Ciencias Forestales

“DETERMINACIÓN DE BOLDINA EN CULTIVOS CELULARES DE *PEUMUS BOLDUS* MEDIANTE ATR-FTIR APOYADO CON MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES”

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales

Bastian Andrés Bucarey Soto

CONCEPCIÓN- CHILE

2024

Profesor Guía: Dr. Rodrigo Hasbún Z.
Depto. de Silvicultura
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

DETERMINACIÓN DE BOLDINA EN CULTIVOS CELULARES DE *PEUMUS BOLDUS* MEDIANTE ATR-FTIR APOYADO CON MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES.

Comisión Evaluadora:

Rodrigo Hasbún Zaror (Profesor guía)

Ingeniero Forestal, Dr. _____

Narciso Aguilera Marin (Profesor co-guía)

Ingeniero Agrícola, Dr. _____

Rosario Castillo Felices (Integrante de la comisión)

Bach. Ciencias Químicas, Dra. _____

Elvis Gavilán Gutiérrez (Integrante de la comisión)

Licenciado en Matemática, Dr. _____

José Becerra Allende (Integrante de la comisión)

Químico Farmacéutico, Dr. _____

Juan Araya Quintana (Integrante de la comisión)

Bioquímico, Dr. _____

Director de Postgrado:

Vicente Hernández Castillo.

Construcción Industrializada en Madera, Dr. _____

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Rodrigo Hasbún, quien durante más de seis años me ha enseñado y aportado significativamente en mi formación como profesional. Su guía y apoyo incondicionales han sido fundamentales en este proceso.

Del mismo modo, agradezco al Dr. Narciso Aguilera, a la Dra. Luvia Guedes y al Dr. Adrian Garrido, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudar y aclarar mis dudas, brindándome su conocimiento y tiempo generosamente.

Mi gratitud también se extiende a la Dra. Rosario Castillo, quien fue clave para que pudiera realizar una pasantía en España. Gracias a la cual conocí a personas increíbles y viví experiencias que enriquecieron mi desarrollo profesional y personal.

A mis amigos cercanos, les agradezco por su constante apoyo y tenerme paciencia para recordarme siempre las cosas que se me olvidaban. En particular, a mi amiga Lorena Rodríguez, quien desde pregrado hasta postgrado siempre me ayudó con distintas materias y estuvo a mi lado en todo momento.

Un agradecimiento especial a mi madre, Paola Soto, por todo lo que ha hecho por mí. Gracias a ella estoy donde estoy hoy. Su amor y sacrificio han sido mi mayor motivación.

También quiero agradecer a mi novia, Victoria Rojas, por su apoyo incondicional durante todo este proceso. Su motivación y aliento me han impulsado a seguir esforzándome cada día más.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que, aunque no he mencionado aquí, fueron claves en mi proceso. Y, por último, me agradezco a mí mismo por la perseverancia y dedicación en la culminación de esta etapa tan importante de mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	5
INDICE DE ILUSTRACIONES	7
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
II INTRODUCCION	12
III MATERIALES Y METODOS	28
3.1 Obtención del Material Vegetal	28
3.2 Extracción de compuestos.....	29
3.3 Cuantificación HPLC-DAD y detección por LS-MS.....	31
3.4 Adquisición de espectros.....	32
3.5 Preprocesado espectral.....	33
3.6 Eliminación de Valores Atípicos	34
3.7 Validación y predicción del modelo.....	35
IV RESULTADOS	36
4.1 Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	36
4.2 Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC).....	37
4.3 Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LS-MS).....	41
4.4 Caracterización de la Huella Dactilar Molecular de Boldina mediante ATR-FTIR.....	42
4.5 Análisis ATR-FTIR de Extractos Metanólicos	44
4.6 Calibración y desarrollo del modelo PLS	46
4.7 Análisis de muestras alteradas	51
Análisis de modelo de muestras totales	52
4.7 Cuantificación de boldina.....	54
V DISCUSION	56
VI CONCLUSIONES	59
VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de alcaloides en solventes alcohólicos y NADES ...	17
Tabla 2. Muestras entregadas para su posterior análisis mediante HPLC y FTIR.	28
Tabla 3. Selección de preprocesamiento y transformaciones aplicados a la data espectral de extractos de líneas celulares para PLS	34
Tabla 4. Comparación de concentración de boldina entre NADES y Metanol. Callo Lee, clon 7 y 6, son distintos cultivos celulares de boldo.....	40
Tabla 5. Bandas intensas en el espectro ATR-FTIR asociadas a los grupos funcionales de la boldina	43
Tabla 6. En la tabla se presentan los resultados más destacados de la evaluación de modelos PLS mediante cinco tratamientos y preprocesamientos distintos aplicados a los datos espectrales de los extractos metanólicos de <i>Peumus</i> <i>boldus</i> . Los parámetros evaluados incluyen el Error Cuadrático Medio de Calibración (RMSEC), el Error Cuadrático Medio de Validación Cruzada (RMSECV), y los coeficientes de determinación de Calibración (R^2C) y Validación Cruzada (R^2CV).	47
Tabla 7. Resultados obtenidos al evaluar diversos rangos de espectro para la cuantificación de boldina en extractos metanólicos. Se incluyen los valores del Error Cuadrático Medio de Calibración (RMSEC) y de Validación Cruzada (RMSECV), así como los coeficientes de determinación de Calibración (R^2C), Validación Cruzada (R^2CV) y Variables latentes (LVs).....	49
Tabla 8. Concentraciones esperadas y los resultados obtenidos mediante HPLC de 10 muestras seleccionadas al azar, expresados en mg/L. Los errores relativos entre las concentraciones esperadas y las obtenidas por HPLC.	52
Tabla 9. Valores del modelo PLS para la cuantificación de boldina en extractos metanólicos.....	53

Tabla 10. Valores correspondientes a la validación del modelo PLS. **A)** corresponde a la predicción de las 15 muestras que no estaban en el modelo, mientras que Validación **(B)** corresponde a la predicción de las 30 muestras obtenida por otro HPLC.....54

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Cromatogramas HPLC-PDA de los alcaloides de hojas de <i>Peumus boldus</i> extraídos con diferentes solventes NADES (Fuente: Torres-Vega et al., 2020).....	18
Figura 2. (A) Representación esquemática de la estructura molecular de la boldina, resaltando sus grupos funcionales clave. El grupo éter se indica en un cuadrado rojo, el grupo fenol en azul y el grupo amina en verde. (B) Lista de las principales bandas de espectroscopía de infrarrojos.....	20
Figura 3. Espectros infrarrojos teóricos y experimentales de indapamida en diferentes solventes (Fuente: Bolukbasi Yalcinkaya et al., 2020).	23
Figura 4. Los espectros infrarrojos de metacrilato de etilo (EMA) en solventes alcohólicos. (Fuente: Ji et al., 2011).	23
Figura 5. Correlación entre concentraciones determinadas y predichas de componentes bioquímicos en la región de huella dactilar por espectros FTIR utilizando modelos PLS. R ² representa el coeficiente de determinación de la regresión lineal. Los símbolos blancos indican los puntos de datos del conjunto de calibración; los símbolos negros indican los puntos de datos del conjunto de validación externa. (Fuente: Ferro et al., 2019).	25
Figura 6. Esquema representativo del procedimiento de extracción utilizando NADES y extracción con metanol (98%) para la obtención de compuestos de interés.	30
Figura 7. Cromatografía de capa fina (TLC) de extractos metanólicos de líneas celulares de <i>Peumus boldus</i> . B representa la boldina, mientras que C1, C2, C3 y C4 indican los extractos metanólicos de diferentes líneas celulares de boldo	37
Figura 8. Cromatogramas obtenidos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a un detector de matriz de diodos (HPLC-DAD). En la Figura 1a se muestra el cromatograma de un extracto metanólico de líneas celulares de <i>Peumus boldus</i> . La Figura 1b representa el cromatograma de	

boldina pura como estándar. Los ejes están etiquetados con la intensidad de la señal en unidades arbitrarias (AU) en el eje Y y el tiempo de retención en minutos en el eje X.....38

Figura 9. Curva de calibración generada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), abarcando un rango lineal de respuesta desde 3,9 hasta 40 mg/L. En el gráfico, el eje Y representa el área, mientras que el eje X muestra las concentraciones de la muestra en mg/L39

Figura 10. Resultados de Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LS-MS). En **(A)** se muestran los cromatogramas de una muestra de extracto metanólico de líneas celulares de boldo. El cromatograma de la muestra se representa en verde, mientras que el de la boldina estándar, esencial para su identificación en el extracto, se muestra en rojo. El eje Y indica la intensidad multiplicada por 10^6 para reflejar la magnitud de la señal de detección, y el eje X muestra el tiempo en minutos, representando el tiempo de retención de los compuestos en la cromatografía. En **(B)** se observa la "vista del espectro" de la boldina de los extractos. La **primera figura** muestra la intensidad en unidades de absorbancia miliar (mAU) a 217 nm y 282 nm en el eje Y, y la masa sobre carga (m/z) en el eje X. La **segunda figura** muestra la intensidad multiplicada por 10^5 en el eje Y y la masa sobre carga (m/z) en el eje X, que indica la relación entre la masa y la carga de los iones detectados en el espectrómetro de masas. 42

Figura 11. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR) de boldina pura. El análisis revela las características bandas de absorción asociadas a los grupos funcionales presentes en la molécula de boldina. El eje Y representa las unidades en absorbancia y el eje X las longitudes de onda en cm^{-1}43

Figura 12. Espectro ATR-FTIR de extractos metanólicos de líneas celulares de *Peumus boldus*, destacando características asociadas a la presencia de boldina. El eje Y muestra la absorbancia y el eje X las longitudes de onda.....45

Figura 13. Comparación de los diferentes tratamientos aplicados en el preprocesamiento de los datos espectrales, evaluando diversas combinaciones

de técnicas como la normalización estándar de variante (SNV), centrado a la media (MC), primera derivada, segunda derivada y suavizado. En el eje Y se encuentra las variables latentes, por su parte en el eje X se encuentra valores de la validación cruzada (R2 CV).46

Figura 14. Representación de seis modelos de cuantificación de boldina en extractos metanólicos de *Peumus boldus* utilizando diferentes rangos de espectro: **(A)** C-C Estiramiento aromático 1570 - 1650, **(B)** C=C Estiramiento aromático 1614 - 1598, **(C)** C-N Bandas 844 - 702, **(D)** C-O Bandas 1247 - 844, **(E)** C-H Bandas 904 – 800 y **(F)** rango completo de la huella dactilar de la boldina (1700 a 700 cm⁻¹). La línea roja representa el ajuste del modelo (Fit), la línea verde 1:1 indica una correlación perfecta entre los valores predichos y reales, y los puntos "Y CV predicted" muestran las predicciones obtenidas a través de validación cruzada50

Figura 15. Representación del modelo de cuantificación de boldina en extractos metanólicos. La línea roja representa el ajuste del modelo (Fit), la línea verde 1:1 indica una correlación perfecta entre los valores predichos y reales, y los puntos "Y CV predicted" muestran las predicciones obtenidas a través de la validación cruzada53

Figura 16. Validaciones del modelo PLS para la predicción de boldina. La línea roja representa el ajuste del modelo (Fit), mientras que la línea verde 1:1 indica una correlación perfecta entre los valores predichos y reales. Los puntos "Y CV predicted" muestran las predicciones obtenidas a través de la validación cruzada. Validación **(A)** corresponde a la predicción de las 15 muestras que no estaban en el modelo, mientras que Validación **(B)** corresponde a la predicción de las 30 muestras obtenidas por otro HPLC.55

RESUMEN

Los cultivos celulares ofrecen una alternativa prometedora para la producción de boldina y otros alcaloides a partir de *Peumus boldus* (boldo), pero se requieren herramientas complementarias para aumentar el rendimiento y estandarizar la producción. La espectrometría es una herramienta poderosa para el análisis de compuestos bioactivos pero no ha sido explorada en boldo. El objetivo de este estudio fue diseñar un modelo de predicción de la concentración de boldina en una matriz compleja de compuestos extraídos por un solvente a partir de celulares. Para ello, se analizaron utilizando HPLC para obtener las concentraciones reales y la variable dependiente, datos fundamentales para diseñar y entrenar el modelo. Los mejores rendimientos en la extracción de la boldina se obtuvieron con metanol. Se empleó ATR-FTIR para obtener los espectros, sobre los cuales se aplicó una regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). De esta manera, el modelo alcanzó una precisión en la predicción entre el 95.1% y 94.8% en una data externa. Los espectros infrarrojos revelaron que el grupo amino y éter presentes en la boldina son responsables de las características espectrales relevantes, no obstante, la huella dactilar de la boldina (1700 – 700 cm^{-1}) entregó los mejores resultados. En conclusión, los espectros infrarrojos obtenidos de extractos metanólicos de cultivos celulares de *Peumus boldus*, tratados con métodos quimiométricos, permiten predecir la concentración de boldina con un alto nivel de precisión. Estos modelos serán útiles para acelerar los procesos de optimización de producción de boldina mediante cultivos celulares a nivel industrial.

ABSTRACT

Accurate prediction of boldine alkaloid concentration is essential to improve production and optimisation in cell cultures of *Peumus boldus*. In Chile, extraction of boldine from leaves threatens the existence of this vulnerable native species. Cell cultures offer a promising alternative, showing potential for alkaloid production, but require optimisation for proper selection of yield strategies and standardisation of production. The aim of this study was to design an optimal model predicting boldine concentration in a complex matrix of methanol-extracted compounds in cell callus. For this purpose, *Peumus boldus* cell cultures were freeze-dried and extracted in methanol. Subsequently, they were analysed using HPLC to obtain real concentrations and the dependent variable, fundamental data to design and train the model. ATR-FTIR was used to obtain the spectra, on which a partial least squares (PLS) regression was applied. In this way, the model achieved a prediction accuracy between 95.1% and 94.8% on external data. The infrared spectra revealed that the amino and ether groups present in boldine are responsible for the relevant spectral features, however, the boldine fingerprint (1700 - 700 cm^{-1}) gave the best results. In conclusion, infrared spectra obtained from methanolic extracts of *Peumus boldus* cell cultures, treated with chemometric methods, allow predicting boldine concentration with a high level of accuracy. These models could be useful to standardise optimisation processes and boldine production at industrial level.

II INTRODUCCION

Los metabolitos secundarios o especializados de las plantas son los principales compuestos naturales utilizados como principios activos en productos medicinales. Estos se producen en cantidades limitadas y de manera no uniforme en los órganos vegetales, siendo moléculas pequeñas que desempeñan roles clave en la modulación del metabolismo y la interacción con el entorno (García y Carril, 2011; Harborne, 2014). A menudo, no son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero sí para su adaptación, protección y comunicación (Seigler, 1998). Por ende, diferentes plantas poseen diversas cualidades químicas, algunas de las cuales pueden ser perjudiciales, mientras que otras son beneficiosas para la salud humana. La extracción de constituyentes fitoquímicos como fenoles, alcaloides, terpenoides y glucósidos de diversas partes de las plantas (hojas, tallos, frutos, semillas, raíces, etc.) es una etapa crucial para la caracterización y utilización de productos naturales (Drew y Demain, 1977). Las características farmacológicas de los productos naturales de las plantas medicinales están estrechamente ligadas a la actividad biológica de sus compuestos activos (Azcon-Bieto y Talón, 2003). Entre los compuestos activos más destacados se encuentran los alcaloides, que presentan una amplia variedad de estructuras químicas, lo que explica la diversidad de actividades farmacológicas que pueden exhibir. Por ejemplo, la morfina, un alcaloide aislado de las cápsulas de la adormidera de opio (*Papaver somniferum*), tiene la capacidad de deprimir el sistema nervioso central y producir una fuerte analgesia (Cowan, 1999). Otro alcaloide conocido es la vinblastina extraída de *Catharanthus roseus*, que tiene la capacidad de retardar e incluso detener el desarrollo de células cancerosas (Barrales-Cureño *et al.*, 2019). Por lo tanto, es crucial reconocer especies vegetales con alcaloides beneficiosos, que puedan ser extraídos para fomentar un mayor desarrollo de productos farmacológicos a partir de compuestos naturales. A pesar de que la utilización de ciertas plantas en

la medicina ha estado presente desde los inicios de nuestra civilización, solo en el último siglo se ha profundizado en el estudio de la amplia gama de productos que pueden derivarse de los compuestos naturales (Heinrich *et al.*, 2019; Simmonds, 2020). Esto ha despertado el interés de industrias farmacéuticas, cosméticas, alimenticias, entre otras (Gurib-Fakim, 2006), generando un interés mundial en utilizar productos naturales de plantas, lo que ha provocado un aumento en la demanda comercial. El incremento en la demanda ha conducido a la sobreexplotación de plantas medicinales, lo que plantea un grave riesgo en especies vegetales de crecimiento lento y regeneración limitada. Como alternativa, se presenta la tecnología de cultivo de células vegetales como una opción favorable para la producción de metabolitos vegetales, ya que ofrece diversas ventajas respecto a la extracción de metabolitos de plantas silvestres. Varios autores han demostrado su potencial para la producción industrial, destacando su velocidad de crecimiento superior a la de los órganos tradicionales como hojas, raíces y brotes, así como la posibilidad de desarrollar cultivos con densidades celulares más altas, lo que facilita el control y manipulación de procesos a escala industrial (Chintalwar *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2010). Además, el cultivo de células vegetales a gran escala no conlleva preocupaciones ambientales significativas, ya que se trata de un recurso renovable y respetuoso con el medio ambiente, lo que resulta crucial dada la creciente demanda de compuestos naturales y el impacto que conlleva en los recursos naturales arbóreos (Ratnadewi, 2017).

En Chile se registran un total de 5.739 especies vegetales, de las cuales 2.628 (45,8%) son nativas (Rodríguez *et al.*, 2018). De estas plantas, 103 han sido certificadas como medicamentos herbarios por el Ministerio de Salud y están aptas para la comercialización (Ministerio de Agricultura, 2022). Entre estas especies se destaca el boldo (*Peumus boldus*), objeto de numerosos estudios

sobre sus propiedades medicinales y su principal metabolito, la boldina (Klimaczewski *et al.*, 2014). A pesar de ello, existen limitadas investigaciones para garantizar una producción sostenible de esta especie, lo cual es preocupante debido a su escasa regeneración natural y problemas de germinación (García R *et al.*, 2010). Se estima que se requieren aproximadamente 500 o más semillas para obtener 100 plantas de boldo. Además, la extracción no controlada de hojas y la prácticamente nula regeneración natural de la especie ponen en peligro al boldo y afectan negativamente el creciente mercado de la boldina (Fuentes-Barros *et al.*, 2018).

Una alternativa prometedora para la producción de boldina a escala industrial es la tecnología de cultivos celulares de boldo, concebida como una "fábrica biológica" para la producción de metabolitos de alta calidad en condiciones altamente controladas. Para poder avanzar en el desarrollo de esta tecnología, surge la necesidad de una mayor optimización y monitoreo (Reyes *et al.*, 2022; Abu-Absi *et al.*, 2014). En el caso del boldo, sería esencial conocer el momento preciso en el cual se sintetiza la mayor cantidad de boldina en los cultivos celulares para garantizar un proceso productivo eficaz y eficiente. Si el metabolito no es liberado de las células, es fundamental implementar técnicas de aislamiento mediante solventes de extracción para controlar, monitorear y evaluar el rendimiento de los metabolitos en los cultivos celulares. Sin embargo, si es posible percibir el metabolito directamente en el medio de cultivo, se pueden utilizar métodos de medición directa, como sensores en línea y técnicas de espectroscopia, que permiten un monitoreo continuo sin la necesidad de aislamiento (Abu-Absi *et al.*, 2010; Hertig *et al.*, 2015). La extracción de metabolitos desempeña un papel crucial en la determinación de la calidad y productividad en las técnicas basadas en cultivo celular, ya que estos procedimientos aseguran que los compuestos obtenidos mantengan su

integridad y concentración óptima para su posterior uso y análisis (Martin y Rose, 1976).

La extracción de alcaloides mediante solventes específicos ha sido la técnica predominante para el aislamiento en plantas (Adejoke *et al.*, 2019). Es esencial tener en cuenta que los rendimientos de los extractos vegetales están estrechamente relacionados con la naturaleza del solvente de extracción, debido a sus diversas características químicas y polares. Por lo tanto, no existe un solvente universalmente definido para una especie vegetal específica; todo dependerá de la naturaleza química del compuesto que se pretende extraer (Sultana *et al.*, 2009). Los métodos de extracción más comunes para alcaloides son los solventes polares (como metanol, etanol, acetona y agua) y a pesar de que muchos de estos solventes tienen su origen en fuentes naturales, el proceso de extracción presenta numerosas desventajas para la salud humana y el medio ambiente (Pena-Pereira *et al.*, 2015). Como alternativa, se han explorado nuevas técnicas denominadas disolventes eutécticos profundos (DES), que suelen ser menos tóxicos y pueden incluir tantos compuestos sintéticos y orgánicos (Abbott *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012). Estos compuestos pueden ser azúcares simples (como sacarosa, glucosa y fructosa), ácidos orgánicos (como ácido málico, cítrico y láctico), aminoácidos (como prolina y glicina) o compuestos de amonio cuaternario (como colina y betaína), que suelen concentrarse dentro o alrededor de las vesículas en células vegetales y forman parte del metabolismo primario. Por lo tanto, se postula que los DES formados dentro de la célula vegetal desempeñan un papel central en la mejora de la solubilidad de las moléculas insolubles en agua, como la lignina, los terpenos y diversos tipos de compuestos (Zhang *et al.*, 2012). Se ha propuesto que al combinar algunos de estos compuestos en proporciones específicas, se pueden generar líquidos viscosos

conocidos como disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) (Dai *et al.*, 2013).

NADES son líquidos formados de metabolitos primarios unidos entre sí por interacciones intermoleculares fuertes, en particular enlaces de hidrógeno, que dan lugar a líquidos viscosos altamente estructurados, lo que explica sus propiedades físicas específicas y su diferente comportamiento de solubilización en comparación con los disolventes convencionales como el agua y los alcoholes (Liu *et al.*, 2018). Debido a esto, es que han demostrado presentar ventajas sobre los solventes convencionales comúnmente utilizados para extraer metabolitos secundarios; por ejemplo, tiene una volatilidad despreciable, viscosidad ajustable y alta solubilización (Choi *et al.*, 2011). Desde el punto de vista ambiental y económico, también presentan importantes ventajas en cuanto a su biodegradabilidad, sostenibilidad, bajo coste y sencilla preparación. Todas estas propiedades sugieren su gran potencial para la extracción de productos naturales y sus posibles aplicaciones para alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos (Dai *et al.*, 2013).

El uso de NADES en la extracción de alcaloides aún está en una etapa temprana, y existe pocos reportes de comparación con los métodos tradicionales (Khan *et al.*, 2023; Ivanović *et al.*, 2020; Funari *et al.*, 2019). Sin embargo, algunos autores han demostrado buenos rendimientos utilizando este solvente natural (Tabla 1). Se ha observado que los NADES basados en cloruro de colina y ácido láctico son superiores en un rango que va desde el 28% hasta el 80% para la extracción de alcaloides derivados del morfinano y protoberberina (Jiang *et al.*, 2019). En otro estudio, se emplearon distintos NADES para la extracción de alcaloides de Amarillydaceae (Takla *et al.*, 2018). Estos investigadores informaron que los NADES que mostraron mayor eficiencia en la extracción de crinina y crinamina

fueron aquellos derivados del cloruro de colina: fructosa y H₂O (35%). Un estudio reciente abordó la extracción de alcaloides y polifenoles de *Peumus boldus* utilizando diferentes NADES (Torres-Vega *et al.*, 2020). Los resultados indicaron que el NADES (prolina-ácido oxálico) permitía una extracción más efectiva de boldina en las hojas de boldo en comparación con las extracciones realizadas con metanol (Figura 1). Esto evidencia que diversos NADES presentan un rendimiento de extracción superior y cierta especificidad hacia ciertos tipos de metabolitos secundarios. En particular, el NADES-6 mostró un mayor rendimiento en la extracción de boldina, esto es relevante para futuras investigaciones en el desarrollo de herramientas de monitoreo y control.

Tabla 1. Concentraciones de alcaloides en solventes alcohólicos y NADES

Material Vegetal	Alcaloides	HPLC (Alcohol)	HPLC (NADES)	Referencia
Hierbas medicinales secas	Epiberberina	~0,52 (g/100g)	~2,75(g/100g)	(Jiang <i>et al.</i> 2019)
Hierbas medicinales secas	Sinomenina	~1,48 (g/100g)	~1,92(g/100g)	(Jiang <i>et al.</i> 2019)
Hierbas medicinales secas	Berberina	~3.9 (g/100g)	~8.2(g/100g)	(Jiang <i>et al.</i> 2019)
Bulbos de Crinum	Crinina	0,033 (mg/ml)	0,563(mg/ml)	(Takla <i>et al.</i> 2018)
Bulbos de Crinum	Crinamina	0,047 (mg/ml)	0,438(mg/ml)	(Takla <i>et al.</i> 2018)
Hojas de boldo	Boldina	0,97 (mg/g)	2,36 (mg/g)	(Torres-Vega <i>et al.</i> 2020)

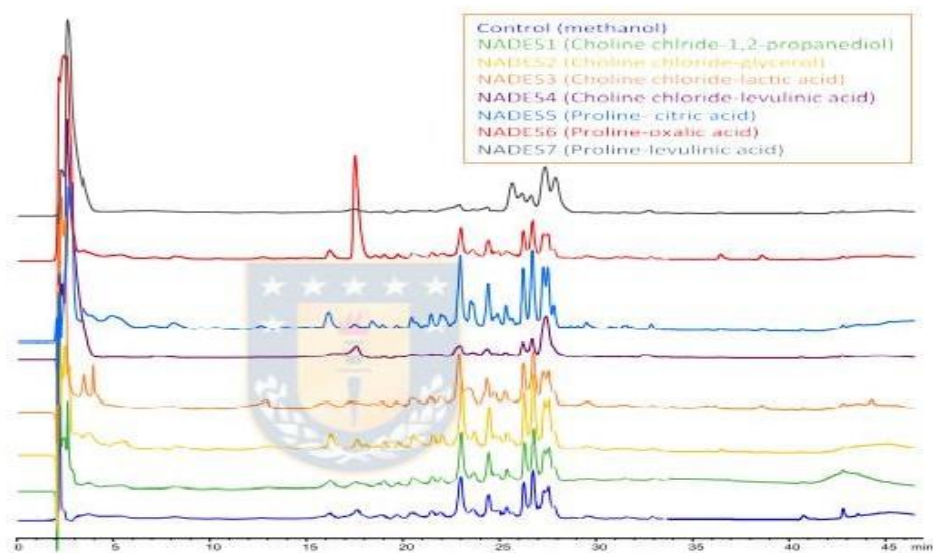


Figura 1. Cromatogramas HPLC-PDA de los alcaloides de hojas de *Peumus boldus* extraídos con diferentes solventes NADES (Fuente: Torres-Vega *et al.*, 2020).

El control de compuestos como los alcaloides, en los cultivos celulares a menudo puede considerarse subóptimo. Por lo general, solo algunos parámetros, como el pH, el O₂ y la temperatura, se controlan en línea; toda la información adicional requerida debe obtenerse mediante el análisis de muestras individuales. Los ensayos típicos a menudo se basan en reacciones enzimáticas o técnicas de separación como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que por lo general genera buenos resultados, pero es poco escalable debido a los largos tiempos de análisis (Mazarevica *et al.*, 2004). Alternativamente, se están adoptando cada vez más las técnicas espectroscópicas vibratorias que garantizan soluciones rápidas y convenientes a ciertos problemas de análisis. Una variedad de sustancias se puede caracterizar, identificar y también cuantificar rápidamente en paralelo a partir de espectros de la muestra (Gillie *et*

al., 2000). La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es un método confiable y bien reconocido para una combinación analito-matriz compleja, como la que se produce en los cultivos celulares. Esta técnica, aprovecha las interacciones entre la radiación infrarroja y las moléculas presentes en una muestra para generar un espectro característico que proporciona información sobre la composición química de la muestra (Zanyar Movasaghi y Rehman, 2008). Esta técnica ha demostrado ser especialmente útil en el análisis de muestras biológicas complejas, como cultivos celulares, debido a su capacidad para proporcionar resultados rápidos y no destructivos (Vitale *et al.*, 2013).

En la espectroscopia infrarroja se encuentra la "huella dactilar" en el rango medio (MIR), la cual se refiere al patrón único de absorción y emisión de la luz infrarroja asociado con las vibraciones moleculares específicas de una sustancia (Jinyi *et al.*, 2019; Paterova *et al.*, 2022). En el caso del alcaloide boldina su huella dactilar está intrínsecamente vinculada a las vibraciones características de los enlaces químicos presentes en su estructura molecular. Molecularmente, la boldina presenta diversos grupos funcionales, siendo uno de ellos el grupo éter, que se caracteriza por la presencia de un átomo de oxígeno vinculado a dos átomos de carbono (Chemistry LibreTexts, 2022; PubChem, 2022). Este grupo confiere propiedades específicas a la molécula, tales como reactividad y características espectroscópicas distintivas en el rango infrarrojo. Adicionalmente, la boldina contiene el grupo funcional amina, que incorpora nitrógeno en su estructura molecular. Las vibraciones correspondientes a los enlaces N-H y C-N en el rango infrarrojo contribuyen de manera significativa a la huella dactilar de la boldina (Chemistry LibreTexts, 2022; IR Spectroscopy: Amines, 2022). Por último, en la estructura molecular se destaca la presencia del grupo funcional fenol,

caracterizado por un anillo bencénico con un grupo hidroxilo (-OH) unido (PubChem, 2022) (figura 2).

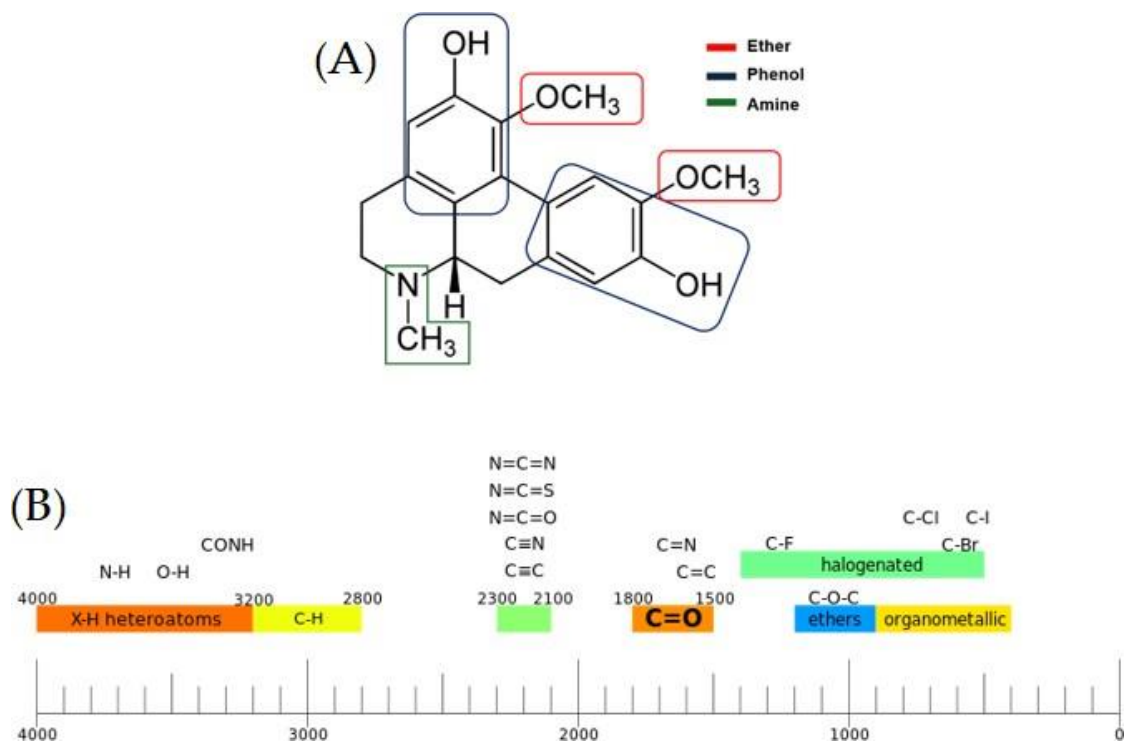


Figura 2. (A) Representación esquemática de la estructura molecular de la boldina, resaltando sus grupos funcionales clave. El **grupo éter** se indica en un cuadrado rojo, el **grupo fenol** en azul y el **grupo amina** en verde. **(B)** Lista de las principales bandas de espectroscopía de infrarrojos.

Dentro de la huella dactilar del infrarrojo medio, las bandas intensas asociadas a los grupos funcionales y compuestos moleculares específicos de la boldina se ubican en rangos característicos. Para el grupo éter, la absorción de la luz infrarroja ocurre generalmente entre 1247 y 844 cm⁻¹. En el caso del grupo funcional amina, las vibraciones correspondientes al enlace C-N se manifiestan

típicamente en el rango de 4000 a 3200 cm^{-1} , pero se han visto estiramientos en rangos de 844 a 702 cm^{-1} complementarios al rango típico (Gomathi *et al.*, 2014). Por último, la presencia del grupo funcional fenol se refleja en bandas de absorción entre 1614 y 1598 cm^{-1} , atribuidas a las vibraciones del anillo bencénico.

A la espectroscopia FTIR se le puede acoplar una reflexión total atenuada (ATR) que ofrece ventajas adicionales sobre el HPLC en términos de tiempo y simplicidad de análisis (Estupiñán Méndez y Allscher, 2022). Una vez que se ha establecido un método, permite ensayos de compuestos relativamente rápidos, donde el análisis cuantitativo alternativo (p. ej., métodos de HPLC) puede requerir mucho tiempo. La técnica ATR-FTIR permite el análisis directo de muestras en estado sólido o líquido sobre la superficie de un cristal óptico, eliminando la necesidad de preparación de muestras y reduciendo los tiempos de análisis. Esta capacidad de análisis rápido y simplificado convierte a la espectroscopia FTIR y ATR en herramientas valiosas para el monitoreo eficiente de la concentración de compuestos en cultivos celulares (Vitale *et al.*, 2013). Esto se logra al recolectar la radiación reflejada desde la superficie interfacial entre la solución acuosa y un elemento de reflexión, como un cristal ATR. En este cristal, las ondas evanescentes emanan y penetran en la solución acuosa, donde son absorbidas por las sustancias presentes (Otto, 1968). Además, se genera suficiente información para desarrollar modelos predictivos que determinen compuestos para la optimización de procesos en los cultivos celulares. Varios estudios han confirmado la eficacia de la espectroscopia ATR-FTIR para la cuantificación de compuestos en cultivos celulares. Por ejemplo, investigaciones realizadas por Tiernan *et al.*, (2020) y Nunes *et al.*, (2020) han demostrado la capacidad de esta técnica para monitorear cambios en la concentración de metabolitos en cultivos celulares de manera rápida y precisa, ofreciendo resultados comparables a los

obtenidos mediante técnicas analíticas estándar como el HPLC. Esta validación respalda la utilidad de la espectroscopia ATR-FTIR como una herramienta confiable para la cuantificación de compuestos bioactivos en matrices complejas, como los extractos de *Peumus boldus*.

Es crucial considerar las diversas variables asociadas con los distintos tipos de solventes utilizados en las extracciones de alcaloides, ya que estas pueden influir en los análisis de monitoreo y control. En este contexto, se ha observado un aumento tanto en la interacción de los enlaces de hidrógeno como en una fuerte transferencia de carga intramolecular en relación con la mayor polaridad del solvente sobre la indapamida, lo que ocasiona cambios en la estabilidad de la molécula y desplazamientos en los datos obtenidos (Figura 3) (Bolukbasi Yalcinkaya *et al.*, 2020). Asimismo, se ha constatado que la acidez, la basicidad y la polaridad del solvente pueden alterar los datos espectrales en la caracterización de metacrilato de etilo (Figura 4) (Ji *et al.*, 2011). Dado esto, la polaridad del solvente desempeña un papel crucial en la determinación de alcaloides mediante ATR-FTIR. A pesar de ello, son escasos los estudios que desarrollan metodologías que consideren el efecto de los solventes de extracción en las técnicas de análisis de productos naturales (Chen *et al.*, 2018). Como consecuencia, aún se desconoce cómo estas variables podrían influir en la obtención de datos que conduzcan a la optimización de cultivos celulares basada en modelos predictivos. En este sentido, la combinación de espectroscopia infrarroja (IR) con métodos quimiométricos, como la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), ofrece una alternativa prometedora para la cuantificación de compuestos químicos en sustancias específicas frente a variables existentes en cada solvente de extracción y su influencia en la calidad predictiva, considerando a su vez la matriz química compleja de los extractos (Rohman *et al.*, 2019) (Deus *et al.*, 2021,).

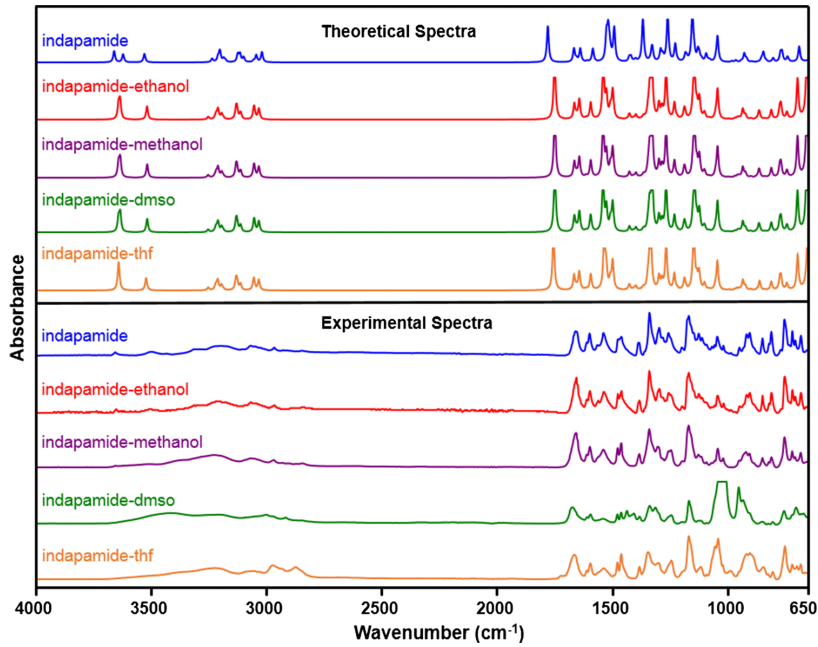


Figura 3. Espectros infrarrojos teóricos y experimentales de indapamida en diferentes solventes (Fuente: Bolukbasi Yalcinkaya *et al.*, 2020).

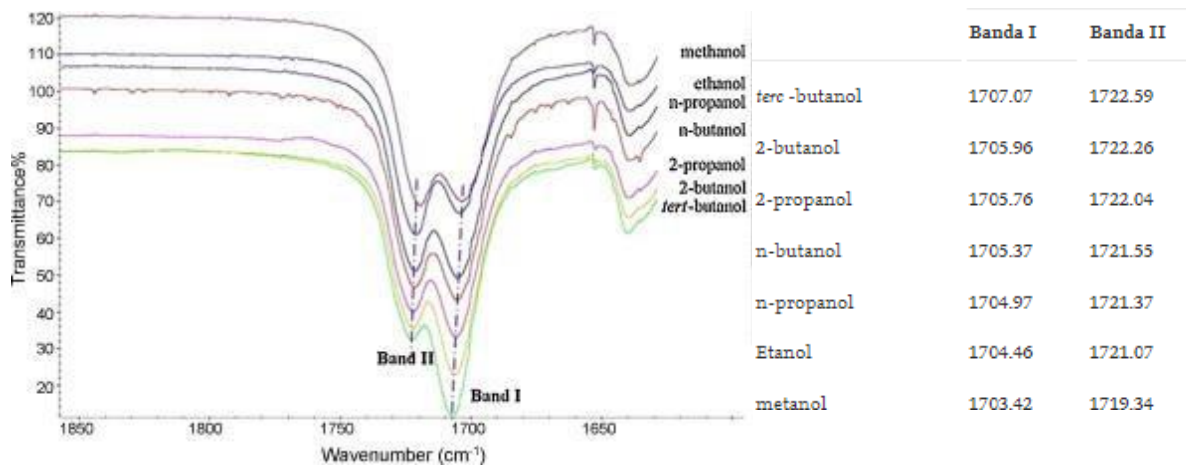


Figura 4. Los espectros infrarrojos de metacrilato de etilo (EMA) en solventes alcohólicos. (Fuente: Ji *et al.*, 2011).

La extracción y cuantificación precisa de alcaloides de cultivos celulares presenta desafíos significativos debido a la complejidad de la matriz biológica en la que se encuentran (Ajila *et al.*, 2010). Esta matriz biológica se refiere a la combinación de diversos componentes presentes en los cultivos celulares, como proteínas, lípidos, carbohidratos, metabolitos secundarios y otros compuestos orgánicos e inorgánicos (Wolfender *et al.*, 2015). La presencia de esta matriz compleja puede dificultar la identificación y cuantificación precisas de los alcaloides, ya que los alcaloides deben separarse y analizarse selectivamente de otros componentes presentes en la matriz (Klein-Júnior *et al.*, 2016). La intrincada naturaleza de los sistemas biológicos involucrados en los cultivos celulares agrega una capa adicional de complejidad a este proceso. Los cultivos celulares son sistemas dinámicos que pueden experimentar cambios en su composición química y metabólica debido a una variedad de factores, como el estado fisiológico de las células, las condiciones de cultivo y los métodos de procesamiento (Z. Li *et al.*, 2023). Estos cambios pueden afectar la concentración y distribución de los alcaloides dentro de la matriz biológica, lo que dificulta aún más su extracción y análisis precisos. Debido a estas consideraciones, los modelos estadísticos han sido ampliamente utilizados para el análisis de muestras biológicas complejas, ofreciendo resultados estables y confiables (Wold *et al.*, 2001; Khlebnikov *et al.*, 2007). Entre los métodos de predicción ms populares para matrices biológicas se encuentra la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), mencionada anteriormente, la cual se fundamenta en establecer una relación lineal entre el conjunto de datos independientes X (espectros infrarrojos) y el conjunto dependiente Y (concentraciones por HPLC) para predecir un compuesto de interés (Stocchero *et al.*, 2019). La precisión y exactitud del modelo dependen en gran medida de las variables, determinando la cercanía del valor medido al valor real y la precisión en la cercanía de los conjuntos de valores obtenidos, lo que se refleja en la reproducibilidad de las mediciones (Skoog *et al.*, 2008). El PLS puede aplicarse en situaciones donde el número de variables independientes supera el

número de observaciones y para reducir el número de variables de entrada del modelo, es posible proyectar y tratar los datos (Hawrył *et al.*, 2020).

Estudios previos, como el realizado por Deus *et al.*, 2021, han evidenciado la eficacia del PLS en la predicción de la bioactividad de compuestos con una alta precisión, lo que subraya su potencial en la cuantificación precisa de alcaloides en extractos vegetales. Además, investigaciones realizadas por Ferro *et al.*, 2019 han utilizado modelos PLS para cuantificar proteínas, lípidos y carbohidratos en microalgas, donde demostró explicar bien las variaciones en los datos y presentar buenas predicciones, como se aprecia en la figura 5. En otros trabajos se ha utilizado el método PLS para mejorar el control, la calidad y evaluación de compuestos. Este modelo ha permitido predecir la bioactividad de los alcaloides con un poder predictivo del 83% (X. Li *et al.*, 2017). También ha generado una presión alta con un coeficiente de determinación del 97% para la predicción del contenido de cafeína en refrescos sin el uso de solventes orgánicos (Paradkar y Irudayaraj, 2002).

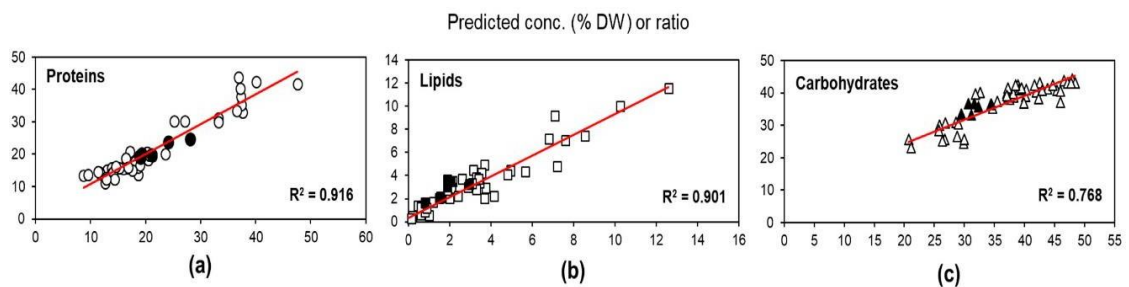


Figura 5. Correlación entre concentraciones determinadas y predichas de componentes bioquímicos en la región de huella dactilar por espectros FTIR utilizando modelos PLS. R² representa el coeficiente de determinación de la regresión lineal. Los símbolos blancos indican los puntos de datos del conjunto de calibración; los símbolos negros indican los puntos de datos del conjunto de validación externa. (Fuente: Ferro *et al.*, 2019).

La combinación de espectroscopia IR y PLS podría ofrecer una herramienta aún más sólida para evaluar la concentración de compuestos bioactivos en extractos de plantas, permitiendo un análisis rápido, preciso y no destructivo. Como se ha mencionado anteriormente, la espectroscopia IR posibilita la adquisición rápida y no destructiva de datos espectrales, agilizando el proceso de análisis y reduciendo los tiempos de muestreo (Estupiñán Méndez y Allscher, 2022). Por otro lado, el PLS brinda la capacidad de modelar relaciones complejas entre variables espectrales y concentraciones de compuestos, posibilitando la predicción precisa de alcaloides en extractos vegetales (X. Li *et al.*, 2017). Por consiguiente, se podría seleccionar la metodología más adecuada para escalar el procedimiento de producción de boldina a partir de cultivos celulares de *Peumus boldus*, considerando que es una especie vegetal reconocida por sus altas concentraciones de boldina, un alcaloide con importantes propiedades farmacológicas. Por lo tanto, es crucial desarrollar un modelo predictivo preciso para su producción a escala industrial. La combinación de espectroscopia IR y PLS ofrece una herramienta valiosa para este propósito al permitir una evaluación rápida y precisa de la concentración de boldina en los extractos de plantas, considerando la influencia por el solvente de extracción y de la matriz química compleja (Rohman *et al.* 2019) (Stocchero *et al.*, 2019). Esto facilitaría la selección de las condiciones óptimas de cultivo y extracción para maximizar el rendimiento de boldina en un entorno industrial. Además, el desarrollo de un modelo predictivo confiable de boldina basado en esta metodología promovería una producción más eficiente y rentable de este compuesto bioactivo, lo que contribuiría al avance a escala industrial y a la conservación de esta especie.

Considerando el efecto del solvente y la matriz compleja en la determinación de un compuesto por IR, se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿Cómo

afecta el solvente de extracción y la matriz compleja a la precisión y exactitud en la predicción de la concentración de boldina mediante ATR-FTIR en cultivos celulares de *Peumus boldus*?

Hipótesis:

- El solvente de extracción que posee mayor afinidad por la boldina entrega espectros de absorción con mayor estabilidad en los análisis de ATR-FTIR.
- El solvente de extracción de alcaloides que entregue mayor rendimiento y menor diversidad de compuestos acompañantes permite alcanzar la mayor exactitud y precisión para predecir boldina en cultivos celulares de *Peumus boldus* mediante ATR-FTIR.

Objetivo General:

Contrastar modelos de predicción de contenido de boldina producidos por espectros de ATR-FTIR en extractos de alcaloides en base a solvente metanol y NADES, generados a partir de cultivos celulares de *Peumus boldus*.

Objetivo Específico:

- Comparar la huella dactilar de los espectros de absorción de los extractos en metanol y NADES junto al estándar de boldina mediante ATR-FTIR.
- Comparar el perfil químico mediante HPLC de extractos en base a solvente metanol NADES, generados a partir de cultivos celulares de *Peumus boldus*.
- Evaluar modelo predictivo PLS de boldina, en base a los espectros de infrarrojo de los extractos con solvente metanol y NADES, generados a partir de cultivos celulares de *Peumus boldus*.

III MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención del Material Vegetal

Las líneas celulares de *Peumus boldus* observadas en la tabla 2, fueron adquiridas del Instituto Forestal (INFOR), San Pedro de la Paz, Región del Biobío, Chile, exceptuando las “Hojas udec” que provienen directamente del campus de la Universidad de Concepción, de la misma región. Para preservar la integridad celular, las muestras fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido a una temperatura de -200 °C. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de liofilización de la masa celular utilizando un liofilizador (Alpha 2-4 LD plus, Alemania) a una temperatura de -85 °C durante 24 horas. Una vez liofilizadas, las células fueron sometidas a un proceso de pulverización utilizando un homogeneizador 1600 MiniG (SPEX CertiPrep, USA) a una velocidad de 1500 rpm durante 2 minutos, generando un polvo homogéneo con un tamaño promedio de partícula inferior a 1,0 mm. Estos polvos celulares resultantes, con un tamaño homogéneo y bien conservados, fueron almacenados herméticamente en condiciones oscuras a -20 °C para su utilización en análisis posteriores. Este método de obtención y preparación del material celular asegura la preservación de las características originales de las células de *Peumus boldus* y proporciona una base sólida para los siguientes pasos en el análisis de compuestos bioactivos y la extracción de boldina.

Tabla 2. Muestras entregadas para su posterior análisis mediante HPLC y FTIR.

Tipo de muestra	Cantidad	Fecha de Colecta
Hojas de árbol creciendo in vivo	3	Dic-22, Jun-23
Hojas plantas creciendo in vitro	3	Dic-22, Jun-23
Cultivos celulares en medio semisólido	40	Dic-22, Abr-23, Jun-23
Cultivos celulares en medio líquido	41	Feb-23, Abr-23, Jun-23, Sep-23

3.2 Extracción de compuestos

Para la preparación del NADES, se siguió un protocolo basado en investigaciones previas de Torres-Vega et al., 2020, con ajustes específicos según las necesidades del estudio. La fórmula del NADES [mM] requería una combinación de 12.6 gramos de ácido oxálico dihidratado y 11.5 gramos de L- prolina. Posteriormente, la mezcla fue sometida a calentamiento utilizando un microondas doméstico (OEM/SMAD, China). Durante el procedimiento, la mezcla se irradió con una potencia de 700 vatios en dos ciclos de 30 segundos cada uno, con pausas entre los ciclos para homogeneizar el solvente. Este proceso llevó a la formación de un líquido viscoso característico del NADES. Para determinar el pH del NADES, se utilizó un medidor de pH previamente calibrado con soluciones estándar de pH 4,0 y 7,0. Una vez preparado, se utilizó el NADES al 80% (v/v) para reducir su viscosidad, de acuerdo con metodologías anteriores (Torres-Vega et al. 2020). Posteriormente, se llevó a cabo el procedimiento presentado en la figura 6.

Extracción de componentes en cultivos celulares de boldo

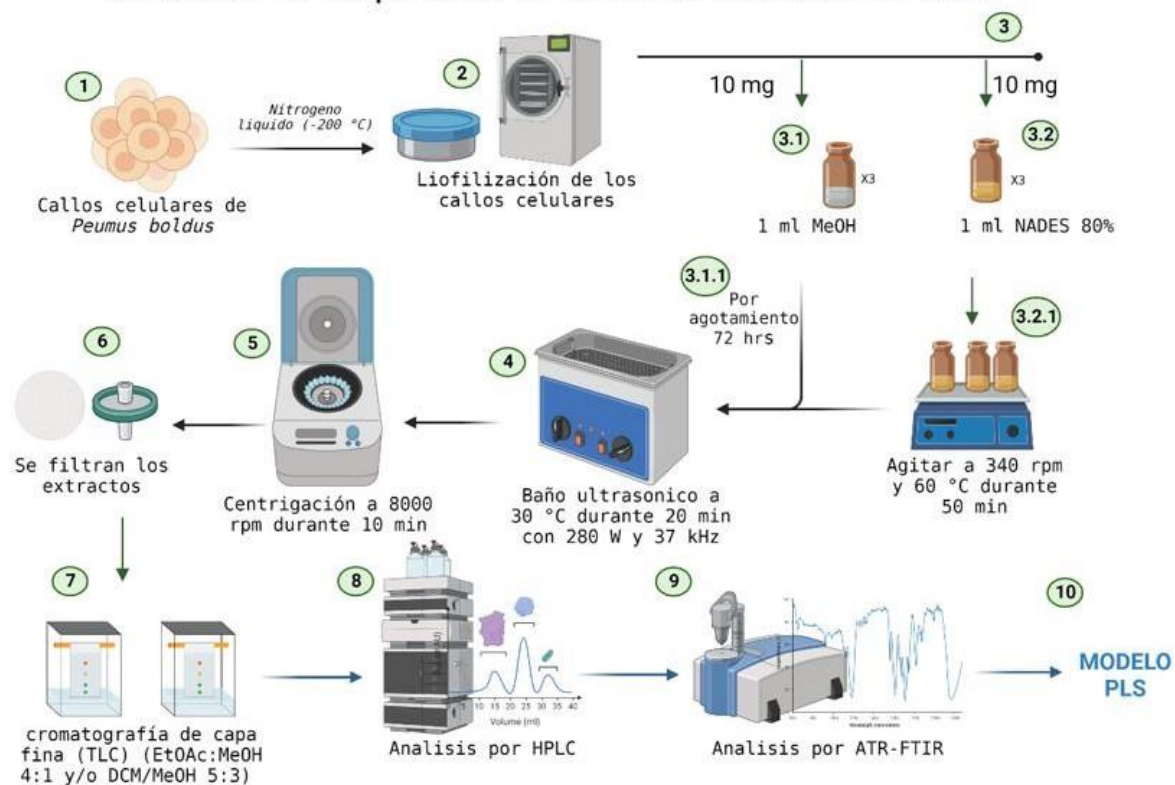


Figura 6. Esquema representativo del procedimiento de extracción utilizando NADES y extracción con metanol (98%) para la obtención de compuestos de interés.

Las células en forma de polvo (10 mg) se agregaron en viales ámbar de 1,5 ml que contenían 1 ml de NADES, por triplicado. Las mezclas se agitaron vigorosamente mediante vortex durante 30 segundos para formar una suspensión. Para la extracción se utilizó un agitador con calor (Eppendorf ThermoMixer® C, Alemania) a 340 rpm y 60 °C durante 50 min. Luego, se realizó la extracción asistida por ultrasonido (EAU) utilizando un baño ultrasónico (ELMASONIC S30H, Alemania) a 30 °C durante 20 min con una potencia de sonicación de 280 W y una frecuencia de 37 kHz. Posteriormente, las muestras se clarificaron por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes

se filtraron a través de una Membrana MF-Millipore de 45 μm antes del análisis HPLC.

Además, se llevó a cabo una extracción utilizando metanol (98%). En este caso, se utilizaron 10 mg de muestra en 1 ml de metanol por triplicado en viales ámbar de 1,5 ml. El proceso se llevó a cabo hasta que se produjo el agotamiento del material vegetal, con una duración total de 24 horas. Para corroborar la presencia de los compuestos de interés en los extractos obtenidos, se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) utilizando sistemas solventes de EtOAc:MeOH 4:1 y/o DCM/MeOH 5:3, junto con un estándar de boldina como método cualitativo.

3.3 Cuantificación HPLC-DAD y detección por LS-MS

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alto rendimiento (HPLC) acoplado a un detector de matriz de diodos (HPLC-DAD) Hitachi Primaide de Japón, equipado con una columna Kromasil C18. La fase móvil consistió en una mezcla de disolventes, donde el componente A era una solución al 1% de ácido fórmico en agua, y el componente B una solución al 1% de ácido fórmico en acetonitrilo. La separación de los compuestos se llevó a cabo a un caudal de 0,6 mL/min, con un volumen de inyección de 10 μL . El detector se ajustó a una longitud de onda de 303 nm para permitir la detección óptima de la boldina. Esta longitud de onda se seleccionó en base a la absorbancia máxima de la boldina, lo que garantiza una detección sensible y específica.

Para la identificación de boldina por LS-MS se empleó el método previamente descrito por Torres-Vega et al., 2020. Este método ha demostrado ser efectivo para la identificación precisa de boldina en extractos metanolicos de material

vegetal. El análisis se realizó utilizando un sistema UHPLC-DAD Bruker Elute LC, acoplado a un espectrómetro Q-TOF Compact de Bruker (Bremen, Alemania). Este sistema ofrece una alta resolución y precisión en la identificación de compuestos, lo que garantiza resultados confiables y reproducibles. Finalmente, el análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software Compass DataAnalysis 4.4 de Bruker Daltonik GmbH (Alemania), que permite el procesamiento y la interpretación eficientes de los resultados obtenidos.

3.4 Adquisición de espectros

Los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (ATR-FTIR) fueron adquiridos mediante un espectrofotómetro FTIR compacto (IRAffinity-1S Shimadzu, Japón), equipado con un detector de alta sensibilidad DLATGS, un componente óptico de destacado rendimiento y una celda MIRACLE10: ATR (Shimadzu INC, Japón). Previamente a cada medición, el cristal de la célula ATR fue sometido a un lavado meticuloso con 30 μ l de agua destilada. En la fase de medición de la muestra, se emplearon 2 μ l del extracto metanólico, promediándose 30 interferogramas por cada medición, con un tiempo total de exploración de 20 segundos. Cada análisis fue replicado tres veces por muestra para garantizar resultados robustos y confiables. Los espectros de absorción se registraron en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} , con una resolución de 8 cm^{-1} . No obstante, con el propósito específico de identificar las bandas asociadas a la boldina, se focalizó en el rango de 1700 a 700 cm^{-1} , siguiendo las recomendaciones de referencia proporcionadas por John Wiley and Sons, Inc. SpectraBase, esto fue apoyado analizando un estándar de boldina pura durante el proceso. La corrección ATR se llevó a cabo utilizando el software LabSolution IR (Shimadzu INC, Japón).

3.5 Preprocesado espectral

Se procedió al diseño y entrenamiento del modelo de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) utilizando los espectros infrarrojos obtenidos por ATR-FTIR y las concentraciones reales de boldina determinadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como variable dependiente. El objetivo principal fue establecer una relación robusta entre las características espectrales y la concentración cuantificada de boldina. Esta tarea se llevó a cabo después de realizar un preprocesamiento espectral, una etapa crítica en quimiometría que precede a la aplicación de técnicas de análisis multivariante sobre los datos espectrales. El propósito fundamental del preprocesamiento es perfeccionar la calidad de los espectros y destilar información redundante o perturbadora que podría obstaculizar las etapas posteriores de presentación y análisis de los datos. Enfrentándonos a desafíos inherentes, como la presencia de diversos compuestos en la matriz, la variabilidad en la composición de la muestra y la posible interferencia de coextractantes, así como la complejidad del fondo espectral, la identificación y cuantificación específica de alcaloides puros, como la boldina, se torna intrincada. Para superar estos obstáculos, se aplicaron transformaciones matemáticas clave, que abarcan desde derivadas espectrales hasta corrección de la línea base y suavizado, así como técnicas diseñadas para contrarrestar la dispersión, como el SNV (Standard Normal Variate). Complementariamente, se emplearon métodos como el centrado medio (MC) para realzar pequeñas diferencias entre espectros similares. Este enfoque integral buscó garantizar la fiabilidad y la precisión en la relación establecida entre las características espectrales y la concentración cuantificada de boldina. Todas estas estrategias fueron implementadas utilizando Matlab R2023b (The Mathworks, Natick, MA). En el desarrollo del modelo, se contó con un total de 115 datos espectrales, de los cuales 100 se destinaron para el entrenamiento, mientras que los 15 restantes se reservaron para una validación externa

independiente. Esta estrategia de asignación de datos aseguró una evaluación rigurosa y fiable del rendimiento del modelo en condiciones novedosas, respaldando la robustez y la generalización de los resultados obtenidos. En el contexto de esta investigación, únicamente se exponen los tratamientos más destacados correspondientes a los análisis respectivos (Tabla 3).

Tabla 3. Selección de preprocesamiento y transformaciones aplicados a la data espectral de extractos de líneas celulares para PLS.

Partial least squares (PLS)	
Transformacion	Preprocesado
SNV	MC
Suavizado (7 pts)-SNV	MC
SNV- 1st derivada (15 pts)	MC
SNV- 1st derivada (21 pts)	MC
SNV- 2nd derivada (15 pts)	MC
SNV- 2nd derivada (21 pts)	MC

El número de la ventana de puntos utilizada se indica entre paréntesis. SNV (variable normal estándar); MC, centrado a la media.

3.6 Eliminación de Valores Atípicos

Se implementó una estrategia específica para la detección y eliminación de valores atípicos en el conjunto de datos. La eliminación de valores atípicos se llevó a cabo mediante un criterio de alejamiento significativo de los valores estimados y la detección de anomalías en los espectros relacionadas con causas experimentales. Esta medida se adoptó de manera selectiva para preservar la

integridad y confiabilidad del modelo PLS, asegurando que los valores atípicos eliminados fueran los que comprometieran la validez del análisis.

3.7 Validación y predicción del modelo

La evaluación del rendimiento del modelo PLS diseñado para la predicción de concentraciones de boldina en extractos de *Peumus boldus* se llevó a cabo mediante parámetros clave, asegurando una comprensión integral de su capacidad predictiva y generalización. En primera instancia, se emplearon coeficientes de determinación (R^2) para evaluar la calidad del modelo en términos de calibración, validación y predicción, proporcionando una medida cuantitativa de la capacidad del modelo para explicar la variabilidad en los datos espectrales y prever concentraciones de boldina de manera precisa y consistente. La validación del modelo PLS se basó en una sólida estrategia que abarcó diversas técnicas y enfoques para garantizar su fiabilidad. En cuanto a la validación externa, se llevó a cabo utilizando un conjunto reservado de 15 muestras que no participaron en ninguna fase del desarrollo del modelo, asegurando que el modelo PLS este proporcionando una evaluación más rigurosa de su capacidad para generalizar y predecir concentraciones de boldina en extractos de *Peumus boldus*. Adicionalmente, se implementó una segunda validación externa que implicó el uso de 30 muestras con un HPLC diferente, fortaleciendo la evaluación del modelo al asegurar su capacidad para proporcionar predicciones precisas e independientes de la instrumentación utilizada.

IV RESULTADOS

4.1 Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Los resultados del análisis mediante TLC (Thin Layer Chromatography) revelaron la presencia de múltiples compuestos en los extractos de las líneas celulares de *Peumus boldus*. La separación de los componentes se llevó a cabo utilizando una fase estacionaria de sílice gel y una fase móvil compuesta por sistemas solventes de EtOAc:MeOH en una proporción de 4:1 y/o DCM/MeOH en una proporción de 5:3, junto con un estándar de boldina como método cualitativo. Sin embargo, es importante destacar que solo se pudieron visualizar los resultados de los extractos metanólicos debido a consideraciones de polaridad. Los extractos metanólicos presentan una mayor afinidad con la fase estacionaria de sílice gel y, por lo tanto, proporcionan una mejor separación de los compuestos presentes en los extractos celulares. Por otro lado, a diferencia de los extractos metanólicos, los obtenidos mediante NADES (Disolventes Eutécticos Profundos Naturales) no pudieron ser visualizados en la placa de TLC. Esto se debe a que los NADES presentan una polaridad diferente a la de los solventes convencionales utilizados en el TLC, lo que dificulta su interacción con la fase estacionaria y su visualización en la placa.

Tras la aplicación de los extractos en la placa de sílice gel y su posterior elución con el solvente adecuado, se observaron múltiples manchas en la placa. Estas manchas representan los diferentes compuestos presentes en los extractos de boldo, como se puede observar en la figura 7. La identificación de estos compuestos se realizó mediante la comparación de sus valores de R_f (factor de retención) con los de compuestos de referencia previamente identificados. Los resultados mostraron la presencia de una mancha correspondiente a la boldina.

La identificación de la boldina se confirmó mediante la comparación de su Rf con el de un estándar de boldina de alta pureza. Además de la boldina, se observaron otras manchas en la placa, lo que sugiere la presencia de otros compuestos en los extractos de boldo. La identificación precisa de estos compuestos requerirá análisis adicionales utilizando técnicas complementarias, como la espectroscopia de masas y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para determinar su estructura y concentración con mayor precisión.

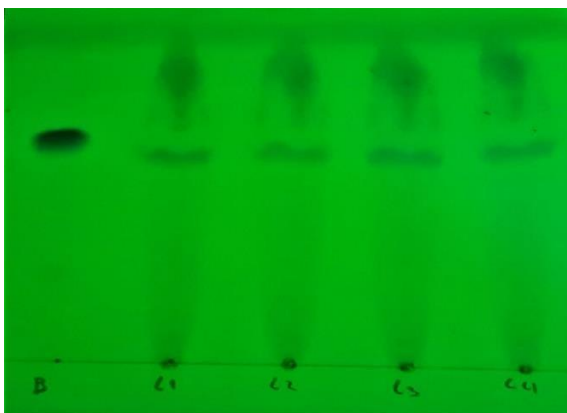


Figura 7. Cromatografía de capa fina (TLC) de extractos metanólicos de líneas celulares de *Peumus boldus*. **B** representa la boldina, mientras que **C1**, **C2**, **C3** y **C4** indican los extractos metanólicos de diferentes líneas celulares de boldo.

4.2 Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)

En primera instancia para conocer la concentración de boldina en los extractos se llevó a cabo la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a un detector de matriz de diodos (HPLC-DAD). En este análisis, se empleó un estándar puro de boldina para establecer parámetros de retención específicos. La detección de boldina se realizó a una longitud de onda de 303 nm, aprovechando su respuesta óptima. El tiempo de retención de boldina se situó en el rango de 16.167 a 16.267 minutos aproximadamente, proporcionando una separación eficaz de la boldina de otros componentes presentes en los extractos. El análisis cromatográfico permitió una identificación altamente específica y

cuantificación precisa de la boldina en los extractos como se ilustra en la figura 8 y 9.

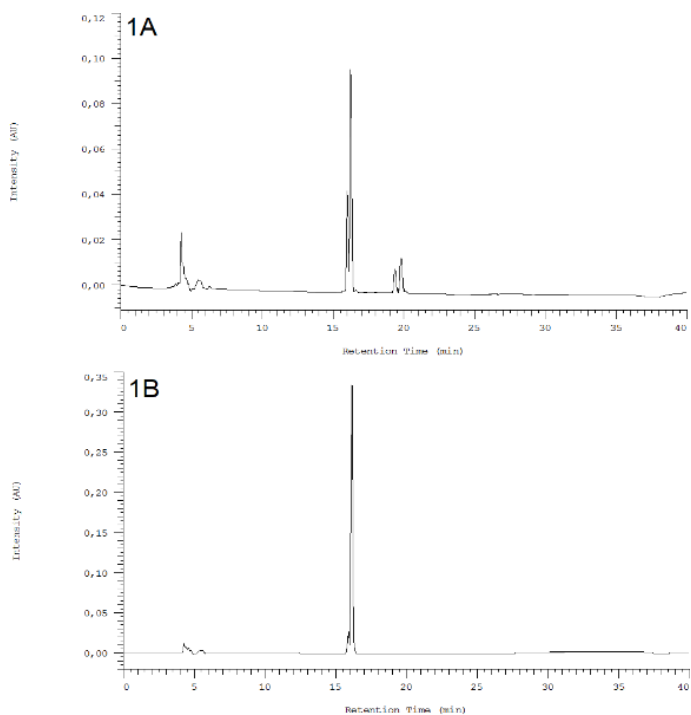


Figura 8. Cromatogramas obtenidos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a un detector de matriz de diodos (HPLC-DAD). En la **Figura 1a** se muestra el cromatograma de un extracto metanólico de líneas celulares de *Peumus boldus*. La **Figura 1b** representa el cromatograma de boldina pura como estándar. Los ejes están etiquetados con la intensidad de la señal en unidades arbitrarias (AU) en el eje Y y el tiempo de retención en minutos en el eje X.

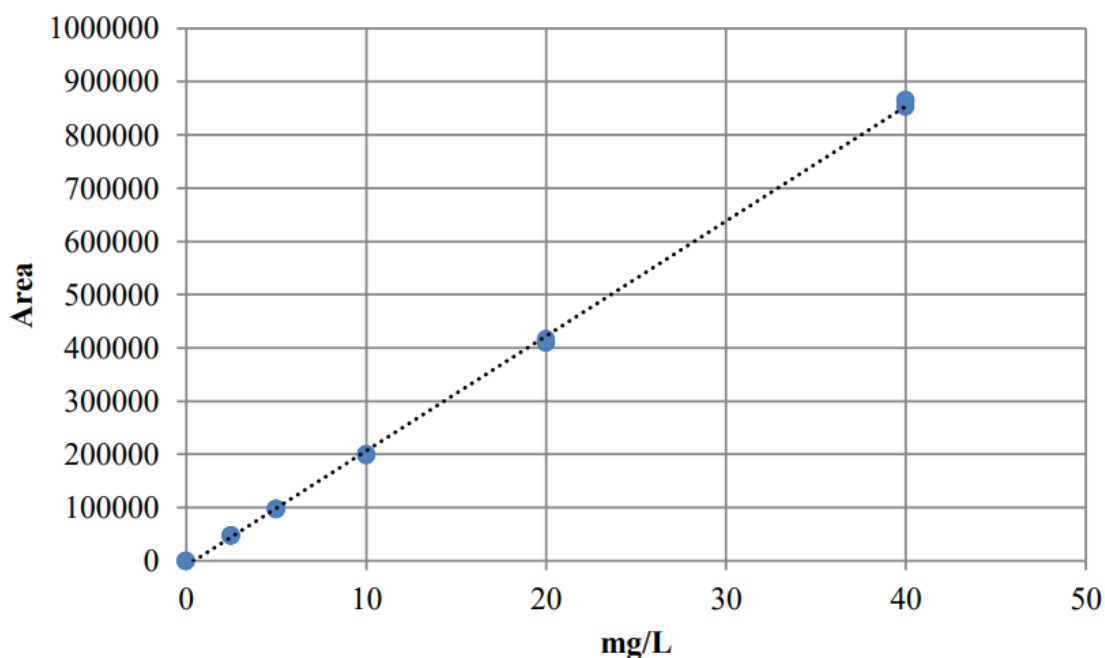


Figura 9. Curva de calibración generada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), abarcando un rango lineal de respuesta desde 3,9 hasta 40 mg/L. En el gráfico, el eje Y representa el área, mientras que el eje X muestra las concentraciones de la muestra en mg/L.

Es importante destacar que, a partir de este punto, se decidió prescindir del uso del NADES para los métodos cromatográficos debido a limitaciones prácticas. La viscosidad del NADES presentó dificultades significativas, ya que su dilución en múltiples ocasiones resultaba necesaria para la preparación de las muestras, lo que podía afectar la precisión y la reproducibilidad de los análisis. Además, esta alta viscosidad podría causar obstrucciones en los equipos cromatográficos, comprometiendo su funcionamiento óptimo y generando inconvenientes técnicos durante el proceso de análisis. Añadiendo que las concentraciones de boldina en las líneas celulares en comparación con los resultados en metanol eran inferiores, como se observa en la tabla 4. Por lo tanto, se optó por continuar con solventes más adecuados como la utilización de extractos metanolicos para garantizar la viabilidad y la eficacia de los métodos cromatográficos utilizados en

este estudio. Además, que estos resultados de HPLC-DAD constituirán la variable dependiente en los futuros modelos quimiométricos, brindando información relevante para el desarrollo y la validación de modelos predictivos de la concentración de boldina en los extractos de las líneas celulares de *Peumus boldus*.

Material Vegetal	Concentración boldina (mg/g) MeOH	Concentración boldina (mg/g) NADES
Hojas boldo (M1)	1,68	3,40
Hojas boldo (in vitro) (M2)	3,69	0,40
Callo Lee (M3)	0,79	0,28
Callo clon 7 (M4)	0,69	0,12
Callo clon 6 (M5)	0,77	0,16

Tabla 4. Comparación de concentración de boldina entre NADES y Metanol. Callo Lee, clon 7 y 6, son distintos cultivos celulares de boldo.

4.3 Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LS-MS)

La boldina de los extractos metanolicos de las líneas celulares de boldo, fue detectada en los extractos analizados utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). La presencia de boldina en los extractos se confirmó mediante la comparación de su tiempo de retención en la cromatografía, que fue de 5.1 minutos, con el estándar de boldina utilizado previamente para calibración, como se aprecia en la figura 10. Al presionar el pick correspondiente a la boldina en los extractos, se observaron dos valores de intensidad en UV, 217 y 282, indicando su absorción de luz ultravioleta en diferentes longitudes de onda. En el análisis de espectrometría de masas, se detectaron iones de boldina con una masa de aproximadamente 328.1515 unidades de masa atómica y una carga positiva. Es importante mencionar que la masa observada es ligeramente superior a la masa molar teórica de la boldina (327.368 g/mol) debido a la presencia de un isótopo en la muestra analizada. Los isótopos son variantes de un elemento químico que tienen el mismo número de protones, pero diferentes números de neutrones, lo que puede afectar ligeramente la masa de la molécula y resultar en una masa detectada ligeramente diferente. Además de la boldina, y muy cerca del pick de este compuesto, se detectó una masa de 297.11 g/mol. Dada la complejidad de la composición química del boldo, este compuesto podría ser un metabolito secundario, un producto de degradación o una impureza presente en el extracto. Lo importante, es que estos resultados confirman la presencia de boldina en los extractos metanolicos de las líneas celulares de *Peumus boldus*, respaldando así su identificación y proporcionando información relevante para un futuro análisis cualitativo y cuantitativo.

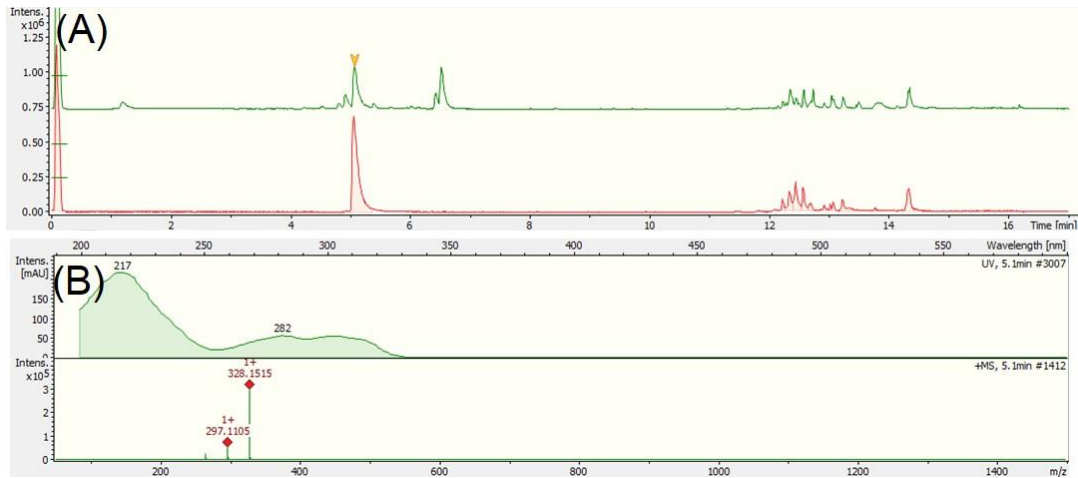


Figura 10. Resultados de Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LS-MS). En **(A)** se muestran los cromatogramas de una muestra de extracto metanólico de líneas celulares de boldo. El cromatograma de la muestra se representa en verde, mientras que el de la boldina estándar, esencial para su identificación en el extracto, se muestra en rojo. El eje Y indica la intensidad multiplicada por 10^6 para reflejar la magnitud de la señal de detección, y el eje X muestra el tiempo en minutos, representando el tiempo de retención de los compuestos en la cromatografía. En **(B)** se observa la "vista del espectro" de la boldina de los extractos. La **primera figura** muestra la intensidad en unidades de absorbancia miliar (mAU) a 217 nm y 282 nm en el eje Y, y la masa sobre carga (m/z) en el eje X. La **segunda figura** muestra la intensidad multiplicada por 10^5 en el eje Y y la masa sobre carga (m/z) en el eje X, que indica la relación entre la masa y la carga de los iones detectados en el espectrómetro de masas.

4.4 Caracterización de la Huella Dactilar Molecular de Boldina mediante ATR-FTIR

Durante el análisis ATR-FTIR, se enfocó en el rango de 1700 a 700 cm^{-1} , según recomendaciones de la base de datos en SpectraBase (*Boldine, Compound with Spectra*, 2024), para explorar específicamente estas vibraciones de forma más amplia (figura 11). Estos grupos funcionales específicos, al interactuar con la

radiación infrarroja, generan bandas de absorción distintivas, fundamentales para la identificación y cuantificación precisa de la boldina mediante el análisis de los espectros ATR-FTIR como se observa en la tabla 5.

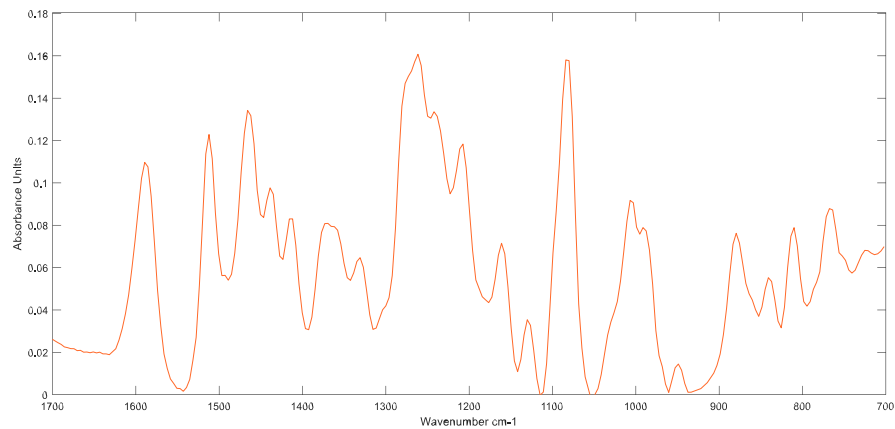


Figura 11. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR) de boldina pura. El análisis revela las características bandas de absorción asociadas a los grupos funcionales presentes en la molécula de boldina. El eje Y representa las unidades en absorbancia y el eje X las longitudes de onda en cm^{-1} .

Tabla 5. Bandas intensas en el espectro ATR-FTIR asociadas a los grupos funcionales de la boldina.

Vibrations	Wavenumber
C-O Bandas	1247 - 844
C=C Estiramiento Aromatico	1614 - 1598
C-N Bandas	844 - 702
C-H Bandas	904 - 800
C-C Estiramiento Aromatico	1570 - 1650

4.5 Análisis ATR-FTIR

Inicialmente, se llevaron a cabo experimentos con extractos de NADES utilizando FTIR para evaluar su viabilidad en el análisis. Sin embargo, se observaron limitaciones significativas. La técnica de ATR (Reflectancia Total Atenuada), utilizada en el FTIR, es muy superficial y solo penetra aproximadamente 1 μm en el material. Esta característica impide que la radiación infrarroja penetre adecuadamente la solución viscosa del NADES, lo que dificulta la interacción con los componentes de interés. Los espectros obtenidos de los extractos de NADES no mostraron claramente los compuestos presentes. Incluso cuando se utilizó boldina pura disuelta en NADES, no se lograron observar sus características espectrales distintivas. Esto se debió a que el espectro del NADES dominaba y cubría los demás compuestos presentes, creando una matriz densa que limitaba la detección de las vibraciones moleculares específicas de los compuestos de interés. Debido a estas dificultades, se decidió analizar exclusivamente los extractos metanólicos.

Los extractos metanólicos no presentaron las mismas limitaciones y permitieron una mejor penetración de la radiación infrarroja, lo que facilitó la obtención de espectros más claros y distintivos de los compuestos presentes. La utilización de extractos metanólicos fue esencial para asegurar la obtención de datos confiables y significativos en el análisis. Durante el análisis de los 100 espectros de los extractos metanólicos de las líneas celulares de *Peumus boldus* mediante ATR-FTIR, se identificaron las bandas espectrales distintivas asociadas a la boldina en el rango de 1700 a 700 cm^{-1} , como se muestra detalladamente en la figura 12. Es importante resaltar que esta limitación técnica se enfrentó en un contexto de matriz compleja, donde los diversos compuestos presentes en las células contribuyeron con sus propios espectros. La complejidad intrínseca de

esta matriz puede resultar en superposiciones espectrales, lo que impacta en la resolución de las bandas específicas de boldina.

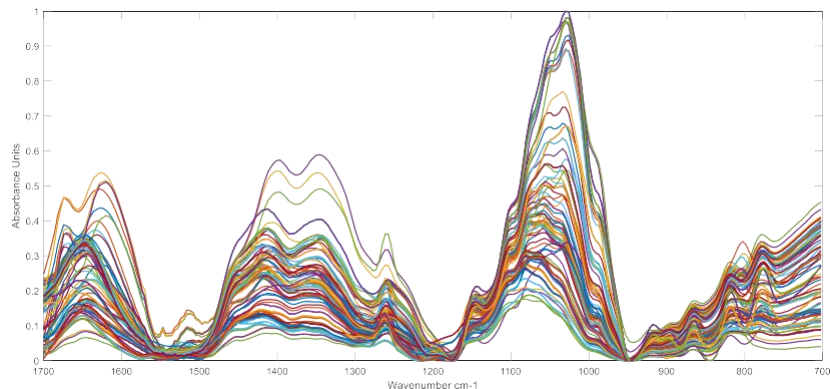


Figura 12. Espectro ATR-FTIR de extractos metanólicos de líneas celulares de *Peumus boldus*, destacando características asociadas a la presencia de boldina. El eje Y muestra la absorbancia y el eje X las longitudes de onda.

La complejidad de la matriz no solo afecta la identificación de las bandas espectrales, sino que también tiene implicaciones en las relaciones lineales entre las concentraciones de boldina y la absorbancia del espectro. Este fenómeno destaca la necesidad crítica de aplicar técnicas avanzadas de preprocesamiento y modelado para abordar la interferencia espectral, asegurando no solo resultados cuantitativos precisos, sino también estrategias esenciales para la interpretación de la concentración de boldina en los extractos. Estos resultados proporcionan los fundamentos esenciales para el establecimiento y desarrollo continuo de modelos predictivos robustos en el contexto de la espectroscopía infrarroja aplicada a la cuantificación precisa de boldina.

4.6 Calibración y desarrollo del modelo PLS

Se llevaron a cabo diversas pruebas con distintos tratamientos espectrales, incluyendo el tratamiento de Standard Normal Variate (SNV), centrado a la media (MC), primera derivada, segunda derivada y suavizado, empleando diversas combinaciones entre ellos. El objetivo era explorar y evaluar la influencia de estos tratamientos en la calidad de los modelos predictivos de la cuantificación de boldina en los extractos de las líneas celulares de *Peumus boldus*. En total, se generaron 35 modelos distintos mediante estas combinaciones, como se aprecia en la figura 13.

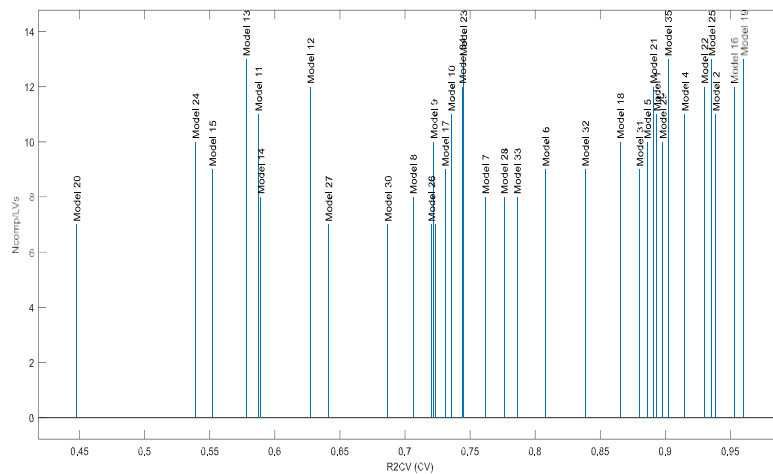


Figura 13. Comparación de los diferentes tratamientos aplicados en el preprocesamiento de los datos espectrales, evaluando diversas combinaciones de técnicas como la normalización estándar de variante (SNV), centrado a la media (MC), primera derivada, segunda derivada y suavizado. En el eje Y se encuentra las variables latentes, por su parte en el eje X se encuentran valores de la validación cruzada (R2 CV).

Para la selección del modelo final se priorizó aquel que presentara el menor número de variables latentes y, simultáneamente, exhibiera el mayor valor de R2 en validación cruzada (R2 CV). La combinación de minimizar variables latentes y

maximizar R2 CV busca un modelo parsimonioso y al mismo tiempo preciso, capaz de adaptarse bien a nuevas muestras sin caer en la complejidad innecesaria. Después de un análisis detallado, el modelo óptimo resultó ser el que incorpora el centrado a la media, SNV y un suavizado de 7 puntos, como se aprecia en la tabla 6. En este contexto, se priorizó la parsimonia y la eficacia del modelo. El centrado a la media permitió eliminar la componente constante de la señal, mejorando la interpretación de las variaciones espectrales relevantes. La normalización estándar de variante (SNV) garantizó una base comparativa uniforme al corregir las variaciones en la intensidad de la señal. El suavizado de 7 puntos se aplicó estratégicamente para reducir el ruido sin perder información espectral crucial. Este tratamiento optimizó la resolución de las bandas asociadas a la boldina, mejorando la capacidad del modelo para discriminar y cuantificar de manera precisa este compuesto en los extractos metanólicos. La selección de este modelo específico se fundamenta en su capacidad para lograr un equilibrio entre la simplificación del modelo.

Tabla 6. En la tabla se presentan los resultados más destacados de la evaluación de modelos PLS mediante cinco tratamientos y preprocesamientos distintos aplicados a los datos espectrales de los extractos metanólicos de *Peumus boldus*. Los parámetros evaluados incluyen el Error Cuadrático Medio de Calibración (RMSEC), el Error Cuadrático Medio de Validación Cruzada (RMSECV), y los coeficientes de determinación de Calibración (R²C) y Validación Cruzada (R²CV).

Partial least squares					
Transformacion	Preprocesado	RMSEC	RMSECV	R2C (Cal)	R2CV (CV)
SNV	MC	10.896	11.262	0.965	0.942
Suavizado (7 pts)-SNV	MC	10.688	11.103	0.986	0.946

SNV- 1st derivada (15 pts)	MC	9.901	11.206	0.965	0.940
SNV- 1st derivada (21 pts)	MC	10.864	11.231	0.958	0.937
SNV- 2nd derivada (15 pts)	MC	10.935	11.235	0.962	0.934
SNV- 2nd derivada (21 pts)	MC	11.034	12.381	0.954	0.919

En esta etapa del análisis, se evaluaron los diferentes rangos espectrales utilizando los parámetros del modelo óptimo, que incorpora el centrado a la media, SNV y un suavizado de 7 puntos, para identificar la boldina en los extractos metanólicos, como se aprecia en la tabla 7. Los resultados destacaron que los mejores modelos se obtuvieron al trabajar con los rangos de estiramiento del éter y de la amina, que mostraron coeficientes de determinación (R^2) de calibración de 0.92 y 0.94, respectivamente. Sin embargo, en términos de validación cruzada, estos rangos obtuvieron valores más bajos, con R^2 de 0.79 y 0.73, respectivamente. En contraste, el peor desempeño se observó en el rango de C-H, a pesar de su alto R^2 de calibración de 0.93, su validación cruzada resultó muy baja con un valor de 0.17. Esta discrepancia sugiere una falta de generalización del modelo y un posible sobreajuste a los datos de calibración. En el caso del rango de C=C, aunque mostró un R^2 de calibración de 0.89, su validación cruzada fue de 0.35, y se requirieron 16 variables latentes debido a la complejidad de la información espectral. La selección de variables latentes del modelo PLS se basó en criterios como la minimización del error de predicción y la maximización de la varianza explicada. Al final, el mejor resultado se obtuvo al utilizar el rango completo de la huella dactilar del espectro de la boldina (1700 a 700 cm^{-1}) debido a la inclusión de todas las bandas espectrales relevantes que representan los diferentes grupos funcionales presentes en la boldina y otros compuestos de interés en los extractos metanólicos de boldo (figura 14). Al

considerar todo el rango, se captura una gama más amplia de características espectrales, lo que permite una mejor discriminación entre los diversos componentes de la muestra. Esto proporciona una mayor cantidad de información sobre la composición química de los extractos, lo que mejora la capacidad del modelo para identificar y cuantificar con precisión la boldina. Además, el uso del rango completo puede ayudar a compensar la superposición espectral y otros efectos de la matriz compleja, lo que conduce a una mejor generalización del modelo y, en última instancia, a resultados más confiables y robustos.

Tabla 7. Resultados obtenidos al evaluar diversos rangos de espectro para la cuantificación de boldina en extractos metanólicos. Se incluyen los valores del Error Cuadrático Medio de Calibración (RMSEC) y de Validación Cruzada (RMSECV), así como los coeficientes de determinación de Calibración (R^2C), Validación Cruzada (R^2CV) y Variables latentes (LVs).

Partial least squares (PLS)						
Vibrations	Wavenumber	RMSEC	RMSECV	R ² C (Cal)	R ² CV (CV)	LV
Huella dactilar	1700 - 700	10.603	11.183	0.986	0.946	11
C-O Bandas	1247 - 844	17.996	30.565	0.923	0.795	13
C=C Aromatico	1614 - 1598	20.801	64.318	0.898	0.350	16
C-N Bandas	844 - 702	15.902	35.560	0.940	0.731	13
C-H Bandas	904 - 800	16.539	132.148	0.935	0.174	13
C-C Aromatico	1570 - 1650	17.914	49.205	0.924	0.585	13

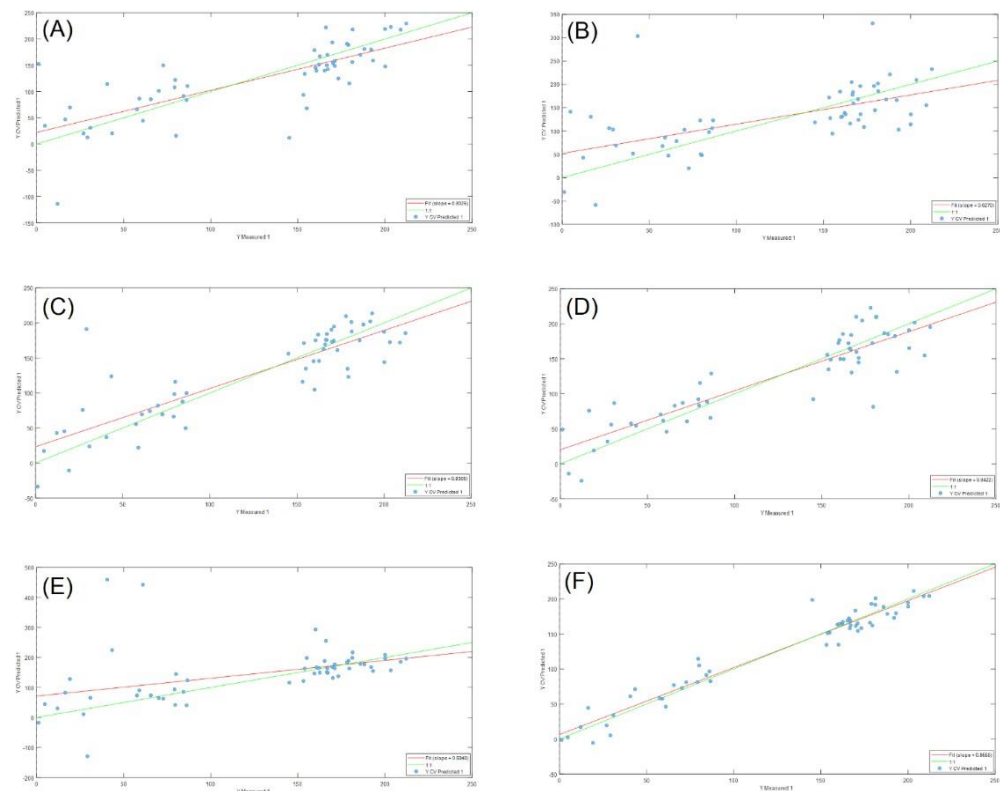


Figura 14. Representación de seis modelos de cuantificación de boldina en extractos metanólicos de *Peumus boldus* utilizando diferentes rangos de espectro: **(A)** C-C Estiramiento aromático 1570 - 1650, **(B)** C=C Estiramiento aromático 1614 - 1598, **(C)** C-N Bandas 844 - 702, **(D)** C-O Bandas 1247 - 844, **(E)** C-H Bandas 904 - 800 y **(F)** rango completo de la huella dactilar de la boldina (1700 a 700 cm⁻¹). La línea roja representa el ajuste del modelo (Fit), la línea verde 1:1 indica una correlación perfecta entre los valores predichos y reales, y los puntos "Y CV predicted" muestran las predicciones obtenidas a través de validación cruzada.

4.7 Recargadas con boldina estándar

En el análisis del modelo de cuantificación de boldina, se observó un espacio vacío entre las muestras de menor y mayor concentración en el espectro de calibración. Esta brecha se debe a la ausencia de muestras con concentraciones intermedias en el rango estudiado, lo que podría generar una falta de información sobre las respuestas espectrales en esa región de concentración. Para abordar esta limitación, se decidió diluir las muestras de alta concentración hasta alcanzar las concentraciones intermedias deseadas para el modelo. Asimismo, se reutilizaron los extractos de baja concentración que ya habían sido analizados, a los cuales se les añadió boldina estándar en cantidades suficientes para alcanzar las concentraciones objetivo y cubrir así el espacio en el modelo.

Esta estrategia de preparación de muestras garantizó una cobertura completa del rango de concentraciones de interés sin necesidad de generar nuevos extractos, lo que permitió mantener la complejidad de la matriz intacta y conservar las características espectrales de los extractos originales. Además, los cálculos para agregar boldina y realizar las diluciones fueron confirmados mediante el análisis de 10 muestras al azar, lo que aseguró la precisión y reproducibilidad del procedimiento de preparación de muestras. Cabe destacar que el error relativo entre las concentraciones esperadas y las obtenidas por HPLC se encontró entre -1.36% y 1.85%, lo que indica una excelente concordancia entre los valores teóricos y experimentales, como se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones esperadas y los resultados obtenidos mediante HPLC de 10 muestras seleccionadas al azar, expresados en mg/L. Los errores relativos entre las concentraciones esperadas y las obtenidas por HPLC.

Muestra	Concentración esperada (mg/L)	Resultado por HPLC (mg/L)	Error relativo %
1	155	153.37	-0.01
2	150	152.25	1.50
3	147	149.72	1.85
4	143	143.58	0.41
5	140	142.14	1.53
6	134	136.36	1.76
7	130	128.23	-1.36
8	125	125.41	0.33
9	122	121.18	-0.67
10	114	114.16	0.14

4.8 Análisis de modelo de muestras totales

Después de incorporar todas las concentraciones mencionadas al modelo, se logró cubrir todo el rango de concentraciones, lo que representó un éxito en la calibración (figura 15). Los resultados obtenidos mostraron un coeficiente de determinación (R^2) de calibración de 0.965 y uno de validación cruzada de 0.944. Además, se obtuvo un Error Cuadrático Medio de Calibración (RMSEC) de 9.0248 y un Error Cuadrático Medio de Validación Cruzada (RMSECV) de 11.8684, como se aprecia en la tabla 9. Estos valores indican una buena capacidad predictiva del modelo en este contexto, considerando la complejidad de la matriz y la presencia de múltiples compuestos en los extractos. Con 11 variables latentes, el modelo demostró un equilibrio adecuado entre la capacidad predictiva y la complejidad de este. De esta manera, el modelo está listo para ser aplicado en la cuantificación de boldina en muestras externas, con un alto nivel de precisión y fiabilidad.

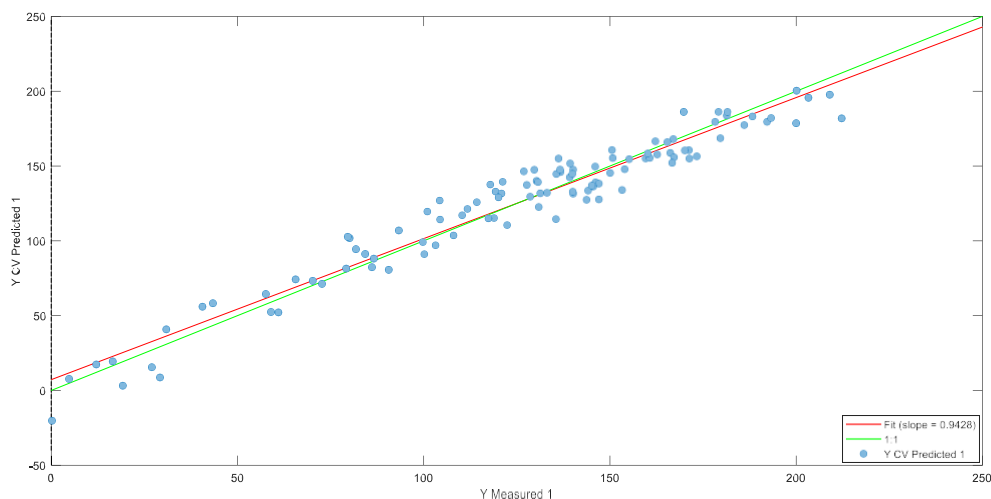


Figura 15. Representación del modelo de cuantificación de boldina en extractos metanólicos. La línea roja representa el ajuste del modelo (Fit), la línea verde 1:1 indica una correlación perfecta entre los valores predichos y reales, y los puntos "Y CV predicted" muestran las predicciones obtenidas a través de la validación cruzada.

Tabla 9. Valores del modelo PLS para la cuantificación de boldina en extractos metanólicos.

	RMSEC	RMSECV	R ² C (Cal)	R ² CV (CV)	LVs
Modelo PLS	9.024	11.868	0.965	0.944	11

Error Cuadrático Medio de Calibración (RMSEC), Error Cuadrático Medio de Validación Cruzada (RMSECV), así como los coeficientes de determinación de Calibración (R²C) y Validación Cruzada (R²CV), junto con el número de variables latentes (LVs) utilizadas en el modelo.

4.7 Cuantificación de boldina

En la validación externa del modelo PLS, se utilizaron dos conjuntos de datos independientes que no fueron empleados en el proceso de calibración (Tabla 10). El primero consistió en 15 muestras con concentraciones conocidas de boldina, y el coeficiente de determinación (R^2) de la predicción fue de 0.951, lo que indica una buena capacidad del modelo para predecir las concentraciones reales. Además, se llevó a cabo una segunda validación utilizando 30 muestras adicionales, donde las concentraciones conocidas fueron proporcionadas por un HPLC de otro laboratorio.

Tabla 10. Valores correspondientes a la validación del modelo PLS. **A)** corresponde a la predicción de las 15 muestras que no estaban en el modelo, mientras que Validación **(B)** corresponde a la predicción de las 30 muestras obtenida por otro HPLC.

	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R2C (Cal)	R2CV (CV)	R2 Prediction
Validación (A)	9.026	13.617	10.123	0.965	0.955	0.951
Validación (B)	9.026	13.617	10.793	0.965	0.956	0.948

Se presenta el Error Cuadrático Medio de Calibración (RMSEC), Error Cuadrático Medio de Validación Cruzada (RMSECV), RMSEP (Error Cuadrático Medio de Predicción Externa), así como los coeficientes de determinación de Calibración (R^2C) y Validación Cruzada (R^2CV), y el R^2 de predicción para la boldina.

Este enfoque de validación cruzada externa permite evaluar la robustez y la generalización del modelo en diferentes condiciones experimentales y analíticas. En este caso, el modelo demostró un alto nivel de precisión, con un R^2 de 0.948 en la predicción de las concentraciones de boldina, lo cual respalda su fiabilidad y aplicabilidad en entornos diversos, como se puede observar en la figura 16.

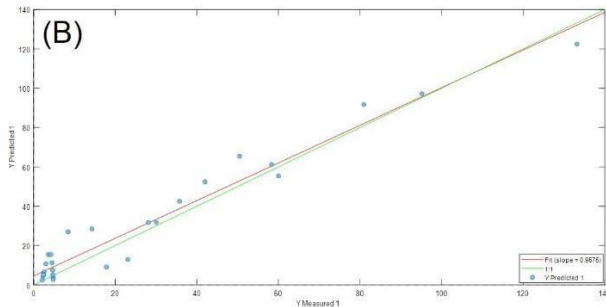
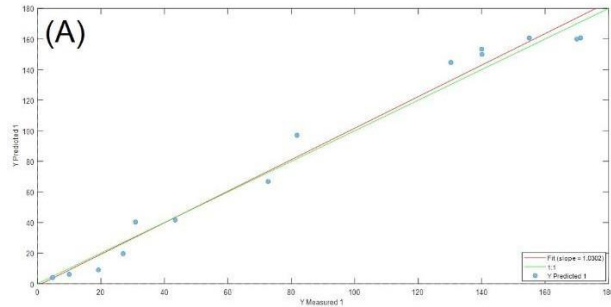


Figura 16. Validaciones del modelo PLS para la predicción de boldina. La línea roja representa el ajuste del modelo (Fit), mientras que la línea verde 1:1 indica una correlación perfecta entre los valores predichos y reales. Los puntos "Y CV predicted" muestran las predicciones obtenidas a través de la validación cruzada. Validación **(A)** corresponde a la predicción de las 15 muestras que no estaban en el modelo, mientras que Validación **(B)** corresponde a la predicción de las 30 muestras obtenidas por otro HPLC.

V DISCUSION

El objetivo principal de este estudio fue diseñar un modelo de predicción de la concentración de boldina en una matriz compleja de compuestos extraídos por un solvente a partir de cultivos celulares de *Peumus boldus*. Los resultados indicaron que los mejores rendimientos en la extracción de la boldina se obtuvieron con metanol. Además, el modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) aplicado a los espectros ATR-FTIR alcanzó una precisión de predicción del 95.1% y 94.8% en datos externos. Estos hallazgos confirman que la espectroscopia infrarroja, combinada con técnicas quimiométricas, es una herramienta eficaz para el monitoreo y control de la producción de boldina en cultivos celulares de *Peumus boldus*.

Estos resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado la eficacia del uso de FTIR y PLS para el análisis de compuestos bioactivos. Por ejemplo, un estudio de X. Li *et al.*, 2017 demostró que la espectroscopia FTIR combinada con PLS es eficaz para la predicción de alcaloides y su bioactividad, alcanzando un coeficiente de determinación (R^2) de 0.83 tanto en modelos de calibración como de validación. Otro estudio de Paradkar y Irudayaraj, 2002, confirmó la utilidad de estas técnicas para la predicción precisa de la concentración de cafeína en diferentes matrices complejas, destacando su potencial para aplicaciones industriales con un R^2 de 0.97 y errores de predicción mínimos.

En cuanto a las hipótesis planteadas, los resultados permiten confirmarlas de manera significativa. La primera hipótesis afirmaba que el solvente de extracción que posee mayor afinidad por la boldina entrega espectros de absorción con mayor estabilidad en los análisis de ATR-FTIR. Los resultados mostraron que el metanol, al ser el solvente con mayor afinidad por la boldina en cultivos celulares, produjo espectros de absorción estables y claros, facilitando así el análisis y la

predicción precisa de la concentración de boldina. La segunda hipótesis proponía que el solvente de extracción de alcaloides que entregue mayor rendimiento y menor diversidad de compuestos acompañantes permite alcanzar la mayor exactitud y precisión para predecir boldina en cultivos celulares de *Peumus boldus* mediante ATR-FTIR. Los datos obtenidos confirmaron esta hipótesis, ya que el metanol no solo proporcionó el mayor rendimiento en la extracción de boldina en líneas celulares de boldo, sino que también resultó en una menor interferencia de compuestos acompañantes a comparación de NADES, lo que permitió alcanzar una alta exactitud y precisión en las predicciones utilizando ATR-FTIR.

Sin embargo, es importante destacar que, en el caso de las hojas de boldo, la situación fue diferente. Se observaron mejores rendimientos de extracción de boldina con NADES que con metanol. Esto podría explicarse por las diferencias en la matriz de las hojas en comparación con las líneas celulares, ya que las hojas contienen una mayor diversidad de compuestos y estructuras celulares más complejas que podrían interactuar de manera diferente con los solventes. Estudios han demostrado que los NADES, debido a su naturaleza eutéctica y sus interacciones específicas con los compuestos bioactivos, pueden aumentar la solubilidad y la estabilidad de ciertos metabolitos en matrices vegetales más complejas (Torres-Vega et al., 2020; Peng et al., 2016; Dai et al., 2013).

En nuestro estudio, se decidió analizar exclusivamente los extractos metanólicos debido a las dificultades inherentes al análisis de NADES. La técnica de ATR (Reflectancia Total Atenuada) utilizada en FTIR es superficial y solo penetra aproximadamente 1 μm en el material, lo que impide que la radiación infrarroja penetre adecuadamente la solución viscosa del NADES. Esto resultó en la incapacidad de obtener espectros distintivos de los compuestos de interés, incluso cuando se utilizó boldina pura disuelta en NADES. La matriz densa generada por el NADES limitaba la detección de las vibraciones moleculares

específicas de los compuestos de interés, en este sentido se presentó limitaciones debido a su alta viscosidad, lo que dificulta la obtención de espectros claros y distintivos de los compuestos presentes. Esta observación está respaldada por investigaciones recientes que han señalado la necesidad de optimización y monitoreo más detallados en el uso de NADES para la extracción de alcaloides. Por ejemplo, He et al. (2024) destaca que, aunque los NADES tienen ventajas ecológicas y de eficiencia, su alta viscosidad puede limitar la interacción de la radiación infrarroja con los componentes de interés, dificultando así su análisis espectroscópico. En el estudio se observa que los espectros FTIR de los extractos de DES-1 muestran alteraciones estructurales significativas en comparación con sus precursores monoméricos, evidenciando interacciones de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, a pesar de no ver grandes diferencias en los espectros, concluyeron que una mayor intensidad de grupos característicos, en el mismo espectro de DES-1, indicando su capacidad de extracción superior en comparación con los solventes tradicionales, lo que en general tiene sentido, pero se ve limitado si se quiere analizar compuestos específicos dentro de matrices complejas.

Los resultados obtenidos en este estudio tienen implicaciones para la producción industrial de boldina mediante cultivos celulares de *Peumus boldus*. La capacidad de predecir la concentración de boldina utilizando espectros ATR-FTIR y técnicas quimiométricas facilita el monitoreo continuo y la optimización de los procesos de producción, lo que es esencial para escalar la producción a niveles industriales de manera eficiente y sostenible. Futuras investigaciones deberían enfocarse en la optimización de los métodos de extracción utilizando NADES, así como en el desarrollo de técnicas espectroscópicas avanzadas que puedan superar las limitaciones actuales. Además, sería valioso explorar la aplicación de otros solventes y técnicas de extracción que puedan mejorar aún más la eficiencia y selectividad en la obtención de alcaloides a partir de cultivos celulares.

VI CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio demuestra la viabilidad de utilizar técnicas quimiométricas y espectroscópicas para la cuantificación precisa de boldina en extractos metanólicos de las líneas celulares de *Peumus boldus*. El modelo PLS desarrollado, combinado con el preprocesamiento adecuado de los espectros ATR-FTIR, mostró resultados prometedores en términos de precisión y selectividad. La aplicación de este modelo puede tener importantes implicaciones en la industria farmacéutica y de productos naturales, permitiendo una evaluación rápida y confiable de la concentración de boldina en diferentes muestras de boldo. Además, este enfoque podría aplicarse a otros compuestos bioactivos presentes en plantas medicinales, contribuyendo así al desarrollo de métodos analíticos más eficientes y rentables. Además, esta investigación proporciona una herramienta precisa y confiable para la cuantificación de boldina en extractos metanólicos de las líneas celulares de *Peumus boldus*, lo que facilita su aplicación en la producción y control de calidad de productos farmacéuticos y complementos dietéticos. Debido a esto, la metodología desarrollada en este estudio puede ser adaptada para la cuantificación precisa de una amplia gama de compuestos bioactivos presentes en diversas plantas medicinales. Esta versatilidad abre nuevas oportunidades de investigación en el campo de la fitoterapia y la medicina natural, permitiendo una evaluación más exhaustiva de los beneficios y propiedades terapéuticas de estos recursos naturales.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott A.P., D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed. 2004. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society* 126(29): 9142-9147.
- Abu-Absi, N., Martel, R. P., Lanza, A. M., Clements, S. J., Borys, M. C., & Li, Z. J. 2014. Application of spectroscopic methods for monitoring of bioprocesses and the implications for the manufacture of biologics. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2(3), 267-284.
- Abu-Absi, N. R., Kenty, B. M., Cuellar, M. E., Borys, M. C., Sakhamuri, S., Strachan, D. J., & Li, Z. J. 2010. Real-time monitoring of multiple parameters in mammalian cell culture bioreactors using an in-line Raman spectroscopy probe. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(3), 482-491.
- Adejoke H.T., H. Louis, O.O. Amusan, G. Apebende. 2019. A review on classes, extraction, purification and pharmaceutical importance of plants alkaloid. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences* 2(4): 130-139.
- Ajila, C., Brar, K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valero, J. R. (2010). Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical reviews in biotechnology*, 31, 227-249.
- Azcon-Bieto J., M. Talón. 2003. *unaamentos isiología Vegetal*.

Barrales-Cureño H.J., C.R. Reyes, I.V. García, L.G.L. Valdez, A.G. De Jesús, J. Cortés Ruíz, L. Sánchez Herrera, M. Calderón Caballero, J.A.S. Magallón, J. Espinoza Perez. 2019. Alkaloids of pharmacological importance in *Catharanthus roseus*. *Alkaloids—Their Importance in Nature and Human Life* 1: 18.

Bolukbasi Yalcinkaya O., A. Yilmaz, B. Ilhan Ceylan. 2020. Solvent effects on UV–Vis and FT-IR spectra of indapamide combined with DFT calculations. *Chemical Papers* 74(4): 1103-1111.

Caiozzi G., D. Cabrera, J.M. Mardónez, F. Saldías. 2002. Hierbas medicinales y graves efectos adversos: Angioedema de úvula causado por uso de *Ecballium elaterium*. *Revista médica de Chile* 130(12): 1407-1410.

Câmara, A. Oliveira, K. Santos, M. Lima, R. Lima, K. Carvalho, Luciene. 2022. Multivariate assessment for predicting antioxidant activity from clove and pomegranate extracts by MCR-ALS and PLS models combined to IR spectroscopy: *Food Chemistry*. 384. 132321.

Chemistry LibreTexts. 2022. Ethers: Structures, Classification, and Nomenclature. Recuperado de <https://chem.libretexts.org/>

Chemistry LibreTexts. 2022. Spectroscopy of the Amine Group. Recuperado de <https://chem.libretexts.org/>

Chandam D.R., A.G. Mulik, D.R. Patil, M.B. Deshmukh. 2016. Oxalic acid dihydrate: proline as a new recyclable designer solvent: a sustainable, green avenue for the synthesis of spirooxindole. *Research on chemical intermediates* 42(2): 1411-1423.

- Chen Y., H. Zhang, W. Zhou, C. Deng, J. Liao. 2018. The solvent effects on dimethyl phthalate investigated by FTIR characterization, solvent parameter correlation and DFT computation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 199: 412-420.
- Chintalwar G., S. Gupta, G. Roja, V. Bapat. 2003. Protoberberine alkaloids from callus and cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia*. *Pharmaceutical biology* 41(2): 81-86.
- Choi Y.H., J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I.W. Arends, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte. 2011. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant physiology* 156(4): 1701-1705.
- Costa F.S., L.S. Moreira, A.M. Silva, R.J. Silva, M.P. dos Santos, E.G.P. da Silva, M.T. Grassi, M.H. Gonzalez, C.D. Amaral. 2022. Natural deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction in the medicinal herb sample preparation and elemental determination by ICP OES. *Journal of Food Composition and Analysis* 109: 104510.
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12(4): 564-582.
- Dai Y., J. van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi. 2013. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica chimica acta* 766: 61-68.

- Dai, Y., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. 2013. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chemistry*, 138(2-3), 1442-1449
- Deus, V. L., Resende, L. M., Bispo, E. S., Franca, A. S., & Gloria, M. B. A. (2021). FTIR and PLS-regression in the evaluation of bioactive amines, total phenolic compounds and antioxidant potential of dark chocolates. *Food Chemistry*, 357, 129754.
- Estupiñán Méndez, D., & Allscher, T. (2022). Advantages of External Reflection and Transflection over ATR in the Rapid Material Characterization of Negatives and Films via FTIR Spectroscopy. *Polymers*, 14(4).
- Ferro L., Z. Gojkovic, A. Gorzsás, C. Funk. 2019. Statistical methods for rapid quantification of proteins, lipids, and carbohydrates in nordic microalgal species using ATR–FTIR spectroscopy. *Molecules* 24(18): 3237.
- Fuentes-Barros G., S. Castro-Saavedra, L. Liberona, W. Acevedo-Fuentes, C. Tirapegui, C. Mattar, B.K. Cassels. 2018. Variation of the alkaloid content of *Peumus boldus* (boldo). *Fitoterapia* 127: 179-185.
- García A.Á., E.P.-U. Carril. 2011. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)* 2(3).
- García R E., M. González O, I. Quiroz M, H. Soto G. 2010. Boldo seeds (*Peumus boldus*): evaluation of their germination. *Chile Forestal*(350): 36-40.
- Gillie J.K., J. Hochlowski, G.A. Arbuckle-Keil. 2000. Infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* 72(12): 71-80.

- Gomathi, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Devaki, K., & Uma, C. 2014. Antioxidant activity and functional group analysis of *Evolvulus alsinoides*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(11), 827-832.
- Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine* 27(1): 1-93.
- Harborne J.B. 2014. Introduction to ecological biochemistry. Academic press. p.
- Hawrył A., M. Hawrył, A. Hajnos-Stolarz, J. Abramek, A. Bogucka-Kocka, Ł. Komsta. 2020. HPLC fingerprint analysis with the antioxidant and cytotoxic activities of selected lichens combined with the chemometric calculations. *Molecules* 25(18): 4301.
- He, Q., Tang, G., Hu, Y., Liu, H., Tang, H., Zhou, Y., Deng, X., Peng, D., Qian, Y., Guo, W., Chen, D., Li, X., & Qiu, H. 2024. Green and highly effective extraction of bioactive flavonoids from *Fructus aurantii* employing deep eutectic solvents-based ultrasonic-assisted extraction protocol. *Ultrasonics Sonochemistry*, 102, 106761.
- Heinrich, M., Fitzgerald, M., & Booker, A. 2019. Medicinal Plant Analysis: A Historical and Regional Discussion of Emergent Complex Techniques. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1480.
- Hertig, D., Maddah, S., Memedovski, R., Kurth, S., Moreno, A., Pennestri, M., Felser, A., Nuoffer, J. M., & Vermathen, P. 2015. Live monitoring of cellular metabolism and mitochondrial respiration in 3D cell culture system using NMR spectroscopy. *RSC Advances*, 5(5), 3731-3741.

IR Spectroscopy Tutorial: Amines. (2022). Recuperado de <https://www.orgchemboulder.com/Spectroscopy/irtutor/aminesir.shtml>

Ji X., Y. Li, J. Zheng, Q. Liu. 2011. Solvent effects of ethyl methacrylate characterized by FTIR. *Materials Chemistry and Physics* 130(3): 1151-1155.

Jiang Z.-M., L.-J. Wang, Z. Gao, B. Zhuang, Q. Yin, E.-H. Liu. 2019. Green and efficient extraction of different types of bioactive alkaloids using deep eutectic solvents. *Microchemical Journal* 145: 345-353.

Jinyi, L., Gao, N., & Tong, K. 2019. Mid-Infrared Tunable Laser-Based Broadband Fingerprint Absorption Spectroscopy for Trace Gas Sensing: A Review. *Applied Sciences*, 9(2), 338.

Klein-Júnior, L. C., Heyden, Y. V., & Henriques, A. T. (2016). Enlarging the bottleneck in the analysis of alkaloids: A review on sample preparation in herbal matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 66-82.

Khlebnikov A.I., I.A. Schepetkin, N.G. Domina, L.N. Kirpotina, M.T. Quinn. 2007. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15(4): 1749-1770.

Klimaczewski C.V., R. de Aquino Saraiva, D.H. Roos, A. Boligon, M.L. Athayde, J.P. Kamdem, N.V. Barbosa, J.B.T. Rocha. 2014. Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by

Fe (II)–citrate in rat liver mitochondria in vitro. *Industrial Crops and Products* 54: 240-247.

Lee E.-K., Y.-W. Jin, J.H. Park, Y.M. Yoo, S.M. Hong, R. Amir, Z. Yan, E. Kwon, A. Elfick, S. Tomlinson. 2010. Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. *Nature biotechnology* 28(11): 1213-1217.

Li X., N. Li, Z. Sui, K. Bi, Z. Li. 2017. An investigation on the quantitative structure-activity relationships of the anti-inflammatory activity of diterpenoid alkaloids. *Molecules* 22(3): 363.

Liu Y., J.B. Friesen, J.B. McAlpine, D.C. Lankin, S.-N. Chen, G.F. Pauli. 2018. Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of natural products* 81(3): 679-690.

Li, Z., Zhang, R., Xu, F., Yang, J., Zhou, L., & Mao, H. (2023). A Cell State Monitoring System with Integrated In Situ Imaging and pH Detection. *Sensors*, 23(23).

Martin S., D. Rose. 1976. Growth of plant cell (*Ipomoea*) suspension cultures at controlled pH levels. *Canadian Journal of Botany* 54(11): 1264-1270.

Mazarevica G., J. Diewok, J.R. Baena, E. Rosenberg, B. Lendl. 2004. On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy. *Applied spectroscopy* 58(7): 804-810.

Ministerio de Agricultura. 2022. 103 Hierbas Medicinales Certificadas por el Ministerio de Salud. Fundación de Comunicaciones, Capacitación y

Cultura del Agro (FUCOA). Recuperado de https://www.fucoa.cl/publicaciones/hierbas_medicinales/.

Nunes, N., Rosa, G., Ferraz Alves, S., Barreto, M. C., & Pinheiro de Carvalho, M. Â. (2020). Fatty acid composition, TLC screening, ATR-FTIR analysis, anti-cholinesterase activity, and in vitro cytotoxicity to A549 tumor cell line of extracts of 3 macroalgae collected in Madeira. *Journal of Applied Phycology*, 32.

Otto A. 1968. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei* 216(4): 398-410.

Paterova, A. V., Toa, Z. S. D., Yang, H., & Krivitsky, L. A. 2022. Broadband quantum spectroscopy at the fingerprint mid-infrared region. *arXiv*, 2202.01565.

Paradkar M.M., J. Irudayaraj. 2002. Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR–ATR spectroscopy. *Food Chemistry* 78(2): 261-266.

Pena-Pereira F., A. Kloskowski, J. Namieśnik. 2015. Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives. *Green Chemistry* 17(7): 3687-3705.

Peng, X., Du, J., Peng, M., Wang, Y., & Zou, J. 2016. Optimization of natural deep eutectic solvents for the extraction of chlorogenic acid from blueberry leaves. *Journal of Molecular Liquids*, 219, 1-10

PubChem. 2022. Boldine. Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Boldine>

Ratnadewi D. 2017. Alkaloids in plant cell cultures. *Alkaloids-Alternatives in Synthesis, Modification and Application*, IntechOpen: 1-23.

Reyes, S. J., Durocher, Y., Pham, P. L., & Henry, O. 2022. Modern Sensor Tools and Techniques for Monitoring, Controlling, and Improving Cell Culture Processes. *Processes*, 10(2), 189.

Rodríguez R., C. Marticorena, D. Alarcón, C. Baeza, L. Cavieres, V.L. Finot, N. Fuentes, A. Kiessling, M. Mihoc, A. Pauchard. 2018. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Botánica* 75(1): 1-430.

Rohman A., A. Windarsih, M.A.M. Hossain, M.R. Johan, M.E. Ali, N.A. Fadzilah. 2019. Application of near-and mid-infrared spectroscopy combined with chemometrics for discrimination and authentication of herbal products: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 9(3): 137-147.

Seigler D.S. 1998. *Plant secondary metabolism*. Springer Science & Business Media. p.

Simmonds, M. 2020. Revitalizing the science of traditional medicinal plants. *Nature*. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/d41586-020-01498-7>

Skoog D.A., F.J. Holler, T.A. Nieman. 2008. *Principios de análisis instrumental*.

- Stocchero M., E. Locci, E. d'Aloja, M. Nioi, E. Baraldi, G. Giordano. 2019. PLS2 in Metabolomics. *Metabolites* 9(3): 51.
- Sultana B., F. Anwar, M. Ashraf. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* 14(6): 2167-2180.
- Takla S.S., E. Shawky, H.M. Hammoda, F.A. Darwish. 2018. Green techniques in comparison to conventional ones in the extraction of Amaryllidaceae alkaloids: Best solvents selection and parameters optimization. *Journal of Chromatography A* 1567: 99-110.
- Tiernan, H., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 241, 118636.
- Torres-Vega J., S. Gómez-Alonso, J. Pérez-Navarro, E. Pastene-Navarrete. 2020. Green extraction of alkaloids and polyphenols from *Peumus boldus* leaves with natural deep eutectic solvents and profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS. *Plants* 9(2): 242.
- Vitale R., M. Bevilacqua, R. Bucci, A.D. Magrì, A.L. Magrì, F. Marini. 2013. A rapid and non-invasive method for authenticating the origin of pistachio samples by NIR spectroscopy and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 121: 90-99.

- Wolfender, J.-L., Marti, G., Thomas, A., & Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382, 136-164.
- Wold S., M. Sjöström, L. Eriksson. 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58(2): 109-130.
- Zanyar Movasaghi, S. R., & Rehman, D. I. ur. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy*
- Zhang Q., K.D.O. Vigier, S. Royer, F. Jérôme. 2012. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* 41(21): 7108-7146.