

**EVALUACION DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO *in vitro* DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DEL LIRIO PEQUEÑO (*Eucharis amazonica* Planchón & Linden) EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS**

**DORA ENITH TOBAR TOSSE**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
UNIDAD DE TOXICOLOGIA GENETICA Y CITOGENETICA  
POPAYÁN  
2004**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO *in vitro* DEL  
EXTRACTO DE ALCALOIDES DEL LIRIO PEQUEÑO (*Eucharis amazonica*  
Planchón & Linden) EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS**

**DORA ENITH TOBAR TOSSE**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
UNIDAD DE TOXICOLOGIA GENETICA Y CITOGENETICA  
POPAYAN  
2004**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO *in vitro* DEL  
EXTRACTO DE ALCALOIDES DEL LIRIO PEQUEÑO (*Eucharis amazonica*  
Planchón & Linden) EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS**

**DORA ENITH TOBAR TOSSE**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Bióloga.**

**Director  
Mag. SILVIO CARVAJAL**

**Asesor  
Ph.D. FABIO CABEZAS**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
UNIDAD DE TOXICOLOGIA GENETICA Y CITOGENETICA  
POPAYAN  
2004**

**NOTA DE ACEPTACION**

---

---

---

**DIRECTOR:**

---

**Mag. SILVIO MARINO CARVAJAL**

**JURADO:**

---

**Mag. PATRICIA EUGENIA VELEZ**

**JURADO:**

---

**Mag. MARTHA ISABEL ALMANZA**

**Fecha de sustentación: 11 de Febrero de 2004**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi madre Maricella y a mi padre Henry, por su incondicional amor y apoyo durante mi carrera, ya que sin ello no habría podido culminar esta etapa de mi vida.

A mis hermanos de los cuales he aprendido mucho como persona y me han dado su apoyo cuando lo he necesitado.

A mi abuelita Ana María, quien siempre me da ánimos, reza por mi ante Dios y me ha hecho comprender que la fe mueve montañas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia, especialmente a mis padres, quienes en el transcurso de mi vida y de mis estudios siempre han estado presentes de manera incondicional.

Al Mag Silvio Carvajal le agradezco inmensamente por su incondicional dedicación en la elaboración y culminación de mi trabajo como Director.

Agradezco al grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, a la Mag Luz Stella Hoyos por su apoyo cuando lo necesite, al Ph-D Fabio Cabezas y a sus estudiantes Catalina segura y Diana López por su asesoría en el método de extracción de alcaloides.

A la Universidad del Cauca, por permitir mi desarrollo profesional y al Departamento de Biología por su apoyo logístico y económico que hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

Finalmente agradezco a mis compañeros y amigos quienes me apoyaron en el campo personal y en el transcurso de mi trabajo, especialmente a Clara Muñoz, Soledad Ordoñez, Yaneth Rosero, Aleida Acosta, Diana Muñoz, Nancy Guerrero, Lorena Bolaños, Nogui Muñoz, Ingrid Reyes, yexania Arboleda, Paola Ocampo y Hector Manzano

## RESUMEN

Las plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae poseen propiedades de tipo medicinal; estas propiedades son atribuidas a principios activos de las plantas como los alcaloides. El lirio pequeño (*Eucharis amazonica*), es de gran interés dado que sus principios activos pueden ser potencialmente empleados en la terapia de enfermedades; pero, así como poseen efectos positivos sobre el organismo, también pueden generar efectos colaterales negativos al interactuar con el ADN, induciendo tumores cancerosos (Evans et al, 1986). Las sustancias que alteran la estructura del material genético, originando fragilidades (sustancias clastógenas), pueden tener una acción directa en el desarrollo del cáncer (Evans et al, 1986).

En la presente investigación se evaluó el efecto citotóxico y genotóxico del extracto de alcaloides de la especie vegetal *Eucharis amazonica* Planchón & Linden (Amaryllidaceae), obtenido mediante el método de extracción de alcaloides ácido-base. La prueba empleada para evaluar citotoxicidad fue el Índice Mitótico (IM), y para genotoxicidad, la de Aberraciones Cromosómicas (AC) en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

El extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* mostró un efecto citotóxico dosis respuesta a las concentraciones 1,4; 8,2 y 44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del extracto disminuyendo el IM respecto al control negativo o concentración 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y mostró un efecto genotóxico a la concentración 8,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respecto al control negativo (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Palabras claves: Amaryllidaceae, alcaloides, método ácido-base, citotoxicidad, Índice Mitótico (IM), genotoxicidad, Aberraciones Cromosómicas (AC).



## CONTENIDO

	Pág
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION</b>	<b>17</b>
<b>2.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>17</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>17</b>
<b>2.3 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	<b>19</b>
<b>3.1 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA</b>	<b>19</b>
<b>3.1.1 Clasificación Taxonómica</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2 Morfología y distribución</b>	<b>19</b>
<b>3.1.3 Usos medicinales</b>	<b>20</b>
<b>3.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LA FAMILIA AMARYLLIDACEA</b>	<b>21</b>
<b>3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ALCALOIDES</b>	<b>22</b>
<b>3.4 CITOTOXICIDAD</b>	<b>26</b>
<b>3.4.1 Índice Mitótico (IM)</b>	<b>26</b>
<b>3.5 GENOTOXICIDAD</b>	<b>26</b>
<b>3.5.1 Aberraciones Cromosómicas (AC)</b>	<b>28</b>
<b>3.5.2 Cultivo de linfocitos</b>	<b>28</b>

<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>29</b>
<b>4.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL</b>	<b>29</b>
<b>4.2 EXTRACCION DE ALCALOIDES</b>	<b>29</b>
<b>4.3 DETERMINACION DE CONCENTRACIONES</b>	<b>32</b>
<b>4.4 CULTIVO DE LINFOCITOS</b>	<b>32</b>
<b>4.4.1 Toma de muestra de sangre</b>	<b>33</b>
<b>4.4.2 Medio de cultivo</b>	<b>33</b>
<b>4.5 SIEMBRA</b>	<b>33</b>
<b>4.6 COSECHA</b>	<b>33</b>
<b>4.7 OBTENCIÓN DE EXTENDIDOS CELULARES Y TINCIÓN</b>	<b>34</b>
<b>4.8 EVALUACION DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE INDICE MITÓTICO (IM)</b>	<b>34</b>
<b>4.9 EVALUACION DEL EFECTO GENOTOXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (AC)</b>	<b>35</b>
<b>4.10 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>4.10.1 Citotoxicidad</b>	<b>36</b>
<b>4.10.2 Genotoxicidad</b>	<b>36</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>38</b>
<b>5.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y EFECTO CITOTÓXICO</b>	<b>36</b>
<b>5.2 EFECTO GENOTÓXICO DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE <i>Eucharis amazonica</i> PLANCHÓN &amp; LINDEN (AMARYLLIDACEAE)</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>54</b>

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO</b>	<b>62</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AC:** Aberraciones Cromosómicas.

**Q. tcos:** Quiebres cromatídicos.

**Q. somicos:** Quiebres cromosómicas

**IM:** Índice Mitótico

**P& L:** Planchón & Linden.

## LISTA DE TABLAS

	Pag
<b>Tabla 1.</b> Actividad biológica de alcaloides de especies vegetales de la familia Amaryllidaceae	23
<b>Tabla 2.</b> Concentración del extracto de alcaloide de <i>Eucharis amazonica</i> , incluido el control negativo o 0 mg/ mL.	32
<b>Tabla 3.</b> Formato de registro de Aberraciones Cromosómicas.	37
<b>Tabla 4.</b> Índice Mitótico (IM) identificado en la evaluación del extracto de alcaloides del lirio pequeño <i>Eucharis amazonica</i> (Amaryllidaceae). Por cada concentración se hicieron de 2 a 7 repeticiones.	38
<b>Tabla 5.</b> Efectos biológicos y/o citotóxicos de alcaloides de Amaryllidaceae y otras especies en diferentes modelos biológicos	45
<b>Tabla 6.</b> Aberraciones cromosómicas (AC) identificadas en las concentraciones alta, media, baja y concentración 0 $\mu$ g/mL o control negativo del extracto de alcaloide de <i>Eucharis amazonica</i> P & L (Amaryllidaceae).	46

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
<b>Figura 1.</b> <i>Eucharis amazonica</i> Planchón & Linden ( <b>Amaryllidaceae</b> ).	19
<b>Figura 2.</b> Algunos tipos estructurales de alcaloides encontrados en <i>Eucharis amazonica</i> .	22
<b>Figura 3.</b> Ruta crítica para evaluaciones genotóxicas de plantas medicinales en Cuba.	27
<b>Figura 4.</b> Instrumentos de laboratorio empleados en la extracción de alcaloides por el método ácido-base.	29
<b>Figura 5.</b> Diagrama de extracción de alcaloides por el método ácido-base (Estandarizado en el laboratorio de Fitoquímica de la Universidad del Cauca por Cabezas, 2001).	31
<b>Figura 6.</b> Protocolo de siembra de linfocitos humanos para Índice Mitótico(IM). (Estandarizado en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por Hoyos et al, 2002)	35
<b>Figura 7.</b> Protocolo de siembra de linfocitos humanos para Aberraciones Cromosómicas(AC). (Estandarizado en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por Hoyos et al, 2002)	35
<b>Figura 8.</b> Frecuencia absoluta del IM identificado en diferentes concentraciones del extracto de alcaloides de <i>Eucharis amazonica</i> ( <b>Amaryllidaceae</b> ). N = 54.	40
<b>Figura 9.</b> Correlación entre las diferentes concentraciones del extracto de alcaloide (rango de 1,4µg / mL a 700µg / mL, incluido el control negativo) y el Índice Mitótico(IM).	40
<b>Figura 10.</b> Metafases observadas en cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos humanos tratados con el extracto de alcaloides de <i>Eucharis amazonica</i> .	41
<b>Figura 11.</b> Correlación entre las concentraciones del extracto de alcaloides ( $\leq 44 \mu\text{g} / \text{mL}$ , incluido el control negativo) y el Índice Mitótico(IM).	42

- Figura 12.** Índice Mitótico (IM) identificado en la concentración del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* (**Amaryllidaceae**) Alta (44 $\mu$ g/mL), Media (8,2 $\mu$ g/m), baja (1,4  $\mu$ g/mL) y el control negativo en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos. 43
- Figura 13.** Aberraciones Cromosómicas (AC) identificadas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos bajo el efecto del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica*. 47
- Figura 14.** Número Promedio de Quiebres Cromatídicos identificados en 100 células por cultivo (9 cultivos) correspondientes a la dosis alta, media, baja y al control negativo del extracto de *Eucharis amazonica*. 48
- Figura 15.** Número Promedio de Quiebres Cromosómicos identificados en 100 células (9 cultivos) en la concentración (alta, media, baja y el control negativo). 48
- Figura 16.** Número Promedio de Aberraciones Cromosómicas (AC) totales identificados en 100 células (9 cultivos) en la concentración alta, media, baja y el control negativo. 49
- Figura 17.** Análisis de correlación positiva entre las Q. tcos y las concentraciones del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica*: 1,4 y 8,2 $\mu$ g/mL, incluido el control negativo (0,0  $\mu$ g/mL). 50
- Figura 18.** Bloques (tratamientos con el extracto de alcaloides cada dos semanas) de los experimentos en el análisis de Quiebres cromatídicos. 50













## LISTA DE ABREVIATURAS

**AC:** Aberraciones Cromosómicas.

**Q. tcos:** Fragilidades cromatídicos.

**Q. somicos:** Fragilidades cromosómicas

**IM:** Índice mitótico

**P& L:** Planchón & Linden.

## LISTA DE TABLAS

	Pag
<b>Tabla 1.</b> Actividad biológica de alcaloides de especies vegetales de la familia Amaryllidaceae	23
<b>Tabla 2.</b> Concentración del extracto de alcaloide de <i>Eucharis amazonica</i> , incluido el control negativo o 0 mg/ mL.	32
<b>Tabla 3.</b> Formato de registro de Aberraciones Cromosómicas.	37
<b>Tabla 4.</b> Índice Mitótico (IM) identificado en la evaluación del extracto de alcaloides del lirio pequeño <i>Eucharis amazonica</i> (Amaryllidaceae). Por cada concentración se hicieron de 2 a 7 repeticiones.	38
<b>Tabla 5.</b> Efectos biológicos y/o citotóxicos de alcaloides de Amaryllidaceae y otras especies en diferentes modelos biológicos	45
<b>Tabla 6.</b> Aberraciones cromosómicas (AC) identificadas en las concentraciones alta, media, baja y concentración 0 $\mu$ g/mL o control negativo del extracto de alcaloide de <i>Eucharis amazonica</i> P & L (Amaryllidaceae).	46

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
<b>Figura 1.</b> <i>Eucharis amazonica</i> Planchón & Linden ( <b>Amaryllidaceae</b> ).	19
<b>Figura 2.</b> Algunos tipos estructurales de alcaloides encontrados en <i>Eucharis amazonica</i> .	22
<b>Figura 3.</b> Ruta crítica para evaluaciones genotóxicas de plantas medicinales en Cuba.	27
<b>Figura 4.</b> Instrumentos de laboratorio empleados en la extracción de alcaloides por el método ácido-base.	29
<b>Figura 5.</b> Diagrama de extracción de alcaloides por el método ácido-base (Estandarizado en el laboratorio de Fitoquímica de la Universidad del Cauca por Cabezas, 2001).	31
<b>Figura 6.</b> Protocolo de siembra de linfocitos humanos para Índice Mitótico(IM). (Estandarizado en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por Hoyos et al, 2002)	35
<b>Figura 7.</b> Protocolo de siembra de linfocitos humanos para Aberraciones Cromosómicas(AC). (Estandarizado en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por Hoyos et al, 2002)	35
<b>Figura 8.</b> Frecuencia absoluta del IM identificado en diferentes concentraciones del extracto de alcaloides de <i>Eucharis amazonica</i> ( <b>Amaryllidaceae</b> ). N = 54.	40
<b>Figura 9.</b> Correlación entre las diferentes concentraciones del extracto de alcaloide (rango de 1,4µg / mL a 700µg / mL, incluido el control negativo) y el Índice Mitótico(IM).	40
<b>Figura 10.</b> Metafases observadas en cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos humanos tratados con el extracto de alcaloides de <i>Eucharis amazonica</i> .	41
<b>Figura 11.</b> Correlación entre las concentraciones del extracto de alcaloides ( $\leq 44 \mu\text{g} / \text{mL}$ , incluido el control negativo) y el Índice Mitótico(IM).	42

- Figura 12.** Índice Mitótico (IM) identificado en la concentración del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* (**Amaryllidaceae**) Alta (44 $\mu$ g/mL), Media (8,2 $\mu$ g/m), baja (1,4  $\mu$ g/mL) y el control negativo en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos. 43
- Figura 13.** Aberraciones Cromosómicas (AC) identificadas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos bajo el efecto del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica*. 47
- Figura 14.** Número Promedio de Quiebres Cromatídicos identificados en 100 células por cultivo (9 cultivos) correspondientes a la dosis alta, media, baja y al control negativo del extracto de *Eucharis amazonica*. 48
- Figura 15.** Número Promedio de Quiebres Cromosómicos identificados en 100 células (9 cultivos) en la concentración (alta, media, baja y el control negativo). 48
- Figura 16.** Número Promedio de Aberraciones Cromosómicas (AC) totales identificados en 100 células (9 cultivos) en la concentración alta, media, baja y el control negativo. 49
- Figura 17.** Análisis de correlación positiva entre las Q. tcos y las concentraciones del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica*: 1,4 y 8,2 $\mu$ g/mL, incluido el control negativo (0,0  $\mu$ g/mL). 50
- Figura 18.** Bloques (tratamientos con el extracto de alcaloides cada dos semanas) de los experimentos en el análisis de Quiebres cromatídicos. 50



























Tabla 1. Actividad biológica de alcaloides de especies vegetales de la familia Amaryllidaceae.

ESPECIE	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	COMPUESTO O EXTRACTO	REFERENCIA
<i>Brunsvigia littoralis</i>	Exhibieron actividad antimalárica con dos sepas de cultivo de <i>Plasmodium Falciparum</i> .	Licorina y 1,2-di-O-acetillicorina.	Campbell et al, 1998.
<i>Caliphruria subdentata</i>	Efecto genotóxico débil en cultivo <i>n vitro</i> de linfocitos humanos mediante pruebas de Intercambio de cromátidas hermanas(ICH)	Extracto crudo de alcaloides.	Acosta et al, 1995
<i>Clivia mimiata Regel</i>	Actividad antiviral. Inhibición del virus de la poliomielitis a la concentración de 1 µg/mL. Concentración >25microgramos es fue citotóxico	Licorina.	leven et al, 1982
<i>Crinum amabile</i>	Constituyentes antimalaricos.y citotóxicos	Licorina, augustina, crinamina.	Likhitayawuid et al, 1993
<i>Crinum asiaticum</i>	La calprotectina esta presente en los leucocitos polimorfonúcleares, e inducen inhibición del crecimiento y muerte celular apoptotica contra lineas celulares de tumor y fibroblastos normales. La calprotectina liberada a espacios extracelulares causa destrucción de tejido en condiciones severas inflamatorias.  En células de carcinoma mamario de ratón MM46 mostró una fuerte inhibición de la calprotectina inductora de citotoxicidad <i>in vitro</i> .  Molécula inhibitoria activa: inhibe la inducción de muerte celular apoptotica inhibe la inducción de muerte celular de MM46 por calprotectina e inhibe el efecto supresor de calprotectina en la sisntesis de ADN blanco a una concentración media efectiva de 0.1-0.5 µg/mL.	Extracto de agua caliente.  Licorina	Yui et al, 1995
<i>Eucharis grandiflora</i>	Indujo una morfologia plana en celulas K-ras-NRK después de 2-3 días de tratamiento, mientras que su efecto morfológico sobre células NRK fue más débil. Inhibe la síntesis de proteínas específicamente en cultivo de células ras-NRK.	Licorina.	Kushida et al, 1997
<i>Hippeastrum ananuca</i>	Mutagénica con el test de micronúcleos en medula ósea de ratón atribuido posiblemente a la presencia de grupos hidroxilo.	Hipeastidina, Maritidina y licorina.	Alarcón et al, 1983;. Cea et al, 1986.
<i>Hymenocallis littoralis</i>	Actividad inhibitoria de transcriptasa reversa de HIV.  Citotoxicidad <i>in vitro</i>	Litoralina.  Licorina y haemantamina.	Lin et al, 1995.

Continuación Tabla 1

ESPECIE	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	COMPUESTO O EXTRACTO	REFERENCIA
Especies del genero <i>Narcissus</i>	Inhibidor del acetil colinesterasa. En el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.	Galantamina.	Lopez et al, 2002
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	Inducir la dilatación de hipersensibilidad en los animales (Dermatitis daffodil)	1 fracción obtenida después de cromatografía preparativa de extracto de bulbos que contenía dos alcaloides: masonina y homolicorina.	Gude et al, 1988.
<i>Sprekelia formosissima</i> <i>Hymenocallis festalis</i> x	Actividad antiproliferativa sobre células de linfoma de ratón. Evaluación de la interacción con ADN y ARN revelaron que el efecto antiproliferativo resulta de su compleja formación con ARN.	Licorina y haemantamina	Hohmann et al, 2001
<i>Vinca</i>	Citotóxica: interrumpir la división celular en metafase.	vinca	. Nefic, 1999
Otras especies	Detención del crecimiento de las células HeLa a las concentraciones menores o iguales a 10 (-1)µM.	Dihidrolicorina, haemantamina, licorina, narciclasina, pretazetina y pseudolicorina.	Jimenez et al, 1976.
	Actividad Antiviral sobre el virus del herpes simplex; debida a la inhibición de la multiplicación, que podría ser parcialmente explicado como un bloqueo de la actividad de la ADN polimerasa viral.	Alcaloides biosintetizados de N-benzilfenetilamina y alcaloides sintetizados en laboratorio del grupo de apogalantamina.	Renard-Nozaki et al, 1989
	Estructuras de alcaloides que contienen dibenzasocina fueron citotóxicos a bajas concentraciones.	Alcaloides conteniendo en su estructura dibenzocina	
	Efecto profiláctico en modelos de artritis-adyuvant en ratas.		Mikami et al, 1999.
	Supresión significativa en el grado de hinchazón de patas tratadas-adyuvant y sin tratar	Licoricidinol	
	Efecto inhibitorio sobre la proteína de neutrofilos inductora de apoptosis , la calprotectina y sobre la producción de macrofagos TNF-alfa.	Licorina y licoricidino.	Yui et al, 2001

Continuación Tabla 1

ESPECIE	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	COMPUESTO O EXTRACTO	REFERENCIA
	En <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (IMA-V Pbx) y <i>Aureobasidium pullulans</i> (DBVA77) inhibió el crecimiento (59.73%). En <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (DBV 3812) y <i>Cryptococcus terreus</i> (CBS 1895) se estimulo el crecimiento (76%-140%)	Licorina	Garuccio y Arrigoni, 1989.
	Inhibe la biosíntesis del ascorbato	Licorina	Arrigoni et al, 1996



## INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo el hombre ha hecho uso de las plantas para curar enfermedades debido a los efectos favorables que producen en la fisiología del organismo. Las plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, que tienen propiedades tónicas, reconstituyentes, diuréticas y emolientes, son utilizadas en forma de infusiones y emplastos. Estas propiedades se atribuyen a principios activos de las plantas como los alcaloides. Entre las especies pertenecientes a esta familia, el lirio pequeño (*Eucharis amazónica*), es de gran interés dado que sus componentes pueden ser potencialmente empleados en la terapia de enfermedades; pero, así como poseen efectos positivos sobre el organismo, también pueden generar efectos colaterales negativos al interactuar con el ADN, induciendo tumores cancerosos (Evans et al, 1986).

Es de gran importancia emplear pruebas biológicas *in vivo* e *in vitro* para determinar el potencial genotóxico (mutagénico) de los alcaloides del lirio pequeño (*Eucharis amazónica*), para que se tomen las medidas necesarias cuando los principios activos de esta planta se usen en la terapia de enfermedades y alertar y prevenir a la población expuesta de los posibles riesgos que se corren en el consumo de especies vegetales pertenecientes a esta familia.

En la presente investigación se evaluó el efecto citotóxico y genotóxico del extracto de alcaloides de la especie vegetal *Eucharis amazonica* Planchón & Linden (Amaryllidaceae) empleando pruebas de citotoxicidad como el Índice Mitótico(IM), y de genotoxicidad como la prueba de Aberraciones cromosómicas (AC), en cultivo *in vitro* de linfocitos humanos.



## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las especies de plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae se emplean en medicina tradicional en forma de infusión, combinadas con plantas aromáticas, y en forma de emplastos para el tratamiento de enfermedades como la ictericia, asma, diarreas y hemorroides (Meerow, 1987). Estos efectos fisiológicos en el organismo se deben a la naturaleza química de sus principios activos, tales como los alcaloides.

Extractos de plantas medicinales han arrojado resultados positivos en estudios sobre el efecto embriotóxico y/o teratogénico, y se ha reportado efecto mutagénico y carcinogénico de los productos de origen vegetal encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población y el uso o exposición a sustancias químicas que son mutagénicas y/o carcinogénicas contenidas en muchas plantas medicinales de uso común (Sánchez et al, 2000)

Muchos de los alcaloides de *Eucharis amazónica* P & L de la familia Amaryllidaceae, tienen una importante actividad biológica en el campo medicinal; pero, al igual que poseen efectos positivos para el organismo, también pueden desencadenar efectos colaterales negativos si interactúan con el ADN, induciendo tumores cancerosos (Evans et al, 1986). Las sustancias que alteran la estructura del material genético, originando quiebres cromosómicos (sustancias clastógenas), pueden tener una acción directa en el desarrollo del cáncer (Evans et al, 1986).

Los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad de los alcaloides contribuyen a identificar su potencial efecto cancerígeno, para prevenir el posible riesgo de su uso en terapia medicinal, y alertar y prevenir a la población expuesta; por esta razón, en este trabajo se evaluó el extracto de alcaloides del lirio pequeño (*Eucharis amazonica* P & L) mediante pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

Para evaluar citotoxicidad se aplicó la prueba de índice Mitótico (IM), y para evaluar genotoxicidad se empleó la prueba de Aberraciones Cromosómicas (AC) en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

En esta investigación se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

1. Si el extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* P & Linden es citotóxico para los linfocitos humanos *in vitro*, entonces al tratarlos con diferentes

concentraciones del mismo, se espera que se deprima el índice Mitótico ( $H_1$ ), de lo contrario se espera que permanezca constante o se eleve ( $H_0$ ).

2. Si el extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* P & L es genotóxico para los linfocitos humanos, entonces, al tratarlos con tres concentraciones del mismo en cultivos *in vitro*, se incrementará significativamente la frecuencia de AC por célula con respecto al control negativo ( $H_1$ ), de lo contrario su frecuencia no se diferenciará significativamente del control negativo ( $H_0$ ).

## 2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico *in vitro* del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* P & L (Amaryllidaceae) en cultivo de linfocitos humanos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

**2.2.1** Evaluar el efecto citotóxico del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* P & L (Amaryllidaceae) y determinar las concentraciones alta, media y baja, necesarias para la prueba de genotoxicidad.

**2.2.2** Identificar si el extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* P& L (Amaryllidaceae) posee efecto genotóxico *in vitro* en cultivos de linfocitos humanos.

**2.2.3** Adquisición de conocimiento básico del método de extracción de alcaloides ácido-base.

### 2.3 JUSTIFICACION

La evaluación biológica de los alcaloides de especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, es de gran importancia, ya que se emplean en medicina tradicional y algunos de los alcaloides de la especie vegetal *Eucharis amazónica* P & L (lirio pequeño) pueden ser potencialmente útiles en la terapia de enfermedades.

Los alcaloides han sido considerados como toxinas naturales. Desde el punto de vista genotóxico, cantidades como  $\mu\text{M}$  (Micromol), producen mutaciones puntuales y cromosómicas en los organismos empleados en los bioensayos (Arnaiz, 1995).

Por lo tanto es necesario someter a una batería de pruebas biológicas al extracto de alcaloides del lirio pequeño (*Eucharis amazónica*), que permitan identificar su citotoxicidad y genotoxicidad en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

Con los resultados de este trabajo se pretende contribuir al estudio de alcaloides de diferentes especies vegetales, en la Unidad de Toxicología Genética y Citogenética, cuyo objetivo primordial es evaluar el efecto de factores ambientales

sobre el ADN que al interactuar con el pueden inducir a la carcinogénesis y de este modo prevenir a la población expuesta.

También se pretende que los resultados de este trabajo sean un gran aporte para contribuir a la verificación de la posible aplicación de alcaloides en el tratamiento de enfermedades.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 DESCRIPCION DE LA PLANTA

##### 3.1.1 Clasificación Taxonómica

Reino: Vegetal

Clase: Monocotiledónea

Orden: Asparagales

Familia: Amaryllidaceae

Nombre científico: *Eucharis amazonica*

Nombres comunes: Lirio pequeño, azucena, cebolleta, varitas de san José

Distribución: desde Bolivia hasta Guatemala, en vías de extinción.

Clasificada por: Alam W. Meerow, Universidad de Florida, USA

Sitio de colección: Centro de estudios ambientales, Tambito (Reserva Natural), Municipio de El Tambo (Cauca) a una altura de 1450 m.s.n.m., en julio de 2002.

##### 3.1.2 Morfología y distribución

Figura 1. *Eucharis amazonica* Planchón & Linden (**Amaryllidaceae**)



Las plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae constituyen una familia ampliamente distribuida, con poblaciones representativas en los géneros *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes*, *Hippeastrum* y *Crinum*. Se presenta distribución restringida de *Eucharis* y endemismo de *Caliphuria*, estos dos últimos en vías de extinción (Meerow, 1987).

Los bulbos son geófitos, terrestres, ocasionalmente epifíticas; bulbos tunicados, incompletamente formados en muy pocos géneros. El género *Eucharis* P & L consta de 17 especies caracterizadas por hojas pecioladas, márgenes de hojas usualmente onduladas; flores inclinadas y colgantes, tubo; perianto en forma de embudo o cañón campanulado o en forma de cráter; tubo cilíndrico abruptamente dilatado en el centro o por encima de la mitad de su longitud, curvo con 25-50 mm de longitud; copa estaminal conspicua, pigmentada basalmente de verde o amarillo, extendida desde el cuello del perianto o adnato a la porción dilatada del tubo; papilas astigmáticas multicelulares, con bulbos geófitos propios del bosque primario adaptadas a baja luminosidad y bosque húmedo tropical (Meerow, 1989).

El género *Eucharis* se encuentra adaptado a condiciones de baja luminosidad y alta humedad relativa, extendiéndose desde Guatemala hasta Bolivia. La mayor parte de las especies se encuentran como ya se dijo antes hacia el occidente de la cuenca del Amazonas y en las estribaciones orientales de la cordillera de los Andes desde el nivel del mar hasta los 2000 m.s.n.m., en los departamentos del Cauca, Valle, Nariño, Choco, Cundinamarca, Amazonas, Meta, Putumayo, Caquetá, Tolima, Quindío y Caldas (Meerow, 1989).

**3.1.3 Usos medicinales.** La aplicación alimenticia y medicinal de los vegetales se debe a la elaboración de dos clases de componentes químicos complejos: los principios inmediatos y los principios activos.

Los prótidos, glúcidos y lípidos (principios inmediatos), constituyen las sustancias que no ejercen una actividad farmacológica directa sobre las funciones fisiológicas del organismo animal, pero son imprescindibles para mantener su vida. Los vegetales que los elaboran y que constituyen la base nutritiva directa de los animales herbívoros, e indirecta, a través de éstos, de los carnívoros, reciben el nombre de plantas alimenticias.

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboran productos como principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico o la enfermedad. Este tipo de plantas constituyen la séptima parte de las especies (Muñoz, 1986).

Alarcón (1983) y Cea (1986), plantearon la posibilidad de que los alcaloides Hipeastidina, Maritdina y Licorina aislados por Muñoz, Pacheco y Silva (1992) de *Hippeastrum ananuca* (Amaryllidaceae), tengan valor terapéutico como agentes antineoplásicos (Alarcón et al, 1997).

El lirio pequeño (*Eucharis amazonica*), es ampliamente conocido en horticultura, aunque a menudo es confundido con el híbrido estéril taxón *E. x grandiflora* P & L. Desde el punto de vista etnobotánico, los bulbos triturados de especies de *Eucharis* han sido usados por poblaciones nativas, en forma de cataplasmas, para el dolor y tumores. Lewis (1986) describe el uso del mucílago de bulbos de *Eucharis* por los indios Jíbaro del Perú, para tratar manchas faciales y acné y puede ser potencialmente útil para el tratamiento de algunas enfermedades tropicales dada sus propiedades tónicas, reconstituyentes, diuréticas y emolientes (Triguna et al, 1990). Las raíces tuberosas de algunas especies de Amaryllidaceae se suministran en combinación con plantas aromáticas y amargas, en hemorroides, diarreas, ictericia y asma. En emplastos se utiliza para picazones y en enfermedades de la piel (Shri et al, 1989).

### **3.2 ANALISIS FITOQUÍMICA DE LA FAMILIA AMARYLLIDACEA**

Los glúcidos formados en la fotosíntesis constituyen los elementos de reserva de las plantas, que se almacenan en sus diferentes órganos y forman nuevas células vegetales. Parte de los mismos se transforman en compuestos secundarios: los lípidos y sus aceites; los terpenos y componentes aromáticos, de cuyo conjunto se forman las esencias y resinas; los heterósidos, combinaciones de azúcares y sustancias activas; los ácidos orgánicos.

Los alcaloides son componentes que contienen en sus moléculas sistemas heterocíclicos nitrogenados y poseen carácter básico. Por esta razón recibieron el nombre de alcaloides; aunque sus estructuras son de tipo divergente, pueden ser consideradas como derivadas de un precursor común, la norbeladina, por acoplamiento con el radical fenolato (Barton y Cohen, 1957). A pesar de sus diferentes estructuras, poseen propiedades fisiológicas análogas. Aparecen en diversos órganos, según la especie vegetal, y el contenido de alcaloides esta influenciado por las condiciones de crecimiento.

Para la obtención de alcaloides, a partir de tejidos vegetales por el método de extracción ácido-base estandarizado en el Laboratorio Fitoquímica de la Universidad del Cauca en el 2001 (Figura 4 y 5), se emplean disolventes como el etanol o metanol, los cuales extraen la mayor parte de los compuestos polares de la planta, obteniéndose así el extracto polar total. Posteriormente se realiza la despigmentación del extracto etanólico o metanólico con el fin de eliminar la clorofila y/o caroteno. Para la obtención del crudo de alcaloides, aprovechando su carácter básico, se emplea ácido clorhídrico (5%) el cual al reaccionar forma una sal de amonio soluble en solventes polares. Luego se adiciona hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH)(10%) en una reacción de óxido reducción originando agua, liberando los alcaloides (crudo de alcaloides) y NH<sub>4</sub>Cl (Domínguez, 1973)

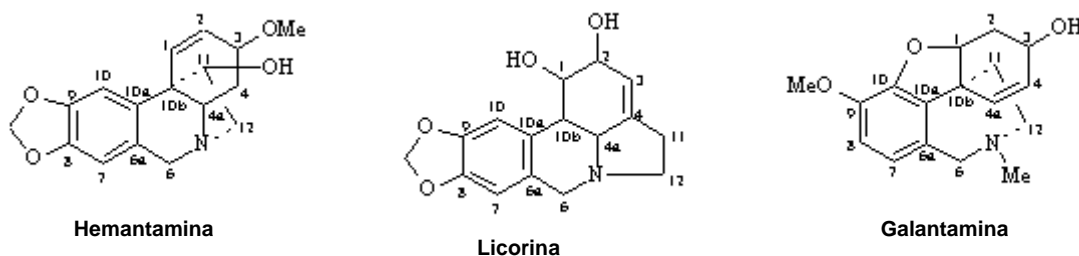
Para separar entre si los diversos alcaloides que pueden coexistir en una disolución, se recurre a cristalizaciones fraccionadas y repetidas de sus sales o a

la separación por técnicas cromatográficas.

Los alcaloides de las Amaryllidaceae son de tipo isoquinólico que poseen una estructura base C6-C1-N-C2-C6, contienen un átomo de nitrógeno secundario, terciario o cuaternario y son bases moderadamente débiles; el número de átomos de carbono está entre 16 y 20, dependiendo de los sustituyentes del sistema anillado.

De bulbos y hojas secas de especies florecidas de *Eucharis amazonica* (**Amaryllidaceae**) se han aislado 13 alcaloides: licorina, ismina, trisferidina, tazetina, 3-epimacronina, galantamina, 3-O-metilgalantamina, hemantamina, vitatina, 8-O-metilmaritidina, 7-methoxyoxoasoinina, 6-O-Methylpretazettine y apohaemanthamine (Cabezas et al, 2002) (Figura 2).

Figura 2. Algunos tipos estructurales de alcaloides encontrados en *Eucharis amazonica*.



Fuente: CABEZAS, F. Estudio químico de alcaloides en *Crinum Kunthianum* ROEM y *Eucharis amazonica* PLANCHON EX LINDEN, familia Amaryllidaceae. Cali, 2002, 282p. Tesis Doctoral. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Pag 19.

### 3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ALCALOIDES

En la Tabla 1, se resumen algunas de las actividades biológicas que se han identificado en los alcaloides presentes en especies vegetales pertenecientes a la familia Amaryllidaceae.









### 3.4 CITOTOXICIDAD

Es la capacidad de un agente químico, físico o biológico de afectar la morfología o fisiología celular, expresándose en alteraciones del ciclo de las células y, en casos extremos, en la muerte de las mismas.

**3.4.1 Índice Mitótico (IM).** Es la relación entre el número de mitosis y el número total de células analizadas; el resultado de esta prueba permite comparar los datos del grupo control con los del grupo experimental para establecer si el químico en estudio causa o no, bloqueo del ciclo celular como consecuencia de su efecto citotóxico (Rojas et al, 1993).

$$IM = \frac{\text{No de células en metafase}}{\text{No Total de células analizadas}}$$

### 3.5 GENOTOXICIDAD

Es la capacidad de un agente químico, físico o biológico para inducir efectos tóxicos, letales o heredables al material genético nuclear o extranuclear en células somáticas y germinales.

El resultado de Las pruebas para evaluar genotoxicidad sirve para predecir carcinogenicidad y su valor radica en que otros estudios confirman la teoría de la mutación somática en el proceso del cancer (Straus, 1981 y Crawford, 1979) y porque muchos compuestos que han resultado ser carcinogénicos en roedores son genotóxicos en pruebas cortas *in vitro*.

En el estudio genotóxico se persigue, como objetivo fundamental, evidenciar qué tipo y a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por el compuesto evaluado. Según Sánchez et al (2000), los niveles de organización que se conocen son:

Mutación génica (nivel I)

- Prueba de Ames (*salmonella typhimurium*).
- Prueba de mutaciones puntuales en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster*.
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART).

Mutación cromosómica (nivel II)

- Prueba citogenética *in vitro* en células de mamíferos.
- Prueba citogenética *in vivo* en ratones.

- Prueba citogenética *in vivo* en ratones (CHO).
- Prueba de dominantes letales en ratones.

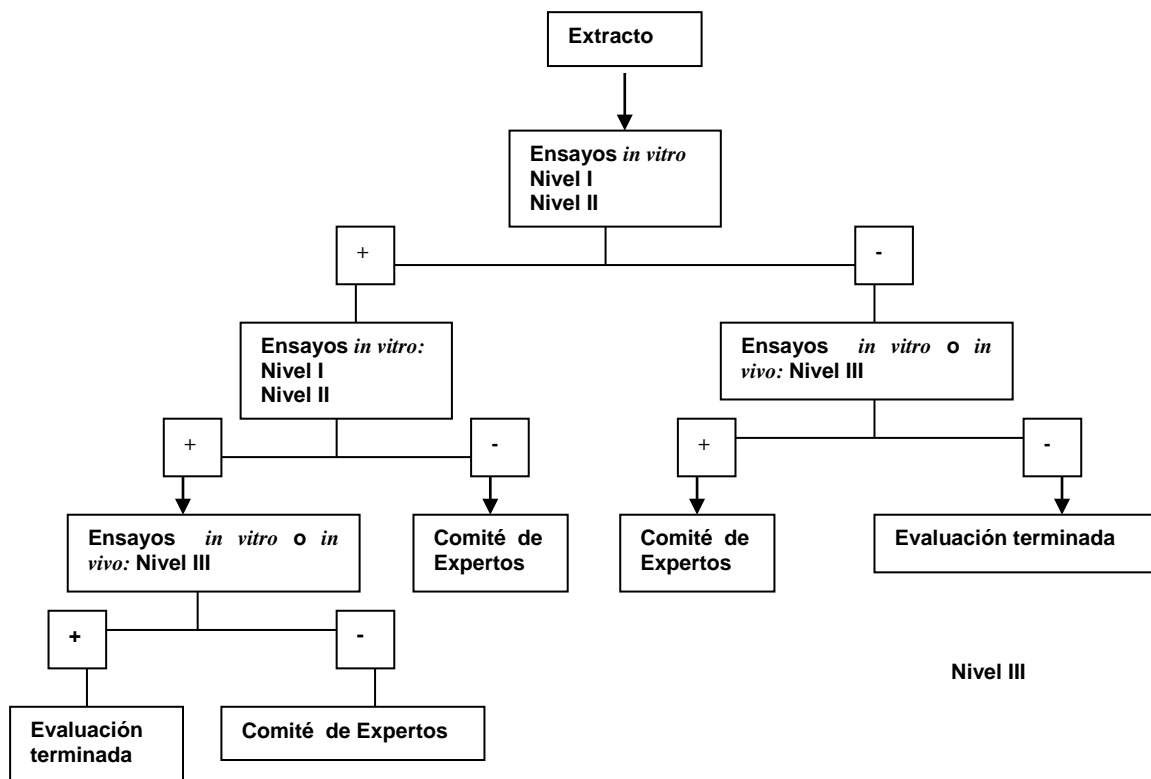
#### Daño primario del ADN (nivel III)

- Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidullans*.
- Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Prueba de mutación y recombinación mitótica en *Drosophila melanogaster* (SMART).
- Prueba de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) *in vitro* con células de mamífero.

#### Transformaciones celulares (nivel IV)

- Prueba de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones.

Figura 3. Ruta crítica para evaluaciones genotóxicas de plantas medicinales en Cuba.



Fuente: SANCHEZ, A. et al. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. En: Rev Cubana Farm 2000; 34(1): 34-43. Pag 38.

**3.5.1 Aberraciones Cromosómicas (AC).** La aberración cromosómica es un cambio del número y/o la estructura de los cromosomas. Determina daños a nivel cromosómico originados en lesiones primarias en el ADN, por reparaciones mal hechas o errores en la replicación; por lo cual incluye daños genéticos de gran magnitud. Esta prueba no detecta daño a nivel genico (de un gen) pero si monitorea las anomalías que se presentan en el genoma entero. Las aberraciones cromosómicas han sido altamente correlacionadas con serias consecuencias biológicas por encontrarse en células cancerosas, pérdidas fetales y algunos tipos de enfermedades genéticas (Rowley, 1986; Yamamoto et al, 1982; Jacobs et al, 1974), es por esta razón que esta prueba ha sido validada para la predicción de problemas potenciales de salud en poblaciones expuestas a agentes peligrosos (Marvin, 1994 y AU, 1991). La prueba de aberraciones cromosómicas es una de las más sensitivas y relevantes para evaluar la actividad genética de un determinado agente y también ha demostrado ser eficiente en la identificación de agentes carcinogénicos y no carcinogénicos (Aulleta y Ashby, 1988; Ashby, 1978).

Las aberraciones cromosómicas comprenden: Quiebres cromosómicos (Q. somicos), Q cromatídicos (Q. tcos), deleciones, inversiones y translocaciones que generan figuras trirradiales, tetrarradiales, etc.

La evaluación se hace mediante el registro de 100 metafases en primer ciclo de división celular contando la cantidad y tipo de AC tales como quiebres cromosómicos y cromatídicos. El resultado de AC se expresa como el número promedio de AC/100 células (Prueba estandarizada en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca por Hoyos et al, 2002).

**3.5.2. Linfocitos humanos en cultivo.** Los linfocitos son células de fácil adquisición y de inducción a la proliferación constituyendo un excelente tipo de células para ser manipuladas en el laboratorio. Crecen fácilmente en cultivo y se encuentran en la circulación en un estado no proliferativo (Go) por lo cual requieren la presencia de fitohemaglutinina (mitogeno) en cultivos a corto tiempo.

Las lesiones primarias inducidas experimentalmente *in vitro*, en el ADN de los linfocitos, se expresan en daños irreversibles como aberraciones cromosómicas después de pasar por una fase de síntesis del ciclo celular.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 OBTENCION DEL MATERIAL VEGETAL

El lirio pequeño (*Eucharis amazónica*), fue recolectado en la Reserva Natural de Tambito en el municipio de El Tambo del departamento del Cauca, a una altura de 1450 m.s.n.m. en el mes de junio de 2002.

### 4.2 EXTRACCION DE ALCALOIDES

La extracción de alcaloides por el método de extracción ácido - base se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad del Cauca (2002).

A partir de 163,85 g (peso seco) de *Eucharis amazónica* se realizó la extracción de alcaloides, por el método ácido-base que se resume en la figura 5.

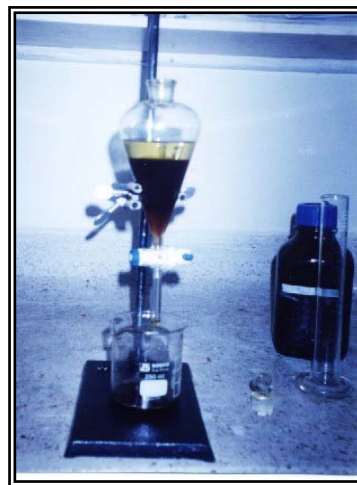
A partir de la extracción con Etanol al 96%, utilizando el extractor soxhet se obtuvieron todas las sustancias solubles de la planta, según el diagrama de extracción mostrado en la figura 5.

Como se describió anteriormente (marco teórico) el crudo de alcaloides se obtuvo aprovechando su carácter de base débil con un  $pK_a > 9$ , que al reaccionar con HCL (5%) se neutralizan formando una sal de amonio (soluble en solventes polares) y se aíslan del resto de metabolitos secundarios. La sal de amonio, al reaccionar con  $NH_4OH$  (10%), produce agua,  $NH_4Cl$  y alcaloides. El crudo de alcaloides se obtuvo en la fase III (figura 4 y 5)

Figura 4. Instrumentos de laboratorio empleados en la extracción de alcaloides por el método ácido-base



Sistema de Extracción sólido - líquido con soxhet



Embudo de decantación

Continuación Figura 4.



**SISTEMA DE EVAPORACION DE SOLVENTES**  
BAÑO DE AGUA (BUCHI WATERBATH  
B-480).  
ROTAVAPOR R-124.  
CONTROLADOR B-721  
BOMBA VACIO: b- 169  
1990

Rotaevaporador



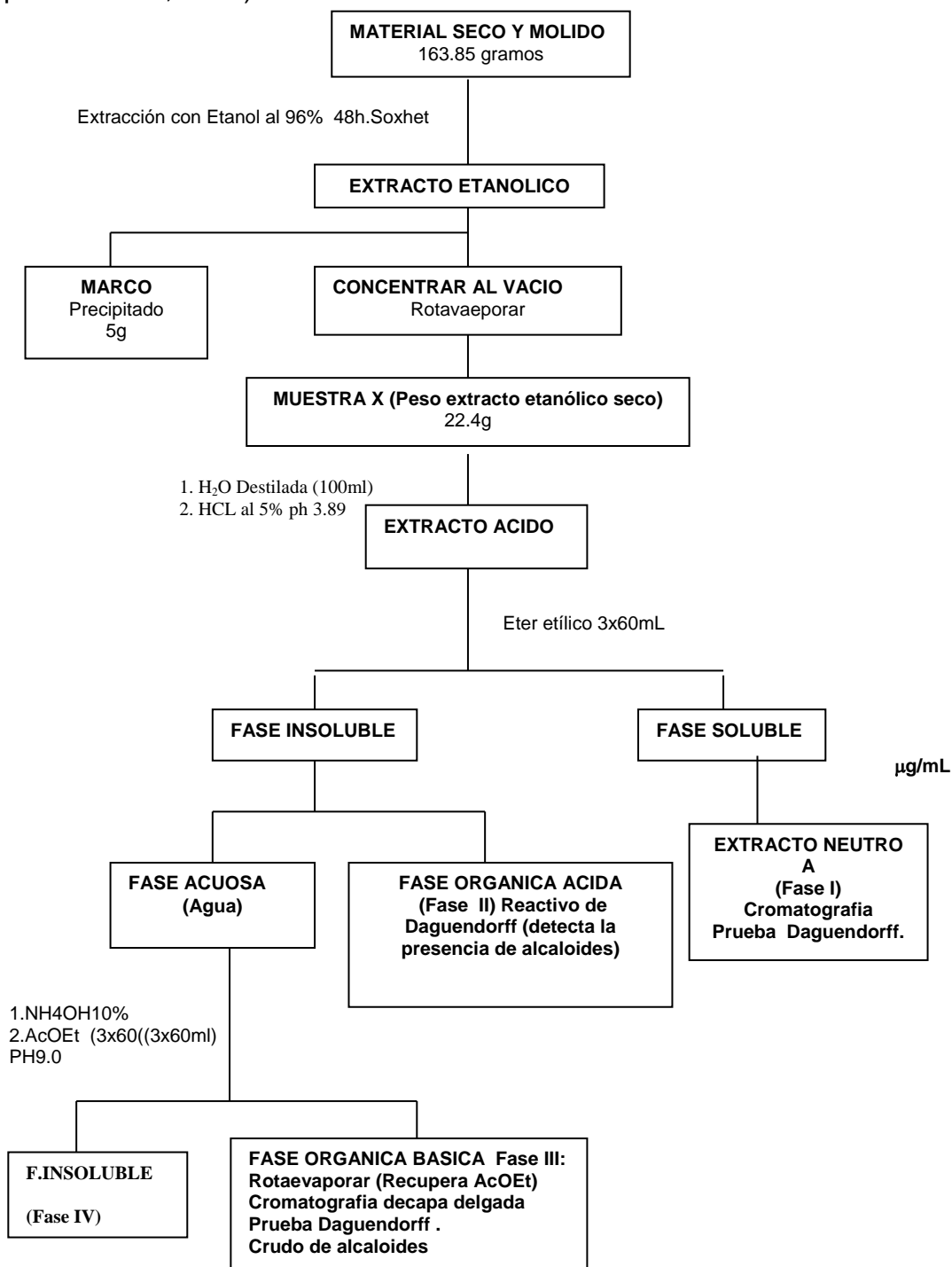
Cromatografía. de capa delgada



Fase III. Crudo de alcaloides



Figura 5. Diagrama de extracción de alcaloides por el método de extracción ácido-base (Estandarizado en el laboratorio de Fitoquímica de La Universidad del Cauca por Cabezas, 2001).



Fuente: Cabezas F. Estudio químico de alcaloides en *Crinum Kunthianum* ROEM y *Eucharis amazonica* PLANCHON & LINDEN, familia Amaryllidaceae. Cali, 2002, 282p. Tesis Doctoral. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias, Departamento de Química.

### 4.3 DETERMINACION DE CONCENTRACIONES

De los 655.7mg de crudo de alcaloides previamente obtenidos, se tomaron 15 mg y se disolvieron en 2 mL de agua estéril, quedando a una concentración de 7mg/ mL, a partir de la cual se hicieron diluciones empleando factores de dilución de:  $\frac{1}{2}$ ; 5,5/6,3; 5/5,7 Y 4/4,6 para obtener las concentraciones que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración del crudo de alcaloide de *Eucharis amazonica*, incluido el control negativo o 0 mg/ mL.

SOLUCION DE TRABAJO: mg/mL	CONCENTRACION EN EL MEDIO $\mu$ g/mL
Control negativo (agua)	0
0,014	1,4
0,027	2,7
0,055	5,5
0,0825	8,2
0,11	11
0,219	22
0,258	25,8
0.295	29,5
0,337	33,7
0,385	38,5
0,4375	44
0,875	88
1,75	175
3,5	350
7	700

### 4.4 CULTIVO DE LINFOCITOS

La evaluación citotóxica y genotóxica del extracto de alcaloides se realizó en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, obtenidos de sangre periférica humana heparinizada (Hoyos et al, 2002).

**4.4.1 Toma de muestra de sangre.** Con una aguja hipodérmica estéril, se tomo de 5 a 10mL de sangre del antebrazo, de la estudiante de biología Dora Tobar durante todo el experimento.

**4.4.2 Medio de cultivo.** El medio de cultivo empleado para la siembra de linfocitos contiene, Medio RPMI 1640 (Sigma), Suero bovino fetal al 10%(Sigma), L- glutamina a una concentración de 2 mM (Sigma), antibióticos (Penicilina, streptomycin) (Sigma).

Para la preparación de un litro de medio de cultivo, se pesan 10,4 g de medio RPMI-1640 y se disuelven en 800mL de agua estéril, se adiciona 2 g de NaHCO<sub>3</sub> y se completa con 200 mL de agua estéril; se agita todo el tiempo para una completa dilución, se lleva a un pH entre 7,15 y 7,20 con HCL-1N. Posteriormente se adiciona 1 mL de penicilina-streptomycin a las concentraciones finales de 100U/mL y 100 µg/mL respectivamente. Finalmente el medio de cultivo se esteriliza en un filtro miliporo 0.22 µm y en cámara de flujo laminar (FLOW12LV 16394). (Hoyos et al, 2002).

#### **4.5 SIEMBRA.**

La siembra de linfocitos se realiza en tubos de centrifuga estériles de 15mL (Falcon) en los cuales se distribuye el medio completo a razón de 4,5mL/tubo o 9mL/tubo, todo bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar. Luego se agrega 0,5mL o 1mL (cultivos de 5mL o 10mL) de sangre heparinizada a cada tubo de ensayo y por último se agrega Fitoheماغlutinina (Sigma. Inductor mitótico) a la concentración final en el medio de 10µg/mL. Los cultivos se colocan a incubar a una temperatura de 37°C durante 50h.

A las 24 h de transcurrida la siembra, los tubos de cultivo se retiran de la incubadora (MEMMERT BM800) y en la cámara de flujo laminar se adicionan las diferentes concentraciones del extracto de alcaloides y se colocan de nuevo a incubar. A las 48 h después de la siembra se agrega colcemid (Sigma. Detiene células en metafase) a una concentración final en el medio de 0,1 µg/mL y a las 50 horas de iniciado el cultivo se realiza la cosecha de las células (Hoyos et al, 2002)

#### **4.6 COSECHA.**

La cosecha es el procedimiento por el cual se aislan los linfocitos del resto de componentes celulares que se encuentran en la sangre total .

A las 50 h después de la siembra (2 horas después de la adición del colcemid) se centrifugan (Centrifuga SORVALL T6000B DUPONT) los cultivos a 1200 rpm por 8

minutos y se remueve el sobrenadante con pipeta pasteur; se dejan 0,5 mL de sobrenadante, cuidando de no perturbar el botón celular.

EL botón celular se resuspende agitando los tubos suavemente con los dedos.

A cada tubo de cultivo se agrega 6 mL de solución hipotónica (0,075 M KCL), previamente calentada a 37°C, por las paredes del tubo y se agita suave y permanentemente. Las células se resuspenden cuidadosamente y se pipetea suavemente para destruir los grumos. La suspensión celular se deja durante 30 minutos a 37°C (en baño María o incubadora).

Después de los 30 minutos de la hipotonización, se agrega con fuerza 1 mL de fijador Carnoy (1:3 Acido Acético - Metanol) dentro de cada tubo, se mezcla bien y se deja reposar por un minuto (prefijación). La mezcla se centrifuga a 1200 rpm por 8 minutos y el sobrenadante se remueve y se resuspende el botón celular.

La fijación se realiza adicionando 5 mL del fijador carnoy y colocando en refrigeración durante 22 minutos. La suspensión celular se centrifuga a 2000 rpm durante 4 minutos (modificación del protocolo estandarizado por Hoyos et al 2002), se remueve el sobrenadante y se repite el proceso 2 veces. Después de la tercera centrifugación se remueve el sobrenadante dejando una pequeña cantidad (0,2 a 0,5 mL) de fijador.

El botón celular se resuspende y se agrega fijador hasta obtener una suspensión homogénea de células con apariencia ligeramente lechosa.

#### **4.7 OBTENCIÓN DE EXTENDIDOS CELULARES Y TINCION**

Se toma un portaobjetos frío y humedecido en ácido acético al 60% previamente refrigerado, y se deja caer de 3 a 5 gotas de suspensión celular en diferentes partes de la placa usando una pipeta pasteur. Los portaobjetos se colocan sobre una toalla de papel formando un ángulo de 45° para la obtención de un buen extendido.

Los portaobjetos se colocan durante 6 minutos sobre una plancha caliente a 40°-45° C para el secado.

Transcurridos tres días los portaobjetos se tiñen con el colorante Giemsa a una concentración del 10% durante 10 minutos. (Hoyos et al, 2002)

#### **4.8 EVALUACION DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE INDICE MITÓTICO (IM)**

Las diferentes concentraciones del extracto de alcaloides (incluido el control negativo o concentración 0µg/mL) se sometieron a la prueba de IM con el fin de identificar su citotoxicidad y determinar las concentraciones alta, media y baja necesarias para realizar las pruebas de genotoxicidad. El protocolo que se aplicó para la prueba de IM se describió previamente y se resume en la Figura 6.

Figura 6. Protocolo de siembra de linfocitos humanos para Índice Mitótico (IM). (Estandarizado en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por Hoyos et al, 2002)



En el experimento de citotoxicidad se hicieron de 2 a 3 cultivos de 5mL por concentración del extracto de alcaloides (Tabla 2).

Los portaobjetos con los extendidos celulares de cada concentración, se analizaron en el microscopio (40x) para la determinación del índice mitótico (IM).

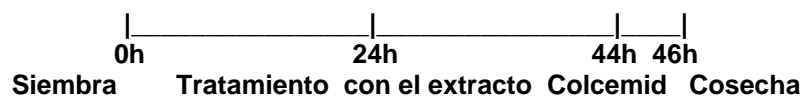
La concentración del extracto de alcaloides que no disminuyó significativamente el IM respecto del grupo control, se eligió como la concentración baja; la concentración del extracto de alcaloides que disminuyó el IM hasta un rango del 60-72% respecto del grupo control, se eligió como la concentración media y la concentración del extracto de alcaloides que disminuyó el IM hasta un 20% respecto del grupo control se eligió como la concentración alta.

Escogidas las concentraciones alta, media y baja de citotoxicidad se procedió a evaluar el efecto genotóxico.

#### **4.9 EVALUACION DEL EFECTO GENOTOXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (AC)**

Las concentraciones alta, media y baja del extracto de alcaloides se sometieron a evaluación genotóxica mediante la prueba de AC (Fig 7), empleando como control positivo Mitomicina (Sigma. Agente clastogénico) y como control negativo el agua.

Figura 7. Protocolo de siembra de linfocitos humanos para Aberraciones cromosómicas (AC). (Estandarizado en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por Hoyos et al, 2002)



Se realizaron cultivos de 10mL: 9mL de medio de cultivo completo, 1mL de sangre (16 gotas), 0,2 mL de Fitoheماغلوتينina (concentración final de 10  $\mu$ /mL). A las 24h de realizada la siembra se hizo el tratamiento con las diferentes concentraciones del extracto, a la 44h se agregó colcemid a una concentración final de 0,0625 $\mu$ g/mL y a las 46h se realizó la cosecha. Los portaobjetos con los extendidos celulares se tiñeron con el colorante Giemsa. Para el registro citogenético, se analizaron 100 metafases.

## **4.10 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

**4.10.1 Citotoxicidad.** En cada experimento se realizaron de 2 a 3 cultivos por cada concentración del extracto, incluido el control negativo. Cada experimento se repitió de 2 a 3 veces. De cada cultivo se gotearon tres portaobjetos y de cada placa se leyeron aproximadamente 700 células. Esto implicó que de cada cultivo se analizaron aproximadamente 2000 células.

En los experimentos antes descritos para la evaluación de citotoxicidad, se obtuvieron en total 54 datos, es decir de 2 a 7 repeticiones por tratamiento.

Los datos se registraron en una tabla. Para los datos obtenidos de IM en las diferentes concentraciones del extracto de alcaloides, se aplicó el tests estadístico de normalidad de Kolmogorov-smirnov y el análisis no paramétrico de correlación de Spearman.

**4.10.2 Genotoxicidad.** En cada experimento de AC se hicieron 20 cultivos (3 por tratamiento, incluido el control negativo y positivo), por cada cultivo se gotearon tres portaobjetos y por cada placa se analizarán aproximadamente 33 metafases; es decir un total 100 metafases por cultivo. El experimento se repitió tres veces (bloques) por lo cual se obtuvieron 45 datos (9 por tratamiento). El registro de los resultados se realizó como se indica en la Tabla 3.

Para el análisis estadístico se aplicó la prueba no paramétrica de KRUSKAL-WALLIS y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan. El análisis también se hizo por correlación y regresión lineal e identificación de la curva de mejor ajuste.

Como los tres experimentos se realizaron en tiempos diferentes (cada 2 semanas), se hizo análisis mediante ANOVA para bloques aleatorizados o la prueba no paramétrica de Fredman.

Los análisis se hicieron con el programa estadístico SPSS (Paquete estadístico Versión 7,5. Obtenido en la Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de La Educación de La Universidad del Cauca).

Tabla 3. Formato de Registro de Aberraciones Cromosómicas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Repetición</b>	<b>No. Metafases</b>	<b>Células aberrantes</b>	<b>Q. tcos.</b>	<b>Q. somicos.</b>	<b>Gap Tcos.</b>	<b>Gap somicos.</b>	<b><u>Aberraciones</u> células</b>
0 $\mu$ / mL	9R							
1,4 $\mu$ / mL	9R							
8,2 $\mu$ / mL	9R							
44 $\mu$ / mL	9R							
MMC 0,0625 $\mu$ g/ mL.	9R							

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 OBTENCION DEL EXTRACTO Y EFECTO CITOTÓXICO.

A partir de 815 gramos de peso fresco de la planta (flores, hojas, tallos y bulbos) de *Eucharis amazónica* P & L (Amaryllidaceae), se obtuvieron 655,7 mg de extracto de alcaloide, mediante el método de extracción ácido-base para alcaloides; lo cual equivale a un rendimiento del 0,08%.

Cabezas en el 2001, identificó los alcaloides presentes en esta mezcla, encontrando: licorina, ismina, trisferidina, tazetina, 3-epimacronina, galantamina, 3-O-metilgalantamina, hemantamina, vitatina, 8-O-metilmaritidina, 7-methoxioxoasoanina, 6-O-Metilpretazetina y apohaemantamina (los tres últimos aislados por primera vez de fuente natural).

El IM obtenido en las diferentes concentraciones del extracto de alcaloide, incluido el control negativo (agua o concentración 0,0 $\mu$ g / mL). Se muestra en la Tabla 4 y Figura 8.

Tabla 4. Índice Mitótico (IM) identificado en la evaluación del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* (Amaryllidaceae). Por cada concentración se hicieron de 2 a 7 repeticiones.

CONCENTRACIÓN $\mu$ g / mL ( medio de cultivo)	Número de Metafasas	Número de Células	Índice Mitótico (IM)
0	84	2000	0,042
	56	2003	0,028
	38	2021	0,019
	38	2002	0,019
	135	2000	0,067
	118	2000	0,059
	100	2003	0,050
1,4	94	2003	0,047
	88	2322	0,038
	48	2000	0,024
	26	2000	0,013
	92	2113	0,043
	87	2013	0,043
	124	2000	0,062
2,7	77	2000	0,038
	91	2014	0,045
	36	2001	0,018
	35	2002	0,017

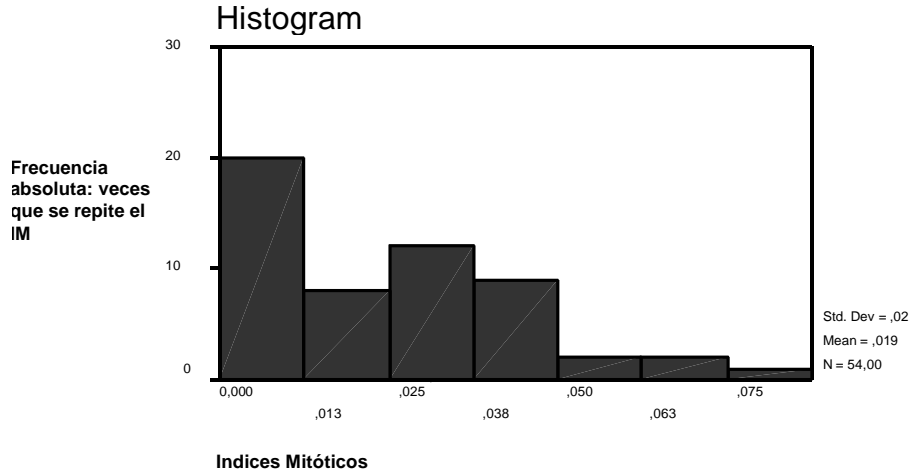


Continuación Tabla 4.

CONCENTRACIÓN µg / mL ( medio de cultivo)	Número de Metafases	Número de Células	Indice Mitótico (IM)
<b>5,5</b>	73	2031	0,036
	81	1948	0,042
	36	2001	0,018
	35	2002	0,017
<b>8,2</b>	53	2004	0,026
	59	2000	0,029
	63	2005	0,031
<b>11</b>	69	1756	0,039
	77	2009	0,027
	10	2010	0,005
	14	2006	0,007
<b>21,9</b>	50	2000	0,025
	15	2005	0,007
	6	2003	0,003
<b>25,8</b>	5	2034	0,002
	7	2001	0,003
<b>29,5</b>	14	2005	0,007
	9	2007	0,004
<b>33,7</b>	3	2000	0,001
	6	2075	0,003
<b>38,7</b>	3	2023	0,001
	5	2025	0,002
<b>44</b>	2	2000	0,001
	6	2075	0,003
	5	2011	0,002
	29	2000	0,014
	23	1810	0,013
	30	2004	0,015
<b>87,5</b>	0	2000	0,000
	0	2000	0,000
<b>175</b>	0	2000	0,000
	0	2000	0,000
<b>350</b>	0	2000	0,000
	0	2000	0,000
<b>700</b>	0	2000	0,000
	0	2000	0,000

Los datos obtenidos de IM para las diferentes concentraciones del extracto de alcaloides, no se ajustan a la curva normal (según el tests de normalidad de Kolmogorov-smirnov) como se muestra en la Figura 8, por lo cual se procedió a realizar análisis no parametricos.

Figura 8. Frecuencia absoluta del Índice Mitótico identificado en diferentes concentraciones del extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica* (Amaryllidaceae). N= 54



Mediante el análisis de correlación de Spearman (Prueba no paramétrica), se identificó asociación lineal negativa entre la concentración del extracto y el índice mitótico (relación dosis efecto) ( $Rho = -0,822$ ;  $p = 0,000$ ) (Figura 9). Se muestra claramente que a concentraciones mayores de  $44\mu\text{g}/\text{mL}$  se empieza a notar un efecto citotóxico severo, dado que el Índice Mitótico tiende a ser 0,00. Para identificar el verdadero impacto de las concentraciones del extracto  $\leq 44\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre el IM, se suprimieron del análisis las concentraciones  $> 44\mu\text{g}/\text{mL}$ , obteniéndose el resultado mostrado en la figura 10 en la cual se observa una clara depresión del IM a medida que se incrementa la concentración del extracto de alcaloide (asociación lineal negativa).

Figura 9. Correlación entre las diferentes concentraciones del extracto de alcaloide (rango de 1,4 a  $700\mu\text{g}/\text{mL}$ , incluido el control negativo) y el IM.

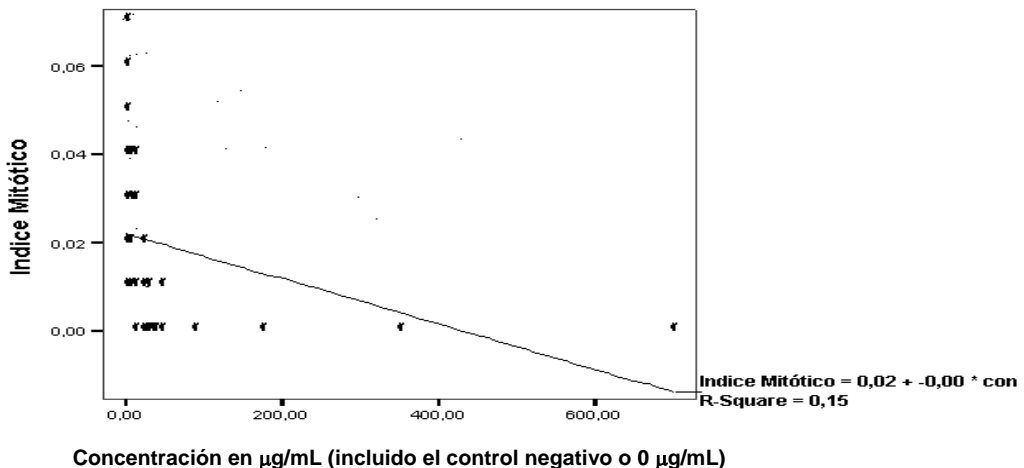
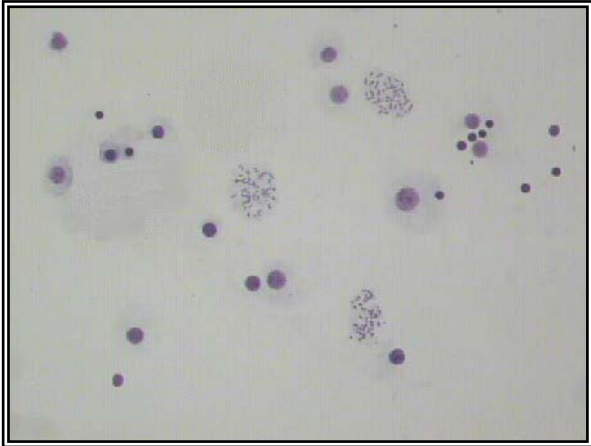
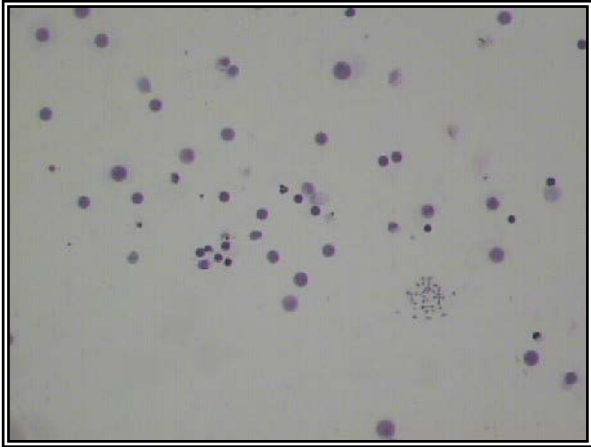


Figura 10. Metafases observadas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos tratados con el extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica*.



Control negativo: Agua 20X

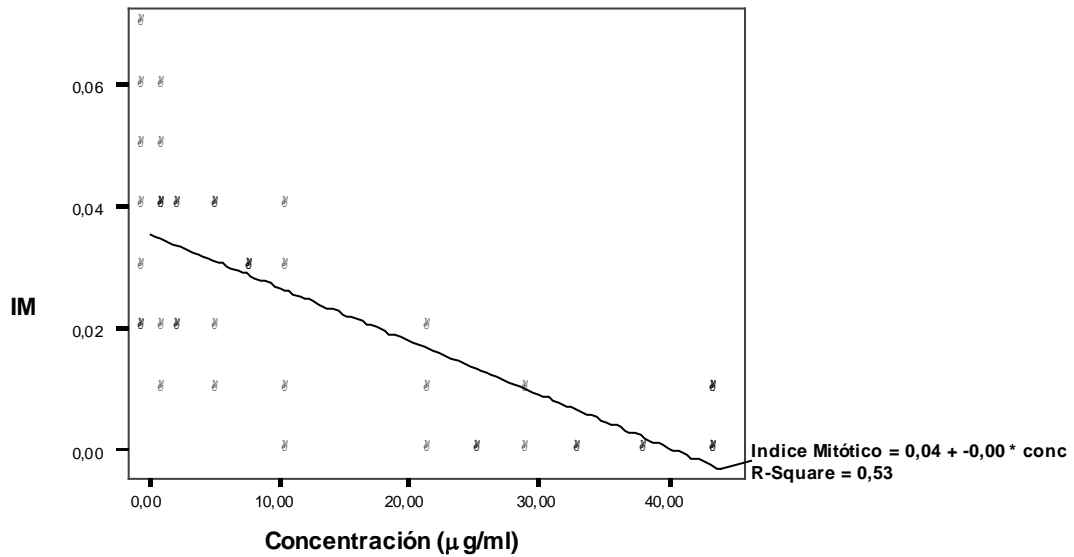


Concentración: 44µg/mL/mL 20x



Concentraciones  $\geq$  44µg/mL /mL 20x

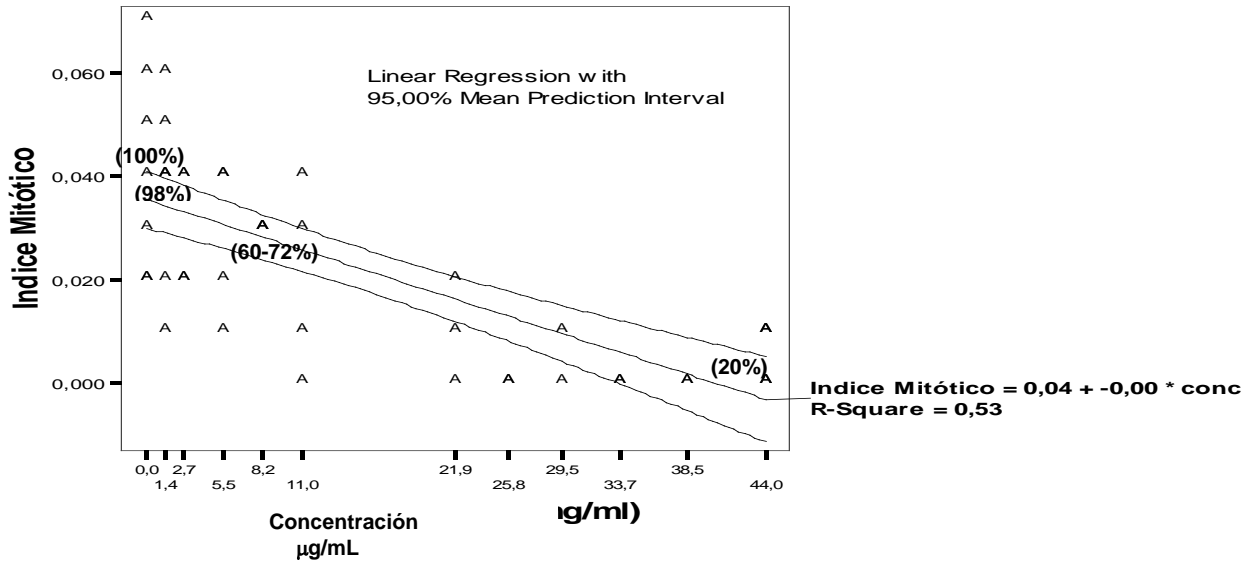
Figura 11. Correlación entre las concentraciones del extracto de alcaloides ( $\leq 44$   $\mu\text{g/ml}$ , incluido el control negativo) y el Índice Mitótico (IM)



Mediante análisis de regresión lineal, se logra establecer que la depresión observada en el IM se debe en un 53% ( $r^2 = 0.53$ ) al incremento en la concentración del extracto; en consecuencia, queda un 47% de variabilidad sin explicar, la cual se deba posiblemente a otros factores que tienen que ver con las condiciones propias de cada cultivo (temperatura ambiental, condición de los reactivos, luz etc) los cuales normalmente no se tienen en cuenta al aplicar el modelo de regresión lineal (Figura 11).

A partir de las concentraciones del extracto de alcaloide de *Eucharis amazónica* P & L, evaluadas mediante la prueba de IM, se identificaron las tres concentraciones del extracto necesarias para realizar las pruebas de genotoxicidad mediante la prueba de Aberraciones cromosómicas (AC). Estas concentraciones fueron: la concentración baja (1,4  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) ya que disminuyo el IM hasta un 98% con respecto del control negativo; la concentración media (8,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) ya que redujo el índice mitótico en un rango de 60 a 72% con respecto al control negativo y la concentración alta (44  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) ya que redujo el índice mitótico en un rango de 40 a 50% con respecto al control negativo (Figura 12).

Figura 12. Índice Mitótico (IM) identificado en la concentración del extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica* (**Amaryllidaceae**) Alta (44µg/mL), Media (8,2µg/mL) y baja (1,4µg/mL) en cultivo *in vitro* de linfocitos humanos.



El efecto depresor del IM ocasionado por el incremento en la concentración del extracto de alcaloide, fue el resultado de un efecto citotóxico premitótico, que trajo como consecuencia el bloqueo del ciclo celular en una etapa anterior a la mitosis (G1,S ,G2), reduciendo el número de células que pasan a la fase de mitosis, posiblemente por muerte celular. Este tipo de respuesta se denomina relación dosis – efecto (Jackson y Bender, 1979).

Los datos de IM obtenidos en este estudio se comportan de manera similar a los resultados obtenidos en el estudio *in vitro* del extracto de alcaloides de *caliphuria subdentata* (**Amaryllidaceae**) en el cual, el crudo de alcaloides tuvo un marcado efecto depresor del IM a medida que se aumenta su concentración (Acosta et al 1995). La dosis alta en el estudio del extracto de alcaloides de *caliphuria subdentata* fue a 111µg / mL, la cual es aproximadamente tres veces mayor que la concentración de *Eucharis amazónica* (44µg/ mL) utilizada en esta investigación. El extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica* presenta un efecto más citotóxico que el extracto de alcaloides de *caliphuria subdentata* en cultivo *in vitro* de linfocitos humanos, ya que se necesitó una concentración menor para inducir un efecto citotóxico severo; esto pudo deberse posiblemente, a la diferencia en cuanto a la estructura química de los alcaloides que componen cada uno de los extractos. Alcaloides de las especies *Brunsvigia litorallis*, *crinum augustum*, *crinum bulbispermum*, *Crinum asiaticum* var *japonicum* y *Hymenocallis expansa* de la familia Amaryllidaceae (tabla 5) también han mostrado efecto citotóxico sobre células no

tumorales, tumorales, y cancerosas; encontrándose que este efecto variaba de acuerdo al tipo estructural de alcaloide, por ejemplo la crasiaticidina aislada de *Crinum asiaticum* var *japonicum* fue citotóxica a concentraciones más altas (3,2 y 4,2 µg/mL) que las concentraciones de licorina (0,3 y 0,5 µg/mL) para inducir citotoxicidad en sarcoma de ratón y carcinoma de pulmón Lewis (Byung et al 2001). Otras investigaciones que corroboran este efecto se describen en la tabla 5 en los trabajos realizados por Weniger et al (1995); Campbell et al (1998) y Abd et al (1991).

Los alcaloides presentes en la mezcla de *Eucharis amazonica* con efecto citotóxico a las concentraciones evaluadas (1,4; 8,2; y 44 µg/mL), posiblemente en forma aislada (separación de cada alcaloide) necesiten de una concentración menor o mayor a las determinadas, teniendo en cuenta que el efecto está influenciado por la estructura del alcaloide y el modelo biológico; ya que como lo demostró Byung et al (2001) el alcaloide pratorimina fue moderadamente citotóxico en sarcoma de ratón (Meth-A), pero no para el carcinoma de pulmón (tabla 5). Algunos alcaloides como licorina (Byung et al, 2001), hemantamina, pretazetina y Tazetina presentes en la mezcla del extracto de *Eucharis amazonica* mostraron efecto citotóxico en células de tumor (Antoun et al, 1993) (Tabla 5).

Los alcaloides de Amaryllidaceae también han mostrado efecto citotóxico en virus como el del virus del Herpes simplex, efecto atribuido a alcaloides con anillo hexahidroindol con dos grupos hidroxilo funcionales que posiblemente bloquean la actividad de la ADN polimerasa viral (Renard, 1989).

El efecto citotóxico premitótico en cuanto a la disminución del IM del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* a concentraciones entre 1,4 y 44 µg/mL, es un efecto similar al producido por el alcaloide vinca (antitumoral) que induce una disminución en la proliferación de los linfocitos a las concentraciones de 0,5, 1 y 20 µg/mL manifestado en la destrucción de núcleos premitóticos con la producción de cromosomas pulverizados. (Nefic, 1999), entonces posiblemente el extracto de alcaloides actuaría sobre los linfocitos de esa manera produciendo el efecto premitótico, o también se deba a la interacción del extracto con estructuras celulares (organelos), o de tipo químico como las proteínas entre otras, o posiblemente porque interactúa en forma directa o indirecta con el ADN inhibiendo su síntesis y en consecuencia la división celular.

Aunque no fue objetivo de este trabajo, el efecto citotóxico del extracto de alcaloides de *Eucharis amazonica* bajo las condiciones evaluadas en este trabajo no contó con la activación de las enzimas del metabolismo que posiblemente incidirían en el aumento del efecto citotóxico traducido en valores de IM por debajo de los encontrados en este trabajo sin activación metabólica (fracción S9 microsomal de hígado de rata); esto es confirmado por el estudio realizado por Carballo et al (1992) que evaluó un extracto acuoso de *Heliotropium curassavicum*

var *Argentinium* con activación metabólica en células de ovario de Hamster ( CHO) Y encontró que el efecto citotóxico expresado en la disminución del IM aumento afectando el ciclo celular.

Tabla 5. Efectos Biológicos y/o citotóxicos de alcaloides de Amaryllidaceae y otras especies en diferentes modelos biológicos.

MODELO DE ESTUDIO	EFEECTO CITOTÓXICO BIOLÓGICO Y/ O	DOSIS	REF
Cultivo <i>in vitro</i> de linfocitos humanos	Extracto de alcaloides de <i>caliphruria subdentata</i> deprimió el IM con el aumento de su concentración.	111µg/mL(alta), 0,85µg/mL(baja)	Acosta et al, 1995
Cultivo <i>in vitro</i> de linfocitos humanos	Vinca (droga antitumoral). Disminución de proliferación de linfocitos		Nefic, 1999
Células de ovario de Hamster(CHO)	<i>Heliotropium curassavicum</i> var. <i>Argentinum</i> . El extracto acuoso deprimió el IM, afectando el ciclo celular .Este efecto aumento con la fracción s9	0,1; 10 y 100µg/mL	Carballo, 1992
Células de melanoma de ratón	<i>Brunsvigia litorallis</i> .. Licorina; 1,2-diacetillicorina. efecto citotóxico.		Campbell W et al, 1998
Células de tumor MOLT4	<i>crinum augustum</i> y <i>crinum bulbispermun</i> licorina (pratorinina) y crinina ( 6 alfa-hidroxibufanisina) mostraron un moderado efecto citotoxico		Abd, 1991
Sarcoma de raton (Meth-A) (1) y Carcinoma lewis de pulmón en ratón (2)	<i>Crinum asiaticum</i> var <i>japonicum</i> .: los alcaloides mostraron un moderado efecto citotóxico Criasiatricidina: moderado efecto citotóxico Licorina: fuerte efecto citotóxico Pratorimina: moderado efecto citotóxico solo en (1)	3,2µg/mL(1) y 4,2 µg/mL (2). 0,3µg/mL(1) y 0,4µg/mL (2). 4,1µg/mL(1)	Byung, 2001
Células de tumor murino y humano	<i>Hymenocallis expansa</i> . Tazetina, hipeastrina y haemantidina. .Efecto citotóxico severo		Antoun et al, 1993
líneas celulares de cancer	Alcaloides con esqueleto fenantreno tuvieron efecto citotóxico.		Youssef et al, 2001.
celulas no tumorales: fibroblastos	25 alcaloides de especies de Amaryllidaceae presentaron efecto citotóxico.		Weniger et al, 1995.
celulas humanas tomorales linfoide MOLT4	De los 25 alcaloides evaluados la pretazetina fue el compuesto más activo y la licorenina fue citotóxico.		
celulas humanas tumoral de hepatoma HepG2	Pretazetina inactiva y licorenina citotoxica.		

MODELO DE ESTUDIO	EFEECTO CITOTÓXICO/ O BIOLÓGICO	DOSIS	REF
virus del Herpes simplex	Sp de Amarillidaceae. alcaloides con anillo hexahidroindol con dos grupos hidroxilo funcionales que posiblemente bloquean la actividad de la ADN polimerasa viral		(Renard, 1989).

## 5.2 EFECTO GENOTÓXICO DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Eucharis amazónica* P & L (AMARYLLIDACEAE)

Tabla 6. Aberraciones cromosómicas (AC) identificadas en las concentraciones alta, media, baja y concentración 0 µg/mL o control negativo del extracto de alcaloide de *Eucharis amazónica* P & L (Amaryllidaceae).

Aberraciones Cromosómicas/100 células Media ± EE (n) <sup>a</sup>				
Tratamiento	Concentración µg/mL	Quiebres Cromatídicos	Quiebres cromosómicos	Quiebres Totales
Control Negativo	0	0,33 ± 0,24 (9)	0,00 ± 0,00 (9)	0,33 ± 0,24 (9)
Dosis Baja	1,4	2,00 ± 0,82 (9)	0,00 ± 0,00 (9)	2,00 ± 0,82 (9)
Dosis Media	8,2	3,33 ± 0,88 (9) <sup>b</sup>	0,11 ± 0,11 (9)	3,44 ± 0,91(9) <sup>c</sup>
Dosis Alta	44	0,56 ± 0,24 (9)	0,22 ± 0,22 (9)	0,78 ± 0,36 (9)

<sup>a</sup> Media ± error estándar (número de cultivos); 100 células contadas por cultivo.

<sup>b</sup> Probabilidad de error Tipo I o nivel de significancia; mediante la prueba de Kruskal - Wallis

<sup>c</sup> P < 0.05 comparado con las concentraciones 0; y 44 µg/mL mediante la prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

En la Tabla 6 y Figura 14, se registra el número promedio de Quiebres cromatídicos (Q. tcos), Quiebres cromosómicos (Q. somicos) y el número promedio de AC en 100 células, correspondientes a cuatro concentraciones del extracto de *Eucharis amazonica*, incluido el control negativo (0 µg/mL). A la concentración 8,2 µg/mL, le corresponde un número promedio de Q. tcos de 3,33 ± 0,88, el cual es significativamente mayor a los Q. tcos registrados en el grupo control (0,33 ± 0,24), a los registrados en la concentración baja (2,00 ± 0,82) y a los registrados en la concentración alta (0,56 ± 0,24). El número de quiebres cromosómicos (Q. somicos) no difiere significativamente entre todas las



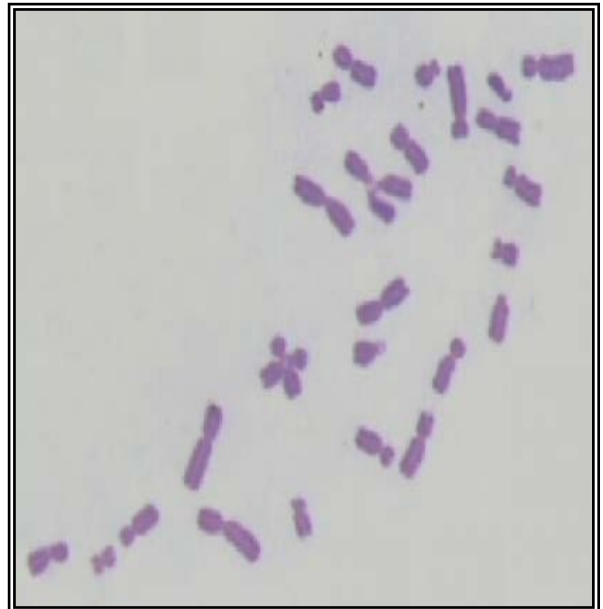
concentraciones del extracto, indicando que el tipo de daño que influye en el número total de AC, realmente son los Q. tcos. (Figura 13).

El número de Q. tcos registradas en la concentración media, es 10 veces mayor que el registrado en el control negativo(3,33/0,33); 1,7 veces mayor que el registrado en la concentración baja (3,33/2,00) y 6 veces mayor que el registrado en la concentración alta (3,33/0,56).

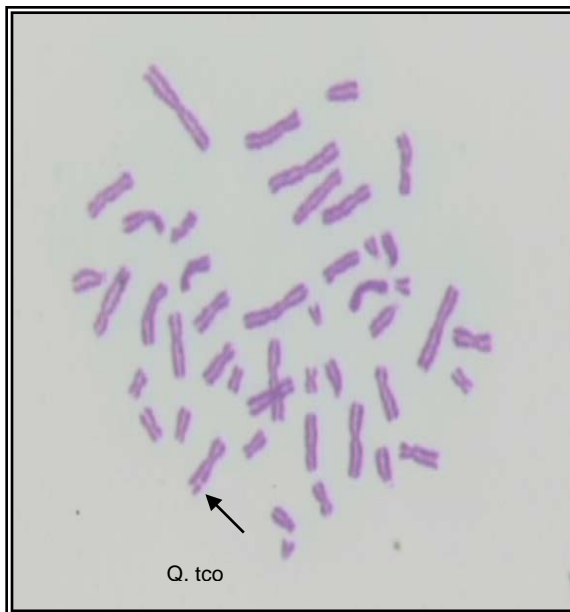
Figura 13. Aberraciones Cromosómicas (AC) identificadas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos bajo el efecto del extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica*.



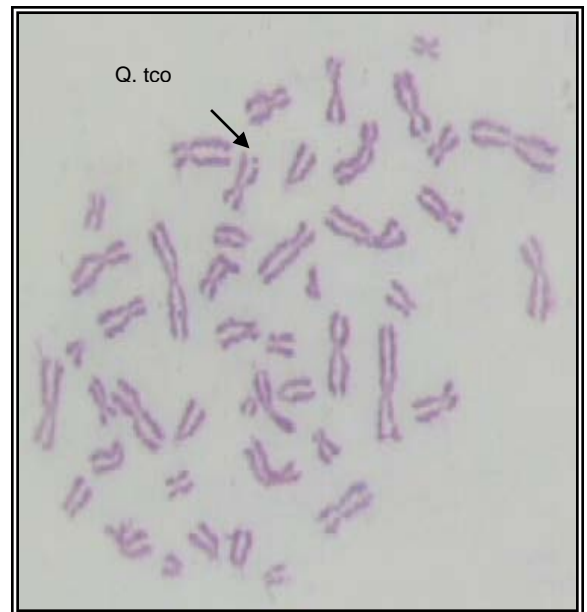
Control negativo: agua 100x



Control positivo: Mitomicina 100x



1,4 µg/mL 100x



8,2µg/mL 100x

Figura 14. Número Promedio de Quiebres Cromatídicos identificadas en 100 células por cultivo (9 cultivos) correspondientes a la dosis alta (1,4µg/mL), media (8,2µg/mL), baja(1,4µg/mL) y al control negativo del extracto de *Eucharis amazónica*

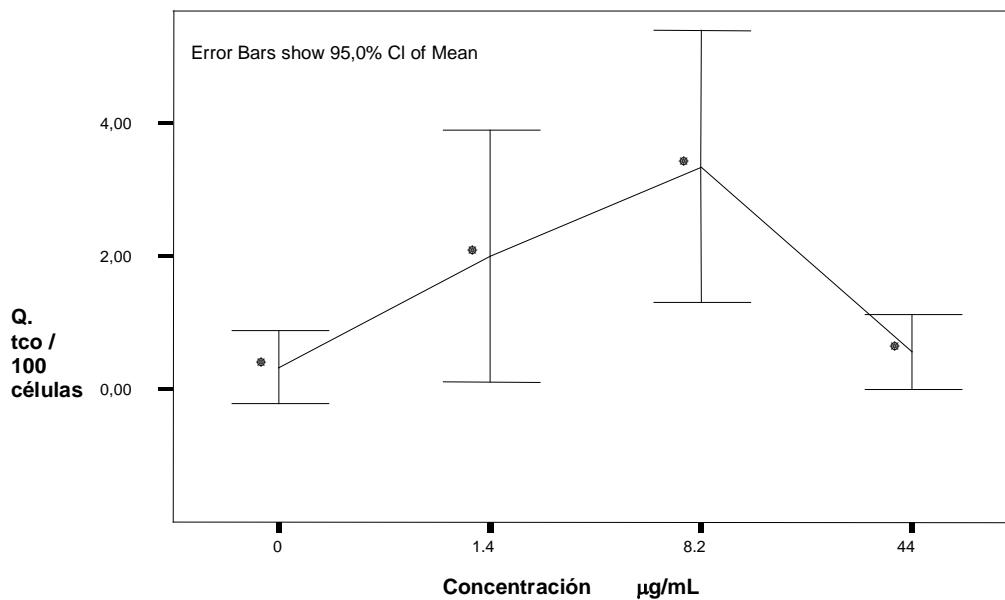


Figura 15. Número Promedio de quiebres Cromosómicos identificados en 100 células (9 cultivos) en la concentración (alta, media, baja y el control negativo).

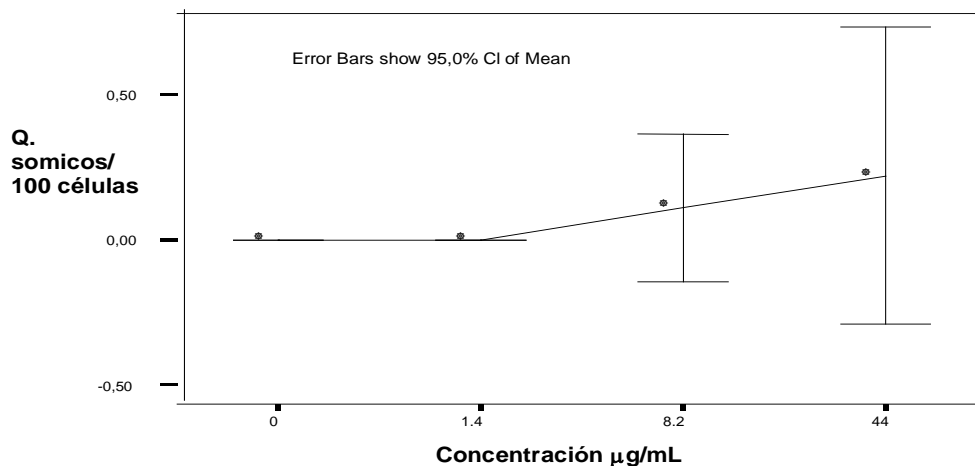
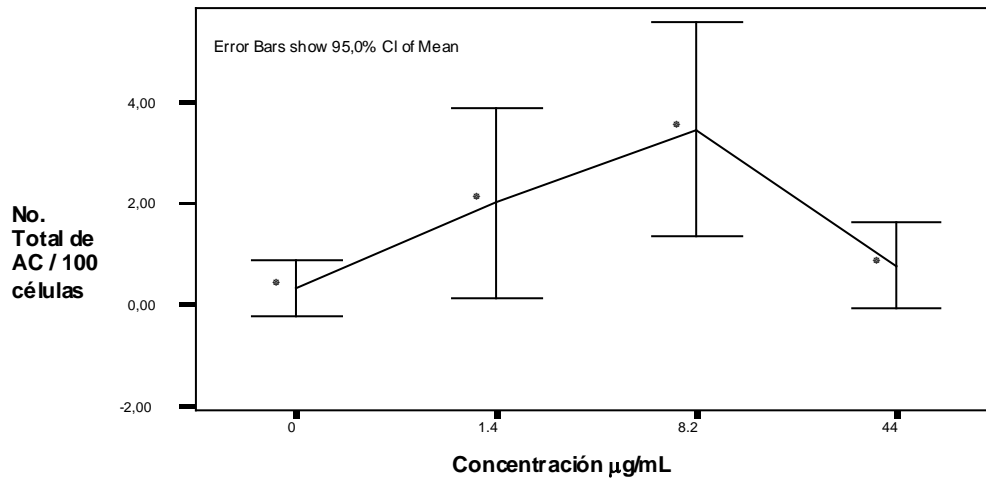


Figura 16. Número Promedio de Aberraciones Cromosómicas (AC) totales identificados en 100 células (9 cultivos) en la concentración alta, media, baja y el control negativo.



En la Figura 17 se observa que existe una correlación positiva (relación dosis efecto), cuando se analiza la asociación existente entre los Q. tcos y las concentraciones del extracto: 0,0; 1.4; y 8,2 µg/mL. En este rango de concentraciones del extracto, la variabilidad observada en el número de Q. tcos se debe en un 23% al incremento en la concentración del extracto (Figura17). Contrario a lo esperado, a la concentración alta (44µg/mL) le correspondió un número promedio de Q. tcos/100 células, muy bajo, que puede deberse al efecto citotóxico severo que comienza a manifestar el extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica*, sobre los linfocitos, a partir de esta concentración; en consecuencia, no se pueden observar los daños genotóxicos debido a la muerte celular de linfocitos.

Como el experimento fue diseñado en bloques aleatorizados, que permite identificar y aislar la variabilidad entre los tres diferentes tiempos (cada 2 semanas) en las que se realizó el experimento, en la Figura 18 se observa que el resultado fue prácticamente el mismo en los tres experimentos realizados, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ellos ( $p= 0,183$ ).

Figura 17. Análisis de correlación positiva entre los Q. tcos y las concentraciones del extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica*: 1,4 y 8,2µg/mL, incluido el control negativo (0,0 µg/mL).

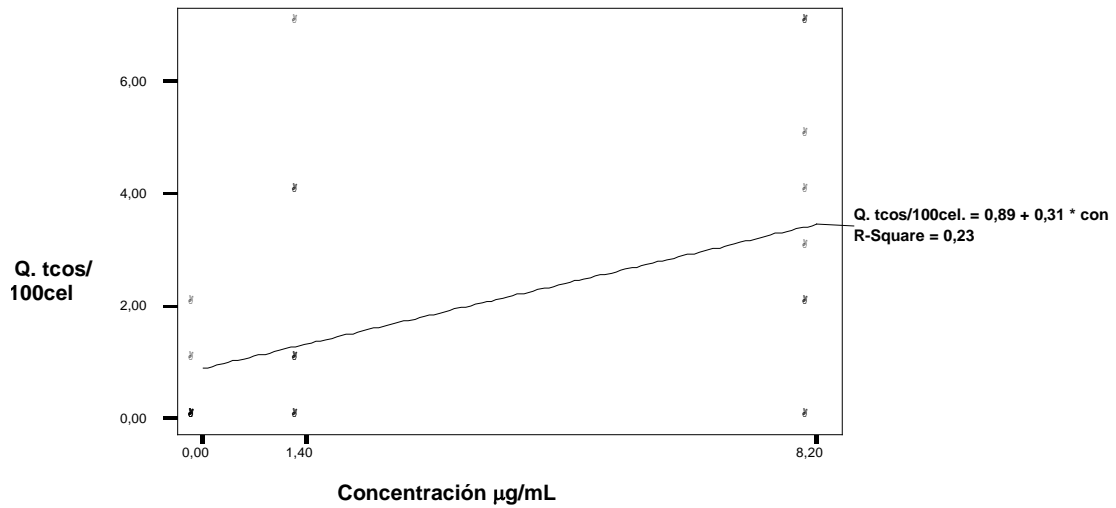
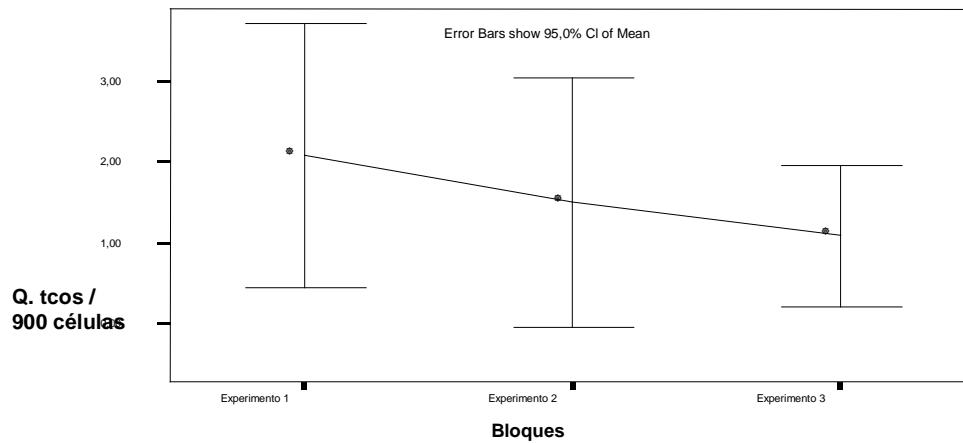


Figura 18. Bloques (tratamiento con el extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica* cada dos semanas) de los experimentos en el análisis de quiebres Cromatídicos.



El extracto de alcaloide actúo en la fase G2 del ciclo celular, ya que el daño más frecuente a la concentración 8,2µg/mL (Tabla 6) fue el quiebre cromatídico que se forma después de la etapa de replicación o fase s (Salamanca, 1990)

Los alcaloides son genotóxicos desde cantidades tan pequeñas como micromoles (Arnaiz, 1995) y en esta investigación se identificó que el extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica* tiene efecto genotóxico para los linfocitos humanos cultivados *in vitro* a la concentración 8,2µg/ mL y fue muy tóxico para la célula (efecto citotóxico) a concentraciones  $\geq 44 \mu\text{g/ mL}$ ; en consecuencia, se puede afirmar que el extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica* es más citotóxico y genotóxico que el extracto de alcaloides de *caliphuria subdentata* (Acosta et al, 1995), el cual a las concentraciones 0,85; 7,0 y 111µg □/mL fue genotóxico evaluado mediante el biomarcador de exposición Intercambio de Cromatides Hermanas (ICH) y no clastogénico (el número promedio de AC no se incremento significativamente), esto posiblemente se debe a la diferencia estructural química entre los alcaloides que componen a cada uno de los extractos.

El efecto dependiendo del tipo estructural de alcaloide concuerda con el trabajo de investigación realizado por Alarcón et al (1997), en el cual mediante el test de micronúcleos en medula ósea de ratón, identificó el efecto clastogénico de Maritidina (MAT), Hipeastidina (HIPP) y Licorina (LIC), aislados de *Hippeastrum ananuca* (Amaryllidaceae), atribuyendo tal efecto a la presencia de un grupo hidroxilo (HIPP) en C-10, MAT en C-3 y LIC en C-1 y C-2) en todos los tres núcleos fenantridínicos. El alcaloide HIPP presento un efecto más clastogénico posiblemente por poseer un grupo hidroxilo, resonancia en el lugar que se ubica el grupo hidroxilo y la acción espacial del puente C-C.

El efecto genotóxico en cultivo *in vitro* de linfocitos humanos por la acción del extracto crudo de alcaloides de *Eucharis amazónica*, identificado en este estudio, debido a que se hizo sin activación metabólica (fracción microsomal S9), no está influenciado por las enzimas del metabolismo que participan en la biotransformación de xenobióticos formando intermediarios reactivos que pueden interactuar directamente con el ADN y aumentar el efecto genotóxico e iniciar eventos que causan muerte celular, inducir cáncer, teratogénesis y otras toxicidades (Arnaiz, 1995). Carballo et al (1992) encontro que el efecto genotóxico expresado en el incremento significativo en el total AC de *Heliotropium curassavicum* var. *Argentinum* en concentraciones de 0,1; 1 y 10µg/mL, estaba asociado con la adición de la fracción S9 y por tanto la posibilidad de que los alcaloides pirrolizidina y sus N-oxidos, experimentaran un proceso de metabolismo *in vitro* siendo activados por oxidación microsomal y cambiando a derivados pirrólicos reactivos.

Algunos químicos genotóxicos pueden ser responsables del proceso de iniciación del cáncer mediante la inducción de AC, por lo cual la genotoxicidad del extracto de *Eucharis amazonica* sobre los linfocitos, da una aproximación de la posibilidad de tener la potencialidad de ser genotóxico, y posiblemente carcinogénico, ya que agentes genotóxicos en cortas pruebas *in vitro* han resultado ser carcinogénicos en pruebas *in vivo* realizadas en ratas (Aulleta y Ashby, 1988)

El efecto genotóxico que mostro el extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica* en el test de AC, en cultivo *in vitro* de linfocitos humanos, es un aporte importante dentro de la ruta a seguir en su estudio genotóxico y en el desarrollo de una evaluación racional del grado de riesgo humano, ya que las Aberraciones cromosómicas (AC) son importantes en la carcinogénesis, mutaciones heredables, perdida embrionaria, desarrollo de anormalidades y envejecimiento (Galloway, 1994).

## 6. CONCLUSIONES

El extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica* P & L (lirio pequeño), cuyos metabolitos activos pueden ser potencialmente utilizados en la terapia de enfermedades, es citotóxico en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos a las concentraciones 1,4, 8,2 y 44 $\mu$ g/mL, traducido en la disminución del IM, al aumentar su concentración con respecto al control negativo o concentración 0 $\mu$ g/mL; lo que indica que hubo un bloqueo premitótico en el ciclo posiblemente por muerte celular. Este tipo de respuesta se denomina relación dosis - efecto (Jackson y Bender, 1979).

El efecto citotóxico que mostró el extracto de alcaloide de *Eucharis amazónica*, en cultivo *in vitro* de linfocitos humanos, posiblemente se debe a la interacción del extracto con estructuras celulares (organelos), o de tipo químico como las proteínas, o posiblemente porque interactúa en forma directa o indirecta con el ADN inhibiendo su síntesis y en consecuencia la división celular.

El extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica* P & L (lirio pequeño) es genotóxico a la concentración 8,2 $\mu$ g/mL, incrementando significativamente el número promedio de AC/célula con respecto al control negativo (concentración 0 $\mu$ g/mL). El incremento en el número promedio de AC/célula se halla asociado linealmente al incremento en la concentración del extracto en el rango 0-8,2 $\mu$ g/mL

La evaluación citotóxica y genotóxica del extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica*, es un aporte importante en el desarrollo de una evaluación racional del grado de riesgo humano, ya que esta especie vegetal es empleada por poblaciones humanas como los indios Jíbaro del Perú (Lewis, 1986) y es de gran interés como farmacéutico por la potencialidad que tiene de aportar un alto rendimiento de alcaloides activos con fines terapéuticos, especialmente la galantamina en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Cabezas, 2002).

## RECOMENDACIONES

Es necesario evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del extracto de alcaloides de *Eucharis amazónica*, en bioensayos *in vivo*, en presencia de las enzimas del metabolismo, dado que estas pueden modificar la estructura de los metabolitos haciéndolos reactivos o con el ADN.

Para su evaluación biológica, es importante aislar los metabolitos activos que tienen la potencialidad de ser empleados en la terapia de enfermedades del extracto crudo de alcaloides de *Eucharis amazónica* ya que en este estudio solo se evaluó la citotoxicidad y genotoxicidad de la mezcla de los alcaloides, lo que da una aproximación del potencial citotóxico y genotóxico de los alcaloides presentes en esta especie vegetal.



## BIBLIOGRAFIA

ABD EL HAFIZ, MA. et al. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum augustun* and *Crinum bulbispermun*. In: Plant Med. 1991 oct; 57(5): 437-9.

ACOSTA, C, P ; ALVAREZ, R. E; BONILLA L. M; MARTÍNEZ, C. E. Evaluación de el efecto citotóxico bloqueador del ciclo, genotóxico *in vitro* de los extracto crudo y de alcaloides del lirio pequeño(*caliphruria subedentata*). Popayán, 1995, 100p. Trabajo de grado (Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

ALARCÓN, A, M; CEA, C.G y WEIGERT, T, G.1983. Citado por : ALARCÓN, M. et al. Potential aneugenic action of phenanthridinic alkaloids and flavonoid determined to be mutagenic through the micronucleus test. Comparative study with the action of colchicine. In: Biol . Concepción Chile.Tomo 68(1997) .p;13-17.

\_\_\_\_\_.1986. Citado por : ALARCÓN, M. et al. Potential aneugenic action of phenanthridinic alkaloids and flavonoid determined to be mutagenic through the micronucleus test. Comparative study with the action of colchicine. In: Biol . Concepción Chile.Tomo 68(1997) .p;13-17.

\_\_\_\_\_. Potential aneugenic action of phenanthridinic alkaloids and flavonoid determined to be mutagenic through the micronucleus test. Comparative study with the action of colchicine. In: Biol . Concepción Chile.Tomo 68(1997) .p;13-17.

ANTOUN, MD. et al. Cytotoxic of *Hymenocallis expansa* alkaloids. J Nat Prod. 1993 Aug;56(8):1423-5.

ARNAIZ RODRÍGUEZ, Rosario. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. : Las toxinas ambientales y la genética. México1995, Fondo de cultura económica.

ARRIGONI, O; PACIOLLA, C; DE GARA, L. Inhibition of galactonolactone dehydrogenase activity by licorine. In: Boll Soc Ital Biol Sper. 1996. Jan-Feb; 72(1-2): 37-43.

ASHBY, 1978. Citado por: COLLAZOS, F; GIRALDO, Y OSPINA, N. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfan (Thiodan) *in vitro* e *in vivo* Popayán, 1995. Trabajo de grado(Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p. 44 – 52.

AULLETA, 1988. Citado por: COLLAZOS, F; GIRALDO, Y OSPINA, N. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfan (Thiodan) *in vitro* e *in vivo* Popayán, 1995. Trabajo de grado (Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p. 44 – 52.

AU, Willian. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposure using cytogenetic techniques. *Occupational Medicine* Hanley & Belfus, 1991. v.6 No 4, p. 597-609. Citado por: COLLAZOS, F; GIRALDO, Y OSPINA, N. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfan (Thiodan) *in vitro* e *in vivo* Popayán, 1995. Trabajo de grado (Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p. 44 – 52

BARTON and COHEN T (1957). Some biogenetic aspects of phenol oxidation. In : "Festschrift Arthur Stoll." Birkhauser Verlag, Basel. Pag 78

BYUNG, S M. et al. Cytotoxic Alkaloids and a Flavan from the Bulbs of *Crinum asiaticum* var. *Japonicum* In: Chem. Pharm. Bull. 49(9) pag1217-1219 (2001).

CABEZAS, F. et al. Alkaloids from *Eucharis amazónica* (**Amaryllidaceae**). In: Chem. Pharm. Bull. 51(3) pag315-317 (2003).

\_\_\_\_\_. Estudio químico de alcaloides en *Crinum Kunthianum* ROEM y *Eucharis amazónica* PLANCHON EX LINDEN, familia Amaryllidaceae. Cali, 2002, 282p. Tesis Doctoral. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias, Departamento de Química.

\_\_\_\_\_. New Alkaloids from *Eucharis amazónica* (**Amaryllidaceae**). Special supplement: Proceedings of 24<sup>TH</sup> International symposium on natural products chemistry: currents trends in natural products. In: Revista Latinoamericana de química. Vol 29 (2001). México 2001; p 59.

CAMPBELL, W E. et al. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. In: Planta Med. 1998 Feb; 64(1): 91-3.

CARBALLO, M. et al. Genotoxic action of an aqueous extract of *Heliotropium curassavicum* var. *Argentinum*. In: Mutation Research. 1992 16; 279(4): 245-53.

CEA, G. et al. 1986. Citado por: ALARCÓN, M. et al. Potential aneugenic action of phenanthridinic alkaloids and flavonoid determined to be mutagenic through the micronucleus test. Comparative study with the action of colchicine. In: Biol. Concepción Chile. Tomo 68(1997) .p;13-17.

CRAWFORD. (1979). Citado por: COLLAZOS, F; GIRALDO, Y OSPINA, N. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfan (Thiodan) *in vitro* e *in vivo* Popayán, 1995. Trabajo de grado(Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p. 44 – 52

DOMINGUEZ , X. Métodos de Investigación en Fitoquímica. Ed Limusa. Mexico 1973.pag281

EVANS, H.J et al. The carcinogenic, mutagenic and teratogenic toxicity of bracken. In: Dracken : Ecology, Land Use and control tecnology, (1986); p 139

GALLOWAY, SM. Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression, and intriguing questions. In: Environ Mol Mutagen. 1994;23 Suppl 24:44-53.

GARUCCIO, I y ARRIGONI, O. [Various sensitivities of yeasts to lycorine]. In: Boll Soc Ital Biol Sper. 1989. Jun; 65(6): 501-8.

GUDE, M. *et al.* An investigation of the irritant and allergenic properties of daffodils (*Narcissus pseudonarcissus* L., *Amaryllidaceae*). A review of daffodils dermatitis. In: contact Dermatitis. 1988 Jul; 19(1): 1-10.

HOMANN, J. et al. Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Srekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. In: Planta Med. 2002 May;68(5):454-7.

HOYOS, L. et al. Manual de citogenetica: Linfocitos Humanos. Popayán 2002, 56p.Universidad del Cauca. Grupo de Investigación en Toxicología Genetica y Citogenética. Departamento de Biología.

IEVEN, M. et al. Plant antiviral agents. III. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regel (**Amaryllidaceae**). In: J Nat Prod. 1982 sep-oct; 45(5): 564-73.

JIMENEZ, A. *et al.* Inhibitors of protein synthesis in eukarytic cells. Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. In : Biochim Biophys Acta. 1976 Mar 17; 425(3): 342-8

JACOBS, P et al. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants : Ann Hum Genet 35. 1974. P. 301-319. Citado por: COLLAZOS, F; GIRALDO, Y y OSPINA, N. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfan (Thiodan) *in vitro* e *in vivo* Popayán, 1995. Trabajo de grado(Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p. 44 – 52.

JACKSON J R; D V; Y BENDER RA. Citotoxic thresholds of vincristine in a murine and a human leukemia cell line *in vitro*. En: cancer, research (39) p43-46 (1979). Citado por: ACOSTA, C, P ; ALVAREZ, R. E; BONILLA L. M; MARTÍNEZ, C. E. Evaluación de el efecto citotóxico bloqueador del ciclo, genotóxico *in vitro* de los extracto crudo y de alcaloides del lirio pequeño(*caliphruria subedentata*). Popayán, 1995, 100p. Trabajo de grado (Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

KUSHIDA, N. et al. Induction of flat morphology in k-ras-transformed fibroblast by lycorine, an alkaloid isolated from the tropical plant *Eucharis grandiflora*. In: Drugs Exp Clin Res. 1997;23(5-6):151-5

LEWIS W.H., Discovery, 17,2-6 (1986). Citado por: CABEZAS, F. et al. Alkaloids from *Eucharis amazónica* (**Amaryllidaceae**). In: Chem. Pharm. Bull. 51(3) pag315-317 (2003).

LIKHITWITAYAWUID, K. et al. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. In: Nat Prod. 1993 Aug; 56(8): 133-8.

LIN LZ. et al. Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. Phytochemistry. 1995 Nov, 40(4): 1295-8.

LOPEZ, S. et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus extracts*. In: Life Sci. 2002 Oct 11;71(21):2521-9.

MARVIN, L y WILLIAM, AU. Application of integrated Genetic Monitoring : The optimal Approach for Detecting Environmental Carcinogens. Environ Health Perspect. 102 (Suppl.9).1994.P.125-1321. Citado por: COLLAZOS, F; GIRALDO, Y OSPINA, N. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfan (Thiodan) *in vitro* e *in vivo* Popayán, 1995. Trabajo de grado(Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p. 44 – 52

MEEROW, Alan W. Biosystematics of tetraploid *Eucharis* (Amaryllidaceae). In: Annals of the Missouri Botanical Garden. Vol 74(1987); p. 291 - 309

\_\_\_\_\_.(1987) Citado por: ACOSTA, C, P ; ALVAREZ, R. E; BONILLA L. M; MARTÍNEZ, C. E. Evaluación de el efecto citotóxico bloqueador del ciclo, genotóxico *in vitro* de los extracto crudo y de alcaloides del lirio pequeño(*caliphruria subedentata*). Popayán, 1995, 100p. Trabajo de grado (Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

\_\_\_\_\_. (1989). Ann. Missouri Bot. Gard. **76**: 136-200. Citado por: CABEZAS , F. Estudio químico de alcaloides en *Crinum Kunthianum* ROEM y *Eucharis amazónica* PLANCHON EX LINDEN, familia Amaryllidaceae. Cali, 2002, p.3, 29. Tesis Doctoral. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias, Departamento de Química

\_\_\_\_\_. Chromosome cytology of *Eucharis*, *Caliphruria*, and *urceolina* (**Amaryllidaceae**). In: American Journal of Botany. Vol 74(1987).p. 1560 – 1576.

MIKAMI, M. et al. Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against Cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model. In: Bioll Pharm Bull. (1999 )Jul; 22(7): 674-8.

MUÑOZ, Fernando. Las plantas medicinales. En plantas medicinales y aromáticas, Estudio, cultivo y procesado. España Ed Mundi – Prensa 1986. p16 -18.

MUÑOZ, O; PACHECO, P and SILVA, M. 1992. Química de la flora Chilena. Amaryllidaceae. Cap 16 pag 309-319. Citado por: ALARCÓN, M. et al. Potential aneugenic action of phenanthridinic alkaloids and flavonoid determined to be mutagenic through the micronucleus test. Comparative study with the action of colchicine. In: Biol . Concepción Chile.Tomo 68(1997) .p;13-17.

NEFIC, H y IBRUL J, S. Genotoxic effect of the antitumor agent vincristine sulfate on human peripheral blood limphocytes *in vitro*. In: Carcinogénesis (1999), Vol 20. No/20; 1193-1199,

RENARD-NOZAKI, J. *et al*. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes simplex virus. In: Res Virol. 1989 Mar-Apr; 140(2): 115-28.

ROJAS E. et al. Mitotic Index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. Anti-cancer Drugs 4: 637-640(1993).

ROWLEY, J 1986. Citado por: COLLAZOS, F; GIRALDO, Y y OSPINA, N. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfan (Thiodan) *in vitro* e *in vivo* Popayán, 1995. Trabajo de grado(Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p. 44 – 52

SANCHEZ LAMAR, A. *et al*. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. En: Rev Cubaba Farm 2000; 34(1): 34-43.

SALAMANCA, Fabio. Citogenética Humana. Editorial Media Panamericana S.A. México, 1990.p.93-101, 235.

SHRI, et al 1989. Citado por: ACOSTA, C, P ; ALVAREZ, R. E; BONILLA L. M; MARTÍNEZ, C. E. Evaluación de el efecto citotóxico bloqueador del ciclo, genotóxico *in vitro* de los extracto crudo y de alcaloides del lirio pequeño(*caliphruria subedentata*). Popayán, 1995, 100p. Trabajo de grado (Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

STRAUS (1981). Citado por: COLLAZOS, F; GIRALDO, Y y OSPINA, N. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfan (Thiodan) *in vitro* e *in vivo* Popayán, 1995. Trabajo de grado(Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p. 44 – 52

TAKASHI, SUGIMURA. Food and Cancer. National cancer center, 5-11 Tsukiji, Chuo-ku, Tokio 104-0045, Japan. Available

TRIGUNA, N. M, et al (1990). Phytochemistry, 29(3), 929. Citado por : CABEZAS F. En: Estudio químico de alcaloides en *Crinum Kunthianum* ROEM y *Eucharis amazónica* PLANCHON EX LINDEN, familia Amaryllidaceae. Cali, 2002, 282p. Tesis Doctoral. Universidad del Valle.

WENIGER, B. et al. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. Planta Med. 1995 Feb;61(1):77-9.

YAMAMOTO et al, 1982. Citado por: COLLAZOS, F; GIRALDO, Y y OSPINA, N. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfan (Thiodan) *in vitro* e *in vivo* Popayán, 1995. Trabajo de grado(Licenciado en biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p. 44 – 52

YOUSEFF, DT AND KHALIFFA AA. Cytotoxyc quaternary alkaloids from the flowers of *Narcissus tazetta*. Pharmazie. 2001oct 56(10) 818.22

YUI, S. et al. [ Inhibition effect of Amaryllidaceae alkaloids, lycoricidinol and lycorine on macrophage TNF- $\alpha$  production]. In: Yakugaku Zasshi. 2001 feb; 121(2): 167-71.

\_\_\_\_\_. The inhibitory effect of lycorine on tumor cell apoptosis induced by polymorphonuclear leukocyte-derived calprotectin. In: Immunopharmacology. 1998 Aug;40(2):151-62.

## **BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA**

Amaryllidaceae. P. 6-51. En: Flora de Ecuador. No 41(1990).p.10-22

OSPINA, Luis Fernando. Bioensayos, extracción, caracterización, y aspectos críticos en la investigación de plantas medicinales. En: II Seminario sobre las plantas medicinales y aromáticas. Palmira 1996; p 1-11.

# ANEXO 1

## REGISTRO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EVALUACION GENOTOXICA DE EL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Eucharis amazónica*

Registrador : \_\_\_\_\_

Experimento Nº: \_\_\_\_\_ Fecha Siembra: \_\_\_\_\_ Fecha cosecha: \_\_\_\_\_

Fecha de registro: \_\_\_\_\_ Tratamiento: \_\_\_\_\_ Placa: \_\_\_\_\_

Nº DE CEL	Nº CRO	ABERRACION CROMOSO MICA		GAP		OTRAS	COOR	Nº DE CEL	Nº CR	ABERRACION CROMOSO MICA		GAP		OTRAS	COOR
		Q. ticos	Q. somicos	ticos	somicos					Q. ticos.	Q. somicos	ticos.	somicos.		
1	46							51	46						
2	46							52	46						
3	46							53	46						
4	46							54	46						
5	46							55	46						
6	46							56	46						
7	46							57	46						
8	46							58	46						
9	46							59	46						
10	46							60	46						
11	46							61	46						
12	46							62	46						
13	46							63	46						
14	46							64	46						
15	46							65	46						
16	46							66	46						
17	46							67	46						
18	46							68	46						
19	46							69	46						
20	46							70	46						
21	46							71	46						
22	46							72	46						
23	46							73	46						
24	46							74	46						
25	46							75	46						
26	46							76	46						
27	46							77	46						
28	46							78	46						
29	46							79	46						
30	46							80	46						
31	46							81	46						
32	46							82	46						
33	46							83	46						
34	46							84	46						
35	46							85	46						
36	46							86	46						
37	46							87	46						
38	46							88	46						
39	46							89	46						
40	46							90	46						



Continuación anexo 1

Nº DE cEL	Nº CRO	ABERRACION CROMOSO MICA		GAP		OTRAS	COOR	Nº DE CEL	Nº CR	ABERRACION CROMOSO MICA		GAP		OTRAS	COOR
		Q. ticos	Q. somicos	ticos	somicos					Q. ticos.	Q. somicos	ticos.	somicos.		
41	46							91	46						
42	46							92	46						
43	46							93	46						
44	46							94	46						
45	46							95	46						
46	46							96	46						
47	46							97	46						
48	46							98	46						
49	46							99	46						
50	46							100	46						
total															
X															

Nº de Cel aberrantes

