



Centro de Investigación Científica de Yucatán
Posgrado en Ciencias Biológicas

**“ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE LA DIVERSIDAD DE
ALCALOIDES EN TRES ESPECIES DEL GÉNERO
Argemone L”**

Tesis que presenta

ZURISADAI ESCOBAR CHAN

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción de Bioquímica y Biología
Molecular de Plantas)

Mérida, Yucatán, México a noviembre de 2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Zurisadai Escobar Chan titulado “Análisis quimiométrico de la diversidad de alcaloides en tres especies del género *Argemone* L” se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dra. Clelia de la Peña Seaman

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 13 de noviembre del 2018.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

L.Q Zurisadai Escobar Chan

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en estas líneas a todas las personas que me han acompañado en esta nueva aventura de mi vida que emprendí hace algunos años, a quienes en sus oraciones han pedido por mí y me ha confortado con palabras de ánimo. A quienes pusieron a mi disposición el valor incalculable de sus conocimientos, impulsándome a seguir adelante. Aquellas personas a quienes con profunda calidad humana comparten conmigo sus vivencias, las mismas que van quedando en lo más profundo de mi corazón para jamás olvidarlas.

Primeramente le expresé mi gratitud a mi director de tesis: al Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota por acompañarme con paciencia en mis sueños y enseñarme con firmeza, le reconozco la organización, elaboración y guía en los análisis y su buena disposición en la evaluación de esta tesis. A la M.C Miriam Monforte González por su optimismo y por haberse tomado un minuto de su tiempo para despejar mis dudas.

Mi más sincero agradecimiento también al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por sus aportaciones al proyecto de investigación y por sus consejos a lo largo de mi formación profesional.

Al Dr. Gumersindo Mirón López por formar parte de mi comité revisor, por todas sus aportaciones, de igual forma al Dr. Jorge Rubio Piña por su evaluación detallada, agradezco a la Dra. Blanca Marina Vera Ku, por su disponibilidad.

Mil gracias al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. por abrirme sus puertas y darme esta valiosa oportunidad, por la infraestructura y los servicios prestados durante mi estancia, jamás olvidaré lo que ha hecho por mi esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar mi educación con la beca de maestría No. 61299, y el financiamiento del proyecto: Localización de los sitios de síntesis y acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* L (chicalote) con clave 285887.

Agradezco a mis compañeros, por su amistad sincera y por ser testigos de lo que hoy está

AGRADECIMIENTOS

a punto de culminar en mi vida, espero que al iniciar nuestros propios caminos un día se vuelvan a cruzar.

Gracias a mis padres Adal Escobar López y Araceli del Carmen Chan Domínguez por creer en mí, dándome un ejemplo de superación y humildad. Gracias a mis hermanas Yudy Merady, Oyuki Abigail y Esmirna Esbeidy; también a mi hermano Eslim Abisai, por el apoyo incondicional en esta etapa de mi vida.

A mis hermanos en Jesús de Komchén por los bellos momentos compartidos y por ser mi apoyo moral.

DEDICATORIA

"A Elohim, Creador de los cielos y la tierra"

Gracias Padre porque has suplido mis necesidades y no me desamparas,
porque confiar en ti es soportar, caminar un paso a la vez y resistir la tempestad.
Gracias Elohim porque aunque yo no lo pensé así, resultó porque te tengo a ti,
sí pudiera repetir, lo haría otra vez, tu palabra a mí me enseñó.
Que así como la gota tiene un rumbo y la lluvia refresca nuestro mundo,
que así sea mi vida.

"A ti Isaí Abdiel"

Por el cariño que solo puede darte la que te ama.
Gracias por estar a mi lado y velar conmigo, por enseñarme que el amor no es una
palabra, sino una razón de ser, un sacrificio. Gracias por tu sencillez y por compartir tu
vida y tus sueños conmigo. Gracias por consolarme en mis horas sombrías, por tu
complicidad, tu respeto y tu confianza, por nuestros 16 de abril llenos de amor.

ÍNDICE

| | Pág. |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO I ANTECEDENTES | 3 |
| 1.1 El metabolismo secundario y los alcaloides | 3 |
| 1.1.1 Las papaveráceas productoras de alcaloides | 4 |
| 1.1.2 Metabolómica en la familia Papaverácea | 5 |
| 1.2 El género <i>Argemone</i> L (Papaveráceas) | 6 |
| 1.2.1 Alcaloides presentes en el género <i>Argemone</i> L. | 7 |
| 1.3 Alcaloides del grupo bencilisoquinolina | 8 |
| 1.3.1 Enzimas participantes en la biosíntesis de los ABI's | 11 |
| 1.3.2 Importancia de los alcaloides bencilisoquinolínicos | 13 |
| 1.4 Modelos de estudio: <i>Argemone mexicana</i> L, <i>Argemone ochroleuca</i> S y <i>Argemone platyceras</i> L y O. | 14 |
| 1.4.1 <i>Argemone mexicana</i> L. | 17 |
| 1.4.1.1 Estudios fitoquímicos en <i>A. mexicana</i> L. | 18 |
| 1.4.2 <i>Argemone ochroleuca</i> S. | 20 |
| 1.4.2.1 Estudios fitoquímicos en <i>Argemone ochroleuca</i> S | 21 |
| 1.4.3 <i>Argemone platyceras</i> L y O. | 23 |
| 1.4.3.1 Estudios fitoquímicos en <i>Argemone platyceras</i> L y O. | 22 |
| 1.4.4 Análisis transcripcional en <i>Argemone mexicana</i> L. | 23 |
| 1.5 Técnicas cromatográficas | 23 |
| 1.5.1 Análisis químicos con métodos cromatográficos | 26 |
| 1.5.2 Huella dactilar cromatográfica | 27 |
| 1.5.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF) | 27 |
| 1.5.3.1 Análisis cuantitativo por CCF | 29 |
| 1.5.4 Cromatografía en Capa Fina de Alto Rendimiento (CCF-AR) | 30 |
| 1.6 Quimiometría | 31 |
| 1.6.1 Técnicas de análisis multivariante | 32 |
| 1.6.1.1 Análisis de Componentes Principales (PCA) | 33 |
| 1.6.1.2 Análisis de Conglomerados (clúster). | 33 |
| HIPÓTESIS | 35 |
| JUSTIFICACIÓN | 35 |
| OBJETIVO GENERAL | 36 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 36 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 37 |
| BIBLIOGRAFIA | 38 |

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| CAPÍTULO II | MATERIALES Y MÉTODOS | 51 |
| 2.1 | Material vegetal | 51 |
| 2.2 | Extracción y concentración de alcaloides bencilisoquinolínicos | 51 |
| 2.3 | Separación por Cromatografía en Capa Fina (CCF) | 52 |
| 2.4 | Cuantificación de sanguinarina y berberina | 53 |
| 2.5 | Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (CCF-AR) | 53 |
| 2.5.1 | Análisis densitométrico | 54 |
| 2.6 | Análisis quimiométrico | 55 |
| 2.6.1 | Programas estadísticos | 55 |
| 2.7 | Análisis de la distribución y expresión relativa de genes involucrados en la síntesis de los ABI's en especies de <i>Argemone</i> | 55 |
| 2.7.1 | Extracción de ARN total y síntesis del ADN complementario | 56 |
| 2.7.2 | Expresión relativa por PCR en punto final. | 58 |
| 2.7.3 | Purificación de transcritos de genes involucradas en la biosíntesis de los ABI's | 58 |
| 2.7.4 | Secuenciación y alineamientos | 59 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 60 |
| CAPÍTULO III | RESULTADOS | 61 |
| 3.1 | Colecta del material vegetal | 61 |
| 3.1.1 | Selección y procesamiento del material vegetal | 62 |
| 3.2 | Obtención del extracto vegetal | 63 |
| 3.3 | Análisis por CCF de extractos alcaloidales | 63 |
| 3.4 | Análisis por CCF-AR para extractos de especies de <i>Argemone</i> | 65 |
| 3.5 | Obtención de perfiles cromatográficos de especies de <i>Argemone</i> por CCF-AR | 67 |
| 3.5.1 | Análisis de perfiles cromatográficos resueltos por los sistemas 1 y 2 | 69 |
| 3.5.2 | Identificación de alcaloides totales en perfiles cromatográficos de especies de <i>Argemone</i> | 70 |
| 3.5.3 | Distribución cuantitativa de berberina, sanguinarina, queleritrina y dihidrosanguinarina en los diferentes tejidos | 73 |
| 3.6 | Cuantificación de berberina y sanguinarina en especies de <i>Argemone</i> L. | 74 |
| 3.6.1 | Cuantificación de berberina en especies de <i>Argemone</i> L. | 74 |
| 3.6.2 | Cuantificación de sanguinarina en especies de <i>Argemone</i> L. | 78 |
| 3.7 | Análisis quimiométrico de alcaloides presentes en especies de <i>Argemone</i> | 80 |
| 3.7.1 | Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de conglomerados de compuestos detectados en especies de <i>Argemone</i> | 82 |
| 3.7.2 | PCA y Análisis de conglomerados de compuestos detectados en raíces de especies de <i>Argemone</i> | 86 |

| | | |
|---------------------|---|------------|
| 3.8 | Análisis de la distribución y expresión relativa de genes involucrados en la síntesis de los ABI's en especies de <i>Argemone</i> | 89 |
| 3.8.1 | Amplificación de transcritos en tejidos de plantas adultas en <i>A. mexicana</i> y <i>A. platyceras</i> | 92 |
| 3.8.2 | Amplificación de transcritos en tejidos de plantas de diferentes etapas de desarrollo en <i>A. platyceras</i> | 97 |
| 3.8.3 | Análisis de expresión en función de la acumulación de los alcaloides en <i>A. mexicana</i> y <i>A. platyceras</i> | 100 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 103 |
| CAPÍTULO IV | | 108 |
| 4.1 | DISCUSIÓN GENERAL | 108 |
| 4.1.1 | Establecimiento de huellas dactilares en especies de <i>Argemone</i> | 109 |
| 4.1.2 | Caracterización química de las especies mediante métodos quimiométricos | 114 |
| 4.1.3 | El metabolismo especializado en especies de <i>Argemone</i> definido por factores genéticos | 115 |
| 4.2 | CONCLUSIONES | 119 |
| 4.3 | PERSPECTIVAS | 120 |
| APÉNDICES | | 121 |
| Apéndice 1. | Matriz de datos para análisis quimiométricos en perfiles de especies de <i>Argemone</i> | 121 |
| Apéndice 2. | Análisis de amplicones obtenidos de <i>A. platyceras</i> | 123 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 131 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Figura 1.1 A) Detalle de plantas seleccionadas para el análisis metabólico en la familia Papaverácea; B) Gráfica que representan los metabolitos secundarios identificados de acuerdo a los patrones de fragmentación másica (se muestran como puntos negros; Tomado de Hagel et al., 2015). | 6 |
| Figura 1.2 Taxonomía y representación de especies del género <i>Argemone</i> L. | 7 |
| Figura 1.3 Algunos alcaloides bencilisoquinolínicos presentes en el género <i>Argemone</i> L. | 8 |
| Figura 1.4 Representación de la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos (Tomado de Rubio-Piña, 2009) | 9 |
| Figura 1.5 Diversidad estructural de los alcaloides bencilisoquinolínicos. | 10 |
| Figura 1.6 Ruta biosintética de la sanguinarina y berberina a partir de la S-reticulina. | 12 |
| Figura 1.7 Planta adulta de <i>Argemone mexicana</i> (Amapola montés, Tomado de https://media.routard.com/image/65/8/photo.1523658.w430.jpg) | 17 |
| Figura 1.8 Planta adulta de <i>Argemone ochroleuca</i> (Amapola mexicana, Tomado de https://www.biolib.cz/en/image/id290790/). | 20 |
| Figura 1.9 Planta adulta de <i>Argemone platyceras</i> (Amapola silvestre blanca, Tomado de http://phytoimages.siu.edu/imgs/ps0/r/Papaveraceae_Argemone_platyceras_2743.html). | 24 |
| Figura 1.10 Expresión génica de <i>Argemone mexicana</i> L, Tomado de Rubio Piña, 2009). | 24 |
| Figura 1.11 Integración de los perfiles de acumulación de sanguinarina y berberina con sus transcritos en plantas adultas (Tomado de Xool-Tamayo, 2009). | 25 |
| Figura 1.12 Cromatografía en Capa Fina (CCF) | 28 |
| Figura 1.13 Estrategia experimental para análisis de la diversidad fitoquímica de tres especies del género <i>Argemone</i> (Papaveraceae). | 37 |
| Figura 2.1 Proceso de extracción de alcaloides para tejidos de especies de <i>Argemone</i> . | 52 |
| Figura 2.2 Diagrama general del método aplicado por CCF-AR para la detección de alcaloides en extractos de <i>Argemone</i> . | 54 |
| Figura 3.1 Mapa de ubicación de los sitios de colecta. | 61 |
| Figura 3.2 Plantas adultas colectadas de <i>A. mexicana</i> , <i>A. ochroleuca</i> y <i>A. platyceras</i> . | 62 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Figura 3.3 | Análisis por CCF de extractos de especies de <i>Argemone</i> en el Sistema 1: n-butanol: H ₂ O: NH ₄ OH (8:1:1 v/v), placa bajo luz UV de 366 nm. | 64 |
| Figura 3.4 | Análisis por CCF de extractos alcaloidales de especies de <i>Argemone</i> en el Sistema 2 (Benceno: EtOH 94:6 v/v), placa bajo luz UV a 366 nm. | 64 |
| Figura 3.5 | Placa cromatográfica obtenida por CCF-AR para el desarrollo de perfiles de alcaloides de alta polaridad en extractos de hoja, tallo y raíz de dos poblaciones de <i>A. mexicana</i> (M-1 y M-2), <i>A. ochroleuca</i> (O) y <i>A. platyceras</i> (P), placa bajo luz UV de 366 nm. | 66 |
| Figura 3.6 | Placa cromatográfica obtenida por CCF-AR para el desarrollo de perfiles de alcaloides de mediana polaridad en extractos de raíces de las dos poblaciones de <i>A. mexicana</i> (M-1 y M-2), <i>A. ochroleuca</i> (O) y <i>A. platyceras</i> (P), placa bajo luz UV de 366 nm. | 66 |
| Figura 3.7 | Perfiles cromatográficos obtenidos por CCF-AR para alcaloides de alta polaridad (Sistema 1) presentes en especies de <i>Argemone</i> . | 68 |
| Figura 3.8 | Perfiles cromatográficos obtenidos por CCFAR para alcaloides de mediana polaridad (Sistema 2) presentes en especies de <i>Argemone</i> . | 68 |
| Figura 3.9 | Cromatograma de extracto de raíz de <i>A. platyceras</i> que muestra la identificación por fluorescencia de compuestos presentes en el Sistema 1 de elución. | 71 |
| Figura 3.10 | Cromatograma de extracto de raíz de <i>A. ochroleuca</i> que muestra la identificación por fluorescencia de compuestos presentes en el segundo sistemas de elución. | 71 |
| Figura 3.11 | Distribución de los 16 presuntos alcaloides resueltos en los perfiles cromatográficos de hojas, tallos y raíces de especies de <i>Argemone</i> . | 72 |
| Figura 3.12 | Intensidades de las señales detectadas en los perfiles de raíces de <i>Argemone</i> para berberina, sanguinarina, queleritrina y dihidrosanguinarina. | 73 |
| Figura 3.13 | Análisis por CCF para la cuantificación de berberina en extractos alcaloidales de raíces en especies de <i>Argemone</i> , placa bajo luz UV de 366 nm. | 75 |
| Figura 3.14 | Cuantificación de berberina en raíces de <i>A. mexicana</i> y <i>A. ochroleuca</i> . | 76 |
| Figura 3.15 | Análisis por CCF (izquierda) para la cuantificación de berberina en extractos alcaloidales de plantas de <i>A. platyceras</i> en diferentes etapas de desarrollo (derecha). | 77 |
| Figura 3.16 | Cuantificación de berberina en raíces de <i>A. platyceras</i> . | 77 |

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| Figura 3.17 | Análisis por CCF para la cuantificación de sanguinarina en extractos alcaloidales de hojas y tallos de <i>A. mexicana</i> 2 (M-2) y <i>A. ochroleuca</i> . | 79 |
| Figura 3.18 | Cuantificación de sanguinarina en <i>A. mexicana</i> M-2 y <i>A. ochroleuca</i> . | 79 |
| Figura 3.19 | Análisis por CCF para la cuantificación de sanguinarina en extractos alcaloidales de raíces en especies de <i>Argemone</i> . | 80 |
| Figura 3.20 | Cuantificación de sanguinarina en raíces de especies de <i>Argemone</i> . | 80 |
| Figura 3.21 | Obtención de valores de alturas de picos de perfiles cromatográficos. | 81 |
| Figura 3.22 | Coefficientes de autovalores y autovectores obtenidos a partir del Análisis de Componentes Principales sobre la matriz de correlación de variables presentes en especies de <i>Argemone</i> . | 83 |
| Figura 3.23 | Diagrama de PCA obtenido a partir de datos estandarizados de variables presentes en especies de <i>Argemone</i> . | 84 |
| Figura 3.24 | Dendograma que resume gráficamente el agrupamiento de las poblaciones en especies de <i>Argemone</i> . | 85 |
| Figura 3.25 | Coefficientes de autovalores y autovectores obtenidos a partir del Análisis de Componentes Principales sobre la matriz de correlación de variables presentes en especies de <i>Argemone</i> . | 87 |
| Figura 3.26 | Diagrama de PCA obtenido a partir de datos estandarizados de variables presentes en raíces de especies de <i>Argemone</i> . | 88 |
| Figura 3.27 | Dendograma de raíz que resume gráficamente el agrupamiento de las poblaciones en especies de <i>Argemone</i> . | 89 |
| Figura 3.28 | Genes participantes en la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en etapa temprana, reacciones específicas para la formación de benzofenantridinas y protoberberinas. | 91 |
| Figura 3.29 | ARN total obtenidos de tejidos de plantas adultas de <i>A. mexicana</i> y <i>A. platyceras</i> . | 91 |
| Figura 3.30 | Amplificaciones por PCR de las reacciones codificantes de los genes NCS, BBE (reacciones comunes) y actina (control positivo) en plantas adultas de <i>A. mexicana</i> y <i>A. platyceras</i> . | 94 |
| Figura 3.31 | Acumulación de transcritos de StySyn y TNMT en tejidos de <i>A. platyceras</i> y DBOX en tejidos de <i>A. mexicana</i> (reacciones específica para sanguinarina). | 95 |
| Figura 3.32 | Acumulación de transcritos para SOMT (reacción específica para berberina) en plantas adultas de <i>A. mexicana</i> y <i>A. platyceras</i> . | 97 |
| Figura 3.33 | Extracción de ARN total obtenidos de tejidos de plantas en tres estados tempranos de desarrollo (E1, E2 y E3) de <i>A. platyceras</i> . | 98 |

| | | |
|--------------------|---|------------|
| Figura 3.34 | Acumulación de transcritos para TNMT (reacción específica para sanguinarina) y SOMT (reacción específica para berberina) en diferentes estados de desarrollo de <i>A. platyceras</i> . | 99 |
| Figura 3.35 | A) Análisis por CCF (Sistema 1) para la visualización de berberina en extractos de raíces de plantas de <i>A. platyceras</i> en diferentes etapas de desarrollo; B). Análisis por CCF (Sistema 2) para la visualización de sanguinarina en extractos de raíces de plantas de <i>A. platyceras</i> en diferentes etapas de desarrollo. | 100 |
| Figura 4.1 | Huellas dactilares por CCF y CCF-AR de extractos alcaloidales de raíces en especies de <i>Argemone</i> en el Sistema 1 (n-butanol/H ₂ O/NH ₄ OH 8:1:1 v:v) y 2 (Benceno/EtOH 94:6 v:v). | 110 |
| Figura 4.2 | Gráfico tridimensional de todos los carriles de la placa presentada en la Fig. 3.6 con un escaneo en una longitud de onda (330 nm). | 111 |
| Figura 4.3 | Cromatogramas obtenidos por CCF-AR (330 nm) de alcaloides presentes en extractos de hojas de <i>A. mexicana</i> . | 112 |
| Figura 4.4 | Perfiles cromatográficos de Ginsenósidos separados por CCF-AR para extractos de raíces de <i>Panax ginseng</i> (RG) y <i>Panax quinquefolium</i> (AG), Tomado de Xie et al., 2006. | 113 |
| Figura 4.5 | Cromatogramas obtenidos por CCF-AR (366 nm) de saponinas de especies de <i>Bupleurum</i> (Tomado de Tian et al., 2009). | 113 |
| Figura 4.6 | Dendograma con la identificación tentativa de compuestos resultantes del análisis de fragmentación y responsables de la segregación de especies del género <i>Unonopsis</i> . | 115 |
| Figura 4.7 | Filograma químico y morfológico de las especies de <i>Argemone</i> (Tomado de Schwarzbach y Kadereit, 1999). | 117 |
| Figura 4.8 | Integración de los perfiles de acumulación de los presuntos alcaloides detectados en perfiles cromatográficos de hoja, tallo y raíz (16 en total), así los niveles los transcritos en <i>A. mexicana</i> y <i>A. platyceras</i> . | 118 |
| Figura A1.1 | Matriz de datos de alturas máximas de bandas pertenecientes a los 16 presuntos alcaloides detectados en perfiles de <i>Argemone</i> . | 122 |
| Figura A2.1 | Fragmentos de <i>A. platyceras</i> en diferentes estados de desarrollo, incluye los genes NCS1, TNMT, StySyn y SOMT en diferentes tejidos. | 124 |
| Figura A2.2 | Alineamiento de los nucleótidos de NCSAm1 y la secuencia del fragmento (#1) de NCS obtenido en hojas de plantas adultas de <i>A. platyceras</i> . | 124 |
| Figura A2.3 | Alineamiento de los nucleótidos de NCSAm1 y la secuencia del fragmento (#2) de NCS obtenido en tallo de plantas adultas de <i>A. platyceras</i> . | 125 |

| | | |
|---------------------|---|------------|
| Figura A2.4 | Alineamiento de los nucleótidos de NCSAm1 y la secuencia del fragmento (#3) de NCS obtenido en raíz de plantas adultas de <i>A. platyceras</i> . | 125 |
| Figura A2.5 | Alineamiento de los nucleótidos de TMNT en <i>Papaver bracteatum</i> y la secuencia del fragmento (#4) de TNMT obtenido en tallo de plantas adultas de <i>A. platyceras</i> . | 126 |
| Figura A2.6 | Alineamiento de los nucleótidos de TMNT en <i>Papaver bracteatum</i> y la secuencia del fragmento (#5) de TNMT obtenido en raíces de plantas adultas de <i>A. platyceras</i> . | 126 |
| Figura A2.7 | Alineamiento de los nucleótidos de StySyn en <i>Argemone mexicana</i> y la secuencia del fragmento (#6) de StySyn obtenido en raíces de plantas adultas de <i>A. platyceras</i> . | 127 |
| Figura A2.8 | Alineamiento de los nucleótidos de StySyn en <i>Argemone mexicana</i> y la secuencia del fragmento (#7) de StySyn obtenido en raíces de plantas adultas de <i>A. platyceras</i> . | 127 |
| Figura A2.9 | Alineamiento de los nucleótidos de SOMT en <i>Argemone mexicana</i> y la secuencia del fragmento (#8) de SOMT obtenido en raíces de plantas en el estado de desarrollo 1 de <i>A. platyceras</i> . | 128 |
| Figura A2.10 | Alineamiento de los nucleótidos de SOMT en <i>Argemone mexicana</i> y la secuencia del fragmento (#9) de SOMT obtenido en raíces de plantas en el estado de desarrollo 2 de <i>A. platyceras</i> . | 128 |
| Figura A2.11 | Alineamiento de los nucleótidos de SOMT en <i>Argemone mexicana</i> y la secuencia del fragmento (#10) de SOMT obtenido en tallos de plantas en el estado de desarrollo 3 de <i>A. platyceras</i> . | 129 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Cuadro 1.1 Enzimas involucradas en la síntesis de los ABI's en <i>Papaver somniferum</i> para la que han sido aislados los cDNA's | 13 |
| Cuadro 1.2 Importancia de los ABI's a nivel farmacológico (<i>Tomado de Liscombe et al., 2005</i>). | 14 |
| Cuadro 1.3 Características predominantes de las especies de estudio. | 15 |
| Cuadro 1.4 Resumen de estudios fitoquímicos de <i>A. mexicana</i> L., <i>A. ochroleuca</i> S y <i>A. platyceras</i> L y O. | 15 |
| Cuadro 1.5 Alcaloides aislados de cuatro especies del género <i>Argemone</i> (<i>Tomado de Israilov y Yunusov, 1986</i>). | 16 |
| Cuadro 1.6 Distribución de los ABI's en los diferentes tejidos de <i>A. mexicana</i> . (<i>Modificado de Brahmachari et al., 2013</i>). | 19 |
| Cuadro 2.1 Descripción de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los ABI's tipo protoberberina y benzofenantridina (<i>Modificado de Xool; 2016; Xool-Tamayo et al., 2017; Vergara-Olivares, 2016</i>). | 56 |
| Cuadro 3.1 Características de los individuos colectados de las diferentes especies de <i>Argemone</i> . | 62 |
| Cuadro 3.2 Análisis de perfiles cromatográficos de extractos del género <i>Argemone</i> en el Sistema 1. Be, berberina. | 69 |
| Cuadro 3.3 Análisis de perfiles cromatográficos de extractos del género <i>Argemone</i> en el Sistema 2. Que, queleritrina; Sa, sanguinarina. | 70 |
| Cuadro 3.4 Secuencias de oligonucleótidos iniciadores y tamaño de los productos esperados de los transcritos ABI's en <i>A. mexicana</i> (Xool-Tamayo, 2016; Xool-Tamayo et al., 2017; Vergara-Olivares, 2016). F, dirección sentido; R, dirección antisentido. | 92 |
| Cuadro 3.5 Resultados de amplificaciones en tejidos de plantas adultas para <i>A. mexicana</i> y <i>A. platyceras</i> con los sitios de acumulación. | 102 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| ABI's | Alcaloides bencilisoquinolínicos |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| ADNc | ADN complementario |
| TYDC | Tirosina/dopa descarboxilasa |
| NCS | Norcoclaurina sintasa |
| BBE | Enzima puente de berberina |
| SOMT | Escoulerina-9-O-metiltransferas |
| STOX | Tetrahidroprotoberberinaoxidas |
| CheSyn | Queilantifolina sintasa |
| DBOX | Dihidrobzofenantridinaoxidasa |
| SanR | Sanguinarina reductasa |
| DOPA | Dihidroxefenilalanina |
| StySyn | S-estilopina sintasa |
| TNMT | Tetrahidroprotoberberina <i>cis-N</i> -metiltransferasa |
| Sa | Sanguinarina |
| Be | Berberina |
| Que | Queleritrina |
| Dsa | Dihidrosanguinarina |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| FT | Factores de transcripción |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| CCF-AR | Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución |
| CC | Cromatografía en columna |
| AR | Alta resolución |
| AM | Análisis Multivariante |
| PCA | Análisis de Componentes Principales |
| PLS | Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales |
| RM | Resonancia magnética |
| PS | Peso seco |
| M-1 | <i>A. mexicana</i> población 1 |
| M-2 | <i>A. mexicana</i> población 2 |
| O | <i>A. ochroleuca</i> |
| P | <i>A. platyceras</i> |

RESUMEN

El género *Argemone* agrupa a varias especies con propiedades medicinales, como *A. mexicana* L; *A. platyceras* L y O y *A. ochroleuca* Sweet. Las propiedades medicinales de estas especies están relacionadas con su capacidad para acumular alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's). En este trabajo se realizó una caracterización fitoquímica por Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución acoplada a densitometría de los alcaloides presentes en tejidos de hojas, tallos y raíces de estas tres especies. Esto permitió la detección de un total de 16 presuntos alcaloides. De estos, cuatro fueron identificados con base en su similitud a estándares comerciales (berberina, queleritrina, sanguinarina y dihidrosanguinarina) y dos fueron cuantificados (berberina y sanguinarina). Al realizar un análisis de componentes principales de la distribución de los alcaloides en los diferentes tejidos y especies, se observó que la composición de las partes aéreas resultaron semejantes entre sí ya que todos los alcaloides detectados en hojas y tallos se agruparon en un sólo conjunto. Sin embargo, la composición en las raíces de las tres especies se segregó en dos grupos, uno formado por *A. mexicana* y *A. ochroleuca*, y otro formado por solamente *A. platyceras*. Esto puede indicar que las diferencias en cuanto a composición de alcaloides ocurren principalmente en las raíces de estas especies. Por otra parte, el análisis multivariado de los datos, indicó que en la formación de grupos influyó la diversidad de alcaloides (número de alcaloides detectados en el análisis cromatográfico), así como el contenido de estos. Del mismo modo, que la diversidad de alcaloides en plantas adultas de las especies estudiadas está determinada principalmente por el tipo de tejido.

También se realizaron análisis de la distribución de transcritos correspondientes a los genes involucrados en las reacciones tempranas de la síntesis de sanguinarina y berberina, que son comunes para ambos, así como algunos los responsables de las reacciones específicas para la síntesis de cada uno de ellos. En hojas, tallos y raíces de plantas adultas de *A. mexicana* se presentaron niveles importantes de los transcritos analizados, mientras que en *A. platyceras*, la mayor abundancia de los transcritos se observó en la raíz, sugiriendo que tejido participa de forma más activa en la síntesis de alcaloides. La detección de los transcritos en los tejidos de *A. platyceras* sugiere que la maquinaria biosintética invierte más recursos para la producción de sanguinarina, en contraste con lo que ocurre en plantas de *A. mexicana* donde se ha observado mayor producción de berberina.

ABSTRACT

The genus *Argemone* includes a number of species with medicinal properties including *A. mexicana* L; *A. platyceras* L y O y *A. ochroleuca* Sweet. Such properties could be related to the presence of benzyliisoquinoline alkaloids (BIA's), distributed along the different tissues. In this work, the phytochemical alkaloid profiling of the three above mentioned *Argemone* species was performed in leaves, stems and roots by means of High Performance Thin-layer Chromatography coupled to densitometry (HPTLC-D) of the alkaloids present in tissues of leaves, stems and roots of these three species. A total of 16 putative alkaloids were detected, identifying four of them by comparison to commercial standards (berberine, chelerythrine, sanguinarine and dihydrosanguinarine) and quantifying two (berberine and sanguinarine). A principal component analysis of the alkaloid tissue distribution in these three species revealed that the composition of the aerial tissues (leaves and stems) resulted similar among them whereas roots segregated in two groups. The first one included both *A. mexicana* and *A. ochroleuca*, with *A. platyceras* in the second. In this way, differences in alkaloid tissue composition could occur mainly in roots among these three species. In addition, multivariate analysis suggested that grouping was affected by alkaloid diversity (i.e. the number of alkaloids detected) as well as for the contents. Moreover, that alkaloid diversity in the analyzed species was mainly determined by tissue.

The distribution of transcripts corresponding to selected genes involved in the early, common biosynthetic reactions of berberine and sanguinarine was also analyzed along with that of those involved in reactions exclusively committed to each alkaloid. Although in mature *A. mexicana* plants, the analyzed transcripts were detected in all the examined tissues (leaves, stems and roots), in *A. platyceras* they were mainly detected in roots. These results suggest that whereas in *A. platyceras* sanguinarine seems to be the main alkaloid produced, in *A. mexicana* berberine production takes precedence.

INTRODUCCIÓN

Argemone L. (Papaveraceae) es un género ampliamente distribuido que se encuentra principalmente en áreas cálidas y secas del Nuevo Mundo con su centro de distribución en el suroeste de los Estados Unidos y el norte de México. El género comprende hierbas anuales y perennes o raramente arbustos con hojas mayormente incisas y partes espinosas, bien definidas por una combinación de caracteres morfológicos (Schwarzbach y Kadereit, 1999). En este género después de una revisión crítica de 32 especies descritas se redujeron a 25 (McDonald-Andrew, 1991).

El interés por las especies de *Argemone* se debe a la naturaleza específica de los diversos grupos de alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's) que contienen. Ya que muchos de estos ABI's presentan actividades farmacológicas y debido a que *Argemone* a menudo ha sido considerada como un pariente cercano del género *Papaver* la posiciona como objetivo interesante en la búsqueda de nuevos alcaloides para uso medicinal (Schwarzbach y Kadereit, 1999).

Por otro lado, tal como la propusieron Schwarzbach y Kadereit (1999), *Argemone* se puede subdividir en dos grupos según la presencia de ciertos ABI's productos de diferentes vías biosintéticas. El primero incluye especies que contienen alcaloides tipo pthalidoisoquinolina, y el segundo se caracteriza por la presencia de protoberberinas o derivados, principalmente protopinas y benzofenantridinas (Hagel y Facchini, 2013).

Entre las principales diferencias en las especies de este género está su capacidad para producir berberina, una protoberberina (Grycová *et al* 2007), sin embargo, a pesar del potencial biosintético que presentan las especies del género hasta la fecha no cuentan con un estudio fitoquímico sistemático.

Con el fin de analizar la diversidad de alcaloides presentes en *Argemone* L. se seleccionaron las especies: *A. mexicana* L; *A. platyceras* L y O; *A. ochroleuca* Sweet, representativas del territorio mexicano. Uno de los propósitos de este trabajo fue demostrar que por medio de un análisis cromatográfico y quimiométrico se pueden sentar las bases quimiotaxonómicas de las especies, así como proveer la información necesaria para identificar algunas enzimas responsables de sus potenciales biosintéticos.

Con la modernización, para el proceso de separación de las mezclas herbolarias se desarrollaron métodos en Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (CCF-AR) que con gran reproducibilidad nos permitió obtener perfiles cromatográficos únicos de un individuo por especie. La correcta separación de los principales compuestos presentes en los perfiles: berberina y sanguinarina, nos permitió cuantificar sus contenidos. Como un paso inicial hacia la identificación de los compuestos separados, las bandas observadas en los perfiles se clasificaron de acuerdo con sus valores de relación frontal (R_f) y propiedades fluorescentes, detectando un total de 16 presuntos alcaloides. Con la utilidad de Cromatografía en Capa Fina (CCF) acoplada a densitometría se analizó el contenido de los 16 alcaloides en extractos de hojas, tallos y raíces. En seguida, las señales obtenidas en todos los perfiles cromatográficos se correlacionaron con análisis multivariantes utilizados en la quimiometría (PCA y Análisis de Conglomerados). De acuerdo con los análisis multivariados, se deduce que los perfiles cromatográficos en las partes aéreas de las tres especies son semejantes, y que los 16 alcaloides detectados parecen ser responsables de la segregación de las tres especies de *Argemone* en los perfiles de raíces.

De igual forma el interés de este trabajo se centró en estudios moleculares de enzimas involucradas en la síntesis de los ABI's en plantas adultas de *A. mexicana* y *A. platyceras* L y O que nos permitieron entender los diferentes niveles de regulación existentes en la síntesis de los alcaloides en estas dos especies.

Se analizó la distribución de los transcritos correspondientes a los genes involucrados en la síntesis de la rama común [(S)-norcoclaurina sintasa (NCS) y la enzima del puente de berberina (BBE)], los responsables de las reacciones específicas para la síntesis de sanguinarina [dihidrobenzofenantridina oxidasa (DBOX), la S-estilopina sintasa (StySyn) y tetrahidroprotoberberina cis-N-metiltransferasa (TNMT)] y para la síntesis de berberina [escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT) y la S-tetrahydroberberina oxidasa (STOX)]. Las mayores diferencias se obtuvieron en *A. platyceras*, ya que se obtuvieron amplificaciones de NCS mas no de BBE, no se observó señal alguna de transcritos participantes en la síntesis de berberina y las amplificaciones para la síntesis de sanguinarina correspondientes a StySyn y TNMT fueron solo en tallos y raíces, mientras que en los tejidos de *A. mexicana* se detectaron niveles importantes de transcritos de los genes NCS, BBE, SOMT y DBOX en hojas, tallos y raíces.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 El metabolismo secundario y los alcaloides

Las plantas producen una increíble diversidad de compuestos químicos de bajo peso molecular que son productos de los procesos propios de su funcionamiento celular. El tipo y los niveles en que estos compuestos o metabolitos se encuentran en los tejidos de las plantas que los forman es un reflejo de los componentes genéticos, ambientales y de desarrollo de las plantas y son propios de cada especie (Budczies *et al.*, 2012). Uno de los conceptos claves en el estudio de los metabolitos es la metabolómica, que comprende el análisis de todos los metabolitos presentes en un organismo, otro concepto clave es la quimiotaxonomía, una rama de la ciencia que relaciona la clasificación taxonómica que guarda una planta con los metabolitos secundarios que produce (Vesteinsdottir *et al.*, 2010).

Una clasificación sencilla de los metabolitos generados por las plantas los puede agrupar en dos grandes conjuntos. Los metabolitos primarios, son aquellos que parten de vías metabólicas comunes de todas las plantas, estos se encuentran en cantidades relativamente elevadas ya que sus funciones son básicas para el funcionamiento de todas las especies; y los metabolitos secundarios, que se acumulan en bajas cantidades y se encuentran distribuidos diferencialmente entre grupos taxonómicos. Estos compuestos, que no son esenciales para el mantenimiento o funcionamiento celular son responsables de la gran diversidad fitoquímica de las plantas. Cada especie de planta produce su propia mezcla de metabolitos, distinta a la de otras especies y si bien estos compuestos no son fundamentales para completar el ciclo vital de la planta, si les confieren ventajas adaptativas ya que participan en diferentes tipos de interacciones de las plantas con su entorno (Pichersky y Gang, 2000).

Uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios que se encuentran en los organismos vivos son los alcaloides, que poseen una gran variedad de tipos de estructuras, rutas biosintéticas y actividades farmacológicas. En 1803 se aisló el primer alcaloide, la narcotina, y le siguieron rápidamente otros como la morfina, estricnina y quinina. Si bien los alcaloides se han usado durante cientos de años en la medicina, hoy en día algunos todavía

son medicamentos prominentes. Aunque los alcaloides se han aislado tradicionalmente de las plantas, cada vez se encuentran más en animales, insectos e invertebrados y microorganismos marinos (Gros *et al.*, 1985; Cordell *et al.*, 2001). Hasta la fecha se conocen alrededor de 50,000 productos naturales, de los cuáles más de 12,000 alcaloides y están distribuidos en diferentes especies que representan cerca de 14.2% de la flora del mundo (Aniszewski-Tadeusz, 2015).

Con respecto a las propiedades químicas de los alcaloides cabe mencionar que son un grupo importante de aminas biológicamente activas. La mayoría se encuentran como bases libres y son solubles en disolventes orgánicos (polares y apolares) e insolubles en agua y mezclas hidroalcohólicas debido al nitrógeno de su estructura. En su forma de sal son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas, pero insolubles en disolventes orgánicos apolares, además de que su solubilidad es dependiente del pH (Arango-Acosta, 2008). Debido a su alto grado de actividad biológica muchos se emplean principalmente como analgésicos; sin embargo, todos son tóxicos y pueden causar la muerte si se ingieren en grandes concentraciones.

1.1.1 Las Papaveráceas productoras de alcaloides

La familia de las Papaveraceae comprende cerca de 700 especies localizadas en las regiones templadas y frías del hemisferio norte. Se trata, sobre todo, de plantas herbáceas y sólo raramente arbustivas (*Bocconia*), perennes y anuales; normalmente laticíferas, con el látex blanco (*Papaver*), anaranjado (*Chelidonium*), o rojo (*Sanguinaria*). La familia está tradicionalmente subdividida en 2 subfamilias: *Papaveroideae*, con numerosos carpelos, y como fruto una cápsula (*Papaver*), o con 2 carpelos (*Chelidonium*, *Sanguinaria*, *Glaucium*); *Fumarioideae*, con flores zigomorfas por la presencia de 1-2 pétalos espolonados, nectarios en la base de los estambres, gineceo con 2 carpelos, aquenios, y cuyos géneros principales son: *Fumaria*, *Corydalis*, *Hypecoum* (Aizpuru *et al.* 1993; Carretero- José, 2004).

Las Papaveráceas presentan un notable interés como plantas medicinales, principalmente por la presencia de alcaloides. En particular, las propiedades de la adormidera *Papaver somniferum*, de la cual se deriva la morfina, son bien conocidas y explotadas. El mismo género tiene variedades muy apreciadas como plantas ornamentales por sus flores (Martínez-Moreno, 2016; Acevska *et al.*, 2012).

Los alcaloides presentes en plantas de esta familia son del tipo bencilisoquinolínicos derivados de la tirosina e incluyen berberina, protopina, pavina, isopavina, y entre otros muchos (Kadereit *et al.*, 1997).

1.1.2 Metabolómica en la familia Papaverácea

Entre los estudios registrados en especies de la familia Papaverácea, una investigación publicada en el 2012 (Farrow *et al.*) seleccionó 18 especies productoras de alcaloides bencilisoquinolínicos pertenecientes a cuatro familias relacionadas: Papaverácea, Berberidácea, Ranunculácea y Menispermácea. Al analizar los perfiles metabólicos de los cultivos celulares para las papaveráceas, se encontraron en mayor abundancia alcaloides del tipo benzofenantridina (sanguinarina, chelirubina y macarpina) y las formas reducidas de estos alcaloides (dihidosanguinarina, dihidrochelirubina y dihidromacarpina). Por el contrario, se detectaron productos finales de alcaloides de protoberberina más sustituidos (por ejemplo, jatrorrhizina, palmatina y pseudopalmatina) sólo en miembros de las Berberidáceas y Menispermáceas.

En otro estudio metabólico realizado por Hagel y colaboradores (2015) se eligió un pequeño número de especies de plantas modelo productoras de alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's) pertenecientes a la familia Papaverácea (Fig.1.1A) para comprender el metabolismo de alcaloides en plantas como la adormidera (*Papaver somniferum*), que acumula agentes farmacológicos importantes como la codeína y la morfina. El enfoque multifacético adoptado en este estudio por Hagel y colaboradores (2015) combinó técnicas diferentes para obtener una instantánea más amplia y precisa del metabolismo primario y secundario en las diferentes especies de plantas. En los perfiles de metabolitos secundarios obtenidos por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masa-Masas (LC-MS/MS) se confirmó la presencia de berberina en varias especies (Fig.1.1B). Los resultados de LC-MS/MS se resumieron como cromatógrafos representativos. *Corydalis chelanthifolia* resultó rica en varios alcaloides que se encontraron en sólo algunas otras especies o ninguna. De acuerdo a los patrones de fragmentación másica, en esta especie incluyeron potencialmente alcaloides de pthalidoisoquinolina.



Figura 1.1 A) Detalle de plantas seleccionadas para el análisis metabólico en la familia Papaveráceas; B) Gráfica que representan los metabolitos secundarios identificados de acuerdo a los patrones de fragmentación másica (se muestran como puntos negros; Tomado de Hagel et al., 2015).

1.2 El género *Argemone* L (Papaveráceas)

Dentro de la familia de la Papaveráceas, el género *Argemone* L. (Fig. 1.2) que comprende cerca de 25 especies ha formado parte de la flora nativa de México, y aunque hasta la fecha no se conoce con exactitud el área de distribución original de estas especies, están repartidas en prácticamente todo el país (Schwarzbach y Kadereit, 1999). Conocidas como chicalotes muchas de ellas se emplean como plantas medicinales y en la elaboración de algunos plaguicidas para agricultura orgánica (Warikoo y Kumar, 2013).

Los chicalotes son plantas herbáceas, anuales o perennes (rara vez arbustivas) con látex acuoso blanquecino o amarillento hasta anaranjado o rojizo, erectas o ascendentes, por lo común espinosas y más o menos glaucas; tallos con frecuencia muy ramificados; hojas a menudo dispuestas tanto en roseta basal como alternas sobre el tallo; flores actinomorfas, relativamente grandes y vistosas, normalmente de forma acopada; sépalos 2 a 6, se observan sólo en el botón, cada sépalo se alarga en el ápice en una especie de cuerno que termina en una espina; pétalos 4 a 6 (a 8, pero más comúnmente 6), caducos; cápsula cilíndrica o fusiforme, dehiscente por 3 a 7 valvas apicales, con frecuencia provista de espinas, el corto estilo y el estigma persistentes; semillas numerosas, globosas, apiculadas hacia el micrópilo, testa reticulada (Ownbey-Gerald, 1958).

Taxonomía Género *Argemone* L.

| | |
|-------------------|-------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Tracheobionta |
| Filo | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Magnoliidae |
| Orden | Papaverales |
| Familia | Papaveraceae |
| Subfamilia | Papaveroideae |
| Tribu | Papavereae |
| Género | <i>Argemone</i> L |



Figura 1. 2 Taxonomía y representación de especies del género *Argemone* L.

Aunque tienen una larga historia en la medicina tradicional mexicana, hasta la fecha no se han reportado metodologías específicas para el análisis, el control de calidad o para la autenticación total de extractos derivados de estas especies, ya que la presencia de diversos alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's) en sus tejidos podrían explicar las propiedades que se les atribuyen (Capasso *et al.*, 2002). Estos alcaloides son derivados de la tirosina y representan uno de los grupos más diversos con más de 2500 compuestos identificados en las diferentes plantas que los producen (Narcross *et al.*, 2016). En secciones posteriores se describe el proceso de síntesis de estos alcaloides.

1.2.1 Alcaloides presentes en el género *Argemone* L.

Las diferentes especies del género *Argemone* L. producen alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's) (Liscombe *et al.* 2005). Se han detectado principalmente alcaloides de los grupos benzofenantridina, protopina y protoberberina (Fig. 1.3). Sin embargo, una de las principales diferencias entre las especies de este género es su capacidad para producir berberina, una protoberberina.

En la península de Yucatán *Argemone mexicana* L, comúnmente llamada cardo santo, se reconoce por sus propiedades medicinales (Siddiqui *et al.*, 2002). Esta planta produce sanguinaria y berberina simultáneamente, que se acumulan tanto en partes aéreas como subterráneas, siendo colectada y comercializada con fines de elaboración de plaguicidas para agricultura orgánica (Rubio y Vázquez, 2013).

A menudo, otras especies que no producen berberina son mezcladas en las colectas de *A. mexicana* L. reduciendo su eficiencia. Sin embargo, en las especies que no producen berberina se pueden encontrar otros alcaloides del tipo protoberberina como coptisina, cheilantifolina y columbamina (Grycová *et al* 2007).

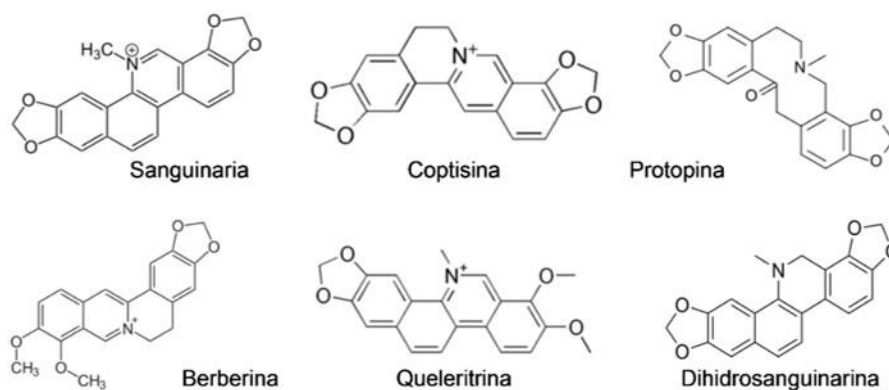


Figura 1.3 Algunos alcaloides bencilisoquinolínicos presentes en el género *Argemone* L.

Las diferencias estructurales entre estos alcaloides son mínimas, lo que indica que son derivados de intermediarios comunes o productos alternos de rutas metabólicas divergentes en las etapas finales.

1.3 Alcaloides del grupo bencilisoquinolina

Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's) se forman a partir de tirosina y representan una de las familias más diversas de alcaloides, se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro bencílico (Facchi y Bird., 1998; Facchi *et al.*, 2000). Los estudios para tratar de establecer la biosíntesis de ABI's iniciaron en 1910 con Winterstein y Trier en Alemania, señalando los primeros precursores derivados de la tirosina. Es decir, han pasado doscientos años desde el aislamiento del primer ABI, y cien del inicio de los estudios para tratar de descubrir cómo

se forman en las plantas (Rueffer y Zenk., 1987).

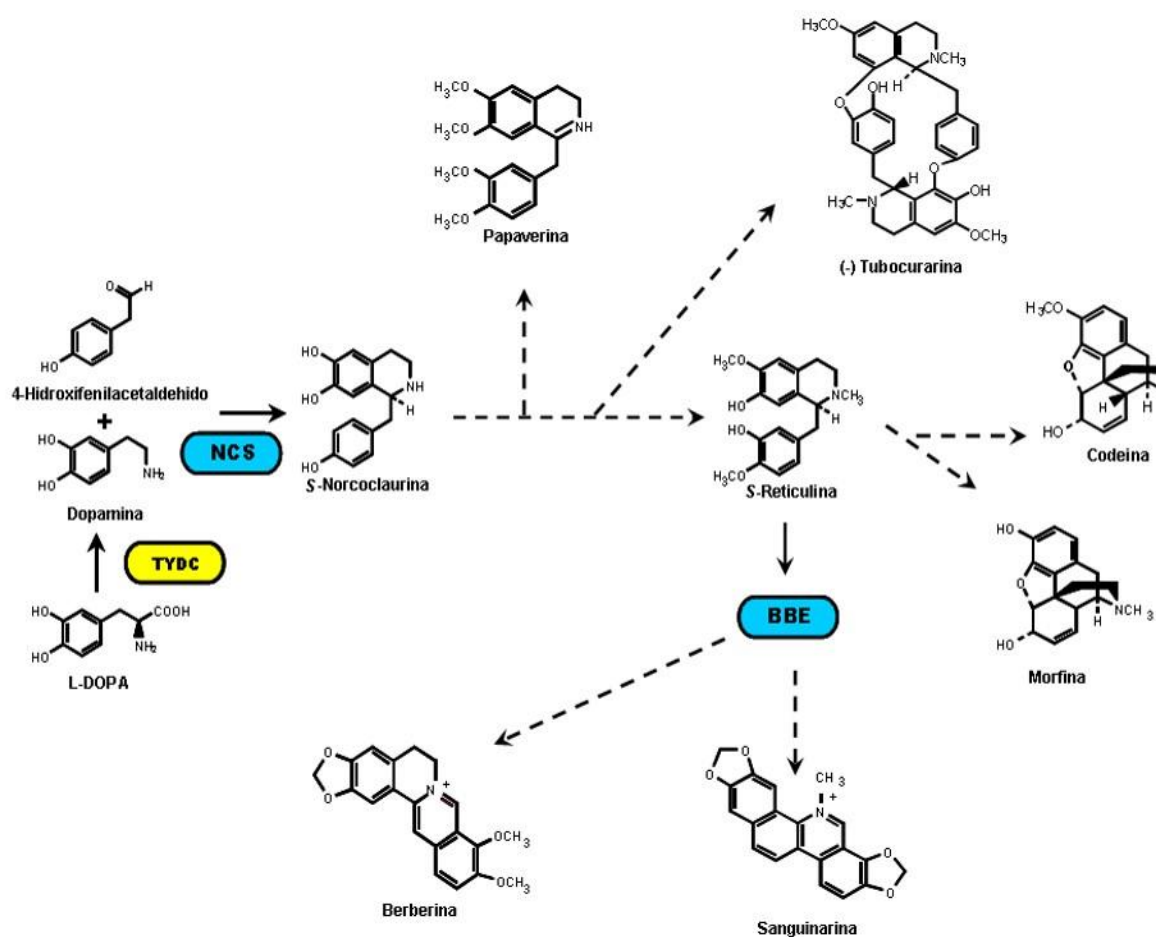


Figura 1.4 Representación de la biosíntesis de alcaloides bencilisquinolinícos (*Tomado de Rubio-Piña, 2009*). TYDC, tirosina/dopa decarboxilasa; NCS, norcoclaurina sintasa; BBE, enzima del puente de berberina).

De manera general, la ruta de biosíntesis de los ABI's se puede dividir en tres etapas (Fig. 1.4). En la etapa inicial, dos moléculas de tirosina, experimentan una serie de reacciones para producir dopamina y 4-hidroxiacetilfenilacetaldehído (4-HPAA), dos intermediarios que se condensan para producir (S)-norcoclaurina, que es considerado como el precursor central de todos los ABI's. La segunda etapa corresponde a la formación de (S)-reticulina, el último intermediario común en la síntesis de todos los alcaloides de este tipo. En la etapa final, la ruta de biosíntesis se ramifica para producir los tres tipos principales de alcaloides de este grupo: benzofenantridina (sanguinarina), protoberberina (berberina) y los morfinaños (morfina) (Rubio-Piña, 2009). Empezando con la morfina, el primer alcaloide

bencilisoquinolínico conocido, aislada del opio por Friedrich Wilhelm Sertürner en 1805, hasta hoy, se cuentan con un número cercano a 2500 estructuras (Schafer. D, 2007; Meyer y Imming., 2011). Dependiendo de su estructura, los ABI´s pueden agruparse en diferentes tipos, que incluyen a los morfínicos, las protopinas, las aporfinas, las benzofenantridinas y las protoberberinas, entre otros (Fig. 1.5).

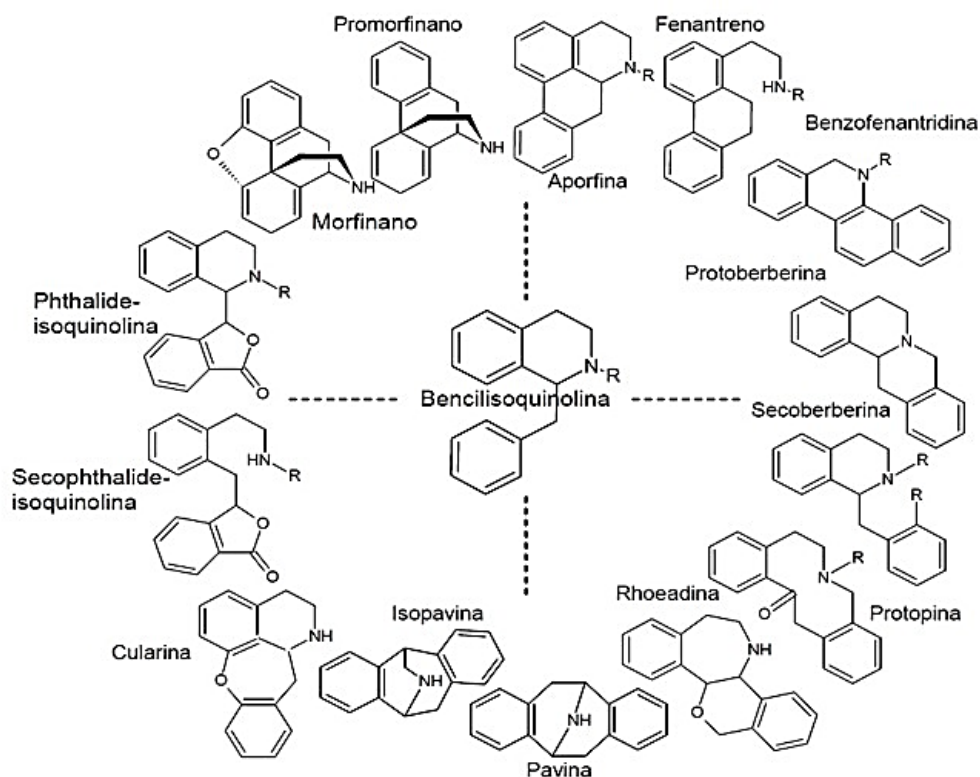


Figura 1.5 Diversidad estructural de los alcaloides bencilisoquinolínicos. Los diferentes tipos de ABI´s son el resultado de las modificaciones a la bencilisoquinolina, compuesto químico que constituye la columna vertebral estructural (Zenk *et al.*, 1985; Liscombe *et al.*, 2005).

Los diferentes tipos de ABI´s se distribuyen siguiendo patrones filogenéticos definidos. De este modo, los alcaloides tipo protoberberina se distribuyen principalmente, pero no de manera exclusiva, en plantas de la familia Berberidaceae, mientras que las benzofenantridinas se distribuyen principalmente en las Papaveráceas (Facchini *et al.*, 1996; Liscombe *et al.*, 2005).

1.3.1 Enzimas participantes en la biosíntesis de los ABI's

Un número restringido de familias de enzimas se ha implicado en el metabolismo de los ABI's. Mientras que algunas enzimas exhiben un rango de sustrato relativamente amplio, otras son altamente específicas del sustrato. Las enzimas de las categorías oxidorreductasa, transferasa y liasa se han caracterizado a partir de plantas productoras de ABI's (Hagel y Facchini, 2013; Choi *et al.*, 2002; Dittrich-Kutchan, 1991).

La primera enzima comprometida del metabolismo ABI's, (S)-norcoclaurina sintasa (NCS), cataliza la condensación de dopamina y 4-HPAA a través de la formación de un enlace C-C, produciendo el núcleo básico de 1-bencilisoquinolina. Las reacciones continúan con la conversión de la S-norcoclaurina en S-scoclaurina por la norcoclaurina 6-O-metiltransferasa (6OMT). S-reticulina es el punto intermedio de ramificación para la mayoría de las vías de las ramificaciones, incluidas las que conducen a sanguinarina, noscapina, berberina y morfina. La conversión de S-reticulina a la protoberberina S-scoulerina por la enzima del puente de berberina (BBE) es un paso comprometido en la biosíntesis de varios alcaloides (Hagel *et al.* 2012; De-Eknamkul *et al.* 2000).

Las reacciones específicas para la formación de benzofenantridinas inician con la transformación de la S-escoulerina a S-queilantifolina. Este paso se lleva a cabo por la queilantifolina sintasa (CheSyn). Como último paso, la dihidrosanguinarina se convierte a sanguinarina por la dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX) (Fig. 1.6). Por su parte, la síntesis de las protoberberinas inicia con la conversión de la S-escoulerina en S-tetrahydrocolumbamina. Este paso es llevado a cabo por la escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT). Enseguida, la S-tetrahydrocolumbamina se convierte en S-canadina por la canadina sintasa (CAS). Esta enzima fue detectada en los géneros *Thalictrum* y *Coptis*. Finalmente, la S-canadina se oxida a berberina por acción de la S-tetrahydroberberina oxidasa (STOX) (Rubio-Piña, 2009).

En los últimos años los ADNc's correspondientes a las enzimas involucradas en la síntesis de los ABI's han sido aislados y caracterizados en diversas especies (Steffens *et al.*, 1985; Unterlinner *et al.*, 1999). *Papaver somniferum*, es un modelo ventajoso para el estudio de la síntesis de los ABI's ya que produce tanto alcaloides de tipo benzofenantridina, como los de tipo morfínicos (Facchini y Bird, 1998; Zulak *et al.*, 2008).

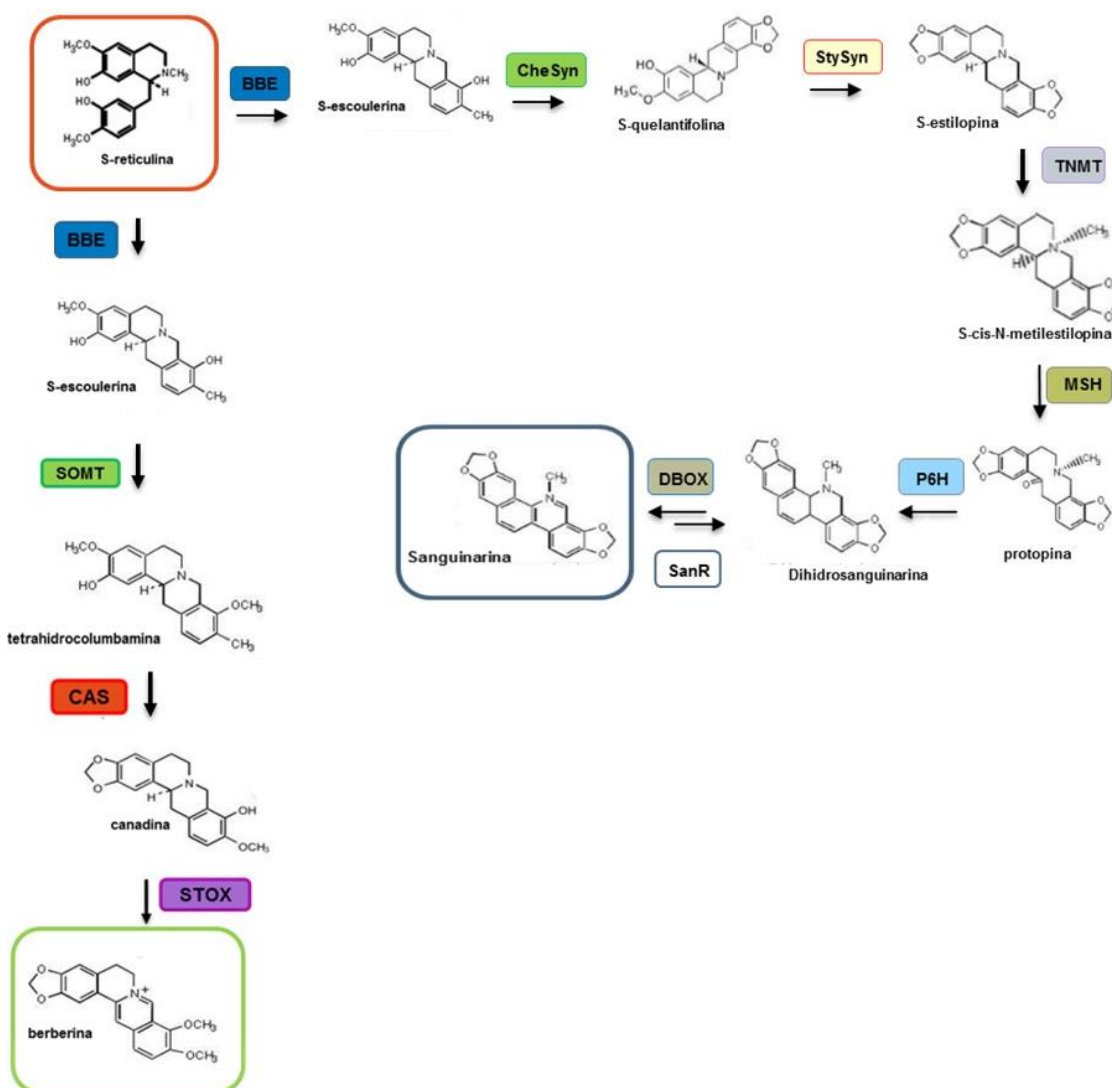


Figura 1.6 Ruta biosintética de la sanguinarina y berberina a partir de la S-reticulina. La síntesis de la sanguinarina requiere de las siguientes enzimas: queilantifolina sintasa (**CheSyn**), S-estilopina sintasa (**StySyn**); tetrahidroprotoberberina cis-N-metiltransferasa (**TNMT**); N-metilestilopina 14-hidroxilasa (**MSH**); protopina 6-hidroxilasa (**P6H**); dihidrobenzofenantridina oxidasa (**DBOX**); sanguinarina reductasa (**SanR**). Por otro lado, para la formación de la berberina se necesita las siguientes enzimas: escoulerina-9-O-metiltransferasa (**SOMT**); canadina sintasa (**CAS**); tetrahidroprotoberberina oxidasa (**STOX**) (modificado de Rubio-Piña, 2009).

En las suspensiones celulares de esta planta se han podido detectar por inmunocitoquímica siete enzimas: 6´OMT, CNMT, NMCH, 4´OMT, BBE, SAT, COR (Cuadro 1.1), mientras que los transcritos correspondientes se han localizado en las células acompañantes (Samanani *et al.* 2006; Liscombe y Facchini, 2008).

Cuadro 1.1 Enzimas involucradas en la síntesis de los ABI's en *Papaver somniferum* para la que han sido aislados los cDNA's

| Enzima | Función | Especie | Expresión | Referencia |
|--------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------------|
| TyDC | Tirosina descarboxilasa | <i>P. Somniferum</i> | Tallo y raíz | Liscombe <i>et al.</i> , 2005 |
| NCS | Norcocclaurina sintasa | <i>P. somniferum</i> | Tallo, peciolo | Liscombe <i>et al.</i> , 2005 |
| 6'OMT | Norcocclaurina 6-O-metiltransferasa | <i>P. somniferum</i> | Tallo, raíz, hoja, cápsula | Inui <i>et al.</i> , 2000 |
| BEE | Enzima del puente de berberina | <i>P. somniferum</i> | Tallo, raíz, hoja, brote | Dittrich y Kutchan, 1991 |
| CNMT | Cocclaurina N-metiltransferasa | <i>P. somniferum</i> | Tallo, raíz, brote | Choi <i>et al.</i> , 2002 |
| COR | Codeinona reductasa | <i>P. somniferum</i> | Tallo, raíz, hoja, cápsula | Unterlinner <i>et al.</i> , 1999 |

Los cultivos de diferentes especies de Papaveráceas son capaces de sintetizar alcaloides. Por ejemplo, en cultivos de *Eschscholzia californica* y *Sambucus canadensis*, se detectó sanguinarina al ser expuestos a un inductor (PS) (Zulak *et al.*, 2008).

1.3.2 Importancia de los alcaloides bencilisoquinolínicos

La función de los ABI's en plantas incluye protección contra herbívoros y agentes patógenos. La actividad farmacológica de algunos de estos alcaloides los hace útiles en el tratamiento de diversas afecciones y nos permite tener una idea de su función biológica en la planta (Facchini-Peter, 2001; Ziegler y Facchini, 2008). Por ejemplo, la morfina tiene eficacia como analgésico, la colchicina provoca la disrupción de los microtúbulos y la (+)-tubocurarina es un bloqueador neuromuscular. Esto sugiere que los alcaloides también podrían funcionar en plantas como protección en contra del ataque de herbívoros. Por otro lado, las propiedades antimicrobianas de la sanguinarina y la berberina sugieren que estos alcaloides confieren protección contra patógenos (Schmeller *et al.*, 1997). Muchas plantas, tales como las Papaveráceas, invierten considerables recursos para la producción de estos alcaloides, lo que sugiere que estos componentes juegan un papel relevante en la fisiología de la planta (Schmeller *et al.*, 1997; Wink *et al.*, 1998). Dado que son reconocidos por las propiedades farmacológicas que exhiben (cuadro 1.2) y la importancia comercial de algunos de los alcaloides de este grupo, las rutas metabólicas involucradas en su biosíntesis han sido estudiadas con detalle y en los últimos años se han dilucidado algunas de éstas. Sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares y los controles bioquímicos

son limitados, debido a que solo recientemente se han aplicado técnicas moleculares como herramientas para el estudio de los mecanismos que las regulan (Facchini *et al.*, 2000).

Cuadro 1.2 Importancia de los ABI's a nivel farmacológico (Tomado de Liscombe *et al.*, 2005).


| Alcaloide | Actividad farmacológica | Planta de donde se aisló |
|--------------|---|---------------------------------|
| Anonaína | Antimicrobiano | <i>Annona muricata</i> |
| Berberina | Antimicrobiano | <i>Coptis japónica</i> |
| Codeína | Analgesico narcótico | <i>Argemone mexicana</i> |
| Colchicina | Disruptivo muscular | <i>Colchium autumnale</i> |
| Emetina | Parasitocida | <i>Uragoga ipecacuana</i> |
| Liriodenina | Antimicrobiana, Anticancerígeno | <i>Annona diversifolia</i> |
| Morfina | Analgesico narcótico | <i>Papaver somniferum</i> |
| Noscapina | Antiespasmodico, Potencial antineoplásico | <i>Papaver somniferum</i> |
| Papaverina | Vasodilatador | <i>Papaver somniferum</i> |
| Sanguinarina | Antimicrobiano | <i>Sanguinaria canadiensis</i> |
| Tubocurarina | Bloqueador muscular | <i>Chondodendron tomentosum</i> |
| Tetrandrina | Bloqueador de canales de Ca ²⁺ | <i>Stephania tetandra</i> |

1.4 Modelos de estudio: *Argemone mexicana* L, *Argemone ochroleuca* S y *Argemone platyceras* L y O.

Para este trabajo se han elegido tres especies del género: *Argemone mexicana* L, *Argemone ochroleuca* S y *Argemone platyceras* L y O que, con una larga historia en la medicina tradicional mexicana, han sido favorecidas por los pueblos indígenas por sus fines curativos y ceremoniales. El cuadro 1.3 presenta una breve descripción para cada una de ellas.

En general, los estudios fitoquímicos aun de todas las especies del género son escasos. En el cuadro 1.4 se enlista un resumen de los trabajos encontrados para las especies en estudio y sus referencias.

Cuadro 1.3 Características predominantes de las especies de estudio.

| <i>Especie</i> | <i>A. mexicana</i> | <i>A. ochroleuca</i> | <i>A. platyceras</i> |
|-----------------------------------|---|--|---|
| Imagen |  |  |  |
| Área de origen | América tropical (Argueta <i>et al.</i> , 1994) | México, nativa de América central. | México, se encuentra en Veracruz |
| Características especiales | Arbusto con terminales brillantes y flores amarillas (Rao y Dave, 2001) | Flores con decoloración amarillenta y estigma de color marrón rojizo (Espinosa y Sarukhán, 1997) | Pétalos blancos o casi blancos y estambres con filamentos rojos (Rzedowski, 1991) |
| Hábitat | Climas secos, y templados | Zonas áridas, climas secos y templados | Climas templados asociada a pastizales |
| Propiedades e importancia | Produce sanguinarina, un alcaloide benzofenantridina cuaternario con fuerte efecto bactericida (Facchini, 2001) | El látex se utiliza para quitar las manchas y carnosidades de los ojos (Heike, 2009) | Tratamiento para la diabetes, flujo vaginal y problemas renales. (BDMTM., 2009) |

Cuadro 1.4 Resumen de estudios fitoquímicos de *A. mexicana* L., *A. ochroleuca* S y *A. platyceras* L y O.

| Especie | Estudio | Referencia |
|---|--|------------------------------|
| <i>A. mexicana</i>  | Se identificó sanguinarina, protopina, alocriptopina, berberina y queleritrina. | Loyola <i>et al.</i> , 1982 |
| <i>A. ochroleuca</i>  | Propiedad antibiótica de la planta sobre un rango amplio de microorganismos patógenos. | Beuria <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>A. platyceras</i>  | Se identificó sanguinarina, protopina, berberina, dihidrosanguinarina y coptisina. | Haisova y Slavik., 1973 |
| | Se señala que la berberina es acumulada en hojas y flores. | Sánchez <i>et al.</i> , 2008 |
| | Actividad antimicrobiana proveniente del látex. | Reyes <i>et al.</i> , 2011 |
| | Contiene argemonina, reticulina, munitagina, norargemonina, protopina y sanguinarina. | Slavik <i>et al.</i> , 1973 |
| | Se señala para tratar la diabetes, flujo vaginal y problemas renales. | BDMTM., 2009 |

En un estudio realizado por Israilov y Yunusov (1986), se estudiaron las composiciones de alcaloides de la parte apigeal de cuatro especies del género *Argemone* (*A. mexicana* L., *A. alba* L., *A. platyceras* Link et Otto., y *A. híbrida*). El aislamiento y separación de los alcaloides se llevó a cabo por Cromatográfica en Columna (CC). La identificación de sus espectros por resonancia magnética nuclear (RMN) de protón, identificó 16 alcaloides. Se detectó coridina e isocoridina por primera vez en plantas de este género, y O-metilplaticerina fue encontrada por primera vez en la naturaleza. En el cuadro 1.5 se muestra la composición de alcaloides obtenidos para cada especie y los alcaloides que comparten entre ellas.

Cuadro 1.5. Alcaloides aislados de cuatro especies del género *Argemone* (Tomado de Israilov y Yunusov, 1986).

| Alcaloide | <i>A. mexicana</i> | <i>A. alba</i> | <i>A. platyceras</i> | <i>A. híbrida</i> |
|------------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| <i>Protopina</i> | + | + | + | + |
| <i>α-alocriptopina</i> | + | | + | + |
| <i>(S)-escoulerina</i> | + | + | | + |
| <i>Sanguinarina</i> | | + | + | + |
| <i>Queilantifolina</i> | + | | | + |
| <i>Stilopina α-metiodina</i> | | | + | |
| <i>Queleritrina</i> | | + | | |
| <i>Reticulina</i> | + | + | + | + |
| <i>Berberina</i> | + | + | + | + |
| <i>Coridina</i> | | | | + |
| <i>Isocoridina</i> | + | | | |
| <i>Magnoflorina</i> | | | + | |
| <i>Munitagina</i> | | | + | + |
| <i>Platicerina</i> | | | + | |
| <i>O-metilplaticerina</i> | | | + | |
| <i>Argemonina</i> | | | + | |

En este trabajo (Israilov y Yunusov, 1986) se indica el potencial biosintético que presentan las especies del género *Argemone*, siendo productoras de metabolitos bioactivos importantes, sin embargo, no se reporta un estudio sistemático sobre la distribución específica de los diferentes ABI's en sus tejidos, hasta la fecha no se han reportado estudios de esta naturaleza, más que solo en *A. mexicana* (Guízar *et al.*, 2012; Xool-Tamayo, 2016). En los siguientes apartados se presenta de forma detallada la información requerida para *A. mexicana* L, *A. ochroleuca* S y *A. platyceras* L y O.

1.4.1 *Argemone mexicana* L.



Figura 1.7 Planta adulta de *Argemone mexicana* (Amapola montés, Tomado de <https://media.routard.com/image/65/8/photo.1523658.w430.jpg>).

Una de las especies silvestres del género *Argemone* más abundante en nuestro país es *A. mexicana* (Fig. 1.7). Es una especie de origen mesoamericano de la región de las Antillas, Florida, Centroamérica y la Península de Yucatán, aunque hoy tiene distribución casi cosmopolita a través de regiones tropicales y subtropicales del mundo, en México prospera en áreas de clima cálido, preferentemente en la vertiente del Golfo (Vibrans-Manduna, 2009). Entre los nombres comunes en español es conocida como amapola montés, cardo santo, así como chicalote (Náhuatl). La especie se ha usado ancestralmente en México por sus propiedades medicinales para tratar problemas gastrointestinales, como diurético, laxante y expectorante (Cruz-Martín, 1940).

Es una planta herbácea anual o perenne de vida corta, con látex amarillo, de 25 a 80 cm (1 m) de alto; un tallo por lo general, con frecuencia ramificado desde cerca de la base; hojas inferiores oblanceoladas o ampliamente elípticas a ovaladas, hasta de unos 25 (40) cm de largo y 11 (18) cm de ancho. Con botones florales subsféricos o ligeramente cilíndricos, su cuerpo de 10 a 15 mm de largo y 9 a 13 mm de ancho; flores provistas de 1 ó 2 brácteas (hojas reducidas) muy cercanas a su base; pétalos de color amarillo intenso o amarillo pálido, obcuneados a obovados (a veces muy ampliamente) de 2 (a 3.5) mm de largo y 1 a 2.5 (3) cm de ancho; estambres 30 a 50, filamentos y anteras amarillos; estigma

purpúreo a café, de 1.5 a 4 mm de ancho y 1 a 2 mm de alto, sus lóbulos muy juntos entre sí, estilo de 1 a 3 mm de largo en el fruto; cápsulas 4 a 6-carpelares, cilíndricas a ampliamente elipsoides, a menudo truncadas en el ápice, de 25 a 30 (45) mm de largo, incluyendo estilo y estigma y 12 a 20 mm de ancho; semillas de alrededor de 2 mm de diámetro (Villaseñor y Espinosa, 1998). La floración y fructificación de *A. mexicana* es en primavera y verano, tiempo en el que se la halla en floración. *A. mexicana* es una de las papaveráceas más abundantes en nuestro país y particularmente en la península de Yucatán (Bhardwaj *et al.*, 1982, Lozoya y Lozoya, 1982).

1.4.1.1 Estudios fitoquímicos en *A. mexicana* L.

A esta planta se le ha llamado “fábrica de alcaloides” debido a la presencia de alcaloides bencilisoquinolínicos, incluyen compuestos del grupo protoberberina, tal es el caso de la berberina predominante en las partes aéreas, así como la sanguinarina del grupo de benzofenantridina, abundante en la raíz y en las semillas (Lozoya y Lozoya, 1982).

También se ha encontrado algunos alcaloides minoritarios como quelantifolina, dihidroqueleritrina, norqueleritrina, coptisina, norsanguinarina, hidroximetilestilopina, 6-acetonilsanguinarina, oxihidrastina, isocoridina, (α ; β) N-demetiloxisanguinarina, pancorina, (+)-argenaxina, (+)-higenamina y argemexicainas (A,B) (Rajvaidhya *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2007, Osho y Adetunji, 2010, Willcox *et al.*, 2011). En el cuadro 1.6 se presenta un resumen de todos los ABI's que se han encontrado en *A. mexicana* y su distribución en los diferentes tejidos.

Trabajos previos en el laboratorio han permitido un primer acercamiento al conocimiento de la ruta de síntesis de los ABI's en *A. mexicana*. Por un método en CLAR (Xool-Tamayo, 2016), se detectó la presencia de sanguinarina, berberina y queleritrina en raíces, siendo la señal más intensa la correspondiente a sanguinarina. Además de los tres alcaloides identificados, se detectaron bandas que no coincidieron con los estándares. Esto sugiere la presencia de otros alcaloides, por otro lado, sugiere que la longitud de 254 nm en la cual se identificaron Sa, Be y Que es capaz de detectar otros alcaloides de la misma familia. La raíz resultó ser el órgano con la mayor complejidad de alcaloides, al presentar los tres principales en cantidades comparables, a diferencia de las hojas en los que la berberina fue el alcaloide predominante. Estos estudios revelan que la síntesis de los alcaloides en *A. mexicana* está controlada a nivel tejido específico y por el grado de desarrollo de la

planta (Rubio-Piña, 2009).

Cuadro 1.6. Distribución de los ABI's en los diferentes tejidos de *A. mexicana*. (Modificado de Brahmachari et al., 2013).

| ABI's | Tejidos |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Berberina | Parte apigeal y semilla |
| Dihidroquelantifolina | Planta entera |
| Dihidrocoridalmina | Planta entera |
| Culombamina | Planta entera |
| (+)-Reticulina | Parte apigeal y parte aérea |
| Protopina | Parte apigeal, semillas y raíces |
| Alocryptopina | Parte apigeal y raíz |
| Criptopina | Planta entera |
| 13-oxoprotopina | Parte aérea |
| (-)-quelantifolina | Parte apigeal |
| Estilopina | Planta entera |
| Nor-sanguinarina | Planta entera |
| Quelitrina | Planta entera |
| Sanguinarina | Raíz y semillas |
| Oxiberberina | Planta entera |
| N-demetiloxisanguinarina | Parte aérea |
| Nor-quelitrina | Planta entera |
| (±)-6-acetonil dihidroquelitrina | Planta entera |
| Dihidrosanguinarina | Semillas |
| Dihidroquelitrina | Tejidos |
| 8-acetonil dihidrosanguinarina | Planta entera |
| 8-metoxi dihidrosanguinarina | Parte aérea |
| Hidróxido de dihidropalmitina | Semillas |

Las aplicaciones farmacológicas de *A. mexicana* son diversas (Brahmachari et al., 2013). Se ha encontrado que los extractos metanólicos de semillas presentan alta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Bhattacharjee et al., 2006). Las decocciones de tejidos aéreos de *A. mexicana* demostraron ser eficaces para tratar enfermedades causadas por *Plasmodium falciparum* (malaria) en niños de Malí y que estos efectos están relacionados con la presencia de berberina en la preparación, que podría alcanzar hasta 20 mg/L en la decocción (Domadia et al., 2008; Willcox et al., 2007). Los extractos orgánicos de las semillas de *A. mexicana* han sido utilizados contra larvas de *Aedes aegypti*, vector de una serie de enfermedades incluido el dengue, así como contra *Culex pipiens*, causante de muchas enfermedades como la encefalitis, japonesa, meningitis y uticaria (Sakthivadivel y Thilagavathy, 2003). Actualmente se ha demostrado que los alcaloides bencilisoquinolínicos presentes en tejidos de *A. mexicana* muestran actividad contra el VIH que aparentemente está relacionado con un efecto inhibitorio sobre la enzima transcriptasa reversa (Chang et al., 2003). Además, las hojas se usan en preparaciones tópicas de hojas y látex que se aplican directamente a los ojos y piel para tratar diferentes padecimientos derivados de

procesos inflamatorios, tales como la conjuntivitis y la psoriasis (Sharma *et al.*, 2011).

1.4.2 *Argemone ochroleuca* S.



Figura 1.8 Planta adulta de *Argemone ochroleuca* (Amapola mexicana, Tomado de <https://www.biolib.cz/en/image/id290790/>).

Argemone ochroleuca S (Papaveraceae), conocida como Amapola mexicana (Fig. 1.8), es una especie originaria de Mesoamérica que distribuye desde el sur de E.U.A. hasta México. Entre sus nombres comunes se registran cardo santo, chicalote cimarrón, chichillón y tlixate. Se ha usado en la medicina tradicional de México donde la referencia más antigua encontrada, corresponde al Códice Florentino del siglo XVI (Argueta y Cano 1994). *Argemone ochroleuca*, se usa como remedio para la tos, la bronquitis, el asma, la eliminación de cataratas y alergia ocular y por su efecto sedante, anticonvulsivo, tranquilizante, antidiabético y propiedades antiespasmódicas (Argueta y Cano 1994).

Es una planta herbácea anual o perenne de vida corta, glauca, con látex amarillo o anaranjado, de 30 cm a 1.2 (1.5) m de alto, provista de espinas rectas, blanquecinas, de longitudes diversas; tallos uno o pocos, ramificándose en la parte superior; hojas inferiores con frecuencia dispuestas en roseta basal, oblanceoladas a elípticas, hasta de 35 cm de largo y 7 cm de ancho, las superiores por lo común de dimensiones menores, todas profundamente divididas; botones florales cilíndricos, su cuerpo de 8 a 18 mm de largo y de 4 a 11 mm de ancho; pétalos amarillos, más comúnmente de color crema o a veces blancos, obovados u obcuneiformes a elípticos, de (1) 1.5 a 3 (3.5) cm de largo y 3 a 25 (30) mm de ancho; estambres 20 a 75, con filamentos y anteras amarillas estigma de color

púrpura, de 2 a 3 mm de ancho y 1 a 1.5 mm de alto, sus lóbulos extendidos, las superficies azulosas no receptivas ubicadas entre los lóbulos, por lo común claramente visibles; cápsulas 3 a 6-carpelares, de 2 a 5 cm de largo incluyendo el estilo corto y grueso y el estigma, y de 1 a 2 (2.5) cm de ancho. La floración y fructificación de *A. ochroleuca* se produce desde primavera hasta el otoño (Bhardwaj *et al.*, 1982).

A. ochroleuca está estrechamente relacionada con *A. mexicana* (Chaturvedi *et al.*, 1999), sin embargo se distingue por las forma de su flor, del brote y del color de los pétalos. Las flores de *A. ochroleuca* son de color crema o amarillo pálido con capullos de flores oblongas (Karlsson *et al.*, 2003). Esta planta crece bien en suelos pobres en nutrientes y con frecuencia lo hace mejor en las zonas donde el fósforo es limitante, mientras que *A. mexicana* se adapta mejor a crecer en áreas deficientes en nitrógeno (Ramakrishnan y Gupta, 1972). *A. ochroleuca* es un tetraploide ($2n = 56$), mientras que *A. mexicana* es una especie diploide ($2n = 28$). Hay evidencia de hibridación probable entre estas dos especies ya que hay una ocurrencia de 5% de triploides ($2n = 42$) registrados en poblaciones de *A. ochroleuca* (Chaturvedi *et al.*, 1999).

1.4.2.1 Estudios fitoquímicos en *Argemone ochroleuca* S

Investigaciones químicas en esta especie han revelado la presencia de alcaloides bencilisoquinolínicos, como sanguinarina, queleritrina, protopina, berberina, dihidrosanguinarina, dihidroqueleritrina, α -allocriptopina, heleritrina, queilantifolina, escualina, reticulina y coptisina (Haisova y Slavik, 1973, 1975; Espinosa-García, 1997).

Por otra parte, se ha reportado que *A. ochroleuca* produce un claro efecto relajante sobre el músculo traqueal del cobayo, donde uno de sus principales alcaloides activos es berberina (Sánchez *et al.*, 2008). El látex crudo de *A. ochroleuca* fue usado contra especies *Candida spp*, demostrando actividad antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*. Estos hallazgos indican que el látex de *A. ochroleuca* podrían usarse contra patógenos fúngicos (Reyes-Francisco, 2011). El único caso documentado de actividad biológica de *A. ochroleuca* en insectos es de Bakhshwain y Alqurashi (2010), que encontraron efectos insecticidas de los extractos de las hojas de esta especie en el escarabajo de la harina *Tribolium castaneum*. También se ha encontrado que el extracto etanólico de una mezcla de tallos secos, hojas y flores de esta

especie tuvo efecto en las larvas del gusano *Spodoptera frugiperda*, que es la plaga de maíz más grave en Latinoamérica (Martínez *et al.*, 2017).

1.4.3 *Argemone platyceras* L y O.



Figura 1.9 Planta adulta de *Argemone platyceras* (Amapola silvestre blanca, Tomado de http://phytoimages.siu.edu/imgs/psor/Papaveraceae_Argemone_platyceras_2743.html).

Argemone platyceras L y O, es una especie atractiva y endémica de México que se encuentra en Veracruz (Fig.1.9; Ownbey-Gerald, 1961). Habita en clima templado, entre los 1200 y los 2400 metros, asociada a pastizal, bosques de encino y de pino. Los nombres comunes registrados en la zona para esta especie son cardo santo, chicalote, chicalote de Castilla y amapola silvestre blanca (Rzedowski-Jerzy, 1991). En la medicina tradicional mexicana, sus flores de son usadas en infusión como un remedio para tos, bronquitis y neumonía (Emes *et al.*, 1994).

A. platyceras es una planta herbácea anual o perenne, con látex amarillo, de 30 a 80 cm (1 m) de alto; con pocos tallos, ramificándose hacia el ápice, provistos de espinas de largo igual o sub-igual; hojas glaucas, las inferiores oblanceoladas, las medianas y superiores elípticas o tendiendo a ovadas, hasta de unos 30 cm de largo y 13 cm de ancho, a veces algo abrasadoras en la base; botones florales cilíndricos, su cuerpo de 18 a 24 mm de largo y de 14 a 18 mm de ancho, esparcida a moderadamente cubierto de espinas finas,

desiguales; flores con frecuencia carentes de brácteas (hojas reducidas) muy cerca de su base; pétalos blancos, a veces ligeramente teñidos de amarillo pálido en la base, excepcionalmente rosados o con el borde rosado (con el secado tienden a amarillo o café oscuro), obcuneiformes, de 4.5 a 5.5 cm de largo y 4.5 a 5 cm de ancho; estambres alrededor, filamentos amarillos claros a rojizo-morados, anteras amarillas a moradas; estigma subsésil, de color púrpura, de 3 a 5 mm de ancho y 2 a 3.5 mm de alto; semillas de alrededor de 2 mm de diámetro. Maleza relativamente común y abundante especialmente en parcelas de cultivo en descanso y orillas de caminos. *A. platyceras* florece casi todo el año (en Veracruz) principalmente de abril a septiembre (Rzedowski-Jerzy, 1991).

1.4.3.1 Estudios fitoquímicos en *Argemone platyceras* L y O.

Las investigaciones químicas han revelado la presencia de alcaloides bencilisoquinolínicos para esta planta (Atta-ur-Rahman, 1994). En extractos de la planta con éter y cloroformo, se identificaron los alcaloides argemonina, norargemonina, alocriptopina, protopina, sanguinarina, berberina y coptisina (Slavík *et al.*, 1973), asimismo, se reportó la presencia de isoquercitrina y rutina en extractos metanólicos de flores y hojas de *A. platyceras*, presentando actividad anti-asmática en conejillos de indias, postulándolos como candidatos para tratamientos contra el asma (Fernández *et al.*, 2005). Hasta la fecha, no hay estudios sistemáticos con respecto a sus propiedades farmacológicas.

1.4.4 Análisis transcripcional en *Argemone mexicana* L.

Estudios realizados en nuestro equipo de trabajo han demostrado que *A. mexicana* produce benzofenantridinas y protoberberinas simultáneamente y que la síntesis de los alcaloides en *A. mexicana* está controlada a nivel tejido específico y por el grado de desarrollo de la planta (Rubio-Piña, 2009) (Fig.1.10).

En el análisis de la expresión tejido-específica de dos isoformas de NCS y BBE en los diferentes tejidos, los transcritos mostraron como resultado, en general, un patrón de expresión relacionado con la acumulación de los alcaloides. Sin embargo, también se observaron algunas diferencias (Fig. 1.10B). En el trabajo se concluyó que la NCS y la BBE son enzimas involucradas en la formación de intermediarios comunes para la síntesis de

benzofenantridinas (sanguinarina) y protoberberinas (berberina) (Sánchez *et al.*, 2008; Schwarzbach y Kadereit, 1999; Fig. 1.10A).

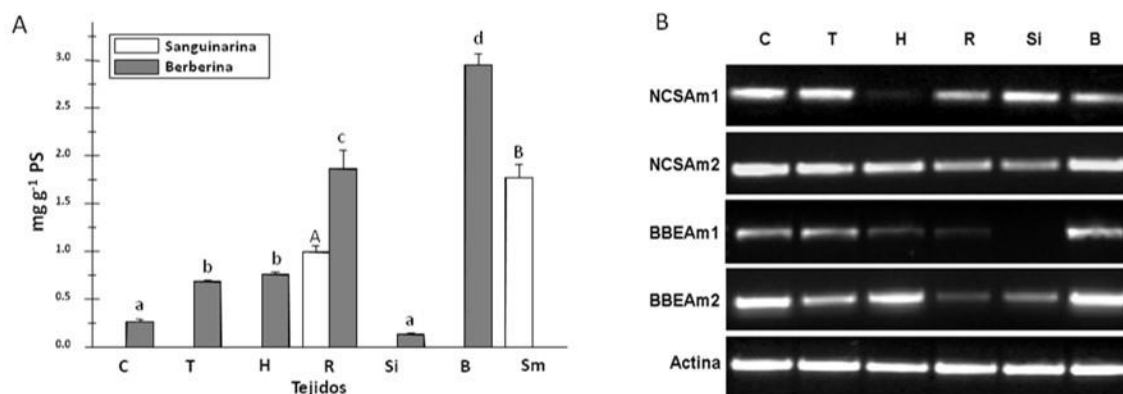


Figura 1.10 Expresión génica de *Argemone mexicana* L, Tomado de Rubio Piña, 2009). Distribución espacial de ABI's y análisis de expresión de la NCS y BBE en plantas maduras de *A. mexicana*. **A)** Acumulación de sanguinarina y berberina (promedio de tres repeticiones con las desviaciones estándar). **B)** expresión de mensajeros de la NCS y BEE por RT-PCR. Análisis normalizado con el transcrito de actina. Abreviaturas: **C**, cápsula; **T**, tallo; **H**, hoja; **R**, raíz; **Si**, semilla inmadura; **B**, brote floral; **Sm**, semilla madura.

En estudios moleculares realizados por Xool-Tamayo (2009), se documentaron los diferentes patrones de acumulación de alcaloides en diferentes etapas de desarrollo de *A. mexicana*, y la distribución de los transcritos correspondientes a genes biosintéticos en las reacciones comunes (*TYDC*, *NCS* y *BBE*), así como los responsables de las reacciones específicas para la síntesis de sanguinarina (*CheSyn*, *DBOX* y *SanR*) y berberina (*SOMT* y *STOX*). Los resultados por qRT-PCR demostraron que, a lo largo del ciclo de desarrollo de la planta, la abundancia de los transcritos para la síntesis de alcaloides disminuye en las raíces, mientras que aumenta en las partes aéreas. Esta tendencia se notó tanto para los transcritos involucrados en las reacciones comunes, como en aquellos para la síntesis de sanguinarina o berberina. La figura 1.11 muestra un esquema de la integración de los perfiles de acumulación de sanguinarina y berberina con sus transcritos en plantas adultas de *A. mexicana*.

Existen reportes de correlación entre la transcripción y acumulación de los alcaloides se ha documentado en plantas adultas. Por ejemplo, en *T. flavum*, *C. japonica* y *P. somniferum* se ha demostrado modulación entre la transcripción y los sitios de acumulación de sus alcaloides (Samanani *et al.*, 2005; Hagel *et al.*, 2012; He *et al.*, 2015). Los datos generados,

sugieren mecanismos de regulación entre la biosíntesis y acumulación de los ABI's, en función del desarrollo de la planta.

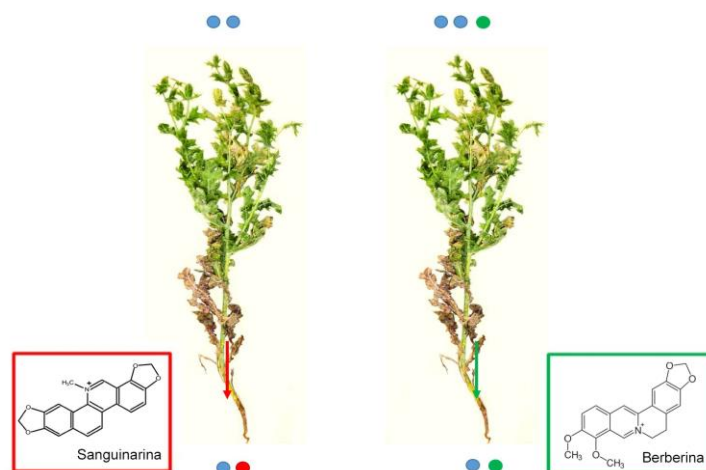


Figura 1.11 Integración de los perfiles de acumulación de sanguinarina y berberina con sus transcritos en plantas adultas (Tomado de Xool-Tamayo, 2009). Los **Círculos azules** indican la presencia de los transcritos de los genes de sanguinarina y berberina en tejidos aéreos o raíz. Los **Círculos rojos** indican la presencia de sanguinarina en tejidos aéreos o raíz. Los **Círculos verdes** indican la presencia de berberina en tejidos aéreos y raíz. Las **Flechas** indican el posible flujo de acumulación de la sanguinarina y berberina en los diferentes tejidos.

1.5 Técnicas cromatográficas

Se trata de un conjunto de técnicas que permiten la separación de los componentes presentes en una mezcla compleja con base en su naturaleza química, que influye en su movilidad en una matriz cuando son arrastrados por un disolvente. En términos generales, la cromatografía se caracteriza por la presencia de dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil que se desplaza a lo largo del sistema. La separación de las moléculas está dada por su afinidad relativa por la fase móvil y la fase estacionaria (equilibrio de distribución) (Smith-Ivor, 2013).

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse según diferentes criterios: atendiendo al modo como las fases se ponen en contacto y atendiendo al fundamento del proceso de separación. En este último caso en definitiva se trata de la naturaleza de las fases y del tipo de interacciones fisicoquímicas que tienen lugar entre los solutos y las fases utilizadas.

De acuerdo con esto; existen diferentes tipos de cromatografía, como son la cromatografía de adsorción donde la fase móvil es un disolvente o gas que al interactuar con la fase

estacionaria permite que los componentes interactúen con la fase móvil. En la cromatografía de partición, la fase estacionaria es un líquido que se sostiene en un soporte sólido y la fase móvil puede ser un líquido o un gas. En la cromatografía de exclusión, el criterio de separación es el tamaño de los metabolitos mientras pasan a través de una malla, y en la cromatografía de intercambio iónico la separación depende de la interacción por diferencia de cargas entre la fase estacionaria y los componentes de la muestra a separar (Walton y Reyes, 2005).

1.5.1 Análisis químicos con métodos cromatográficos

La cromatografía en sus orígenes era exclusivamente una técnica de separación que se transformó en técnica de análisis cuando se acopló con dispositivos capaces de monitoriar las especies químicas que se iban separando, a esta separación se le representa en forma de gráfica y es conocido como cromatograma. Así, la cromatografía se ha convertido en un método analítico de primer orden y se puede emplear para la identificación cualitativa y determinación cuantitativa de las especies químicas separadas (Valcárcel y Gómez, 2001).

Para el análisis cualitativo, un parámetro que puede usarse con fines cualitativos en cromatografía, es el tiempo de retención. Este es característico para cada componente en cada sistema cromatográfico. Se trata sin embargo de una información pobre si se compara con otras técnicas de identificación (ej: RMN, C¹³, IR, EM, y otras técnicas espectroscópicas). Asimismo, únicamente con el tiempo de retención resulta difícil asegurar la presencia de un componente en una mezcla, aunque sí se puede afirmar su ausencia. Una correcta identificación requiere siempre el uso de estándares en las mismas condiciones cromatográficas (Gomis-Yagües, 2008).

Por otra parte, el análisis cuantitativo se basa en la comparación del área o altura de pico del componente de interés con la de estándares de esta sustancia de concentración conocida, estableciendo que existe una relación lineal entre el área o altura de pico y la concentración. En los análisis basados en altura de picos, se requiere que la anchura de los picos no sufran modificaciones durante el tiempo necesario para obtener los cromatogramas de la muestra y de los estándares para obtener resultados exactos. Por ello suele usarse mucho más el análisis basado en área de pico, parámetro independiente de los efectos de ensanchamiento. El método más sencillo de la calibración consiste en el uso

de estándares externos. Se obtienen los cromatogramas de disoluciones estándares de concentraciones diferentes, pero consecutivas, y se representa el área de pico en función de la concentración para construir la curva de calibración. Esto debe corresponder a una recta que pasa por el origen. Por interpolación se obtiene la concentración de ese constituyente en la muestra (Cases y Hens., 1988; Hernández y Pérez., 2002).

1.5.2 Huella dactilar cromatográfica

La huella cromatográfica de una planta es el perfil de los compuestos presentes en su extracto, obtenido por un procedimiento definido para separar tantos compuestos como sea posible, con el fin de construir un patrón de reconocimiento específico (Liang *et al.*, 2004; Dejaegher *et al.*, 2010).

Las normativas actualizadas sobre plantas medicinales publicadas por la OMS, la Agencia de Medicinas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) se pronuncian por el uso de huellas dactilares ya que indican que la identificación de la planta medicinal debe ser una de las primeras pruebas aplicadas para garantizar la calidad y discriminar entre especies relacionadas o muestras adulteradas (Lucio *et al.*, 2012; Tistaert y Vander., 2012).

La Cromatografía en Capa Fina es una de las técnicas más usadas para el análisis de productos herbolarios (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2001), básicamente se usa como un método de rastreo que provee perfiles cromatográficos característicos.

1.5.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La Cromatografía en Capa Fina o TLC, por sus siglas en inglés (*Thin Layer Chromatography*) es una aplicación especial de la cromatografía de adsorción, que utiliza matrices sólidas sobre un soporte plano. Sus principales ventajas, en comparación con otros tipos de cromatografía es que es sencilla, rápida, económica, versátil y permite analizar muchas muestras a la vez (Fig. 1.12) (Mok *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2004). Se utiliza principalmente como un método semicuantitativo que provee perfiles cromatográficos característicos. No obstante, su aplicación regularmente se ha limitado a la identificación de compuestos marcadores ya que, por lo general es uno de los principales métodos usados para la identificación de drogas, narcóticos ilegales y explosivos (Johll-Matthew,

2008).

La CCF incluye diferentes etapas que encierran la preparación de la cámara de desarrollo, la activación de la placa, aplicación de las muestras, el desarrollo de la placa y el revelado o derivatización para la localización de las bandas (Fig. 1.12). La visualización del cromatograma, para localizar la posición de cada uno de los compuestos en la mezcla separada, depende de los tipos de moléculas presentes en la muestra original. Una vez que las muestras se han separado, las bandas cromatográficas pueden detectarse por diferentes métodos como la visualización con vapores de yodo, la iluminación con luz ultravioleta de capas conteniendo compuestos de fosforo, o bien la carbonización con ácido sulfúrico (Wilcox y Wilcox., 1995).

Muchos compuestos pueden ser localizados examinando la placa que contiene un indicador de fluorescencia, bajo luz UV a longitudes de onda corta (254 nm); los compuestos que absorben en la región del UV pueden verse entonces como bandas oscuras sobre un fondo verde fluorescente, mientras que las sustancias de naturaleza fluorescente pueden visualizarse en luz UV de longitud de onda larga (360 nm). (Pasto y Johnson, 2003; Volonté y Quiroga, 2013).

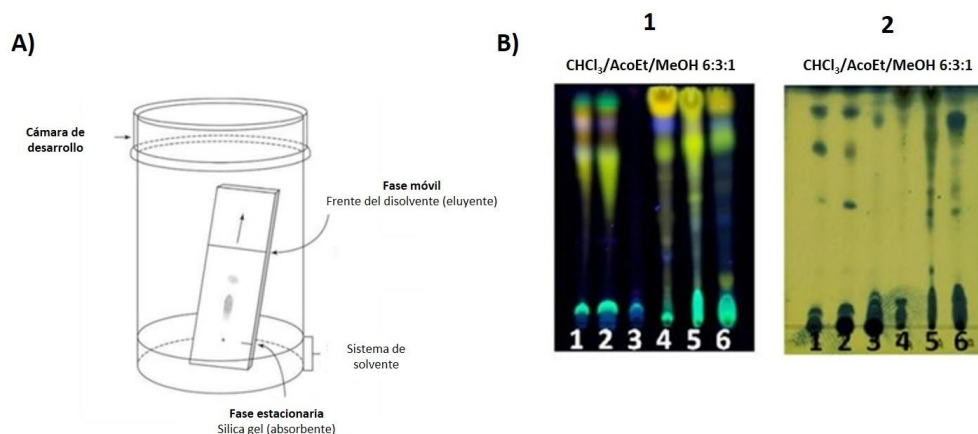


Figura 1.12 Cromatografía en Capa Fina (CCF). A) Preparación de la cámara de desarrollo y revelado; B) Monitoreo por CCF de la extracción de ABI's de *Argemone mexicana* L, Tomado de Yam, 2014. Placa expuesta a la luz UV de 365 nm (1) y posteriormente derivatizada con ácido fosfomolibdico (2).

1.5.3.1 Análisis cuantitativo por CCF

Para poder realizar un análisis cuantitativo en CCF, la muestra debe aplicarse con suficiente precisión para que los parámetros sean confiables, la cuantificación de los metabolitos de interés se realizó por densitometría. La densitometría es un medio para medir la concentración de las zonas reveladas en la capa de CCF (o CCF-AR), desarrollada sin alterar las sustancias separadas, midiendo la intensidad de la coloración de la mancha y pueden trabajar en modo transmitancia, fluorescencia o reflexión, es decir, se mide la cantidad de luz UV o Visible transmitida, fluorescente o reflejada, luego se transforman estos valores en áreas que son proporcionales a la concentración. Un densitómetro consta de una fuente luminosa, un filtro, un colimador, una fotocélula y un galvanómetro.

La técnica consiste en hacer pasar un haz de radiación electromagnética de longitud de onda preestablecida (usualmente UV / visible desde 190-800 nm), y que se mueve a una velocidad predeterminada a través de las zonas cromatográficas, la técnica de escaneo de la placa en estas condiciones se denomina espectrodensitometría. El escaneo es un proceso relativamente rápido (hasta 100 mm s⁻¹). El escaneo de los carriles desarrollados da como resultados cromatogramas muy similares a los obtenidos en CLAR, que normalmente muestran una serie de picos con una resolución diferente donde las zonas están bien separadas (Vilanova y Sobob, 2004).

Además, el densitómetro se puede ajustar para disminuir las señales de ruido, la sensibilidad, y gama para dar un rendimiento óptimo. Debido a que, en la práctica, la muestra debe aplicarse en la placa con suficiente precisión para que los parámetros sean confiables y tener un debido control en el desarrollo, la densitometría de barrido ofrece la evaluación más precisa en CCF-AR, particularmente para el ensayo y la cuantificación de compuestos marcadores. Su selectividad espectral ofrece una gran ventaja sobre la inspección visual y la densitometría de video. A diferencia de otras técnicas de separación, los costos para un sistema de CCF-AR, así como el mantenimiento es comparativamente bajo (Reich y Schibli, 2006).

1.5.4 Cromatografía en Capa Fina de Alto Rendimiento (CCF-AR)

La CCF-AR (HPTLC, del inglés *High Performance thin layer chromatography*) es la técnica más avanzada de CCF y la combinación óptima de equipo moderno con una sólida base teórica y metodología estandarizada (Jovanovic *et al.*, 1998). CCF-AR presenta un equipo especializado, con un proceso de separación mediante tecnología e instrumentos mecánicos programables. Para no dañar la superficie de la placa, se utiliza una microjeringa especialmente para depositar la muestra en forma de spray o por contacto. Consecuentemente, posee un dispositivo para el desarrollo de placa, sofisticadas cámaras de revelado, escaneo mediante un densitómetro, sistemas de documentación electrónica y procesamiento de datos.

Para el desarrollo de CCF-AR se utilizan placas tipo HPTLC con un tamaño de partícula de aproximadamente 5 μ m, mientras que para CCF convencional se usan partículas de unos 20 μ m de tamaño medio. Como resultado de esta mejora, la altura del plato teórico se disminuye por un factor de aproximadamente 3. Esta reducción permite elevar el número de platos teóricos de una placa de 300 a 5000, y la consecuencia final es que se pueden obtener separaciones equivalentes con menores distancias de migración.

Para el desarrollo de las placas se usan cámaras horizontales, que poseen dos pequeñas entradas en los extremos para colocar el solvente, y esto posibilita el uso de dos solventes distintos, las placas se ponen con el adsorbente para abajo, en forma horizontal (Vilanova y Soborb, 2004; Volonté y Quiroga, 2013).

En general, las ventajas que se tienen al usar en CCF-AR son una mayor resolución debido al menor tamaño de partícula lo que también implica una mayor superficie expuesta, mayor sensibilidad, tiempos más breves, recorridos más cortos y mayor reproducibilidad. También es de utilidad para el desarrollo de placas preparativas y la administración de muestras con aplicadores automáticos, y permite realizar cuantificaciones por medio de parámetros densitométricos (Reich y Schibli, 2006; Chaita *et al.*, 2017).

1.6 Quimiometría

La quimiometría es la rama de la química que aplica métodos estadísticos a los problemas analíticos de identificación y cuantificación de los compuestos químicos presentes en una muestra Lucio *et al.*, 2012). Entre los alcances de la quimiometría están el diseño de experimentos, la optimización y la validación de métodos, el procesamiento de señales cromatográficas y espectroscópicas, las técnicas de calibración (lineales, no lineales y multivariantes), las relaciones de estructura-actividad, entre otras.

Su creación fue promovida como resultado de la comprobación de que los procesos químicos no pueden ser explicados sólo con técnicas estadísticas univariantes (análisis de una única característica o cualidad del individuo). Por ello, los datos experimentales deben ser analizados mediante métodos que permitan evaluar los efectos de dos o más factores o de todo el proceso en conjunto, como son los análisis multivariantes. Hoy en día el empleo de la quimiometría en metabolómica es útil para realizar diferentes estudios, incluyendo la clasificación de especies de plantas muy parecidas y la determinación de huellas dactilares en extractos, entre otros (Tistaert y Vander., 2012; Araujo *et al.*, 2012; Rajalahti y Kvalheim 2011).

El perfil cromatográfico de una planta medicinal es un sistema multivariante, tanto por la manera en cómo se registran las señales analíticas, como por el número de componentes que se pueden registrar (Cieśła *et al.*, 2012). Para el establecimiento de las huellas dactilares se han empleado diversas técnicas estadísticas, entre ellos el Análisis de Componentes Principales (PCA), en el cual se construyen combinaciones lineales de las variables iniciales que explican la mayor parte de información (Tistaert y Vander., 2012).

Con la quimiometría también es posible la aplicación de pretratamientos a los datos experimentales para la construcción de modelos para establecer agrupaciones de muestras en función de su similitud. De manera general, el pretratamiento es la modificación de datos y se realiza antes de construir un modelo matemático. El propósito es linealizar la respuesta de las variables y eliminar las fuentes extrañas de variación que no son de interés en el análisis (Hendriks *et al.*, 2005; Wise *et al.*; 2006). La correlación de la línea base es un método comúnmente empleado en aplicaciones cromatográficas donde la señal de algunas variables es debida solamente a la señal del fondo. El algoritmo WLS ("Asymmetric

Weighted Least Squares") emplea un enfoque automático para determinar qué puntos son los más probables para ser sólo línea base; esto lo hace ajustando de manera iterativa una línea base a cada cromatograma y determinando qué variables están claramente por encima de la línea base (es decir, la señal) y cuales están debajo de ésta (ruido). Se asume que los puntos debajo de la línea base son más significativos en el ajuste de la señal de fondo del espectro (Daszykowski y Walczak., 2006).

1.6.1 Técnicas de análisis multivariante

El análisis multivariante (AM), se refiere a un conjunto de técnicas estadísticas de amplia aplicación en el mundo científico, especialmente en los estudios de tipo empírico, pues se analizan simultáneamente los efectos de diferentes variables sobre cada objeto sometido a un proceso de investigación (Mertler y Reinhart, 2016).

Por ejemplo, en una Investigación para identificar áreas prioritarias para el manejo y conservación de especies en peligro de extinción, el investigador dispone de una gran cantidad de datos del entorno en el que se desarrolla la investigación, como: la presencia, distribución y el tamaño de las poblaciones de especies, la fenología y la identificación. Los factores que tienen influencia en los resultados suelen ser diversos (apoyo para la realización de los trabajos de campo, ecología, gastos en equipo de campo, etc.) (Jiménez *et al.*, 2005). Por lo tanto podemos afirmar que la mayoría de los problemas que surjan en la investigación son multidimensionales, es decir, que se deberían estudiar los factores que influyen de una manera simultánea utilizando técnicas multivariantes (Gad *et al.*, 2013)

Una clasificación de gran utilidad es el diferenciar las técnicas multivariantes en dos grupos básicos: los métodos dependientes se emplean para explicar o proyectar las variables dependientes con base en dos o más variables independientes. Por ejemplo, probar los efectos de un fertilizante sobre el crecimiento de una planta en función de numerosas variables independientes (tipo de fertilizante, cantidad, mezcla de sustratos etc.) (Arteaga *et al.*, 2003). Los métodos independientes tratan de dar significado a un conjunto de variables o bien tratar de agrupar las cosas. Por ejemplo, determinar los componentes químicos presentes en extractos vegetales y relacionarlos con sus actividades biológicas (García-Luján, 2010).

Dentro de los métodos de análisis de variables independientes se encuentran el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Conglomerados (clúster).

1.6.1.1 Análisis de Componentes Principales (PCA)

El análisis de componentes principales (en inglés, *Principal Component Analysis*, PCA) es un método estadístico que sintetiza la información, reduciendo el número de variables a considerar en un análisis (reducción de la dimensión). El PCA realiza un análisis de los componentes principales de una matriz **X** de dimensión $n \times p$. Los datos de los perfiles cromatográficos pueden ser organizados en una matriz **X** siendo las filas (n) las muestras a analizar (individuos) y las columnas (p) las variables (mediciones obtenidas de los alcaloides). Los componentes principales se van construyendo según el orden de importancia en relación con la variabilidad total que las variables van acumulando de la muestra. (Kramer-Richard, 1998).

En la actualidad el PCA es un método universal que se puede utilizar en cualquier área de las ciencias biológicas y sociales. Es de uso frecuente en ciencias sociales para la interpretación de datos socio-económicos y de desarrollo humano (Lin Liao *et al.*, 2015); en la medicina se ha utilizado para determinar biomarcadores que ayuden en el pronóstico, detección, caracterización y respuesta al tratamiento de una enfermedad (Sreekumar *et al.*, 2009); en química alimentaria se ha utilizado para la caracterización, identificación y diferenciación de alimentos (Cárnara *et al.*, 1995), y en ciencias ambientales se ha utilizado para identificar y evaluar el impacto de fuentes contaminantes y su efecto en el medio ambiente (Lin Liao *et al.*, 2015).

1.6.1.2 Análisis de Conglomerados (clúster).

El Análisis de Conglomerados es una técnica estadística multivariante cuyo propósito principal es agrupar elementos (o variables) tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos (Rueda *et al.*, 2016).

La técnica está siendo ampliamente para casi todas las áreas de investigación, creando no solo una riqueza de conocimiento en el uso, sino también la necesidad de una mejor comprensión de la técnica (Hair *et al.*, 2000). Se pueden citar ejemplos de diferentes tipos de aplicaciones como, la derivación de taxonomías en biología para la agrupación de los

organismos vivientes, clasificaciones psicológicas basadas en la personalidad, análisis de segmentación de mercados, entre otros (Prieto-Guerra, 2006).

Los conglomerados obtenidos después de un análisis, muestran un alto grado de homogeneidad interna dentro del conglomerado y un alto grado de heterogeneidad externa del mismo. En nuestro caso, se busca la partición de un conjunto de datos (perfiles cromatográficos de individuos) en grupos, de tal forma que los datos pertenecientes a un mismo grupo sean muy similares entre sí pero muy diferentes a los de los otros grupos. Para conseguir formar grupos homogéneos de observaciones, hay que medir la similaridad o la distancia (disimilaridad) entre las muestras (tres individuos por especie), con este fin, en este trabajo se utiliza la distancia euclídea, la cual mide el parecido entre unidades de análisis que han sido evaluadas en un conjunto de variables métricas (Aranaz-Ferrán, 2002).

HIPÓTESIS

Si el metabolismo de los alcaloides en el género *Argemone* L. está definido por factores genéticos, entonces se espera un patrón diferencial de grupos de alcaloides en diferentes especies quimiotaxonómicamente relacionadas.

JUSTIFICACIÓN

El género *Argemone* L incluye diferentes especies productoras de alcaloides con propiedades altamente medicinales. Sin embargo, actualmente, no se cuenta con un estudio fitoquímico sistemático y caracterización química de estas especies. Por lo cual, se posicionan como modelos ideales para el estudio de la diversidad y establecimiento de perfiles de alcaloides.

Este estudio permitirá construir un patrón de reconocimiento específico de la identidad de los componentes químicos, de tres especies: *A. mexicana* L; *A. platyceras* L y O y *A. ochroleuca* Sweet; y establecer patrones diferenciales de alcaloides asociadas a su potencial biosintético. Así mismo, la información obtenida será de utilidad para identificar enzimas con mecanismos novedosos para conocer los componentes que generan la diversificación química, no solo entre especies, sino entre los diferentes tejidos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la diversidad de alcaloides en *A. mexicana* L. *A. platyceras* L y O. y *A. ochroleuca* Sweet (Papaveraceae) mediante métodos quimiométricos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Establecer las condiciones de CCF-AR para obtener los perfiles cromatográficos de alcaloides de diferentes tejidos de plantas del género *Argemone*.
- 2.- Analizar el contenido de alcaloides en los extractos obtenidos de tejidos de hoja, tallo y raíz de tres especies del género *Argemone* L. (*A. mexicana* L; *A. platyceras* L y O; *A. ochroleuca* Sweet).
- 3.- Comparar los perfiles cualitativo y cuantitativo de alcaloides en función del origen del extracto analizado.
- 4.- Analizar la distribución y expresión relativa de al menos tres genes involucrados en la síntesis de los ABI's por PCR en tejidos, mostrando condiciones contrastantes en los perfiles de acumulación de alcaloides.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se colectaron plantas adultas de *A. mexicana* L; *A. platyceras* L y *O. A. ochroleuca* Sweet y se identificaron en el herbario “U’nahil tikin xiw” del CICY. Las plantas se separaron en hojas, tallos y raíces. Una parte de los tejidos se secaron para la obtención de los extractos y otra se congeló en nitrógeno líquido para la obtención de ácidos nucleicos. El proceso para la obtención de alcaloides que comprende la extracción de la droga vegetal, seca y molida, y la purificación del extracto obtenido, se efectuaron en base en la metodología descrita por Monforte y colaboradores (1992) con algunas modificaciones.

Con el extracto de las especies obtenidas se probaron diferentes condiciones cromatográficas para optimizar la separación de los componentes presentes en los extractos utilizando las técnicas cromatográficas de CCF y CCF-AR. El análisis quimiométrico se realizó mediante técnicas multivariantes aplicadas a la matriz de datos extraída de los perfiles cromatográficos. La detección y cuantificación de ácidos nucleicos se realizarán por RT-PCR, NanoDrop y electroforesis.

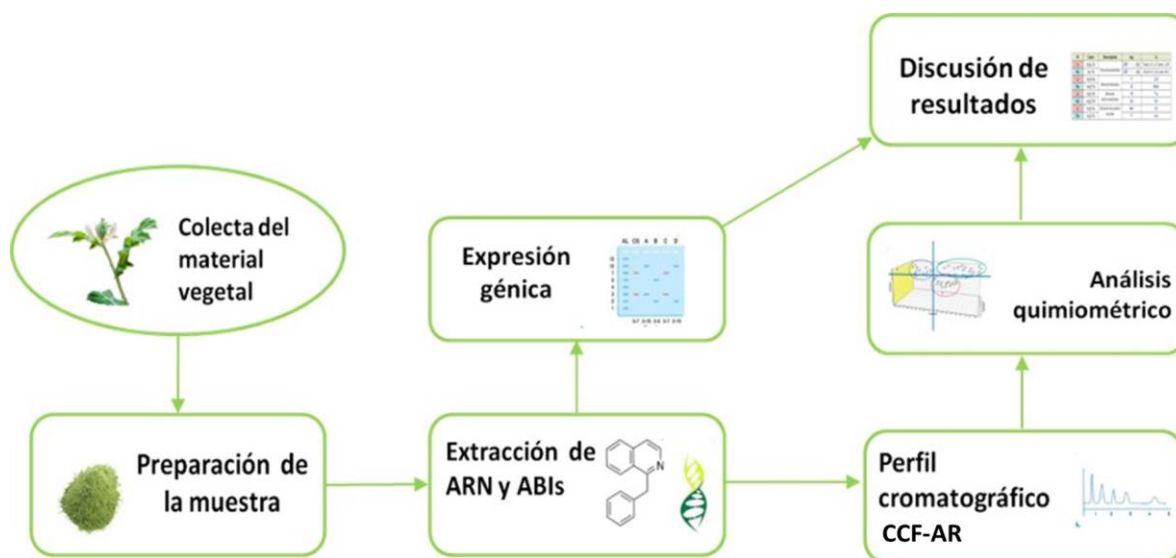


Figura 1.13 Estrategia experimental para análisis de la diversidad fitoquímica de tres especies del género *Argemone* (Papaveraceae).

BIBLIOGRAFÍA

- Acevska, J., Stefkov, G., Petkovska, R., Kulevanova, S., & Dimitrovska, A. (2012). Chemometric approach for development, optimization, and validation of different chromatographic methods for separation of opium alkaloids. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(4), 1117-1129.
- Akerele Olayiwola. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro mundial de la salud (págs. 390-395). Caracas: Elsevier.
- Aizpuru, I., Aseginolaza, C., Catalán, P., & Uribe-Echebarría, P. M. (1993). Catálogo florístico de Navarra. Informe técnico. Dpto. de Medio Ambiente, Gobierno de Navarra: Pamplona.
- Aniszewski Tadeusz. (2015). Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications. Elsevier.
- Aranaz Magdalena, F. (2002). *SPSS para Windows*. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Arango Acosta, G. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Araujo, P., Janagap, S., & Holen, E. (2012). Application of Doehlert uniform shell designs for selecting optimal amounts of internal standards in the analysis of prostaglandins and leukotrienes by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1260, 102-110.
- Argueta Villamar, A., Cano Asseleih, L. M., & Rodarte, M. L. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. México: Instituto Nacional Indigenista 1786p. ISBN, 1093031427, 9682973244-9682973252.
- Arteaga Martínez, B., León, S., & Amador, C. (2003). Efecto de la mezcla de sustratos y fertilización sobre el crecimiento de *Pinus durangensis* Martínez en vivero. *Foresta Veracruzana*, 5 (2).

-
- Bakhashwain A, Alqurashi A.D. 2010. Repellent and insecticidal effects of some plant extracts on flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Alexandria Science Exchange Journal 31: 248–254.
- Bhardwaj D.K, Bisht M.S, Jain R.K, Munjal A. 1982. Phenolics from the seeds of *Argemone mexicana*. Phytochem 21: 2154 – 2156.
- Bhattacharjee, I., Chatterjee, S. K., Chatterjee, S., & Chandra, G. (2006). Antibacterial potentiality of *Argemone mexicana* solvent extracts against some pathogenic bacteria. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101 (6), 645-648.
- Brahmachari, G.; Gorai, D.; Roy, R (2013). *Argemone mexicana*: Chemical and pharmacological aspects. Rev BrasFarmacogn., 3: 559-575
- Budczies, J., Denkert, C., Müller, B. M., Brockmöller, S. F., Klauschen, F., Györfy, B., & Griffin, J. L. (2012). Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissue—a GC-TOFMS based metabolomics study. BMC genomics, 13 (1), 334.
- Capasso, A., Aquino, R., Tommasi, N., Piacente, S., Rastrelli, L., & Pizza, C. (2002). Neuropharmacology activity of alkaloids from South American medicinal plants. Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents, 2 (1), 1-15.
- Cárnara, M., Díez, C., & Torija, E. (1995). Chemical characterization of pineapple juices and nectars. *Food Chemistry*, 93-100.
- Carretero, José. L., & Las malas hierbas de los cultivos. (2004). *Flora arvensis española: las malas hierbas de los cultivos*. Phytoma.
- Cases, M. V., & Hens, A. G. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Reverté.
- Chaita, E., Gikas, E., & Aligiannis, N. (2017). Integrated HPTLC-based Methodology for the Tracing of Bioactive Compounds in Herbal Extracts Employing Multivariate Chemometrics. A Case Study on *Morus alba*. *Phytochemical Analysis*, 28 (2), 125-131.

-
- Chang, Y. C., Hsieh, P. W., Chang, F. R., Wu, R. R., Liaw, C. C., Lee, K. H., & Wu, Y. C. (2003). Two new protopines *Argemone mexicana* A and B and the anti-HIV alkaloid 6-acetyldihydrochelerythrine from formosan *Argemone mexicana*. *Planta medica*, 69 (02), 148-152.
- Chaturvedi, M.; Datta, K., & Pal, M. (1999). Pollen anomaly-a clue to natural hybridity in *Argemone* (Papaveraceae). *Grana*, 38(6), 339-342.
- Choi, T. Morisige, N; Shitani, K; Yazaki, F. Sato (2002). Molecular cloning and characterization of coclaurine N-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.*, 277 (2002), pp. 830–835
- Cieśla, Ł.; Kryszewski, J.; Stochmal, A.; Oleszek, W & Waksmundzka-Hajnos, M. (2012). Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic *compounds*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 70, 126-135.
- Cordell, G. A., Quinn-Beattie, M. L., & Farnsworth, N. R. (2001). The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, 15 (3), 183-205.
- Cruz, Martín. D. L., & Emmart, E. W. (1940). The *Badianus* manuscript: Codex Barberinii, Latin 241, Vatican Library. An Aztec herbal of 1552 (No. 581.634 M38).
- Dejaegher, B.; Alaerts, G. & Matthijs, N. (2010). Methodology to develop liquid chromatographic fingerprints for the quality control of herbal medicines. *Acta Chromatographica*, 237-258.
- Daszykowski, M., & Walczak, B. (2006). Use and abuse of chemometrics in chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25 (11), 1081-1096.
- De-Eknamkul, W.; Suttipanta, N., & Kutchan, T. M. (2000). Purification and characterization of deacetylpecoside synthase from *Alangium lamarckii* Thw. *Phytochemistry*, 55(2), 177-181.
- Dittrich- Kutchan, H TM (1991) Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine

-
- alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9969-9973.
- Domadia, P. N., Bhunia, A., Sivaraman, J., Swarup, S., & Dasgupta, D. (2008). Berberine targets assembly of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ. *Biochemistry*, 47(10), 3225-3234.
- Emes, M., Aguilar, A., Argueta, A., & Cano, L. (1994). *Indigenous Medicinal Florae from México*, vol. II. National Indigenist Institute, Mexico.
- Espinosa García, F. J., & Sarukhán, J. (1997). *Manual de malezas del Valle de México*.
- Facchini, P. J., Huber-Allanach, K. L., & Tari, L. W. (2000). Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry*, 54(2), 121-138.
- Facchini, P. J., & Bird, D. A. (1998). Developmental regulation of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plants and tissue cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34(1), 69-79.
- Facchini, P. J., Penzes, C., Johnson, A. G., & Bull, D. (1996). Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant physiology*, 112(4), 1669-1677.
- Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology*, 52(1), 29-66.
- Farrow, S. C., Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2012). Transcript and metabolite profiling in cell cultures of 18 plant species that produce benzyloquinoline alkaloids. *Phytochemistry*, 77, 79-88.
- Fernandez, J., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., VanCalsteren, M. R., Jankowski, C., & Campos, M. G. (2005). Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *European journal of pharmacology*, 522(1-3), 108-115.

-
- Gad, H., El-Ahmady, S., Abou-Shoer, M., & Al-Azizi, M. (2013). Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. *Phytochemical Analysis*, 1-24.
- García Luján, C., Martínez, A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9 (2).
- Gomis Yagües, V. (2008). Tema 3. Cromatografía de gases. Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial.
- Grycová, L., Dostál, J., & Marek, R. (2007). Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 68 (2), 150-175.
- Gros, E., Pomillo, A., Seldes, A., & Burton, G. (1985). Introducción al Estudio de los Productos Naturales. Whashington, D.C: Secretaria General de la Organización de los estados Americanos.
- Guízar-González, C., Trujillo-Villanueva, K., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2012). Sanguinarine and dihydrosanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* (L) cell suspension cultures exposed to yeast extract. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56 (1), 19-22.
- Hair, J. F., Bush, R. P., & Ortinau, D. J. (2000). Marketing research: A practical approach for the new millennium. Irwin Professional Publishing.
- Haisova, K., & Slavik, J. (1973). Alkaloids of the Papaveraceae II. Alkaloids from *Argemone ochroleuca*. *Collect. Czech.Chem.Commun*, 2307-2312.
- Haisova, K., & Slavik, J. (1975). On the minor alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 40 (5), 1576-1578.
- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2012). Subcellular localization of sanguinarine biosynthetic enzymes in cultured opium poppy cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48 (2), 233-240.
- Hagel, J. M., Beaudoin, G. A., Fossati, E., Ekins, A., Martin, V. J., & Facchini, P. J. (2012). Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final

- steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *287* (51), 42972-42983.
- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, *54* (5), 647-672.
- Hagel, J. M., Morris, J. S., Lee, E. J., Desgagné-Penix, I., Bross, C. D., Chang, L., & Sensen, C. W. (2015). Transcriptome analysis of 20 taxonomically related benzylisoquinoline alkaloid-producing plants. *BMC plant biology*, *15* (1), 227.
- Haisová, K., & Slavik, J. (1975). On the minor alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Collect Czech, Chemm. Commum*, *40*.
- He, Y., Hou, P., Fan, G., Li, D., & Peng, C. (2015). Isolation and characterization of a novel (S)-canadine synthase gene from *Coptis chinensis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, *18* (5), 376-380.
- Hernández, L. H., y Pérez, C. G. (2002). Análisis instrumental. Ariel.
- Hendriks, M., Cruz, L., De Bont, D., & Hall, R. (2005). Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. *Analytica Chimica Acta*, 53-64.
- Israilov, I. A., & Yunusov, M. S. (1986). Alkaloids of four species of *Argemone*. *Chemistry of Natural compounds*, *22* (2), 189-192.
- Jiménez-Alfaro, B., Sánchez, G. B., & Prieto, J. F. (2005). Ecología y conservación de *Centaurium somedanum* M. Laínz (Gentianaceae), planta endémica de la Cordillera Cantábrica (España). *Pirineos*, *160*, 45-68.
- Johll, Matthew. (2008). *Investigating Chemistry: A Forensic Science Perspective*. Macmillan.
- Jovanovic, E., Agbaba, D., Stakic, Z., & Vladimirov, S. (1998). HPTLC determination of ceftriaxone, cefixime and cefotaxime in dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 893-898.

-
- Kadereit, J. W., Schwarzbach, A. E., & Jork, K. B. (1997). The phylogeny of *Papaver* s.l. (Papaveraceae): Polyphyly or monophyly. *Plant Systematics and Evolution*, 204 (1-2), 75-98.
- Karlsson, L. M., Tamado, T., & Milberg, P. (2003). Seed dormancy pattern of the annuals *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* (Papaveraceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 198 (4), 329-339.
- Kramer, Richard. (1998). *Chemometric techniques for quantitative analysis* (No. 04; QD101.2, K7.). New York: Marcel Dekker.
- Lenka Grycova, J. D. (2007). Quaternary protoberberine alkaloids. *Elsevier*, 150-157.
- Liscombe, D. K., MacLeod, B. P., Loukanina, N., Nandi, O. I., & Facchini, P. J. (2005). Evidence for the monophyletic evolution of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry*, 66 (11), 1374-1393.
- Liang, Y.-Z., Xie, P., & Chan, K. (2004). Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, 53-70.
- Lin Liao, Q., Liu, C., Wu, Y., Jin, Y., Hua, M., Zhu, W., Huang, L. (2015). Association of soil cadmium contamination with ceramic industry: A case study in a Chinese town. *Science of The Total Environment*, 26-32.
- Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, 19 (2), 173-180.
- Liscombe D.K, MacLeod B.P, Loukanina N, Nandi O.I, Facchini P.J (2005). Evidence for the monophyletic evolution of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* 2005; 66:(11): 1374-1393.
- Lozoya, L. L., & Lozoya, M. (1982). *Flora medicinal de México*. Instituto mexicano del seguro social.
- Lucio Gutierrez, J. R., Garza-Juárez, A., Coello, J., MasPOCH, S., Salazar-Cavazos, M. L., Salazar-Aranda, R., & de Torres, N. W. (2012). Multi-wavelength high-performance

-
- liquid chromatographic fingerprints and chemometrics to predict the antioxidant activity of *Turnera diffusa* as part of its quality control. *Journal of Chromatography A*, 1235, 68-76.
- Martínez, A. M., Aguado-Pedraza, A. J., Viñuela, E., Rodríguez-Enríquez, C. L., Lobit, P., Gómez, B., & Pineda, S. (2017). Effects of ethanolic extracts of *Argemone ochroleuca* (Papaveraceae) on the food consumption and development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 100 (2), 339-345.
- Martínez Moreno, D., Reyes-Matamoros, J., Andrés-Hernández, A. R., & Pérez-Espinosa, L. (2016). Flora útil de la comunidad "Rancho El Salado" en Jolalpan, México. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3, 1-15.
- McDonald, A. (1991). *Plantae alpinae novae mexicanae: Argemone subalpina* (Papaveraceae). *Brittonia*, 43 (2), 120-122.
- Mertler, C. A., y Reinhart, R. V. (2016). *Advanced and multivariate statistical methods: Practical application and interpretation*. Routledge. *Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 592-602.
- Meyer, A., & Imming, P. (2011). Benzylisoquinoline alkaloids from the Papaveraceae: the heritage of Johannes Gadamer (1867–1928). *Journal of natural products*, 74 (11), 2482-2487.
- Mok, D., & Chau, F.-T. (2006). Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 210-217.
- Monforte-González, M., Guízar-González, C., Rubio-Piña, J., Carrillo-Pech, M., & Vázquez-Flota, F. (2012). Berberine and sanguinarine quantitation in *Argemone mexicana* L.(Papaveraceae) tissues by TLC-in situ fluorography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 25 (4), 358-360.
- Narcross, L., Fossati, E., Bourgeois, L., Dueber, J. E., & Martin, V. J. (2016). Microbial factories for the production of benzylisoquinoline alkaloids. *Trends in biotechnology*, 34 (3), 228-241.

- Osho, A., & Adetunji, T. (2010). Antimicrobial activity of the essential oil of *Argemone mexicana* Linn. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (1), 019-022.
- Ownbey, Gerald. B. (1958). Monograph of the genus *Argemone* for North America and the West Indies. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 21(1), 1-159.
- Ownbey, Gerald. B. (1961). The genus *Argemone* in South America and Hawaii. *Brittonia*, 13(1), 91-109.
- Pasto, D. J., & Johnson, C. R. (1981). Determinación de estructuras orgánicas. Reverté.
- Paul, N. K., & Begum, N. (2007). Influence of Root and Leaf Extracts of *Argemone mexicana* on Germination and Seedling Growth of Blackgram, Rapeseed and Wheat. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 42 (2), 229-234.
- Pichersky, E., & Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5 (10), 439-445.
- Prieto Guerra, R. E. (2006). Técnicas estadísticas de clasificación, un ejemplo de análisis cluster.
- Rajalahti, T., & Kvalheim, O. M. (2011). Multivariate data analysis in pharmaceuticals: a tutorial review. *International journal of pharmaceuticals*, 417 (1), 280-290.
- Rajvaidhya, S., Nagori, B. P., Singh, G. K., Dubey, B. K., Desai, P., & Jain, S. (2012). A review on *Argemone mexicana* linn.-an Indian medicinal plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3 (8), 2494.
- Ramakrishnan, P. S., & Gupta, U. (1972). Nutrient factors influencing the distribution of two closely related species of *Argemone*. *Weed Research*, 12 (3), 234-240.
- Reich, E., & Schibli, A. (2006). High-performance Thin-layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants Thieme. New York: Thieme.
- Reyes Francisco Daniel, P. C. (2011). Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 139-146.

-
- Rubio Piña, J. (2009). Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Mérida, Yucatán: CICY, 1-171.
- Rubio-Piña, J., & Vázquez-Flota, F. (2013). Pharmaceutical applications of the benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana* L. Current topics in medicinal chemistry, 13 (17), 2200-2207.
- Rueda Bayona, J. G., Elles Pérez, C. J., Sánchez Cotte, E. H., Ariza, G., León, Á., & Rivillas Ospina, G. D. (2016). Identifying patterns of climate variability from principal component analysis-PCA, Fourier y k-means clustering. Tecnura, 20 (50), 55-68.
- Rueffer, M., & Zenk, M. (1987). Enzymatic formation of protopines by a microsomal cytochrome P-450 system of *Corydalis vaginans*. Tetrahedron Letters, 28.
- Ruiz-Jimenez, J., Priego-Capote, F., Garcia-Olmo, J., & de Castro, M. L. (2004). Use of chemometrics and mid infrared spectroscopy for the selection of extraction alternatives to reference analytical methods for total fat isolation. Analytic chemistry acta, 525 (2), 159-169.
- Rzedowski, J. (1991). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. Acta botánica mexicana, (14), 3-21.
- Sakthivadivel, M., & Thilaga vathy, D. (2003). Larvicidal and chemosterilant activity of the acetone fraction of petroleum ether extract from *Argemone mexicana* L. seed. Bioresource technology, 89 (2), 213-216.
- Samanani, N., Park, S. U., & Facchini, P. J. (2005). Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. The Plant Cell, 17 (3), 915-926.
- Samanani, N., Alcantara, J., Bourgault, R., Zulak, K. G., & Facchini, P. J. (2006). The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. The Plant Journal, 47 (4), 547-563.
- Sánchez, M., Castillo H, C., & Navarrete, A. (2008). Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of *Argemone ochroleuca* Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 229-236.

-
- Schäfer, D. (2007). Milk of Paradise? Opium und Opiate in der Literatur des 19. und 20. Jahrhunderts. Springer Link, 339-346.
- Schmeller, T., El-Shazly, A., & Wink, M. (1997). Allelochemical activities of pyrrolizidine alkaloids: interactions with neuroreceptors and acetylcholine related enzymes. *Journal of chemical ecology*, 23 (2), 399-416.
- Schwarzbach, A., & Kadereit, J. (1999). Phylogeny of prickly poppies (*Argemone* L.: Papaveraceae) and the evolution of morphological and alkaloid characters based on ITS nrDNA sequence variation. *Pl.Syst.Evol*, 257-279.
- Siddiqui, I., Shaukat, S., Khan, G., & Zaki, M. (2002). Evaluation of *Argemone mexicana* for control of root-infecting fungi in tomato. *Journal of Phytopathology*, 321-329.
- Sharma, P., Singh, M., Arora, S., & Singh, R. (2011). The evaluation of in vitro toxicity of the protein (LL 4218) isolated from leaves of *Argemone mexicana* in human hepatoma-derived cell line (HepG2) using multiplexing approach. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 2 (4), 179-179.
- Slavík, J., Slavíková, L., & Haisová, K. (1973). Alkaloids of the Papaveraceae. L. On the quaternary alkaloids from *Argemone platyceras* Link et Otto. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 38 (8), 2513-2517.
- Smith, Ivor. (Ed.). (2013). *Chromatography*. Elsevier.
- Sreekumar, A. L. (2009). Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, 910-914.
- Steffens, P., Nagakura, N., & Zenk, M. H. (1985). Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures. *Phytochemistry*, 24 (11), 2577-2583.
- Tistaert, C., & Vander Heyden, Y. (2012). Bilinear decomposition based alignment of chromatographic profiles. *Analytical chemistry*, 84 (13), 5653-5660.
- Unterlinner, B., Lenz, R., & Kutchan, T. M. (1999). Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine

-
- biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *The Plant Journal*, 18 (5), 465-475.
- Valcárcel, M., Gómez-Hens, A., & Rubio, S. (2001). Selectivity in analytical chemistry revisited. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 20 (8), 386-393.
- Vésteinsdóttir, E., Björnsdóttir, S., Hreidarsson, A. B., & Stefansson, E. (2010). Risk of retinal neovascularization in the second eye in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Acta ophthalmologica*, 88 (4), 449-452.
- Vibrans Manduna, Madamombe, I., H., & García, V. V. (2009). Género y conocimientos etnobotánicos en México y Zimbabwe. Un estudio comparativo. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, 6 (18), 21-48.
- Vilanova Gisbert, E., & Sogorb Sánchez, M. A. (2004). Técnicas analíticas de contaminantes químicos: Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. Ediciones Díaz de Santos.
- Villaseñor Ríos, J. L., & Espinosa-García, Y. F. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, DF.
- Volonté, M. G., & Quiroga, P. (2013). Análisis farmacéutico.
- Warikoo, R., & Kumar, S. (2013). Impact of *Argemone mexicana* extracts on the cidal, morphological, and behavioral response of dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, 112 (10), 3477-3484.
- Walton, H. F., & Reyes, J. (1983). *Análisis químico e instrumental moderno*. Reverté.
- Wilcox, Jr. Charles F. & Wilcox Mary F (1995),., "Experimental Organic Chemistry. A Small-Scale Approach", 2ª. Ed., Prentice-Hall, New Jersey, USA, pp. 122-127, 130-132 y 142-147.
- Willcox, M. L., Graz, B., Diakite, C., Falquet, J., Dackouo, F., Sidibe & Diallo, D. (2011). Is parasite clearance clinically important after malaria treatment in a high transmission area? A 3-month follow-up of home-based management with herbal medicine or

- ACT. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 105 (1), 23-31.
- Willcox, M. L., Graz, B., Falquet, J., Sidibé, O., Forster, M., & Diallo, D. (2007). *Argemone mexicana* decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 101 (12), 1190-1198.
- Wink, M., Schmeller, T., & Latz-Brüning, B. (1998). Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. Journal of chemical Ecology, 24 (11), 1881-1937.
- Wise, B. M. (2006). Chemometrics tutorial for PLS_Toolbox and Solo. Eigenvector Research.
- Xool Tamayo, J. (2016). Estudio de la relación entre la acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en diferentes tipos de tejidos de *Argemone mexicana* y sus patrones transcripcionales. Mérida, Yucatán: CICY.
- Yam Puc, J.A. (2014). Extracción de alcaloides de *Argemone mexicana*. México. CICY.
- Zenk, M., Rueffer, M., Amann, M., Deus-Neum, N., & Nagakura, N. (1985). Benzylisoquinoline biosynthesis of plant cells and isolated enzymes. Journal of Natural Products, 725-738.
- Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. Annu. Rev. Plant Biol., 59, 735-769.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Se colectaron individuos de tres especies del género *Argemone*: *A. mexicana*, *A. ochroleuca* y *A. platyceras*. Poblaciones de estas especies se localizaron en Puebla, Yucatán, Campeche y Chihuahua (ver resultados de la sección 3.1) y se colectaron en diferentes estados de desarrollo, de acuerdo a la disponibilidad encontrada en las poblaciones. De este modo, se colectaron cuatro estados de desarrollo de *A. mexicana* L y *A. platyceras* L y O, y únicamente plantas adultas de *A. ochroleuca* S.

Se colectaron las plantas completas y se llevaron al laboratorio en donde se lavaron con agua de la llave y se separaron cuidadosamente en hojas, tallos y raíces. Las plantas fueron identificadas por el Biol. José Luis Tapia y un ejemplar de cada especie fue depositado en el herbario “U’ nahil tikin Xiw” del CICY. Los tejidos colectados se separaron en dos lotes que se empaquetaron en papel aluminio y se almacenaron en un congelador (Thermo scientific) a -80 °C. Un lote se utilizó para la extracción de alcaloides, por lo que los tejidos se secaron por liofilización durante 24 h, una vez secos, se trituraron con la ayuda de un mortero, o bien, con ayuda de un rallador metálico. Los tejidos secos y triturados se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente protegidos de la luz hasta su utilización. El segundo lote se mantuvo en congelación para la extracción de los ácidos nucleicos.

2.2 Extracción y concentración de alcaloides bencilisoquinolínicos

La extracción de alcaloides (Fig. 2.1) se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Monforte *et al* (2012) con algunas modificaciones. Se pesaron 200 mg de material seco que se trituraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino con la ayuda de mortero y pistilo. El polvo obtenido se incubó en 15 mL de MeOH con agitación lenta por dos h a temperatura ambiente. Después, el extracto se repartió en tubos de microcentrífuga que se centrifugaron por 5 min a 10,000 rpm. Los sobrenadantes de cada tubo se reunieron en un solo tubo Falcon, a partir de este extracto crudo, se realizaron los análisis de alcaloides. Al mismo tiempo, se tomaron dos mL del extracto para ser concentrados por evaporación a presión reducida en un Centrivap (Heto Uk) con el fin de calcular el rendimiento.



Figura 2.1 Proceso de extracción de alcaloides para tejidos de especies de *Argemone*.

2.3 Separación por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Los alcaloides presentes en los extractos fueron separados por Cromatografía en Capa Fina (CCF) en placas de gel de sílica de 20 x 10 cm (Merck, cat. No. 1.05554.0004) con indicador fluorescente (F_{254}). Como fases móviles fueron usados dos sistemas de disolventes, ya establecidos para la separación de alcaloides de *A. mexicana* (Monforte *et al.*, 2012) y que debido a sus características permiten la separación de compuestos alta (sistema 1) y baja (sistema 2) polaridad. El sistema 1 consistió de n-butanol/ agua/ hidróxido de amonio en proporción 8:1:1 (v/v); mientras que el sistema 2 se preparó con benceno/ etanol en proporción 94:6 (v:v). Se ensayaron volúmenes de aplicación de entre 1 y 3 μL del extracto (donde cada μL representar 13 μg de peso seco de tejido) y el volumen de la mezcla de disolventes en la cámara de desarrollo fue de 10 mL. El tiempo de corrida fue de 30 minutos para el sistema polar y 15 minutos para el sistema de menor polaridad. Las placas se desarrollaron en cámaras Twin Trough Chamber (CAMAG). Las placas se visualizaron con una lámpara UV (*Spectroline*®, USA) a una longitud de onda de 366 nm. Para identificar los alcaloides se compararon los R_f observados en las muestras con los estándares disponibles (sanguinarina, berberina y queleritrina); también se analizaron los patrones de autofluorescencia y la forma de cada mancha.

2.4 Cuantificación de sanguinarina y berberina

La cuantificación de sanguinarina y berberina se llevó a cabo por densitometría *in situ* sobre las placas cromatográficas. La detección se realizó con un densitómetro (Scanner 4, CAMAG, Muttenz, Basilea-Campiña, Switzerland) a una longitud de onda de 330 nm, utilizando el método de estándar externo. Las lecturas se hicieron por un barrido lineal de cada carril y la concentración de los alcaloides se determinó comparando el área del pico de las muestras contra el área de los picos obtenidos con concentraciones conocidas de los estándares. Se utilizó una curva de calibración para cada alcaloide. Dichas curvas presentaron un coeficiente de correlación de 0.9983 para sanguinarina y 0.9972 para berberina, así como un límite de detección (LDD) de 1.06 ng y de 1.19 ng para sanguinarina y berberina, respectivamente. En cuanto al límite de cuantificación (LDC), fueron de 3.5 ng/por punto y 3.9 ng/por punto, respectivamente (Estrada Alfaro, 2018).

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con los promedios de las concentraciones obtenidas de sanguinarina y berberina. Utilizando la prueba de Tukey se efectuaron comparaciones múltiples de las medias para establecer diferencias de concentración entre los tejidos de las especies.

2.5 Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (CCF-AR)

Para la elaboración del perfil cromatográfico por Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (CCF-AR) se programó el software VisionCats (versión 2.4) del equipo de HPTLC por sus siglas en inglés (High performance Thin Layer Chromatography) marca CAMAG, trabajando en placas cromatográficas de Silica gel 60 F₂₅₄ de medidas 20,0 x 10,0 cm. Se aplicó un volumen de 1 a 2 µL de las muestras y de los estándares de referencia usando nitrógeno de alta pureza con una jeringa de 25 µL a una velocidad de 140 nL/s, aplicando en bandas entre 4 a 8 mm. El frente de disolvente alcanzó una distancia de 7 cm a partir del origen. El tiempo total de desarrollo de la placa en todos los casos fue menor a 45 minutos (Fig. 2.2). Para el desarrollo cromatográfico se utilizó un volumen de 10 mL de eluyente con una distancia de desarrollo de 70 mm, la activación de la placa se realizó durante 10 min con una solución sobresaturada de KSCN manteniendo el sistema en un ambiente controlado con una humedad relativa entre 50 y 56%; posteriormente se saturó la

cámara cromatográfica usando 25 mL de la fase móvil (Srivastava y ManMohan, 2011).

Una vez desarrollado el cromatograma se procedió a documentarlo fotográficamente usando las longitudes de onda de 254 nm y 366 nm. Mediante el software (VisionCats) se obtuvieron los valores de R_f de los estándares y de las bandas de interés, con los cuales se realizó la comparación de los extractos. El tiempo de saturación de la cámara cromatográfica y tiempo de pre-acondicionamiento de la placa cromatográfica se evaluaron entre sí. Las condiciones para el rendimiento óptimo se establecieron experimentalmente y se describen en la figura 2.2.



Figura 2.2 Diagrama general del método aplicado por CCF-AR para la detección de alcaloides en extractos de *Argemone*. Los sistemas de disolventes utilizados para correr todas las muestras son benceno/EtOH (94:6 v/v) y n-butanol/H₂O/NH₄OH (8:1:1 v/v).

2.5.1 Análisis densitométrico

Para la obtención de perfiles cromatográficos de especies de *Argemone* por CCF-AR, se realizaron las lecturas de las bandas directamente en la placa, utilizando el densitómetro (Scanner 4, CAMAG, Muttenz, Basilea-Campiña, Switzerland) usando una longitud de onda de 330 nm. Los datos obtenidos para cada cromatograma incluyen la altura y área de los picos, y posiciones de zonas (inicio, medio y extremo) para cada componente resuelto en cada carril cromatográfico en la placa de CCF. También se aplicó un ajuste de la línea base

para que todos los picos se integraran con precisión. Para las lecturas de los cromatogramas se usó la dirección de escaneo desde el origen hasta el frente del solvente en cada carril. Para cada banda se calculó la relación frontal (R_f), el área, el color y se correlacionó la concentración de estándares con el área de las bandas para determinar la intensidad de los picos de los compuestos identificados. Los carriles se compararon de acuerdo con la presencia o ausencia de bandas, a su R_f , intensidad de picos y color.

2.6 Análisis Quimiométrico

Para poder observar las posibles relaciones entre los individuos y especies de *Argemone* con respecto a su distribución de alcaloides (variables elegidas), se utilizaron los métodos quimiométricos de PCA y Análisis de Conglomerados. El conjunto de datos fue constituido por 108 cromatogramas obtenidos (por cada sistema de elución) de los extractos de *A. mexicana* L. *A. platyceras* L y O. y *A. ochroleuca* Sweet (Papaveraceae). Las matrices de datos contuvieron la altura de picos específicos detectados en cada perfil, con esta matriz se realizó la construcción de los modelos de PCA y Análisis de Conglomerados. Para el proceso de aplicación de las técnicas multivariantes se incorporó como variables la diversidad alcaloidal.

2.6.1 Programas estadísticos

Para el desarrollo de PCA y Análisis de Clúster se utilizó el programa estadístico Info Stat versión 16-04-2015 y el programa Minitab 18. Para el diseño de matrices de datos se usó el programa Microsoft Office Excel 2007 y para la presentación de graficas se utilizó Origin V.6 e Info Stat.

2.7 Análisis de la distribución y expresión relativa de genes involucrados en la síntesis de los ABI's en especies de *Argemone*

Para el análisis de transcritos de genes específicos involucrados en la ruta biosintética de ABI's. Se utilizaron oligonucleótidos previamente diseñados por Xool-Tamayo (2016) utilizando el transcriptoma de *A. mexicana*, la información disponible en la literatura y en diferentes bases de datos, como NCBI, ENA-EBI y PhytoMetaSyn. Las secuencias se muestran en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Descripción de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los ABI's tipo protoberberina y benzofenantridina (*Modificado de Xool; 2016; Xool-Tamayo et al., 2017; Vergara-Olivares, 2016*). Tamaño de los productos esperados de transcritos ABI's encontrados en *Argemone mexicana*; F, dirección sentido; R, dirección antisentido.

| Transcrito | Secuencias (5'→3') | Dirección | Tm | Tamaño (pb) |
|--|----------------------------------|-----------|------|-------------|
| NCS1 (S)-norcoclaurina sintasa | CATCGCTAATTACGTTCTCAAGAATCA | F | 67°C | 241 |
| | ATAGTAGTACATGGAATTACCTGGATGGGA | R | | |
| BBE1 enzima del puente de berberina | CATCTTTGTTTCATCATCATCTTCTTCTTCTT | F | 66°C | 268 |
| | GATCCTCTTGTGCAACATCTAACGGT | R | | |
| BBE2 enzima del puente de berberina | CTCATCTTTGTTTCATCTTCTTTCTGTGC | F | 66°C | 255 |
| | GATCCTCTTG TGCAACATCTAACGGT | R | | |
| SOMT escoulerina-9-O-metiltransferasa | CAGGATTTGGACCAGAAGCAC | F | 63°C | 252 |
| | ACGATACTCCATCCTCCTCGC | R | | |
| STOX tetrahidroprotoberberina oxidasa | GGTTAGGAAATATGGACTTG | F | 54°C | 544 |
| | ATAACATTGCTGGTGAATCT | R | | |
| StySyn S-estilopina sintasa | GTTCAAATCTAGTACGTCGGCT | F | 53°C | 173 |
| | TTCTCTTGAACATTTGGTTCTCGT | R | | |
| TNMT tetrahidroprotoberberina cis-N-metiltransferasa | CCCCCTGGTTGTGTGACAAT | F | 54°C | 167 |
| | TTCACTGCTTCATGGTTTCCTC | R | | |
| DBOX dihidrobenzofenantridina oxidasa | CACAGGCCAAGAGGTTTGCTA | F | 62°C | 523 |
| | GCTTCCTCTATTTCTTCCCTTT | R | | |
| ACTIN Actina | GGAGAAGAGTTATGAGCTCCTGAC | F | 62°C | 232 |
| | CATACGATCAGCAATACCAGGGAA | R | | |

2.7.1 Extracción de ARN total y síntesis del ADN complementario

Para la extracción de ARN, se tomó parte de los tejidos frescos de las especies colectadas para triturarlos con mortero en nitrógeno líquido. Las claves se asignaron haciendo referencia a la misma división del material vegetal para alcaloides. El material vegetal para ARN se empaquetó y almacenó en el ultracongelador a -80 °C.

La extracción de ARN total se efectuó de acuerdo con lo reportado por Rubio-Piña en el 2009. Para la extracción, se maceró 1 g de tejido con nitrógeno líquido y 250 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) hasta obtener un polvo fino. El tejido se homogenizó con 10 mL del amortiguador de extracción (Trizol), y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 g por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo al que se le agregó 1 mL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Las fases se separaron centrifugando a 13,000 g durante 10 min a 4°C, la fase acuosa se transfirió un tubo estéril (este paso se realizó 2 veces). La fase acuosa se mezcló con 0.625 volúmenes de 8 M de LiCl₂ y se incubó durante 1h a 4°C, la mezcla se centrifugó a 13,000 g durante 30 min a 4 °C, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante. La pastilla de ARN se lavó con etanol al 70%, centrifugando las muestras a 13,000 g durante 10 min a 4°C, finalmente la pastilla se resuspendió en 20 µl de amortiguador TE y se almacena a -80°C hasta su uso. La integridad del ARN de las muestras se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La concentración y pureza del ARN se evaluó usando el NanoDrop, para medir la absorbancia de la muestra.

La síntesis de cDNA se realizó por transcripción reversa utilizando ARN total obtenido de hojas, tallos y raíces de las muestras. Para este experimento, se utilizó el procedimiento descrito por Vergara-Olivares (2016). Para síntesis de la primera cadena complementaria de cDNA se realizó una reacción utilizando los siguientes componentes: 2 µg de ARN total, 2µl de DNAsa (10X buffer), 2 µl de regulador y 6 µl de agua DEPC, luego se incubó a 37 °C por 30 min y después se detuvo la reacción al incubar a 65 °C durante 10 min. Posteriormente, se agregaron: 1 µl de Oligo dT (500µg/ml), 1µl de DNT´p mix (10Mm), 5µl de H₂O DEPC y se incubó a 65°C por 20 min, luego se dejó reposar por 10 min, y finalmente, se agregó 1 µl de transcriptasa reversa (M-MLV), 2 µl de DTT y se dejó en incubación a 37 °C por 60 min, obteniéndose un volumen final de 30 µl. La reacción se inactivó incubando a 70 °C por 15 min. Las concentraciones de cDNA se verificaron usando el equipo NanoDrop y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.7.2 Expresión relativa por PCR en punto final.

El ADN de cadena sencilla así formado fue sometido a la Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*), para el aislamiento de los ADNc's parciales correspondientes a las enzimas específicas claves en la ruta biosintética de los ABI's. Se utilizó 10 µM de cebadores específicos y 0.6 µL (5 U/µL) de Taq ADN polimerasa y se estandarizaron las condiciones de amplificación de cada uno de los genes de interés. Los cebadores para la amplificación de transcritos correspondientes a las enzimas fueron diseñados por Xool-Tamayo (2016) y se muestran en el cuadro 2.1. Los productos esperados correspondieron al fragmento de pb para las enzimas utilizando los cebadores específicos.

El programa de PCR consistió en 30 ciclos con etapas de 30 segundos, cada una a 95 y 50 °C y de 1 min a 72 °C, para la desnaturalización, alineamiento, y amplificación respectivamente, precedidos por una etapa de 3 min a 94° C y finalizando con otra de 10 min a 72 °C. Los productos de RT-PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1% teñido con 1 µg·mL⁻¹ de bromuro de etidio. Se incluyeron marcadores de tamaño molecular (1 Kb DNA ladder, INVITROGEN ®). Para el análisis de los niveles de acumulación de los transcritos fue empleada la proteína actina (ACTIN ®) como estándar interno. El gel se visualizó en un fotodocumentador con transluminador Bio-Rab Universal Hood II.

2.7.3 Purificación de transcritos de genes involucradas en la biosíntesis de los ABI's

Los geles de agarosa donde se fraccionaron los productos de la PCR para amplificar los fragmentos fueron visualizados en un trasluminador (MACROVUE UV-25) a 225 nm. Los amplicones se escindieron del gel con la ayuda de un bisturí estéril y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL en hielo. El fragmento se purificó con la ayuda del estuche comercial Zimoclean™ Gel DNA Recovery Kit de Epigenetics ®. Las purificaciones se realizaron siguiendo las instrucciones del protocolo provisto en el estuche Zimoclean™ que se basa en un método de alta calidad para la recuperación de ADN de geles de agarosa agregando el buffer ADB para disolver la agarosa y transfiriendo la solución a una columna que contiene un tubo colector. Después de dos lavados con el buffer DNA Elution, el ADN puro se eluye de la columna.

2.7.4 Secuenciación y alineamientos

Para la secuenciación, se prepararon tubos que contenían 5 μL de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de producto de PCR más 5 μL de 5 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ de primer utilizado. Las muestras fueron enviadas a la compañía MacroGen Inc. en Seoul Corea del Sur para su secuenciación. Cada muestra fue enviada con el oligonucleótido directo y el reverso por separado.

En el análisis bioinformático, el proceso de verificación se realizó a partir de las comparaciones de secuencias nucleotídicas presuntamente identificadas de *A. mexicana*, depositadas y disponibles en bancos de información o bases de datos, como NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los alineamientos se realizaron mediante el programa DNAMAN 4.13.

BIBLIOGRAFÍA

- Estrada Alfaro, N (2018). Validación de un método para la cualificación de sanguinarina y berberina en *Argemone mexicana*, por cromatografía de capa fina-densitometría. - Mérida, Yucatán: UADY.
- Monforte-González, M., Guízar-González, C., Rubio-Piña, J., Carrillo-Pech, M., & Vázquez-Flota, F. (2012). Berberine and sanguinarine quantitation in *Argemone mexicana* L.(Papaveraceae) tissues by TLC-in situ fluorography. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 25(4), 358-360.
- Rubio-Piña, J. (2009). Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Mérida, Yucatán: CICY, 1-171.
- Srivastava, ManMohan. (2011). High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). Berlin: Springer Heidelberg.
- Vergara-Olivares, M. (2016). Análisis de la redundancia genética de la ruta de síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* L.
- Xool-Tamayo, J. (2016). Estudio de la relación entre la acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en diferentes tipos de tejidos de *Argemone mexicana* y sus patrones transcripcionales.
- Xool-Tamayo, J., Serrano-Gamboa, G., Monforte-González, M., Mirón-López, G., & Vázquez-Flota, F. (2017). Development of newly sanguinarine biosynthetic capacity in in vitro rootless shoots of *Argemone mexicana* L. Mexican prickly poppy. Biotechnology letters, 39(2), 323-330.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Colecta del material vegetal

La colecta del material vegetal se llevó a cabo entre diciembre de 2016 y febrero de 2017 en sitios seleccionados para cada una de las especies en estudio, tomando en cuenta su hábitat natural y su época de floración y de fructificación (figura 3.1). Las poblaciones de *A. mexicana* L. se localizaron en Komchén, Mérida, Yucatán (21.10° N 89.67° O) y en Dzacabuchén, Champotón, Campeche (19.04° N 90.70° O). La población de *A. platyceras* L y O se localizó en San Juan Huiloapán, Atzitzintla, Puebla (18.89°N 97.27 °O). La población de *A. ochroleuca* S. se localizó en los alrededores de la ciudad de Chihuahua, Chihuahua (28.63° N 106.09° O). Los ejemplares de cada especie fueron identificados por el Biol. José Luis Tapia Muñoz del herbario “U Nahil Tikin Xiw” del CICY.

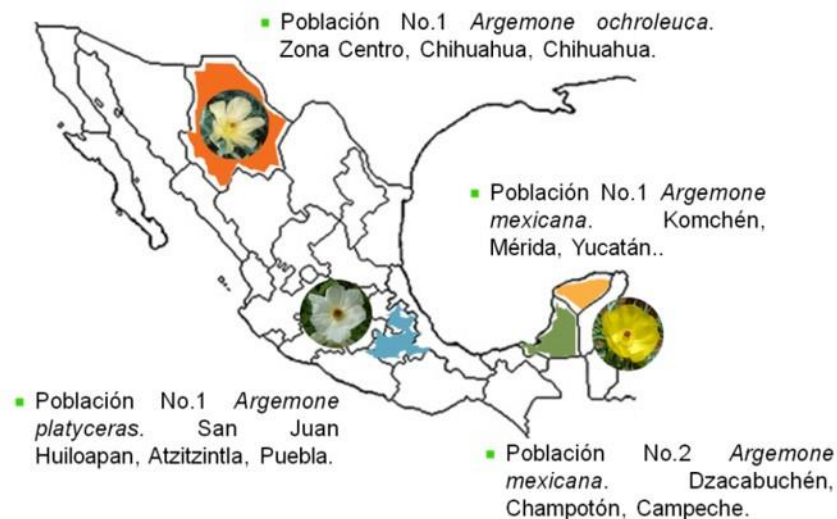


Figura 3.1 Mapa de ubicación de los sitios de colecta. Se indica el número de población de la especie y se resaltan los estados de la República Mexicana en el que se colectó.

Se colectaron tres individuos adultos de cada especie por población para ser procesados y uno adicional para ser prensado y conservado en el herbario. Las plantas colectadas presentaban capullos, flores abiertas, cápsulas y semillas (Fig. 3.2). Las tallas de los individuos colectados se muestran en el cuadro 3.1.



Figura 3.2 Plantas adultas colectadas de *A. mexicana*, *A. ochroleuca* y *A. platyceras*.

Cuadro 3.1. Características de los individuos colectados de las diferentes especies de *Argemone*.

| <i>Especie/Población</i> | <i>Origen</i> | <i>Color de flores</i> | <i>Altura (cm)</i> |
|--------------------------|-------------------|------------------------|--------------------|
| <i>A. mexicana</i> -1 | Komchén Yuc. | Amarillo intenso | 62-84 |
| <i>A. mexicana</i> -2 | Dzacabuchén, Cam. | Amarillo intenso | 30-48 |
| <i>A. platyceras</i> | Atzitzintla, Pue. | Blanco | 30-50 |
| <i>A. ochroleuca</i> | Chihuahua, Chih. | Amarillo pálido | 27-35 |

3.1.1 Selección y procesamiento del material vegetal

Las plantas fueron colectadas enteras, extrayéndolas de raíz y se conservaron en hielo durante su transporte al laboratorio, excepto los ejemplares de *A. ochroleuca* que fueron despachados por paquetería. Una vez en el laboratorio, las plantas se lavaron cuidadosamente con agua y jabón para eliminar restos de tejidos, tierra y las hojas marchitas. Después del lavado, las plantas fueron separadas en hojas, tallos y raíces y secadas por liofilización. Los tejidos secos fueron molidos utilizando un mortero hasta reducir a polvo fino. Los tejidos provenientes de los individuos diferentes de cada especie fueron procesados de manera independiente de tal modo que se cuentan con muestras triplicadas para cada tejido por individuo. Las muestras fueron etiquetadas con un código que combina la letra inicial de la especie (**m, o, p**), el número del individuo colectado (**1, 2, 3**), la inicial del tejido (**h, t, r**) y el número de repetición (**1, 2, 3**). De este modo, el código **m1h1** representa *A. mexicana*, individuo **1**, tejido de **hoja**, repetición **1**.

3.2 Obtención del extracto vegetal

Se pesaron 200 mg de material vegetal seco y se maceraron en 15 mL de MeOH grado analítico con agitación constante por 2 h a 25 °C. Utilizando esta metodología los rendimientos obtenidos fueron de entre 30 y 120 mg totales de extractos metanólicos secos para los diferentes tejidos, que representan entre el 30 y 60 % del peso seco inicial del tejido empleado para la extracción.

3.3 Análisis por CCF de extractos alcaloidales

Los primeros análisis por CCF se realizaron para establecer las condiciones preliminares para la separación de ABI's de los extractos. Se utilizaron dos sistemas de disolventes para la separación de los compuestos de mayor (sistema 1) y menor (sistema 2) polaridad. La composición de estas mezclas fue n-butanol/ H₂O/ NH₄OH (8:1:1 v/v) y benceno/ EtOH (94:6 v/v), para los sistemas 1 y 2 respectivamente. En estos sistemas, la sanguinarina (Sa) se visualiza al exponerse a la luz UV de 366 nm como con una banda naranja-rojiza con valores de *Rf* de 0.95 y 0.38 en los sistemas 1 y 2 respectivamente, por otra parte, la berberina (Be) despliega una fluorescencia verde azulada a un *Rf* de 0.29 en el sistema 1 y se mantiene en el origen en el sistema 2, mientras que la queleritrina (Que) se percibe también como una banda naranja-rojiza, pero a *Rf* de 0.95 y 0.27 en los sistemas 1 y 2, respectivamente (Fig. 3.3 y 3.4). De este modo, la implementación de dos sistemas de disolventes para la obtención del perfil cromatográfico completo resultó adecuada, considerando que las distancias recorridas por el disolvente y por los diferentes alcaloides presentes en los extractos presentó una resolución adecuada para su cuantificación e identificación.

Un análisis utilizando el sistema 1 reveló la presencia de berberina en los tres tejidos de las tres especies estudiadas, aunque las menores cantidades se observaron en *A. platyceras* (Fig. 3.3). En esta especie, sólo se detectaron trazas en tallos y hojas, siendo el límite de detección del método de 1.06 ng por punto (Estrada Alfaro, 2018); mientras que en las raíces, aunque las señales fueron superiores al límite de cuantificación (3.9 ng/por punto; Estrada Alfaro, 2018), no alcanzaron los valores de las otras especies.

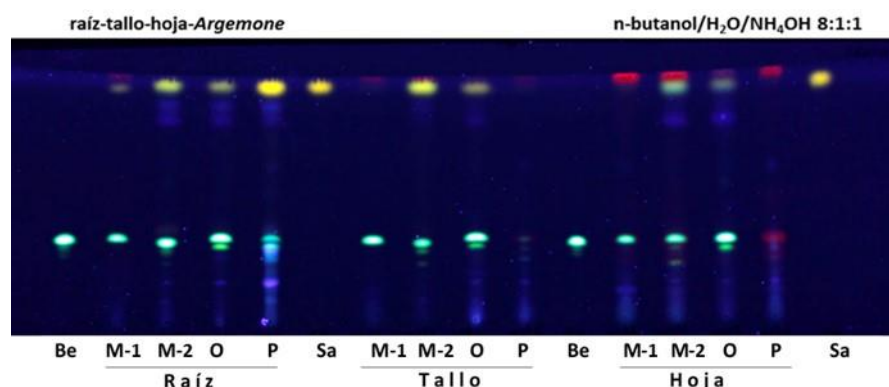


Figura 3.3 Análisis por CCF de extractos de especies de *Argemone* en el Sistema 1: n-butanol: H₂O: NH₄OH (8:1:1 v/v), placa bajo luz UV de 366 nm. M-1, *A. mexicana* población 1; M-2, *A. mexicana* población 2; O, *A. ochroleuca*; P, *A. platyceras*. Cada carril fue cargado con 1 μ L de extracto, los estándares utilizados fueron: berberina (Be, *Rf*: 0.29) y sanguinarina (Sa, *Rf*: 0.95).

El sistema 2 logró la separación de los alcaloides de mediana polaridad, como sanguinarina y queleritrina. La sanguinarina se encontró en cantidades significativas en las raíces de todas las especies. También se observó la presencia de dihidrosanguinarina, muy próxima al frente de disolventes, y de queleritrina que se detectó en todos los tejidos de la población 2 de *A. mexicana*, así como en *A. ochroleuca*, pero no en *A. platyceras* (Fig.3.4).

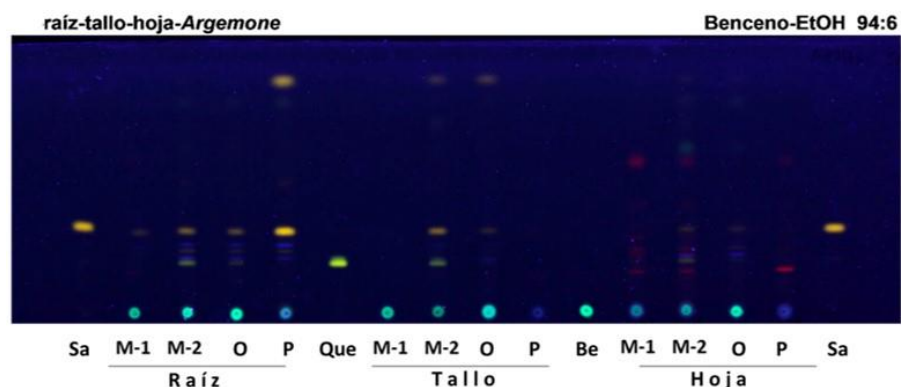


Figura 3.4 Análisis por CCF de extractos alcaloidales de especies de *Argemone* en el Sistema 2 (Benceno: EtOH 94:6 v/v), placa bajo luz UV a 366 nm. M-1, *A. mexicana* población 1; M-2, *A. mexicana* población 2; O, *A. ochroleuca*; P, *A. platyceras*. Mismas abreviaturas en la Fig. 3.6. Cada carril fue cargado con 1 μ L de extracto, los estándares utilizados fueron: sanguinarina (Sa, *Rf*: 0.38) y queleritrina (Que, *Rf*: 0.27).

De este modo, la presencia de los alcaloides sanguinarina y berberina (de forma particular) en los tejidos de *Argemone* pueden ser usadas como referencias, no solo por ser los productos finales de dos rutas biosintéticas distintas (benzofenantridinas y protoberberinas) sino por sus abundancias (Vázquez-Flota, 2018).

Recapitulando, los perfiles obtenidos por CCF nos revelan que *A. mexicana*, *A. platyceras* y *A. ochroleuca* presentan una capacidad biosintética similar, más no idéntica. Es importante notar que con anterioridad se reportó que las especies en estudio se caracterizan por la presencia de protoberberinas y sus derivados (Haisová y Slavik, 1973; Hagel y Facchini, 2013), así como por la presencia de sanguinarina y berberina (Rubio-Piña, 2009; Baker *et al.*, 2002; Fletcher *et al.*, 1993; Slavik *et al.*, 1972), estos hallazgos apoyan los resultados obtenidos en nuestros análisis por CCF.

3.4 Análisis por CCF-AR para extractos de especies de *Argemone*

Con el fin de aumentar la sensibilidad en la detección de alcaloides y lograr una mayor reproducibilidad se realizaron ensayos por cromatografía en capa fina de alta resolución (CCF-AR). Para ello, se definieron las condiciones para el desarrollo cromatográfico, incluyendo la altura de la placa (10 cm), el volumen de extracto a aplicar (1-3 μ l) y el método de visualización. Las separaciones se llevaron a cabo con los sistemas de disolventes 1 y 2 anteriormente mencionados.

Los extractos y los estándares de referencia fueron aplicados sobre las placas en forma de bandas. Los perfiles cromatográficos se realizaron para muestras de un individuo de cada especie y compararon con los estándares disponibles. Las condiciones de la cámara se fijaron a una humedad relativa de 56% y temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, con una distancia de corrida de 70 mm en placas de 10×10 mm de altura. Al finalizar el desarrollo del cromatograma, la placa se observó bajo luz visible y luz UV a las longitudes de onda 254 y 366 nm, capturándose las imágenes correspondientes mediante el Visualizer CAMAG que permite obtener fotografías de alta resolución (Figs. 3.5 y 3.6). Posteriormente la imagen se corrigió mediante el software del equipo (VisionCats, versión 2.4) para la normalización del color, eliminación de fondo y captura de las densidades ópticas (Ram *et al.*, 2011).

El método, utilizando el sistema 1, permitió una muy buena separación de ABI's, incluyendo

la berberina (uno de los compuestos abundantes; Fig. 3.5). Algo similar se observó al emplear el sistema 2 con los alcaloides de mediana polaridad, como sanguinarina y queleritrina (Fig. 3.6). Cabe mencionar que los tiempos de saturación de la cámara cromatográfica oscilaron entre 15 y 20 minutos y el resultado en la placa es variable según la naturaleza de cada muestra, razón por la cual cada carril fue analizado individualmente.

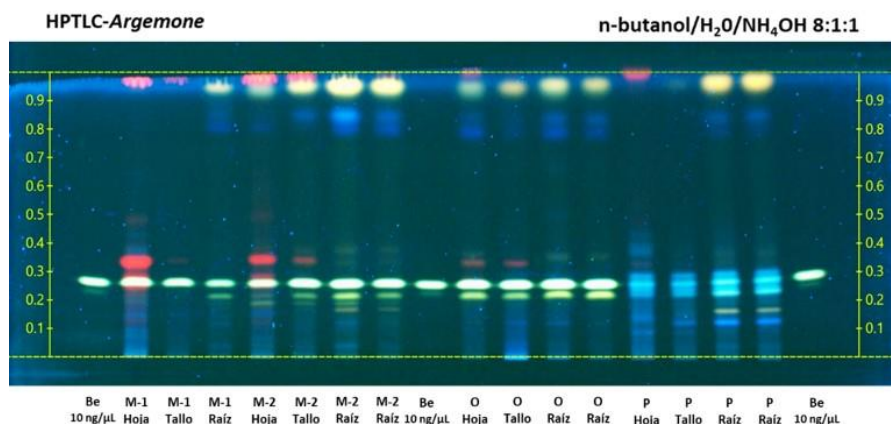


Figura 3.5 Placa cromatográfica obtenida por CCF-AR para el desarrollo de perfiles de alcaloides de alta polaridad en extractos de hoja, tallo y raíz de dos poblaciones de *A. mexicana* (M-1 y M-2), *A. ochroleuca* (O) y *A. platyceras* (P), placa bajo luz UV de 366 nm. Del estándar de berberina (Be) se aplicó un punto de 10 ng/μL. Mismas abreviaturas como en la Fig. 3.3.

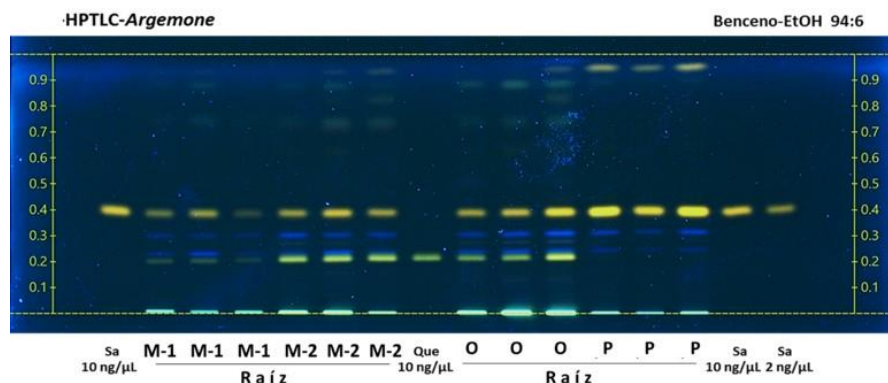


Figura 3.6 Placa cromatográfica obtenida por CCF-AR para el desarrollo de perfiles de alcaloides de mediana polaridad en extractos de raíces de las dos poblaciones de *A. mexicana* (M-1 y M-2), *A. ochroleuca* (O) y *A. platyceras* (P), placa bajo luz UV de 366 nm. Los estándares utilizados fueron sanguinarina (Sa) y queleritrina (Que) en concentraciones de 2 y 10 ng/μL. Mismas abreviaturas como en la Fig. 3.4.

De este modo, la separación de los alcaloides fue adecuada en ambos sistemas y los perfiles de bandas fueron similares a los obtenidos previamente con la cromatografía

convencional (CCF), generando los valores de R_f característicos para cada mancha de las muestras identificadas. El R_f de berberina fue de 0.40 en el sistema 1 y los de sanguinarina y queleritrina en el sistema 2 fueron de 0.40 y 0.20 respectivamente. La diferencia en los valores de R_f entre la cromatografía convencional y la de AR pueden deberse a la fase gaseosa de disolventes que se genera durante el tiempo de saturación en la cámara en desarrollo, ya que la cámara representa un sistema cerrado los compuestos son empujados por las moléculas del disolvente en desarrollo como por las moléculas del disolvente presentes en la fase gaseosa. También puede deberse a la naturaleza de la fase estacionaria (placas grado HPTLC) con un tamaño de partícula de aproximadamente $5\mu\text{m}$, lo que nos permitió obtener separaciones con menores distancias de migración (Reich y Schibli, 2006; Srivastava-ManMohan, 2011).

3.5 Obtención de perfiles cromatográficos de especies de *Argemone* por CCF-AR

Una vez que se logró la separación adecuada de los alcaloides más abundantes (berberina y sanguinarina) mediante el uso de ambos sistemas de disolventes, se obtuvieron los perfiles cromatográficos correspondientes a un individuo por cada especie. Para ello, se analizaron los carriles de las placas correspondientes, mediante un barrido en el densitómetro. Esto se hizo con el fin de detectar todas las bandas separadas en los diferentes sistemas utilizados. Cada banda representa, en principio un alcaloide diferente ya que sus valores de R_f difieren, presentan una fluorescencia característica y en la mayoría de los casos las bandas se resuelven completamente. En las figuras 3.7 y 3.8 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos en los sistemas de elución 1 y 2 respectivamente.

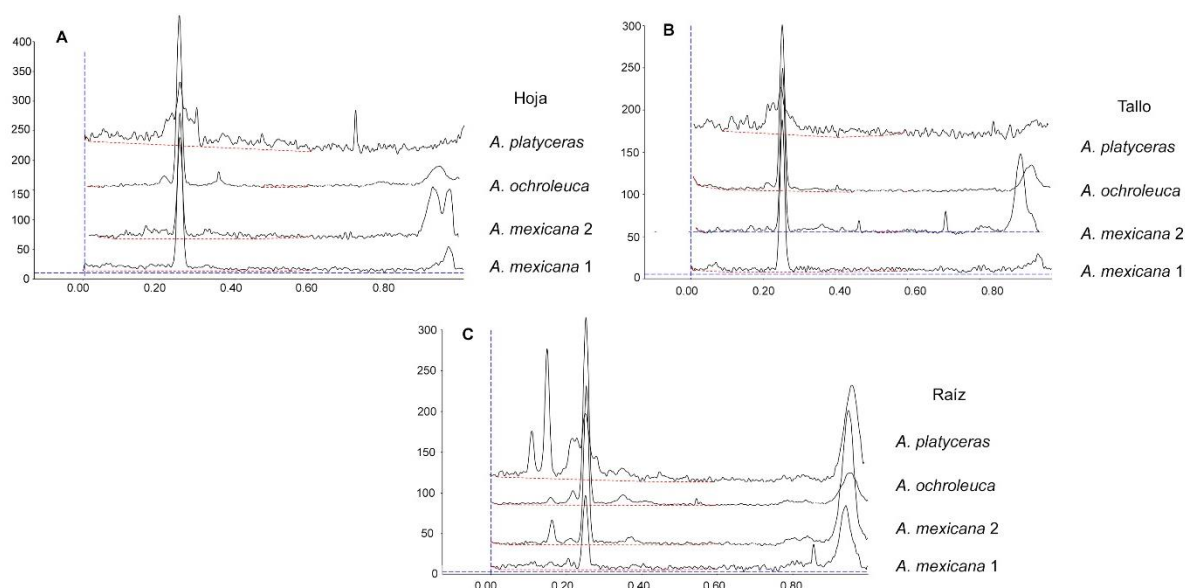


Figura 3.7 Perfiles cromatográficos obtenidos por CCF-AR para alcaloides de alta polaridad (sistema 1) presentes en especies de *Argemone*. Todos los carriles fueron leídos a una misma longitud de onda (330 nm). Extractos de hoja (A), tallo (B) y raíces (C).

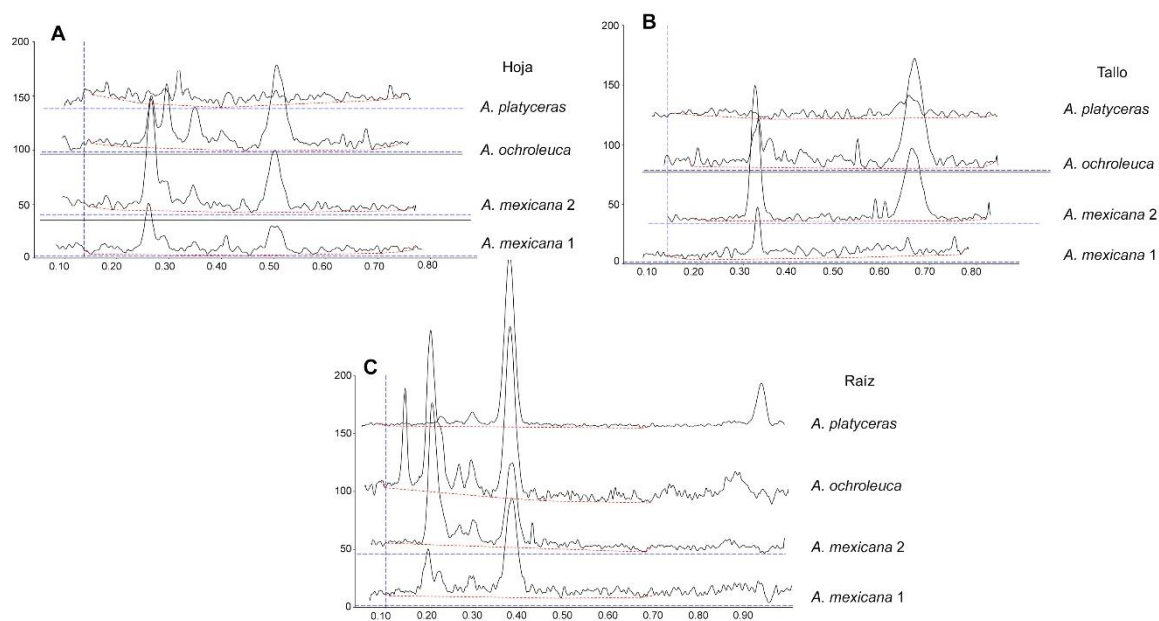


Figura 3.8 Perfiles cromatográficos obtenidos por CCFAR para alcaloides de mediana polaridad (sistema 2) presentes en especies de *Argemone*. Todos los carriles fueron leídos a una misma longitud de onda (330 nm). Extractos de hoja (A), tallo (B) y raíces (C).

Los perfiles cromatográficos que se obtuvieron por CCF-AR presentan ventajas sobre la CCF convencional ya que en el análisis, la aplicación de las muestras y el desarrollo de la cromatográfica es de forma automatizada, generando resultados más reproducibles; y con la detección visual con foto-documentación, además de que el software permite realizar una comparación del perfiles de cada muestra en la combinación que se desee (Sherma y Fried, 2003). La cantidad de fase móvil utilizada por muestra en CCF-AR resultò sustancialmente menor que por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) (Spoof *et al.*, 2010). Por otra parte, a diferencia de los datos obtenidos por CCF convencional pueden, los obtenidos por CCF-AR pueden ser altamente recomendables para fines de control de calidad de fitomedicamentos debido a que se desarrollaron bajo condiciones controladas por los equipos HPTLC CAMAG (Srivastava- ManMohan, 2011).

3.5.1 Análisis de perfiles cromatográficos resueltos por los sistemas 1 y 2

Los cuadros 3.2 y 3.3 presentan los analisis de perfiles cromatográficos en los sistemas 1 y 2, respectivamente. Es interesante notar que, utilizando el sistema 1, el mayor número de compuestos o bandas (Cuadro 3.2) se presentó en extractos de hojas de *A. mexicana* y de raíces de *A. platyceras*, de los cuales berberina es el compuesto más abundante (nótese la altura de los picos; Fig. 3.7). Por otro lado, en el sistema 2, hojas y tallos de *A. platyceras* mostraron no sólo el menor número de compuestos, sino en menores abundancias (Fig. 3.8; Cuadro 3.3).

Cuadro 3.2 Análisis de perfiles cromatográficos de extractos del género *Argemone* en el sistema 1. Be, berberina.

| Especie | Tejido | Bandas detectadas | Valores de <i>R_f</i> |
|----------------------|--------|-------------------|---|
| <i>A. mexicana</i> | Hoja | 6 | 0.16, 0.19, 0.21, 0.29 (Be), 0.45, 0.54 |
| | Tallo | 4 | 0.16, 0.23, 0.29 (Be), 0.45 |
| | Raíz | 5 | 0.16, 0.19, 0.23, 0.29 (Be), 0.45 |
| <i>A. ochroleuca</i> | Hoja | 4 | 0.16, 0.23, 0.29 (Be), 0.45 |
| | Tallo | 5 | 0.16, 0.23, 0.29 (Be), 0.45, 0.54 |
| | Raíz | 5 | 0.16, 0.21, 0.23, 0.29 (Be), 0.45 |
| <i>A. platyceras</i> | Hoja | 3 | 0.16, 0.19, 0.23 |
| | Tallo | 5 | 0.16, 0.19, 0.23, 0.45, 0.54 |
| | Raíz | 6 | 0.16, 0.19, 0.21, 0.23, 0.29 (Be), 0.45 |

Cuadro 3.3 Análisis de perfiles cromatográficos de extractos del género *Argemone* en el sistema 2. Que, queleritrina; Sa, sanguinarina.

| Especie | Tejido | Bandas detectadas | Valores de <i>Rf</i> |
|----------------------|--------|-------------------|--|
| <i>A. mexicana</i> | Hoja | 7 | 0.25 (Que), 0.28, 0.34, 0.38 (Sa), 0.46, 0.58, 0.80 |
| | Tallo | 4 | 0.25 (Que), 0.34, 0.38 (Sa), 0.90 (DhSa) |
| | Raíz | 7 | 0.25 (Que), 0.28, 0.31, 0.34, 0.38 (Sa), 0.46, 0.90 (DhSa) |
| <i>A. ochroleuca</i> | Hoja | 6 | 0.25 (Que), 0.28, 0.34, 0.38 (Sa), 0.58, 0.80 |
| | Tallo | 6 | 0.25 (Que), 0.28, 0.31, 0.34, 0.38 (Sa), 0.46 |
| | Raíz | 8 | 0.25 (Que), 0.28, 0.31, 0.34, 0.38 (Sa), 0.46, 0.58, 0.90 (DhSa) |
| <i>A. platyceras</i> | Hoja | 1 | 0.46 |
| | Tallo | 1 | 0.46 |
| | Raíz | 5 | 0.28, 0.31, 0.34, 0.38 (Sa), 0.90 (DhSa) |

3.5.2 Identificación de alcaloides totales en perfiles cromatográficos de especies de *Argemone*

Debido a que sólo se disponía de cuatro estándares de alcaloides (berberina, sanguinarina, dihidrosanguinarina y queleritrina) no fue posible aún asignar identidad a otros compuestos. Como un paso inicial hacia la identificación de los otros compuestos separados, las bandas observadas en cada sistema de elución se clasificaron de acuerdo a sus valores de *Rf* y propiedades fluorescentes, así mismo y se enumeraron por orden de elución en figuras animadas en las que el tamaño de la mancha indica la abundancia del alcaloide (Figs. 3.9 y 3.10).

En el sistema 1, que presenta los alcaloides más polares, se detectaron un total de siete bandas con fluorescencias en tonos azules, verdes y amarillas (Fig. 3.5). Estas bandas se etiquetaron C1 a C7, en donde la berberina se observa con una fluorescencia verde, a *Rf* 0.29 y correspondiendo al compuesto 5 (C5). En el sistema 2 se detectaron nuevas bandas con tonos amarillos y azules (Fig. 3.6) y que fueron enumeradas de C8 a C16. Queleritrina, sanguinarina y dihidrosanguinarina, presentando fluorescencias naranjas y amarillas, correspondieron a C8, C12 y C16, con valores de *Rf* de 0.25, 0.38 y 0.90, respectivamente (Fig. 3.10).

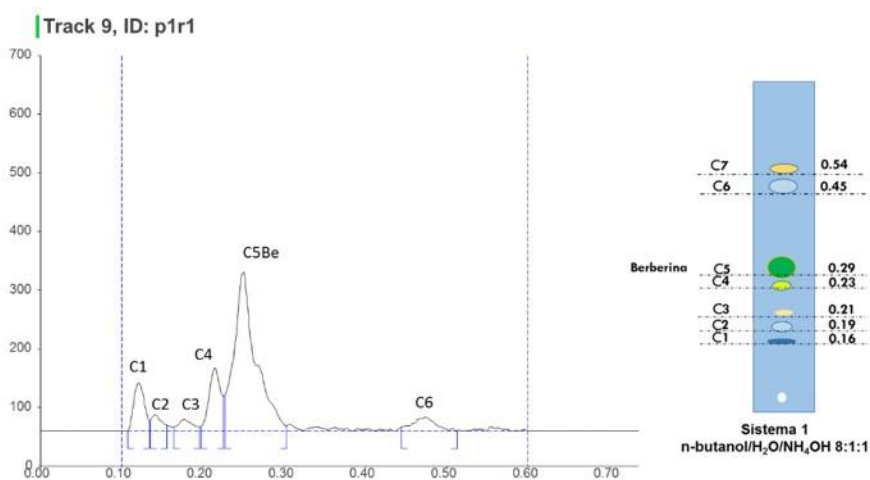


Figura 3.9 Cromatograma de extracto de raíz de *A. platyceras* que muestra la identificación por fluorescencia de compuestos presentes en el Sistema 1 de elución. A la derecha se presenta el perfil animado por CCF que marca el número de compuesto de acuerdo a su orden de elución en la placa y sus valores de *Rf*.

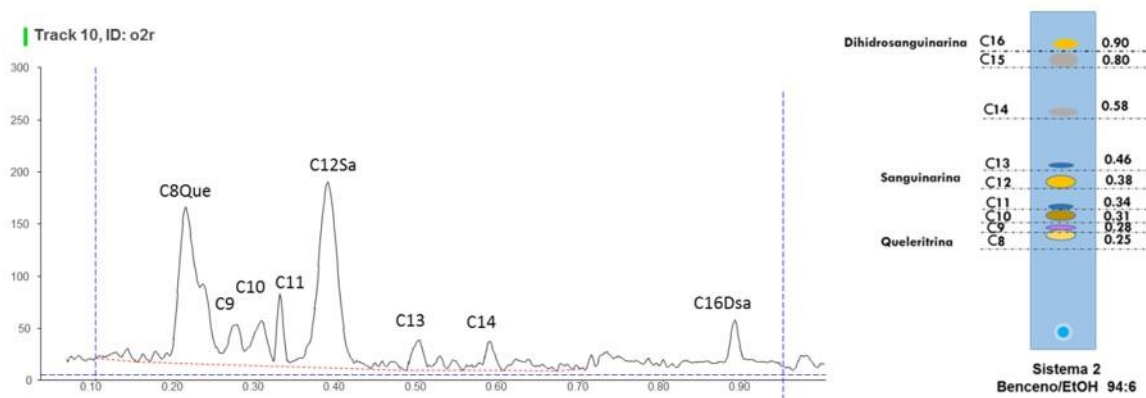


Figura 3.10 Cromatograma de extracto de raíz de *A. ochroleuca* que muestra la identificación por fluorescencia de compuestos presentes en el sistema 2 de elución. A la derecha se presenta el perfil animado por CCF que marca el número de compuesto de acuerdo a su orden de elución en la placa y sus valores de *Rf*.

Un análisis de las distribuciones tisulares de los 16 presuntos alcaloides en las tres especies (Fig. 3.11) reveló que las mayores coincidencias ocurrieron en la hojas y tallos de *A. mexicana* y *A. ochroleuca*, que compartieron ocho y siete compuestos, respectivamente. Por otro lado, la raíces de las tres especies compartieron un total de nueve compuestos.

En este análisis se puede observar (Fig. 3.11) que no ocurrieron alcaloides exclusivos en ninguna de las tres especie. Las diferencias ocurren en las distribuciones en los tejidos. Por ejemplo, la parte aérea de *A. platyceras* solamente comparte cuatro compuestos que aún no han sido identificados (C1, C4, C6 y C13) con las otras dos especies. Sin embargo, las partes aéreas de *A. mexicana* y *A. ochroleuca* mostraron una mayor similitud, ya que comparten los compuestos: berberina (C5), queleritrina (C8), C9, C11, sanguinarina (C12), C14 y C15.

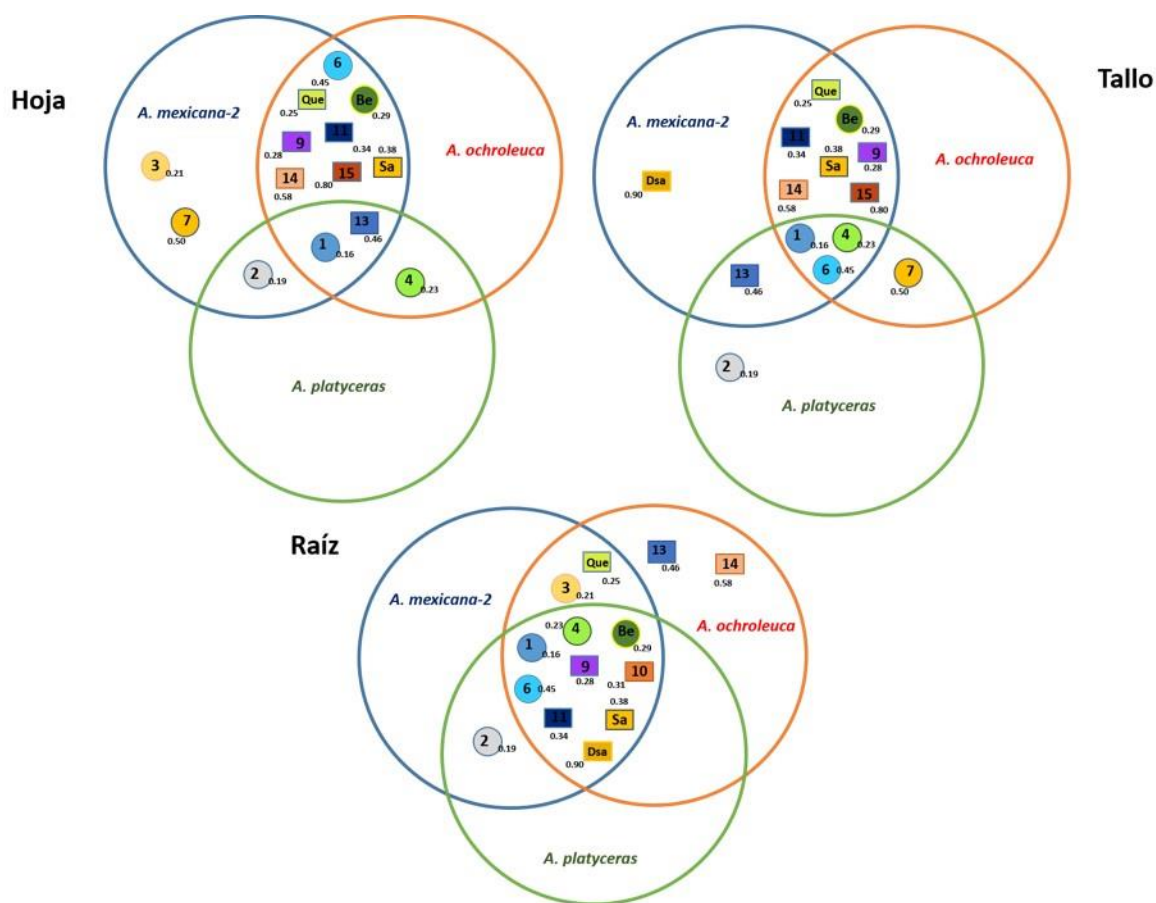


Figura 3.11 Distribución de los 16 presuntos alcaloides resueltos en los perfiles cromatográficos de hojas, tallos y raíces de especies de *Argemone*. Los compuestos del sistema de elución 1 se presentan en un círculo y los del sistema 2 en un cuadro. Los colores representan por lo general las características fluorescente de los compuestos. Que, queleritrina; Sa, sanguinarina; Dsa, dihidrosanguinarina; Be, berberina.

3.5.3. Distribución cuantitativa de berberina, sanguinarina, queleritrina y dihidrosanguinarina en los diferentes tejidos de *Argemone*

Como ya se mencionó, es posible asignar identidades a cuatro alcaloides; sanguinarina, berberina y queleritrina, para los que se cuenta con los estándares de referencia, así como dihidrosanguinarina, el cuál ha sido identificado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM; Guízar-González *et al.*, 2012). Dado que los volúmenes de extracto se equilibraron para representar 13 μg de peso seco de tejido, es posible establecer comparaciones sobre sus posibles abundancias. De este modo, en los perfiles de raíces, las señales detectadas para sanguinarina fueron muy similares entre sí (Fig. 3.12), sugiriendo similares contenidos. Este no fue el caso para la dihidrosanguinarina que, si bien se pudo observar en las tres especies, se detectaron picos con mayor intensidad en *A. platyceras*, seguida por *A. ochroleuca* y *A. mexicana* en porcentajes de 4 y 2% de lo observado en *A. platyceras*, respectivamente (Fig. 3.12).

Respecto a la berberina, que también se encontró en las tres especies, se detectó con mayor intensidad en *A. ochroleuca*, seguida por *A. mexicana* y *A. platyceras* en porcentajes de 40 y 3% de *A. ochroleuca*, respectivamente (Fig. 3.12). Queleritrina pudo detectarse en las raíces de *A. mexicana* y *A. ochroleuca*, siendo aparentemente el doble de abundante en *A. mexicana* (Fig. 3.12).

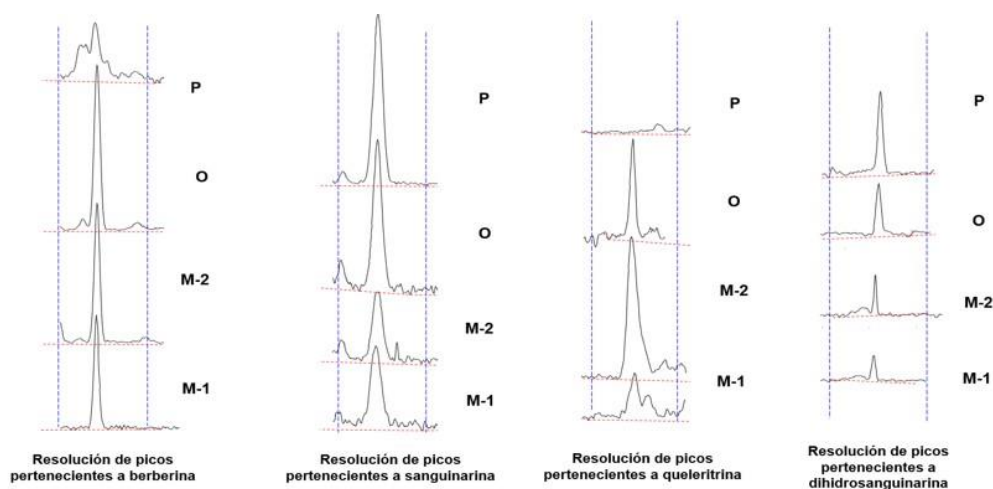


Figura 3.12. Intensidades de la señales detectadas en los perfiles de raíces de *Argemone* para berberina, sanguinarina, queleritrina y dihidrosanguinarina. M-1, *A. mexicana* población 1; M-2, *A. mexicana* población 2; O, *A. ochroleuca*; P, *A. platyceras*.

Como ya se indicó, en los tejidos aéreos (hojas y tallos), los perfiles obtenidos fueron cualitativamente muy similares entre *A. mexicana* y *A. ochroleuca*. No obstante, se notó una diferencia con respecto a queleritrina, cuya señal se detectó con mayor intensidad en tallos de *A. mexicana* que en los de *A. ochroleuca*, en los que fue unas cinco veces menor.

Con relación al alcaloide queleritrina, no se detectó en ninguno de los tres tejidos de *A. platyceras* (Fig. 3.12), sin embargo, es posible que se encuentre presente en otras etapas de desarrollo y no en la edad adulta de la planta (Atta-ur-Rahman, 1994). Por su parte, la berberina se pudo detectar en muy bajas cantidades y sólo en las raíces de esta especie.

En un estudio previo realizado en parte apigeal de plantas de cuatro especies de *Argemone* (*A. mexicana*, *A. alba*, *A. platyceras* y *A. híbrida*) se logró el aislamiento e identificación de 16 alcaloides (Israilov y Yunusov, 1986), entre los alcaloides aislados de *A. mexicana* y *A. platyceras* se encontraron sanguinarina, berberina y queleritrina (sólo para *A. mexicana*), también; protopina, α -alocriptopina, (S)-escoulerina, queilantifolina y reticulina, que estuvieron presentes en ambas especies. Los alcaloides magnoflorina, munitagina, platicerina, O-metilplaticerina y argemonina se aislaron solamente en *A. platyceras*. A partir de este análisis, es razonable sugerir que algunos de los alcaloides aislados en esta investigación puedan corresponder a algunos de los doce que aún no se han identificado en los perfiles cromatográficos.

3.6 Cuantificación de berberina y sanguinarina en especies de *Argemone* L.

La correcta separación de berberina y sanguinarina en los diferentes sistemas de disolventes permitió cuantificar sus contenidos. Para ello, se elaboraron curvas de calibración de 5 a 50 ng/ μ L para cada alcaloide. Para estos análisis se utilizaron extractos de plantas en estado maduro, con flores y frutos, en estos análisis.

3.6.1 Cuantificación de berberina en especies de *Argemone* L.

La berberina se cuantificó directamente en los extractos crudos, utilizando el sistema 1 (n-butanol/H₂O/NH₄OH 8:1:1 v/v). Bajo estas condiciones, la abundancia del alcaloide en los extractos de *A. mexicana* y *A. ochroleuca*, se obtuvieron que diluir entre dos y siete veces antes de las lecturas densitométricas de las placas (Fig. 3.13), no dejándolos fuera del límite

de cuantificación (3.9 ng/por punto; Estrada Alfaro, 2018). No obstante, los extractos de *A. platyceras* necesitaron ser concentrados, debido a su baja concentración.

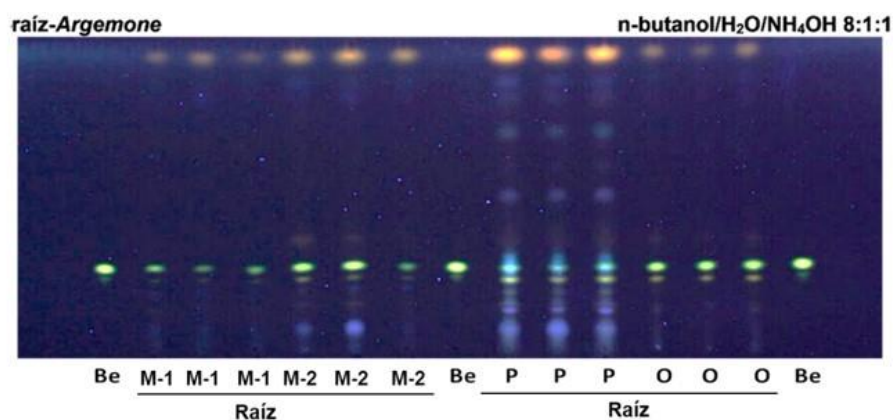


Figura 3.13 Análisis por CCF para la cuantificación de berberina en extractos alcaloidales de raíces en especies de *Argemone*, placa bajo luz UV de 366 nm. M-1 y M2, *A. mexicana* poblaciones 1 y 2, respectivamente (dilución 1: 2). P, *A. platyceras*; O, *A. ochroleuca* (dilución 1:7). Solo los extractos de *A. platyceras* se cargaron en 3 μ L. En los demás casos se cargó 1 μ L. Be, berberina (*R_f*: 0.29).

Es interesante notar que los contenidos de berberina en hojas y tallos de las dos poblaciones de *A. mexicana* fueron similares entre sí (aproximadamente entre de 1.4 y 1.0 mg/g PS para hojas y tallos, respectivamente (Fig. 3.14). Estos valores, resultaron también comparables con los observados en *A. ochroleuca*, mientras que el alcaloide no se pudo cuantificar en estos tejidos en *A. platyceras* (Fig. 3.14). Por su parte, las raíces mostraron diferencias más notables, encontrándose en las de *A. ochroleuca* los mayores contenidos, siendo cerca de tres veces superiores a los encontrados en *A. mexicana* (Fig. 3.13), mientras que en *A. platyceras* se observaron niveles muy bajos. Los valores observados en los tejidos de *A. mexicana* son similares a los reportados previamente (Monforte-González *et al.*, 2012; Xool-Tamayo *et al.*, 2017).

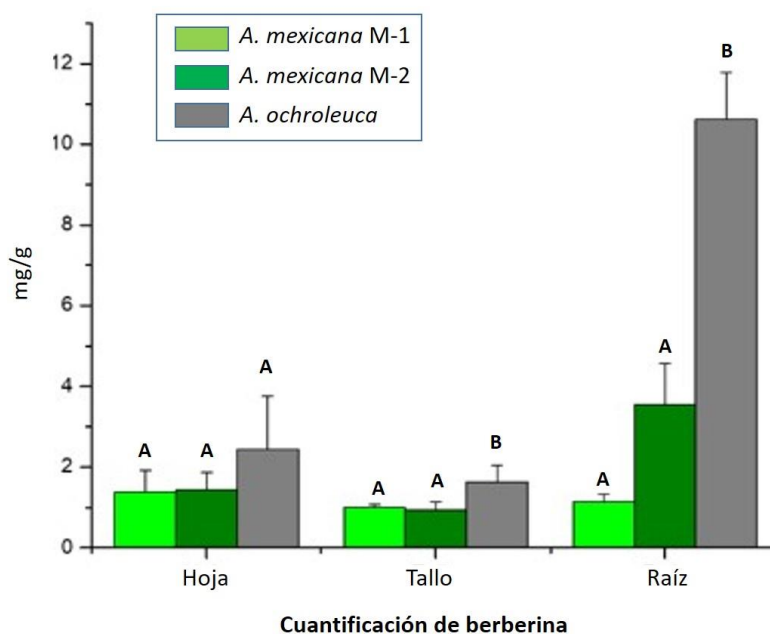


Figura 3.14 Cuantificación de berberina en raíces de *A. mexicana* y *A. ochroleuca*. Para *A. mexicana* se señala el número de población (M-1=población no.1, M-2= población no.2). Promedio de tres repeticiones con desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Los bajos contenidos de berberina observados en *A. platyceras* pueden estar relacionados con la etapa de desarrollo maduro. Con el fin de analizar si en etapas más tempranas se podría detectar este alcaloide, tejidos de plantas en etapas juveniles se incluyeron en los estudios tejidos de plantas en etapas juveniles (Fig. 3.15). Las plantas fueron colectadas y clasificadas en tres etapas (E1, E2, E3) dependiendo del grado de crecimiento observado y no dependiendo de la presencia de nuevas estructuras. Las plantas E1 son pequeñas, de 4 cm de raíz aproximadamente y 10 cm de altura, presentaron hojas verdaderas y raíces secundarias extendidas, mientras que las E2 y E3 presentaban raíces de aproximadamente 16 cm con hojas bien extendidas y alturas aproximadamente de 25 a 30 cm, las plantas E2 no presentaron aun elongación del tallo, mientras las E3 son plantas juveniles con crecimiento vegetativo y brotes. Al igual que en las plantas adultas, los contenidos de berberina en los tejidos aéreos se encontraron por debajo del límite de detección, pero en raíces de etapas más tempranas las cantidades fueron similares a las observadas en *A. mexicana* (2.0 mg/g PS). No obstante, estos contenidos disminuyeron notablemente en etapas posteriores (Fig. 3.16).

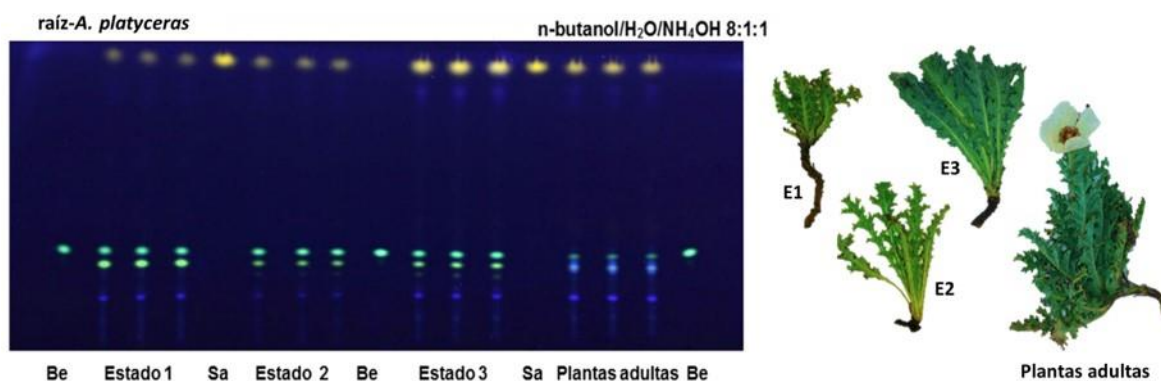


Figura 3.15 Análisis por CCF (izquierda) para la cuantificación de berberina en extractos alcaloidales de plantas de *A. platyceras* en diferentes etapas de desarrollo (derecha). Se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos de estados de desarrollo 1, 2, 3 y extractos de los tres individuos de plantas adultas, placa bajo luz UV a 366 nm. Todas las mezclas fueron desarrolladas una sola vez y cada carril fue cargado con un volumen de extracto de 1 μ L, sanguinarina (Sa, *Rf*: 0.95) y berberina (Be, *Rf*: 0.29).

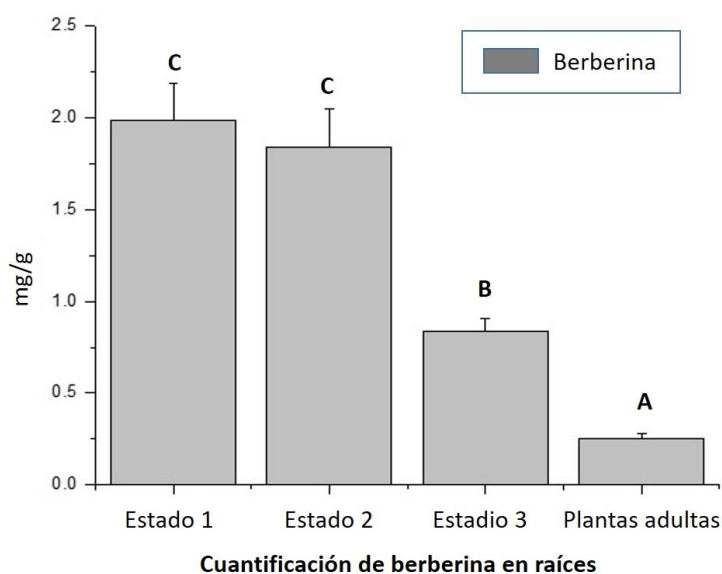


Figura 3.16 Cuantificación de berberina en raíces de *A. platyceras*. Promedio de tres repeticiones con desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Es importante remarcar la capacidad biosintética de *A. ochroleuca* ya que en otros trabajos se han demostrado la abundancia de berberina, no solo en sus raíces sino en la parte aérea, aportándole a la planta propiedades de actividad antimicrobiana y responsabilizando al alcaloide como el principio activo relajante de esta planta medicinal (Takker *et al* 1993; Sánchez *et al* 2008; Reyes *et al* 2011).

3.6.2 Cuantificación de sanguinarina en especies de *Argemone* L.

La presencia de sanguinarina en partes aéreas (tallos y hojas) fue cuantificable en las especies de *A. mexicana* y *A. ochroleuca*. En las poblaciones de *A. mexicana* se observó de manera inconsistente (Fig. 3.17 y Fig. 3.19). En este estudio, este alcaloide se pudo cuantificar en los tejidos de tallos y hojas de la población 2 de *A. mexicana* (Fig. 3.18). En tallos, los contenidos de sanguinarina fueron significativos, llegando a alcanzar cerca de un tercio de lo observado en las raíces. No obstante, en la población 1, este alcaloide sólo se pudo detectar en cantidades trazas, pero no en niveles superiores al límite de cuantificación (3.5 ng/por punto; Estrada Alfaro, 2018) en los tallos y hojas, mientras que en raíces alcanzó cantidades comparables a las de berberina (ligeramente menores de 1.0 mg/g PS). Esto indica que la presencia de sanguinarina en esta especie puede ocurrir bajo ciertas condiciones.

De acuerdo con lo que ya se tiene reportado para *A. mexicana*, la presencia de sanguinarina en los tejidos aéreos sólo se detecta en niveles cuantificables en etapas previas a la madurez (plántulas en desarrollo y etapas juveniles, antes de la floración; Xool-Tamayo *et al.*, 2017), ya que la capacidad de los tejidos aéreos para acumular este alcaloide disminuye hasta contener cantidades trazas, conforme la planta avanza de las etapas tempranas a las adultas. Los análisis obtenidos de sanguinarina en la población 1 de *A. mexicana* coincide con estos resultados (Xool-Tamayo *et al.*, 2017), ya que sólo se pudieron detectar cantidades trazas del alcaloide. Sin embargo, la inconsistencia observada en la población 2, puede relacionarse con la transición entre etapas juveniles y maduras. No obstante, aun con estas discrepancias, los valores de sanguinarina en la población 2 de *A. mexicana* no son significativos (siendo muy bajos, de 0 a 0.2 mg/g PS; Fig. 3.18) con los de la primera población.

Por su parte, en *A. ochroleuca* se observaron contenidos de sanguinarina significativos, en tanto hojas y tallos (Fig. 3.18), alcanzando valores cercanos al 20% de lo detectado en raíces, en donde se alcanzaron valores aproximados de 2.0 mg/g PS (Fig. 3.19). De este modo, las raíces de esta especie representan el tejido con la mayor capacidad de acumulación de alcaloides entre los estudiados ya que aun y cuando las raíces de *A. platyceras* mostraron una mayor acumulación de sanguinarina (Fig. 3.20), éstas

acumularon bajas cantidades de berberina, a diferencia de las de *A. ochroleuca* (Ver Fig. 3.19). Se debe mencionar que la queleritrina también pudo ser detectada en los tejidos aéreos de la población 2 de *A. mexicana* (M-2), pero no en los de *A. ochroleuca* o *A. platyceras* (Fig. 3.17).

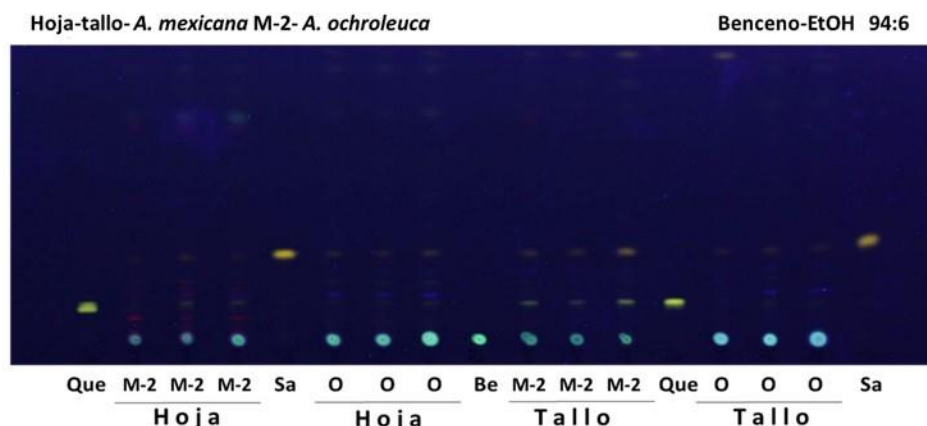


Figura 3.17 Análisis por CCF para la cuantificación de sanguinarina en extractos alcaloidales de hojas y tallos de *A. mexicana* 2 (M-2) y *A. ochroleuca*. El sistema de disolventes se encuentra indicado en el lado superior derecho de la placa. Todas las mezclas fueron desarrolladas una sola vez y cada carril fue cargado con un volumen de extracto de 1 μ L, los estándares utilizados fueron: sanguinarina (Sa, *Rf*: 0.38) y queleritrina (Que, *Rf*: 0.27).

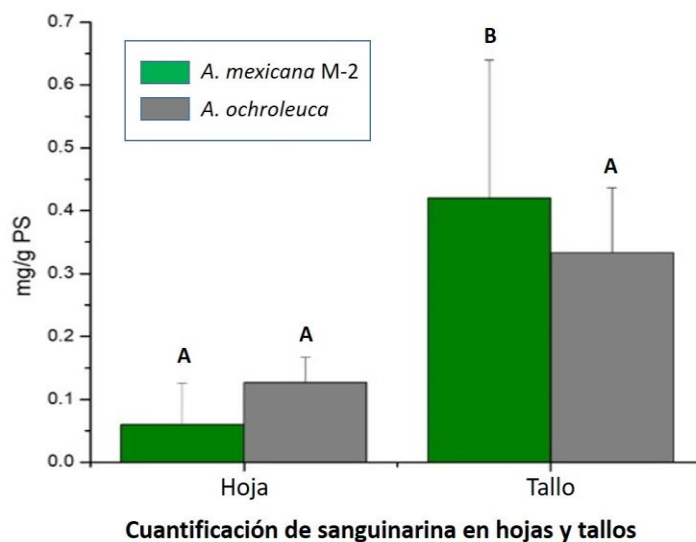


Figura 3.18 Cuantificación de sanguinarina en *A. mexicana* M-2 y *A. ochroleuca*. Se señalan los tejidos de hojas y tallos así como el número de población de *A. mexicana* (M-2=población no.2). Promedio de tres repeticiones con desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

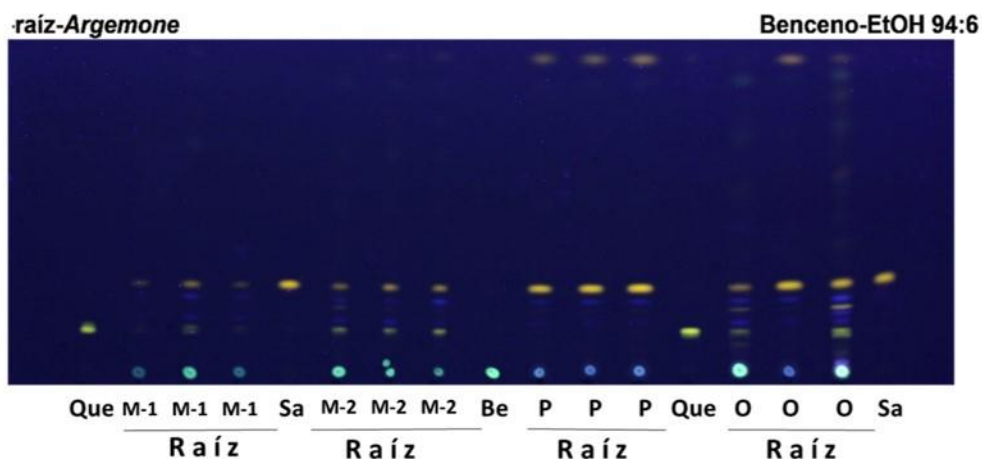


Figura 3.19 Análisis por CCF para la cuantificación de sanguinarina en extractos alcaloidales de raíces en especies de *Argemone*. Las claves de los extractos corresponden a los 3 individuos por especies. Todas las mezclas fueron desarrolladas una sola vez sin diluciones y cada carril fue cargado con un volumen de extracto de 1 μ L, los estándares utilizados fueron: sanguinarina (Sa, *Rf*: 0.38), queleritrina (Que, *Rf*: 0.27) y berberina Be, *Rf*: 0.00).

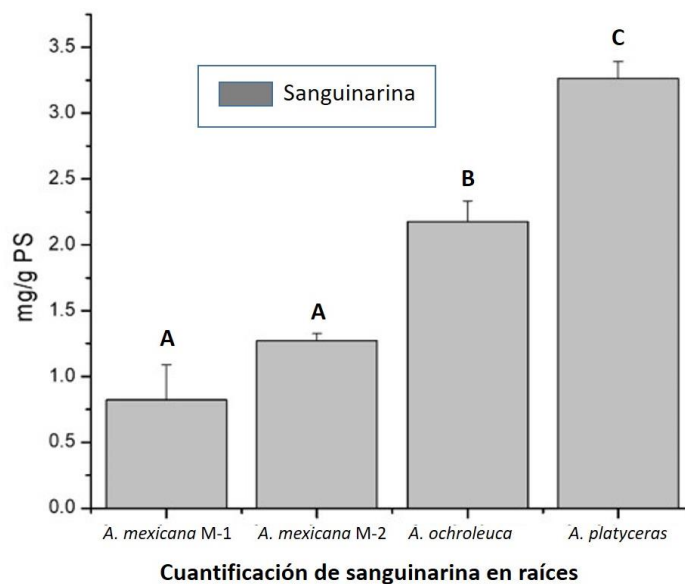


Figura 3.20 Cuantificación de sanguinarina en raíces de especies de *Argemone*. Se señala el número de población para cada especie (M-1, población 1; M-2, población 2). Promedio de tres repeticiones con desviación estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

3.7 Análisis quimiométrico de alcaloides presentes en especies de *Argemone*

La evaluación de los extractos alcaloidales se realizó por CCF empleando dos sistemas de disolventes. Las lecturas se realizaron por cada carril desde el punto de aplicación hasta el frente del disolvente, obteniendo cromatogramas completos a una longitud de onda de 330 nm. Las lecturas obtenidas para cada cromatograma se ajustaron respecto a la línea base y se generaron los reportes de áreas y alturas máximas de cada pico.

Se obtuvieron un total de 108 perfiles cromatográficos (considerando tres repeticiones, tres tejidos, tres individuos y cuatro especies/poblaciones) en cada sistema de elución. El total de bandas cromatográficas observadas de acuerdo con los valores de *Rf* fueron 16 (nueve observadas en el sistema 1 y siete en sistema 2). Se registró la altura de las señales cromatográficas para cada banda (Fig. 3.21), y las lecturas se organizaron en tablas para su análisis multivariado, obteniendo de esta manera una matriz de datos constituida por 108 filas y 16 columnas (ver apéndice 1).

El objetivo de realizar un análisis multivariado fue para reducir la dimensionalidad de los datos químicos y observar las posibles relaciones entre individuos de cada especie. Como resultado es posible proponer las causas de las diferencias entre ellos en términos de su diversidad alcaloidal.

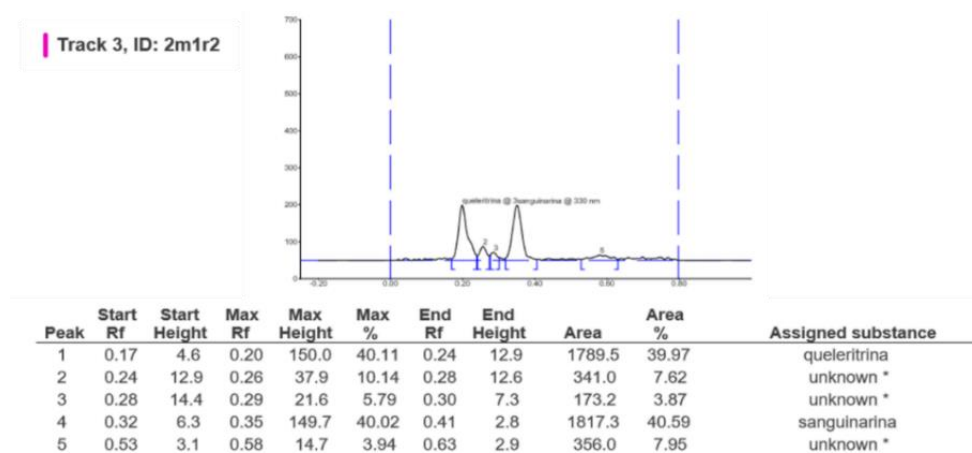


Figura 3.21 Obtención de valores de alturas de picos de perfiles cromatográficos. Las matrices de datos fueron construidas con los valores de altura máxima de los picos correspondientes a los alcaloides.

Existen reportes de datos cromatográficos obtenidos por CCF-AR, que ya han sido evaluados con diversos métodos quimiométricos. De este modo, se han logrado evaluar productos herbolarios con matrices de datos construidas con las alturas de las zonas máximas de picos a valores de R_f específicos usados como variables de entrada (Bhardwaj *et al.*, 2015; Ristivojević *et al.*, 2016). Las herramientas multivariadas utilizadas generalmente son Análisis de Componentes Principales (PCA), Análisis de Regresión de Mínimos Cuadrados (PLS) y Análisis de conglomerados. En un trabajo realizado en extractos metanólicos de *Morus alba* (Chaita *et al.*, 2017), se identificaron 23 bandas. Para generar una matriz de datos, los cromatogramas fueron divididos en intervalos y los valores de R_f fueron complementados con sus correspondientes intensidades de absorción. Usando PLS, las alturas de las bandas fueron correlacionadas para el rastreo de inhibidores de tirosinasa en el extracto de *M. alba*. También, se ha reportado un análisis quimiométrico de 119 aceites vegetales (Skrbić *et al.*, 2015), entre ellos el aceite de las semillas de *A. mexicana*. La aplicación de análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) y PCA señaló que el aceite de las semillas de *A. mexicana* pudiera representar una materia prima adecuada para la elaboración de biodiesel. Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado estudios quimiométricos de alcaloides para el género *Argemone*. Por lo cual de estos trabajos mencionados se han tomado estrategias para los análisis quimiométricos realizados a partir de los trabajos mencionados.

En este análisis quimiométrico se desarrollaron análisis de componentes principales (PCA) y análisis de conglomerados. Los programas estadísticos utilizados para el desarrollarlo de las técnicas multivariadas fueron Infostat versión 16-04-2015 y Minitab 18. Para la matriz de datos se usó el programa Microsoft Office Excel 2007.

3.7.1 Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de conglomerados de compuestos detectados en especies de *Argemone*

La matriz de datos utilizada para el desarrollo de PCA se muestra en el Apéndice 1. Para el análisis se emplearon los datos estandarizados (cada variable a media 0 y varianza 1), de esta manera, las variables (diferentes tejidos, especie/población) tuvieron el mismo peso en el análisis y en la reducción de los datos se observaron correlaciones.

Además del diagrama del PCA obtenido (Fig. 3.23), se muestran los autovalores que acompañan a cada componente principal (CP), los autovectores y los coeficientes o peso de cada variable (Fig. 3.22). El PC1 fue la componente principal con mayor autovalor explicando el 34.6% de la variabilidad total de los datos y el PC2 el 16.8%. En el diagrama de PCA (Fig. 3.23) los dos primeros componentes principales explicaron el 51.4% de la variabilidad total de los datos. El coeficiente de determinación o correlación cofenética fue de (R^2) 0.892, lo que significa que los resultados obtenidos para la predicción de regresión lineal indican un buen método predictivo y estadísticamente una buena calidad del modelo para tener resultados reproducibles.

Análisis de componentes principales

Datos estandarizados
Casos leídos 108
Casos omitidos 1

Variables de clasificación

Muestra
Caso

Matriz de correlación/Coefficientes

| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5Be | C6 | C7 | C8Que | C9 | C10 | C11 | C12Sa | C13 | C14 | C15 | C16 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| C1 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| C2 | -0.04 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| C3 | 0.41 | -0.09 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | |
| C4 | -0.03 | -0.11 | 0.19 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| C5Be | 0.47 | 0.56 | 0.25 | 0.17 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| C6 | 0.47 | -0.12 | 0.38 | 0.16 | 0.08 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| C7 | 0.10 | -0.17 | -0.12 | 0.06 | -0.16 | 0.69 | 1.00 | | | | | | | | | |
| C8Que | -0.12 | 0.39 | -0.05 | 0.21 | 0.30 | -0.08 | -0.22 | 1.00 | | | | | | | | |
| C9 | 0.30 | 0.26 | 0.35 | 0.58 | 0.46 | 0.21 | -0.30 | 0.46 | 1.00 | | | | | | | |
| C10 | 0.26 | -0.05 | 0.45 | 0.64 | 0.28 | 0.07 | -0.22 | 0.23 | 0.60 | 1.00 | | | | | | |
| C11 | 0.15 | 0.21 | 0.34 | 0.57 | 0.44 | 0.21 | -0.25 | 0.53 | 0.88 | 0.63 | 1.00 | | | | | |
| C12Sa | 0.51 | 0.13 | 0.75 | 0.29 | 0.46 | 0.43 | -0.23 | 0.21 | 0.74 | 0.55 | 0.69 | 1.00 | | | | |
| C13 | -0.19 | 0.27 | -0.11 | -0.19 | 0.15 | -0.06 | -0.20 | 0.42 | 0.18 | 0.09 | 0.27 | 0.17 | 1.00 | | | |
| C14 | 0.09 | -0.07 | 0.28 | 0.68 | 0.14 | 0.08 | -0.22 | 0.40 | 0.73 | 0.74 | 0.76 | 0.46 | 0.18 | 1.00 | | |
| C15 | -0.13 | -0.07 | -0.04 | -0.09 | -0.14 | -0.10 | -0.08 | -0.07 | -0.06 | -0.09 | -0.09 | -0.08 | -0.07 | -0.06 | 1.00 | |
| C16 | 0.54 | -0.12 | 0.67 | 0.15 | 0.21 | 0.45 | -0.13 | -0.06 | 0.56 | 0.25 | 0.40 | 0.82 | -0.13 | 0.14 | -0.05 | 1.00 |

Autovalores

| Lambda | Valor | Proporción | Prop Acum |
|--------|-------|------------|-----------|
| 1 | 5.53 | 0.35 | 0.35 |
| 2 | 2.69 | 0.17 | 0.51 |
| 3 | 1.85 | 0.12 | 0.63 |
| 4 | 1.46 | 0.09 | 0.72 |
| 5 | 1.03 | 0.06 | 0.79 |
| 6 | 0.94 | 0.06 | 0.84 |
| 7 | 0.65 | 0.04 | 0.89 |
| 8 | 0.55 | 0.03 | 0.92 |
| 9 | 0.44 | 0.03 | 0.95 |
| 10 | 0.30 | 0.02 | 0.97 |
| 11 | 0.22 | 0.01 | 0.98 |
| 12 | 0.15 | 0.01 | 0.99 |
| 13 | 0.07 | 4.3E-03 | 0.99 |
| 14 | 0.05 | 3.2E-03 | 1.00 |
| 15 | 0.04 | 2.3E-03 | 1.00 |
| 16 | 0.02 | 1.2E-03 | 1.00 |

Autovectores

| Variables | e1 | e2 |
|-----------|-------|-------|
| C1 | 0.19 | 0.35 |
| C2 | 0.07 | -0.28 |
| C3 | 0.26 | 0.29 |
| C4 | 0.25 | -0.05 |
| C5Be | 0.23 | -0.08 |
| C6 | 0.14 | 0.41 |
| C7 | -0.10 | 0.31 |
| C8Que | 0.18 | -0.38 |
| C9 | 0.39 | -0.11 |
| C10 | 0.32 | -0.06 |
| C11 | 0.37 | -0.16 |
| C12Sa | 0.38 | 0.15 |
| C13 | 0.07 | -0.31 |
| C14 | 0.31 | -0.17 |
| C15 | -0.06 | -0.02 |
| C16 | 0.27 | 0.33 |

Correlaciones con las variables originales

| Variables | CP 1 | CP 2 |
|-----------|-------|-------|
| C1 | 0.45 | 0.58 |
| C2 | 0.17 | -0.46 |
| C3 | 0.62 | 0.47 |
| C4 | 0.59 | -0.09 |
| C5Be | 0.54 | -0.13 |
| C6 | 0.33 | 0.68 |
| C7 | -0.24 | 0.52 |
| C8Que | 0.42 | -0.62 |
| C9 | 0.91 | -0.17 |
| C10 | 0.75 | -0.10 |
| C11 | 0.88 | -0.26 |
| C12Sa | 0.88 | 0.25 |
| C13 | 0.17 | -0.52 |
| C14 | 0.74 | -0.28 |
| C15 | -0.14 | -0.03 |
| C16 | 0.63 | 0.54 |

Correlación cofenética= 0.892

Figura 3.22 Coeficientes de autovalores y autovectores obtenidos a partir del Análisis de Componentes Principales sobre la matriz de correlación de variables presentes en especies de *Argemone*. Compuestos marcados desde C1 hasta C16.

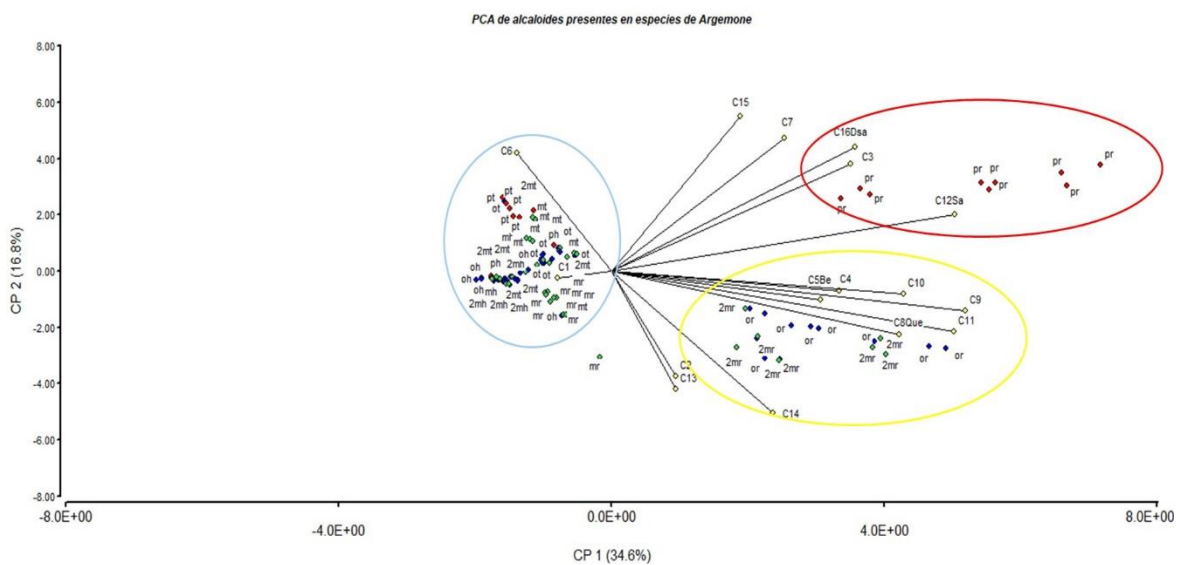


Figura 3.23 Diagrama de PCA obtenido a partir de datos estandarizados de variables presentes en especies de *Argemone*. Compuestos marcados desde C1 hasta C16; tejidos: hoja (h), tallo (t), raíz(r); en individuos de *A. mexicana* población 1 (m-h, -t, -r) y población 2 (2m-h, -t, -r); *A. ochroleuca* (o-h, -t, -r), y *A. platyceras* (p-h, -t, -r). Ver detalles de la nomenclatura en Materiales y Métodos.

En el diagrama de PCA (Fig. 3.23) se pueden observar los 16 alcaloides detectados repartidos espacialmente en tres grupos naturales. Un grupo formado contiene generalmente los perfiles de individuos de hojas y tallos de las tres especies (círculo azul), correlacionados principalmente con los compuestos C1 y C6, estos dos compuestos son característicos principalmente en los perfiles de la parte aérea de las especies. Es posible deducir que los perfiles de partes aéreas son similares.

Con respecto a los perfiles de raíces, se han dividido en dos grupos. Los perfiles de raíces de *A. platyceras* se agruparon de manera independiente en un grupo (círculo rojo), siendo un indicador de que existen diferencias químicas en sus perfiles comparados con raíces de las otras especies. Los alcaloides espacialmente más cercanos entre los individuos son C3, sanguinarina (C12) y dihidrosanguinarina (C16). Esto es congruente con los reportes de áreas de sus cromatogramas, donde se obtuvo que del 100 % del área total de picos presentes en el cromatograma, el 83.5% corresponde a los picos de Sa y Be.

El tercer grupo está formado con los perfiles de raíces de *A. ochroleuca* y de *A. mexicana* (círculo amarillo), lo que nos indica que la composición de alcaloides es muy similar entre estas especies, posiblemente por la presencia de sus alcaloides mayoritarios (berberina y

queleritrina).

Para continuar con el análisis quimiométrico, se realizó un análisis de conglomerados con el propósito de observar posibles relaciones (mediante enlaces) de los perfiles cromatográficos de las especies. Las asociaciones se muestran en un dendograma que considera el nivel de similitud. Para realizar este análisis, se utilizó la misma matriz de datos anteriormente descrita (Apéndice 1); (Fig. 3. 22). Se eligió como técnica un método jerárquico aglomerativo (Uriel y Manzano, 2002) y se realizó el agrupamiento de todos los individuos en un sólo conglomerado. Para la medida de asociación se utilizó la distancia promedio. En la figura 3.24 se aprecia el dendograma en forma de árbol de variables presentes en especies de *Argemone*.

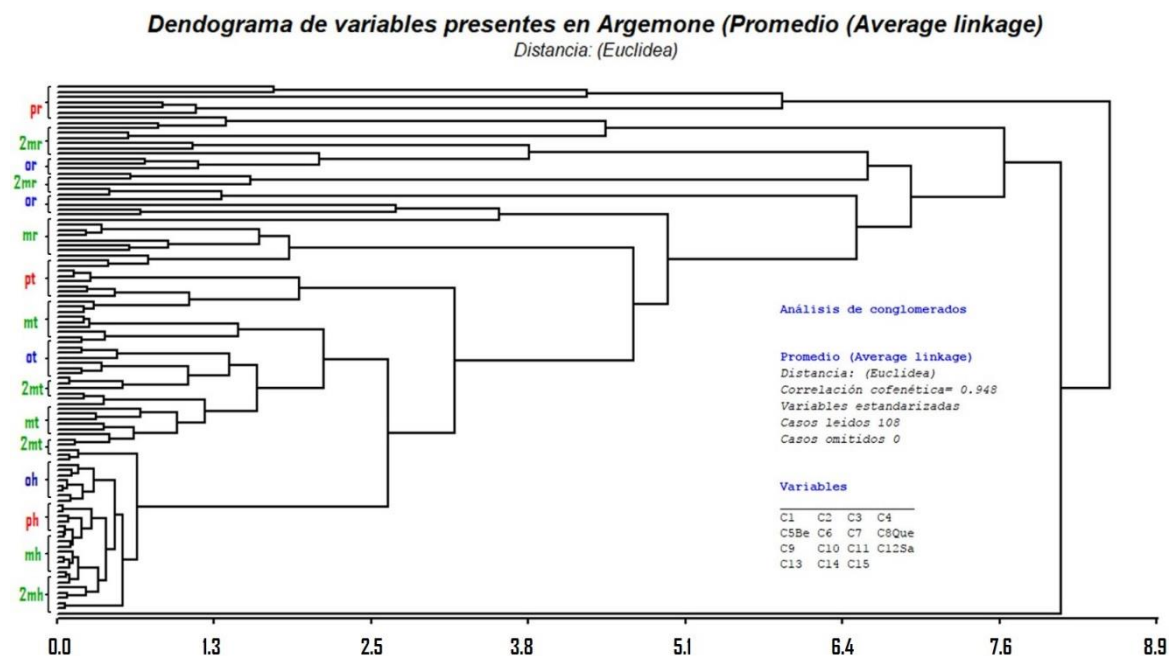


Figura 3.24 Dendograma que resume gráficamente el agrupamiento de las poblaciones en especies de *Argemone*. Compuestos marcados desde C1 hasta C16; en tejidos de hoja (h), tallo (t) y raíz (r); en individuos de *A. mexicana* población 1 (m-h, -t, -r) y 2 (2m-h, -t, -r); *A. ochroleuca* (o-h, -t, -r) y *A. platyceras* (p-h, -t, -r). Ver detalles de la nomenclatura en Materiales y Métodos.

En el dendograma (Fig. 3.24), se puede visualizar la alta similitud entre individuos de las especies en los perfiles de hojas, en tallos y raíces la similitud disminuye al aumentar la distancia en la escala. Las observaciones más distantes (por incorporarse al final del dendograma) son de los perfiles de raíces de los individuos de *A. platyceras* (distancia 8.1) en conjunto con perfiles de raíces de individuos de *A. mexicana* 2 (con un punto de unión a

una distancia de 7.6). Por el contrario, las observaciones más cercanas son entre los perfiles de hojas de las tres especies de *Argemone* (distancia 0.8), quedando reflejada la formación de un conglomerado entre ellas, lo que significa que existe mayor similitud química y homogeneidad en este grupo. En los perfiles de tallos y raíces no se observó un conglomerado definido.

Los resultados de PCA y del análisis de conglomerados permiten ver perfiles con características similares, con vectores de datos similares, marcándose unos cerca de otros en el espacio definido por las variables (diversidad alcaloidal). Los 16 alcaloides detectados permiten ver la segregación de las tres especies de *Argemone* y las diferencias entre los grupos resultantes son ahora aparentes. Así, la diversidad de alcaloides en plantas adultas de las especies estudiadas está determinada por el tejido. Al comparar los perfiles de hojas y tallos, se pueden observar que son muy semejantes principalmente por presentar un menor número de alcaloides en sus perfiles y un menor contenido de los mismos en comparación con la intensidad de picos de sanguinarina y berberina y cercanos a sus límites de detección; 1.06 ng y 1.19, respectivamente (Estrada Alfaro, 2018). Por otro lado, al comparar los perfiles de raíces, un grupo está definido (entre *A. mexicana* y *A. ochroleuca*) por presentar un mayor número de alcaloides en sus perfiles y mayor contenido de los mismos, mientras que el segundo grupo, a diferencia del primero (por *A. platyceras*) presenta un número menor de compuestos pero en mayores contenidos.

3.7.2 PCA y Análisis de conglomerados de compuestos detectados en raíces de especies de *Argemone*

Para analizar con más detalle las correlaciones existentes entre individuos de las especies en los perfiles de raíces, se realizó un análisis de PCA, la matriz de datos (Apéndice 1, Sección 1.2) fue diseñada con las alturas de los picos correspondientes a compuestos presentes en cromatogramas de raíces de los individuos de *Argemone*. El diagrama del PCA obtenido se presenta en la figura 3.26 y en la figura 3.25 se presentan las tablas de los autovalores que acompañan a cada componente principal (CP), los autovectores y los coeficientes o peso de cada variable. El PC1 explica el 37.7% de la variabilidad total de los datos y el PC2 el 21%. En el diagrama de PCA (Fig. 3.26) los dos primeros componentes principales explicaron el 58.7% de la variabilidad total de los datos. El coeficiente de

determinación o correlación cofenética fue de (R^2) 0.823, lo que significa que el modelo resultante es un predictor significativo para la abundancia de alcaloides.

Análisis de componentes principales

Datos estandarizados

Casos leídos 36

Casos omitidos 0

Variables de clasificación

Muestra

Matriz de correlación/Coefficientes

| | C1 | C2 | C3 | C4 | CSBe | C6 | C7 | C8Que | C9 | C10 | C11 | C12Sa | C13 | C14 | C15 | C16 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| C1 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| C2 | 0.11 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| C3 | 0.52 | -0.19 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | |
| C4 | 0.02 | -0.23 | 0.13 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| CSBe | 0.25 | 0.87 | 0.17 | -0.03 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| C6 | 0.74 | -0.07 | 0.72 | -0.05 | 0.15 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| C7 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 | | | | | | | | | |
| C8Que | -0.25 | 0.57 | -0.43 | -0.01 | 0.37 | -0.10 | 0.00 | 1.00 | | | | | | | | |
| C9 | 0.47 | 0.22 | 0.20 | 0.60 | 0.31 | 0.50 | 0.00 | 0.41 | 1.00 | | | | | | | |
| C10 | 0.44 | -0.26 | 0.34 | 0.53 | -0.08 | 0.13 | 0.00 | -0.23 | 0.26 | 1.00 | | | | | | |
| C11 | 0.20 | 0.11 | 0.20 | 0.49 | 0.26 | 0.45 | 0.00 | 0.53 | 0.78 | 0.31 | 1.00 | | | | | |
| C12Sa | 0.75 | -0.01 | 0.82 | 0.10 | 0.33 | 0.90 | 0.00 | -0.25 | 0.45 | 0.27 | 0.41 | 1.00 | | | | |
| C13 | -0.39 | 0.16 | -0.43 | -0.76 | -0.19 | -0.21 | 0.00 | 0.38 | -0.47 | -0.50 | -0.28 | -0.44 | 1.00 | | | |
| C14 | 0.14 | -0.28 | 0.07 | 0.64 | -0.26 | 0.19 | 0.00 | 0.33 | 0.63 | 0.51 | 0.63 | 0.10 | -0.29 | 1.00 | | |
| C15 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.00 | |
| C16 | 0.61 | -0.24 | 0.72 | 0.17 | 0.06 | 0.75 | 0.00 | -0.51 | 0.36 | 0.09 | 0.19 | 0.80 | -0.53 | -0.08 | 0.00 | 1.00 |

Autovalores

| Lambda | Valor | Proporción | Prop Acum |
|--------|-------|------------|-----------|
| 1 | 5.27 | 0.38 | 0.38 |
| 2 | 2.94 | 0.21 | 0.59 |
| 3 | 2.60 | 0.19 | 0.77 |
| 4 | 1.30 | 0.09 | 0.86 |
| 5 | 0.83 | 0.06 | 0.92 |
| 6 | 0.54 | 0.04 | 0.96 |
| 7 | 0.24 | 0.02 | 0.98 |
| 8 | 0.13 | 0.01 | 0.99 |
| 9 | 0.06 | 4.5E-03 | 0.99 |
| 10 | 0.04 | 2.7E-03 | 1.00 |
| 11 | 0.03 | 2.0E-03 | 1.00 |
| 12 | 0.02 | 1.2E-03 | 1.00 |
| 13 | 0.01 | 5.9E-04 | 1.00 |
| 14 | 0.01 | 4.0E-04 | 1.00 |
| 15 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| 16 | 0.00 | 0.00 | 1.00 |

Autovectores

| Variables | e1 | e2 |
|-----------|-------|----------|
| C1 | 0.33 | -0.11 |
| C2 | -0.05 | 0.28 |
| C3 | 0.33 | -0.24 |
| C4 | 0.22 | 0.25 |
| CSBe | 0.10 | 0.20 |
| C6 | 0.35 | -0.11 |
| C7 | 0.00 | 0.00 |
| C8Que | -0.08 | 0.51 |
| C9 | 0.31 | 0.35 |
| C10 | 0.23 | 0.05 |
| C11 | 0.26 | 0.38 |
| C12Sa | 0.38 | -0.14 |
| C13 | -0.30 | -3.2E-03 |
| C14 | 0.19 | 0.33 |
| C15 | 0.00 | 0.00 |
| C16 | 0.33 | -0.27 |

Correlaciones con las variables originales

| Variables | CP 1 | CP 2 |
|-----------|---------|-------|
| C1 | 0.75 | -0.19 |
| C2 | -0.12 | 0.47 |
| C3 | 0.75 | -0.41 |
| C4 | 0.50 | 0.43 |
| CSBe | 0.22 | 0.35 |
| C6 | 0.80 | -0.19 |
| C7 | 6.6E-06 | 0.01 |
| C8Que | -0.19 | 0.87 |
| C9 | 0.71 | 0.60 |
| C10 | 0.53 | 0.09 |
| C11 | 0.59 | 0.66 |
| C12Sa | 0.87 | -0.24 |
| C13 | -0.70 | -0.01 |
| C14 | 0.43 | 0.57 |
| C15 | 0.00 | 0.00 |
| C16 | 0.77 | -0.47 |

Correlación cofenética= 0.823

Figura 3.25 Coeficientes de autovalores y autovectores obtenidos a partir del Análisis de Componentes Principales sobre la matriz de correlación de variables presentes en especies de *Argemone*. Compuestos marcados desde C1 hasta C16.

En el PCA obtenido para variables presentes en raíces, se observan dos grupos naturales (Fig. 3.26). Los individuos de *A. platyceras* se comportaron en función de dos compuestos destacados: sanguinarina y dihidrosanguinarina, esto está acorde a lo obtenido en las cuantificaciones, ya que *A. platyceras* tiene una alta producción de sanguinarina y no produce queleritrina en raíces. Los individuos de *A. mexicana* y *A. ochroleuca* se presentan muy cercanos en el espacio, lo que confirma la similitud de sus perfiles cromatográficos en raíces. Los individuos de *A. mexicana* correlacionaron con el mayor número de compuestos

detectados.

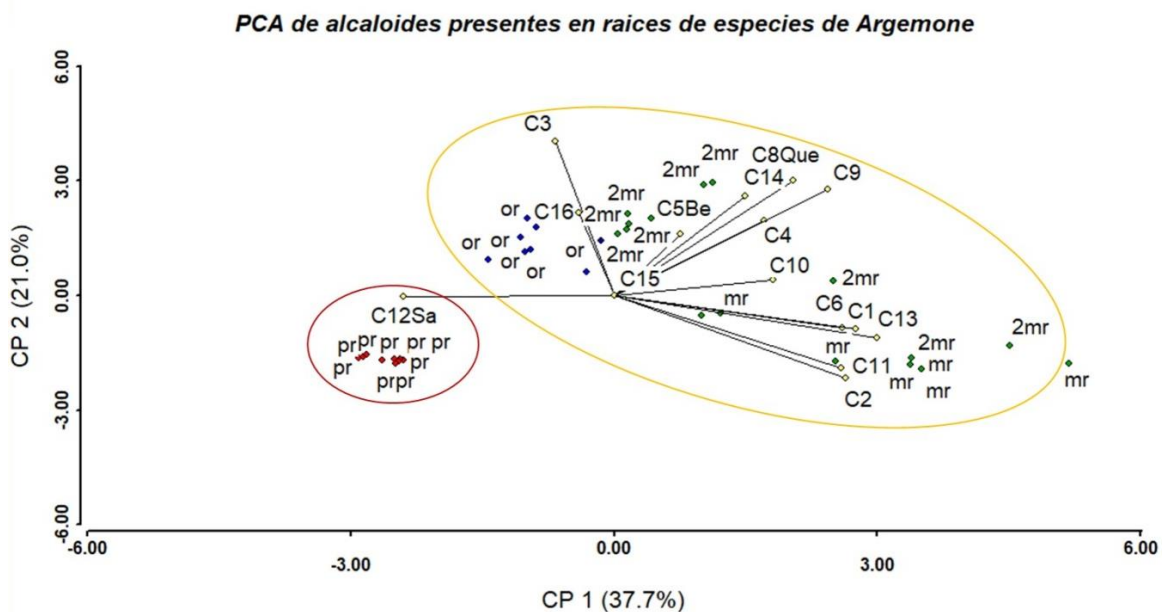


Figura 3.26 Diagrama de PCA obtenido a partir de datos estandarizados de variables presentes en raíces de especies de *Argemone*. Compuestos marcados desde C1 hasta C16; tejido: raíz (r); para individuos: mr, *A. mexicana* población 1; 2mr, *A. mexicana* población 2; or, *A. ochroleuca*; pr, *A. platyceras*.

En la figura 3.27 se presenta el análisis de conglomerados obtenido en raíces. El dendograma presenta a los individuos de ambas poblaciones de *A. mexicana* formando un bloque a una distancia de unión de 4.65, mientras tanto, la población de *A. ochroleuca* se une a este mismo bloque a una distancia de 5.28. Los últimos en unirse son los individuos de *A. platyceras* (a un punto de unión de 5.38), reflejando la formación de un único conglomerado. De esta manera, los perfiles de raíces con mayores diferencias son los de *A. platyceras* y *A. mexicana*.

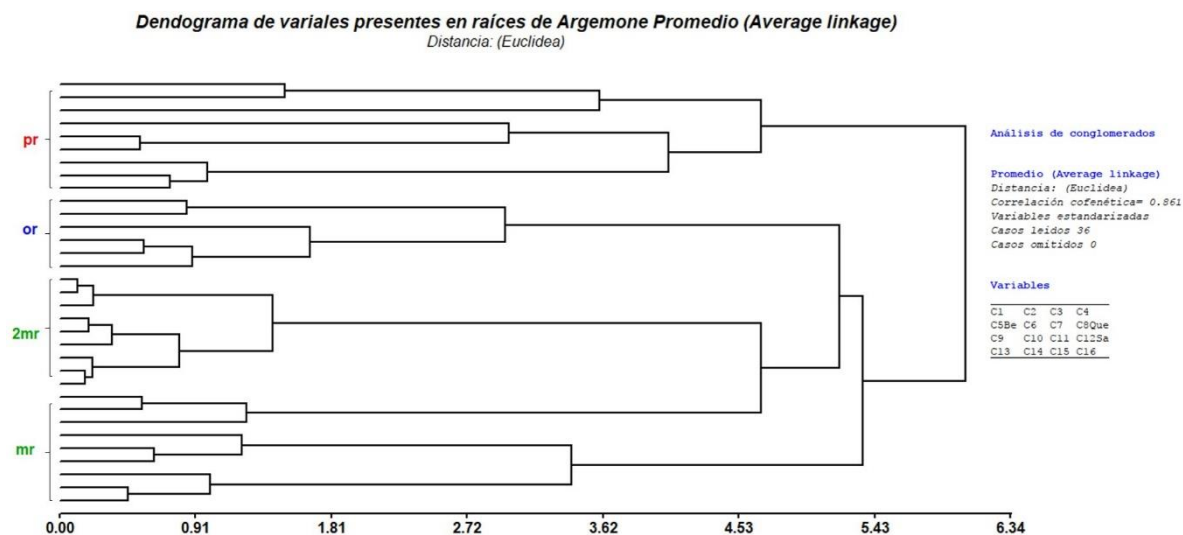


Figura 3.27 Dendrograma de raíz que resume gráficamente el agrupamiento de las poblaciones en especies de *Argemone*. Compuestos marcados desde C1 hasta C16; tejidos: raíz (r); para individuos: m (r), *A. mexicana* población 1; 2m (r), *A. mexicana* población 2; o (r), *A. ochroleuca*; p (r), *A. platyceras*.

Integrando los análisis realizados por PCA y conglomerados en perfiles de raíces, obtenemos que los datos para individuos de *A. platyceras* son bastante homogéneos y se separan de los individuos por la presencia marcada de sanguinarina en sus perfiles, mientras que la presencia de los demás compuestos influye en el agrupamiento de las poblaciones de *A. mexicana* y *A. ochroleuca*.

3.8 Análisis de la distribución y expresión relativa de genes involucrados en la síntesis de los ABI's en especies de *Argemone*

En paralelo con la distribución de los alcaloides sanguinarina y berberina en los diferentes tejidos de plantas adultas de las tres especies de *Argemone* y la distribución de berberina en estados tempranos de desarrollo de *A. platyceras*, se analizó la distribución de los transcritos correspondientes a genes específicos involucrados en su ruta biosintética. Este análisis se hizo con el fin de establecer si los tejidos en los que se acumulan los alcaloides corresponden con los de su posible síntesis. En estudios previos se han sugerido la posible existencia de mecanismos de transporte en *A. mexicana* (Xool-Tamayo *et al.*, 2017). No se incluyen análisis para *A. ochroleuca* ya que no se contó con material vegetal fresco.

En la primera parte de este análisis de genes, se determinó el nivel de participación de los diferentes tejidos en plantas adultas, los estudios se realizaron en hoja, tallo y raíz de *A. mexicana* y *A. platyceras*. En la segunda parte, se evaluó por primera vez, el comportamiento de genes específicos en los tres estados tempranos de desarrollo en *A. platyceras*, presentando de esta manera la mayor parte del ciclo de vida de esta planta. En el primer estado de desarrollo (E1), las plantas se caracterizaron por presentar hojas verdaderas y raíces secundarias extendidas (4 cm de raíz aproximadamente y 10 cm de altura). En el segundo estado (E2) las plantas no presentan elongación del tallo (raíces de aproximadamente 16 cm) y en el estado 3 (E3) las plantas son juveniles presentando elongación del tallo (de 25 a 30 cm de altura). La finalidad de este análisis en *A. platyceras* es conocer si el patrón de distribución de los alcaloides típicos de las plantas maduras se presenta desde los estados tempranos de desarrollo.

Se seleccionaron transcritos correspondientes a genes de la etapa temprana de síntesis, que son comunes tanto para berberina y sanguinarina, como (S)-norcoclaurina sintasa (NCS) y la enzima del puente de berberina (BBE); así como otros involucrados específicamente en la síntesis de berberina, la escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT) y la S-tetrahydroberberina oxidasa (STOX) y de sanguinarina, la dihidrobenzofenantridina oxidasa (DBOX), la S-estilopina sintasa (StySyn) y tetrahidroprotoberberina cis-N-metiltransferasa (TNMT) (ver Fig.3.28).

Los niveles de transcritos se monitorearon por RT-PCR, un tipo de análisis cualitativo que estima la abundancia relativa de los transcritos. Se partió de ARN extraído de tejidos de hoja, tallo y raíces de *A. mexicana* y *A. platyceras* (Fig. 3.29) y utilizando oligonucleótidos iniciadores (cebadores) específicos (Cuadro 3.4; Xool-Tamayo, 2016; Xool-Tamayo *et al.*, 2017; Vergara-Olivares, 2016), la actina fue amplificada como control positivo (testigo) en cada reacción. Por otro lado, dado que los iniciadores empleados están diseñados para secuencias de *A. mexicana*, los productos obtenidos a partir de *A. platyceras* se compararon con éstas para poder asignar su posible identidad. Los análisis revelaron porcentajes significativos de similitud entre las secuencias de ambas especies (Apéndice 2).

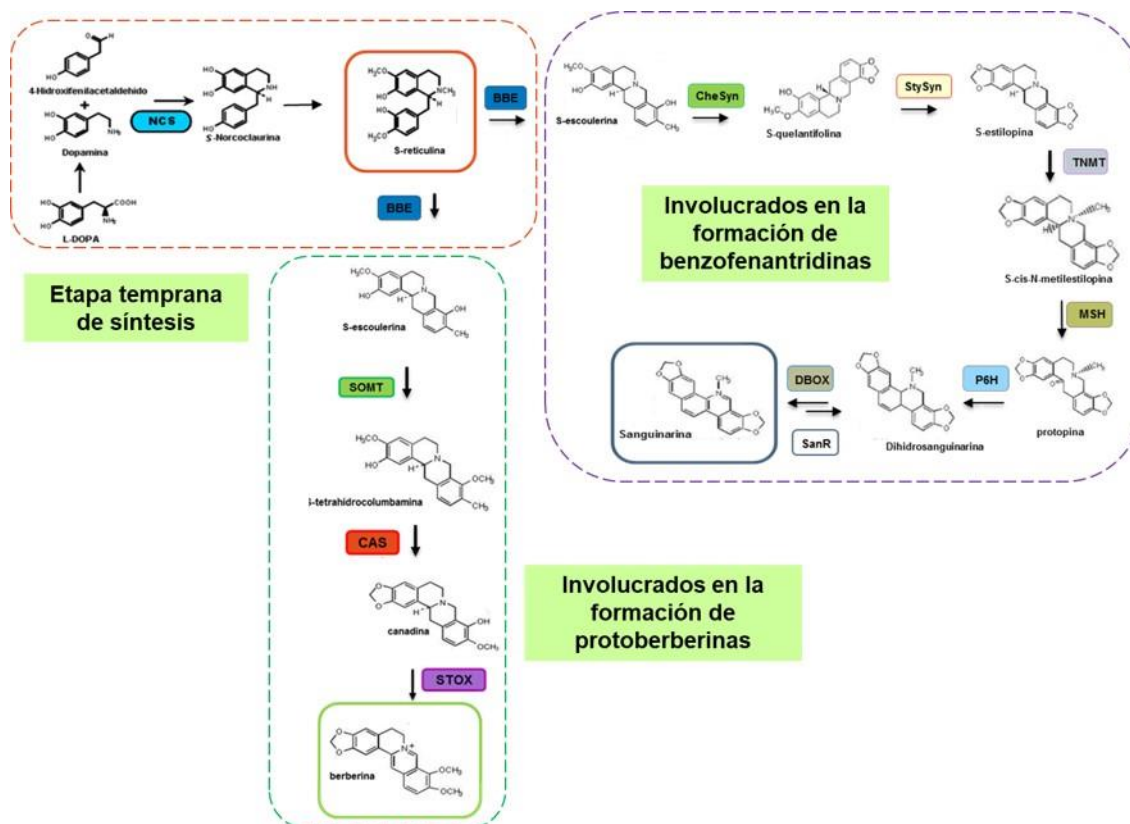


Figura 3.28 Genes participantes en la biosíntesis de alcaloides benzilisoquinolínicos en etapa temprana, reacciones específicas para la formación de benzofenantridinas y protoberberinas. Para la etapa inicial, los genes de las enzimas (S)-norcoclaurina sintasa (**NCS**) y la enzima del puente de berberina (**BBE**). Para la síntesis de la sanguinarina, los genes de las enzimas: queilantifolina sintasa (**CheSyn**), S-estilopina sintasa (**StySyn**); tetrahidroprotoberberina cisN-metiltransferasa (**TNMT**); N-metilestilopina 14-hidroxilasa (**MSH**); protopina 6-hidroxilasa (**P6H**); dihidrobenzofenantridina oxidasa (**DBOX**); sanguinarina reductasa (**SanR**). Por otro lado, para la formación de la berberina, los genes de las enzimas: escoulerina-9-O-metiltransferasa (**SOMT**); canadina sintasa (**CAS**); tetrahidroprotoberberina oxidasa (**STOX**).

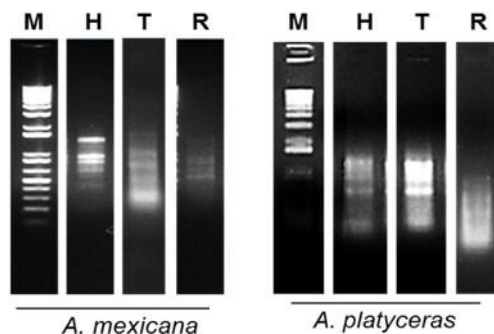


Figura 3.29 ARN total obtenidos de tejidos de plantas adultas de *A. mexicana* y *A. platyceras*. Geles de agarosa a 1.3% en buffer TAE (Tris-Acetato, EDTA; 40mM, 1 mM). Tinción con bromuro de etidio. (M, marcador de peso molecular de 1kb; H, hoja; T, tallo; R, raíz).

Cuadro 3.4. Secuencias de oligonucleótidos iniciadores y tamaño de los productos esperados de los transcritos ABI's en *A. mexicana* (Xool-Tamayo, 2016; Xool-Tamayo *et al.*, 2017; Vergara-Olivares, 2016). F, dirección sentido; R, dirección antisentido.

| Transcrito | Secuencias (5'→3') | Dirección | Accession | Tm | Tamaño (pb) |
|------------|----------------------------------|-----------|-----------|------|-------------|
| NCS1 | CATCGCTAATTACGTTCTCAAGAATCA | F | EU881891 | 67°C | 241 |
| | ATAGTAGTACATGGAATTACCTGGATGGGA | R | | | |
| BBE1 | CATCTTTGTTTCATCATCATCTTCTTCTTCTT | F | EU881889 | 66°C | 268 |
| | GATCCTCTTGTGCAACATCTAACGGT | R | | | |
| BBE2 | CTCATCTTTGTTTCATCTTCTTTCTGTGC | F | EU881890 | 66°C | 255 |
| | GATCCTCTTGTGCAACATCTAACGGT | R | | | |
| SOMT | CAGGATTTGGACCAGAAGCAC | F | KT984756 | 63°C | 252 |
| | ACGATACTCCATCCTCCTCGC | R | | | |
| STOX | GGTTAGGAAATATGGACTTG | F | HQ116698 | 54.3 | 544 |
| | ATAACATTGCTGGTGAATCT | R | | | |
| StySyn | GTTCAAATCTAGTACGTCCGCT | F | EF451151 | 53°C | 173 |
| | TTCTCTTGAACATTTGGTTCTCGT | R | | | |
| TNMT | CCCCCTGGTTGTGTGACAAT | F | UN15660 | 54°C | 167 |
| | TTCCTGCTTCATGGTTTCTC | R | | | |
| DBOX | CACAGGCCAAGAGGTTTGCTA | F | UN11221 | 62°C | 523 |
| | GCTTCCTCCTATTTTCTTCCCTTT | R | | | |
| ACTINA | GGAGAAGAGTTATGAGCTCCTGAC | F | ACTam2 | 62°C | 232 |
| | CATACGATCAGCAATACCAGGGAA | R | | | |

3.8.1 Amplificación de transcritos en tejidos de plantas adultas en *A. mexicana* y *A. platyceras*

La presencia de los transcritos de interés se analizó por PCR de punto final. Como testigo se utilizó la amplificación de la actina, cuyo producto esperado es de 232 pb (de acuerdo con la secuencia de *A. mexicana*). De los transcritos correspondientes a los genes biosintéticos de las reacciones comunes se eligió la NCS y BBE. Si bien en *A. mexicana* existen dos isoformas de la NCS (NCSAm-1 y -2) y de BBE (BBEAm-1 y -2) en este análisis se seleccionaron la NCS1 y BBE1 debido a que no se conoce el número de isoformas en

otras especies, incluyendo *A. platyceras*. De acuerdo a lo reportado en *A. mexicana*, las isoformas de NCS y BBE, se pueden expresar de manera preferencial en diferentes tejidos y condiciones (tanto en plántulas como en plantas maduras; Guízar-González *et al.*, 2016; Xool-Tamayo *et al.*, 2017; Vázquez-Flota *et al.*, 2018) y en cultivo celulares sometidos a inducción con SA (ácido salicílico) y MeJa (jasmonato de metilo) (Rubio-Piña., 2009; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010). En hojas de plantas adultas se observó que la expresión de la NCSAm-1, fue casi el doble de la isoforma -2 y mientras que los niveles de las isoformas de BBE fueron los mismos. En contraste, en tallo y raíz, la expresión de las isoformas NCSAm-2 y BBEAm-2 fue mayor, siendo probable que la existencia de las isoformas de BBE y NCS de *A. mexicana* forme parte de un mecanismo regulatorio para la síntesis de alcaloides en esta planta como respuesta a diferentes tipos de estímulos (Vergara-Olivares, 2016).

Utilizando los iniciadores para la NCSAm1, se lograron amplificar fragmentos de alrededor de 200 pb tanto en hojas, tallos y raíces de *A. mexicana* y de *A. platyceras*, sin embargo, se observaron diferencias en las intensidades entre los tejidos (Fig. 3.30). El tamaño esperado del producto amplificado fue de 241 pb, considerando la secuencia reportada en *A. mexicana* (a partir de la cual se diseñaron los iniciadores) y el producto en *A. platyceras* fue de 218 pb (Fig. 3.30). En ambas especies, la señal de mayor intensidad se detectó en las raíces, sin embargo, en tallos de *A. mexicana* la señal fue similar en intensidad y muy débil en hojas (Fig. 3.30). Por su parte, en *A. platyceras*, los amplicones obtenidos de las raíces fueron de mayor intensidad que en los tejidos aéreos (Fig. 3.30). En *A. mexicana* previamente se reportó (Vázquez-Flota *et al.*, 2018) que los transcritos de NCSAm1 se observan en menor grado en hojas, en comparación con los demás tejidos, lo que coincide con nuestros resultados.

Por otra parte, los resultados obtenidos para la amplificación de transcritos de la enzima del puente de berberina (BBEAm1) se observan en la figura 3.30. Solo se detectaron los transcritos correspondientes en los tejidos de *A. mexicana*, obteniendo fragmentos de 268 pb, lo que se ajusta a los tamaños esperados (Fig. 3.30). En *A. platyceras* no se observó ninguna señal de BBEAm1 en sus tejidos. Con el fin de corroborar este resultado, también se probaron los cebadores para BBEAm2 no observándose amplificaciones de nuevo. De este modo, es posible que los cebadores utilizados en *A. platyceras* no reconocieran las

secuencias de este gen, o bien que la expresión del gen antecedió al momento de la colecta del tejido.

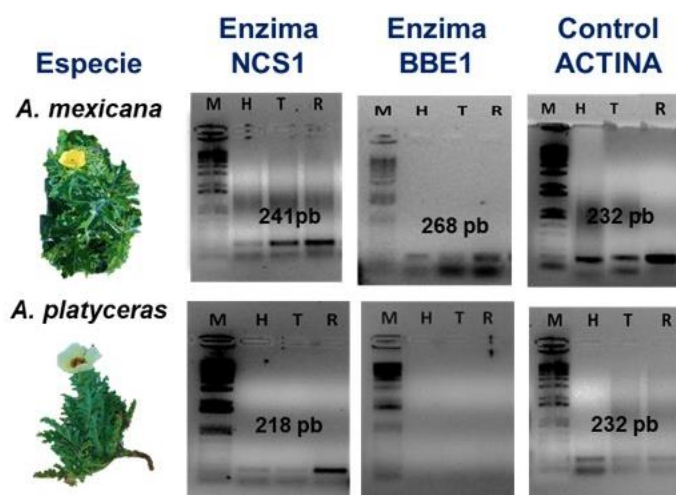


Figura 3.30 Amplificaciones por PCR de las reacciones codificantes de los genes NCS, BBE (reacciones comunes) y actina (control positivo) en plantas adultas de *A. mexicana* y *A. platyceras*. Geles de agarosa a 1.3% en buffer TAE (Tris-Acetato, EDTA; 40mM, 1 mM). Tinción con bromuro de etidio. (M, marcador de peso molecular de 1kb; H, hoja; T, tallo; R, raíz).

Tanto los NCS como los BBE son indicadores del inicio de las primeras reacciones catalíticas de la ruta metabólica común. Las amplificaciones en los tejidos de *A. mexicana*, sugieren reacciones catalíticas alternas durante la síntesis de sanguinarina y berberina (Xool-Tamayo *et al.*, 2017; Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013), las señales de NCS Am-1 y BBE Am-1 en las partes aéreas son consistentes con la acumulación de berberina en la planta, y los transcritos observados en la raíz sugieren que este órgano podría ser el sitio de síntesis de la sanguinarina (Xool-Tamayo *et al.*, 2017). No obstante, no se debe descartar que los intermediarios involucrados en la biosíntesis de sanguinarina puedan ser transportados a partir de las partes aéreas (Facchini *et al.*, 1996). Por otro lado, en *A. platyceras*, las señales débiles de NCSAm1 en las partes aéreas son consistentes con la baja presencia de alcaloides en sus perfiles cromatográficos y con el bajo contenido de sanguinarina y berberina, mientras que las señales fuertes de NCSAm1 en el tejido de raíz, permiten deducir que los distintos alcaloides que acumula, se forman en ese mismo tejido.

Para analizar los transcritos correspondientes a genes participantes en las reacciones biosintéticas tardías para sanguinarina, se eligieron la StySyn, TNMT y DBOX, que en el proceso de síntesis (Fig. 3.28) participan en la formación de la S-estilopina, la S-cis-N-estilopina y la sanguinarina, siendo esta última el producto final de la ruta biosintética (Vázquez-Flota *et al.*, 2018).

En la figura 3.31 se muestran los resultados obtenidos. La StySyn y TNMT no se lograron detectar en los tejidos de *A. mexicana*, pero sí DBOX (de 523 pb). En contraste, se pudo observar la expresión de StySyn y TNMT en tallos y raíces de *A. platyceras* (que corresponden a los fragmentos de 173 y 170 pb, respectivamente).

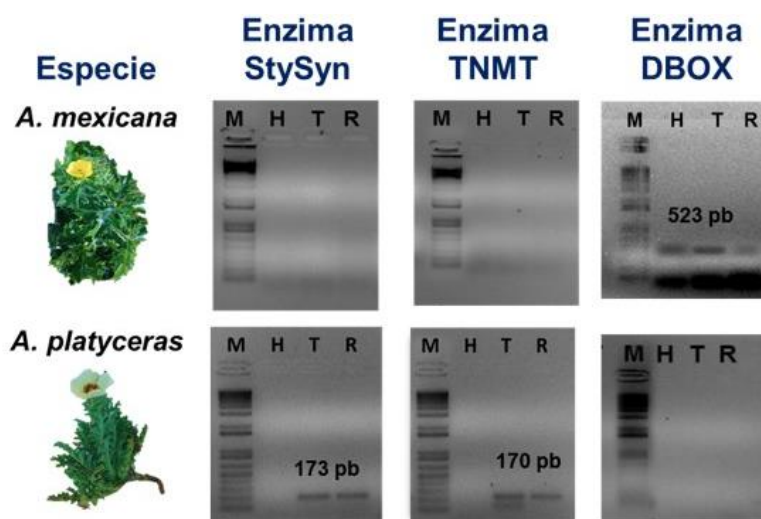


Figura 3.31 Acumulación de transcritos de StySyn y TNMT en tejidos de *A. platyceras* y DBOX en tejidos de *A. mexicana* (reacciones específicas para sanguinarina). Geles de agarosa a 1.3% en buffer TAE (Tris-Acetato, EDTA; 40mM, 1 mM). Tinción con bromuro de etidio. (M, marcador de peso molecular de 1kb; H, hoja; T, tallo; R, raíz).

En plantas adultas de *A. mexicana* se ha reportado que la distribución de los alcaloides en los tejidos no necesariamente corresponde necesariamente con la actividad transcripcional de estos mismos tejidos (Xool-Tamayo, 2016), aunque no se obtuvieron amplificaciones de StySyn y TNMT, las amplificaciones de DBOX en los tejidos, sugiere que hay actividad transcripcional para la sanguinarina en la parte aérea, y que pudieran existir mecanismos de transporte entre los tejidos de *A. mexicana* para su acumulación en raíces. Como se mencionó en este trabajo y se ha reportado en nuestro grupo de investigación (Rubio-Piña

y Vázquez- Flota, 2013; Xool-Tamayo, 2016), el contenido de sanguinarina es muy bajo en la parte aérea, por lo cual la acumulación final de sanguinarina en raíces está relacionada con la aparición de células especializadas capaces de almacenarla. Además, las amplificaciones obtenidas de StySyn y TNMT en tallos y raíces de *A. platyceras*, podrían estar coincidiendo con los sitios de acumulación de sanguinarina (porque no se detectó sanguinarina en perfiles de hojas). Cabe destacar que en las cuantificaciones que realizamos (en *A. mexicana*, *A. platyceras* y *A. ochroleuca*) para este alcaloide, el tejido de raíz de *A. platyceras* presentó el mayor contenido, por lo cual, es probable que en raíces de *A. platyceras*, sanguinarina se acumule y se sintetice. En *Eschscholzia californica* (Papaveraceae), una especie que se caracteriza por la producción únicamente de ABI's tipo benzofenantridinas podría estar sucediendo lo mismo ya que al igual que en *A. platyceras* son las raíces el tejido que presenta la mayor concentración de sanguinarina (Hagel y Facchini, 2013), sin embargo, en un estudio molecular en células en suspensión se han aislado varios genes involucrados en la biosíntesis de queleritrina, que podría ser una de tantas diferencias entre estas especies, ya que no hemos detectado queleritrina en ningún tejido de plantas adultas de *A. platyceras*, pero en raíces se ha cuantificado berberina (en bajo contenido), lo que nos indica la producción de protoberberinas en *A. platyceras*.

Por su parte, en las reacciones catalíticas para la síntesis de berberina (Fig. 3. 28), en todos los tejidos analizados de *A. mexicana* se detectaron niveles importantes de SOMT, los productos de PCR fueron de 252 pb con bandas bien definidas (Fig. 3.32), sin embargo, que este transcrito no se detectó en ningún tejido de *A. platyceras* (Fig. 3.32), también se probaron los oligonucleótidos iniciadores de STOX en ambas especies, no observando amplificaciones.

En un análisis de SOMT (Vergara- Olivares, 2016), se evaluó su expresión en hoja, tallo y raíz de plantas adultas en *A. mexicana*, de manera general, el gen indicador de biosíntesis de berberina (SOMT) se expresó en todos los tejidos analizados tanto en RT-PCR como en qPCR, estos resultados son similares con los que obtuvimos, sugiriendo que hay biosíntesis y acumulación de este metabolito, esto se corrobora en la cuantificación, ya que se detectó cantidades de berberina en todos los tejidos.

En *A. platyceras*, las cuantificaciones demostraron menor producción de berberina en etapa adulta, con esto se puede inferir que el resultado de los transcritos de SOMT en plantas adultas está mostrando un patrón de expresión relacionado con la concentración de berberina.

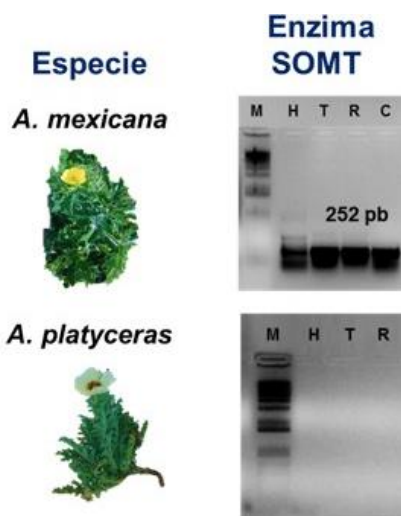


Figura 3.32 Acumulación de transcritos para SOMT (reacción específica para berberina) en plantas adultas de *A. mexicana* y *A. platyceras*. Geles de agarosa a 1.3% en buffer TAE (Tris-Acetato, EDTA; 40mM, 1 mM). Tinción con bromuro de etidio. (M, marcador de peso molecular de 1kb; H, hoja; T, tallo; R, raíz; C, callo).

3.8.2 Amplificación de transcritos en tejidos de plantas de diferentes etapas de desarrollo en *A. platyceras*

Con el fin de conocer sí el patrón de acumulación de los alcaloides típicos de los individuos en la etapa adulta, el mismo que en los estados tempranos de desarrollo y sí los sitios de acumulación son los mismos en los que se forman, se probaron oligonucleótidos iniciadores para BBEAm1, BBEAm2, y SOMT (con la posibilidad de obtener transcritos ya que en plantas adultas no se obtuvo), así también para los genes NCSAm1, StySyn y TNMT (amplificados en tejidos de plantas adultas).

Los análisis moleculares en los estados E1, E2 y E3 se iniciaron con la extracción de ARN de hoja, tallo y raíz para cada estado (ver Fig. 3.33), después de evaluar la integridad y pureza del ARN y realizar la síntesis de cDNA, en las reacciones de PCR se utilizaron los

mismos cebadores que en plantas adultas.

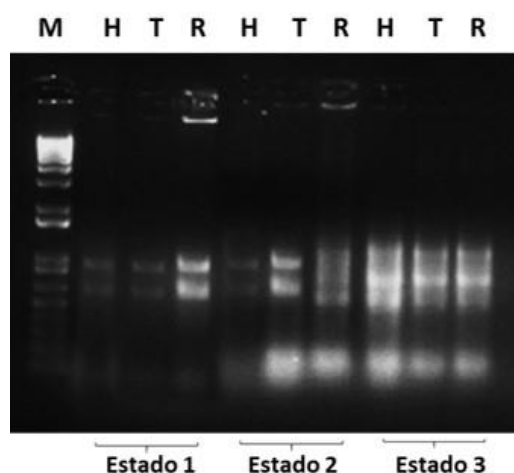


Figura 3.33 Extracción de ARN total obtenidos de tejidos de plantas en tres estados tempranos de desarrollo (E1, E2 y E3) de *A. platyceras*. Geles de agarosa al 1.3% en buffer TAE (Tris-Acetato, EDTA; 40mM, 1 mM). Tinción con bromuro de etidio. (M, marcador de peso molecular de 1kb; H, hoja; T, tallo; R, raíz).

Como indicadores del tramo común, se evaluó la presencia de NCSAm1, BBEAm1 y BBEAm2, mas no se observaron amplificaciones en ninguna de las tres etapas de desarrollo. Indicandonos nuevamente para el caso de BBE que los cebadores utilizados no reconocieron las secuencias de este gen, para el caso de NCSAm1 no se observaron bandas definidas, por lo que concluimos que tal vez se traten de posibles inespecificidades en la amplificación.

No obstante, se lograron amplificaciones de SOMT (Fig. 3.34) en raíces de los estados de desarrollo 1 y 2 y en tallos del estado 3 (con señal más intensa). Esto puede sugerir que en etapas tempranas de desarrollo (E1 y E2) la síntesis de berberina se lleva a cabo en las raíces y en este mismo tejido se acumula (Fig. 3.35A), mientras que en plantas juveniles (E3) como la amplificación es en tallos y debido a que no se detecta berberina en ese tejido, es posible que exista un mecanismo de transporte de los intermediarios de sanguinarina a la raíces (Fig. 3.35A). Con estos resultados se puede inferir que los trascritos de SOMT no se amplificaron en etapa adulta porque la síntesis no se está llevando a cabo o se está llevando a cabo en niveles mínimos y que la acumulación del alcaloide en raíces se trate de una reserva.

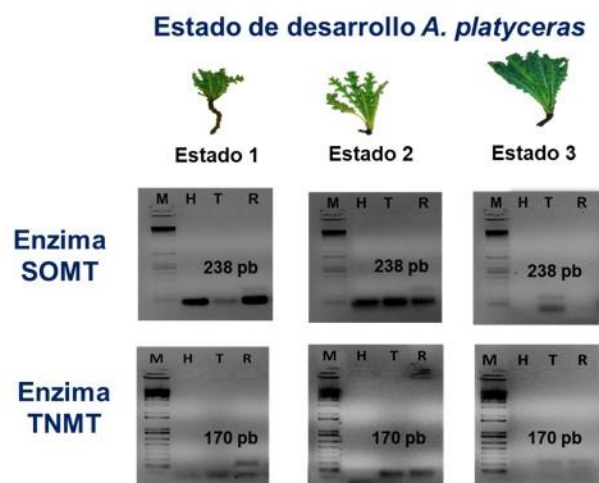


Figura 3.34 Acumulación de transcritos para TNMT (reacción específica para sanguinarina) y SOMT (reacción específica para berberina) en diferentes estados de desarrollo de *A. platyceras*. Geles de agarosa a 1.3% en buffer TAE (Tris-Acetato, EDTA; 40mM, 1 mM). Tinción con bromuro de etidio. (M, marcador de peso molecular de 1kb; H, hoja; T, tallo; R, raíz).

Para comprender la actuación de la biosíntesis de berberina en *A. platyceras*, estudios moleculares realizados en diferentes estados de desarrollo de *A. mexicana* (Xool-Tamayo., 2016) reportan algo muy similar en la producción de sanguinarina, los análisis confirmaron que la capacidad de sintetizar sanguinarina está presente desde las etapas más tempranas del desarrollo. No obstante, al avanzar hasta llegar a la formación de hojas maduras, la sanguinarina prácticamente desaparece de las partes aéreas, aunque los transcritos pueden ser detectados en algunos casos. La explicación biológica de la disminución en la capacidad de acumular alcaloides en las plantas adultas, en comparación con los estados más jóvenes, puede estar relacionada con una pérdida en la capacidad biosintética de alcaloides o bien en una disminución de los sitios de almacenamiento (Zeng *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2014).

Por otra parte, se observaron amplificaciones de TNMT en tallos en estados de desarrollo de E2 y E3, también en raíces de los tres estados de desarrollo (Fig. 3.34), las señales de los transcritos corresponden al tamaño del producto esperado (170 pb) y se observaron señales más intensas en los primeros dos estados de desarrollo, mientras que en E3 las bandas son muy tenues. De acuerdo a los perfiles obtenidos por CCF (Fig. 3.35B), la acumulación de sanguinarina está presente solamente en tejidos de raíces de E1, E2 y E3. Esto nos confirma que sucede algo muy similar de lo que observamos en plantas adultas,

ya que se observa el transcrito en el mismo tejido en el que se acumula. Para los transcritos observados en tallos, es posible que exista un mecanismo de transporte para los intermediarios de sanguinarina a raíces.

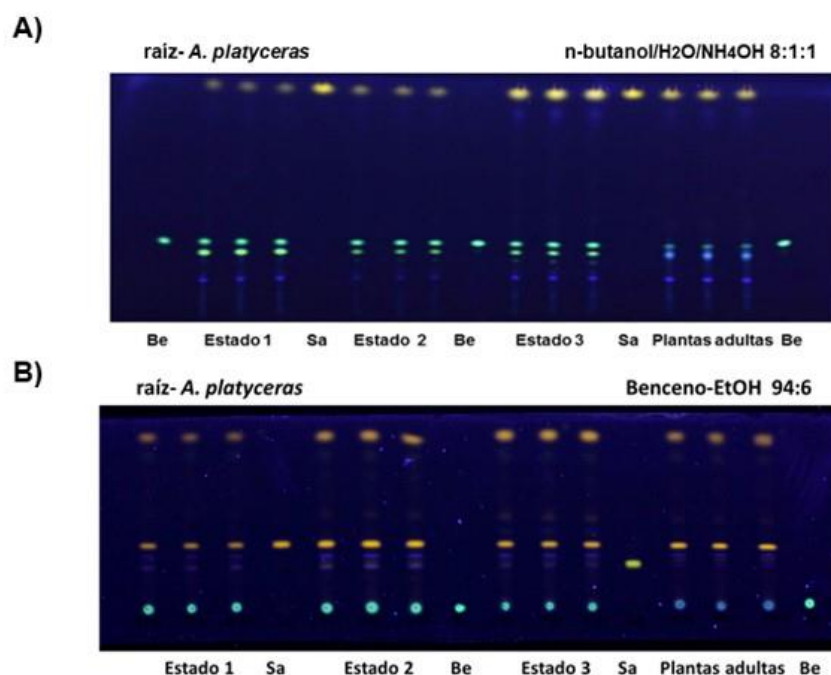


Figura 3.35 A) Análisis por CCF (Sistema 1) para la visualización de berberina en extractos de raíces de plantas de *A. platyceras* en diferentes etapas de desarrollo; B). Análisis por CCF (Sistema 2) para la visualización de sanguinarina en extractos de raíces de plantas de *A. platyceras* en diferentes etapas de desarrollo. Se muestran los extractos obtenidos de estados de desarrollo 1, 2, 3 y extractos de los tres individuos de plantas adultas. Todas las mezclas fueron desarrolladas una sola vez y cada carril fue cargado con un volumen de extracto de 1 μ L, sanguinarina.

3.8.3. Análisis de expresión en función de la acumulación de los alcaloides en *A. mexicana* y *A. platyceras*

El análisis realizado incluyó la distribución de sanguinarina y berberina en plantas adultas de *A. mexicana* y en los diferentes tejidos de *A. platyceras* a lo largo de 4 etapas de desarrollo en su ciclo de vida (incluyendo plantas adultas). El objetivo de este estudio permitió establecer asociaciones entre los tejidos que acumulan los alcaloides y aquéllos que expresan los genes biosintéticos y, de este modo, determinar el nivel de participación de los diferentes tejidos.

Los análisis realizados en *A. mexicana*, en general han sido comparables con análisis realizados anteriormente por otros compañeros en el grupo de investigación, la robustez de nuestro trabajo se basa en que las amplificaciones parten de muestras de ARN de individuos por separado y no de mezclas, además se trata de las mismas muestras utilizadas para la extracción de los alcaloides pero procesadas de diferente modo para fines de análisis moleculares. Asimismo en *A. platyceras*, las muestras utilizadas siguen esa misma clasificación, esto nos permite aportar a los análisis de cuantificación la variabilidad de cada individuo analizado.

En plantas maduras, las diferencias notables con respecto a los análisis de expresión son principalmente en la participación de los diferentes tejidos específicos para la síntesis de ABI's. Por ejemplo, en *A. mexicana*, las amplificaciones de NCSAm1, BBEAm1, DBOX y SOMT en todos los tejidos analizados sugieren que está activa la ruta de biosíntesis de berberina y sanguinarina, lo que coincide con la detección de ambos alcaloides en hojas, tallos y raíces. Sin embargo, en *A. platyceras*, solo en las amplificaciones de NCSAm1 se observa la participación del tejido de hojas, mientras que las amplificaciones de StySyn y TNMT se presenta en tallos y raíces. También se observaron diferencias en las intensidades de las bandas correspondientes a los productos de RT-PCR de los diferentes tejidos analizados, y en general las mayores intensidades se registraron en bandas de *A. mexicana*. Debido a que el análisis de expresión es meramente cualitativo y no se pretende estimar que si una mayor intensidad de la señal corresponde a un mayor el nivel expresión.

De igual forma se observaron diferencias en las reacciones específicas para berberina, ya que no se obtuvieron amplificaciones de BBEAm1, BBEAm2, SOMT y STOX en tejidos de *A. platyceras*. Esto sugiere que en el caso de los oligonucleótidos para BBE no están funcionando correctamente en el reconocimiento de las secuencias del gen, y con respecto a SOMT, el grado de desarrollo de la planta puede estar influyendo ya que se obtuvo transcritos de este gen en tejidos de plantas en los otros estados de desarrollo (E1, E2 y E3). En el cuadro 3.16 se presenta un resumen de los contenidos de sanguinarina y berberina en los tres tejidos de plantas adultas de *A. mexicana* y *A. platyceras*, así como el resultado de las amplificaciones de transcritos pertenecientes a los genes participantes en la biosíntesis de los ABI's.

Cuadro 3.5 Resultados de amplificaciones en tejidos de plantas adultas para *A. mexicana* y *A. platyceras* con los sitios de acumulación.

| Alcaloides | | Hoja | | Tallo | | Raíz | |
|---|---------|--|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| | | <i>A. mex.</i> | <i>A. platy.</i> | <i>A. mex.</i> | <i>A. platy.</i> | <i>A. mex.</i> | <i>A. platy.</i> |
| Sanguinarina (mg/g PS) | | NC | ND | NC | ND | 0.8218 | 3.2644 |
| Berberina (mg/g PS) | | 1.3842 | NC | 1.0046 | NC | 1.1342 | 0.2525 |
| | | | | | | | |
| Reacciones | Enzimas | Resultado de las amplificaciones por PCR | | | | | |
| Comunes | NCS1 | + | + | + | + | + | + |
| | BBE1 | + | - | + | - | + | - |
| Específicas para la síntesis de sanguinarina | DBOX | + | - | + | - | + | - |
| | StySyn | - | - | - | + | - | + |
| | TNMT | - | - | - | + | - | + |
| Específicas para la síntesis de berberina | SOMT | + | - | + | - | + | - |
| | STOX | - | - | - | - | - | - |

En plantas de desarrollo (E1, E2 y E3) de *A. platyceras* la amplificación de TMNT y SOMT evidencia la capacidad de la especie en acumular sanguinarina y berberina, aunque se puede inferir que el tejido que participa de forma más activa en todas sus etapas de desarrollo es la raíz. Además, se infiere que su maquinaria biosintética invierte más recursos para la producción de sanguinarina, en contraste con lo que ocurre en plantas de diferentes estados de desarrollo de *A. mexicana* donde se ha observado mayor producción de berberina. En este trabajo no se realizaron estudios moleculares para la especie de *A. ochroleuca* ya que no se disponía de material fresco, sin embargo se considera que vale la pena realizar un análisis más exhaustivo donde se incluya la síntesis de queleritrina y sus respectivos sitios de acumulación ya que de acuerdo con las cuantificaciones, se ha observado que existe abundancia de este alcaloide en tejidos de *A. mexicana* y *A. ochroleuca*.

BIBLIOGRAFÍA

- Baker, J. T., Borris, R. P., Carte, B., Cordell, G. A., Soejarto, D. D., & C ragg, G. M. Al-Hayan, AM 2006. Study of alkaloids of *Argemone ochroleuca* growing in Saudi Arabia. Tesis de Maestría. Departamento de Farmacognosia, Facultad de Farmacia. Universidad Rey Saud. Alonso Osorio, MJ 2002. Mesa redonda: El Medicamento en la Oficina de la Farmacia, Plantas Medicinales. XIII Congreso Nacional Farmaceutico.
- Bhardwaj, A., Pal, M., Srivastava, M., Tulsawani, R., Sugadev, R., & Misra, K. (2015). HPTLC based chemometrics of medicinal mushrooms. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38 (14), 1392-1406.
- Chaita, E., Gikas, E., & Aligiannis, N. (2017). Integrated HPTLC-based Methodology for the Tracing of Bioactive Compounds in Herbal Extracts Employing Multivariate Chemometrics. A Case Study on *Morus alba*. *Phytochemical Analysis*, 28 (2), 125-131.
- Estrada Alfaro, N (2018). Validación de un método para la cualificación de sanguinarina y berberina en *Argemone mexicana*, por cromatografía de capa fina-densitometría. Mérida, Yucatán: UADY.
- Facchini, P. J., Penzes, C., Johnson, A. G., & Bull, D. (1996). Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant physiology*, 112 (4), 1669-1677.
- Fletcher, M. T., Takken, G., Blaney, B. J., & Alberts, V. (1993). Isoquinoline alkaloids and keto-fatty acids of *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* (mexican poppy) seed. I. An assay method and factors affecting their concentration. *Australian Journal of Agricultural Research*, 44 (2), 265-275.
- Guízar-González, C., Trujillo-Villanueva, K., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2012). Sanguinarine and dihydrosanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* (L) cell suspension cultures exposed to yeast extract. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56 (1), 19-22.

- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54 (5), 647-672.
- Haisova, K., & Slavik, J. (1973). Alkaloids of the Papaveraceae. IL. On alkaloids from *Argemone ochroleuca* Sweet. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 38 (8), 2307-2312.
- Israilov, I. A., & Yunusov, M. S. (1986). Alkaloids of four species of *Argemone*. *Chemistry of Natural compounds*, 22 (2), 189-192.
- Monforte-González, M., Guízar-González, C., Rubio-Piña, J., Carrillo-Pech, M., & Vázquez-Flota, F. (2012). Berberine and sanguinarine quantitation in *Argemone mexicana* L.(Papaveraceae) tissues by TLC-in situ fluorography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 25 (4), 358-360.
- Purwanto, R., Hori, K., Yamada, Y., & Sato, F. (2017). Unraveling additional O-Methylation steps in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in California poppy (*Eschscholzia californica*). *Plant and Cell Physiology*, 58 (9), 1528-1540.
- Rahman, A. U. (1994). *Handbook of Natural Products Data: Isoquinoline Alkaloids*. Elsevier.
- Ram, M., Abdin, M., Khan, M., & Jha, P. (2011). HPTLC Fingerprint Analysis: A Quality Control for Authentication of Herbal Phytochemicals. *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*, 105-116.
- Reich, E., Schibli, A., Widmer, V., Jorns, R., Wolfram, E., & DeBatt, A. (2006). HPTLC methods for identification of green tea and green tea extract. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 29 (14), 2141-2151.
- Reyes, F. D., Peña, C. J., Canales, M., Jiménez, M., Meraz, S., & Hernandez, T. (2011). Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10 (2).
- Ristivojević, P., Dimkić, I., Trifković, J., Berić, T., Vovk, I., Milojković-Opsenica, D., & Stanković, S. (2016). Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, bioautography and chemometrics. *PLoS one*, 11 (6), e0157097.

- Rubio Piña, J. (2009). Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Mérida, Yucatán: CICY.
- Rubio-Piña, J., & Vázquez-Flota, F. (2013). Pharmaceutical applications of the benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana* L. Current topics in medicinal chemistry, 13 (17), 2200-2207.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Castillo-Henkel, C., & Navarrete, A. (2008). Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of *Argemone ochroleuca* Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. Journal of pharmacy and pharmacology, 60 (2), 229-236.
- Sherma, J., & Fried, B. (Eds.). (2003). Handbook of thin-layer chromatography (Vol. 89). CRC press.
- Škrbić, B., Cvejanov, J., & Đurišić-Mladenović, N. (2015). Chemometric characterization of vegetable oils based on the fatty acid profiles for selection of potential feedstocks for biodiesel production. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 9 (3), 358-371.
- Slavík, J., Slavíková, L., & Haisová, K. (1973). Alkaloids of the Papaveraceae. L. On the quaternary alkaloids from *Argemone platyceras* Link et Otto. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 38 (8), 2513-2517.
- Spoof, L., Neffling, M. R., & Meriluoto, J. (2010). Fast separation of microcystins and nodularins on narrow-bore reversed-phase columns coupled to a conventional HPLC system. Toxicon, 55 (5), 954-964.
- Srivastava, ManMohan. (2011). High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). Berlin: Springer Heidelberg.
- Takken, G., Fletcher, M. T., & Blaney, B. J. (1993). Isoquinoline alkaloids and keto-fatty acids of *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* (Mexican poppy) seed. II. Concentrations tolerated by pigs. Australian Journal of Agricultural Research, 44 (2), 277-285.

-
- Trujillo-Villanueva, K., Rubio-Piña, J., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2010). Fusarium oxysporum homogenates and jasmonate induce limited sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnology letters*, 32 (7), 1005-1009.
- Uriel, E., & Manzano, J. A. (2002). *Análisis multivariante aplicado* (Vol. 76). Paraninfo.
- Vázquez-Flota, F., Rubio-Piña, J., Xool-Tamayo, J., Vergara-Olivares, M., Tamayo-Ordoñez, Y., Monforte-González, M., Guízar-González, C., Mirón-López, G. (2018). Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 41 (1): 13 – 21.
- Vergara-Olivares, M. (2016). *Análisis de la redundancia genética de la ruta de síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en Argemone mexicana L.*
- Verma, M.; Ghangal, R.; Sharma, R.; Sinha, A.K.; Jain, M. Transcriptome analysis of *Catharanthus roseus* for gene discovery and expression profiling. *PLoS One*. 2014, 9:e103583.
- Xool Tamayo, J. (2016). *Estudio de la relación entre la acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en diferentes tipos de tejidos de Argemone mexicana y sus patrones transcripcionales.* Mérida, Yucatán: CICY.
- Xool-Tamayo, J., Serrano-Gamboa, G., Monforte-González, M., Mirón-López, G., & Vázquez-Flota, F. (2017). Development of newly sanguinarine biosynthetic capacity in in vitro rootless shoots of *Argemone mexicana* L. Mexican prickly poppy. *Biotechnology letters*, 39 (2), 323-330.
- Zeng, J.; Liu, Y.; Liu, W.; Liu, X.; Liu, F.; Huang, P.; Zhu, P.; Chen, J.; Shi, M.; Guo, F.; Cheng, P.; Zeng, J.; Liao, Y.; Gong, J.; Zhang, H.M.; Wang, D.; Guo, A.Y.; Xiong, X. Integration of transcriptoma, proteome and metabolism data reveals the alkaloids biosynthesis in *Macleaya cordata* and *Macleaya microcarpa*. *PLoS One*. 2013, 8: e53409

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Las especies del género *Argemone* (Papaveraceae) han sido estudiadas por varios autores por ser consideradas cercanas al género *Papaver* (Hagel y Facchini., 2013). Estas plantas se caracterizan por producir alcaloides derivados de la bencilisoquinolina. Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's) representan un grupo con estructuras diversas y con diferentes funciones ecofisiológicas, en la mayoría de los casos desconocidas, a pesar de las propiedades medicinales de muchos compuestos que han sido explotados durante siglos (Rashid *et al.*, 1995; Hung *et al.*, 2007; Hagel y Facchini, 2013). Las especies de *Argemone* se pueden subdividir en dos grupos, con base en la presencia de ciertos ABI's. El primero incluye especies que contienen alcaloides tipo pthalidoisoquinolina como *A. subintegriifolia*, *A. fruticosa* y *A. turnerae* (Schwarzbach y Kadereit, 1999) y el segundo grupo se caracteriza por la presencia de protoberberinas o derivados, principalmente protopinas y benzofenantridinas, como *A. mexicana* (Xool-Tamayo *et al.*, 2017), *A. ochroleuca* (Sánchez y Mendoza *et al.*, 2008) y *A. albiflora* (Haisova *et al.*, 1973). Esta subdivisión está basada en la composición de alcaloides que contienen, así como en sus morfologías.

En estudios realizados anteriormente, se han detectado nueve diferentes ABI's en la parte aérea y radical de *A. mexicana*. También se han evaluado sus capacidades biosintéticas mediante la abundancia tisular de algunos transcritos involucrados que se han obtenido por qRT-PCR (Vázquez-Flota *et al.*, 2018). Se ha reportado que los diferentes tejidos están involucrados en la síntesis de sus principales alcaloides, independientemente de los sitios de acumulación (Vázquez-Flota *et al.*, 2018). Con el fin de analizar la diversidad de alcaloides presentes en este género, en este trabajo se incluyeron análisis químicos y moleculares de tres especies de *Argemone*. Las especies seleccionadas fueron *A. mexicana* L; *A. platyceras* L y O; *A. ochroleuca* Sweet que, por su ubicación geográfica, son representativas del territorio mexicano. Por medio de un análisis cromatográfico (CCF y CCF-AR) se obtuvieron las huellas dactilares de extractos alcaloidales y se detectaron 16 compuestos de tipo alcaloides. Más aun, mediante un análisis multivariado se pudieron sentar las bases quimiotaxonómicas de estas especies y se pudieron documentar los

contrastes entre los perfiles de la parte aérea y radical. Por otra parte, y con el fin de empezar a entender los diferentes niveles de regulación existentes en la síntesis de los alcaloides en *A. mexicana* y *A. platyceras*, mediante PCR punto final se obtuvieron los transcritos de enzimas participantes en la ruta biosintética de los ABI's.

4.1.1 Establecimiento de huellas dactilares en especies de *Argemone*

El reconocimiento de los patrones de los extractos alcaloidales obtenidos de las diferentes especies de *Argemone* se obtuvo por CCF y CCF-AR. Se utilizaron dos sistemas de disolventes para la separación de los compuestos de mayor y menor polaridad. La composición del sistema para desarrollar los metabolitos de menor polaridad fue una mezcla de n-butanol/ H₂O/ NH₄OH en una proporción de 8:1:1 (v/v) y el segundo sistema para desarrollar los matabolitos de alta polaridad fue una mezcla de benceno/ EtOH en una proporción de 94:6 (v/v). Las aportaciones de estas técnicas cromatográficas se ven reflejadas en los perfiles cromatográficos obtenidos (Fig. 4.1).

La metodología utilizada por CCF fue un sistema abierto, por lo consiguiente, la placa estuvo expuesta a efectos ambientales (como aire), factores climáticos (temperatura, humedad) y luz (Reich y Schibli, 2007). Sin embargo, para todas las muestras, el proceso se mantuvo constante, aplicando la misma cantidad de extracto (en forma de punto) por carril. Los parámetros ambientales (como la humedad y la composición de la fase gaseosa en la cámara) no fueron controlados, dado que se mantuvo un sistema abierto. La metodología usada por CCF-AR complementó las ventajas inherentes de CCF. Aquí, la aplicación de las muestras (en forma de bandas) se realizó de manera automática y luego, se realizó el desarrollo con una cámara cerrada y la evaluación se llevó a cabo mediante un sistema de documentación electrónica. Hoy en día, CCF-AR es una técnica analítica consolidada, con el mismo nivel de calidad que GC y CLAR, y también un complemento ideal para esas técnicas (Akowuah *et al.*, 2006; Zlatkis y Kiser, 2011).

Los resultados obtenidos por CCF-AR, en comparación con CCF convencional mostraron mayor definición y separación de las bandas, los *R_f* de los compuestos separados fueron muy similares en ambos métodos. Además, CCF-AR facilitando la visualización de los componentes minoritarios en el perfil (Sharma *et al.*, 2010).

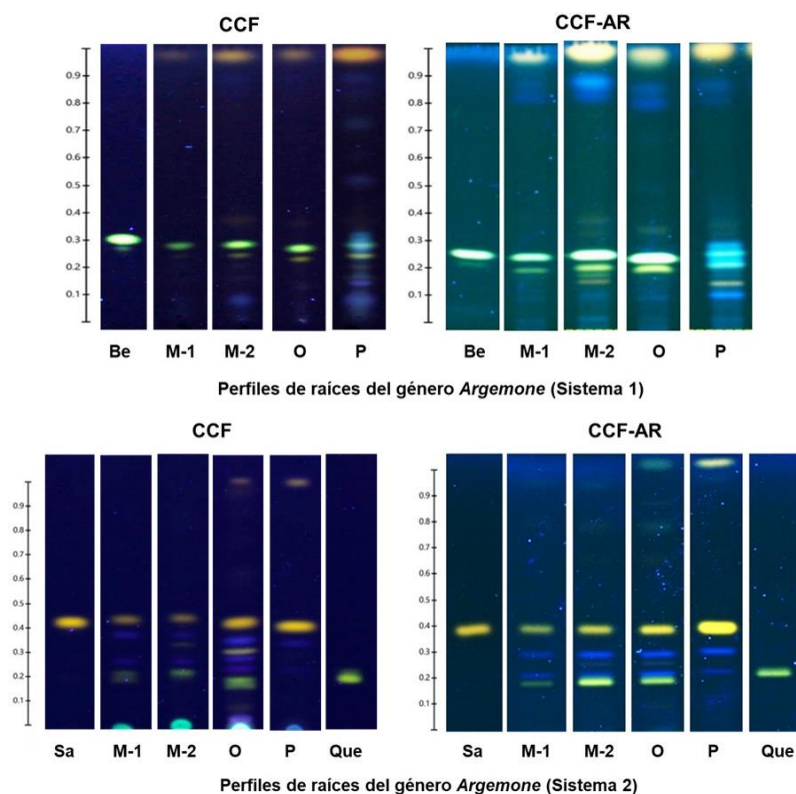


Figura 4.1 Huellas dactilares por CCF y CCF-AR para extractos alcaloidales de raíces en especies de *Argemone* en el Sistema 1 (n-butanol/H₂O/NH₄OH 8:1:1 v:v) y 2 (Benceno/EtOH 94:6 v:v). M-1, *A. mexicana* población 1; M-2, *A. mexicana* población 2; O, *A. ochroleuca*; P, *A. platyceras*. Para CCF, cada carril fue cargado con 1 μ L de extracto, que representa 13 μ g de peso seco de tejido, los estándares utilizados fueron: sanguinarina (Sa, *Rf*. 0.38), queleritrina (Que, *Rf*. 0.27) y berberina (Be, *Rf*. 0.29); para CCF-AR, cada carril fue cargado con 2 μ L de extracto, los estándares utilizados fueron: sanguinarina (Sa, *Rf*. 0.40), queleritrina (Que, *Rf*. 0.20) y berberina (Be, *Rf*. 0.27).

La evaluación densitométrica se realizó con las huellas dactilares de todas las muestras a una longitud de 330 nm, obteniendo de esta manera los cromatogramas. De cada placa se generó una gráfica (como se muestra en la figura 4.2 para las raíces de las diferentes especies). Para una comparación directa de todos los carriles integrados, la gráfica tridimensional (3D) puede verse como una imagen de espejo de la placa. La posición de la aplicación está en frente (Fig. 4.2).

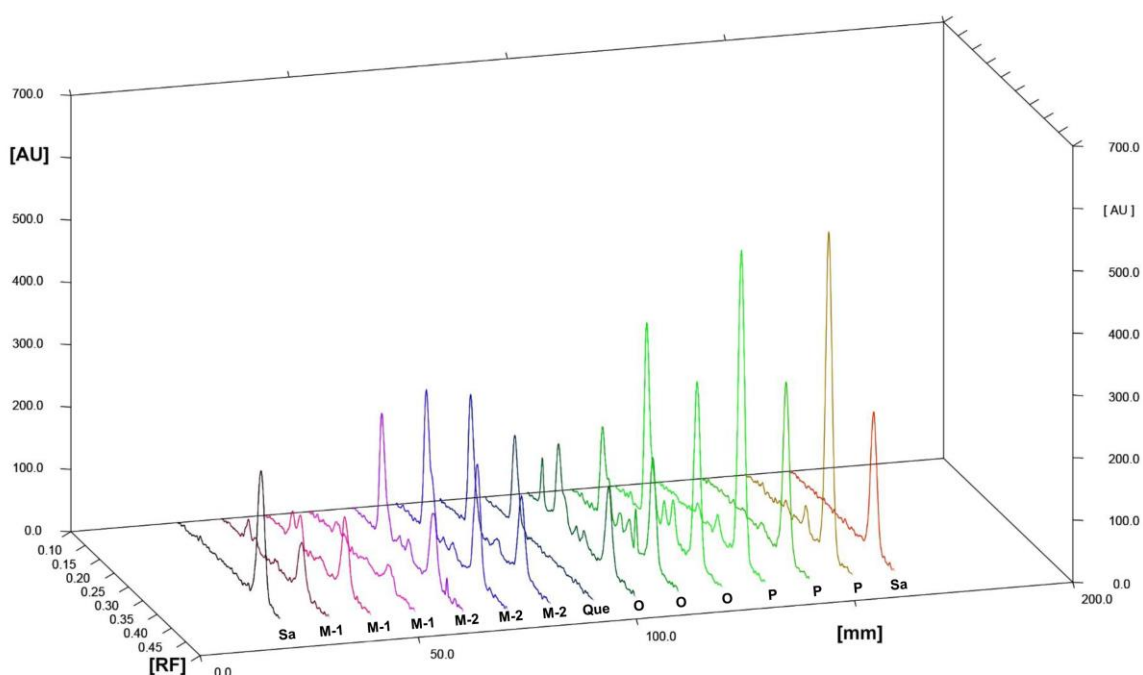


Figura 4.2 Gráfico tridimensional de todos los carriles de la placa presentada en la Fig. 3.6 con un escaneo en una longitud de onda (330 nm). Perfiles de alcaloides del Sistema 2 en extractos de raíces de especies de *Argemone*. Línea negra, estándar de **Sa** (10 ng/μL, *Rf*: 0.40); líneas rosadas, *A. mexicana* primera población (**M-1**); líneas azules, *A. mexicana* segunda población (**M-2**); línea azul; estándar de **Que** (10 ng/μL, *Rf*: 0.20); líneas verdes, *A. ochroleuca* (**O**); líneas verdes y café, *A. platyceras* (**P**); línea roja, estándar de **Sa** (10 ng/μL, *Rf*: 0.40). Ejes: **[AU]**, unidades de absorbancia registradas; **[Rf]**, la altura de la placa (10 cm) con regleta de *Rf*; **[mm]**, ancho de la placa (20 cm).

La buena separación obtenida utilizando los dos sistemas de disolventes ya descritos permitió la identificación de cuatro de los alcaloides; queleritrina, sanguinarina, dihidrosanguinarina y berberina, por comparación con los estándares disponibles. Las demás bandas detectadas se registraron por sus valores de *Rf* y por sus propiedades fluorescentes. En total se documentaron 16 compuestos y 12 aún no han sido identificados. Los 16 compuestos se etiquetaron como C1 a C16, de estos, de acuerdo con su orden de elución C5, C8, C12 y C16 correspondieron a berberina, queleritrina, sanguinarina y dihidrosanguinarina, respectivamente. La figura 4.3 muestra el análisis del cromatograma obtenido de extractos de hojas de *A. mexicana*.

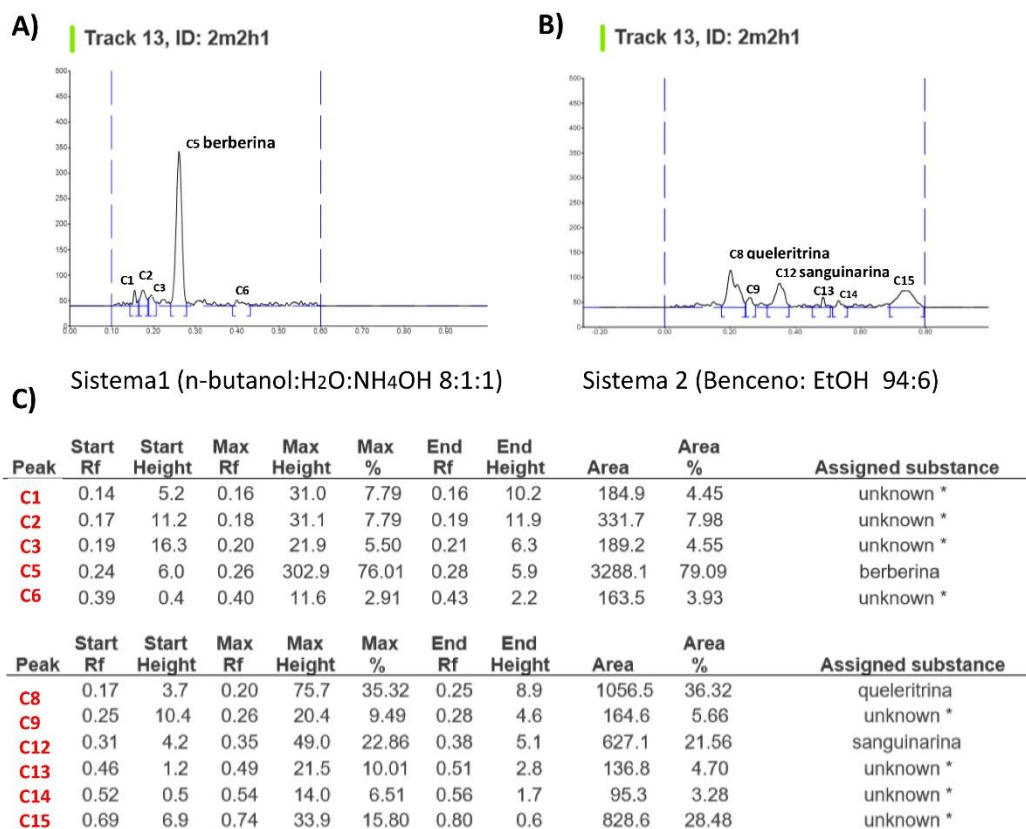


Figura 4.3 Cromatogramas obtenidos por CCF-AR (330 nm) de los alcaloides presentes en extractos de hojas de *A. mexicana*. A) Cromatograma de compuestos polares (Sistema 1), compuestos detectados: C1, C2, C3, C5 y C6; B) Cromatograma de compuestos de mediana polaridad (Sistema 2), compuestos detectados: C8, C9, C12, C13, C14 y C15; C) Reporte de *R_f*, alturas, áreas y porcentajes áreas para cada pico.

De este modo, el análisis de los perfiles cromatográficos de las especies de *Argemone* puede resultar una herramienta valiosa en el control de calidad de extractos herbarios producidos a partir de estas especies (Srivastava-ManMohan, 2010). Por ejemplo, *Panax ginseng* y *Panax quinquefolium* son dos especies cercanas que contienen ingredientes químicos muy similares, tienen diferentes aplicaciones en la Medicina Tradicional China. Mediante la comparación de las imágenes de sus perfiles cromatográficos (Fig. 4.4) ha sido posible diferenciar preparaciones provenientes de cada especie entre ellas (Xie *et al.*, 2006).

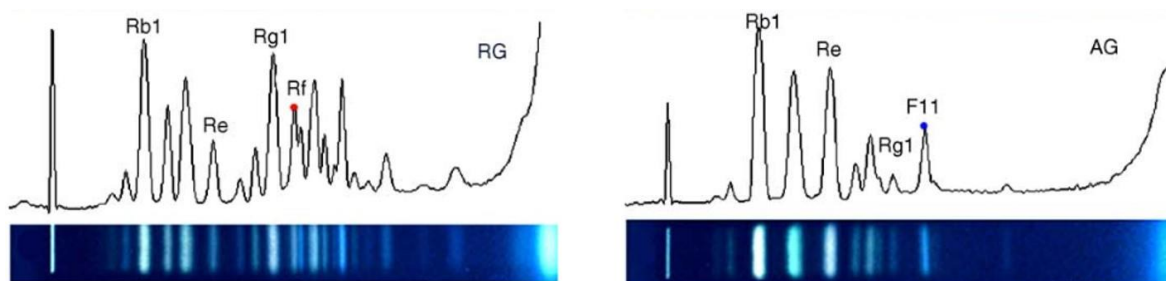


Figura 4.4 Perfiles cromatográficos de Ginsenosidos separados por CCF-AR para extractos de raíces de *Panax ginseng* (RG) y *Panax quinquefolium* (AG), Tomado de Xie et al., 2006. Fase móvil: CHCl₃: C₄H₈O₂: MeOH: H₂O 15:40:22:10.

Las raíces de *Bupleurum chinense* y *B. scorzonerifolium* son consumidas contra diversos padecimientos. Las saponinas presentes en sus extractos (Fig. 4.5B) son reconocidas como sus componentes activos, sin embargo, en ocasiones sus extractos son adulterados con otras especies del género. En un estudio realizado (Tian et al., 2009) se autentificaron (por CCF-AR) 33 lotes de extractos comerciales. Las imágenes fluorescentes (Figura 4.5A) fueron procesadas por quimiometría para el reconocimiento de similitud y se lograron distinguir fácilmente unos de otros.

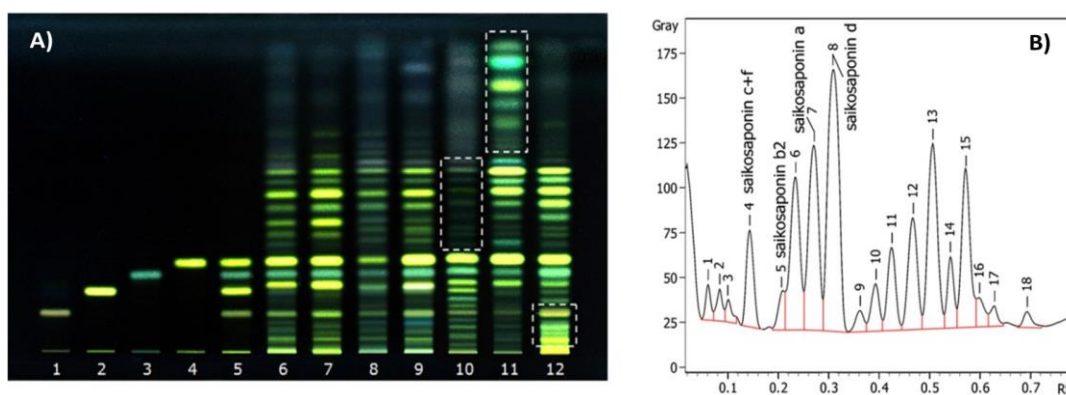


Figura 4.5 Cromatogramas obtenidos por CCF-AR (366 nm) de saponinas de especies de *Bupleurum*, Tomado de Tian et al., 2009. A) 1-5, estándares; 6,7, *B. chinense*; 8, *B. scorzonerifolium*; 9, *B. falcatum*; 10, *B. longiradiatum*; 11, *B. bicaule*; 12, *B. marginatum*. B) patrones de reconocimiento de CCF-AR de saponinas para el análisis de perfiles de *Bupleurum*. Fase móvil: CH₂Cl₂: C₄H₈O₂: MeOH: H₂O 30:40:15:3.

4.1.2 Caracterización química de las especies mediante métodos quimiométricos

Los datos generados a partir de las señales cromatográficas detectadas en los extractos de los diferentes tejidos de las especies analizadas de género *Argemone* son de naturaleza multivariable, en el sentido de que hay más de una variable (tales como, los presuntos alcaloides detectados) para cada individuo analizado.

En un estudio realizado por Silva y colaboradores (2016), se colectaron ejemplares de cinco diferentes especies del género *Unonopsis* en diversos sitios del estado brasileño de Amazonas analizando el potencial de la huella dactilar de los alcaloides presentes en las hojas mediante Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis quimiométrico con el objetivo de aplicar los perfiles químicos con enfoques quimiotaxonómicos. A pesar de que se encontraron compuestos comunes entre las diferentes especies, el análisis también mostró diferencias significativas entre las especies y los sitios de recolección. Los resultados mostraron una alta similitud química entre dos de las especies (*U. floribunda* y *U. rufescens*) que las distinguía de las tres restantes (*U. guatteroides*, *U. duckei* y *U. stipitata*). La identificación química apuntó a cinco compuestos como posibles marcadores entre las especies (Silva *et al.*, 2016) (Fig. 4.6).

Del mismo modo, los análisis multivariados basados en la diversidad de alcaloides en tres especies del género *Argemone*, realizados en este estudio, permiten inferir que la segregación de las especies en dos grupos diferentes, fue esencialmente por la presencia de 16 alcaloides detectados. Estos grupos fueron, por un lado el formado por los perfiles de las partes aéreas conjuntas (hojas y tallos) que no mostraron diferencias entre las especies, y por el otro, los perfiles de las partes radicales que dieron lugar a dos grupos; uno integrado por *A. mexicana* y *A. ochroleuca*, y otro por solamente *A. platyceras* (ver Fig. 3.23). La ocurrencia de diferencias en la composición de alcaloides en las raíces indica que en la formación de estos grupos influyó la diversidad de alcaloides (número de alcaloides detectados en el análisis cromatográfico), así como la cantidad de los mismos.

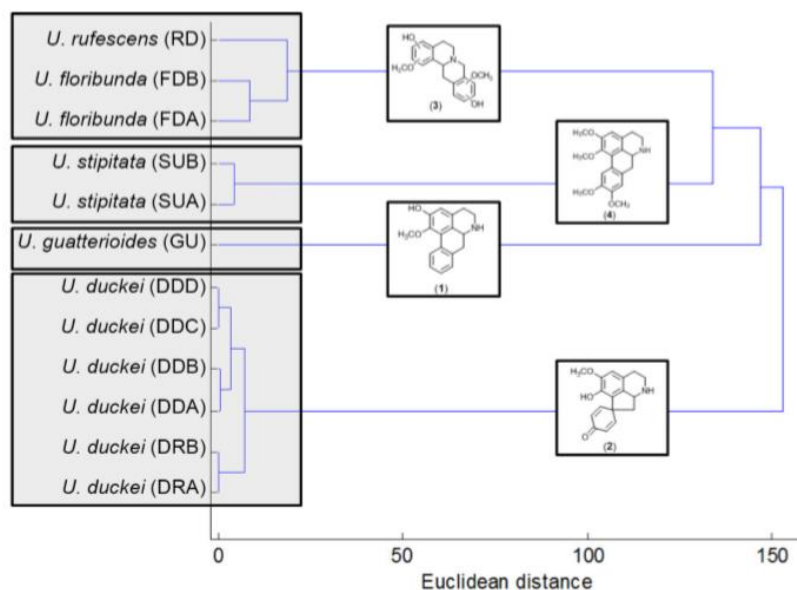


Figura 4.6 Dendrograma con la identificación tentativa de compuestos resultantes del análisis de fragmentación y responsables de la segregación de especies del género *Unonopsis*. 1) asimilobina, 2) glaziovina; 3) scoulerina 4) norclaucina (Tomado de Da Silva et al., 2016).

4.1.3 El metabolismo especializado en especies de *Argemone* definido por factores genéticos

En una caracterización de diversas variedades *Ocimum basilicum* L (albahaca), se realizaron colectas en diferentes regiones de Irán y se documentaron parámetros morfológicos y fitoquímicos, como la cuantificación de los ácidos fenólicos (Javanmardi et al., 2002). El análisis de conglomerados distinguió químicamente cuatro grupos, resultando en que las variedades colectadas en ambientes húmedos y semi húmedos mostraron bajas cantidades de ácidos fenólicos, sugiriendo que en estos ambientes parecen no ser necesarios (Javanmardi et al., 2002). En este estudio también se analizó la variabilidad genética de las poblaciones y cómo esta variabilidad se traduce en variación fenotípica (Javanmardi et al., 2002).

Por otra parte, también se ha reportado que especies con un amplio rango de distribución geográfica presentan variaciones fenotípicas (Lortie y Aarssen, 1996) y que éstas han surgido cuando los distintos genotipos confrontan diversos ambientes, reaccionado siendo de manera distinta a los mismos (plasticidad fenotípica, Gutteling et al., 2007).

Aunque no hay suficientes estudios fitoquímicos sobre las especies de *Argemone*, las revisiones más recientes han integrado todas las estructuras químicas conocidas de los ABI's y las enzimas participantes. Por ello, se ha logrado obtener un buen entendimiento de sus rutas metabólicas (Hagel y Facchini, 2012; Chávez et al., 2011; Rubio-Piña, 2009).

En un trabajo realizado por Schwarzbach y Kadereit (1999) se dedujeron relaciones evolutivas dentro del género *Argemone* a partir de la variación de nucleótidos en el ADN ribosomal nuclear. En este análisis filogenético (fig. 4.7) se pudieron reconocer cuatro grupos distintos (I, II, III, IV) y algunos caracteres morfológicos, como color, forma y estructura se pudieron asociar a especies dentro del género *Argemone*. Esto fue de gran valor pues dichos caracteres resultan de una variación morfológica en gran parte continua y de paralelismos correlacionados probablemente causados por la poliploidización. Además, el aporte de este trabajo fue que las especies de *Argemone* presentan un metabolismo especializado debido al potencial evolutivo de sus caracteres genéticos, muy importantes para el establecimiento, supervivencia y crecimiento de las especies en diversos ambientes (Lloret *et al.*, 2004).

Las especies estudiadas en este trabajo; *A. mexicana*, *A. ochroleuca* y *A. platyceras*, pueden ser ubicadas en la filogenia presentada por Schwarzbach y Kadereit (1999) (figura 4.6), en la cual *A. mexicana* y *A. ochroleuca* se encuentran en el grupo IV y que han sido clasificadas por producir alcaloides tipos protopinas y protoberberinas (P), mientras que *A. platyceras* pertenece al grupo II y ha sido clasificada por presentar tanto alcaloides tipo P y como pthalidoisoquinolina, lo que coincide con el agrupamiento generado en este análisis para los perfiles de las raíces (Fig. 3.26). Además, cabe señalar que mientras *A. platyceras* presenta flores blancas, las otras dos especies presentan tonalidades amarillas (Fig. 3.2).

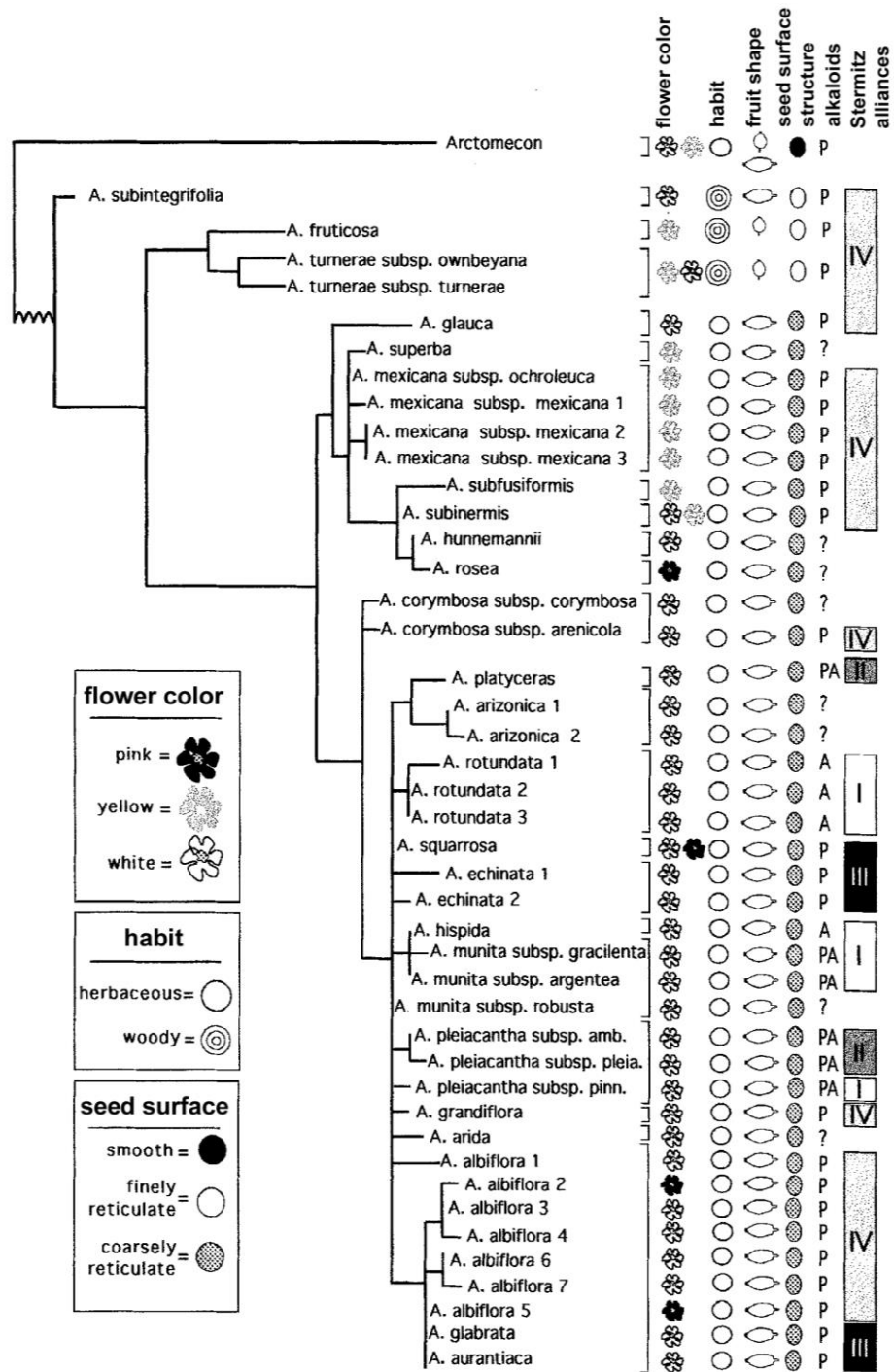


Figura 4.7 Filograma químico y morfológico de las especies de *Argemone* (Tomado de Schwarzbach y Kadereit, 1999). Como grupo externo se empleó *Arctomecon*. P, protopinas y protoberberinas; A, apavines (alcaloides tipo fthalideisoquinolina); PA, combinación de ambos tipos.

En la figura 4.8 se muestra un diagrama que marca las diferencias encontradas en los análisis moleculares realizados en *A. mexicana* y *A. platyceras*, se presentan los sitios de acumulación y de biosíntesis para ABI's, y con los enfoques comentados en este apartado, se puede verificar que las especies presentan particularidades en la elección de tejidos que participan en la acumulación de sus alcaloides, así como el favorecimiento de síntesis de ABI's tipo fenantridinas en *A. platyceras* y fenantridinas y protoberberinas en *A. mexicana*.

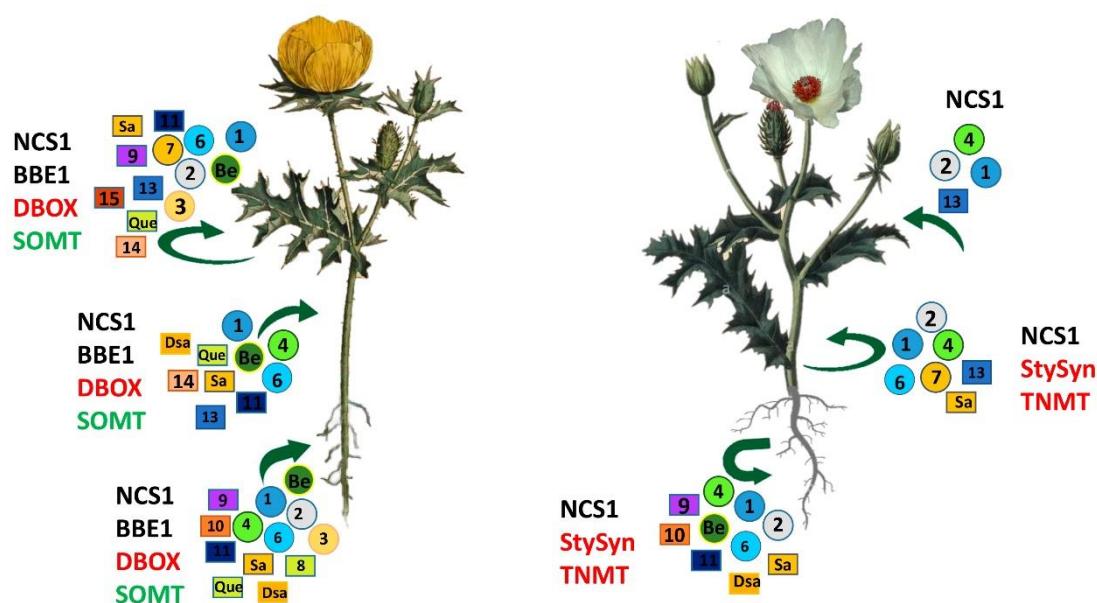


Figura 4.8 Integración de los perfiles de acumulación de los presuntos alcaloides detectados en perfiles cromatográficos de hoja, tallo y raíz (16 en total), así los niveles los transcritos en *A. mexicana* y *A. platyceras*. Compuestos: dentro de círculos para Sistema 1 de elución, dentro de cuadrados para el Sistema 2 de elución (ver Fig. 3.11); **NCS1 y BBE1** (ver Fig. 3.30), enzimas participantes en reacciones comunes de biosíntesis; **StySyn, TNMT y DBOX** (ver Fig. 3.31), enzimas participantes en la producción de sanguinarina; **SOMT** (Fig. 3.32), enzima participante en la formación de berberina.

4. 2 CONCLUSIONES

- La integración de los resultados obtenidos por CCF convencional y CCF de alta resolución (AR) fueron adecuados para la obtención de las huellas dactilares de las tres especies de *Argemone* y para la detección de 16 tipos de alcaloides, así como para el reconocimiento de cuatro ABI's con estándares, y la cuantificación de dos de ellos (sanguinarina y berberina).
- Se estableció que el análisis quimiométrico es oportuno para establecer la similitud entre las especies. Con la correlación de las señales cromatográficas se obtuvo que los perfiles de la parte aérea (hojas y tallos) en las tres especies analizadas es muy similar y la influencia de los 16 alcaloides detectados agrupan los perfiles de raíces de *A. ochroleuca* y *A. mexicana*, además que los individuos de *A. platyceras* en raíces, se separan en un grupo correlacionados con sanguinarina.
- Los análisis moleculares en individuos adultos de *A. mexicana* y *A. platyceras* resultaron interesantes ya que presentan diferencias en los sitios de biosíntesis de los ABI's que producen. Mientras que en *A. mexicana* se obtuvieron amplificaciones de genes de enzimas para la síntesis de berberina y sanguinarina, en *A. platyceras* no se obtuvieron amplificaciones para la síntesis de berberina, estos resultados en *A. platyceras* nos indican, que esta especie favorece la síntesis de ABI's tipo fenantridinas y que está directamente relacionada con sus estados de desarrollo.

4.3 PERSPECTIVAS

Una vez asentadas las bases quimiotaxonómicas de tres especies de *Argemone*, al combinar otras técnicas cromatográficas acopladas a técnicas espectroscópicas nos permitirían elucidar estructuralmente los alcaloides separados por CCF-AR.

Por otro lado, este trabajo presenta uno de los primeros acercamientos de tipo molecular sobre la síntesis de alcaloides en *A. platyceras*, y ya que se han iniciado las primeras secuencias de genes en esta especie, con la disponibilidad de su transcriptoma, bien se podrían abordar posteriormente nuevos aspectos sobre el proceso de síntesis de ABI's en esta planta.

La expansión de herramientas moleculares, así como estrategias de ingeniería metabólica darían lugar para interesantes oportunidades para *A. platyceras* y *A. ochroleuca* y fomentar mayor interés en otras especies del género, como recursos de gran potencial.

APÉNDICE

En esta sección se muestran los datos complementarios de los resultados (Capítulo III). En el Apéndice 1 se muestra la matriz de datos diseñada para los análisis quimiométricos en perfiles de hojas, tallos y raíces de las especies de estudio.

En el apéndice 2 se presentan los resultados de las secuenciaciones de los productos amplificados a partir de RNA de *A. platyceras*, así como sus respectivos alineamientos comparados con las secuencias correspondientes de *A. mexicana*.

Apéndice 1. Matriz de datos para análisis quimiométricos en perfiles de especies de *Argemone*

Se obtuvieron un total de 108 perfiles cromatográficos (considerando tres repeticiones, tres tejidos, tres individuos y cuatro especies/poblaciones) en cada uno de los sistemas de elución. El total de bandas cromatográficas observadas, de acuerdo a los valores de *R_f* fueron 16 (nueve observadas en el sistema 1 y siete en sistema 2). Se registró la altura de las señales cromatográficas para cada banda. La matriz de datos generada para los análisis de PCA y de conglomerados de la sección 3.7.1, del Capítulo III, se presenta en la figura A1.1. La columna 1 enlista las muestras analizadas en el densitómetro. La columna 2 despliega las claves utilizadas como nomenclatura para dichas muestras donde la primera letra se refiere a la especie (m y 2m, o, p; para *A. mexicana*, *A. ochroleuca* y *A. platyceras*, respectivamente) y la segunda al tejido (h, t, r; para hoja, tallo, r). De la columna 3 a la 18 se presentan los valores de las alturas registradas para cada uno de los 16 alcaloides. La matriz presenta un total de 108 hileras considerando tres repeticiones de tres tejidos de tres individuos de cuatro especies/poblaciones.

Para los análisis quimiométricos de los perfiles de raíces de las especies de *Argemone* (sección 3.7.2, del capítulo III), se analizaron las altura de las señales cromatográficas de las muestras número 73 hasta la número 108.

Figura A1.1. Matriz de datos de alturas máximas de bandas pertenecientes a los 16 alcaloides detectados en perfiles de *Argemone*.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
|---------|--------|-------|------|------|--------|--------|-------|-------|-------|------|------|------|--------|-------|------|------|--------|
| Muestra | Perfil | C1 | C2 | C3 | C4 | C5Be | C6 | C7 | C8Que | C9 | C10 | C11 | C12Sa | C13 | C14 | C15 | C16Dsa |
| 1 | Mh | 13 | 22.7 | 0 | 0 | 315 | 0 | 15.2 | 18.9 | 15.2 | 0 | 0 | 11.8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | Mh | 11.8 | 30.8 | 0 | 0 | 358.4 | 0 | 15.8 | 23.4 | 17.8 | 0 | 0 | 12.9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | Mh | 10.2 | 35.8 | 0 | 0 | 328.6 | 0 | 23.3 | 22.8 | 20.7 | 0 | 0 | 14.9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | Mh | 15.3 | 19.4 | 0 | 0 | 211.9 | 0 | 0 | 18.6 | 18.8 | 0 | 0 | 17.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | Mh | 14.4 | 24.6 | 0 | 0 | 289.5 | 0 | 0 | 12.4 | 17.1 | 0 | 0 | 17.1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | Mh | 13.3 | 24.4 | 0 | 0 | 154.7 | 0 | 0 | 9.3 | 13 | 0 | 0 | 16.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | mh | 14.8 | 15.6 | 0 | 0 | 189 | 0 | 0 | 12.5 | 20.9 | 0 | 0 | 12.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | mh | 13.9 | 13.8 | 0 | 0 | 243.3 | 0 | 0 | 10.4 | 18.4 | 0 | 0 | 10.9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | mh | 14.7 | 18.9 | 0 | 0 | 201.9 | 0 | 0 | 13.1 | 29.7 | 0 | 0 | 11.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 2mh | 28.4 | 32.4 | 18.4 | 0 | 288.5 | 10.5 | 0 | 5602 | 17.9 | 0 | 36.5 | 28.9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 2mh | 34.2 | 29.6 | 22.9 | 0 | 312.5 | 12.4 | 0 | 38.7 | 15.2 | 0 | 32.9 | 25.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 2mh | 30.4 | 31.3 | 24.4 | 0 | 307.7 | 11.9 | 0 | 47.3 | 19.7 | 0 | 32.9 | 27.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 2mh | 22.1 | 20 | 18 | 0 | 302.4 | 15.6 | 18 | 125.5 | 22.1 | 0 | 9.2 | 68.8 | 20.4 | 56 | 0 | 0 |
| 14 | 2mh | 18.9 | 17.5 | 17.2 | 0 | 229.6 | 14.2 | 24.1 | 80.9 | 21.4 | 0 | 12.4 | 45.3 | 18.9 | 52.1 | 0 | 0 |
| 15 | 2mh | 24.4 | 19.5 | 11.3 | 0 | 272.6 | 19.7 | 19.7 | 112.5 | 31.5 | 0 | 8.7 | 61.4 | 25.2 | 53.9 | 0 | 0 |
| 16 | 2mh | 12.4 | 18.9 | 0 | 0 | 460 | 26.9 | 13.9 | 66.3 | 10.1 | 0 | 33.3 | 24.3 | 0 | 23 | 0 | 0 |
| 17 | 2mh | 9.1 | 21.4 | 0 | 0 | 399.4 | 22.3 | 9 | 52.1 | 12.4 | 0 | 29.4 | 22.6 | 0 | 18.9 | 0 | 0 |
| 18 | 2mh | 13.5 | 31.7 | 0 | 0 | 502.3 | 26.1 | 11.3 | 69.4 | 12 | 0 | 27.3 | 25.7 | 0 | 24.1 | 0 | 0 |
| 19 | oh | 0 | 0 | 0 | 22.6 | 230.5 | 24.5 | 0 | 42.1 | 35.8 | 0 | 0 | 74.4 | 0 | 13.7 | 19.9 | 0 |
| 20 | oh | 0 | 0 | 0 | 19.9 | 289.7 | 31.9 | 0 | 62.1 | 29.1 | 0 | 0 | 72.3 | 0 | 12.5 | 15.4 | 0 |
| 21 | oh | 0 | 0 | 0 | 23.5 | 362.7 | 22.1 | 0 | 53.3 | 37.4 | 0 | 0 | 62.1 | 0 | 13.4 | 16.6 | 0 |
| 22 | oh | 0 | 32.4 | 0 | 70.7 | 420.3 | 0 | 0 | 26.3 | 35.1 | 0 | 0 | 36.7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | oh | 0 | 33.1 | 0 | 50 | 365 | 0 | 0 | 13.3 | 32.9 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | oh | 0 | 36.2 | 0 | 37.7 | 417.1 | 0 | 0 | 17.7 | 33.4 | 0 | 0 | 40.8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | oh | 0 | 43.2 | 0 | 89.6 | 387.7 | 0 | 0 | 45.8 | 32.6 | 0 | 0 | 56.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | oh | 0 | 49.5 | 0 | 66.4 | 372.9 | 0 | 0 | 42.3 | 45.1 | 0 | 0 | 51.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | oh | 0 | 42.3 | 0 | 112.2 | 380 | 0 | 0 | 44.2 | 43.5 | 0 | 0 | 46.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | ph | 12.9 | 29.6 | 0 | 0 | 0 | 16.6 | 13.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9.2 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | Ph | 14.2 | 21.2 | 0 | 0 | 0 | 13.7 | 12.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14.4 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | ph | 13.7 | 18.5 | 0 | 0 | 0 | 22.8 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9.3 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | ph | 13.4 | 40.1 | 0 | 0 | 41.1 | 16.9 | 10.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15.8 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | ph | 11.8 | 39.8 | 0 | 0 | 29.8 | 18.7 | 11.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19.6 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | ph | 19.5 | 31.4 | 0 | 0 | 38.6 | 19.9 | 14.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20.7 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | ph | 20.9 | 25.4 | 0 | 0 | 20.4 | 15.6 | 15.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14.7 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | ph | 17.2 | 29.6 | 0 | 0 | 12.8 | 20.1 | 13.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23.9 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | ph | 16.8 | 28.7 | 0 | 0 | 13.6 | 20.1 | 16.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18.4 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | mt | 502.3 | 0 | 0 | 0 | 3214 | 145.6 | 369.4 | 25.4 | 0 | 15.8 | 0 | 16.1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 38 | mt | 496.8 | 0 | 0 | 0 | 3416.8 | 158.9 | 334.7 | 13.9 | 0 | 22.3 | 0 | 21.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | mt | 488.9 | 0 | 0 | 0 | 4223.2 | 135.8 | 346.8 | 16.5 | 0 | 17.7 | 0 | 18.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | mh | 527.5 | 0 | 0 | 0 | 3005.6 | 449 | 456.6 | 25.5 | 0 | 15.4 | 0 | 15.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 41 | mt | 496.1 | 0 | 0 | 0 | 3260.1 | 480.2 | 472.3 | 21.3 | 0 | 14.8 | 0 | 17.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42 | mt | 503.7 | 0 | 0 | 0 | 3085.3 | 472.1 | 513.8 | 0 | 0 | 16.6 | 0 | 15.8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 43 | mt | 417.8 | 0 | 0 | 0 | 3150.4 | 95.8 | 160 | 42 | 56.2 | 19.4 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 44 | mt | 442.9 | 0 | 0 | 0 | 3256.8 | 102.4 | 107 | 43.2 | 42.1 | 12.6 | 0 | 17.7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 45 | mt | 409.2 | 0 | 0 | 0 | 3351.5 | 111.4 | 0 | 45.6 | 32.3 | 15.1 | 0 | 10.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 46 | 2mt | 452 | 0 | 0 | 0 | 3542.9 | 0 | 0 | 175.2 | 0 | 22.9 | 0 | 42.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 47 | 2mt | 526.5 | 0 | 0 | 0 | 3926.2 | 0 | 0 | 204.1 | 0 | 26.4 | 0 | 41.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | 2mt | 513.7 | 0 | 0 | 0 | 3614.4 | 0 | 0 | 199.3 | 0 | 34.7 | 0 | 55.8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 49 | 2mt | 583.1 | 0 | 0 | 0 | 2948.1 | 0 | 0 | 170.7 | 0 | 31.8 | 0 | 90.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | 2mt | 527.4 | 0 | 0 | 0 | 2756.4 | 0 | 0 | 199.4 | 49.4 | 26.6 | 0 | 82.1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 51 | 2mt | 618.4 | 0 | 0 | 0 | 2927.4 | 0 | 0 | 173.8 | 40.9 | 21.4 | 0 | 120.7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 52 | 2mt | 314.8 | 0 | 0 | 85.9 | 2648.2 | 0 | 0 | 230.1 | 0 | 22.4 | 0 | 105 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 53 | 2mt | 201 | 0 | 0 | 83.2 | 2748 | 0 | 0 | 189.6 | 0 | 0 | 0 | 111.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 54 | 2mt | 243.8 | 0 | 0 | 84.1 | 2812.7 | 0 | 0 | 210.9 | 0 | 20.8 | 0 | 88.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 55 | ot | 509.4 | 0 | 0 | 0 | 4546.3 | 234 | 169.2 | 45 | 19.4 | 16.6 | 19.2 | 76.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 56 | ot | 438.5 | 0 | 0 | 0 | 5614.9 | 219.4 | 193.8 | 35.6 | 26.7 | 16.2 | 20.8 | 96.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 57 | ot | 448.9 | 0 | 0 | 0 | 5692.6 | 227.9 | 186 | 35.2 | 23.2 | 12.4 | 30.2 | 86.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 58 | ot | 455.2 | 0 | 0 | 704.6 | 5348.4 | 150 | 92.3 | 28.3 | 19 | 42.3 | 29.7 | 76.4 | 2.5 | 0 | 0 | 0 |
| 59 | ot | 423.8 | 0 | 0 | 645.2 | 5278.9 | 143.4 | 99.9 | 31.4 | 14.6 | 26.4 | 24.3 | 46.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | ot | 517.8 | 0 | 0 | 569 | 5155.7 | 150.9 | 97.6 | 30.3 | 19.2 | 46.8 | 30.9 | 57.3 | 0.31 | 0 | 0 | 0 |
| 61 | ot | 310.3 | 0 | 0 | 606.4 | 4022.6 | 345.9 | 56.8 | 46.2 | 65.6 | 25.6 | 26.4 | 59.9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 62 | ot | 312.9 | 0 | 0 | 582.7 | 3204.4 | 328.1 | 90.4 | 40.4 | 36.2 | 15.4 | 17.8 | 76.1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 63 | ot | 275 | 0 | 0 | 616.3 | 3387.6 | 348.1 | 89.2 | 39.7 | 32.9 | 16.3 | 23.6 | 76.7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 64 | pt | 281.6 | 0 | 0 | 1548 | 0 | 767.9 | 599.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 65 | pt | 236.8 | 0 | 0 | 1942 | 0 | 780.4 | 712.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16.7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 66 | pt | 205.8 | 0 | 0 | 1509.8 | 0 | 722.9 | 645.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 67 | pt | 112.6 | 0 | 0 | 458.2 | 0 | 741.6 | 514 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 68 | pt | 136.4 | 0 | 0 | 422.9 | 0 | 763.6 | 645 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23.9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 69 | pt | 134.4 | 0 | 0 | 441.6 | 0 | 794.7 | 400.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 70 | pt | 122.4 | 0 | 0 | 584.1 | 0 | 740.2 | 869.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 71 | pt | 126.9 | 0 | 0 | 596.3 | 0 | 736.9 | 814.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22.8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 72 | pt | 132.6 | 0 | 0 | 482.2 | 0 | 763 | 904.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25.1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 73 | mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 3012.2 | 0 | 0 | 312.2 | 0 | 85.4 | 0 | 1479 | 126.8 | 0 | 0 | 0 |
| 74 | mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 2945.6 | 0 | 0 | 345.8 | 0 | 96.7 | 0 | 1117.3 | 122.2 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|--------|-------|-------|--------|---------|-------|---|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|---|-------|
| 75 | mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 2718.2 | 0 | 0 | 356.9 | 0 | 91.5 | 0 | 1225.4 | 147.3 | 0 | 0 | 0 |
| 76 | mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 1245.1 | 0 | 0 | 459.2 | 0 | 214.2 | 0 | 987 | 342.7 | 0 | 0 | 0 |
| 77 | mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 1348.2 | 0 | 0 | 524.3 | 0 | 213 | 0 | 1085.7 | 326.1 | 0 | 0 | 0 |
| 78 | mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 1426.7 | 0 | 0 | 580.4 | 0 | 219 | 0 | 1189.5 | 318.2 | 0 | 0 | 0 |
| 79 | mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 2046.3 | 0 | 0 | 312.4 | 0 | 175.6 | 0 | 816.3 | 214.2 | 0 | 0 | 0 |
| 80 | mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 1992.8 | 0 | 0 | 305 | 0 | 218 | 0 | 1085.5 | 173.7 | 0 | 0 | 0 |
| 81 | mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 1708.9 | 0 | 0 | 249.6 | 0 | 200.4 | 0 | 1185.2 | 188.1 | 0 | 0 | 0 |
| 82 | 2mr | 219 | 86 | 0 | 508.3 | 7456.1 | 329.1 | 0 | 1914.2 | 214.6 | 214 | 714.2 | 4547 | 159.7 | 203.1 | 0 | 0 |
| 83 | 2mr | 212.4 | 145.6 | 0 | 456.9 | 7846.2 | 314.7 | 0 | 1733.4 | 198.8 | 184.7 | 645.7 | 4986.5 | 210 | 186.7 | 0 | 0 |
| 84 | 2mr | 229.8 | 149.4 | 0 | 441.8 | 7953.7 | 311.4 | 0 | 1870.6 | 222.9 | 161.1 | 642.9 | 4944.5 | 240.5 | 223.7 | 0 | 0 |
| 85 | 2mr | 385.2 | 290.4 | 0 | 312.2 | 10845.6 | 110.2 | 0 | 1523.3 | 225.5 | 98.2 | 318 | 1807 | 151.7 | 0 | 0 | 0 |
| 86 | 2mr | 342.1 | 296.3 | 0 | 405.6 | 10478.2 | 96 | 0 | 1478 | 212.7 | 56 | 215.2 | 2545 | 173.1 | 0 | 0 | 0 |
| 87 | 2mr | 358.7 | 253.3 | 0 | 344.2 | 10869.5 | 93.8 | 0 | 2160.2 | 248.8 | 74.3 | 197.3 | 2287.6 | 145.9 | 0 | 0 | 0 |
| 88 | 2mr | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 302.8 | 0 | 1678.2 | 258.6 | 0 | 352.7 | 1947.3 | 408.7 | 321 | 0 | 0 |
| 89 | 2mr | 120 | 0 | 0 | 0 | 345.6 | 345.1 | 0 | 1814.3 | 196.6 | 0 | 498.6 | 2009.3 | 322.6 | 385.4 | 0 | 0 |
| 90 | 2mr | 148.5 | 0 | 0 | 0 | 124.8 | 439.3 | 0 | 1889.5 | 210.8 | 0 | 516.7 | 1444.9 | 337.3 | 361.6 | 0 | 0 |
| 91 | or | 0 | 0 | 0 | 2815.2 | 2389.7 | 0 | 0 | 962.3 | 245.3 | 245.9 | 320.4 | 1545.9 | 0 | 518.3 | 0 | 0 |
| 92 | or | 0 | 0 | 0 | 2415.8 | 2645.1 | 0 | 0 | 1178 | 201.4 | 302.5 | 271.9 | 1626.4 | 0 | 429.9 | 0 | 0 |
| 93 | or | 0 | 0 | 0 | 2473.9 | 2670.1 | 0 | 0 | 1115.9 | 209.7 | 292.2 | 401.6 | 1892.6 | 0 | 419.8 | 0 | 0 |
| 94 | or | 0 | 0 | 0 | 3045.1 | 2849.3 | 0 | 0 | 542.7 | 190 | 306.4 | 218.6 | 1236.9 | 0 | 329.4 | 0 | 0 |
| 95 | or | 0 | 0 | 0 | 3258.3 | 3045.2 | 0 | 0 | 492.6 | 176.6 | 266.8 | 250.7 | 1576 | 0 | 209.4 | 0 | 0 |
| 96 | or | 0 | 0 | 0 | 2667.8 | 3076.7 | 0 | 0 | 538.8 | 218.1 | 259 | 209.3 | 1472.6 | 0 | 232.2 | 0 | 0 |
| 97 | or | 0 | 0 | 0 | 2489.4 | 2667.1 | 0 | 0 | 1686.4 | 277.4 | 640.2 | 529.7 | 987.4 | 0 | 322.8 | 0 | 0 |
| 98 | or | 0 | 0 | 0 | 2968.7 | 2947.3 | 0 | 0 | 1256 | 302 | 552.4 | 815.3 | 1248 | 0 | 420.8 | 0 | 0 |
| 99 | or | 0 | 0 | 0 | 3202.3 | 3046 | 0 | 0 | 1421.2 | 275.6 | 700.7 | 795.8 | 1361.9 | 0 | 399.4 | 0 | 0 |
| 100 | pr | 288.8 | 0 | 314.7 | 1245.8 | 5596.2 | 544.2 | 0 | 251.4 | 172.6 | 203.8 | 502.9 | 8475.1 | 0 | 85.7 | 0 | 503 |
| 101 | pr | 295.6 | 0 | 289.7 | 1322.7 | 5924.7 | 586.7 | 0 | 302.6 | 205.8 | 175 | 438.2 | 6456.2 | 0 | 99.6 | 0 | 614.1 |
| 102 | pr | 305.7 | 0 | 280.9 | 1310.5 | 6049.2 | 530.5 | 0 | 315.7 | 218.9 | 179.2 | 424.2 | 7968 | 0 | 117.7 | 0 | 508.9 |
| 103 | pr | 912.4 | 0 | 0 | 345.1 | 2814 | 589.9 | 0 | 316.8 | 340.5 | 0 | 287.9 | 5978 | 0 | 0 | 0 | 659.6 |
| 104 | pr | 814.4 | 0 | 0 | 245 | 2715.1 | 528.7 | 0 | 302.1 | 302.7 | 0 | 362.1 | 5743.3 | 0 | 0 | 0 | 607.2 |
| 105 | pr | 705 | 0 | 0 | 855.6 | 2627.3 | 500.5 | 0 | 256.8 | 294.3 | 0 | 393.7 | 6033.9 | 0 | 0 | 0 | 758.2 |
| 106 | Pr | 1245.3 | 0 | 241.5 | 895.1 | 3967.1 | 614.8 | 0 | 0 | 233.7 | 596.3 | 285.6 | 6984.9 | 0 | 411.5 | 0 | 402.1 |
| 107 | Pr | 1245.3 | 0 | 186.2 | 915.6 | 3347.2 | 545 | 0 | 0 | 270.8 | 680.4 | 389.4 | 7012 | 0 | 375 | 0 | 398.1 |
| 108 | Pr | 1340.1 | 0 | 231.4 | 980.5 | 3763.8 | 754.8 | 0 | 0 | 230.2 | 754.6 | 327 | 8972.3 | 0 | 356.5 | 0 | 329.6 |

Apéndice 2. Análisis de amplicones obtenidos de *A. platyceras*

En este apéndice se muestran los datos complementarios para las secciones 3.8.1 y 3.8.2 del Capítulo III. Tomando en cuenta que los fragmentos amplificados a partir del ARN total extraído de los tejidos de *A. platyceras* fueron obtenidos con el uso de cebadores diseñados a partir de secuencias de *A. mexicana*, se llevó a cabo su secuenciación, con la finalidad de su comprobación. A continuación en la Figura A2.1 se muestran los fragmentos amplificados de los diferentes tejidos y etapas que fueron secuenciados. Los transcritos analizados fueron NCS1, TNMT, StySyn y SOMT (ver Figs. 3.30, 3.31, 3.32 para las abreviaturas). Se analizaron plantas en diferentes etapas de desarrollo (E1, E2, E3; ver Fig. 3.34

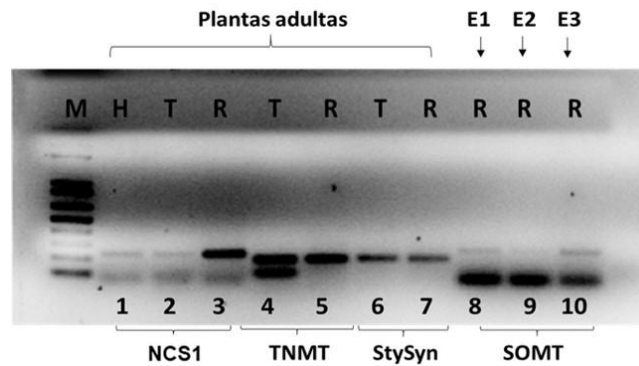


Figura A2.1 Fragmentos amplificados de *A. platyceras* en diferentes tejidos y estados de desarrollo, incluye los genes NCS1, TNMT, StySyn y SOMT. Ver Figs. 3.30, 3.31, 3.32 y 3.34 para las abreviaturas.

Para la verificación de los fragmentos obtenidos de *A. platyceras*, se utilizaron transcritos diseñados para *A. mexicana*. Las comparaciones se realizaron utilizando las secuencias nucleotídicas identificadas de *A. mexicana* y disponibles en bancos de información o bases de datos, como NCBI (National Center for Biotechnology Information). El programa utilizado para el alineamiento fue DNAMAN setup. Las secuencias de nucleótidos se compararon entre sí con la finalidad de obtener un porcentaje de identidad entre ellos y la similitud de las secuencias amplificadas en *A. platyceras* contras *A. mexicana*. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras posteriores.

```

Upper line: DNAMAN1, from 170 to 390
Lower line: DNAMAN2, from 1 to 214

NCSAm1:180528-022_K12_1A70ZA0164.ab1 (209 pb) Identity=53%
170 CAATCTGTGATAAGAAAGGAAGTTACATATGAATTGGAAGTACC.AACATCAGCTGATTC
   ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1   KAAABICTCGCATCTTAGACCITTTAC.CACCATTTGGAGGGCGCCTGATGACATCTAACT
229 AATTGGGCAGTITACAGTTCACCCAACATTCCTACACITCTAAGAGATGTTCTACTTCC
   ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
60  .TTCGAAACCCCTTGAACCTCAC..ATCCCTGCCAATTGTTTCGATGTTGGGTGAACTATA
289 TGGTGTITTTTGAAGCTAGATGTGATTGAGGGCAATGGTGGTGTGGAACTGTTCTTGA
   ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
116 TGCTGCCCTAATTGAATCAGCTGAGGTTG.GGGTAATGGTGGAGTTGTAACCTGTTCTTGA
349 CAITGTTTTCCCTCCAGGTGCTGTGCCCCGTTGTTACAAGA
   ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
175 CAITGTTTCCCCCCC..CCGGAATCCTTGTACCATTAAAA
    
```

Figura A2.2 Alineamiento de los nucleótidos de NCSAm1 y la secuencia del fragmento (#1) de NCS obtenido en hojas de plantas adultas de *A. platyceras*. El porcentaje de identidad entre ellos es de 53%, las estrellas marcan la similitud de las secuencias.

```

Upper line: DNAMAN1, from 641 to 858
Lower line: DNAMAN6, from 2 to 218

NCSAm1:180528-022_l16_1A70ZAO165.ab1 (218 pb) Identity=50%
641  AATCAATCTGTGATAAGAAAGGAAGTTACATATGAACTGCAAGITCCAACCTCAGCTGAT
    ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
2    AABGGGGCGCTGTGTCATGTAAGGTTAC.TGCCCTAGGTTAGCCATGATGACATCTAAT

701  TCAATTTGGGCAGTTTATAGTTCACCCAAACATTCCTACAATTCTCAGGGATGTTCTGCTT
    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
61   C...TTTCGAAAACACCAGGAAGCAGAACATCCCTGAGAATTGTTGGAATGTTGGGTGA

761  CCTGG...TGTTTTCGAAAGATTAGATGTCATCAAGGGTAATGGTGGTGTGGAACTGT
    ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
117  ACTATAAATGCCCTCATTGAATCAGATGAGGTCGGAGCTTGCGGTGCATATGGAACCTC

817  TCTTGACATTGTTTCCCATCCAGGTAATCCATGTACTACTA
    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
177  CTTTCTTATTGTTTCCCATCCCGGAAATCCTTGTCTACAA

```

Figura A2.3 Alineamiento de los nucleótidos de NCSAm1 y la secuencia del fragmento (#2) de NCS obtenido en tallo de plantas adultas de *A. platyceras*. El porcentaje de identidad entre ellos es de 50%, las estrellas marcan la similitud de las secuencias.

```

Upper line: DNAMAN1, from 645 to 858
Lower line: DNAMAN2, from 3 to 216

NCSAm1:180528-022 A14 1A70ZAO166.ab1 (216 pb) Identity=59%
645  AATCTGTGATAAGAAAGGAAGTTACATATGAACTGCAAGITCCAACCTCAGCTGATCAA
    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
3    AABATCTCAATCTTTTACATGTTACTAGCCTTCCGTTACCCCTTGATGACATCTAATCTTT

705  TTTGGGCAGTTTATAGTTCACCCAAACATTCCTACAATTCTCAGGGATGTTCTGCTTCTCG
    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
63   CGAAAACACCAGGAAGCAGACCATCCCTGCCAATTGTTGGAATGGTGGGTGAGCTTCTCG

765  GTGTTTTCGAAAGATTAGATGTCATCAAGGGTAATGGTGGTGTGGAACTGTTCTTGACA
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
123  GTGTTTTCAATGAAATCAGATGACGTCGAGGGTATGGTGCCTGTTGGAATGTTCTTGACA

825  TTGTTTCCCATCCAGGTAATCCATGTACTACTA
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
183  TTGTTTCCCATCCAGGAAATCCATGTACTACAA

```

Figura A2.4 Alineamiento de los nucleótidos de NCSAm1 y la secuencia del fragmento (#3) de NCS obtenido en raíz de plantas adultas de *A. platyceras*. El porcentaje de identidad entre ellos es de 59%, las estrellas marcan la similitud de las secuencias.

La comparación de secuencias de los fragmentos amplificados para NCS en hoja, tallo y raíz de *A. platyceras* con las secuencias reportadas de la isoforma 1 de NCS para *A. mexicana* (Figs. A2.2, A2.3 y A2.4), presentaron un rango de identidad del 50-59%, y con estos porcentajes se sugiere que son similares y que el grado de conservación revela las posibles relaciones evolutivas en las diferentes especies. También se puede inferir que en *A. platyceras* existen otras isoformas para este gen así como sucede en *A. mexicana*.

Las secuencias de los fragmentos amplificados para TNMT en tallo y raíz de *A. platyceras*, se compararon con las secuencias reportadas de este mismo gen en *Papaver bracteatum* (Papaverácea) (Figs. A2.5 y A2.6), especie productora de benzofenantridinas y morfinaos (Sharafi et al., 2013) el porcentaje de identidad (más alto) fue de 71% en tallos y 43% en raíces.

```

Upper line: DNAMAN1, from 750 to 925
Lower line: DNAMAN2, from 2 to 171

TNMT KR260909.1 Papaver bracteatum :180528-022_C12_1A70ZAO167.ab1 (167 pb) Identity=71%
750 GCTGCTAATAGTCTCCTCTATTTCAGGATGATGTTTCAGTTGTGGATCATTGGGTTGTC
    * * * * *
2 AAABAAAAGAGCTCTCTATTTC .AGGATGATGTTTCCGTTGCG .ATCATTGGGTCCTT

810 AACGGAATGCACATGGCTCGTTTCAGTAGACATTTGGAGAAAGGCACTAGACAAAAATATG
    * * * * *
60 GACGCAATG .GCATGGCTCGTTCCGTACAGGCATGGAGAAAGAACTAAACACGAATATG

870 GAAGCTGCAAAAGAAATTCATTACCTGGACTTGGAGGAAGCCACGAAGCAGTAAA
    * * * * *
119 TCAGCTGGGAAGAGAGAA .AATACCTGCACITGGAAGA .GTCATGAACCAGGGAA

```

Figura A2.5 Alineamiento de los nucleótidos de TMNT en *Papaver bracteatum* y la secuencia del fragmento (#4) de TNMT obtenido en tallo de plantas adultas de *A. platyceras*. El porcentaje de identidad entre ellos es de 71%, las estrellas marcan la similitud de las secuencias.

```

Upper line: DNAMAN1, from 292 to 472
Lower line: DNAMAN2, from 1 to 175

TNMT KR260909.1 Papaver bracteatum :180528-022_E14_1A70ZAO168.ab1 (170 pb) Identity=43%
292 CAGAAGAAGCTGCACATGAATTATACTGTGAACGAGCACAGATCAAAGATGGACAAACTG
    * * * * *
1 EAAABGGCGTTTTTGGTGGTTTCT .CTGTTTGTGCGCATCGTTTCTGTGTTGTACTGATCC

352 TTCTCGACATTGGTTGTTGGTCAAGGTGGTCTAGTTCTATACATTGCTCGGAAATATAAGA
    * * * * *
60 TCTTTCCATTCTACTGGCCAGAATG . . . . .TCTTCTCCTTGTGATGAACATAGCA

412 AATGTCATGTTACAGGGCTCACTAATTCAAAGGCACAAGTCAATTACTTACTC .AAGCAA
    * * * * *
114 AATCCTGGAAGICTTAGTACGGCAATTTAAGTTAAAAGCTGACCCACAGCTTCTGAACAA

```

Figura A2.6 Alineamiento de los nucleótidos de TMNT en *Papaver bracteatum* y la secuencia del fragmento (#5) de TNMT obtenido en raíces de plantas adultas de *A. platyceras*. El porcentaje de identidad entre ellos es de 43%, las estrellas marcan la similitud de las secuencias.

Por otra parte, las secuencias de los fragmentos amplificados para StySyn en raíz de plantas adultas de *A. platyceras*, se compararon con las secuencias reportadas de este mismo gen en *A. mexicana* (Figs. A2.7 y A2.8), los porcentajes de identidad fueron

superiores al 80%, lo que indica que es altamente probable que las secuencias de *A. platyceras* pudieran corresponder en realidad a StySyn.

```
Upper line: DNAMAN1, from 860 to 1034
Lower line: DNAMAN2, from 3 to 178

StySynAm :180528-022_E12_1A70ZAO169.ab1 (173 pb) Identity=88%
860 ATCGTTAAATTCACCTACTAATACT.TACTTACATTTTCTTAGATCACAGAACTACGAAG
* * * * *
3 AABATGAATCGCGAGTACTATGACTGTACTTACATTTTCTTAGATCCCCCAACTACAAG

919 ATGAAGTTATTATATTCGCGATATTTGAAGCTTATCTTTTGGGIGTAGATAGTACTTCTT
*****
63 ATGAAGTTATTATATTCGCTATATTTGAAGCTTATCTTTTGGGTGAACATAGTACTTCTT

979 CAACTACAGCATGGGCACTCGCGTATTTAATACGAGAACCAAATGTTCAAGAGAAA
* *****
123 CTACTACAGCATGGGCACTCGCGTATTTAATACGAGAACCAAATGTTCAAGAGAAA
```

Figura A2.7 Alineamiento de los nucleótidos de StySyn en *Argemone mexicana* y la secuencia del fragmento (#6) de StySyn obtenido en raíces de plantas adultas de *A. platyceras*. El porcentaje de identidad entre ellos es de 88%, las estrellas marcan la similitud de las secuencias.

```
Upper line: DNAMAN1, from 860 to 1034
Lower line: DNAMAN2, from 2 to 177

StySynAm :180528-022_G12_1A70ZAO170.ab1 (172 pb) Identity=84%
860 ATCGTTAAATTCACCTACTAATACTTACTTACATTT.TCTTAGATCACAGAACTACGAAG
* * * * *
2 AAABATAATCGCGAGTACTATGCTGTAGTTGCAGTTGTCTTATCTCCCCCACTACAAG

919 ATGAAGTTATTATATTCGCGATATTTGAAGCTTATCTTTTGGGIGTAGATAGTACTTCTT
*****
62 ATGAAGTTATTATATTCGCTATATTTGAAGCTTATCTTTTGGGTGTACATAGTACTTCTT

979 CAACTACAGCATGGGCACTCGCGTATTTAATACGAGAACCAAATGTTCAAGAGAAA
* *****
122 CTACTACAGCATGGGCACTCGCGTATTTAATACGAGAACCAAATGTTCAAGAGAAA
```

Figura A2.8 Alineamiento de los nucleótidos de StySyn en *Argemone mexicana* y la secuencia del fragmento (#7) de StySyn obtenido en raíces de plantas adultas de *A. platyceras*. El porcentaje de identidad entre ellos es de 84%, las estrellas marcan la similitud de las secuencias.

Las secuencias de los fragmentos amplificados para SOMT en plantas de los estados de desarrollo E1, E2 y E3 en *A. platyceras*, se compararon con las secuencias reportadas de este mismo gen en *A. mexicana* (Figs. A2.9, A2.10 y A2.11), los % de identidad en los estados de desarrollo E1 y E3 estuvieron arriba del 80%, y en el estado E2 de 54 %, estos porcentajes confirman que son similares.

```

Upper line: DNAMAN1, from 314 to 559
Lower line: DNAMAN2, from 1 to 241

SOMTAm:180528-022_K14_1A70ZAO171.ab1 (237 pb) Identity=68%
314 CACAAGTTTCTGCAACTGACTTAGTTTCTAAAATGTCCAACATAATCAATAACCCCTAATG
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1   KAAABTCCACTGAAAGGGCATTAGCTTCTGTG.TGTC.GTCATAATGTTCCACCCTGTTG

374 CACCCATCTTTCTAGACAGAATACTTAGATTGTTGGGTGTAAGCTCTATCCTATCCATG
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
59  CACACTTCTTTCTGGAC.GACTACTAAGATTGTTGGCCGTC.GCTCTATCCTATCCAAGT

434 CTACGAGGGCTATTTGCGCCATTATCGTCGTCAAATGGAAAAATCATGAACAAAGTGGAAA
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
117 CTACTAGGGCTATTTCTCCATTATCTCCGTCAAATGGAAAAATCGCGATCAAAGTGTA

494 GGGTTTACGGTTTAAACGGAAGAATCTCGTTCTTTGGTTCTCGCGAGGAGGATGGAGTAT
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
177 GGATGTTGGACTTTTGTAGAAAATACGTCGTGTTGTGGAACCTTGCTTATGATCCAA.AT

554 CGTGT
    * * *
236 CCTGAT

```

Figura A2.9 Alineamiento de los nucleótidos de SOMT en *Argemone mexicana* y la secuencia del fragmento (#8) de SOMT obtenido en raíces de plantas en el estado de desarrollo 1 de *A. platyceras*. El porcentaje de identidad entre ellos es de 68%, las estrellas marcan la similitud de las secuencias.

```

Upper line: DNAMAN1, from 311 to 554
Lower line: DNAMAN2, from 2 to 235

SOMTAm:180528-022_I12_1A70ZAO172.ab1 (232 pb) Identity=54%
311 AAGCACAAGTTTCTGCAACTGACTTAGTTTCTAAAATGTCCAACATAATCAATAACCCTA
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
2   AAABTCAAAAATCTCGTGATCATCTTCGGT...GAGTCCTCA...TACCTTTCCCTTTG

371 ATGCACCCATCTTTCTAGACAGAATACTTAGATTGTTGGGTGTAAGCTCTATCCTATCCA
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
54  TTGCACATTTCTTTCTTGAC.GACTACAAAGATTAATAGGCGTCGCACAATGG.ATCCA

431 TGICTACGAGGGCTATTTGCGCCATTATCGTCGTCAAATGGAAAAATCATGAACAAAGTGG
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
112 AGTCTACTTAGGCTATTTCTCCATTAATCCGTCAAATGGAATGGTCGCAATAAGGTTAT

491 AAAGGGTTTACGGTTTAAACGGAAGAATCTCGTTCTTTGGTTCTCGCGAGGAGGATGGAG
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
172 AAATTATGTTGGACTTTTGTAGAAACTACTCTGCTGCGGATCCTTGCTTCTGATCCAA

551 TATC
    * *
232 TTCC

```

Figura A2.10 Alineamiento de los nucleótidos de SOMT en *Argemone mexicana* y la secuencia del fragmento (#9) de SOMT obtenido en raíces de plantas en el estado de desarrollo 2 de *A. platyceras*. El porcentaje de identidad entre ellos es de 54%, las estrellas marcan la similitud de las secuencias.

somniferum y *Papaver bracteatum*, la secuencia mostró 96% de identidad , por lo que se demuestra que existen secuencias conservadas de genes entre especies productoras de alcaloides (Ziegler et al., 2006).. En otro estudio realizado a partir de cultivos celulares de *Thalictrum flavum* (Samanani y Facchini, 2004), se aisló un gen de Norcoclaurina sintasa (NCS). Después de realizar una expresión heteróloga del cDNA de NCS, se produjo una proteína recombinante con actividad NCS. Se detectó homología entre NCS y proteínas identificadas en el látex de *P. somniferum*, también, mostró 35% de identidad con la enzima (HYP1) responsable de la biosíntesis de la hipericina naftodioantrona bioactiva en Hierba de San Juan (Bais et al., 2003).

BIBLIOGRAFÍA

- Akowuah, G. A., Zhari, I., Norhayati, I., & Mariam, A. (2006). HPLC and HPTLC densitometric determination of andrographolides and antioxidant potential of *Andrographis paniculata*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2-3), 118-126.
- Bais, H. P., Vepachedu, R., Lawrence, C. B., Stermitz, F. R., & Vivanco, J. M. (2003). Molecular and biochemical characterization of an enzyme responsible for the formation of hypericin in *St. John's wort* (*Hypericum perforatum* L.). *Journal of Biological Chemistry*, 278 (34), 32413-32422.
- Chávez M.L.D, Rolf M, Gesell A, Kutchan T.M. (2011). Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana*. *Arch Biochem Biophys*.507:186-193.
- Da Silva, F. M., Koolen, H. H., da Silva Pereira, J. L., Flach, A., da Costa, L. A. M., de Souza, A. D., & Pinheiro, M. L. B. (2015). Chemotaxonomy of the Amazonian *Unonopsis* species based on GC-MS and chemometric analysis of the leaf essential oils. *Records of Natural Products*, 9 (4), 530.
- Gutteling, E. W., Riksen, J. A. G., Bakker, J., & Kammenga, J. E. (2007). Mapping phenotypic plasticity and genotype–environment interactions affecting life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity*, 98 (1), 28.
- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54 (5), 647-672.
- Haisova, K., Slavik, J., & Dolejš, L. (1973). Alkaloids of the Papaveraceae. LI. Additional alkaloids from *Argemone albiflora* HORNEM. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 38 (11), 3312-3320.

- Hung, T. M., Na, M., Dat, N. T., Ngoc, T. M., Youn, U., Kim, H. J., ... & Bae, K. (2008). Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *Journal of ethnopharmacology*, 119 (1), 74-80.
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H. P., & Vivanco, J. M. (2002). Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (21), 5878-5883.
- Lortie, C. J., & Aarssen, L. W. (1996). The specialization hypothesis for phenotypic plasticity in plants. *International Journal of Plant Sciences*, 157 (4), 484-487.
- Lloret, F., Escudero, A., Iriondo, J. M., Martínez-Vilalta, J., & Valladares, F. (2012). Extreme climatic events and vegetation: the role of stabilizing processes. *Global Change Biology*, 18 (3), 797-805.
- Rashid, M. A., Gustafson, K. R., Kashman, Y., Cardellina, J. H., McMahon, J. B., & Boyd, M. R. (1995). Anti-HIV alkaloids from *Toddalia asiatica*. *Natural product letters*, 6 (2), 153-156.
- Reich, E., & Schibli, A. (2007). High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. Thieme.
- Rubio Piña, J. (2009). Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Mérida, Yucatán: CICY.
- Samanani, N., Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2004). Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*, 40 (2), 302-313.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Castillo-Henkel, C., & Navarrete, A. (2008). Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of *Argemone ochroleuca* Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 60 (2), 229-236.

- Saurina, J. (2010). Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (3), 234-245.
- Sharafi, A., Sohi, H. H., Mousavi, A., Azadi, P., Dehsara, B., & Khalifani, B. H. (2013). Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29 (11), 2125-2131.
- Sharma, P., Srinivas Bharath, M. M., & Murthy, P. (2010). Qualitative high performance thin layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in urine samples of Cannabis abusers. *Indian Journal of Medical Research*, 132 (2), 201.
- Schwarzbach, A. E., & Kadereit, J. W. (1999). Phylogeny of prickly poppies, *Argemone* (Papaveraceae), and the evolution of morphological and alkaloid characters based on ITS nrDNA sequence variation. *Plant Systematics and Evolution*, 218 (3-4), 257-279.
- Srivastava, ManMohan. (Ed.). (2010). High-performance thin-layer chromatography (HPTLC). Springer Science & Business Media.
- Tang, T. X., Guo, W. Y., Xu, Y., Zhang, S. M., Xu, X. J., Wang, D. M., ... & Yang, D. P. (2014). Thin-layer chromatographic identification of Chinese propolis using chemometric fingerprinting. *Phytochemical analysis*, 25 (3), 266-272.
- Tian, R. T., Xie, P. S., & Liu, H. P. (2009). Evaluation of traditional Chinese herbal medicine: Chaihu (*Bupleuri Radix*) by both high-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic fingerprint and chemometric analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216 (11), 2150-2155.
- Vázquez-Flota, F., Rubio-Piña, J., Xool-Tamayo, J., Vergara-Olivares, M., Tamayo-Ordoñez, Y., Monforte-González, M., Guízar-González, C., Mirón-López, G. (2018). Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzyloquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 41 (1): 13 – 21.

- Xie, P., Chen, S., Liang, Y. Z., Wang, X., Tian, R., & Upton, R. (2006). Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *Journal of chromatography A*, 1112 (1-2), 171-180.
- Xool-Tamayo, J., Serrano-Gamboa, G., Monforte-González, M., Mirón-López, G., & Vázquez-Flota, F. (2017). Development of newly sanguinarine biosynthetic capacity in in vitro rootless shoots of *Argemone mexicana* L. Mexican prickly poppy. *Biotechnology letters*, 39 (2), 323-330.
- Ziegler, J., Voigtländer, S., Schmidt, J., Kramell, R., Miersch, O., Ammer, C. & Kutchan, T. M. (2006). Comparative transcript and alkaloid profiling in Papaver species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *The Plant Journal*, 48 (2), 177-192.
- Zlatkis, A., & Kaiser, R. E. (2011). HPTLC-high performance thin-layer chromatography (Vol. 9). Elsevier.