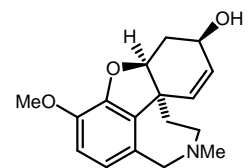


LA BIODIVERSITAT COM A FONT DE RECURSOS NATURALS PER UNA EXPLOTACIÓ SOSTENIBLE

Dr. JAUME BASTIDA
 Grup de Productes Naturals
 Facultat de Farmàcia. UB
jaumbastida@ub.edu

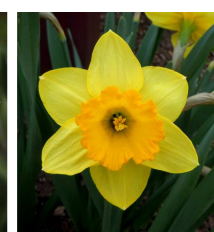
GALANTAMINA (Gal) Y ENF. ALZHEIMER (EA)



Galantamina
 Reminyl®
 Razadyne® (USA)



Leucojum aestivum



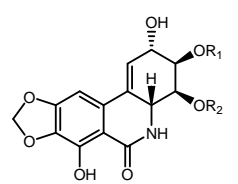
Narcissus cv Carlton



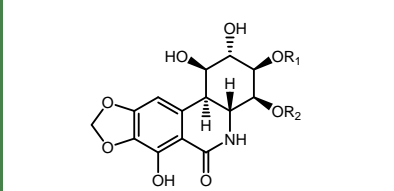
Hippeastrum papilio



OTROS ALCALOIDES DE LAS AMARYLLIDACEA



sal de piridinio de 3,4-O-fosfato cíclico de narciclasina
 $R_1, R_2 =$



sal sódica de 3,4-O-fosfato cíclico de pancratistatina
 $R_1, R_2 =$ Na^+
 pancratistatina $R_1=R_2=H$

Narciclasina y Pancratistatina

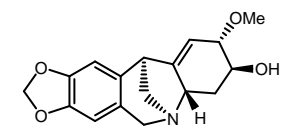
- Antitumorales. Fase clínica.
- Inhiben selectivamente:
 - crecimiento sarcoma M5076
 - proliferación de leucemia linfocítica P388
- Inducen apoptosis específica en cáncer de mama.

Problemas de solubilidad de la base

OTROS ALCALOIDES DE LAS AMARYLLIDACEA

Patente: US2016024074 (A1)

Montanina

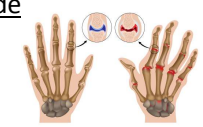


Fracción de alcaloides de los bulbos de *Rhodophiala bifida*



Tratamiento/prevenión de:

- artritis reumatoide
- colitis ulcerosa
- sepsis
- osteoporosis
- infecciones inflamatorias
- artritis psoriásica
- artritis crónica juvenil
- otras enf. inflamatorias no específicas de articulaciones



Inventores:
 Gnieslaw de Oliveira, P.; Pereira Ramos Pedrazza, G.; Farinon, M; Ricardo Machado, X.; Zuanazzi, J.A.S.; Spies, F.
 UFRGS y HCPA (RS, Brasil)

DESARROLLO SOSTENIBLE, CAMBIO CLIMÁTICO Y ECOSISTEMAS
Diversidad Biológica para el Desarrollo Sostenible

Objetivos Específicos

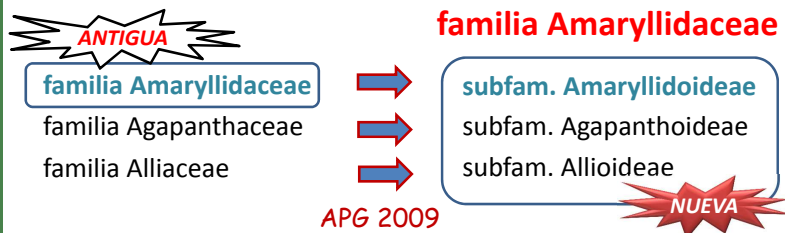
- bioprospección de Amaryllidaceae
- evaluar los recursos
- identificar nuevos compuestos
- identificar nuevas fuentes **Gal**
- bases para aprovechamiento sostenible
- obtención de **Gal** a nivel de planta piloto



UNIVERSIDADES IMPLICADAS



LA FAMILIA AMARYLLIDACEAE



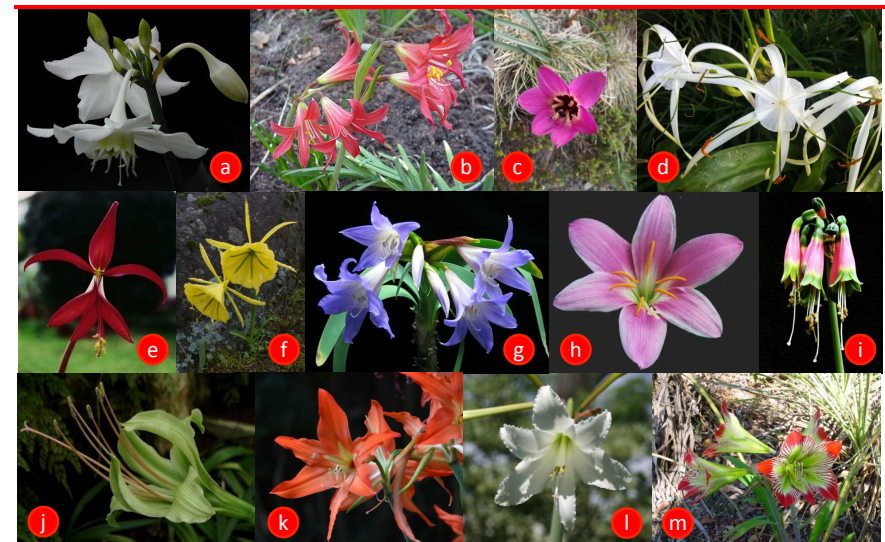
Amaryllidaceae

Agapanthaceae

Allioideae

Chase, Reveal, Fay (2009) *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 132-6

AMARYLLIDACEAE DE IBEROAMERICA



[a] *Eucharis amazonica*, [b] *Rhodophiala moelleri*, [c] *Rhodophiala andicola*, [d] *Hymenocallis littoralis*, [e] *Sprekelia formosissima*, [f] *Ismene amancaes*, [g] *Worsleya procera*, [h] *Zephyranthes grandiflora*, [i] *Phaedranassa dubia*, [j] *Hippeastrum calyptratum*, [k] *Hp. striatum*, [l] *Hp. argentinum*, [m] *Hp. psittacinum*

1. BIOPROSPECCIÓN: MUESTREO

1. Cumplimiento de los requisitos legales: **Convenio sobre la Biodiversidad** (1993) y **Protocolo de Nagoya** (2010)
2. Prospección de la Biodiversidad. **Recolección 300 g PF**
3. Colección de material de Herbario centralizado en la UTI (Quito, Ecuador), integrado en el Missouri Botanical Garden (<http://tropicos.org/>)
4. Banco de germoplasma. **Micropropagación bulbos**



Home Names Specimens References Projects Images More Tools

Tropicos® was originally created for internal research but has since been made available to the world's scientific community. All of the nomenclatural, bibliographic, and specimen data accumulated in MBG's electronic databases during the past 30 years are publicly available here. This system has nearly 1.3 million scientific names and over 4.4 million specimen records.

Click an image for detailed information:

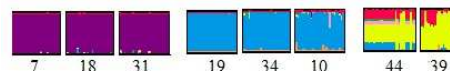


Quick Name Search Search Search Exact

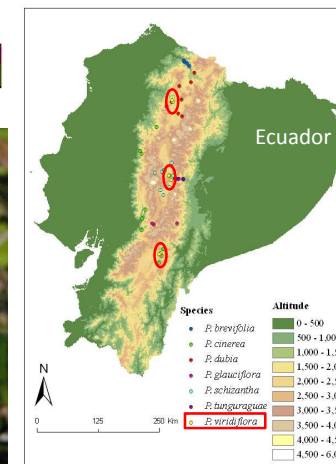
Common Name

1. BIOPROSPECCIÓN: ANÁLISIS GENÉTICO

Phaedranassa viridiflora Baker



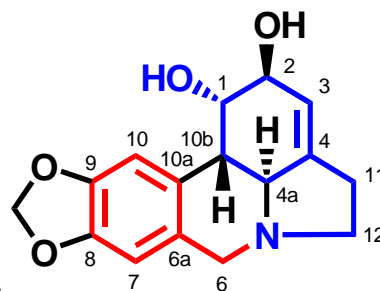
Prof. Alan Meerow



Oleas, Meerow, Ortega (2016) Genetic structure of the threatened *Phaedranassa schizantha* (Amaryllidaceae) *Botanical Journal of the Linnean Society* 1-11

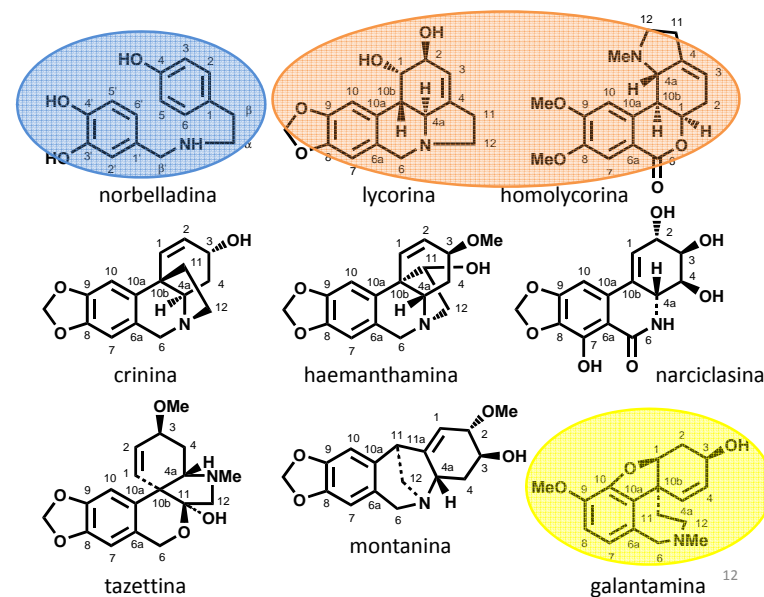
2. ESTUDIO PRELIMINAR: LOS ALCALOIDES

- Lycorina, *Lycoris radiata*
- Aislamiento: **Gerrad, 1877**
- Caracterización estructural: **Nagakawa et al., 1956:**
- Numeración: **Ghosal, Saini & Razdan, 1985**



- Bastida, Lavilla, Viladomat (2006)** Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In *The Alkaloids* **63**: 87-179
- Bastida, Berkov, Torras, Pigni, de Andrade, Martínez, Codina, Viladomat (2011)** Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 65-100
- Berkov, Osorio, Viladomat, Bastida (2019)** Chemodiversity, Chemotaxonomy and Chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. In *The Alkaloids* **83**: 000

2. ESTUDIO PRELIMINAR: ALCALOIDES PRINCIPALES



2. ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS MUESTRAS

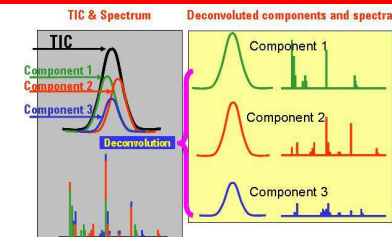
1. Extracción de 300 g PF → estudios preliminares: caracterizar compuestos a [0.001%] de PF
2. Escasa manipulación
3. Instrumental/técnicas avanzadas



13

2. ESTUDIO PRELIMINAR: GC-MS

Agilent 6890 + MSD 5975
AMDIS software (Automatic
Mass Spectral Deconvolution
and Identification System)



- Columnas: DB5 / HP5
baja polaridad (30m x 0.25mm x 0.25µm) // tiempo: ~ 40 min.

Programa de Temperatura:

100-180°C a 15°C/min, 180-300°C a 5°C/min,
mantener 10 min a 300°C
T Inyector: 250°C // Flujo (He): 0.8 mL/min
[1mg/mL] // Inyección: 1 µL // Split 1:20

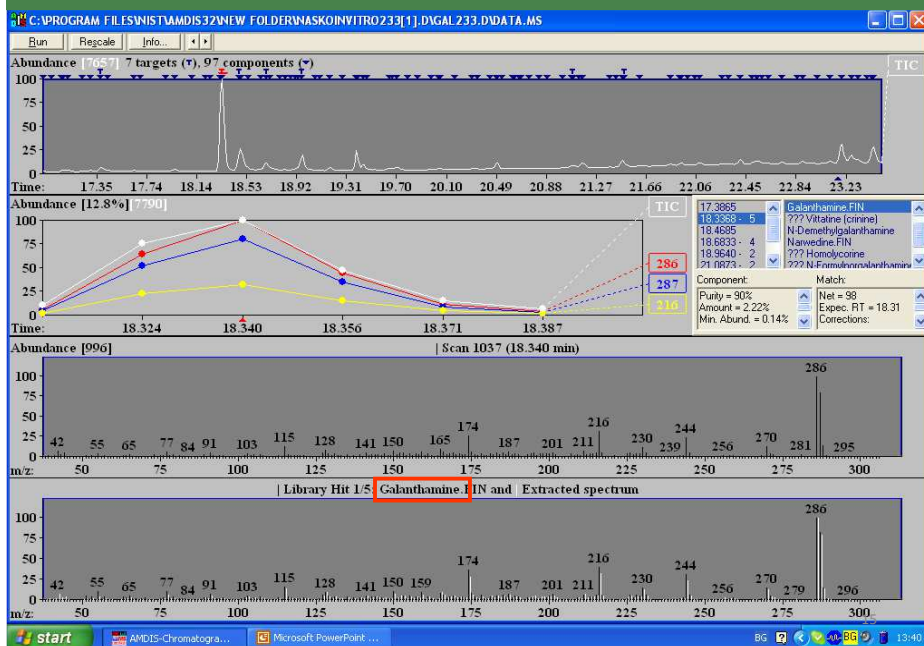
Derivatización:

5 mg extracto + Piridina (50µL)
90 min a 40°C con BSTFA (50µL)
Evaporar a sequedad N₂
Redisolver en 250 µL de MeOH

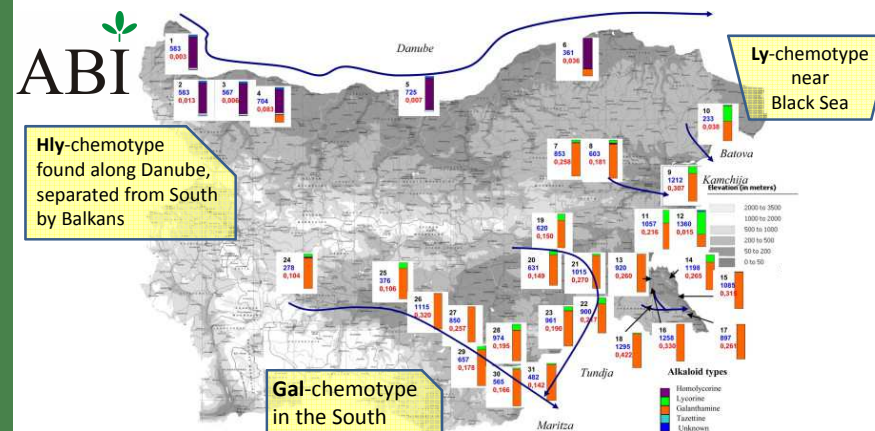
- Los valores del Índice de Kovats (RI) de los compuestos se mide con mezcla patrón de alcanos saturados (C9-C36)

Torras, Berkov, Jáuregui, Caujapé, Viladomat, Codina, Bastida (2010) *Phytochem. Anal.* 21, 80-8

Detección de Galantamina



Quimiotipos de *Leucojum aestivum* en Bulgaria

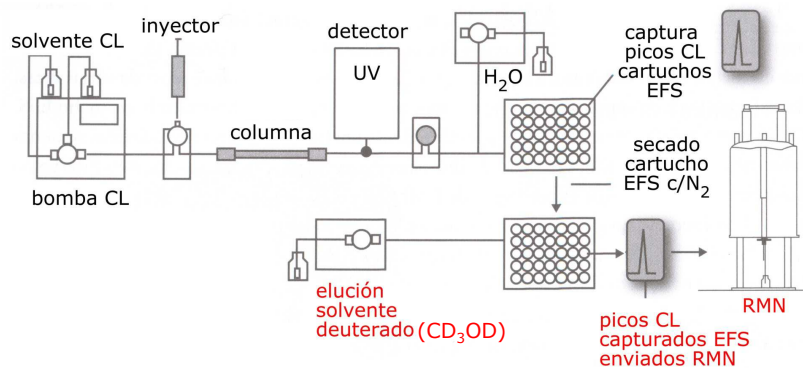


El contenido medio de Gal varía de 0.003 a 0.08% (PS) en el Norte, hasta un 0.42% en las poblaciones del Sur. Algunos individuos alcanzan el 0.65% en Gal

Berkov, Georgieva, Kondakova, Viladomat, Bastida, Atanassov, Codina (2013) *Biochemical Systematics and Ecology* 46: 152-61

16

3. CARACTERIZACIÓN PARCIAL: LC-SPE-NMR

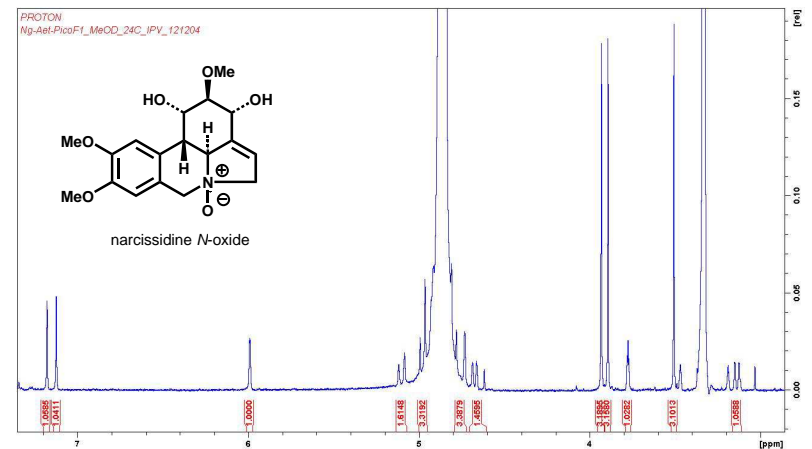


- Extracto a [40 mg/mL]. Inyección de 5µL x3 (DAD/EFS)
- Columna ProntoSIL Eurobond fase reversa C18, 125x4 mm, 5µm
- Gradiente de la fase móvil (flujo 0.5 mL/min)
A (H₂O + 0.1%TFA) // B (ACN + 0.1%TFA)
- Cartuchos de EFS resina GP (divinilbenzeno), 10x2 mm, 10 µm

t (min)	%B
0	5
3	5
48	22
51	100
56	100
57	5
60	5

3. CARACTERIZACIÓN PARCIAL: LC-SPE-NMR

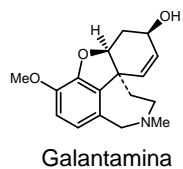
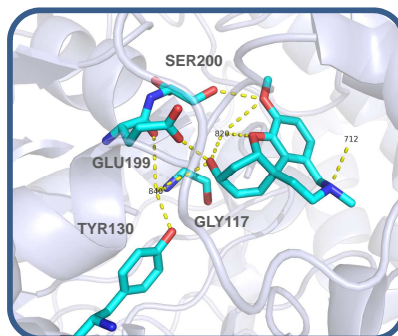
F1, m/z 350 C₁₈H₂₃NO₆



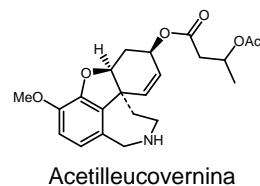
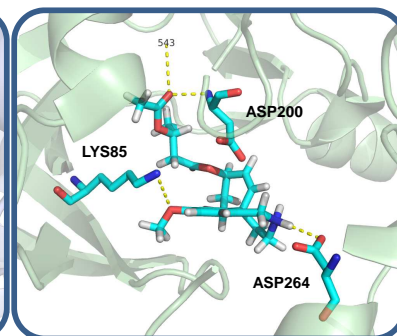
18

4. DOCKING DIANAS EA: ACE, BCE, GSK-3β

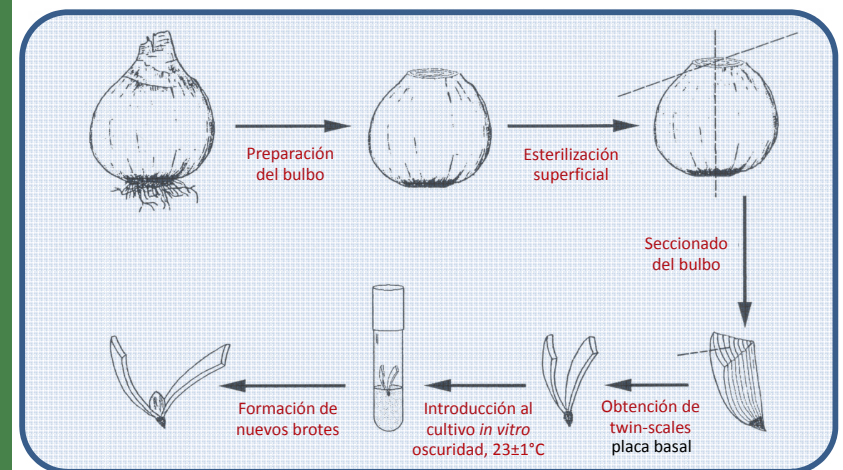
ACE *Torpedo californica*



GSK-3β



5. MICROPROPAGACIÓN *in vitro*

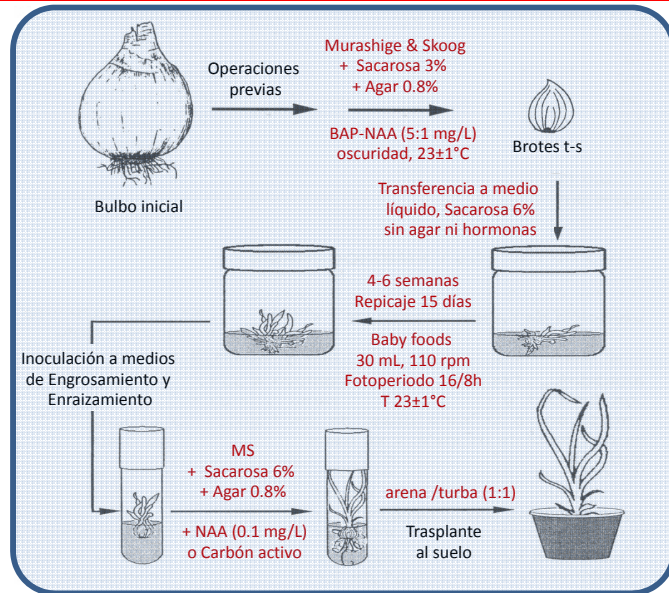


Sellés, Bergoñón, Viladomat, Bastida, Codina (1999). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49: 129-36

Sellés, Viladomat, Bastida, Codina (1999). *Plant Cell Reports* 18: 646-51

20

5. MICROPROPAGACIÓN *in vitro*



21

5. MICROPROPAGACIÓN *in vitro*: *Leucojum aestivum*



BAP 2 mg/mL + NAA 0.15 mg/mL



3 meses después

22

5. MICROPROPAGACIÓN *in vitro*: *Hippeastrum papilio*

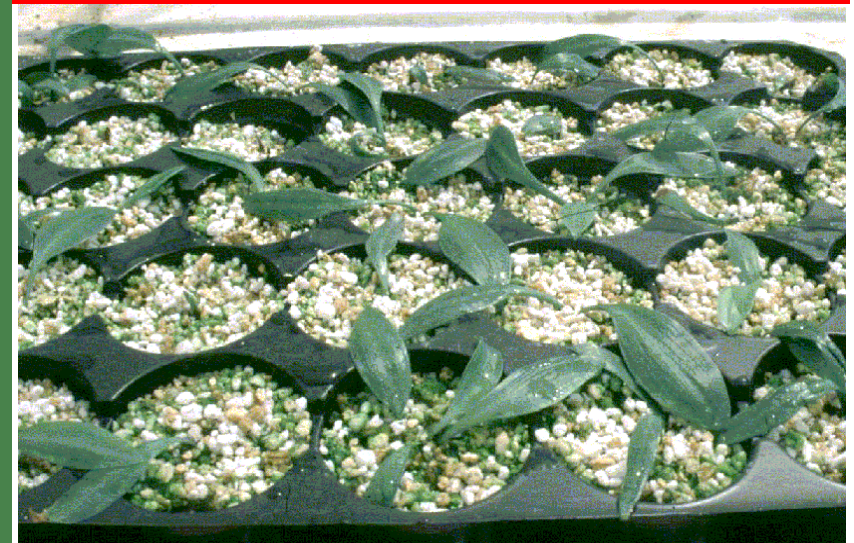


aclimatación

- ① Twin scaling on MS + 2 mg/L BAP and 0,1 mg/L NAA, ② Bulb formation 30 days after scaling, ③ Bulb formation 50 days after scaling, ④ Bulb growing in temporary immersion, ⑤ Bulbs ready for planting, ⑥ Acclimated bulbs

23

5. MICROPROPAGACIÓN *in vitro*



Colque, Viladomat, Bastida, Codina (2002). *Journal of Horticultural Science & Biotech.* 77: 739-43

6. COMPLETAR CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

MS, HRMS

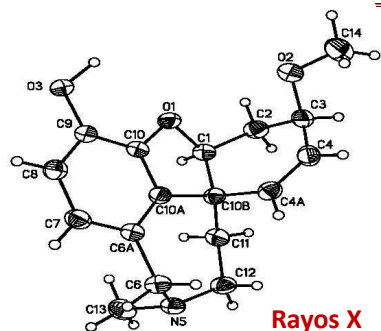
pf, $[\alpha]_D$, UV, IR

RMN 1D: $H^1/C^{13}/DEPT$

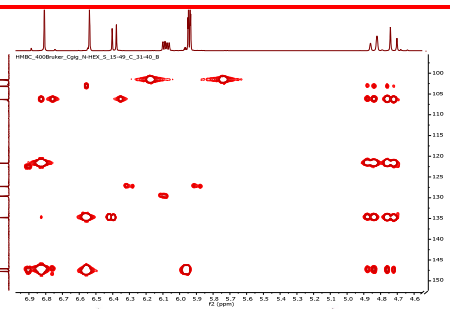
RMN 2D: COSY, HMQC

NOESY, HMBC

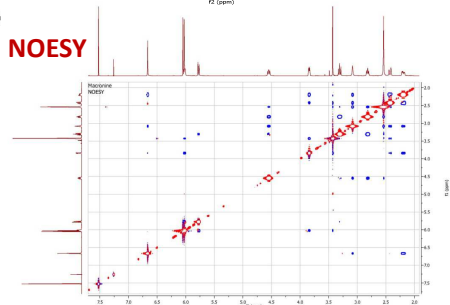
Rayos X, CD



HMBC

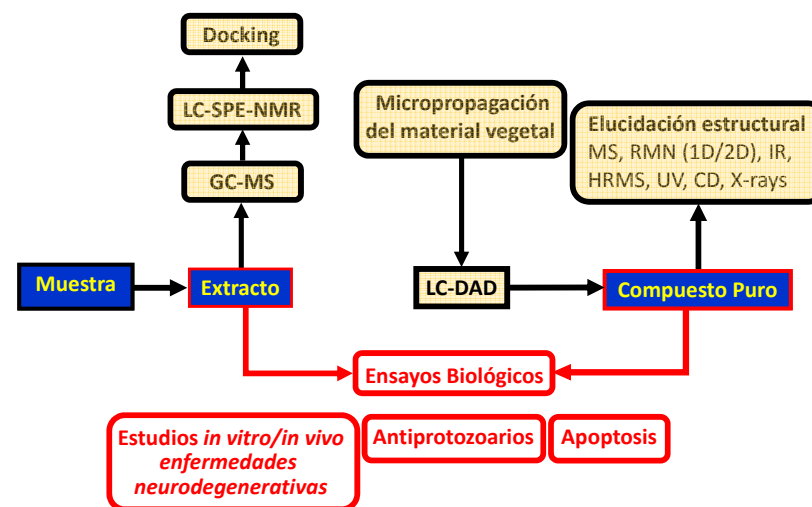


NOESY



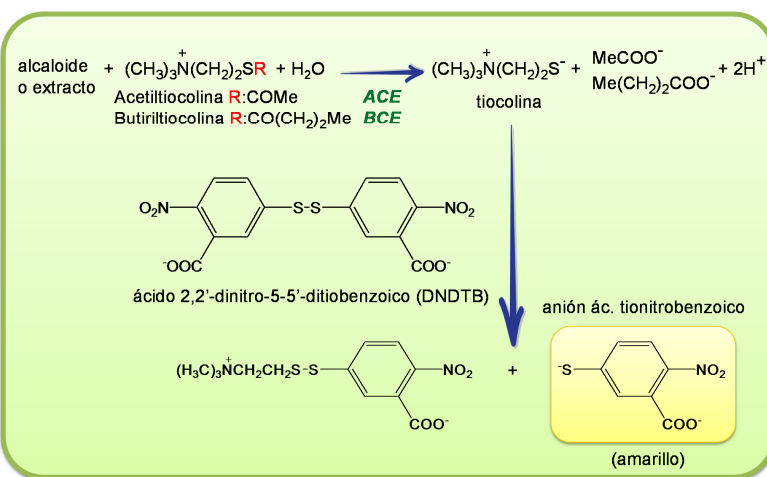
Rayos X

7. ENSAYOS DE LAS ACTIVIDADES *in vitro* E *in vivo*



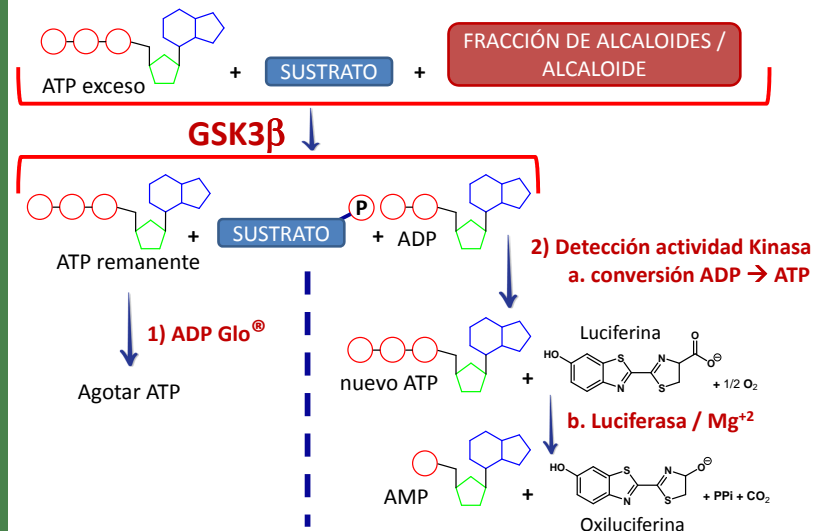
26

7. ESTUDIO ACTIVIDADES *in vitro*: INHIBICIÓN ACE/BCE



Ellman, Courtney, Andres jr, Featherstone (1961) *Biochemical Pharmacol.* 7: 88-90
 López, Bastida, Viladomat, Codina (2002) *Life Sciences* 71: 2521-2529

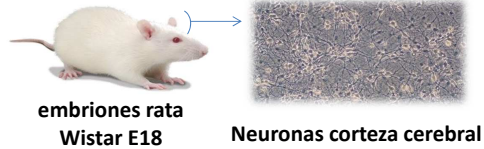
7. ESTUDIO ACTIVIDADES *in vitro*: INHIBICIÓN GSK3 β



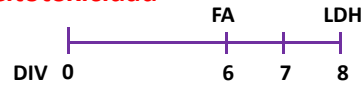
Baki, Bielik, Molnár, Szendrei, Keresü (2007) *Assay and Drug Development Technology* 5: 75-83

7. ESTUDIO ACTIVIDADES *in vitro*: NEUROPROTECCIÓN

- Cultivos primarios

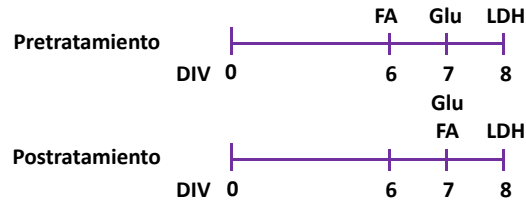


- Ensayo de Citotoxicidad



FA (µg/mL)	
0,75	6,00
1,50	12,00
3,00	24,00

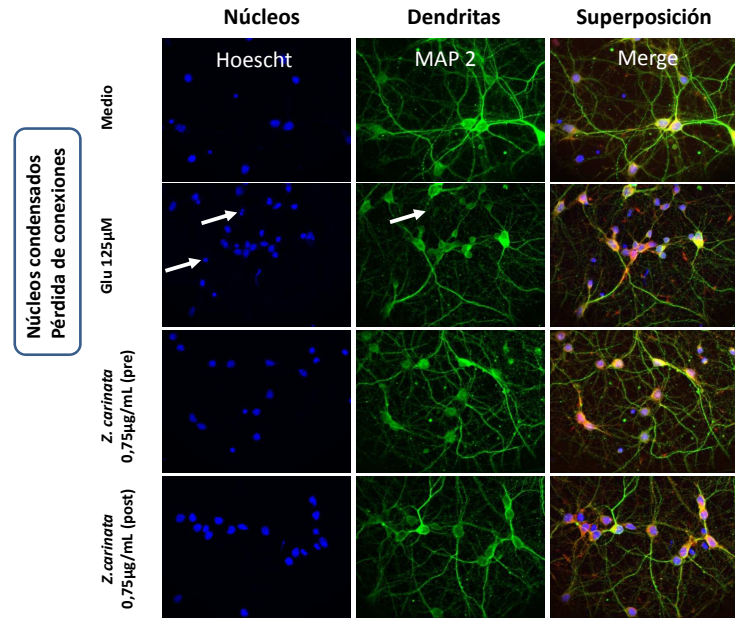
- Ensayo de Neuroprotección (toxicidad por Glu)



LDH: Lactato Deshidrogenasa liberación → muerte cél. (colorimétrico)
Glu: Glutamato 125µM, 20min

Cortés, Posada, Alvarez, Alzate, Berkov, Cardona-Gómez, Osorio (2015) *Life Sci.* 122: 42-50

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA NEURONAS



7. ESTUDIO ACTIVIDADES *in vivo*: modelo TRANSGÉNICO

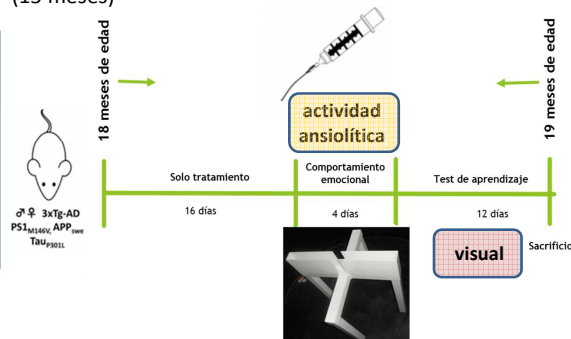


Extracto rico alcaloides 10mg/Kg x2 veces día vehículo DMSO 1% (vía intraperitoneal)



3 lotes experimentales

- No Transgénicos tratados con vehículo (sol. salina)
- Transgénicos tratados con vehículo
- Transgénicos tratados con FA



Sabogal-Guáqueta, Muñoz-Manco, Ramírez-Pineda, Lamprea-Rodríguez, Osorio, Cardona-Gómez (2015) *Neuropharmacology* 93, 134-45

31

10. PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN DE Gal



Extracción por parte de la Empresa

32

Tabla 1: Aplicación de esta Guía a la fabricación de sustancias activas

Tipo de fabricación		Aplicación de esta Guía a las etapas (marcadas en gris) empleadas en el tipo de fabricación			
Síntesis química	Fabricación del Material de partida API de	Introducción del Material de partida API en el proceso	Fabricación de intermedio(s)	Aislamiento y purificación	Procesado físico envasado v
API derivado de fuentes animales	Recogida del órgano, fluido o tejido	Troceado, mezcla, y/o procesado inicial	Introducción del Material de partida API en el proceso	Aislamiento y purificación	Procesado físico envasado v
API extraído de fuentes vegetales	Recolección de la planta	Troceado y extracción inicial	Introducción del Material API de partida en el proceso	Aislamiento y purificación	Procesado físico envasado v
Extracto vegetal usado como API	Recolección de la planta	Troceado y extracción inicial		Extracción adicional	Procesado físico envasado v
API formado por plantas molidas o pulverizadas	Recolección de la planta y/o cultivo y cosecha	Troceado/molienda			Procesado físico envasado v
Biotecnología Fermentación/ cultivo celular	Establecimiento del banco de células patrón y de trabajo	Mantenimiento del banco de células de trabajo	Cultivo celular y/o fermentación	Aislamiento y purificación	Procesado físico envasado y
Fermentación clásica para fabricación de un API	Establecimiento del banco de células	Mantenimiento del banco de células	Introducción de células en la fermentación	Aislamiento y purificación	Procesado físico envasado v

NCP – Normas Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario
 API – Ingrediente Farmacéutico Activo
http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm (01/09/2014)



Moltes gràcies