

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO QUÍMICO DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES  
EN *Caliphuria subdentata* (Amaryllidaceae)**

**DIANA JIMENA LÓPEZ BENAVIDES  
CATALINA DEL PILAR SEGURA BETANCOURTH**

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

**Director:**

**FABIO ANTONIO CABEZAS FAJARDO. (Ph. D)**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Julio 2003**

## INTRODUCCIÓN

La familia botánica **Amaryllidaceae** tiene una amplia distribución geográfica, con poblaciones especialmente importantes en Sur África, Centro y Sur América, sin olvidar los géneros que tienen distribución restringida en el área Mediterránea y en el Cáucaso<sup>1</sup>. Colombia por su ubicación en el trópico ecuatorial, presenta una gran diversidad botánica entre las que se incluye la familia de **Amaryllidaceae**. Esta familia botánica es bien reconocida por sus follajes, las formas, los colores de sus flores y por producir bulbos ricos en alcaloides biogenéticamente relacionados con un gran potencial terapéutico<sup>2</sup>.

Estos alcaloides constituyen un grupo de compuestos del metabolismo secundario vegetal que tienen como característica principal la de ser exclusivos dentro de esta familia de plantas; por lo tanto, tienen un valor quimiotaxonómico importante. Los alcaloides del tipo **Amaryllidaceae** se caracterizan por poseer: una estructura base C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-N-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, átomo de nitrógeno que puede ser secundario, terciario o incluso cuaternario, ser bases moderadamente débiles con un pKa variable entre 6-9 y oscilar en el número de átomos de carbono de 16 a 20 dependiendo de los sustituyentes del sistema aislado<sup>3</sup>. En Colombia se reporta la existencia del género *Caliphruria* que prospera bajo condiciones de sombra (umbrofila), la mayor parte de las especies se encuentran hacia el occidente de la cordillera de los Andes por debajo de los 1000 m.s.n.m., siendo los departamentos de Cauca, Valle, Nariño, Chocó y Caldas en donde se reporta la presencia de sólo 4 especies de *Caliphruria*, siendo 3 de estas endémicas de Colombia<sup>2</sup>.

El interés por los alcaloides de las **Amaryllidaceae** esta motivado por el considerable número de acciones farmacológicas que presentan, a pesar de esto sólo se ha estudiado la actividad biológica y terapéutica de algunos de ellos. La mayoría muestran un efecto inhibitorio de la actividad de diferentes enzimas, además de retrasar el proceso de crecimiento en algunos tipos de semillas. También presentan actividad antiviral y antitumoral<sup>4</sup>.

La galantamina es el alcaloide de **Amaryllidaceae** más importante desde el punto de vista farmacológico debido a sus distintas aplicaciones terapéuticas. En los últimos tiempos, este alcaloide ha adquirido una especial relevancia en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, comercializándose con el nombre de Reminyl®<sup>5</sup>.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un buen camino para encontrar nuevos productos bioactivos es el estudio de material vegetal. Como ya se ha mencionado, los alcaloides de las **Amaryllidaceae** no se reportan en otras familias. La mayoría de estos alcaloides solo se han detectado en la subfamilia Amaryllidoideae, que agrupa 9 tribus con más de 37 géneros<sup>6</sup>, entre los que se encuentra el género *Caliphruria* que aunque no se ha agrupado en ninguna de dichas tribus, pertenece a esta subfamilia productora de alcaloides de **Amaryllidaceae**. Conociendo esto, a partir de la especie *Caliphruria subedentata* se analizará el extracto metanólico con el fin de determinar si se presenta alcaloides del tipo de las **Amaryllidaceae**; y si existen, establecer la cantidad de cada uno de ellos en dicha especie.

*Caliphruria subedentata*, endémica de la subregión Pacífica del departamento del Cauca y que se encuentra en amenaza de extinción<sup>7</sup> se propone como una posible fuente alternativa de galantamina, sustancia que en la actualidad tiene un claro interés terapéutico, pues como inhibidor de acetilcolinesterasas cerebrales es un fármaco empleado en la enfermedad de Alzheimer<sup>8</sup>.

Los ensayos que se realicen determinarán la presencia o no, de galantamina en *C. subedentata*; de encontrarse un resultado positivo, esta variedad constituirá una nueva fuente de dicho alcaloide que posibilitará excelentes proyecciones económicas para la región en la producción de droga natural empleada para tratamiento de la enfermedad del Alzheimer con el establecimiento de cultivos que permitan el aprovechamiento de dicho metabolito.

### 1.1 HIPOTESIS

¿Tiene la especie *Caliphruria subedentata* alcaloides típicos de la familia **Amaryllidaceae**? ¿Podría la especie *Caliphruria subedentata* presentar alcaloides del tipo galantamina? ¿Se puede constituir esta especie en una nueva fuente de galantamina?

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GENERALES

- ❖ Contribuir al estudio del contenido alcaloídico de la especie *Caliphruria subedentata*, mediante técnicas analíticas de extracción, purificación y espectroscópicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Aislar, purificar e identificar alcaloides desde la fase orgánica de *Caliphruria subedentata* por diferentes técnicas cromatográficas y espectroscópicas de IR, RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY-2D, ROESY) y MS.
- ❖ Identificar la presencia de galantamina en la especie *Caliphruria subedentata* mediante técnicas analíticas cromatográficas y espectroscópicas como aporte a la búsqueda de fuentes naturales del alcaloide.
- ❖ Preparar derivados a partir de algunos de los alcaloides aislados con el objeto de comprobar la presencia de algunos grupos funcionales.

### 3. JUSTIFICACION

En la actualidad existen varias estrategias para la obtención de Galantamina y alcaloides relacionados, entre ellas se encuentra la síntesis química en la que todavía se presentan grandes problemas como la poca estereoespecificidad con la que se transcurren las reacciones de oxidación y reducción de sus precursores más directos; bajo rendimiento con que se obtiene y su elevado costo<sup>9</sup>. Es por esto que la demanda de galantamina extraída de fuentes vegetales está en aumento, asociada a la alta incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa y Norteamérica.

La extracción a partir del material de campo se ha realizado tradicionalmente de diferentes especies de *Galanthus* y *Leucojum*, las cuales crecen principalmente en el Este de Europa, sin embargo el éxito comercial de este alcaloide se vio restringido por su limitada disponibilidad a partir de dichas fuentes naturales tradicionales<sup>10</sup>. Y aunque algunas especies de Narcisos contienen apreciables cantidades de galantamina se estima que desde su plantación hasta su plena producción deberán pasar al menos 6 años, de manera que al final de esta década se necesitarán más de 20000 toneladas de bulbos por año para producir 1 kg de galantamina<sup>11</sup>. En Europa, la galantamina se extrae de una pequeña flor conocida como gota de nieve (*Galanthus nivalis*) de la que se requiere enormes cantidades de biomasa para producir galantamina que se traduce en un alto costo de la droga<sup>12</sup>.

En este sentido *C. subdentata* podría ser una especie que permita obtener mayores cantidades de dicho metabolito, generando así en primera instancia un campo de investigación con el fin de diseñar estrategias para cultivos sostenibles de **Amaryllidaceae** que generen un desarrollo comunitario y busquen la conservación de esta importante familia de plantas. En segunda instancia reducir los costos de tratamiento a los enfermos que padecen el mal de Alzheimer que según la Revista Colombia de Psiquiatría “afecta hoy a más de 20 millones de personas, con enorme consecuencias sobre la economía de los países y constituyen uno de los temas de investigación más activos en el área de la salud”<sup>13</sup>.

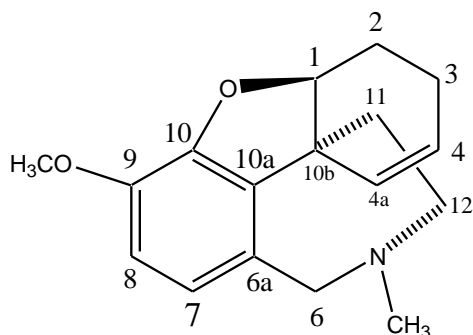
Con el presente trabajo se pretende sentar las bases para el establecimiento de un sistema experimental de obtención de galantamina y otros alcaloides de interés, alternativo a la síntesis orgánica, como consecuencia de su elevado costo y bajo rendimiento. Las investigaciones ahora iniciadas tendrán su continuidad en la optimización de la producción de estos compuestos, las cuales llevará a cabo el Grupo de Estudios Ambientales.

## 4. ANTECEDENTES

Los alcaloides de las **Amaryllidaceas** constituyen el grupo de compuestos del metabolismo secundario, el interés por ellos no es nuevo, se inicia en el siglo pasado con el aislamiento de licorina de *Narcissus pseudonarcissus*<sup>14</sup>. Desde entonces el número de alcaloides aislados ha ido en aumento hasta alcanzar alrededor de 350 en la actualidad. Estos compuestos tienen una característica y es la exclusividad dentro de la familia Amaryllidaceae, y más concretamente en la subfamilia *Amaryllidoideae*, y salvo las excepciones de mesembrenol, aislado de *crinum olonthum* y 6-epimesembranol en *Narcissus pallidulus*<sup>15</sup>, no se conoce la existencia de otros tipos de alcaloides en esta familia de plantas.

La galantamina (figura 1) es de especial interés no sólo por su estructura química, sino por sus propiedades farmacológicas, en particular el carácter inhibitorio de la enzima colinesterasa, además exhibe otros efectos tal como: analgesia en el sistema nervioso central<sup>16</sup>, así mismo alivio de los síntomas de la fatiga y las perturbaciones del sueño en pacientes con síndrome de fatiga crónica (encéfalo mielitis mialógica)<sup>10</sup>, también se ha utilizado en el tratamiento de las formas espásticas de la parálisis cerebral infantil<sup>17</sup>.

Figura 1. Galantamina



En los años 50 este alcaloide se obtenía de la especie caucasiana *Galanthus woronowii* cuyo aislamiento se realizaba fundamentalmente en Irak y Turquía<sup>10</sup>. En Estados Unidos se realizaron diferentes cultivos de narcisos ornamentales en busca de nuevas fuentes potenciales para la producción de galantamina<sup>18</sup>. En Europa, y más concretamente en Gran Bretaña, se están cultivando cientos de

acres con bulbos de narcisos, con el fin de extraer este compuesto; siendo hoy la obtención de fuentes naturales la única vía para la producción de este alcaloide. Si bien la síntesis orgánica ofrece una fuente importante de nuevas sustancias farmacéuticas, los productos naturales continúan cumpliendo un papel importante en la farmacopea, no sólo porque muchos de ellos se utilizan sin ninguna modificación o como materia prima para hemisíntesis de productos farmacéuticos, sino también porque sirven de moléculas modelo para la síntesis. Se estima que entre 40%-45% de los medicamentos son de origen natural, es el caso de galantamina que ha sido obtenida usualmente como ya se mencionó, a partir de la planta entera o de bulbos de diferentes especies<sup>10</sup>.

En Colombia se ha reportado los siguientes géneros de **Amaryllidaceae**: *Amaryllis*, *Brunsvigia*, *Caliphruria*, *Eucharis*, *Crinum*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Pancreatium*, *Sprekelia*, *Urceolina*, *Zephyranthes* y recientemente *Phaedranassa*. De estos géneros se ha reportado la presencia de galantamina en *Amaryllis*, *Crinum*, *Eucharis*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Pancreatium*, *Zephyranthes*<sup>19</sup>, pero se desconoce su presencia en el género *Caliphruria*.

Con *Caliphruria subedentata* se han realizado ensayos de citotoxicidad por medio de la prueba de índice mitótico (IM) y genotoxicidad empleando la prueba de aberraciones cromosómicas (AC) y la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), tanto para el crudo total como para el extracto alcaloídico; encontrándose para este último un efecto citotóxico entre el rango de concentraciones de 0.85 µg/mL a 111 µg/mL y un efecto genotóxico débil no clastogénico. Para el crudo total se presenta un efecto citotóxico en la concentración de 111 µg/mL pero sin efecto genotóxico ni clastogénico<sup>20</sup>, lo cual permite predecir para esta planta un futuro promisorio, como una fuente de uso terapéutico potencial en el tratamiento del cáncer y la malaria.

Tabla 1. Distribución botánica de algunos alcaloides más representativos de la familia **Amaryllidaceae**

Alcaloide	Especie	Referencia
<b>Licorina</b>	<i>Clivia miniata</i> Regel	21
	<i>Clivia nobilis</i>	22
	<i>Crinum amabile</i>	23
	<i>Crinum asiaticum</i> L.	24
	<i>Crinum augustum</i>	25
	<i>Crinum bulbispermum</i> L.	26
	<i>Crinum bibispermum</i> Milne.	22, 27
	<i>Crinum defixum</i> Ker-gaw	28
	<i>Crinum latifolium</i>	29, 28, 30
	<i>Crinum longifolium</i>	22
	<i>Crinum natans</i>	31
	<i>Crinum oliganthum</i>	32
	<i>Crinum ornatum</i>	31
	<i>Crinum pratense</i>	33
	<i>Crinum seabrum</i> . Herb.	28, 34
	<i>Crinum zeylanicum</i> L.	34
	<i>Corculigo orchioides</i>	35
	<i>Haemanthus kalbreyereri</i>	36
	<i>Hippeastrum ananuco</i>	37
	<i>Hippeastrum bicolor</i>	38
	<i>Hippeastrum equestre</i>	38, 39
	<i>Hippeastrum vittatum</i> L. Herr.	40
	<i>Hymenocallis archicola</i> Northrop	41, 42
	<i>Leucojum aestruum</i> L.	43, 44
	<i>Leucojum vernum</i>	43
	<i>Lycoris guangxiensis</i>	45
	<i>Lycoris longituba</i>	45
	<i>Lycoris radiata</i> Herb.	46, 47
	<i>Lycoris sanguinea</i> Maxim	48, 49
	<i>Narcissus papyraceus</i> Kerl-Gawl	50
	<i>Narcissus poeticus</i>	43, 51
	<i>Narcissus tazatta</i> L.	52, 53, 54
	<i>Pancratium biflorum</i> Roxb.	55
	<i>Pancratium maritimum</i>	56
	<i>Pancratium triathum</i>	57
	<i>Sternbergia lutea</i> Ker-Gawl	58, 59
	<i>Ungenia severtzovii</i>	60
	<i>Ungenia tadshicorum</i>	61
	<i>Ungenia vedenskyi</i>	62
	<i>Zephyranthes carinate</i> Herb.	63
<i>Zephyranthes robusta</i>	64	



<b>HEMANTAMINA</b>	<i>Clivia miniata</i> Regel <i>Haemanthus kalbreyeri</i> <i>Hippeastrum ananuca</i> <i>Hippeastrum equestre</i> <i>Hymenocallis arenicala</i> Northrop <i>Lycoris sanguinea</i> Maxim <i>Zephyranthes robusta</i> <i>Zephyranthes rosea</i> <i>Zephyranthes sulphurea</i> Narcissus <i>Pseudonarcissus l.</i> <i>Narcissus tazetta</i>	65 36 66 67 41, 42 49 64 68 64 69 70
<b>GALANTAMINA</b>	<i>Crinum amabile</i> <i>Hippeastrum equestre</i> <i>Leucojum aestivum</i> L. <i>Leucojum vernum</i> <i>Lycoris longituba</i> <i>Lycoris Guangxiensis</i> <i>Lycoris radiata</i> Herb. <i>Lycoris sanguinea</i> Maxim. <i>Narcissus papyraceus</i> Kerl-Gawl <i>Narcissus poeticus</i> <i>Narcissus tazetta</i> L. <i>Pancratium trianthum</i> <i>Sternbergia lutea</i> Ker-Gawl <i>Ungernia severtzovii</i> <i>Ungernia victoris</i> <i>Ungernia vedenshy.</i>	23 67 43, 44, 71 43 45 45 46 48, 49 50 51, 72 73 57 58 60 74 62
<b>MARITIDINA</b>	<i>Hippeastrum ananuco</i> <i>Narcissus papyraceus</i> Kerl-Gawl <i>Narcissus tazetta</i> L. <i>Zephyranthes robusta</i> <i>Zephyranthes rosea</i> <i>Zephyranthes sulphurea</i>	37 50 45 68 68 64
<b>HAMAYNA</b>	<i>Crinum asiaticum</i> L. <i>Crinum latifolium</i> <i>Crinum zeylanicum</i>	24 29 34
<b>HOMOLICORINA</b>	<i>Crinum defixum</i> Ker-Gawl <i>Hippeastrum ananuco</i> <i>Lycoris radiata</i> Herb. <i>Narcissus tazetta</i> L. <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. <i>Narcissus poeticus</i> L	28 37 47 53, 54 75, 76 70, 77

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 GENERALIDADES DE LOS ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE

A menudo las cortezas, raíces, hojas, frutos y bayas de las plantas producen bases que contienen nitrógeno llamadas alcaloides. Los alcaloides, a diferencia de la mayoría de los grupos de productos naturales, son compuestos química y biológicamente heterogéneos, y constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más amplio y complejo <sup>78</sup>. Farmacológicamente es un grupo muy importante ya que incluye sustancias activas que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos.

En particular, el interés por los alcaloides de **Amaryllidaceae** está motivado por el considerable número de acciones farmacológicas que presenta. Sin embargo, la posibilidad del uso terapéutico de productos de estas plantas no es caprichosa sino que se debe a la amplia utilización medicinal de estos desde la antigüedad y en muy diferentes culturas <sup>79</sup>.

Estos compuestos tienen como característica principal la de ser exclusivos dentro de esta familia de plantas. Por lo tanto tiene un valor quimiotaxonómico importante, todos ellos derivados de los aminoácidos fenilalanina y tirosina a través de un intermediario común: la O-metilnorbelladina, la cual mediante tres modos distintos de acoplamiento fenol oxidativos, origina esqueletos básicos, de estos, por sustituciones y modificaciones estructurales de tipo enzimático se derivan los alcaloides de **Amaryllidaceae**. Por regla general, son compuestos monoméricos aunque se han encontrado algunos dímeros <sup>80</sup>.

Teniendo en cuenta estos datos y el sistema heterocíclico que presentan, se pueden distinguir los siguientes tipos de esqueletos (Tabla 2).

Tabla 2 Clasificación de los alcaloides de **Amaryllidaceae** según los tipos estructurales.<sup>9</sup>

GRUPO ESTRUCTURAL	ESQUELETO TIPO	TIPO DE ACOPLAMIENTO
N-bencil-N-fenetilamina	Norbelladina	Sin acoplamiento
Pirrolofenantridina	Licorina	<i>orto-para'</i>
2-benzopirano[3,4-g]indol	Licorenina	<i>orto-para'</i>
5,10b-etanofenantridina	Hemantamina/ Crinina	<i>para-para'</i>
2-benzopirano[3,4-c] indol	Pretazetina	<i>para-para'</i>
Fenantridina	Narciclasina	<i>para-para'</i>
5,11-metanomorfantridina	Montanina	<i>para-para'</i>
Dinbenzofurano	Galantamina	<i>para-orto'</i>

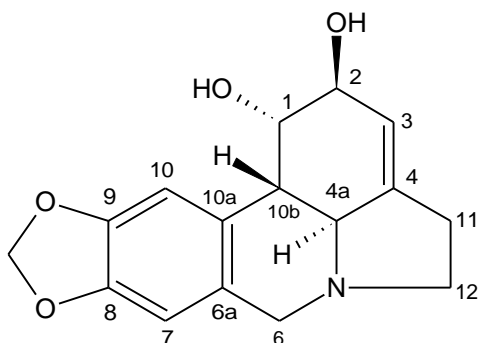
La numeración del esqueleto carbonado no sigue la norma IUPAC para el respectivo sistema heterocíclico, desde 1984 se acepta internacionalmente la propuesta de numeración basada en la biogénesis de estos metabolitos <sup>68</sup>.

A continuación se resumen los tipos estructurales más importantes, y que posiblemente son los que se pueden encontrar en *Caliphuria subedentata*.

**5.1.1 Alcaloides tipo licorina/licorenina.** Los alcaloides del tipo licorina se incluyen dentro del grupo estructural pirrolofenantridina, mientras que los alcaloides del tipo licorenina pertenecen al grupo 2-benzopirano [3,4-g] indol. Ambos tipos presentan un acoplamiento fenol oxidativo *orto-para'* en su biosíntesis. Los alcaloides pirrolofenantridínicos constituyen el grupo más importante y numeroso de la familia **Amaryllidaceae**. Se caracterizan por poseer un esqueleto con sustituyentes oxigenados del tipo hidroxilo, metoxilo o metilendioxi en los anillos A y C y a veces en el anillo D. El átomo de nitrógeno es terciario, rara vez cuaternario; el representante más característico es la licorina (figura 2), presentándose en más de 350 géneros diferentes, alcaloide reconocido por su toxicidad. La estereoquímica de estos alcaloides se ha podido establecer utilizando las técnicas espectroscópicas, de Dicroísmo Circular (D.C) y Rayos X.

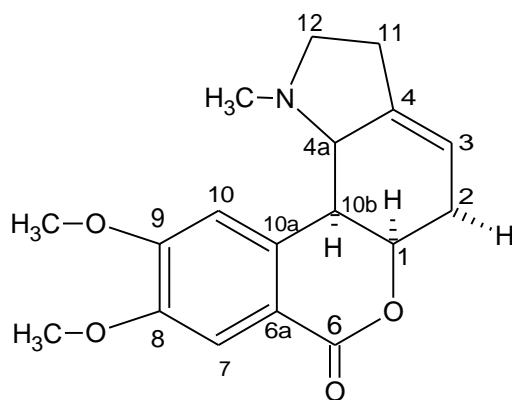
Además se ha encontrado alcaloides con enlaces N-glucosídicos, los cuales se caracterizan por activar de forma bastante marcada el crecimiento vegetal, y se conocen algunos casos en que inhiben el crecimiento de plantas parásitas<sup>8</sup>.

Figura 2. Licorina



Los alcaloides del tipo licorenina se caracterizan por presentar un anillo de pirano que se puede encontrar en forma de lactosa, hemiacetal o éter cíclico. Su estereoquímica ha sido estudiada a fondo tanto desde el punto de vista químico como espectroscópico, comprobándose que la fusión entre los anillos B/C es generalmente *cis*. Además todos los alcaloides de este grupo se caracterizan por presentar sustituyentes oxigenados en las posiciones 8 y 9 así como una insaturación en el anillo C. El alcaloide típico es homolicorina (figura 3).

Figura 3. Homolicorina



**5.1.2 Alcaloides tipo crinina/ hemantamina.** Este grupo de derivados de 5,10b etanofenantridina engloba una serie de compuestos interrelacionados que derivan de las dos formas enantiomórficas del sistema cíclico básico, consistente en un esqueleto de fenantridina con un puente etano entre el átomo de nitrógeno y el carbono 10b, generando 2 formas enantiomórficas que son consecuencia de su origen biogénico, como es el caso de crinina con un puente tipo  $\beta$ -crinano (figura 4). El átomo de nitrógeno es terciario y se encuentra siempre como unión entre el puente etano y el sistema fenantrénico; este puente etano puede hallarse

por encima o por debajo del esqueleto, dando lugar a series de alcaloides representados por crinina y hemantamina (figura 5) respectivamente.

Figura 4. Crinina

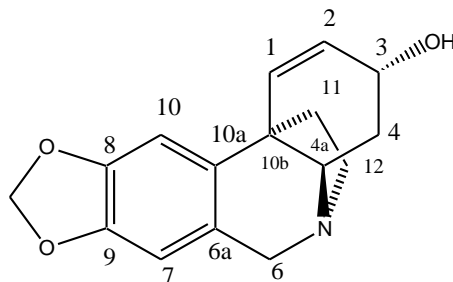
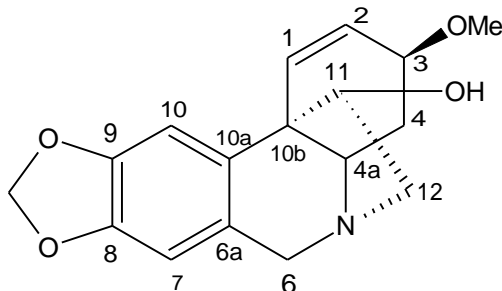


Figura 5. Hemantamina



Tiene sustituyentes oxigenados en las posiciones 3, 8, 9 como es el caso de maritidina (figura 6) y pueden tener otros sustituyentes adicionales en 6, 7, 10 y en 11 como en hamayna (figura 7); así como una insaturación entre las posiciones 1 y 2 conducentes a una diversidad estructural elevada.

Figura 6. Maritidina

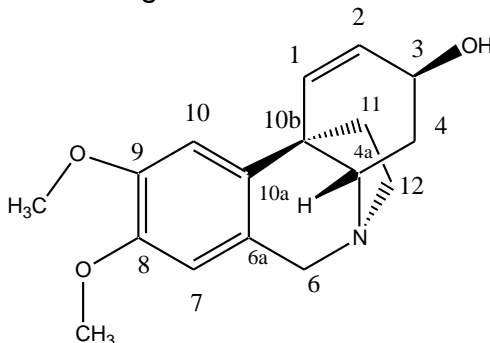
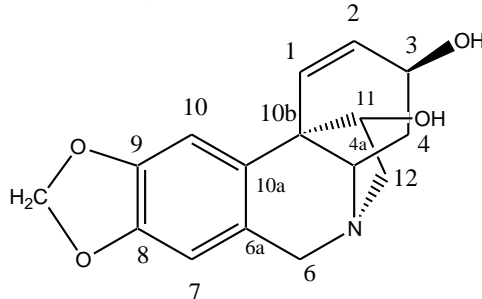


Figura 7. Hamayna

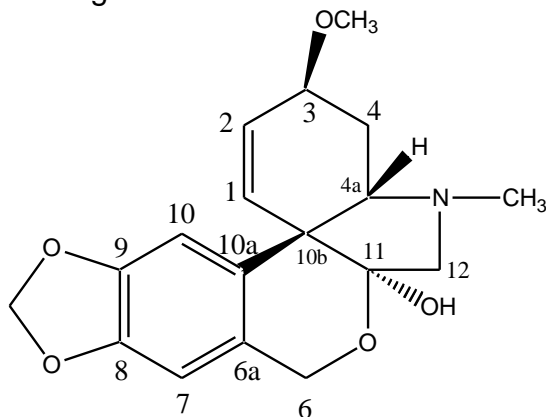


El análisis conformacional de estos compuestos es relativamente sencillo teniendo en cuenta que los anillos A, B, y D constituyen un sistema rígido <sup>81</sup>.

Todos los alcaloides de esta serie hasta ahora encontrados presentan una fusión *trans* entre los anillos B y C; para el estudio de la configuración absoluta de los alcaloides 5,10b-etanofenatridínicos ha sido muy importante el empleo de técnicas de dicroísmo circular (DC), dispersión óptica rotatoria (DRO) y los análisis de Rayos X.

**5.1.3 Alcaloides tipo tazetina.** Este grupo incluye un reducido número de alcaloides que al igual que el tipo crinano provienen de un acoplamiento fenol-oxidativo *para-para'*. Están basados en un esqueleto 2- benzopirano[3,4 c] indol, todos poseen sustituyentes oxigenados en los carbonos 8 y 9 (frecuentemente un grupo metilendioxi), además de una insaturación en las posiciones 1 y 2; el átomo de nitrógeno es terciario, y siempre se encuentra metilado. La tazetina esta actualmente reconocida como un artefacto originado en el proceso de extracción a partir del verdadero alcaloide, pretazetina (figura 8). Este es uno de los alcaloides más abundante en las **Amaryllidaceae**.

Figura 8. Pretazetina



**5.1.4 Alkaloides tipo galantamina.** Este grupo estructural de alcaloides derivados de dibenzofurano con uno de los anillos saturado total o parcialmente, habitualmente poseen sustituciones oxigenadas en las posiciones 3 y 9, una insaturación entre los carbonos 4 y 4a y un grupo N-metilo que podría considerarse como el de mayor interés desde el punto de vista farmacológico, pues está representado por la galantamina (1), alcaloide que posee una poderosa actividad anticolinesterásica, usándose en el tratamiento de la miastemia gravis, miopatías, trastornos del sistema nervioso central, lesiones del sistema nervioso periférico, entre otras patologías.

El número de alcaloides pertenecientes a esta estructura es relativamente reducido, siendo la mayoría de ellos derivados de la galantamina, con distinto grado de oxidación, hidratación o sustitución.

De todos los grupos revisados, la galantamina (1), alcaloide aislado de un gran número de especies de la familia **Amaryllidaceae**, es uno de los compuestos más interesantes por sus propiedades anticolinesterásicas. Se han registrado dos medicamentos: uno de ellos, Nivalin®, es el hidrobromuro de galantamina inhibidor de la colinesterasa con una toxicidad moderada, Nivalin® se encuentran en las farmacopeas china, rusa, y en occidente, en la farmacopea italiana entre otras <sup>82</sup>.

Otra forma comercializada de este alcaloide, Energix ®, es un preparado a base de hidrobromuro de galantamina, creatina, fitina y jalea real comercializada en países del Este. En una serie de ensayos clínicos se observó que la administración prolongada de este medicamento no producía efectos colaterales<sup>83</sup>. También se encuentra Reminyl® producida por Janssen Ortho Inc. (Ontario, Canadá) que trabaja aumentando la cantidad de acetilcolina en el cerebro. Basado en datos experimentales se ha comprobado que realza la acción del acetilcolina afectando los receptores nicotínicos en el cerebro. El efecto beneficioso del potencial de Reminyl® puede disminuir mientras que el proceso de la enfermedad avanza<sup>6</sup>.

**5.1.4.1 Aspectos fundamentales de la enfermedad de Alzheimer.** La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva del cerebro, que afecta a personas que superan los 65 años, aunque pueden aparecer cronológicamente antes. Se estima que entre un 5 y 10% de las personas que superan esta edad padecen algún tipo de demencia senil moderada o severa <sup>84</sup>. La EA es la causa más habitual de estas demencias, por lo que millones de personas del mundo occidental mayores de 65 años la padecen <sup>85</sup>.

La EA viene acompañada por una pérdida gradual y progresiva de las funciones mentales. Ello es debido a que las regiones cerebrales del hipocampo y del parahipocampo, esenciales para el aprendizaje de nuevas informaciones, se ven afectadas severamente por dicha patología, siendo un signo prominente y primario de esta enfermedad. Los síntomas de comportamiento, como depresión, agitación, delirios o alucinaciones aparecen en muchos pacientes con EA. Estos, eventualmente, pierden el interés por su entorno y terminan en una silla de ruedas o postrados por largo tiempo. El curso de la enfermedad es muy variable, aunque los estadios finales de la EA están marcados por el vacío mental y la pérdida del control de todas las funciones corporales <sup>86</sup>.

Desgraciadamente, hasta el momento no existe ningún tratamiento para detener la progresión de esta grave enfermedad neurodegenerativa. Solamente se aplican paliativos en las etapas iniciales de la enfermedad, por las cuales se mejoran condiciones de vida.

## 5.2 BIOSINTESIS

Los alcaloides de **Amaryllidaceae** parecen tener un precursor común, la norbelladina, que al igual que sus derivados tienen un esqueleto del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-N-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>. La unidad C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> es aportada por la L-fenilalanina (L-Phe), mientras que la unidad C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-N es aportada por la L-Tirosina (L-Tyr) <sup>87</sup>, ver figura 9.

El proceso biosintético se inicia con la desaminación oxidativa antiperiplanar de la L-Phe por la acción de la enzima PAL (fenilalanina amonio-liasa) dando lugar al ácido trans-cinámico <sup>86</sup>.

En *Nerine bowdenni* se mostró que la unidad C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> que lleva al anillo A de estos alcaloides no deriva de tirosina, el cual se hidroxila en posición para, dando lugar al ácido p-cumárico. Este último experimenta un proceso oxidativo en *orto*, con respecto al grupo hidroxilo, formándose el ácido cafeico. Finalmente el ácido cafeico sufre una reacción de oxidación, con la subsiguiente pérdida del ácido glioxídico para dar lugar al aldehído protocatéquico, que por metilación origina la isovainillina, ambos precursores de la unidad C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, L-Tyr por su parte se incorpora como tiramina, previa descarboxilación, debida a la acción de la enzima Tirosin descarboxilasa (Tyr). La condensación (reacción de Mannich) del aldehído protocatéquico o la isovanillina y la tiramina da lugar a una base de Schiff, que por reducción da el precursor norbelladina o bien O-metilnorbelladina <sup>89</sup>.



Los pasos posteriores son propios para cada grupo de estos alcaloides, los cuales, como ya se ha indicado, se originan en función del tipo de acoplamiento fenólico. Así, el acoplamiento *p-o'* da lugar a los alcaloides del tipo galantamina, el acoplamiento *o-p'* a los del tipo licorina, y el *p-p'* a los del tipo hemantamina. Por convenio la notación ['] hace referencia a la posición del anillo procedente del aminoácido L-Phe<sup>90</sup>, ver figura 10.

Figura 9. Biosíntesis de alcaloides de los precursores Norbelladina y O-metilnorbelladina

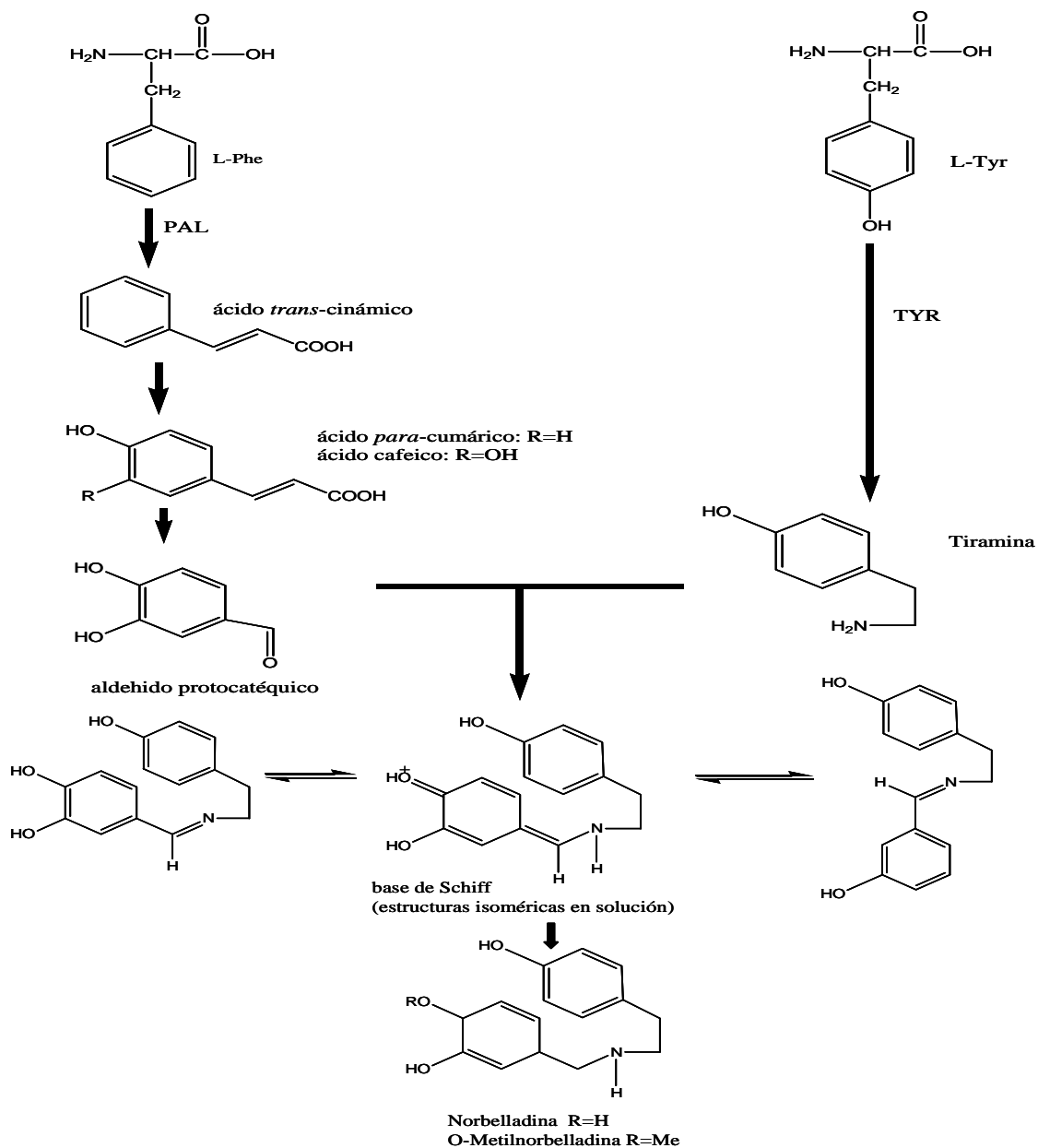
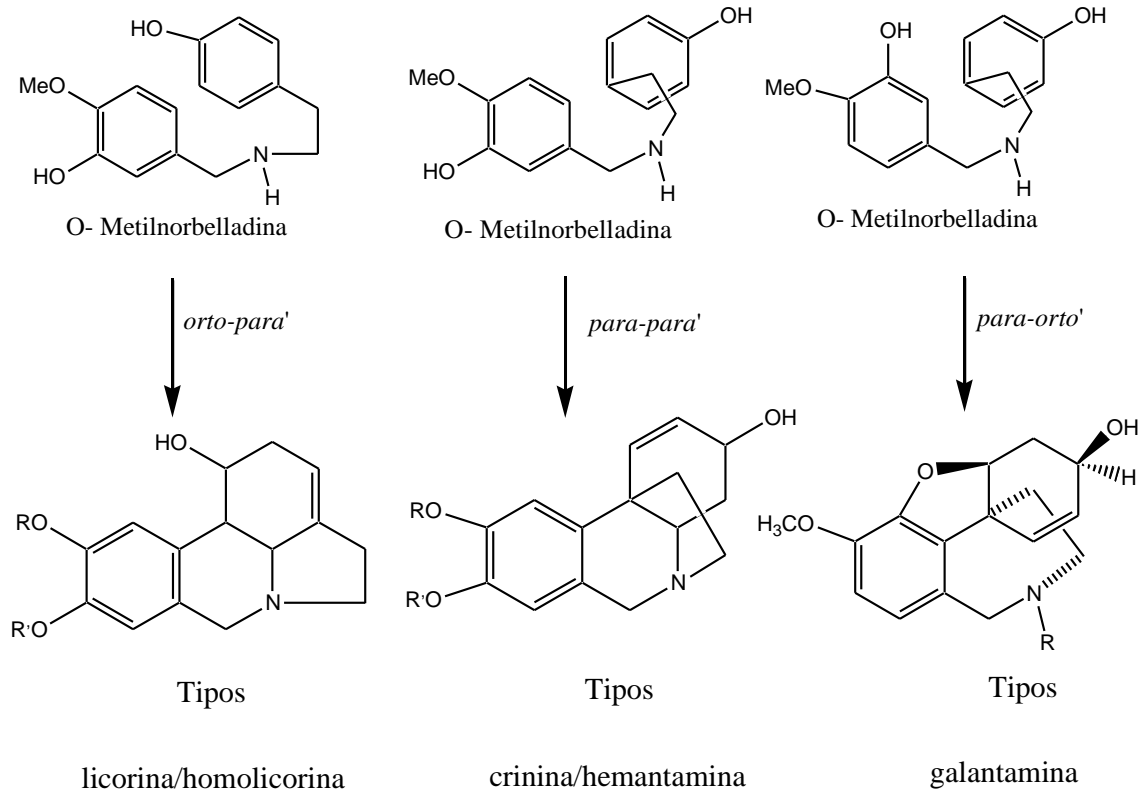


Figura 10. Acoplamiento fenol-oxidativo en alcaloides de **Amaryllidaceae**.



### 5.3 CONSIDERACIONES BIOLÓGICAS DE LOS ALCALOIDES AISLADOS.

Se resumen a continuación las acciones biológicas presentadas por los alcaloides más representativos de esta familia a nivel de la planta que los produce y en relación a otras plantas, hongos y levaduras, así como las acciones sobre insectos e incluso mamíferos incluyendo al hombre.

Tabla 3. Acción farmacológica de los alcaloides del tipo licorina/licorenina

Alcaloide	Acción	Referencia
<b>Hipeastrina</b>	Débil actividad contra insectos depredadores.	91
	Elicitor en dermatitis de contacto en el hombre.	92
	Inductor del retraso de hipersensitividad en animales.	
	Citotóxico contra células fibroblásticas LMTK.	
<b>licorenina, 6-0-metil</b>	Repelente frente a la mariposa amarilla.	46
<b>Licorina (2)</b>	Inhibición de la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas.	93
	Inhibidor de la biosíntesis de ácido ascórbico en Vicia faba y Allium cepa.	94
	Se encuentra en la rizosfera alrededor de las partes subterráneas de Sternbergia lutea, en contacto con la cepa ITM 311 de Pseudomonas sp.	95
	Disminuye el contenido proteico en callos de Nicotiana y el contenido de DNA y RNA en germen de trigo y levaduras.	96
	Inhibidor del crecimiento de Phytophthora capsici.	97
	Inhibidor del crecimiento de Phymatotrichum omnivorum.	98
	Inductor de la senescencia en Schottera nicaeensis.	99
	Repelente frente a la langosta del desierto.	100
<b>licorina, fosfolípidos</b>	Vía de detoxificación de licorina para la planta productora.	101
	Favorece la deposición de azúcares acilados.	68
<b>masonina</b>	Alérgeno en dermatitis de contacto en el hombre.	102
<b>pancrasidina</b>	Promotor del crecimiento en huésped de hierba parásita.	92
	Inhibidor de la germinación de semillas y del crecimiento de las plantas	90
<b>pseudolicorina</b>	Disminuye el contenido proteico en callos de tabaco y el contenido de DNA y RNA en germen de trigo y levaduras.	68
	Inhibidora del crecimiento de Phymatotrichum omnivorum.	97
<b>pseudolicorina, metil</b>	Igual que pseudolicorina, excepto la última acción.	99
<b>ungeremina</b>	Tóxica para especies vegetales parásitas (Imperata cilíndrica).	68

Tabla 4. Acción farmacológica de los alcaloides del tipo crinina/hemantamina.

Alcaloide	Acción	Referencia
<b>licoricidina</b>	Inhibidor del crecimiento en coleoptilo de Avena, de la germinación en <i>Oryza</i> , y de la división celular en cultivos de tejidos de <i>Nicotiana</i> .	103
<b>licoricidinol</b>	Igual que <b>licoricidina</b> .	103
	Suprime la producción de etileno inducida por IAA en segmentos de hipocotilo etiolados de <i>Vigna radiata</i>	104
	Inhibidor de la síntesis proteica en hipocotilos de <i>Vigna radiata</i> , pero no la de RNA, Inhibe la síntesis proteica en eucariotas.	104
	Insecticida de potente acción frente a larvas de la mariposa amarilla.	46
<b>narciclasina</b>	Inhibición de la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas.	68
	Interrumpe súbitamente la síntesis de proteínas en células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sin afectar la síntesis de RNA.	105
<b>pancratistatina</b>	Inhibición de la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas.	68
<b>pancratistatina, 7-deoxi</b>	Igual que <b>pancratistatina</b> .	97
	Disminuye el contenido proteico en callos de tabaco y el contenido de DNA y RNA en germen de trigo y levaduras.	
<b>pretazetina</b>	Tóxica en mamíferos.	106
	Hipotensivo	107
<b>tazetina</b>	Citotóxico contra una variedad de cultivos de células ( <i>In vitro</i> ).	108
<b>Hemantamina(5)</b>	Citotóxico contra células fibroblásticas LMTK.	109
	Moderadamente activo contra leucemia de Rauscher.	110
	Inhibidor de la síntesis de proteínas bloqueando la formación del enlace peptídico sobre la peptidiltransferasa centro de la subunidad ribosomal 60s	111, 112

Tabla 5. Acción farmacológica de los alcaloides del tipo galantamina.

Alcaloide	Acción	Referencia
Galantamina (1)	Poderoso analgésico	4, 113
	Anticonvulsivo	114
	Hpotensivo.	115
	Inductor de hipotermia en ratas	116
	Inhibidor de colinesterasa con efectos farmacológicos sobre el Sistema Nervioso Central Periférico.	117, 118
	Como inhibidor de acetil colinesterasa es utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.	4, 119
	Usado en una composición farmacéutica en el tratamiento del alcoholismo.	120
	Produce envenenamiento por digestión, respiración o neuromuscular.	121
	Exhiben actividad analgésica en ratones comparable al de la morfina.	121
	Bloqueador neuromuscular y restaurador de la transmisión sináptica.	114
	Inhibe SOC traumático.	121
	Exhibe potente acción insecticida contra la mariposa amarilla Eureka hecabe mandarina.	4
	Neuroestimulante por vía intravenosa.	121
Inhibición de epileptogénesis producida por penicilina.		

## 5.4 GÉNERO *Caliphruria*

### 5.4.1 Consideraciones Botánicas

La familia **Amaryllidaceae** se encuentra ubicada dentro de las angiospermas (clase Magnoliopsida), subclase monocotiledóneas (*Liliidae*), orden Asparagales<sup>12</sup>. Esta familia, a su vez, se subdivide en cuatro subfamilias: **Amaryllidoideae**, **Agvoideae**, **Hypoxidoideae** y **Campynematoideae**.

Los alcaloides de Amaryllidaceae concretamente se han encontrado en la subfamilia **Amaryllidoideae**, que agrupa 9 tribus (**Amaryllideae**, **Haemantehae**, **Narcisseae**, **Pancratieae**, **Eucharideae**, **Hippeastreae**, **Galantheae**, **Lycorideae**, **Stenomessae**) con diferentes géneros cada una. Particularmente el género *Caliphruria* no se ha agrupado en ninguna de las tribus anteriormente mencionadas, pero por pertenecer a la subfamilia **Amaryllidoideae** y por lo tanto potencialmente productores de alcaloides del tipo **Amaryllidaceae**.

Los bulbos de *Caliphruria* son redondos o en forma de globo invertido, compuesto de bases de hojas modificadas y concéntricas (hojas rudimentarias), siendo ésta una característica de muchas especies de **Amaryllidaceae**. Los bulbos son simipodiales en su forma de crecimiento. Las hojas rudimentarias externas en los bulbos están modificadas internamente a manera de túnicas de color ligeramente café, estando igualmente articuladas apicalmente al cuello o seudotallo de longitud variable. Distalmente los seudotallos se convierten en pecíolos de hojas individuales. Los cuellos de estos bulbos permanecen por debajo de la superficie del suelo y su longitud puede tener alguna significancia filogenética considerable<sup>1</sup>.

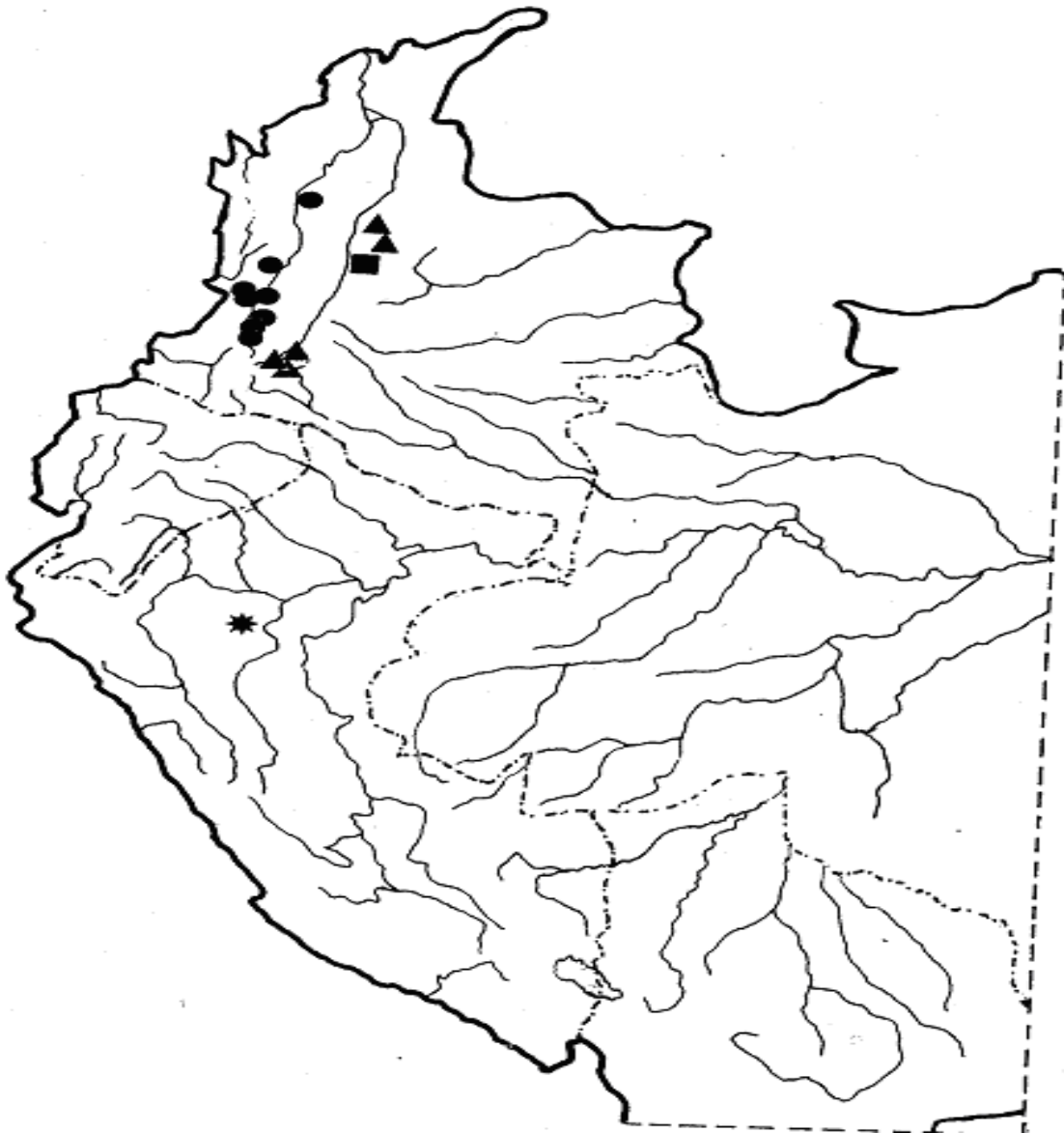
Márgenes de hojas no onduladas; flores inclinadas y semicolgantes con pedículo curvo; periantio en forma de embudo o cañón, dilatación gradual desde la base (raramente subcilíndrica), recto o muy levemente inclinado, 25 mm. o menos de longitud; copas estaminales inconspicuas y no pigmentadas, reducidas a membranas, unión congénita basal de los filamentos, papillas estigmáticas multicelulares<sup>12</sup>.

### 5.4.2 Distribución Geográfica

Este género está constituido por cuatro especies, tres de ellas endémicas de Colombia; *C. subdentata*, *C. hartwegiana* y *C. tenera* las cuales se encuentran

restringidas a las cordilleras occidental y central, esta última catalogada como extinguida y *C. korsakoffi* del Perú. (Mapa 1).

*Caliphurria subedentata* es la más común y variable especie de este género, florece en algunas épocas del año; se encuentra a través de los más bajos y centrales bosques de montaña de las cuevas de las cordilleras central y occidental longitud oeste a 76 ° W y en los alrededores del valle del cauca; hoy en día muchos de estos bosques han sido destruidos, por esta razón las especies no se encuentran en forma abundante y están en peligro de extinción<sup>1</sup>.



Mapa 1. Distribución de especies de *Caliphurria* en noroeste-central Sur América.  
*Caliphurria hartwegiana* ▲      *C. korsakoffi* ■  
*C. subedentata* ●      *C. ternera* ■

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 COLECCIÓN Y CLASIFICACION DEL MATERIAL VEGETAL.

*Caliphruria subedentata* fue colectada en el municipio del Tambo, departamento del Cauca. Esta especie fue identificada por el Especialista Bernardo Ramirez del Herbario de la Universidad del Cauca; (clave AC 20).



Figura 11. Flor de *Caliphruria subedentata*.

### 6.2 EXTRACCION DE ALCALOIDES.

Bajo la denominación de alcaloides se engloba un grupo amplio y variado de sustancias que tienen como característica principal el ser bases nitrogenadas. En las plantas estos compuestos pueden estar como bases libres, en forma de sales, o como N-óxidos. El conocimiento de su solubilidad tiene una importancia considerable, tanto para el uso farmacéutico cuando se administra en forma de solución, como para los métodos de aislamiento a partir del material vegetal, y su separación de las sustancias no alcaloídicas también presentes. A pesar de que las solubilidades de los diferentes alcaloides y sus sales son muy diversas, como cabría esperar de su variada estructura, como premisa inicial se sigue el principio que los alcaloides, como bases, acostumbran a ser solubles en solventes orgánicos en medio básico y cuando se hallan como sales son solubles en agua o en solventes alcohólicos en medio ácido débil. Los diferentes extractos crudos se ensayan para visualizar la presencia de los alcaloides sobre cromatografía de capa fina, usando en nuestro caso el reactivo de Dragendorff modificado<sup>122</sup>, el cual reacciona dando una coloración anaranjada. De los extractos resultantes se separan las impurezas utilizando métodos cromatográficos para conseguir, finalmente, un producto con una pureza suficiente que permita su cristalización, y



de esta forma, poder someterlo a diferentes pruebas físicas, químicas y espectroscópicas, para elucidar su estructura.

El método de extracción y fraccionamiento de los alcaloides se basó en el establecido previamente para este tipo de compuestos <sup>123</sup>, con algunas modificaciones. A continuación se describen con detalle.

## FASE I

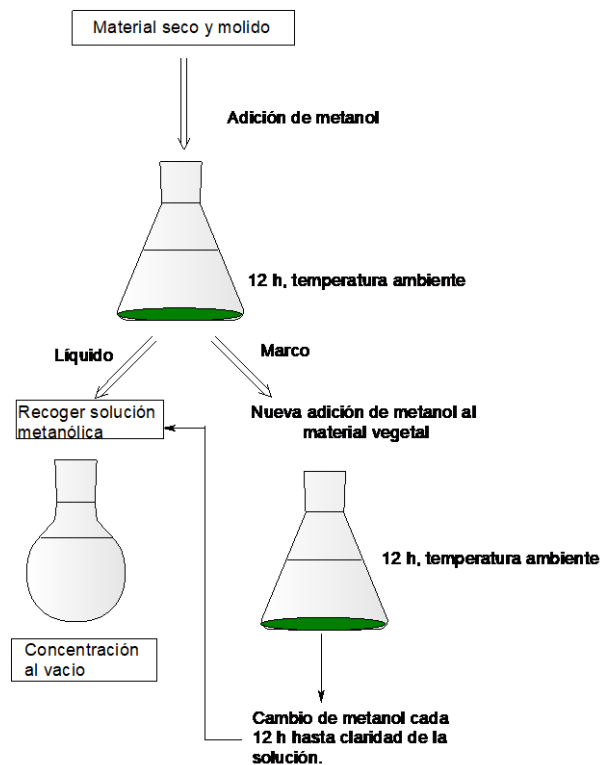
Para la extracción de los alcaloides se partió de 4.5 Kg de material vegetal fresco, el cual fue secado a temperatura ambiente, pulverizado por medio de un molino eléctrico; obteniéndose 400 gramos de material seco y molido.



Figura 12. Plantación de *Caliphurria subedentata*, ubicado en el jardín botánico Alvaro José Negret (Popayán-Cauca).

## FASE II

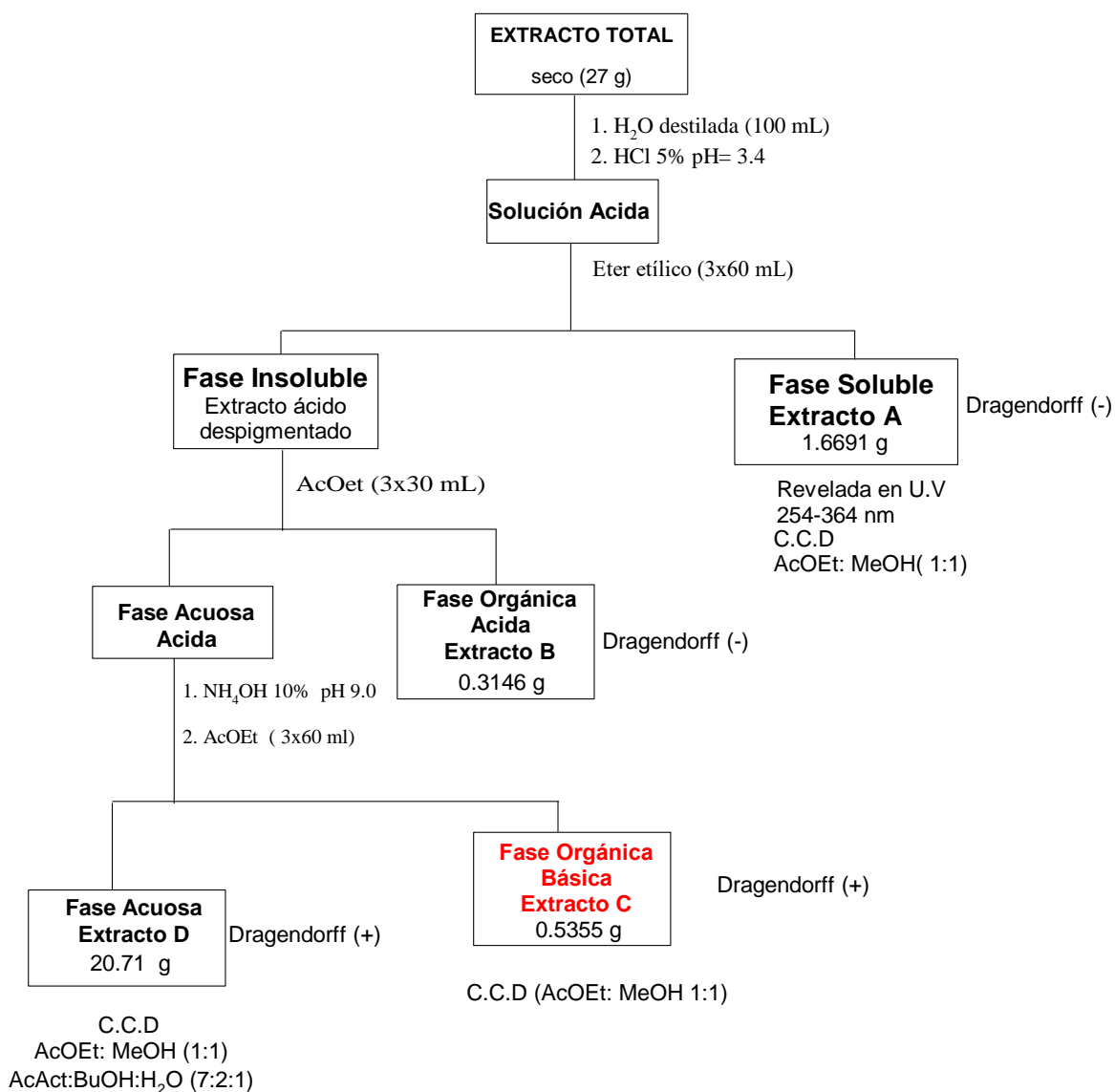
Una vez pulverizada la planta seca, se extrajo con metanol empleando el método de extracción en frío <sup>12</sup> con metanol grado analítico (esquema 1) se deja el metanol en contacto con el material vegetal por 12 horas (en reposo), al cabo de las cuales se filtra y se obtiene la solución metanólica. Posteriormente se concentra al vacío. El marco se somete nuevamente a una extracción con metanol, filtrando después de 12 h y concentrando el filtrado. Dicho proceso se repite hasta obtener una solución metanólica bastante clara; el extracto total obtenido fue de 97.3 g.



Esquema 1. Método de extracción en frío<sup>12</sup>

### FASE III DESPIGMENTACION

Seguidamente se inició la fase de despigmentación (Esquema 2): 27 g del extracto metanólico se acidificó gota a gota con ácido clorhídrico al 5% hasta obtener un pH de 3.4. El extracto metanólico ácido se lavó 3x60 mL de éter etílico con el fin de eliminar los pigmentos más lipófilos, como carotenos y clorofilas. El extracto etéreo concentrado denominado extracto A, se sometió a una cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como primer eluyente la mezcla AcOEt-MeOH (1:1) para comprobar la presencia de narciclasina u otro alcaloide similar, para detectarlos se realizó una observación de la fluorescencia al UV a 254-365 nm, y además revelado con Dragendorff modificado dando negativo, razón por la cual se constató la ausencia de este tipo de alcaloides en el extracto etéreo.



Esquema 2. Despigmentación del extracto metanólico<sup>124</sup>

Se procedió al fraccionamiento del extracto ácido, carente ya de pigmentos, utilizando cambios de pH, y permitiendo fraccionar los alcaloides en función de la polaridad, estableciendo así una gradación de los mismos. El proceso se detalla de la siguiente manera:

El extracto ácido despigmentado fue sometido a extracción con Acetato de etilo 3x30 mL cada una, estas fracciones reunidas se concentraron al vacío, obteniéndose un residuo de 0.3146 g que se le denominó **Extracto B**. El ensayo

preliminar de este extracto por CCF utilizando como eluyente la mezcla AcOEt-MeOH (1:1) no presentó coloración al revelarlo con el reactivo de Dragendorff.

La fase acuosa ácida resultante de la primera extracción con acetato de etilo se alcalinizó hasta pH 9.0 utilizando NH<sub>4</sub>OH 10%. De esta manera se asegura que los alcaloides pasen a su forma de base y sean solubles en disolventes orgánicos; tras la alcalinización se extrae con Acetato de Etilo 3x60 mL cada una, una vez reunidos los extractos se concentran al vacío, esta fase orgánica se evapora a sequedad dando un residuo sólido oscuro de 535.5 mg de peso denominado **Extracto C**. En el cual se encuentran la mayoría de los alcaloides en forma de base; según lo revelado por el reactivo de dragendorff en C.C.F.

En la fase acuosa final hay una serie de alcaloides que, a pesar del pH, siguen siendo poco solubles en disolventes orgánicos. Una vez reunidas las fases se obtuvo un residuo gomoso de 20.71 g que constituyó el Extracto D. La fase acuosa resultante de los anteriores procesos se trató por cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) utilizando como fase móvil Butanol-Ácido Acético-Agua (7:2:1) con el fin de poder separar los glucósidos.

### 6.3 SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES.

#### 6.3.1 Separación de alcaloides mediante cromatografía líquida al vacío.

Teniendo en cuenta lo revelado por el reactivo de Dragendorff modificado en CCF. (Tabla 6). Se inicia la separación de los alcaloides contenidos en el extracto C mediante diferentes técnicas cromatográficas. Dichas técnicas y los productos obtenidos a partir de estas se describen a continuación:

Tabla 6. Preparación reactivo de Dragendorff modificado <sup>122</sup>

<b>SOLUCIÓN A</b>	0.85 g Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O 100 mL CH <sub>3</sub> COOH glacial 40 mL H <sub>2</sub> O
<b>SOLUCIÓN B</b>	16.0 g KI 400 mL
<b>SOLUCIÓN DE RESERVA</b>	Mezclar partes iguales de <b>A</b> y <b>B</b> , guardar en recipiente ámbar.
<b>SOLUCIÓN PULVERIZACIÓN</b>	X mL solución de <b>Reserva</b> 2X mL CH <sub>3</sub> COOH glacial 10X mL H <sub>2</sub> O

- Cromatografía en columna a presión reducida (CLV) siguiendo la metodología descrita por Dalmases y Bonet <sup>125</sup>; se utilizó un embudo Buchner de porcelana, con disco fijo perforado (tamaño de poro 10-12  $\mu\text{m}$ ) de 16 cm de altura x 8 cm de diámetro x 10 cm de soporte. La columna se empacó en seco con sílica gel Merck (70-230 mesh), se sometió a vacío para lograr la máxima densidad de empaque (figura 13).

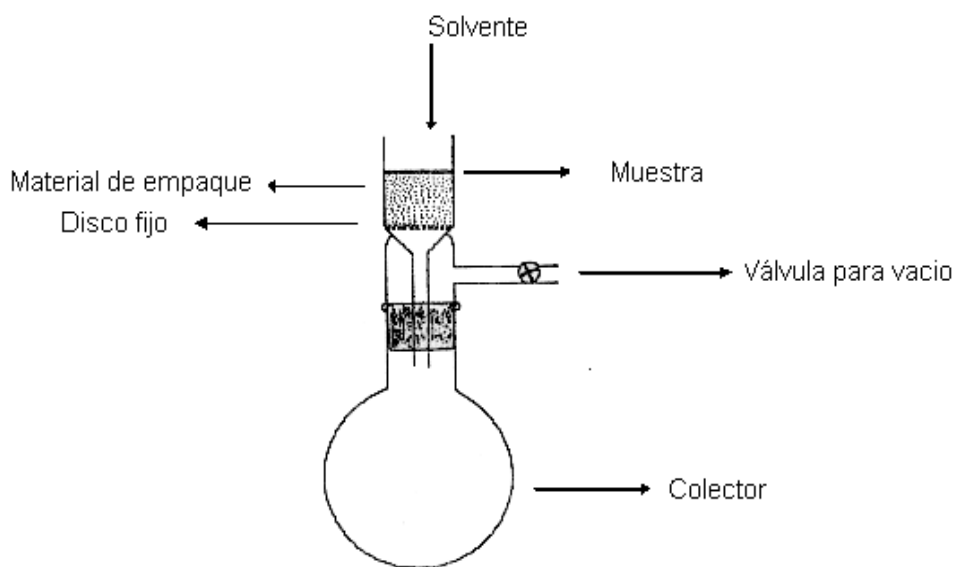


Figura 13. Montaje Columna al Vacío

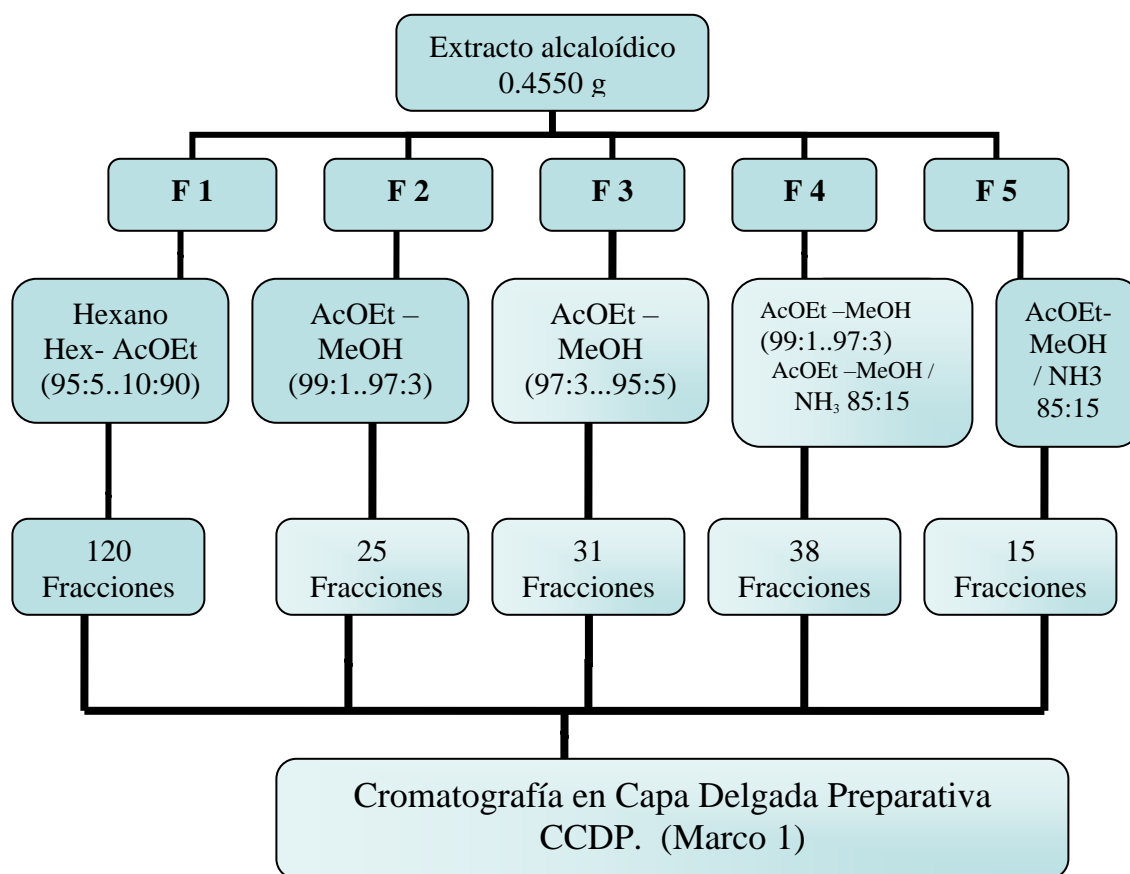
## CONSECUSIÓN DE FRACCIONES

El crudo (0.4550 g) se diluyó en 5 mL de  $\text{CHCl}_3$  y se le agregó sílica gel SDS Chromagel 60 A CC (230-400 mesh) hasta homogenización formándose una pasta fina de color café claro, la cual se seca y se coloca encima de la columna, procediendo a agregar sucesivamente fracciones de 200 mL de hexano, hexano-AcOEt, AcOEt y AcOEt-MeOH en diferentes proporciones como se muestra en la tabla 7.

El desarrollo de la columna se siguió mediante CCF y de acuerdo a la similitud del revelado se reunieron en cinco fracciones como se muestra a continuación en el esquema 3 y tabla 7 denominados **MARCO 1**.

Tabla 7. Mezcla elutrópica utilizada en la columna líquida al vacío.

	<b>Proporciones</b>	<b>No Fracciones</b>	<b>Dragendorff</b>	<b>Fracción (cantidad)</b>
<b>Hexano</b>		7	(-)	<b>F 1</b> (120)
<b>Hexano-Acetato de Etilo</b>	(95:5 a 10:90)	80	(-)	
<b>Acetato de Etilo</b>	(99:1)	18		
<b>Acetato de Etilo-Metanol</b>		15		
<b>Acetato de Etilo-Metanol</b>	(99:1)	5	(+)	<b>F 2</b> (25)
<b>Acetato de Etilo-Metanol</b>	(97:3)	20	(+)	
<b>Acetato de Etilo-Metanol</b>	(97:3)	20	(+)	<b>F 3</b> (31)
<b>Acetato de Etilo-Metanol</b>	(95:5)	11	(+)	
<b>Acetato de Etilo-Metanol</b>	(95:5)	13	(+)	<b>F 4</b> (38)
<b>Acetato de Etilo-Metanol</b>	(93:7)	10	(+)	
<b>Acetato de Etilo-Metanol</b>	(90:10)	10	(+)	
<b>Acetato de Etilo-Metanol/NH<sub>3</sub></b>	(85:15)	5	(+)	
<b>Acetato de Etilo-Metanol/NH<sub>3</sub></b>	(85:15)	15	(+)	<b>F 5</b> (15)
<b>Acetato de Etilo-Metanol/NH<sub>3</sub></b>	(8:2)	5	(-)	(5)



Esquema 3. Fracciones obtenidas CLV

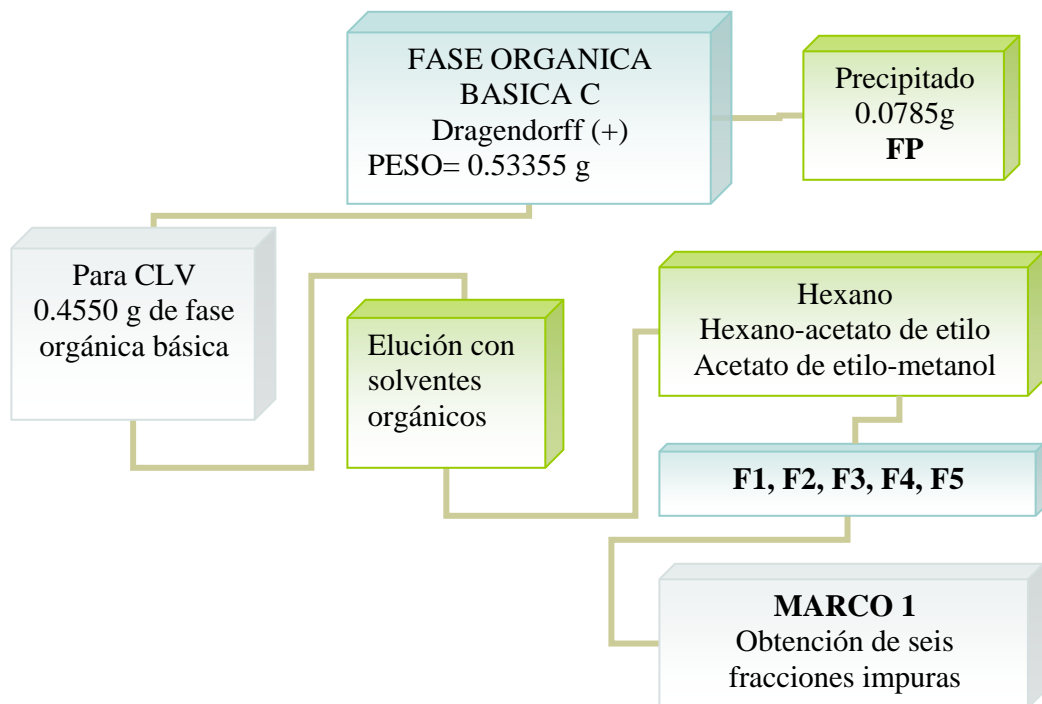
Tabla 8 Fracciones orgánicas impuras obtenidas (**MARCO 1**)

FRACCIÓN 1	0.0075 g muestra
FRACCIÓN 2	0.1955 g muestra
FRACCIÓN 3	0.2360 g muestra
FRACCIÓN 4	0.1467 g muestra
FRACCIÓN 5	0.1035 g muestra

### 6.3.2 Purificación mediante Cromatografía en Capa Delgada Preparativa

Para el desarrollo del presente trabajo se partió de las seis fracciones orgánicas impuras llamadas **Marco 1** (tabla 8), obtenidas del crudo de alcaloides por cromatografía líquida al vacío (CLV) en el Laboratorio de Productos Naturales de

la Universidad de Barcelona (España), Departamento de Farmacia\* (Esquema 4). Dichas fracciones se obtuvieron en el previo tratamiento ya explicado<sup>1</sup> en las Fases I-III.



Esquema 4. Obtención Marco 1

Cada fracción del **MARCO 1** se purificó mediante Cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP), empleando cromatoplasas Merck de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> de 20x20 cm y 1 mm de espesor con soporte de vidrio. El peso máximo de muestra por cromatoplasa fue de 40 mg, el desarrollo se hizo con diferentes mezclas de disolventes en cubetas cromatográficas de vidrio. En el tanque se colocaron aproximadamente 60 mL del eluyente por placa como se muestra en la figura 14.

\* La consecución de las fracciones se realizó en España gracias al convenio de cooperación con Iberoamérica con la Universidad de Barcelona (España).





Figura 14. Cromatografía en Capa Delgada Preparativa

Se revela en UV a 254 y 365 nm. parcialmente en Dragendorff. Se raspan las franjas reveladas en UV, a este se le adiciona metanol caliente con el fin de disolver el alcaloide retenido por la sílica, se filtra empleado una jeringa con algodón, se recoge el filtrado para evaporar el solvente

A partir del **MARCO 1** se realizó el siguiente procedimiento establecido en las fases mostradas a continuación:

#### **FASE IV.**

##### **I. Aislamiento de alcaloides**

La fracción **F1** eluida solamente con Hexano, Hexano-AcOEt (95:5 a 9:1) dio un resultado negativo para alcaloides, aparentemente contenía principalmente grasas, que no son los compuestos de nuestro interés por lo que no se continuó el estudio de esta fracción.

La fracción **F2** eluida con AcOEt-MeOH (99: a 97:3), cuyo peso fue 196 mg, en el ensayo preliminar utilizando como mejor eluyente la mezcla AcOEt-MeOH (1:1) corrida por duplicado permitió observar la presencia de 2 alcaloides Cs-1 (Rf-0.38) y Cs-2 (Rf-0.71). Con el fin de separar estos alcaloides del resto de impurezas se

preparó una por CCDP en la que se utilizó esta mezcla como líquido de desarrollo; los alcaloides se separaron perfectamente y fueron recuperados eluyendo la Sílica gel con metanol caliente con un filtrado posterior, después del secado se obtuvieron 11.6 mg de Cs-1 y 17.4 mg de Cs-2 que fueron identificados posteriormente como galantamina (1) y hemantamina (5), respectivamente.

La fracción **F3** con un peso de 236 mg; eluida con AcOEt-MeOH (91:1 a 97:3) mostró una mayor concentración de alcaloides que la anterior dado el ensayo preliminar por CCD empleando como eluyente para la cromatografía preparativa AcOEt-MeOH (99.5:0.5) en atmósfera de amoníaco utilizada con el fin de invertir la polaridad de los compuestos a separar y de esta manera obtener una mejor resolución. Se obtuvieron cuatro manchas al utilizar la lámpara U.V y además con el reactivo de Dragendorff de las cuales se pudo identificar que dos de ellas corresponden a los alcaloides galantamina (1) y hemantamina (5) aislados en la fracción anterior; sin embargo no se lograron separar los otros dos alcaloides completamente Cs3 17.4 mg y Cs4 4.7 mg contenidos en el extracto, con esto se consiguió una purificación previa que permitirá simplificar posteriores separaciones con técnicas más resolutivas.

La fracción **F4** pesa 146.7 mg de mezcla; contiene las fracciones obtenidas de AcOEt-MeOH (95.5 a 9:1) y las primeras fracciones de 85:15 en atmósfera de amoníaco, se purifican en CCDP utilizando como mejor fase móvil AcOEt-MeOH (95:5) en atmósfera de amoníaco de donde se obtienen cuatro compuestos denominados Cs8, Cs9, Cs10, Cs11 de peso 11.7 mg, 10.6 mg, 35.2 mg, 6.8 mg respectivamente. Identificando posteriormente Cs8 como hamayna (7) y Cs9 como homolicorina (3); Cs10 y Cs11 se encontraron como mezcla.

La fracción **F5** constituye 103,5 mg, obtenidos de la elución de AcOEt-MeOH (85:15) en atmósfera de amoníaco, se purifica en CCF preparativa utilizando como mejor mezcla de elución AcOEt-MeOH (99:1) en atmósfera de amoníaco, se observan tres manchas denominadas Cs5, Cs6 y Cs7 con 19.7 mg, 5.5 mg, 29.7 mg respectivamente; análisis posteriores determinaron Cs5 como maritidina (6); Cs6 y Cs7 se encontraron como mezclas.

### **6.3.3 Purificación mediante Cromatografía Líquida en Columna a Gravedad.**

Las mezclas obtenidas de la CCF preparativa identificados como Cs10; Cs11 y Cs6 fueron reunidos y sometidos a una purificación final mediante cromatografía en columna líquida a gravedad debido a su similitud en CCF utilizando como fase estacionaria Sílica gel 60 (0.063 a 0.2 mm) y como fase móvil mezcla elutrópica

de Hexano; Hexano-AcOEt; acetato de etilo; AcOEt-MeOH hasta 60% de metanol; siguiendo un procedimiento similar al utilizado en Cromatografía Líquida al vacío. Se recogieron 584 fracciones de 25 mL cada una de donde se obtienen dos compuestos que revelan con luz U.V y con Dragendorff pero la muestra fue insuficiente para su determinación estructural.

#### **6.3.4 Identificación de alcaloides.**

Para la determinación estructural de los alcaloides aislados se utilizaron las siguientes técnicas instrumentales:

**Espectro Infrarrojo (IR).** Espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo 1430 y 1600 FT IR, en pastilla de KBr o en película ( $\text{CHCl}_3$ ).

**Espectro de Resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .** Se realizaron en espectrofotómetros VARIAN modelos Gemini-200, Gemini 300 y VXR-500. Los productos se disolvieron en  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  usando como referencia interna TMS y  $\text{CHCl}_3$ . Los espectros de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ -COSY y ROESY se corrieron en un aparato VARIAN VXR-500, utilizando las secuencias de pulsos estándar.

**-Espectro de Masas (EM).** Espectrómetro HEWLETT-PACKARD Modelo 5989 Å, con introducción directa de las muestras y con una energía de ionización de 70 eV.

**Análisis elemental (AE).** Analizador EAGER 200 Stripchart, tiourea como referencia interna.

**Puntos de fusión.** Tubos capilares abiertos, con un aparato Büchi CTP-MP 300, o Gallenkamp M.P. Se reportan sin corrección.

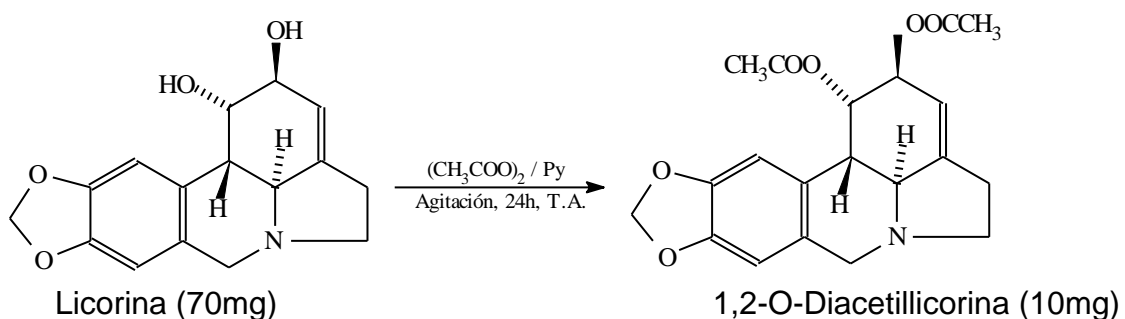
**Dicroísmo circular (DC).** Espectropolarímetro JASCO J-720, expresando los resultados como elipticidad molar [ $\Theta$ ]. Técnica espectroscópica utilizada en

análisis estereoquímico, aplicada en alcaloides de **Amaryllidaceae** en su elucidación estructural <sup>109</sup>. Para todos los casos la concentración es 1 mg/mL.

**Rotación específica**  $[\alpha]_D$ . Polarímetro Perkin-Elmer 241, 40 microamperios, 20°C, utilizando una lámpara de sodio de  $\lambda = 589$  nm, EtOH, MeOH y CHCl<sub>3</sub> como solventes. Este dato se evalúa en las condiciones estandarizadas para cada alcaloide por el grupo investigador en **Amaryllidaceae** de la Universidad de Barcelona. Se compara con la información registrada en la base de datos.

### 6.3.5 PREPARACIÓN DE DIACETATO DE LICORINA <sup>122</sup>.

Licorina (2) (70 mg) se añadió a una solución de piridina (1 mL) y anhídrido acético (2 mL). Se dejó la mezcla en agitación por 24 horas a temperatura ambiente. La reacción se monitoreó por CCD en EtOAc-MeOH (1:1). Se agregó agua fría (20 mL), pero no se formó precipitado. Se extrajo con éter etílico (3x25 mL). La solución etérea se trató sucesivamente con HCl (25 mL, 0.1 N), NaHCO<sub>3</sub> (25 mL, 10 %), agua salada (25 mL) y finalmente agua destilada (25 mL). Se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se evaporó el éter y se obtuvo el diacetato de licorina (10 mg).



## 7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 7.1 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ALCALOIDES AISLADOS DE *Caliphruria subedentata*.

Del estudio fitoquímico de la planta entera de *Caliphruria subedentata* como ya se ha mencionado en el apartado de metodología se han aislado seis alcaloides todos ellos ya habían sido detectados previamente en otras especies de la familia **Amaryllidaceae**.

La elucidación estructural de los alcaloides aislados se ha hecho con base en las técnicas espectroscópicas de RMN de protón y carbono, así como espectrometría de masas y propiedades físicas, comparándose con los resultados descritos en la literatura además la confirmación de las asignaciones se ha basado en los cálculos de las conformaciones mas estables para estos alcaloides, obtenidos con el programa informática ACD/ChemSketch (versión 3.50) Richmond St. West.

#### 7.1.1 Datos Físicos y espectroscópicos de los alcaloides aislados.

##### Csp-1

Alcaloide de punto de fusión 260-262 °C, aislado en forma cristalina (80 mg) como precipitado del extracto alcaloídico de *Caliphruria subedentata*, identificado como licorina (2) con base en el estudio de las siguientes propiedades:

Análisis elemental: C 66.77, H 5.90, N 4.40. Calculado para un C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>: C 66.89, H 5.96, N 4.88 %

$[\alpha]_D^{22} = -62^\circ$  ( c 0.1, EtOH)

IR  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3302, 1501, 2900, 2543, 2364, 1224, 1015 y 937

EM m/z ( int.rel): 287(24)[ M]<sup>+</sup>, 286 [ M-H]<sup>+</sup>, 269 (4), 268 (18), 226 (100), 211 (5), 147 (15), 119 (9), 83 (10).

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OH) Y RMN<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ver tabla 9 y tabla 10 respectivamente.

## Cs1

Alcaloide de punto de fusión 199-201°C, este alcaloide cristaliza en forma de prismas tanto en metanol como en CHCl<sub>3</sub> dando 35.6 mg de compuesto puro identificado como hemantamina (5) en base al estudio de las siguientes propiedades:

Análisis elemental: C 68.02; H 6.5; N 4.68; calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>: C 67.76; H 6.35; N 4.65%.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20°</sup> +38 (CHCl<sub>3</sub>; c 0.45).

Dicroísmo circular: [  $\theta$  ]<sub>284</sub> +1624, [  $\theta$  ]<sub>253</sub> - 3436.

IR  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> :3100-3400; 1800-1600; 1950-1850; 1481; 1238; 933.

EM 70 eV  $m/z$  ( int.rel): 301(65)[ M]<sup>+</sup>, 269 (41), 257(48), 227 (100), 225(96), 224 (65), 181 (96), 115 (52), 43(89).

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Y RMN<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ver tabla 11 y tabla 12 respectivamente.

## Cs2

Alcaloide punto de fusión 124-126 °C, recristalizado en metanol dando 28.5 mg de compuesto puro identificado como galantamina (1) mediante el análisis de las siguientes propiedades:

Análisis elemental; C 71.22; H 7.51; N 4.84; calculado para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub>: C 71.06; H 7.37; N 4.8 %.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20°</sup> -115 (EtOH; c 0.5).

IR  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> :3210; 1890-1700; 1671.9; 1482; 1238; 1040.

EM(\*) 70 eV  $m/z$  ( int.rel): 287(100)[ M]<sup>+</sup>; 217; 174

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Y RMN<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ver tabla 13 y tabla 14 respectivamente.

## Cs 5

Alcaloide de punto de fusión 251-254 °C, recristalizado en metanol de donde se obtuvieron 19,7 mg del compuesto identificado como maritidina (6) mediante los siguientes datos espectroscópicos:

Análisis elemental: C 71.10; H 7.40; N 4.85; calculado para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>: C 71.06; H 7.37; N 4.87%

$[\alpha]_D^{20} +14.3^\circ$  (MeOH; c 0.84).

IR  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 2359, 1605, 1508, 1458, 1442, 1317, 1262, 1032, 849, 767.

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Y RMN<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ver tabla 15 y tabla 16 respectivamente.

## Cs8

Alcaloide de punto de fusión 81-83 °C, recristalizado en metanol proporciona 11.7 mg del compuesto puro identificado como hamayna (7) mediante el análisis de las siguientes propiedades:

Análisis elemental: C 67.02; H 6.14; N 4.83; calculado para C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>: C 66.87; H 5.97; N 4.88%.

$[\alpha]_D^{22^\circ} +80$  (EtOH; c 0.60)

Dicroísmo circular:  $[\theta]_{245} -5570$ ,  $[\theta]_{290} + 4420$ .

IR (\*)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3500-3300; 1620; 1482; 932.

EM 70 eV *m/z* (int.rel): 287[M]<sup>+</sup>; 269(100); 240 (18); 225(11); 224(7); 181(17); 115(7); 77(4); 56(12); 55(21); 54(10); 44(42); 43(55); 42(20); 41(15).

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Y RMN<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ver tabla 17 y tabla 18 respectivamente.

## Cs 9

El sexto alcaloide aislado de punto de fusión 169-171°C, fue identificado como homolicorina (3) gracias a los datos físicos y espectroscópicos obtenidos:

Análisis elemental: C 68.72; H 6.75; N 4.40; calculado para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>: C 68.55; H 6.97; N 4.44%.

$[\alpha]_D^{20^\circ} +93.5^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; c 1.2)

IR (\*)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 2820,1700,1600,1260-1245,1080.

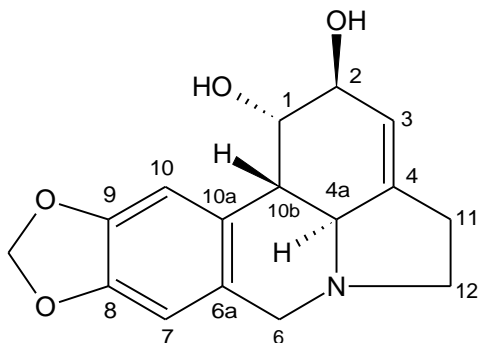
EM 70 eV *m/z* (int.rel): 206 (1), 178 (3), 109 (100), 108 (29), 94 (6), 82 (8), 42 (13).

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Y RMN<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ver tabla 19 y tabla 20 respectivamente.

(\*) Valores tomados de la base de datos del Laboratorio de Productos Naturales Universidad de Barcelona, España. (No se muestran los espectros).

### 7.1.2 Elucidación Estructural Csp-1

El primer alcaloide que se obtuvo del extracto básico C de *Caliphruria subedentata* pudo ser identificado como licorina (2) mediante sus datos físicos y los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, IR y EM. Al ser la licorina el alcaloide más ampliamente distribuido en la familia Amaryllidaceae, su estructura y estereoquímica están completamente demostradas.



**Licorina (2)**

#### Espectro IR

El espectro IR presenta como rasgos destacables la presencia de las señales correspondientes a la vibración de tensión del enlace oxígeno-hidrogeno del hidroxilo a  $3302\text{ cm}^{-1}$ , del enlace C-O-C a  $1244\text{ cm}^{-1}$  y O-CH<sub>2</sub>-O a  $932\text{ cm}^{-1}$ . Figura 15.

#### Espectro de $^1\text{H}$ -RMN

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de licorina (2) (figura 16), registrado en CD<sub>3</sub>OD a 200 MHz, muestra las señales características de los alcaloides con estructura pirolofenantridínica con una insaturación en el anillo C, señales que han permitido la caracterización del alcaloide, en concordancia con las citadas en la bibliografía:

- Dos singuletes en la zona aromática a  $\delta$  6.88 y 6.64 ppm, característicos de los protones H-10 y H-7 del anillo A, que no acoplan entre sí.
- Un singulete a  $\delta$  5.91 ppm, que integra dos protones y que corresponden al grupo metilendioxo del anillo dioxol.



- Un singulete ancho a  $\delta$  5.5 ppm, asignable al protón vinílico H-3.
- Un singulete ancho a  $\delta$  4.46 ppm, correspondiente al H-1.
- Dos dobletes a  $\delta$  4.11 y 3.50 ppm, característico para los protones  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, de la posición 6, adyacente al átomo de nitrógeno y al núcleo aromático. La asignación del protón  $\beta$  a campos más bajos está en concordancia con su disposición *cis* con respecto al par de electrones libres del átomo de nitrógeno. Se trata de un sistema AB simple, con una constante de acoplamiento ( $J_{gem} = 16 \text{ Hz}$ ) típica de los protones geminales.
- Un singulete a  $\delta$  4.15 que corresponde al protón H-2.
- Un multiplete a  $\delta$  3.31 ppm, asignado al protón  $\beta$  de la posición 12, el protón se encuentra a campos más altos, concretamente a 2.45 ppm como doblete de tripletes. En este caso, los protones de la posición 12 formarían un sistema AX simple.
- Un doblete ancho a  $\delta$  2.93 y otra a 2.70 ppm ( $J = 10.7 \text{ Hz}$ ), asignables a H-4a y H-10b, respectivamente, formando un sistema AB. La disposición *trans* entre los anillos B y C del sistema tetracíclico se pone de manifiesto por la magnitud de la constante de acoplamiento. Además, en esta zona alifática puede observarse el multiplete correspondiente a los protones de la posición 11.

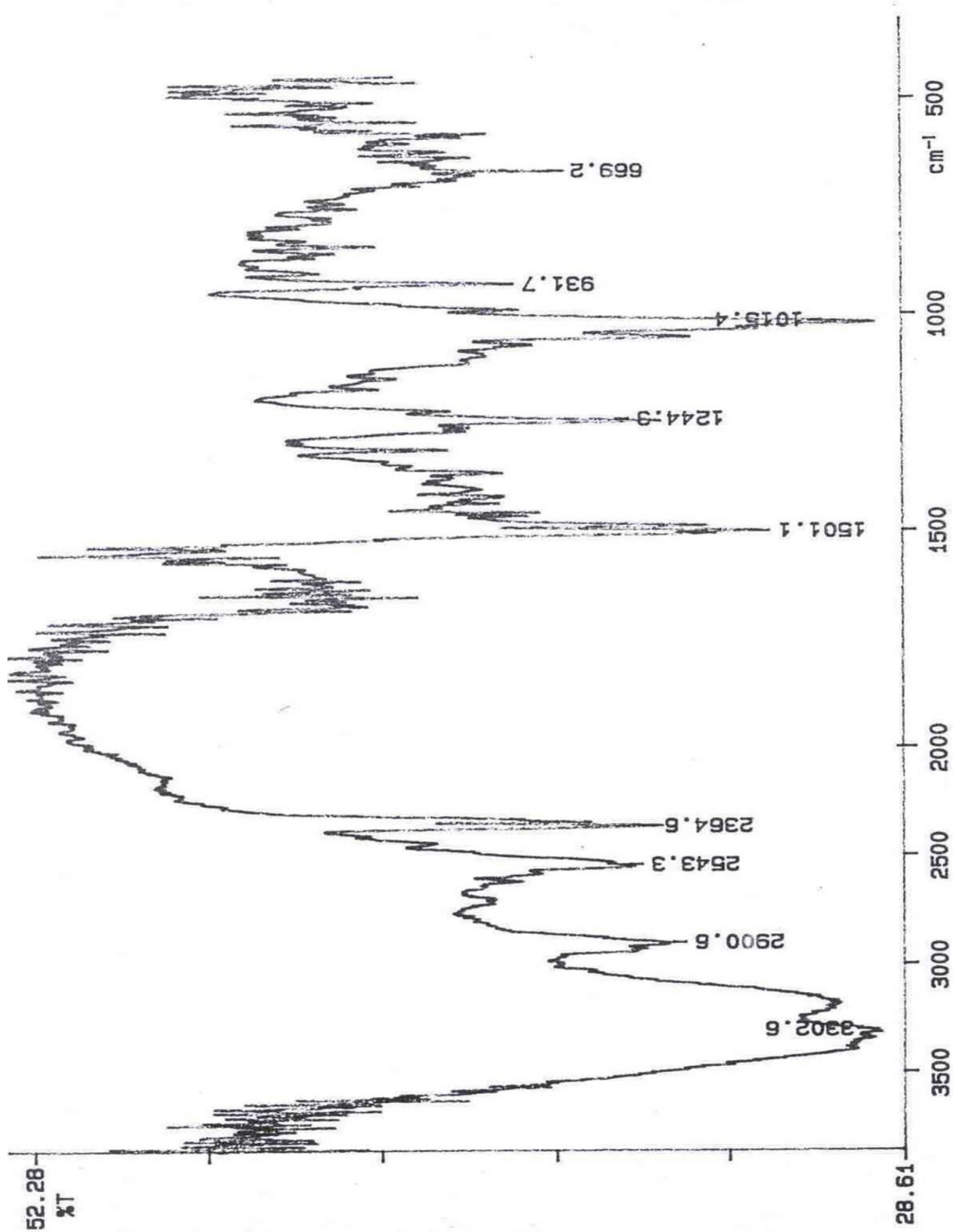


Figura 15. Espectro IR de licorina (2)

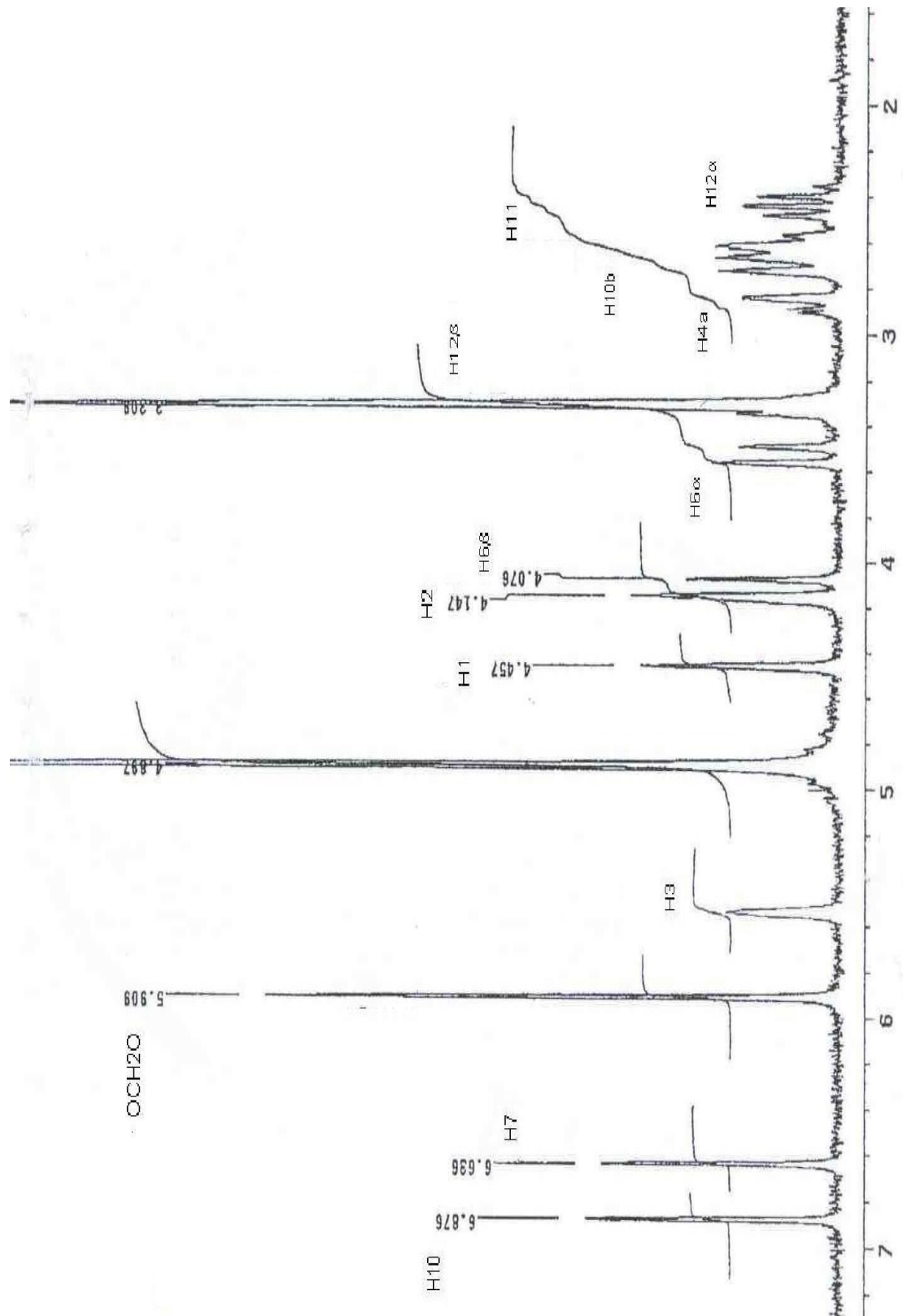


Figura 16. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de licorina (2)

Tabla 9 Datos espectro  $^1\text{H}$ -RMN y de correlación ROESY de licorina (2).

H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)	ROESY
1	4.46	sa		H-2, H-10
2	4.15	s		H-1, H-3
3	5.55	sa		H-2
4a	2.93	d	4a, 10b=10.7	H-10b
6 $\alpha$	3.50	d	6 $\alpha$ , 6 $\beta$ = 16.0	H-6 $\beta$ , H-10b
6 $\beta$	4.11	d	6 $\beta$ , 6 $\alpha$ = 16.0	H-6 $\alpha$ , H-7
7	6.64	s		H-6 $\beta$
10	6.88	s		H-1
10b	2.79	dd	10b, 4a = 10.7	H-6 $\alpha$ , H-4a
11	2.68	m	11, 12 $\alpha$ - 12 $\beta$ = 8.4	
12 $\alpha$	2.45	dt		H-12 $\beta$ , H-6 $\alpha$
12 $\beta$	3.31	m		H-12 $\alpha$
OCH <sub>2</sub> O	5.91	s		

La verificación de algunas asignaciones se ha podido realizar mediante un experimento ROESY. Así se observa un claro efecto de correlación entre los protones H-1 y H-10 señales a  $\delta$  4.46 y 6.88 ppm respectivamente. En cambio, no se observa efecto NOE al irradiar la señal a  $\delta$  6.64 ppm. Por ello el singulete a  $\delta$  6.88 ppm se asigna al protón aromático H-10 y la señal a  $\delta$  6.62 ppm al protón H-7; Figura 17; las demás señales de correlación se pueden observar en la tabla 9.

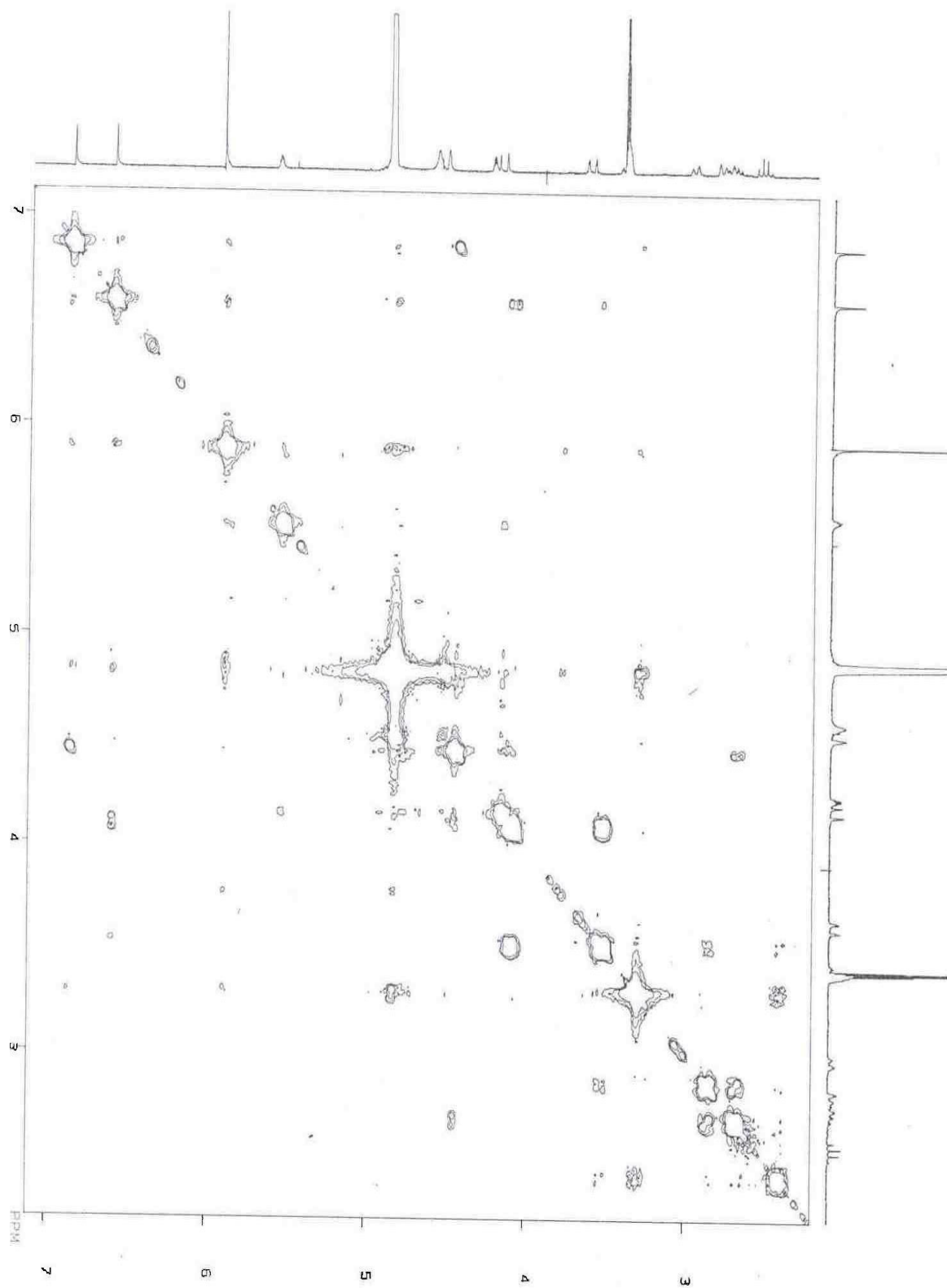


Figura 17. Espectro ROESY de licorina (2)

## Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de licorina (2) (figura 18) y otros alcaloides del mismo tipo es bien conocido y sirve de comparación para el resto de alcaloides, todos ellos correspondientes al mismo esqueleto de licorano.

Las señales que presenta son las siguientes:

A campos bajos:

- Cinco señales de baja intensidad, discriminadas en la experiencia DEPT (figura 19) como los carbonos cuaternarios del anillo aromático y el carbono cuaternario del doble enlace. Los carbonos correspondientes al anillo aromático se presentan a  $\delta$  146.5, 146.0, 128.5 y 127.8 ppm y corresponden, respectivamente, a los carbonos C-8 y C-9, C-6a y C-10a. Estos desplazamientos varían en función de los sustituyentes en C-8 y C-9, así el carbono olefínico y cuaternario C-4 se presenta a 141.9 ppm.
- La señal a  $\delta$  117.5 ppm se asigna al carbono olefínico C-3.
- Los dobletes a 106.7 y 104.5 ppm se asignan a los carbonos aromáticos C-7 y C-10.
- La señal a 100.5 ppm, corresponde al carbono metilénico del grupo metilendioxo.

A campos altos

- Se distinguen mediante la experiencia DEPT los carbonos metilénicos C-12, C-6 y C-11, los cuales aparecen a  $\delta$  56.2, 53.0 y 27.6 ppm en la fase negativa del espectro respectivamente. Las señales restantes corresponderían, las más desapantalladas, a  $\delta$  71.3 y 70.1 ppm a los carbonos C-2 y C-1 a consecuencia del efecto de los respectivos grupos hidroxilo, y los dos dobletes a  $\delta$  60.6 y 39.2 ppm, a los carbonos C-4 a y C-10b.

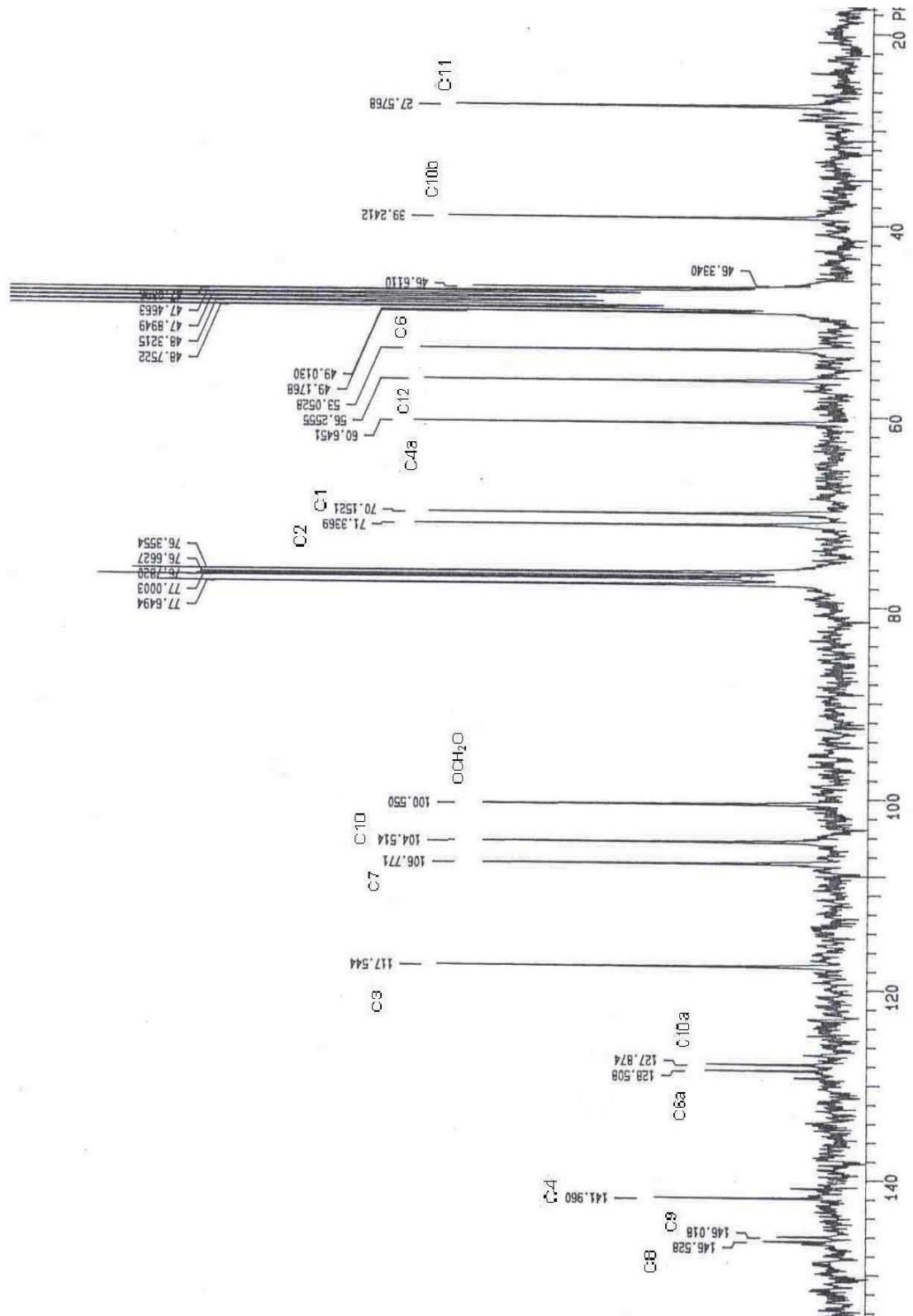


Figura 18. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN de licorina (2)

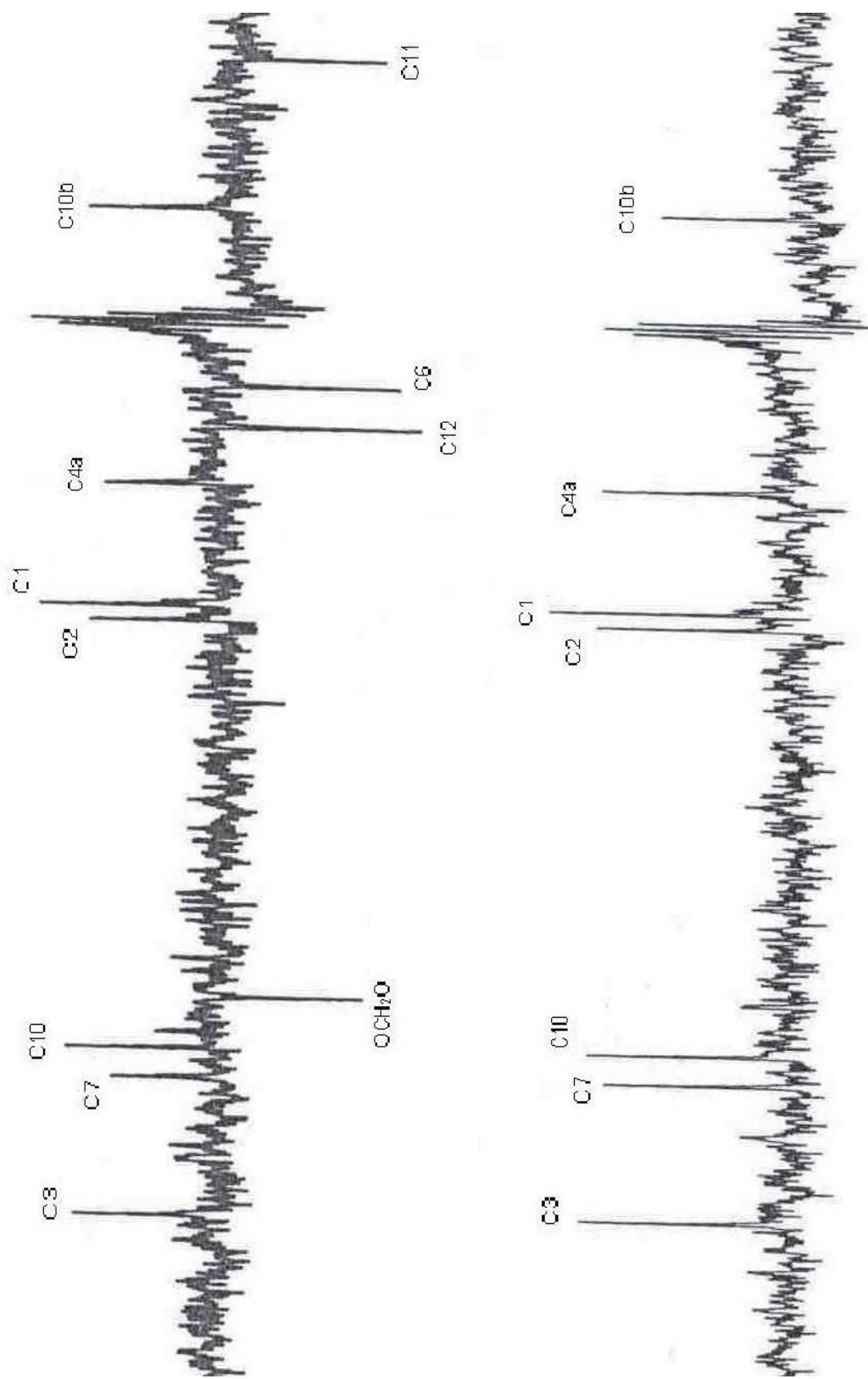


Figura 19. Espectro DEPT de licorina (2)



Tabla 10 Datos espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de licorina (2)

C	$\delta$ (ppm)	DEPT
1	70.1	CH
2	71.3	CH
3	117.5	CH
4	141.9	C
4a	60.6	CH
6	53.0	CH <sub>2</sub>
6a	128.5	C
7	106.7	CH
8	146.5	C
9	146.0	C
10	104.5	CH
10a	127.8	C
10b	39.2	CH
11	27.6	CH <sub>2</sub>
12	56.2	CH <sub>2</sub>
OCH <sub>2</sub> O	100.5	CH <sub>2</sub>

### Espectro de Masas

El espectro de masas de licorina (2) presenta un ión molecular relativamente intenso a  $m/z = 287$  (figura 20). El pico base se observa a 226, aunque es también importante el  $m/z = 227$ . Estos fragmentos se originan por rotura del anillo C por un proceso tipo retro-Diels Alder, con pérdida subsiguiente de un hidrógeno radical, lo que daría lugar al fragmento  $m/z = 226$ , más estable. El fragmento restante sería un etilenglicol de  $m/z = 60$ . Otro fragmento importante es el de  $m/z = 269$ , que representa la pérdida de agua del ión molecular (figura 21).

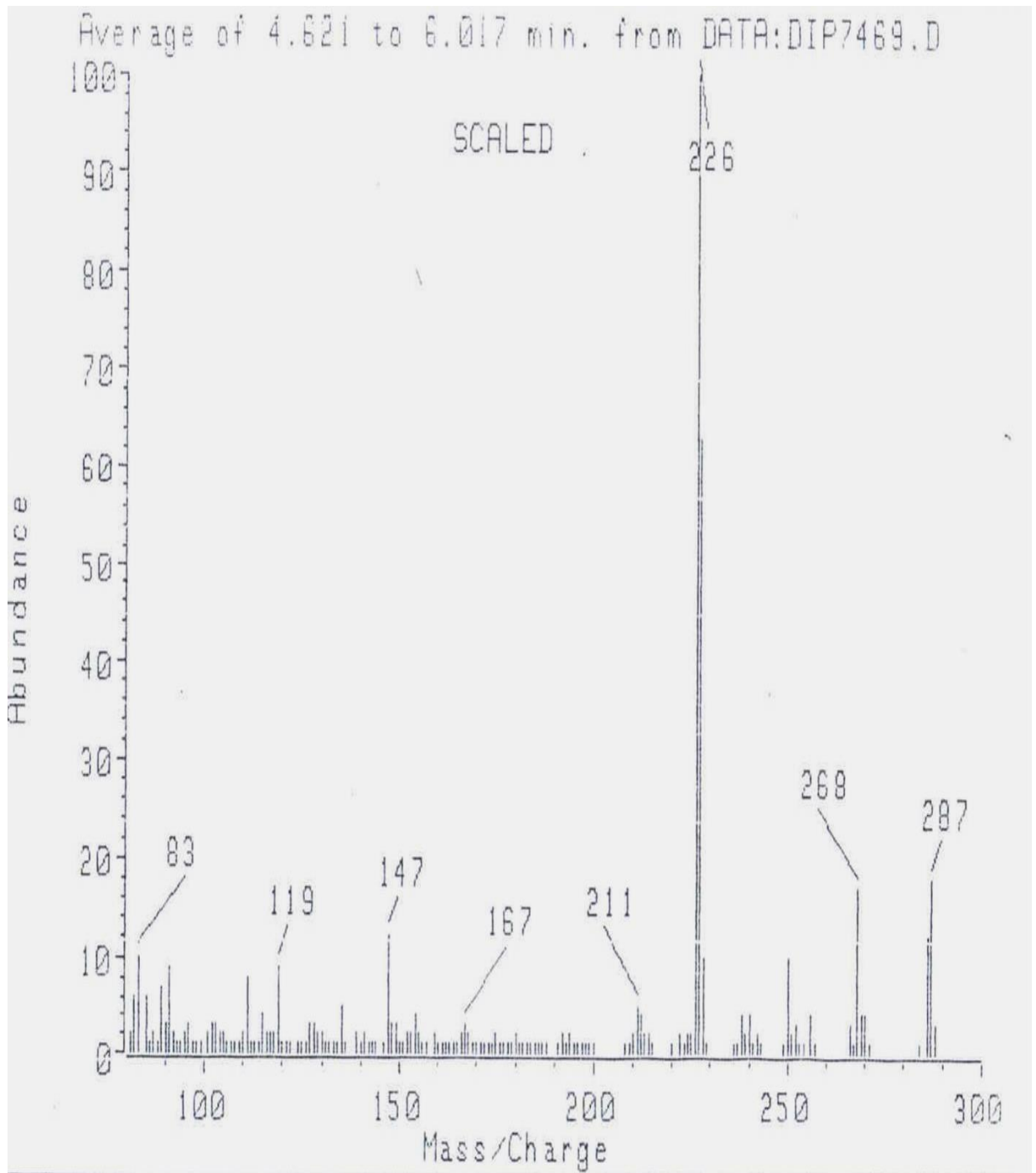


Figura 20. Espectro Masas de licorina (2)

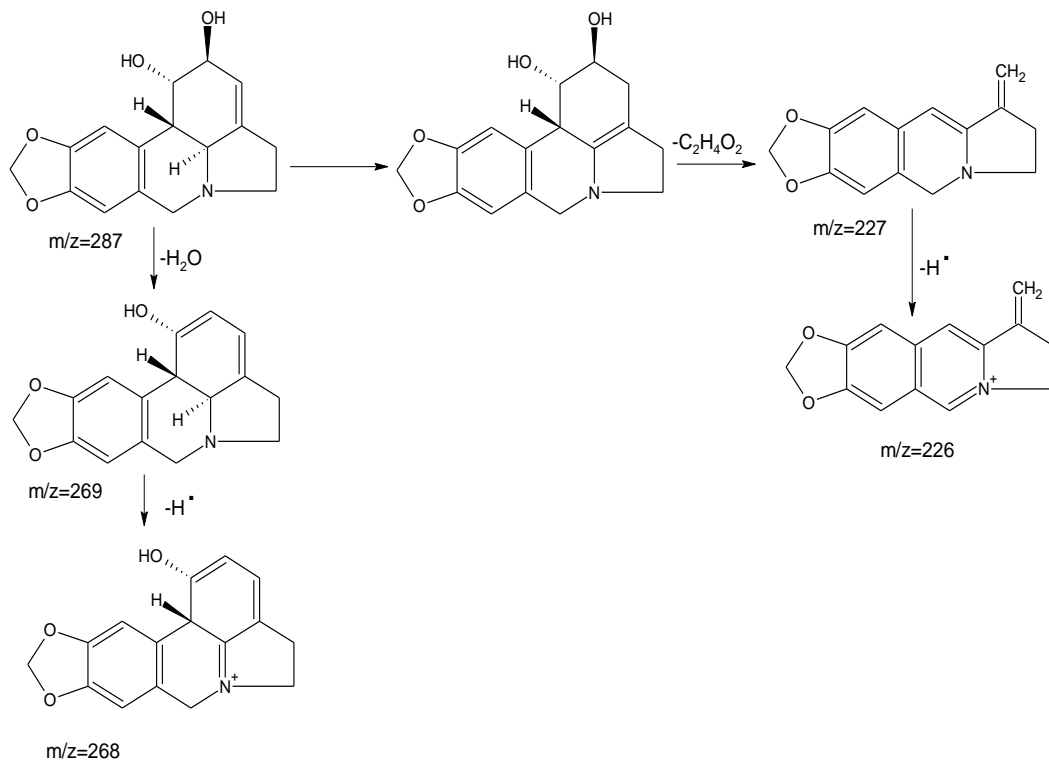


Figura 21. Fragmentación de licorina (2)

Una confirmación ulterior de la estructura de la licorina (2) viene dada a través del cálculo de la conformación más estable de la molécula. En esta conformación se puede observar la proximidad espacial entre H-10 y H-1, H-6 $\alpha$  y H-4 a, H-3 y H-2, así como la disposición en *trans* entre los anillos B y C (figura 22).

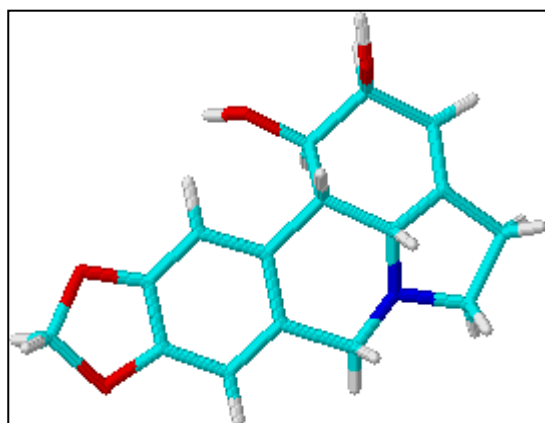
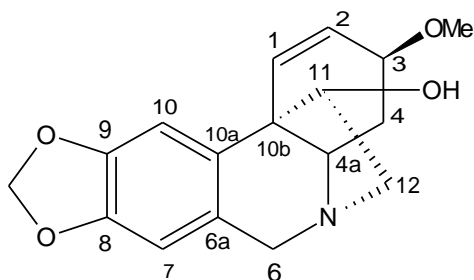


Figura 22. Estructura de mínima energía de licorina (2)

### 7.1.3 Elucidación estructural de Cs1.



**Hemantamina (5)**

El compuesto de referencia Cs1, aislado del extracto C, se identificó como hemantamina (5), y constituye el segundo alcaloide mayoritario de la especie en estudio. Este alcaloide se aisló por primera vez en un híbrido del género *Haemanthus*<sup>126</sup>, y con el nombre de natalensina en *Haemantus natalensis* y *H. puniceus*<sup>127</sup>. Su estructura se estableció en el año de 1960<sup>128</sup> y se demuestra completamente con base a un estudio de sus datos espectrales de masas y principalmente de RMN 1D y 2D.

#### Espectro de IR.

Este espectro sólo tuvo un carácter confirmatorio de los grupos funcionales presentes en su estructura; así se observó: (Figura 23).

- banda ancha entre 3100-3400  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración de tensión del grupo hidroxilo.
- Sobretonos armónicos entre 1800-1600, correspondiente al anillo aromático.
- bandas agudas en la zona entre 2950-2850  $\text{cm}^{-1}$ , asignables a las vibraciones del estiramiento del enlace C-H del grupo metilendioxi.

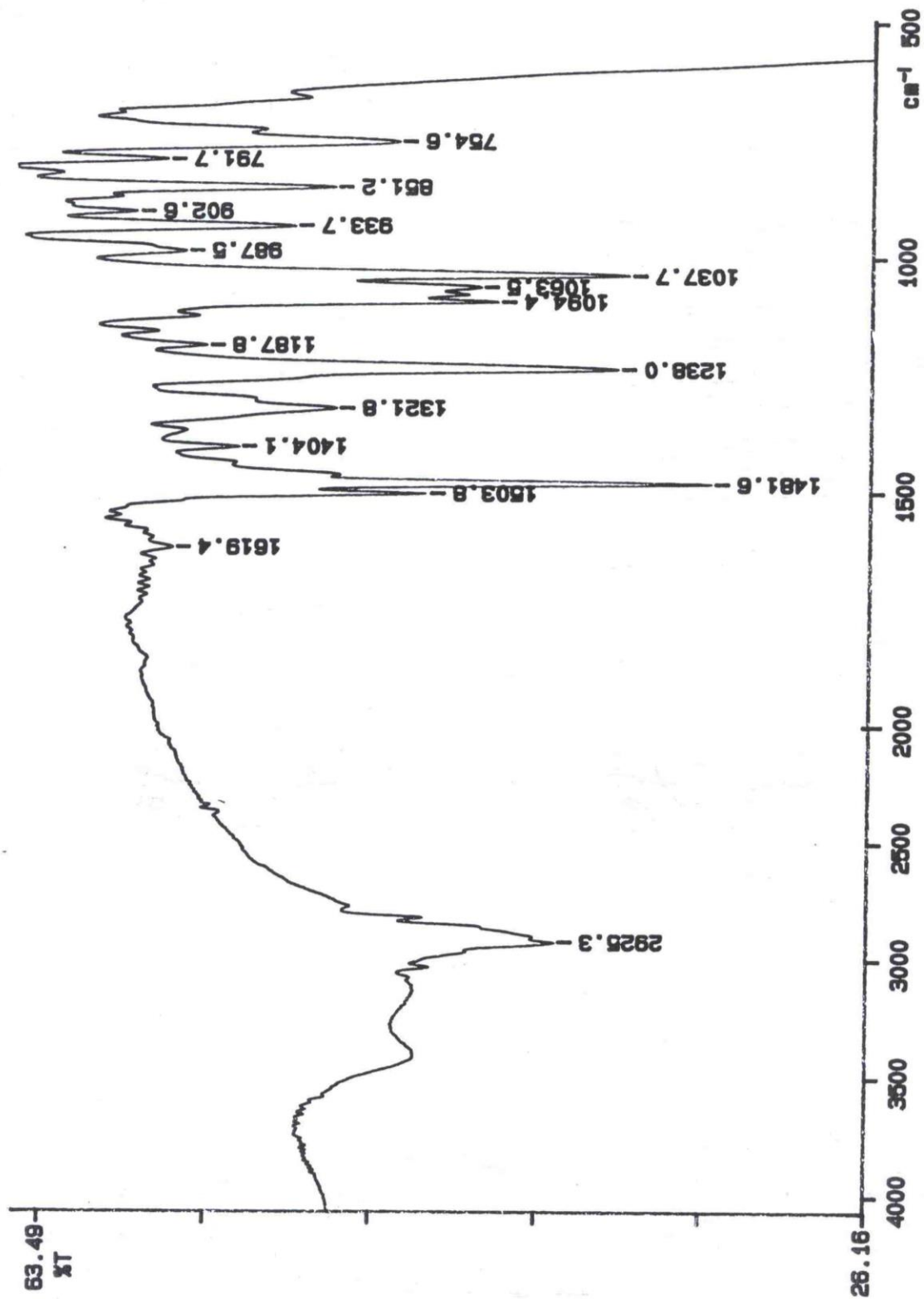


Figura 23. Espectro IR de hemantamina (5)

## Espectro de $^1\text{H}$ -RMN

- Dos singuletes a  $\delta$  6.81 y 6.47, correspondientes a los protones aromáticos H-10 y H-7. El protón H-10 se localiza a campos más bajos que la señal del protón H-7 debido a la proximidad de la olefina del anillo C <sup>129</sup>.
- A  $\delta$  5.89 ppm están los protones correspondientes al grupo metilendioxi del anillo aromático.
- La olefina ubicada entre los carbonos 1-2, que constituye un sistema ABX con H-3, distinguiéndose H-1  $\delta$  6.39 ppm, el cual acopla únicamente con H-2, que se encuentra a  $\delta$  6.25 ppm, se aprecia además un acoplamiento con el vecino H-3 dando como señal un doble doblete como resultado del acoplamiento con los protones H-1 ( $J = 10.0$ ) y H-3 ( $J = 5.0$ ); si bien la presencia de un doble enlace entre C-1/C-2 permite dos conformaciones posibles del anillo C en los sistemas 5,10b- etanofenantridínicos (figura 24), la conformación de semisilla (A) parece ser la más estable, y ello puede confirmarse con la magnitud de la constante de acoplamiento entre los protones H-2 y H-3, los cuales forman un ángulo aproximado de  $45^\circ$ , por lo que la  $J$  calculada oscila entre 4-5 Hz, siendo la  $J$  observada de 5.0 Hz;
- El protón H-3, que acopla a su vez con los hidrógenos de la posición 4, se desplaza a 3.82 ppm, apareciendo en forma de multiplete.
- Los protones en 4 muestran la señal más compleja, presentando una multiplicidad en forma de ddd, ya que acoplan entre sí con un constante geminal grande y con los respectivos protones vecinales, se distingue el protón H-4 $\alpha$ , a 2.15 ppm, con dos constantes de acoplamiento grandes, una geminal y la otra transdiaxial, con el protón de la posición 4a, mientras que H-4 $\beta$ , a  $\delta$  2.00, presenta un acoplamiento geminal y dos vecinales más pequeños, como consecuencia de su disposición ecuatorial.
- A campos altos se distingue un singulete agudo, a 3.35 ppm, correspondiente al grupo metoxilo no aromático en la posición 3 del anillo C. (figura 25)
- Un doble doblete a 3.25 ppm correspondiente al protón 4a, que acopla con los protones en 4 $\alpha$  y 4 $\beta$ .
- Los protones no equivalentes en 12, H-12 exo, a 3.23 ppm, y H-12 endo, a 3.35 ppm. La asignación de estos protones se evidencia por su correlación con H-11 del puente etano, el cual presenta un desplazamiento químico a  $\delta$

3.96, con multiplicidad en forma de dd. El hecho de que no aparezca como triplete confirma que los protones de la posición 12 no sean equivalentes, y el hecho de que H-12 exo aparezca más desapantallado se debe a su disposición en *syn* respecto al par de electrones libre del nitrógeno<sup>130</sup>

- Los protones metilénicos en 6 muestran un gran acoplamiento geminal de 16.8 Hz, que esta en concordancia con la bibliografía<sup>131</sup>. El mayor desapantallamiento de H-6 $\beta$  a  $\delta$  4.28 ppm está relacionado con su disposición en *cis* respecto al par de electrones no enlazante del nitrógeno; lo que no ocurre con H-6 $\alpha$  a  $\delta$  3.73 ppm.

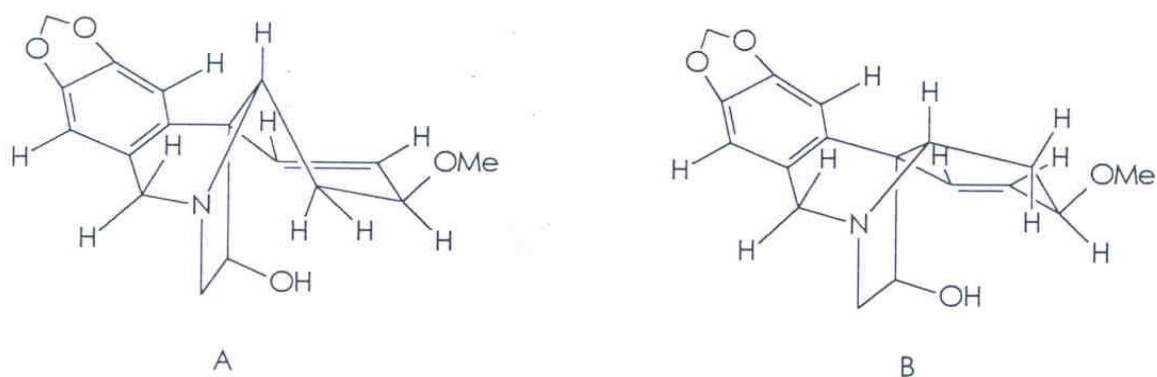


Figura 24. Posibles conformaciones de hemantamina (5)

Tabla 11 Datos del espectro de <sup>1</sup>H-RMN y de correlación COSY hemantamina (5)

H	δ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)	COSY
1	6.39	d	1,2 =10.0	H-2
2	6.25	dd	2,1=10.0 2,3= 5.0	H-1, H-3
3	3.82	m	3,2=4.8 3,4 <sub>α</sub> =3,6 3,4 <sub>β</sub> =1.9	H-2, H-4 <sub>α</sub> , H-4 <sub>β</sub> , H-OCH <sub>3</sub>
4 <sub>α</sub>	2.15	ddd	4 <sub>α</sub> ,4 <sub>β</sub> =13.7 4 <sub>α</sub> ,4 <sub>a</sub> =13.6 4 <sub>α</sub> ,3=4.2	H-3, H-OCH <sub>3</sub> , H-4 <sub>β</sub>
4 <sub>β</sub>	2.00	ddd	4 <sub>β</sub> ,4 <sub>a</sub> =13.7 4 <sub>β</sub> ,4 <sub>a</sub> =4.6 4 <sub>β</sub> ,3=1.0	H-3, H-OCH <sub>3</sub> , H-4 <sub>α</sub>
4 <sub>a</sub>	3.25	dd	4 <sub>a</sub> ,4 <sub>β</sub> =13.6 4 <sub>a</sub> ,4 <sub>α</sub> =4.6	
6 <sub>α</sub>	3.73	d	6 <sub>α</sub> ,6 <sub>β</sub> =16.8	H-7, H-6 <sub>β</sub>
6 <sub>β</sub>	4.28	d	6 <sub>β</sub> ,6 <sub>α</sub> =16.8	H-7, H-6 <sub>α</sub>
7	6.47	s		H-6 <sub>α</sub> , H-6 <sub>β</sub>
10	6.81	s		
11endo	3.96	dd	11endo,12endo=6.6 11endo,12exo=3.3	H-4 <sub>a</sub> , H-OCH <sub>3</sub>
12exo	3.23	dd	12exo,12endo=13.9 12exo,11endo=3.3	11, 12endo
12endo	3.35	dd	12endo,12exo=13.9 12endo,11endo=6.7	11, OCH <sub>3</sub> , 12exo
OCH <sub>2</sub> O	5.89	s		
OCH <sub>3</sub>	3.35	s		11, H-4 <sub>α</sub> , H-4 <sub>β</sub>



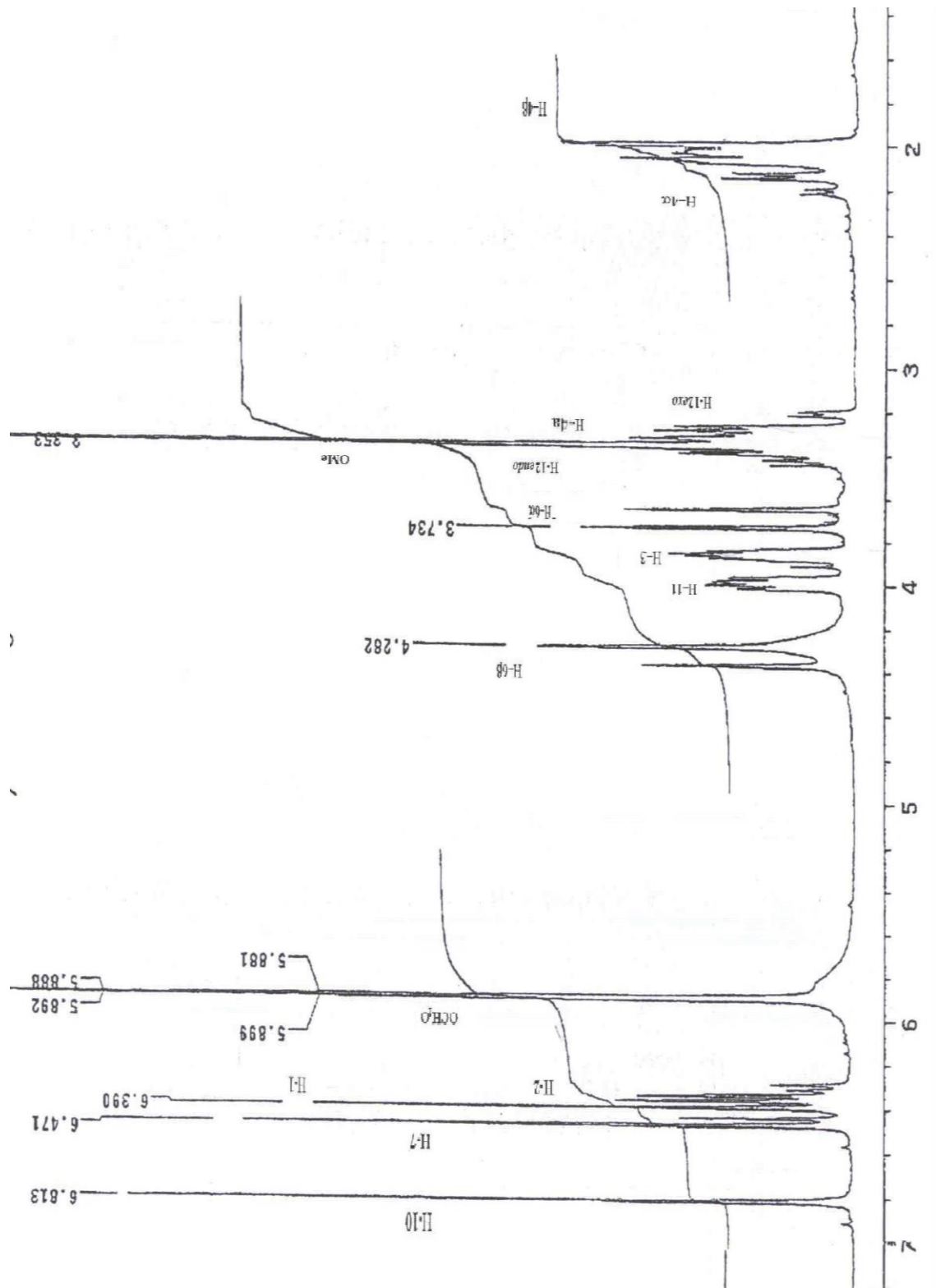


Figura 25. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de hemantamina (5)

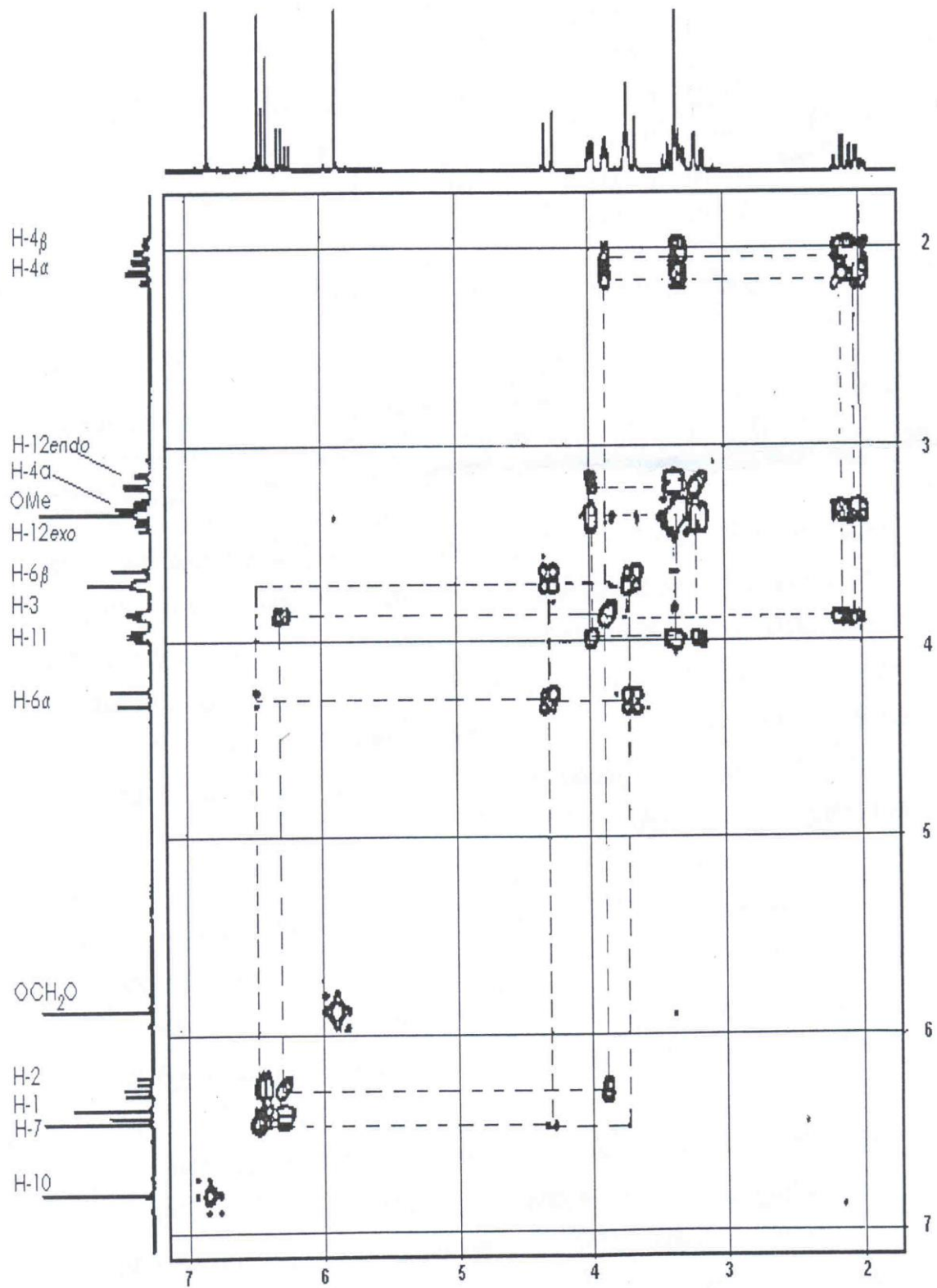


Figura 26. Espectro de correlación homonuclear 2D COSY de hemantamina (5)

Estos acoplamientos se justifican por medio de un experimento de correlación homonuclear (COSY) figura 26; en el que se observa que el singulete del metoxilo aromático se solapa con las señales de correlación de su zona del espectro ( $\delta$  3.3-3.6) Figura 24. Se observa también que hay correlación de H-3 con el protón H-2 y los dos H-4, y se pueden distinguir los H-12 en base a su correlación con H-11; otras correlaciones se pueden observar en la tabla 11.

### **Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN**

En este espectro (figura 27) se observan cinco carbonos cuaternarios; siete carbonos metílicos; cuatro carbonos metilénicos y un grupo metilo asignados de la siguiente forma.

- Los carbonos C-1 y C-2 aparecen a 132.3 y 126 ppm, respectivamente. Se ha podido constatar, por comparación con otros alcaloides del mismo esqueleto<sup>8</sup>, que los valores de desplazamiento de estos carbonos dependen de la estereoquímica del carbono C-3, así como del sustituyente de este último carbono.
- A  $\delta$  106.9 y 103.3 ppm se encuentran las señales de los carbonos metílicos del anillo A, C-7 y C-10, respectivamente; el carbono C-7 aparece un poco más desapantallado siguiendo el modelo de los alcaloides con el esqueleto 5,10b-etanofenantridínico<sup>132</sup>.
- C-8 y C-9 a  $\delta$  146.5 y 147 ppm respectivamente son los carbonos cuaternarios más desapantallados del anillo aromático vecinales al grupo metilendioxi.
- Las señales de C-10a y C-6a, aparecen más apantalladas; el mayor desplazamiento del carbono C-10a, a 135 ppm con respecto al C-6a a 126 ppm se debe a la influencia ejercida por el grupo OH de la Posición 11.
- El carbono de la posición C-3 se asigna a  $\delta$  72.4 ppm. Su desplazamiento químico en comparación con otros alcaloides se ve afectado según esté sustituido por el grupo hidroxilo o metoxilo, presentando en este último caso un desapantallamiento de 10 ppm, aproximadamente. Por otra parte también viene influenciado por la estereoquímica del sustituyente, según esté en posición ecuatorial o axial, pues, con base en estos datos y por comparación con la bibliografía se puede concluir que existe un metoxilo axial unido al C-3.

- El carbono terciario C-4a a 62.5 ppm, junto con el carbono cuaternario C-10b, forman parte de la unión *trans* entre los anillos B y C. El desplazamiento químico de este último a  $\delta$  50.0 ppm, viene afectado por su proximidad al hidroxilo del carbono C-11.
- Los carbonos 11 y 12 aparecen a 79.7 y 60.8 ppm respectivamente, desplazamiento debidos al hidroxilo de la posición 11 que produce un intenso desapantallamiento.
- A  $\delta$  63 y 60.8 ppm aparecen las señales de los carbonos vecinos al nitrógeno, C-6 y C-12 respectivamente.
- A  $\delta$  56.0 ppm se observa el pico correspondiente al grupo metoxilo unido al carbono C-3.
- A campos muy altos aparece la señal del C-4, a 27.7 ppm, la cual también viene influenciada por la posición axial o ecuatorial del sustituyente en 3.

Tabla 12 Datos espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN-DEPT de hemantamina (5)

C	$\delta$ (ppm)	DEPT
1	132.3	CH
2	126	CH
3	72.4	CH
4	27.7	CH <sub>2</sub>
4a	62.5	CH
6	63	CH <sub>2</sub>
6a	126	C
7	106.9	CH
8	146.5	C
9	147	C
10	103.3	CH
10a	135	C
10b	50	C
11	79.7	CH
12	60.8	CH <sub>2</sub>
OCH <sub>2</sub> O	100.8	CH <sub>2</sub>
OMe	56	CH <sub>3</sub>

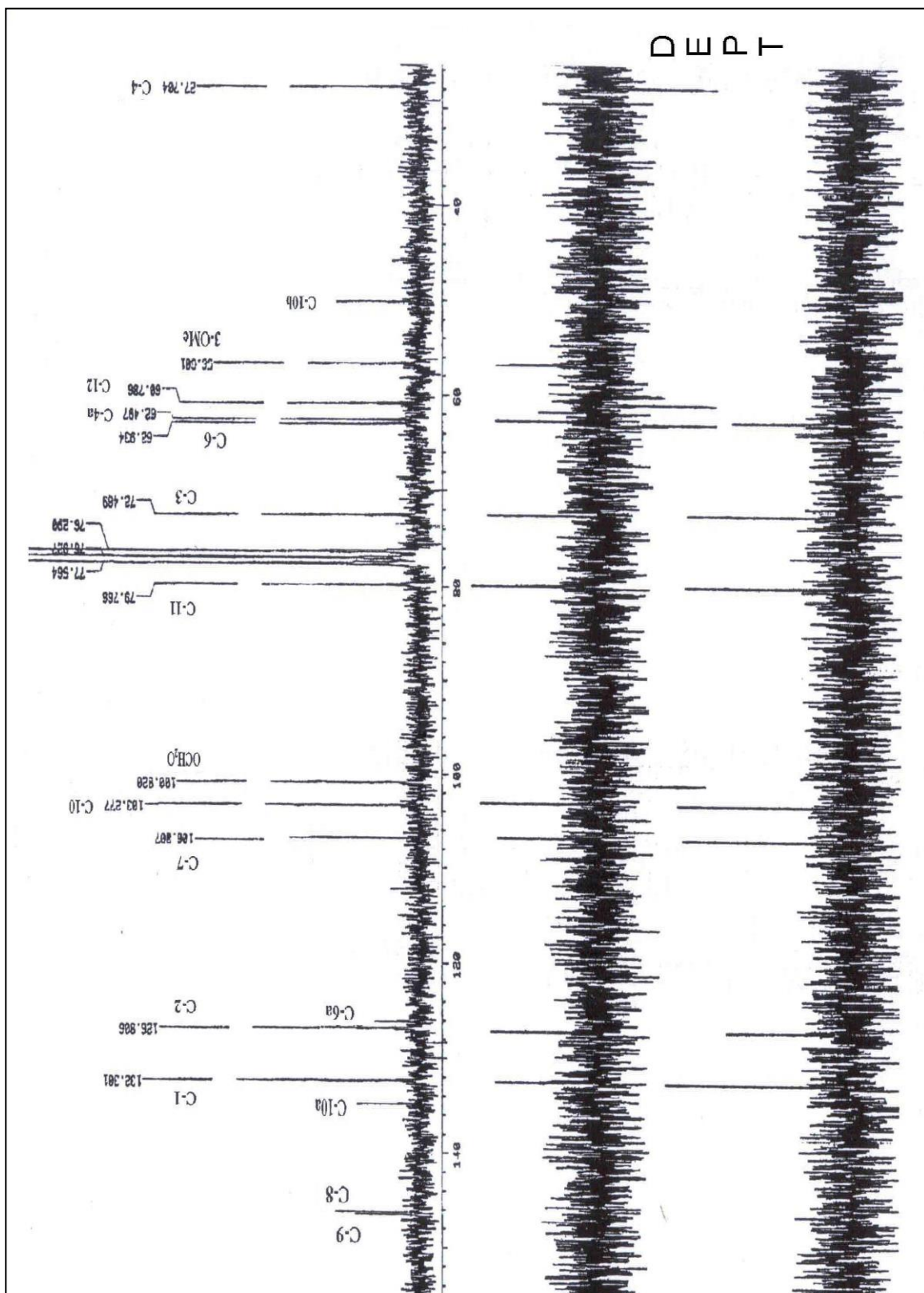


Figura 27. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT de hemantamina (5)

## Espectro de masas

El modelo de fragmentación ha sido bastante estudiado sobre todo por Duffield<sup>133</sup>, Longevialle y colaboradores<sup>134</sup>.

Un primer hecho destacable es que la presencia del hidroxilo en C-11 afecta bastante a los procesos de fragmentación de la molécula (Figura 29 A y B).

Se observa un pico molecular de poca intensidad a  $m/z$  301, así como tres modos fundamentales de fragmentación: pérdida de  $\text{CH}_3\text{OH}$ , pérdida de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$  y pérdida de  $\text{CHO}$ .

En general, para los alcaloides del tipo crinano ( $\alpha$  o  $\beta$  indistintamente) la pérdida de metanol (Figura 28) está más favorecida en las moléculas en las que el puente y el sustituyente en C-3 están en *cis*. El fragmento de  $m/z = 269$  se forma entonces, pero mucho más fácilmente que cuando no se cumple esta condición. Los picos más importantes derivados de este tipo de pérdida son los de  $m/z$  269, el cual deriva de un proceso tipo retro Diels-Alder para su formación,  $m/z$  240 que se produce por la pérdida de un radical tipo formaldehído,  $m/z = 211$ , que procede del anterior por fragmentación de la unidad metilénimina,  $m/z = 210$  y  $m/z = 209$ , que deriva por pérdida sucesiva de dos radicales hidrógeno y, finalmente, el que es el pico base a  $m/z = 181$ , derivado de la pérdida de su cadena cetónica como consecuencia de una reordenación de McLafferty con uno de los hidrógenos del esqueleto llevando al ión de  $m/z = 225$  que puede experimentar una subsiguiente eliminación de hidrógeno.

Los procesos que llevan a la pérdida de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$  (M-43) y  $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$  (M-44) son también importantes. En hemantamina (5) el fragmento M-44 es más importante que el M-43, al corresponder a la pérdida de un hidrógeno radical del proceso precedente. La relativa significancia de esta pérdida natural de hidrógeno deriva de la facilidad con la cual los elementos derivados de metanol son eliminados, en nuestro caso, la pérdida de metanol está relativamente favorecida por lo cual, la pérdida de  $\text{C}_2\text{H}_5$  o  $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$  dominará enteramente el patrón de la fragmentación. El modelo propuesto por Longevialle y colaboradores, consiste en la apertura del anillo D por ruptura del enlace C-11/C-12; seguido de reordenamiento del hidrógeno 11-Hidroxílico, que se pierde<sup>134</sup> El grupo aldehídico así formado puede entonces inducir ruptura del enlace C6/C6a, generando un ión oxonio en conjugación con el anillo aromático. Una rotura homolítica del enlace C-4a/C-5 elimina la mitad nitrogenada  $\text{CH}_2=\text{NCH}_3$ , con generación del radical  $m/z = 258$ . De esta manera, el ión oxonio induce la pérdida de un hidrógeno radical  $m/z = 257$

seguido de pérdida de metanol o de un radical metoxilo, lo que daría fragmentos de  $m/z = 225$  y  $m/z = 227$ .

La pérdida de CHO observada por Longevialle y colaboradores para otros compuestos del grupo de la hemantamina (5) es poco importante en este alcaloide. Picos característicos de este grupo son los  $m/z = 272$ ,  $m/z = 230$ ,  $m/z = 197$ .

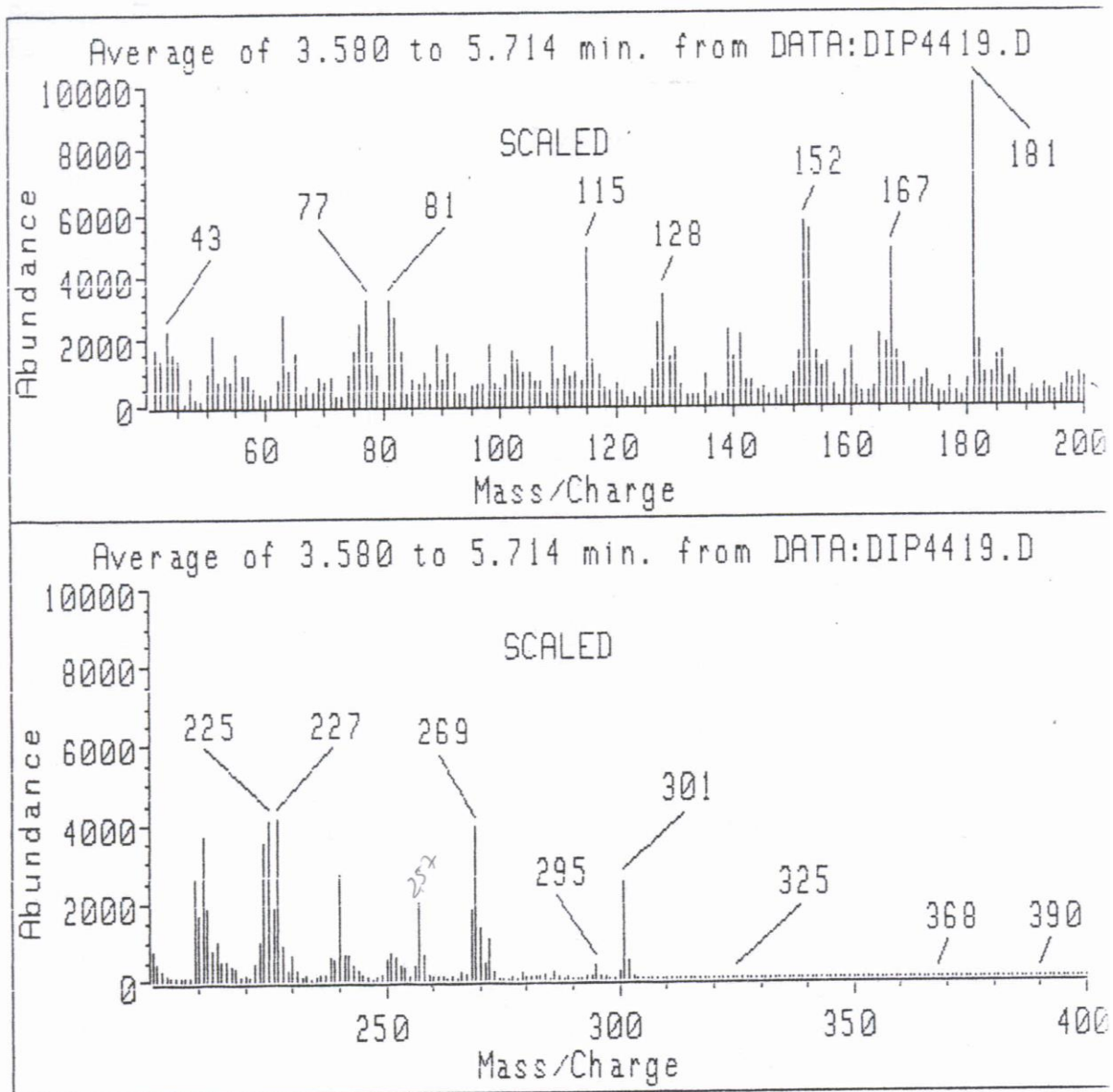


Figura 28. Espectro masas de hemantamina (5)

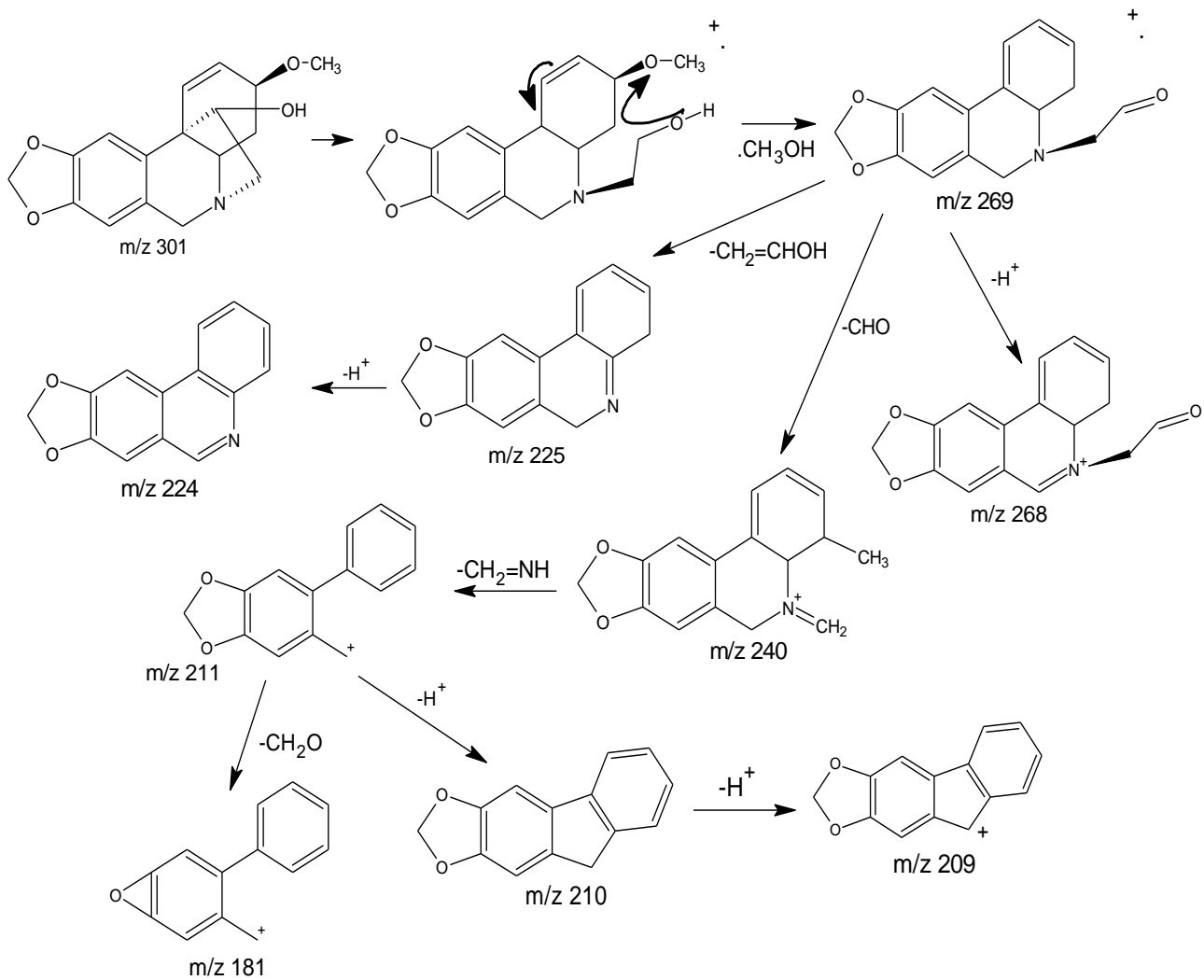


Figura 29 A. Fragmentaciones de hemantamina (5). Pérdida de CH<sub>3</sub>OH.



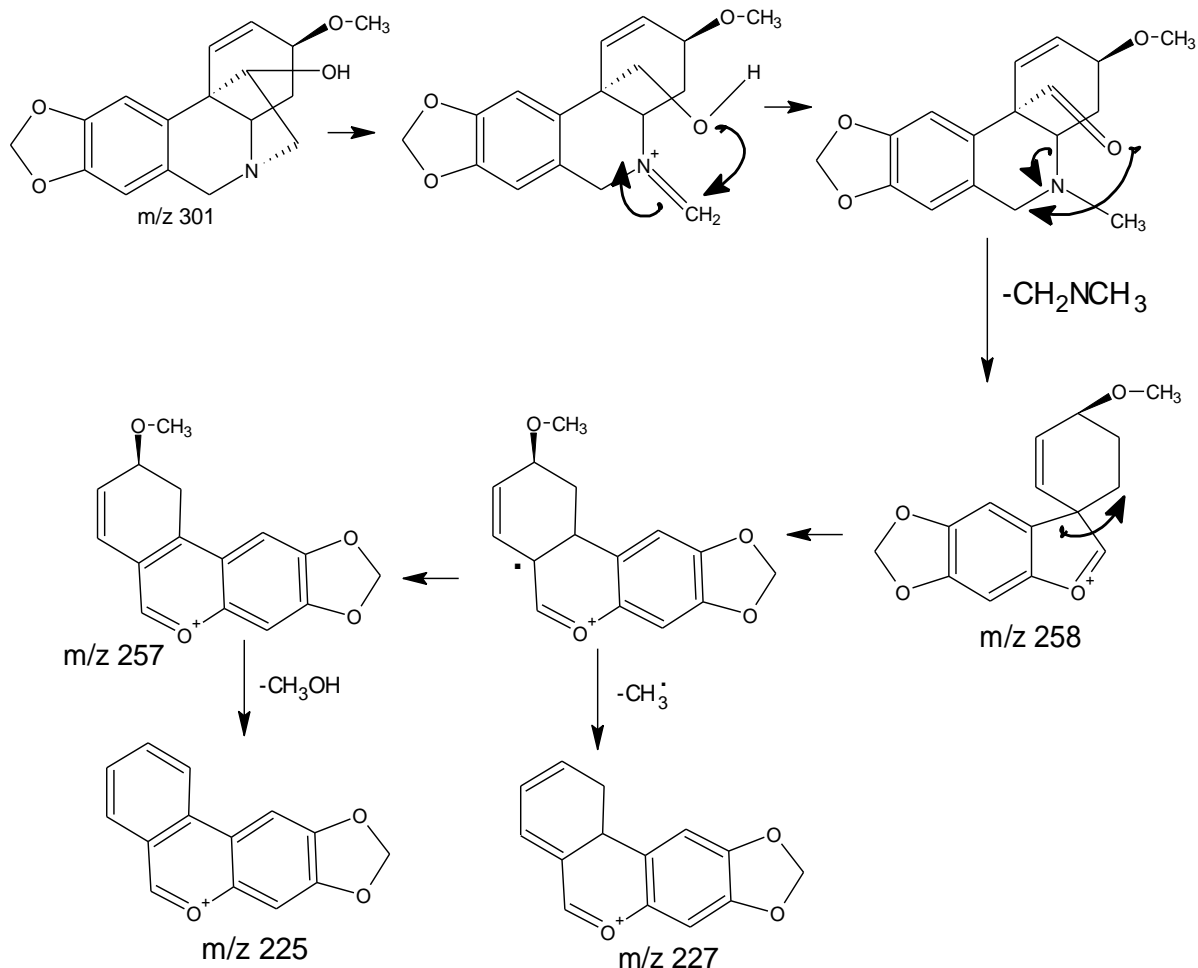


Figura 29 B. Fragmentaciones de hemantamina (5). Pérdida de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N.

### Dicroísmo Circular

La configuración absoluta de hemantamina (5) se asignó por estudios de dicroísmo circular (figura 30), en los que la configuración del puente etilideno C-11/C-12 está en  $\alpha$ , por comparación con los datos publicados<sup>135</sup>, mínimo a 251.0 nm.

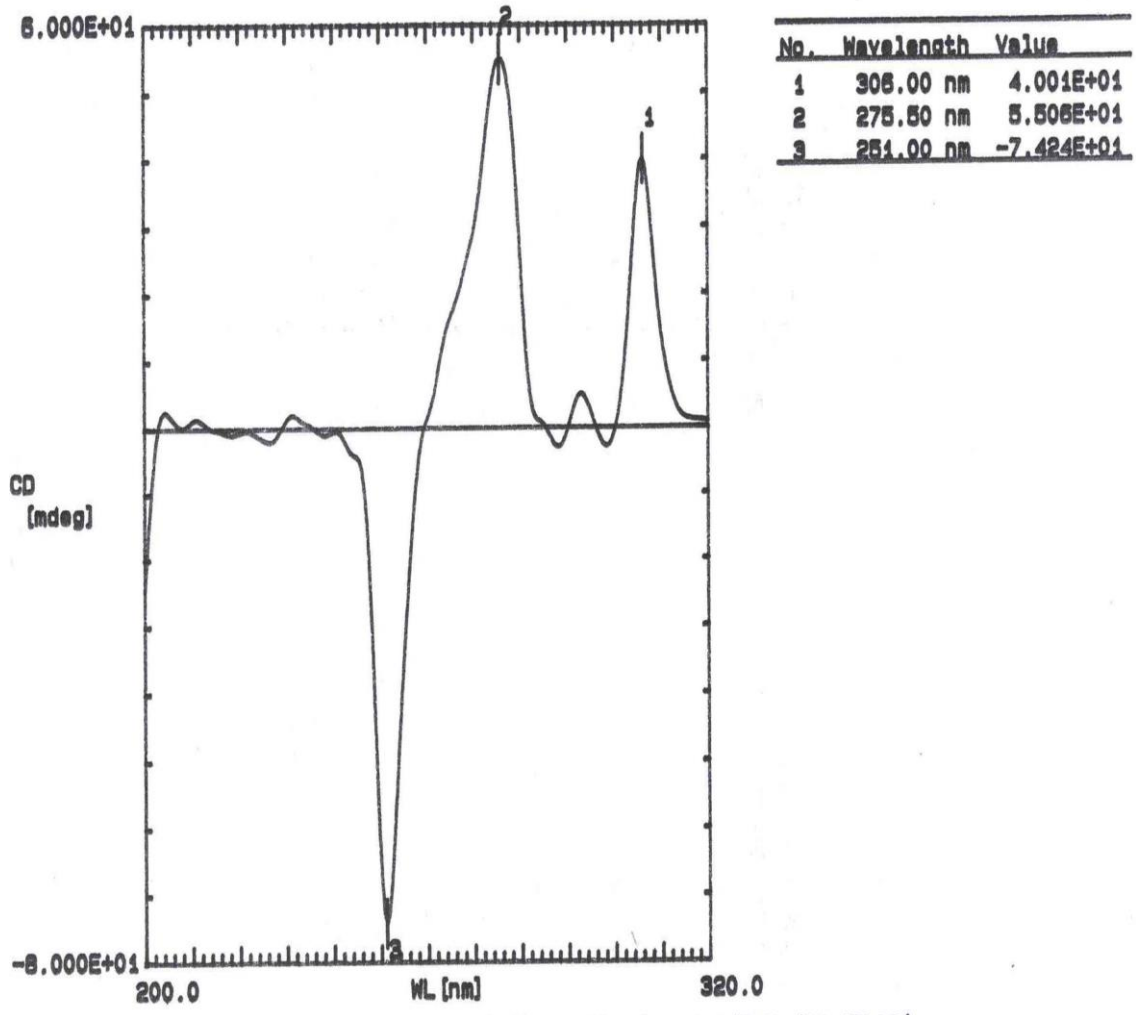


Figura 30. Espectro de Dicroísmo Circular hemantamina (5)

Finalmente en la figura 31 se muestra el modelo molecular que se ha encontrado como energéticamente más estable, después de minimizar la energía de la estructura de la hemantamina, caracterizada por presentar un puente etilideno C-11/C-12 en  $\alpha$ , en ella se aprecia la fusión *trans* entre los anillos B y C así como la disposición axial del grupo metoxilo del carbono C-3.

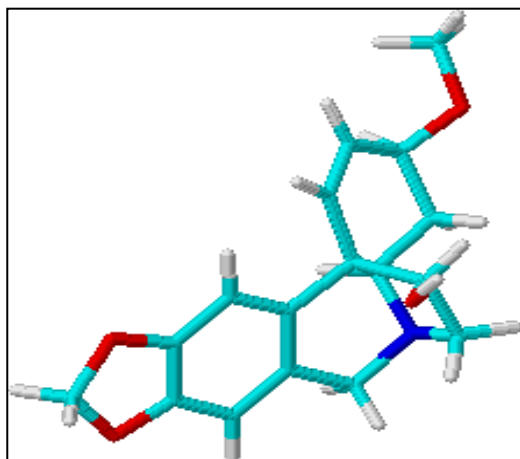
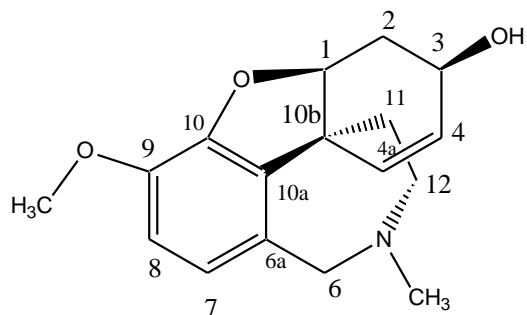


Figura 31. Conformación de mínima energía de hemantamina (5)

#### 7.1.4. Elucidación estructural de Cs2.

El sólido amorfo de punto de fusión 124-126 °C; el cual según el análisis elemental le corresponde la fórmula molecular  $C_{17}H_{21}NO_3$  se identificó como galantamina (1). Es uno de los alcaloides más estudiados estructuralmente dada su actividad biológica, ya que es potente analgésico, anticonvulsivo, hipotenso, inhibidor de colinesterasa.



**Galantamina (1)**

Es utilizado como agente terapéutico en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Las características espectroscópicas son las siguientes.

## Espectro de IR.

Este espectro (figura 32) tuvo un carácter confirmatorio de los grupos funcionales presentes en la molécula.

- Banda ancha a  $3210\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de tensión del grupo hidroxilo.
- Bandas armónicas entre  $1890$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al anillo aromático.
- A  $1482\text{ cm}^{-1}$  y  $1238\text{ cm}^{-1}$  se encuentran las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión debidas al enlace C-O-C.
- A  $1040\text{ cm}^{-1}$  banda de elongación por el enlace C-O.

## Espectro de $^1\text{H}$ RMN.

- Dos dobletes para los dos protones aromáticos orientados en posición *orto* así: H-7 a  $\delta$  6.64 ppm y H-8 a 6.66 ppm con una constante de acoplamiento  $J$  de 8.2 Hz. Solamente los alcaloides tipo galantamina muestran una constante de acoplamiento entre estos protones aromáticos del anillo A. (figura 33).
- Las señales a 6.04 y 6.00 ppm que integran para un protón cada una, fueron asignadas para los protones 4a y 4 respectivamente con una constante de acoplamiento entre sí de  $J$  10.3 Hz.
- Dos dobletes en un sistema AB correspondiente a los protones bencílicos de C-6; asignado  $6\alpha$  a  $\delta$  3.72 ppm y  $6\beta$  a  $\delta$  4.11 con una constante de acoplamiento muy alta, lo que confirma un acoplamiento geminal con  $J = 15.2$  Hz.
- A 4.61 ppm está un multiplete que integra para un protón y presenta un acoplamiento homoalílico con la señal a 2.00 ppm en forma de ddd; señales asignadas a H-1 Y H-2 $\alpha$ . La señal del H-1 se ve desplazada debido al efecto inductivo del anillo furano.
- La señal a 4.13 ppm es un multiplete integrando para un protón y asignado a H-3.

- Las señales a 3.10 y 3.30 ppm en forma de dt y ddd; integran cada una para un protón, presentan una constante de acoplamiento alta de 14.4 Hz, lo cual supone un acoplamiento geminal, siendo asignadas las señales para los protones H-12 $\alpha$  y H-12 $\beta$  respectivamente. Corroborándose estas correlaciones con lo reportado en la literatura <sup>136</sup>.
- La señal a  $\delta$  2.70 ppm como ddt e integrando para un hidrógeno se presenta con una constante de acoplamiento alta ( $J = 15.7$  Hz) con la señal a  $\delta$  2.00 ppm ya definida para H-2 $\alpha$  implicando un acoplamiento geminal, siendo por lo tanto dicha señal la correspondiente al protón H-2 $\beta$ .
- Igualmente las señales a  $\delta$  2.04 y 1.60 ppm ambos en forma de ddd; integran para un protón cada una; están acopladas entre sí ( $J = 13.5$  Hz), lo que indica la presencia de protones geminales asignándose a H-11 $\alpha$  y H-11 $\beta$  respectivamente.
- Las señales a  $\delta$  3.83 y 2.40 ppm en forma de singulete integran cada uno para tres protones; la señal mas desapantallada es causada por el efecto del heteroátomo oxígeno y la unión al anillo aromático asignándose por tanto al grupo -OCH<sub>3</sub> mientras que la señal a 2.40 ppm fue asignada al grupo -NCH<sub>3</sub>.

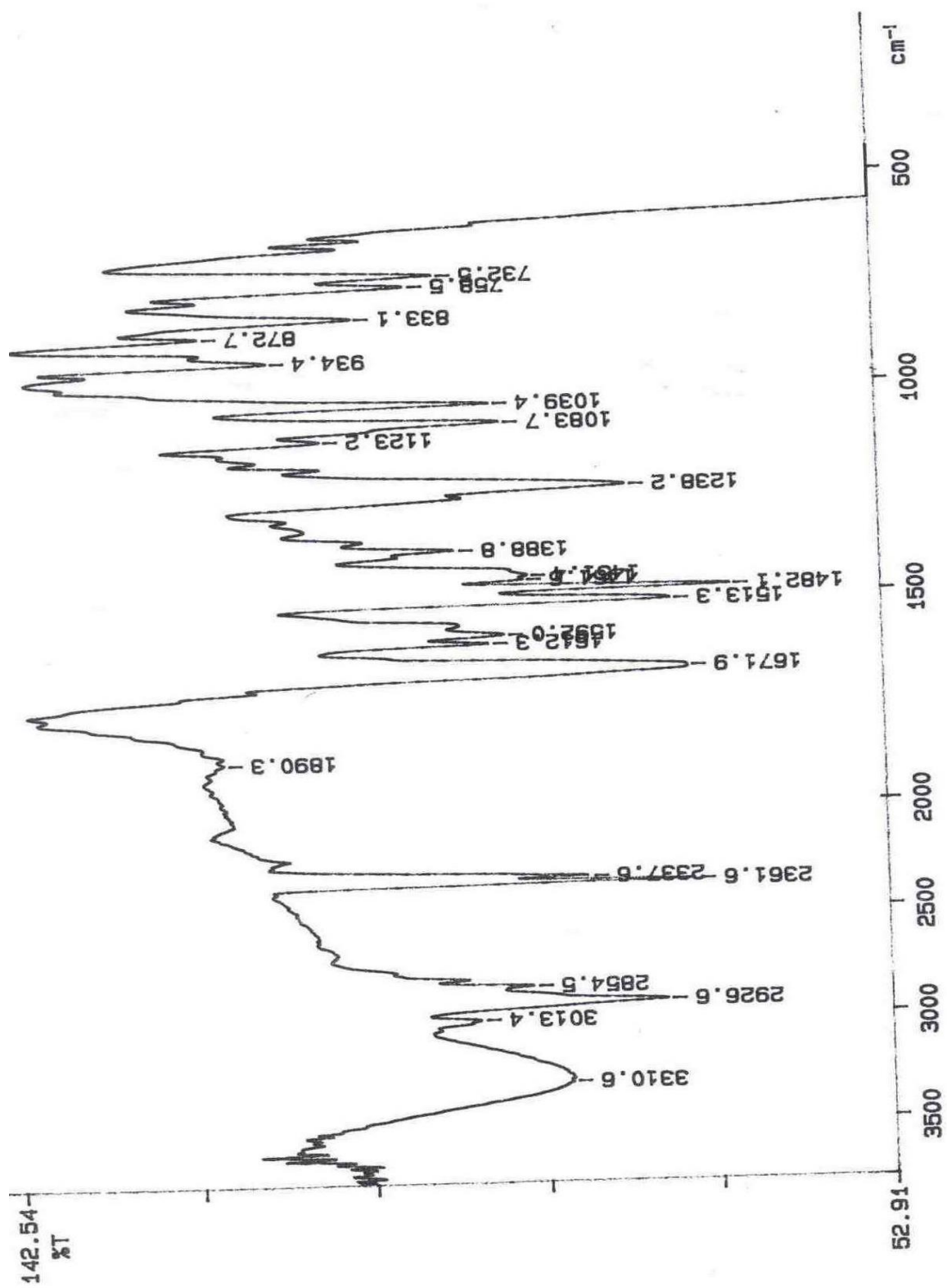


Figura 32. Espectro infra-rojo de galantamina (1)

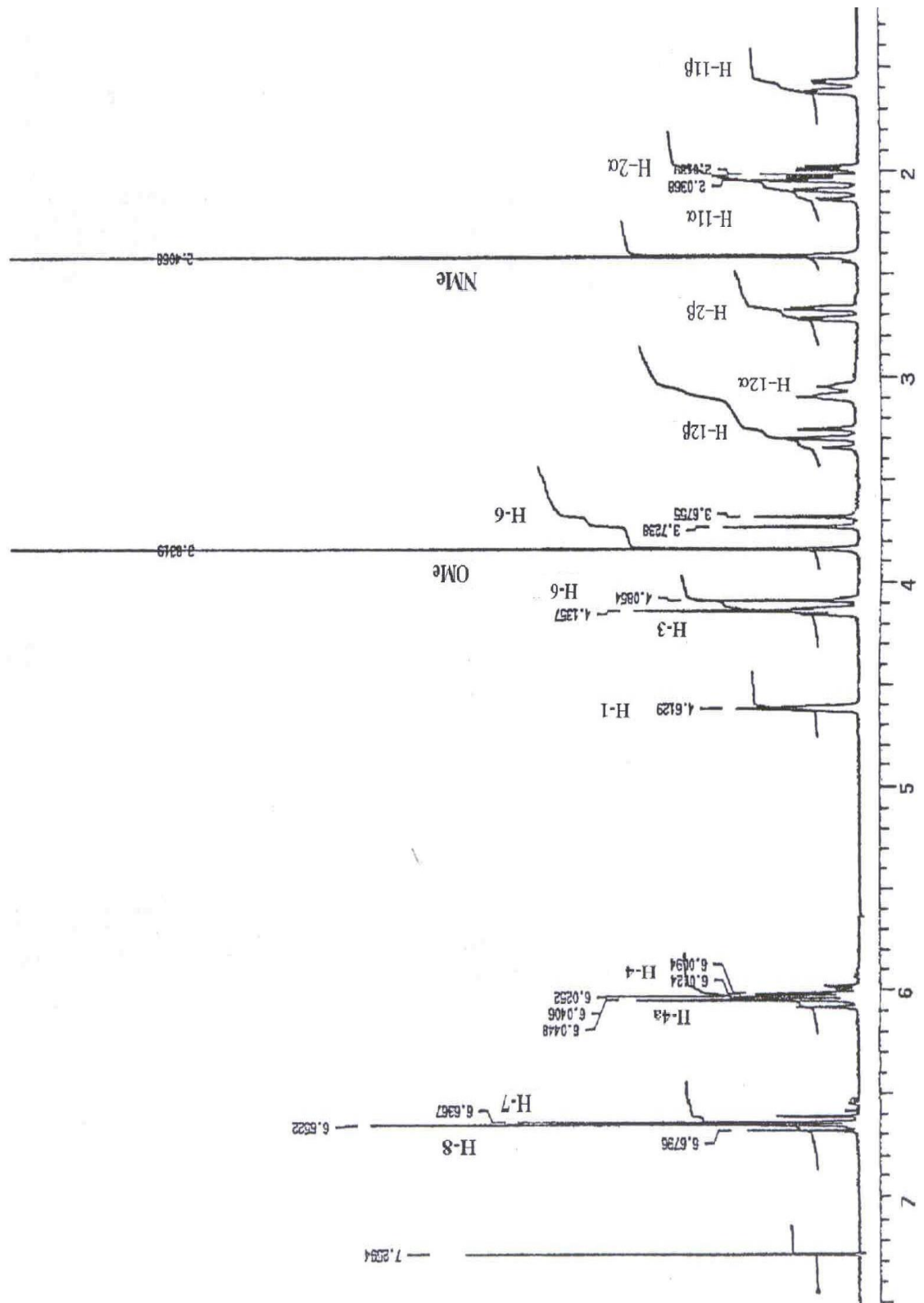


Figura 33. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de galantamina (1)

Tabla 13 Datos espectro  $^1\text{H}$  RMN de galantamina (1).

H	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	4.61	m	
2 $\alpha$	2.00	ddd	2 $\alpha$ ,2 $\beta$ =15.7 2 $\alpha$ ,1=12.2 2 $\alpha$ ,3=3.5
2 $\beta$	2.70	ddt	2 $\beta$ ,2 $\alpha$ =15.7 2 $\beta$ ,1=3.7 2 $\beta$ ,3=1.4
3	4.13	m	
4	6.00	dd	4,4a=10.3 4,3=4.5,
4a	6.04	dd	4a,4=10.3
6 $\alpha$	3.72	d	6 $\alpha$ ,6 $\beta$ =15.2
6 $\beta$	4.11	d	6 $\beta$ ,6 $\alpha$ =15.2
7	6.64	d	7,8=8.2
8	6.66	d	8,7=8.2
11 $\alpha$	2.04	ddd	11 $\alpha$ ,11 $\beta$ =13.5 11 $\alpha$ ,12 $\alpha$ =5.0 11 $\alpha$ ,12 $\beta$ =2.5
11 $\beta$	1.60	ddd	11 $\beta$ ,11 $\alpha$ =13.5 11 $\beta$ ,12 $\beta$ =3.5 11 $\beta$ ,12 $\alpha$ =2.2
12 $\alpha$	3.10	dt	12 $\alpha$ ,12 $\beta$ =14.4 12 $\alpha$ ,11 $\alpha$ =3.5
12 $\beta$	3.30	ddd	12 $\beta$ ,12 $\alpha$ =14.4 12 $\beta$ ,11 $\beta$ =12.2 12 $\beta$ ,11 $\alpha$ =2.1
OMe	3.83	s	
NMe	2.40	s	

### Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN- DEPT.

En este espectro (figura 34) se observan dos regiones: a campo bajo  $> 90.0$  ppm se observan las señales de los carbonos aromáticos, alifáticos así: las señales a  $\delta$  145.5, 144.0, 132.8, 128.5, 122.1 y 111.0 ppm se asignaron a los carbonos aromáticos C9, C10, C10a, C6a, C7 y C8; mientras que las señales a  $\delta$  126.6 y 127.6 ppm, se asignaron a los olefínicos C4 Y C4a respectivamente.



Las otras señales se ubican a campo alto < 90.0 ppm y corresponden a los carbonos saturados desapantallados por efecto de la unión al anillo aromático a un heteroátomo. Las señales a  $\delta$  88.6, 62.0, 60.1, 53.4, 48.0, 33.4 y 29.9 ppm se asignaron a los carbonos C1, C3, C6, C12, C10b, C11 y C2; las señales a 55.8 y 41.4 ppm se asignaron a los grupos C9-OMe y N-CH<sub>3</sub> respectivamente.

Tabla 14 Datos espectro de <sup>13</sup>C-RMN- DEPT de galantamina (1).

C	$\delta$ (ppm)	DEPT
1	88.6	CH
2	29.9	CH <sub>2</sub>
3	62.0	CH
4	126.6	CH
4a	127.6	CH
6	60.1	CH <sub>2</sub>
6a	128.5	C
7	122.1	CH
8	111.0	CH
9	145.5	C
10	144.0	C
10a	132.8	C
10b	48.0	C
11	33.4	CH <sub>2</sub>
12	53.4	CH <sub>2</sub>
OMe	55.8	CH <sub>3</sub>
NMe	41.4	CH <sub>3</sub>

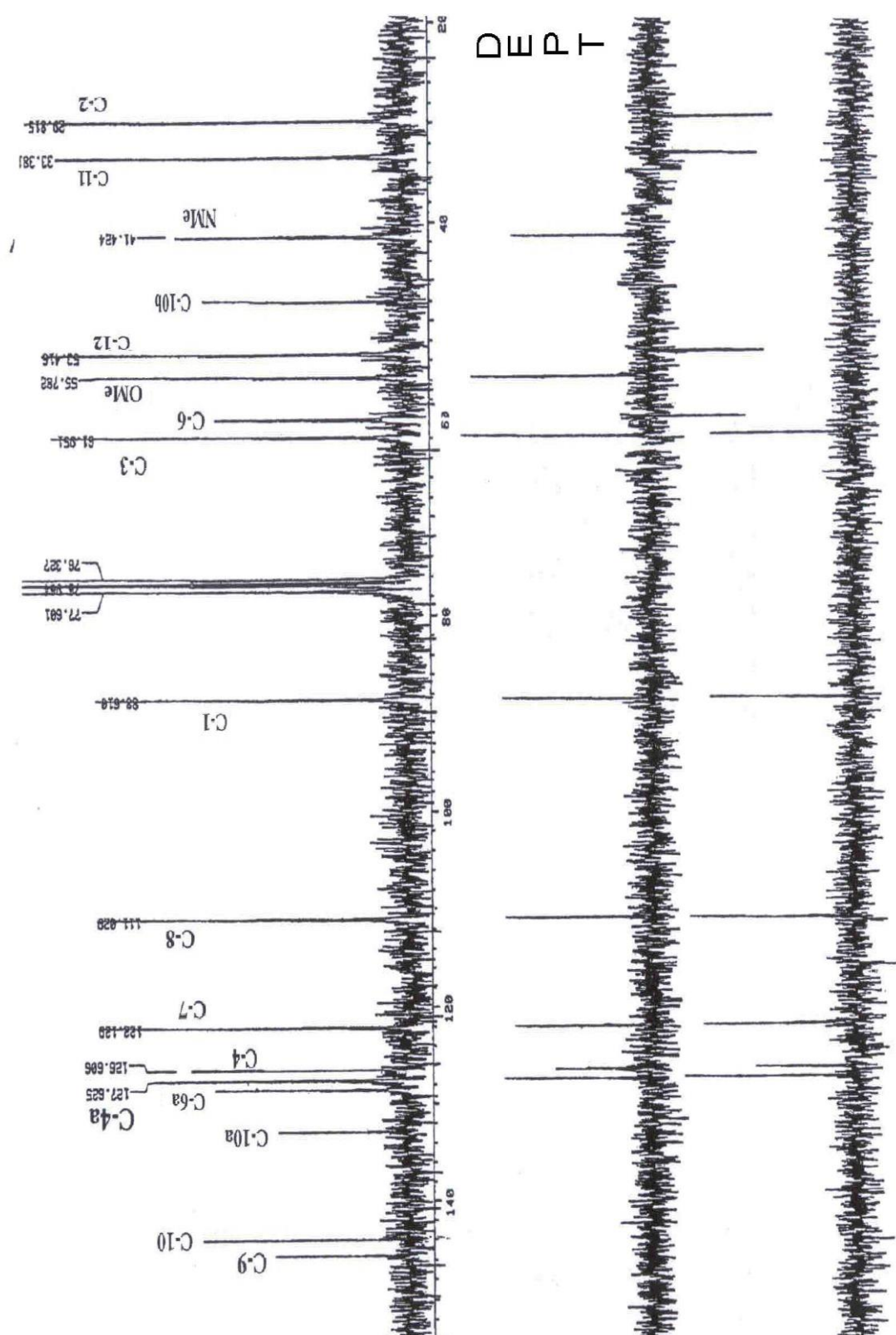


Figura 34. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT de galantamina (1)

## Espectro de masas.

El espectro de masas (figura 35) mostró un ión molecular  $m/z = 287$  coincidente con la fórmula molecular; es además el pico base, el fragmento a  $m/z 217$  se forma por el rompimiento del anillo C con la eliminación de  $C_4H_6O$ . El pico a  $m/z 174$  aparece después de la eliminación de elementos del anillo B en donde se incluye el átomo de nitrógeno ( $-C_2H_5N$ ).

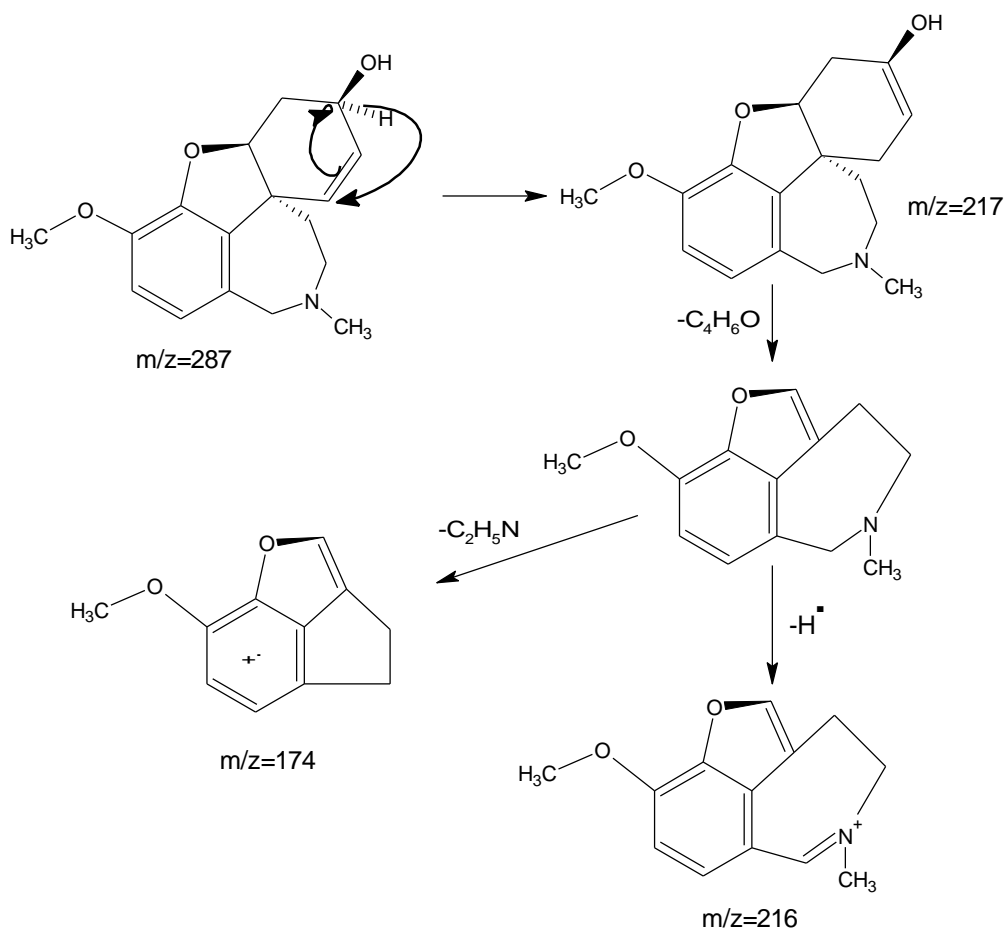


Figura 35. Fragmentaciones de galantamina (1)

En la figura 36 se muestra el modelo molecular que se ha encontrado como energéticamente más estable, que se caracteriza por poseer un anillo de oxirano.

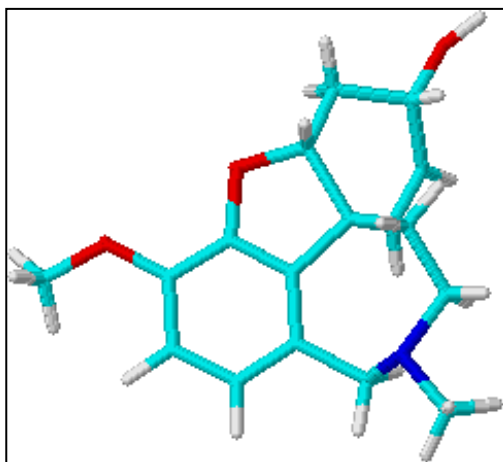
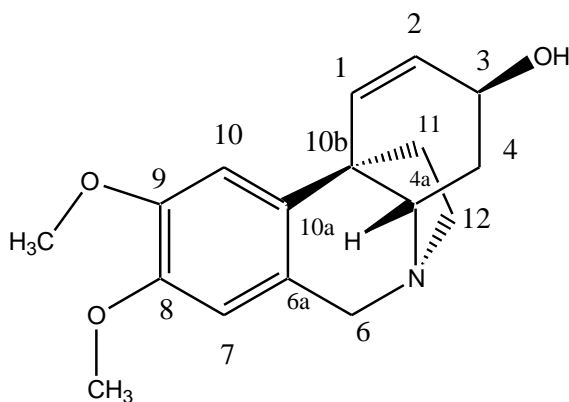


Figura 36. Estructura de mínima energía para galantamina (1)

### 7.1.5 Elucidación estructural de Cs5

El cuarto alcaloide aislado de *Caliphuria subedentata* es maritidina (6), una molécula bastante inusual en la familia de las Amaryllidaceae. Con este trabajo, se cita por primera vez en el género *Caliphuria*.



**Maritidina (6)**

## Espectro de IR

El espectro de IR (figura 37) de maritidina (6) muestra como señales más características:

- A  $3421\text{ cm}^{-1}$ , una banda ancha atribuible a la vibración de tensión del hidroxilo libre.
- A  $1260\text{ cm}^{-1}$ , una banda intensa que puede asignarse a la vibración de tensión de uno (o más) enlaces C-O-C (previsiblemente correspondientes a metoxilos).
- Una señal inespecífica, pero que puede ser atribuida a la vibración del enlace Ar-C-C, observada a  $1507\text{ cm}^{-1}$ .

El espectro IR da poca información sobre la estructura de la molécula, siendo el de  $^1\text{H}$ -RMN de mayor utilidad para la elucidación.

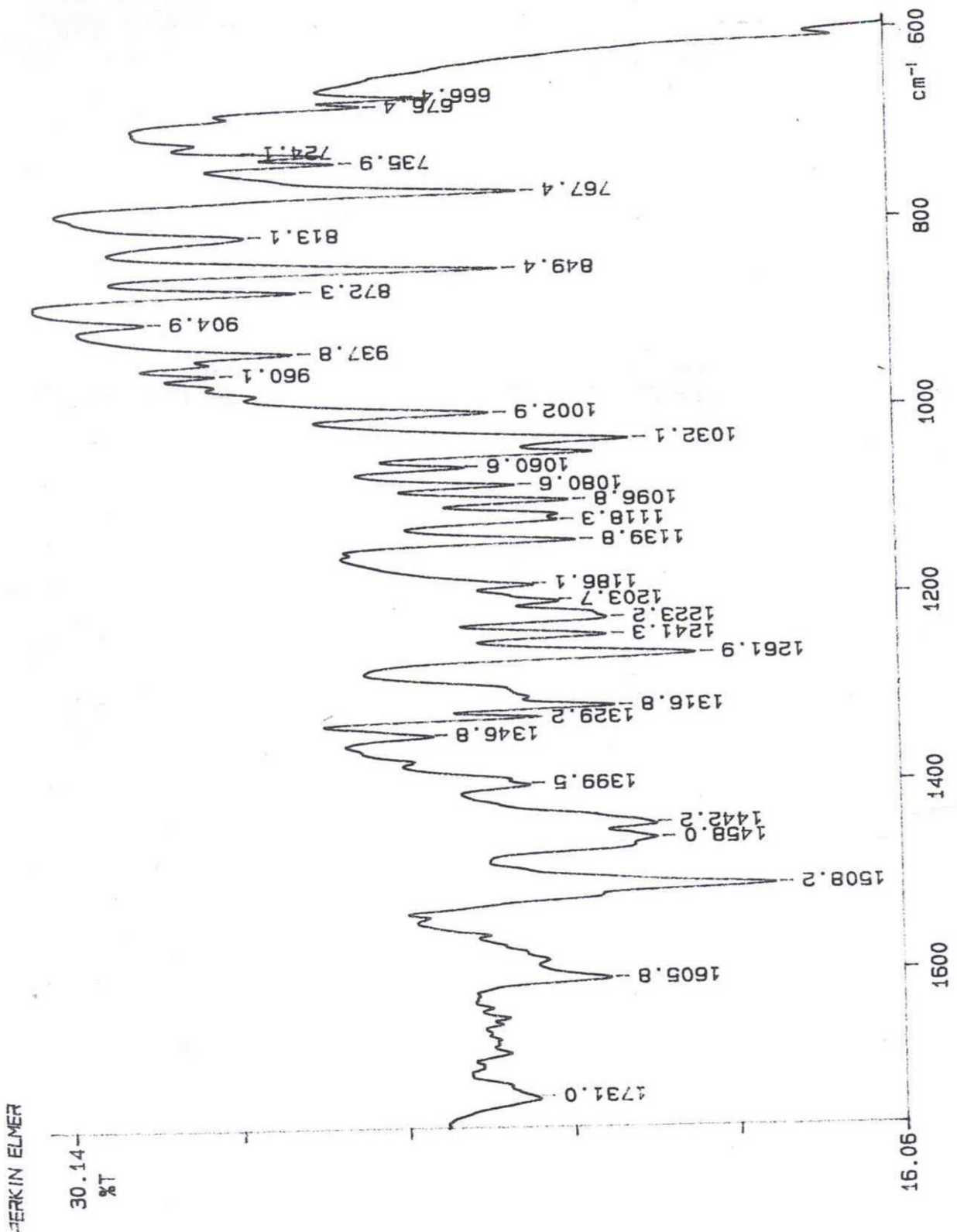


Figura 37. Espectro IR de maritidina (6)

## Espectro de $^1\text{H}$ -RMN

Este espectro (figura 38) muestra como señales más características las siguientes:

- 2 grupos metoxilo aromático a  $\delta$  3.78 y 3.86 ppm y 2 protones aromáticos como singuletes a  $\delta$  6.42 y 6.83 ppm para H-7 y H-10 respectivamente.
- Los protones H-1 y H-2, presentan un acoplamiento cis-olefínico entre sí y H-2, además con los H-3 $\alpha$  con lo que H-2 se muestra como doble doblete.
- Se confirma la posición  $\alpha$  de el protón H-3 a  $\delta$  4.33 ppm, pues si estuviera en  $\beta$  tendría un acoplamiento alílico cercano a los 2 Hz con H-1, y el acoplamiento de H-2 con H-3 sería aún de más baja intensidad.
- El protón H-4 $\alpha$  tiene un gran acoplamiento con H-4a debido a la característica posición trans-diaxial de la serie de la hemantamina para estos dos protones. El H-4 $\beta$  muestra como hecho característico un acoplamiento con H-2, debido a un mecanismo W (ya que se encuentra en el mismo plano). Todas estas afirmaciones pueden verse más claramente en el modelo estructural de mínima energía obtenido para maritidina (figura 40).
- Los protones H-6 $\alpha$  y H-6 $\beta$  aparecen como dos dobletes correspondientes a un sistema AB con un acoplamiento geminal de gran intensidad.
- Los protones metilénicos 11 y 12 tanto endo como exo; aparecen en los valores reportados en la literatura, desplazados por hacer parte del puente etano.

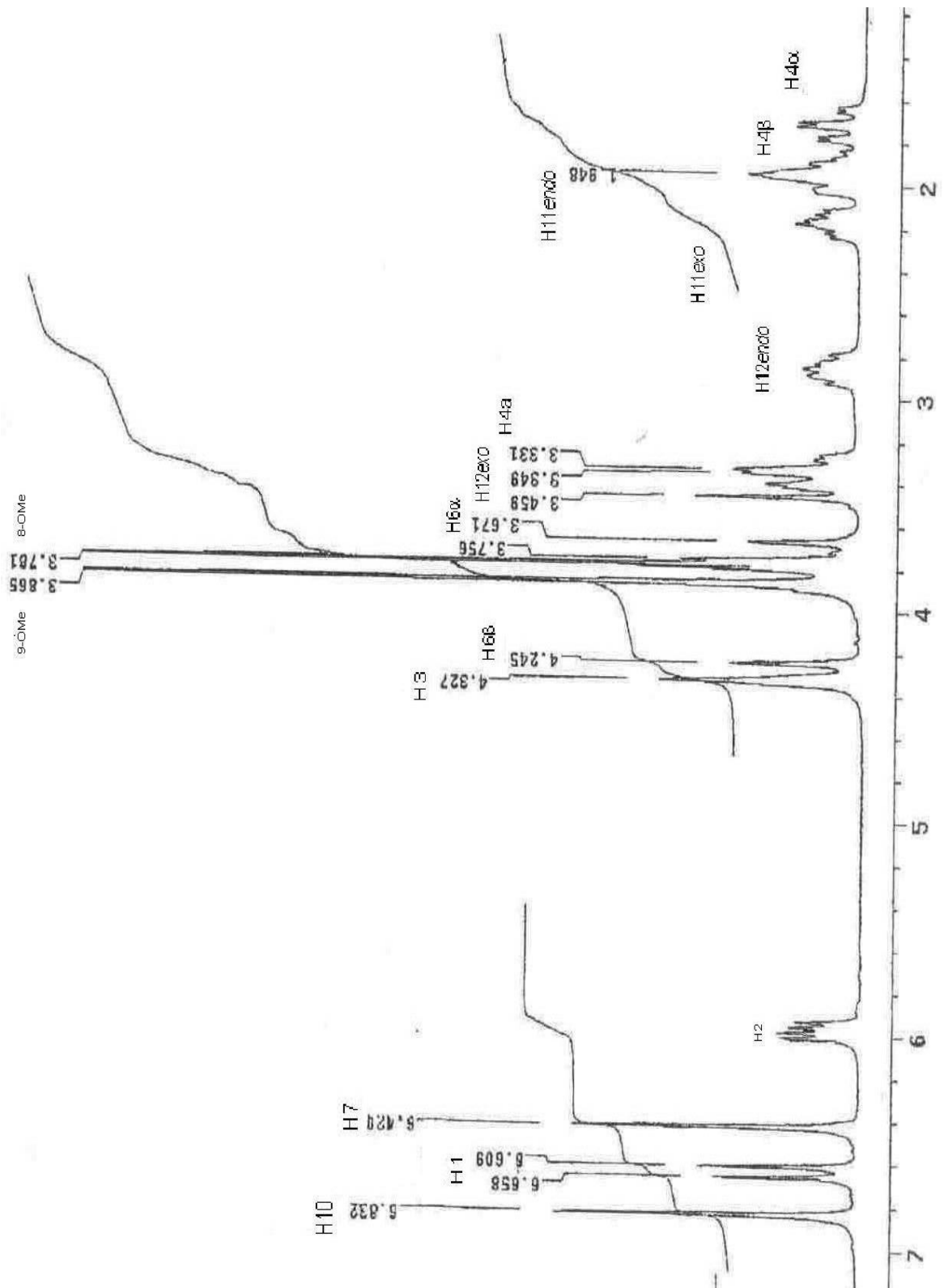


Figura 38. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de maritidina (6)



Tabla 15. Datos del espectro <sup>1</sup>H-RMN de maritidina (6).

H	δ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	6.63	d	1,2=10
2	5.46	dd	2,1=10.0 2,3 <sub>α</sub> =4.5
3 <sub>α</sub>	4.33	sa	
4 <sub>α</sub>	1.71	dt	4,4 <sub>a</sub> = 13.5 4,3 = 4.0
4 <sub>β</sub>	1.92	m	
4 <sub>a</sub>	3.40	m	
6 <sub>α</sub>	3.71	d	6,6 = 16.5
6 <sub>β</sub>	4.28	d	6,6= 16.5
7	6.42	s	
10	6.83	s	
11 exo	2.17	ddd	11 <sub>exo</sub> ,11 <sub>endo</sub> , =12.5 11 <sub>exo</sub> ,12 <sub>endo</sub> ,= 9.0 12 <sub>exo</sub> ,12 <sub>exo</sub> ,=4.0
11 endo	1.92	m	
12 exo	3.40	m	
12 endo	2.85	ddd	12 <sub>endo</sub> ,12 <sub>exo</sub> , =13.5 12 <sub>endo</sub> ,11 <sub>exo</sub> ,= 9.0 12 <sub>endo</sub> ,11 <sub>exo</sub> ,=4.3
9-O-Me	3.86	s	
8-O-Me	3.78	s	

### Espectro de <sup>13</sup>C-RMN

Para la interpretación del espectro <sup>13</sup>C-RMN de maritidina (6) (figura 39) es de gran utilidad el trabajo de Frahm y colaboradores en el que se estudian otros alcaloides de Amaryllidaceae emparentados con este, entre ellos, los del grupo del (-)-1,2 dehidrocrinano <sup>132</sup>

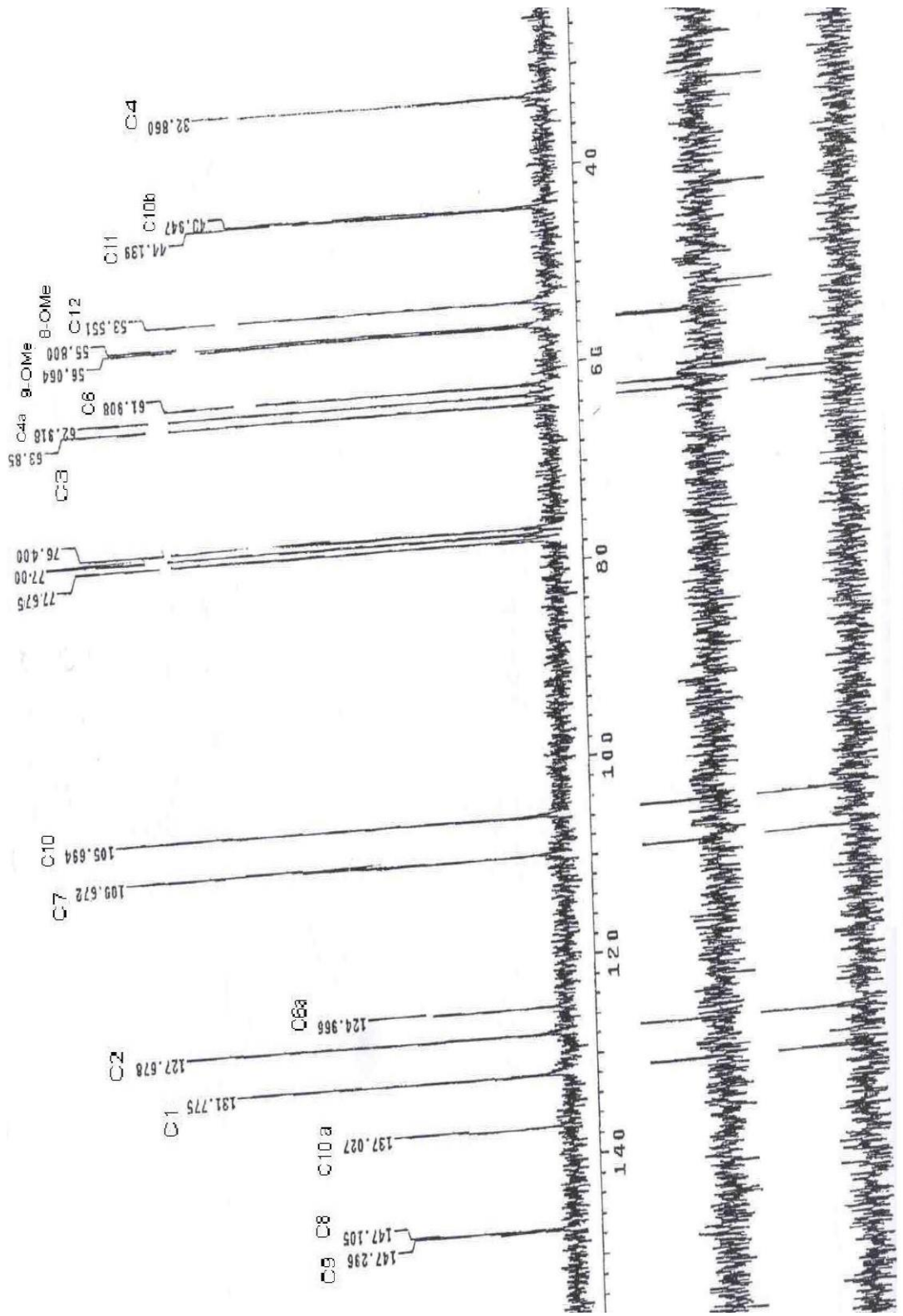


Figura 39. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN-DEPT de maritidina (6)

Las señales que se identifican son las siguientes:

- Los dos carbonos en C-1 y C-2 entre los dobles aromáticos se situarían en los 131.8 ppm y 127, 7 ppm. Se ha observado, por los valores de desplazamiento de C-1 y C-2 para otros compuestos análogo, que éstos dependen de la estereoquímica de C-10b y C-3, y además son influenciados por el sustituyente en C-3.
- El carbono arílico C-3 a  $\delta$  63.8 ppm responde al cambio de metoxilación en hemantamina a hidroxilación en maritidina, con un apantallamiento de unos 10 ppm.
- El carbono C-4 a  $\delta$  32.9 ppm experimenta el efecto inverso al C-3 respecto a la hidroxilación en C-3, es decir, la hidroxilación supone un apantallamiento en C-4 con respecto a la metoxilación, y también en las posiciones en ecuatorial o axial del sustituyente en C-3.
- El carbono terciario C-4a que en las uniones trans de los anillos B/C presenta un desplazamiento entre 61 y 63 ppm con un sustituyente en axial en la posición 3, presenta un apantallamiento de 5 ppm si hay epimerización en esa posición, y experimenta un apantallamiento similar con un hidroxilación en  $6\alpha$ , de lo que se puede deducir que en la unión B/C es trans, ya que C-3 tiene el sustituyente en posición axial y C-6 no tiene ningún sustituyente, lo cual coincide también con los resultados de  $^1\text{H-RMN}$ .
- El carbono C-6 a  $\delta$  61.9 ppm tiene un desplazamiento acorde con la ausencia de sustitución en este carbono, ya que una hidroxilación desapantallaría del orden de 12 a 14 ppm.
- En cuanto a las señales del anillo aromático, la señal de C-6a, carbono cuaternario, se observa a  $\delta$  121.1 ppm.
- El carbono C-7 aparece también dentro de sus valores normales  $\delta$  109.7 ppm.
- C-8 a 55.8 ppm que corresponde a una sustitución por metilo, la señal correspondiente al otro carbono metoxílico se observa a 56.9 ppm, valores característicos de los carbonos metoxílicos al igual que C-9 a  $\delta$  147.3 ppm.
- C-10 al igual que C-7, muestra a  $\delta$  105.7 ppm un doblete. El carbono cuaternario C-10a, resuena a  $\delta$  136.5 ppm.

- El carbono C-10b, carbono terciario, presenta un desplazamiento  $\delta$  de 44.0 ppm, que es el valor normal cuando no hay hidroxilación en 11 ni epóxido en las posiciones del doble enlace 1,2, como ocurre por ejemplo en flexina<sup>132</sup>.
- Los carbonos C-11 y C-12, a 42.7 y 53.5 ppm, respectivamente, tienen los valores que están de acuerdo con carbonos no sustituidos en esa posición.

Tabla 16 Datos espectro <sup>13</sup>C-RMN de maritidina (6).

C	$\delta$ (ppm)	DEPT
1	131.8	CH
2	127.7	CH
3	63.8	CH
4	32.9	CH <sub>2</sub>
4a	62.9	CH
6	61.9	CH <sub>2</sub>
6a	125.0	C
7	109.7	CH
8	147.1	C
9	147.3	C
10	105.7	CH
10a	137.0	C
10b	44.0	C
11	44.1	CH <sub>2</sub>
12	53.5	CH <sub>2</sub>
8-O-Me	55.8	CH <sub>3</sub>
9-O-Me	56.1	CH <sub>3</sub>

La confirmación final de la estructura molecular de maritidina (6) se encuentra determinando su conformación mas estable energéticamente en donde se observa la posición del puente etano-fenantridina. (figura 40)

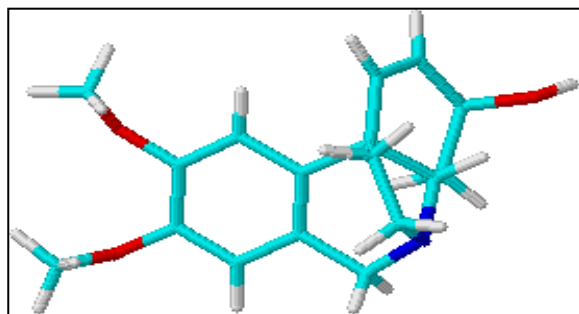
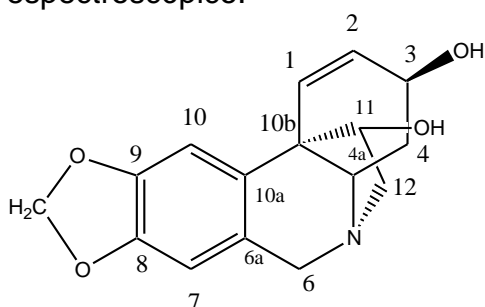


Figura 40. Conformación de mínima energía de maritidina (6)

### 7.1.6. Elucidación estructural de Cs-8

Sólido amorfo de punto de fusión 81-83 °C, según el análisis elemental le corresponde la fórmula molecular  $C_{16}H_{17}NO_4$ , fue identificado como hamayna (7), alcaloide muy común en varias especies de la familia **Amaryllidaceae**. Compuesto aislado previamente de *Boophanef lava*, *Brunsvigia josephinae*, *Crinum bulbispermum*, *C. kirkii*, *C. asiaticum*, *C. latifolium* y *C. zeylanicum* <sup>12</sup>.

Se identificó completamente teniendo en cuenta el siguiente análisis espectroscópico.



**Hamayna (7)**

### Espectro de IR.

Los grupos que se confirman con las señales de este espectro son los siguientes.

- Banda ancha entre  $3500-3300\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de tensión del grupo hidroxilo.
- A  $1620\text{ cm}^{-1}$  bandas armónicas debidas a las vibraciones por el anillo aromático.
- Banda mediana a  $1482\text{ cm}^{-1}$  debida a las vibraciones de tensión C-O.
- A  $932\text{ cm}^{-1}$  banda característica fuera del plano del grupo metilendioxi.

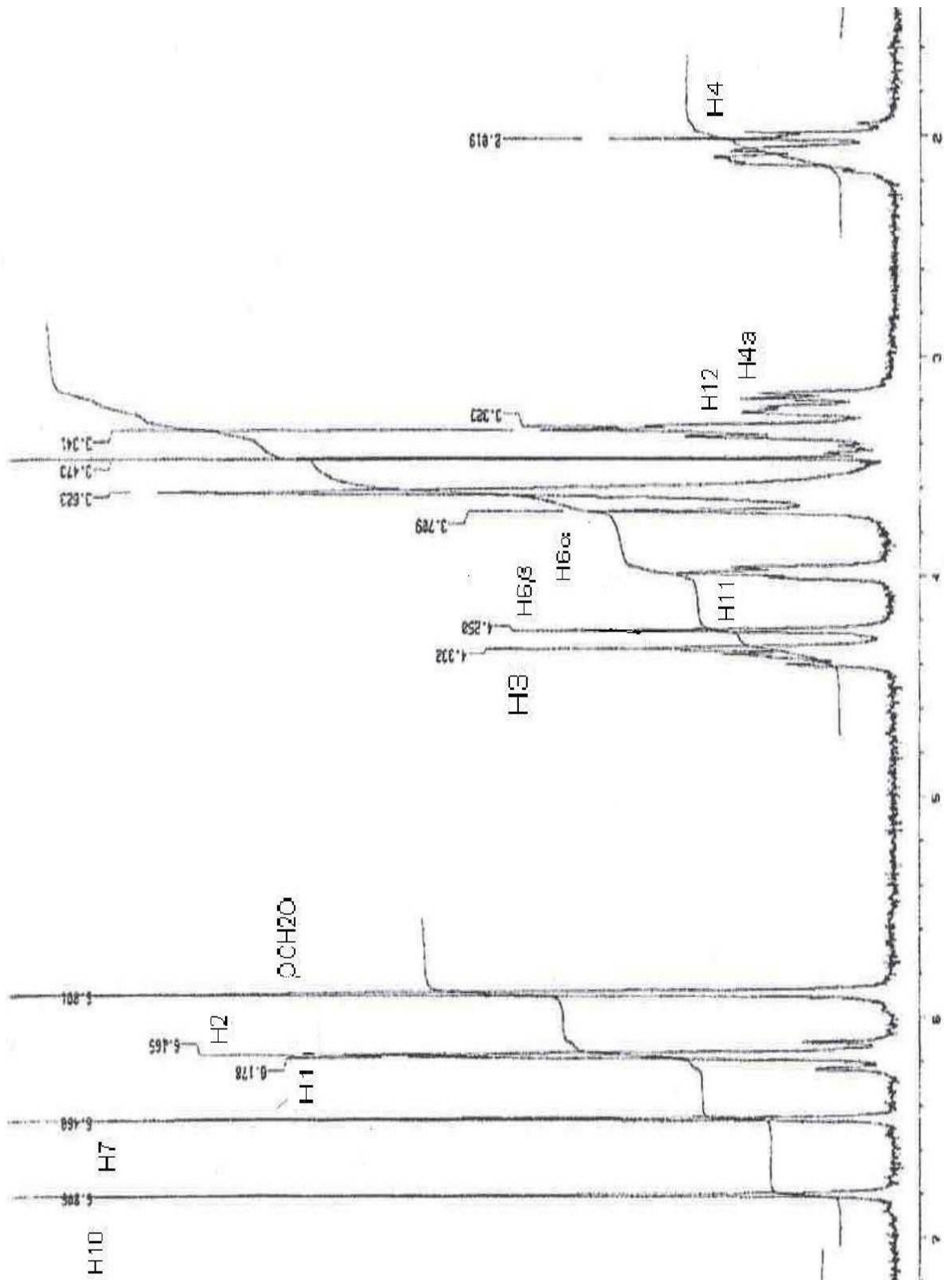


Figura 41. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de hamayna (7)

## Espectro de $^1\text{HRMN}$ .

Las señales que aparecen en este espectro (figura 41) son muy similares a las reportadas para hemantamina, alcaloide ya analizado, por pertenecer al mismo tipo  $\alpha$ -crinano, se resumen a continuación:

- Dos singuletes a  $\delta$  6.81 ppm y 6.47 ppm para los protones aromáticos H-10 y H-7 respectivamente.
- Dos protones olefínicos como un singulete ancho a  $\delta$  6.16-6.17 ppm asignados para los protones H-1 y H-2 en donde las constantes de acoplamiento están de acuerdo a la relación *cis* entre el singulete en C-3 y el puente de  $\alpha$ 5-10b-etanofenantridínico.
- Dos dobletes para el sistema AB correspondientes a los protones bencílicos de la posición 6, asignados así:  $6\alpha$  a  $\delta$  3.71 ppm y  $6\beta$  a  $\delta$  4.25 ppm encontrándose este último más desapantallado debido al par electrónico deslocalizado del Nitrógeno.
- Un singulete a 5.90 ppm perteneciente al grupo metilendioxi.
- Un multiplete centrado a  $\delta$  2.02 ppm asignado para los protones H-4 los cuales no son equivalentes químicamente pero por la resolución del espectro no se asignaron las señales correspondientes al H- $4\alpha$  y H- $4\beta$ .
- Un doble doblete a  $\delta$  3.20 ppm para el protón H-4a; este protón presenta una constante de acoplamiento ( $J = 6.54$  Hz) con H- $4\alpha$  debido a su posición *trans*-diaxial, disposición característica para este tipo de alcaloides.
- Un multiplete para H-3 a  $\delta$  4.35 ppm desplazado por inducción del grupo hidroxilo.
- A  $\delta$  4.00 ppm se presenta un triplete asignado al protón H-11 que acopla con los protones no equivalentes de la posición 12.
- Un multiplete a  $\delta$  3.30 ppm para los hidrógenos de la posición 12 no equivalentes químicamente debido a el nitrógeno adyacente; el espectro no muestra las señales diferenciadas.

Tabla 17 Datos espectro <sup>1</sup>H-RMN de hamayna (7).

H	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	6.16-6.17	m	--
2	6.16-6.17	m	--
3	4.35	m	3,2=4.95 3,4= 1.7
4	2.02	m	4α,4β=12.8
4a	3.20	d	4a,4α y β=6.54
6α	3.71	d	6α,6β=13.04
6β	4.25	d	6β,6α=13.04
7	6.46	s	
10	6.81	s	
11	4.00	t	7.7
12	3.30	m	17.75; 7
12	3.30	m	17.75; 7
OCH <sub>2</sub> O	5.90	s	

### **Espectro de <sup>13</sup>C-RMN – DEPT.**

Para el análisis de este espectro (figura 42) se divide en dos regiones. La región a campo bajo (>90.0 ppm) en donde se encuentran las señales olefínicas y carbonos aromáticos, también como el del grupo metilendioxi; asignados así: a δ 101.0; 103.2; 106.8; 123.2; 125.9; 135.5; 137.5; 137.6; 146.5 ppm se asignaron OCH<sub>2</sub>O; C10; C7; C1; C6a; C2; C10a; C8; C9 respectivamente.

Las otras señales correspondientes a los carbonos saturados se encuentran a campo alto (< 90.0 ppm) así:

C 11 a δ 79.8 ppm; C3 a 67.2 ppm; C4a a 66.1 ppm; C6 a 63 ppm; C12 a δ 61.0 ppm; C10b a δ 49.8 ppm; 4 a 33.0 ppm; en donde se observa el efecto del sustituyente hidroxilo en los carbonos C11 y C3; además de la influencia del nitrógeno en los carbonos adyacentes a él (C6, C4a y C12).



Tabla 18 Datos espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN – DEPT de hamayna (7).

C	$\delta$ (ppm)	DEPT
1	123.2	CH
2	135.5	CH
3	67.22	CH
4	33.0	CH <sub>2</sub>
4a	66.0	CH
6	63.0	CH <sub>2</sub>
6a	125.9	C
7	106.8	CH
8	146.1	C
9	146.5	C
10	103.2	CH
10a	137.6	C
10b	49.8	C
11	79.8	CH
12	61.0	CH <sub>2</sub>
OCH <sub>2</sub> O	101.0	CH <sub>2</sub>

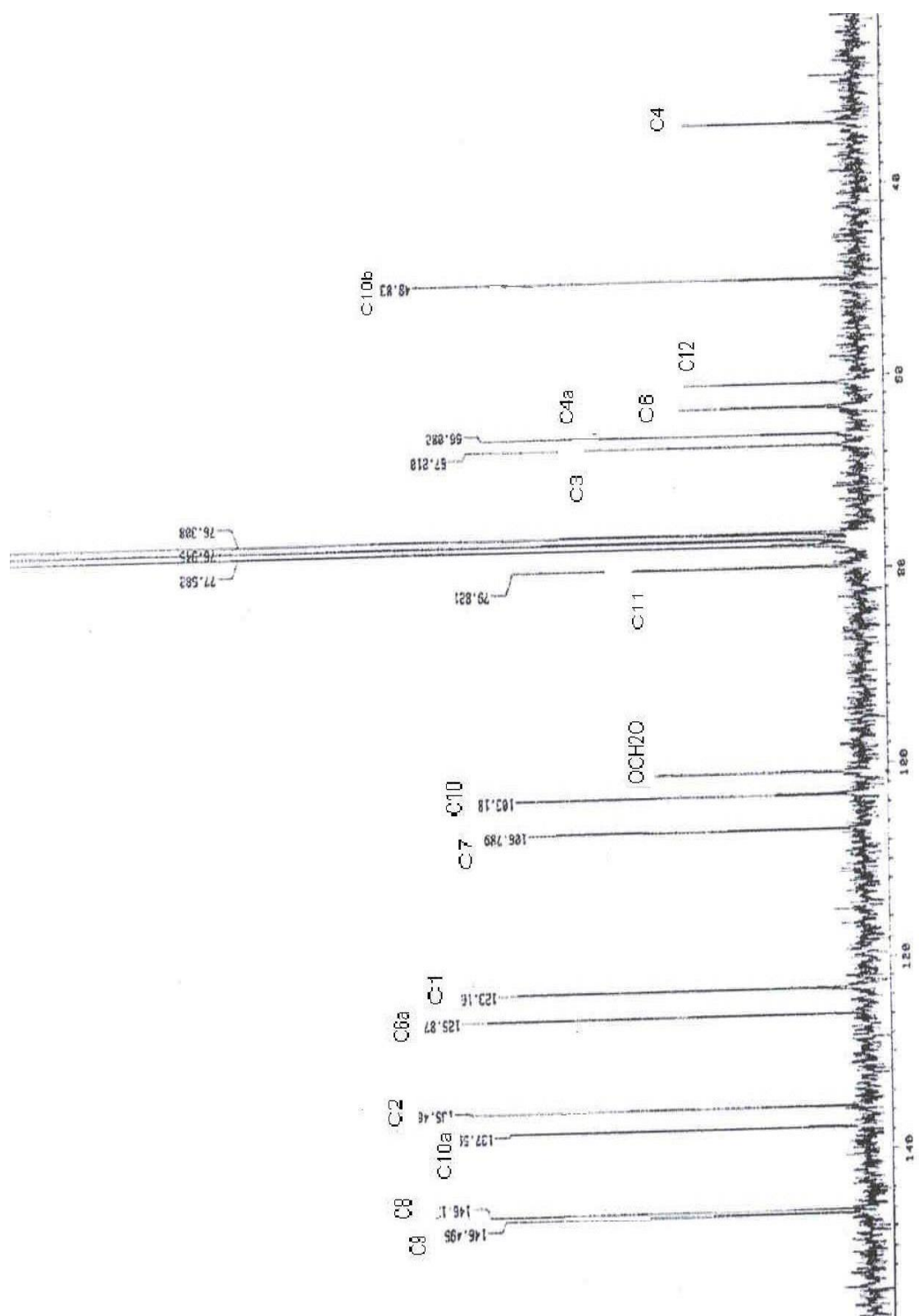


Figura 42. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de niamayna (7)

## Espectro de masas.

El patrón de fragmentación en este caso se basa en características químicas como el doble enlace ( $\Delta^{1,2}$ ) en el anillo C y un grupo hidroxilo como sustituyente en C<sub>11</sub>.

La facilidad o no de la pérdida de H<sub>2</sub>O a partir del ión molecular depende de la estereoquímica del grupo hidroxilo en C<sub>3</sub>. Así en el espectro de masas de hamayna es el pico base a m/z = 269.

La subsiguiente pérdida de un radical aldehídico ( $\cdot\text{CHO}$ ) se evidencia por un pico a m/z [240] y es típico en este tipo de alcaloides con una abundancia relativa apreciable. (figura 43)

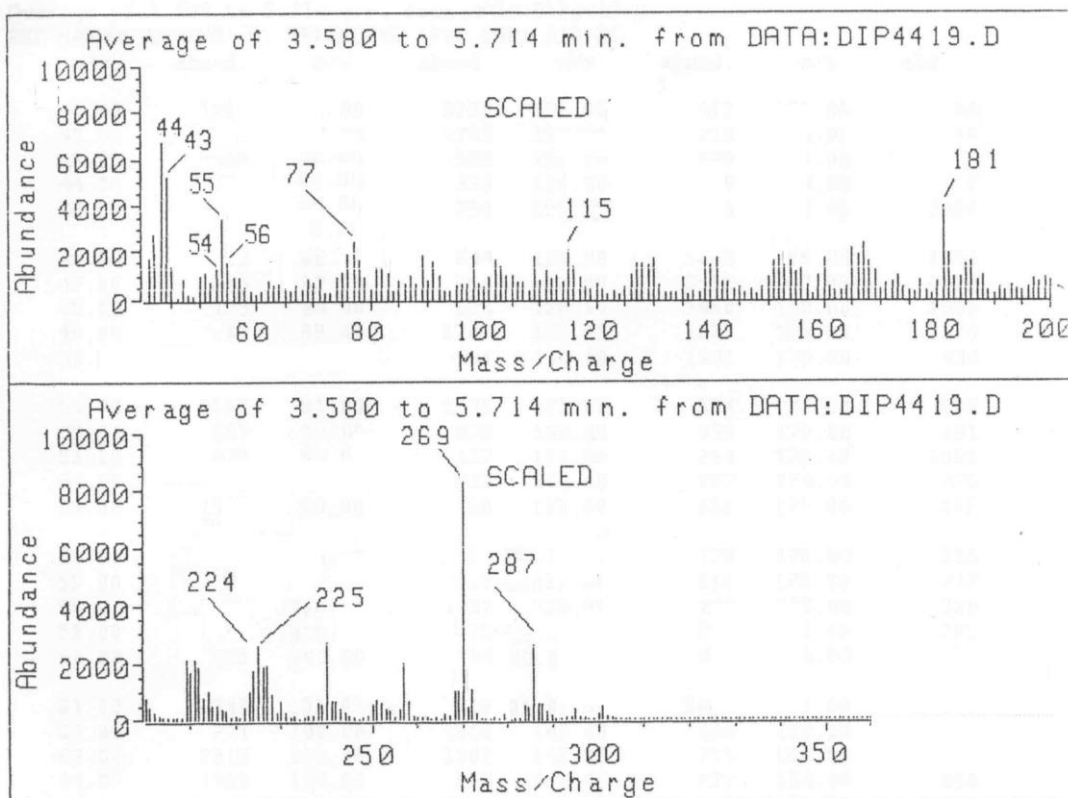


Figura 43. Espectro de Masas de hamayna (7)

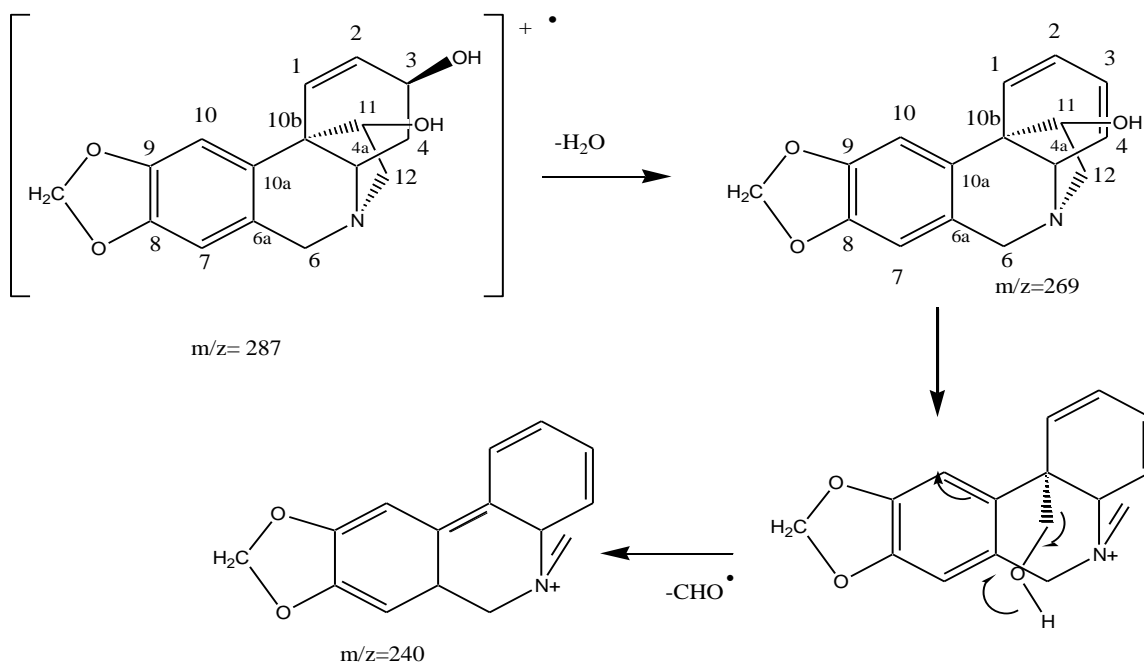


Figura 44. Fragmentaciones de masas de hamayna (7)

### Espectro de Dicroísmo Circular.

Este espectro (figura 45) determina la configuración absoluta de la molécula; los valores reportados para las curvas de dicroísmo circular definen claramente un sistema  $\alpha$ -crinano con un puente de  $\alpha$  5 – 10b-etanofenantridina, lo cual coincide con la estereoquímica reportada para hamayna; además el espectro revela que la unión B/C es *trans*-diaxial y que las curvas están dominadas por el cromóforo metilendioxi-fenil.

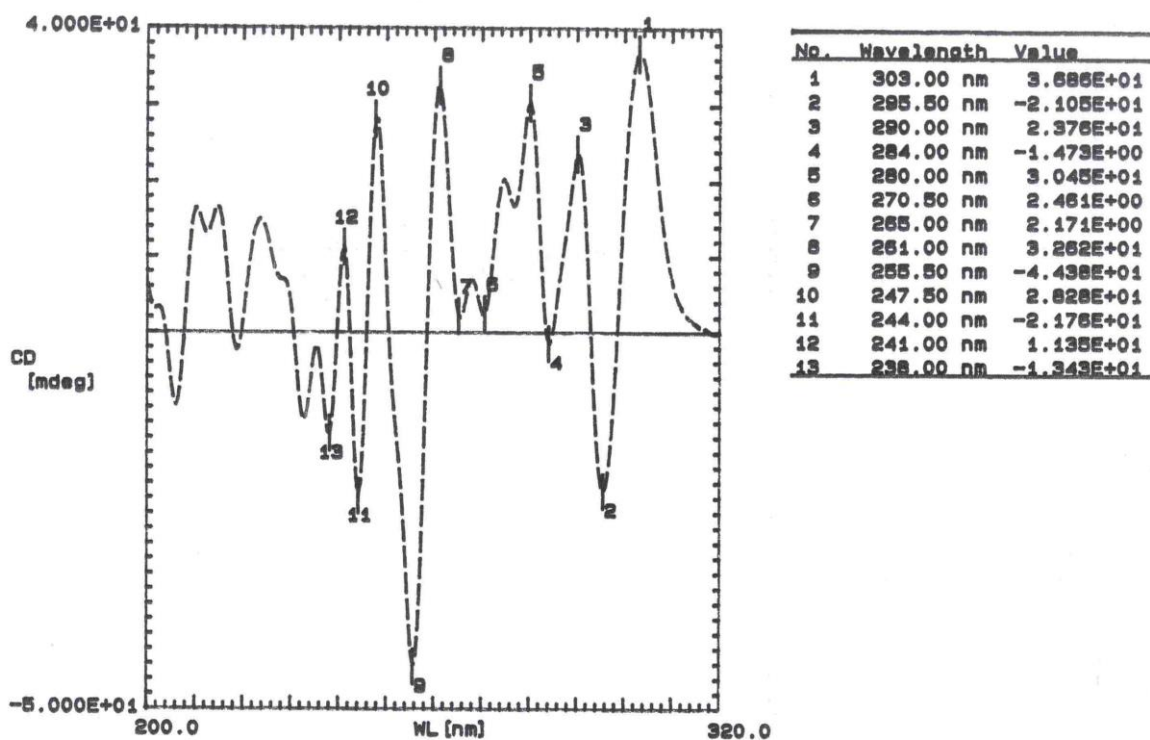


Figura 45. Espectro de dicroísmo circular de hamayna (7)

En la estructura más estable simulada para hamayna (7) (figura 46) se observa la configuración  $\alpha$  del puente etanofenantridina.

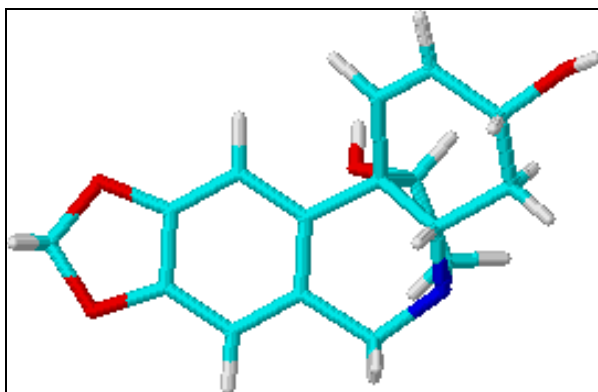
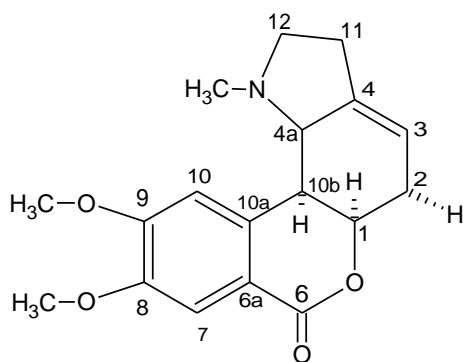


Figura 46. Estructura de mínima energía de hamayna (7)

### 7.1.7 Elucidación estructural de Cs9

La elucidación estructural de este Cs9 identificado como homolicorina (3), se ha realizado con base a la aplicación de técnicas espectroscópicas de RMN. La utilización de otras técnicas como la espectroscopía de IR y EM, o las físicas (pf,  $[\alpha]_D$ , entre otras) ha tenido un valor confirmatorio.



**Homolicorina (3)**

### Espectro de infrarrojo

Los grupos que se pueden confirmar a partir de los datos del espectro IR son los siguientes.

- Banda a  $2820\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones de tensión del enlace C-H.
- A  $1700\text{ cm}^{-1}$  bandas armónicas correspondientes a las vibraciones del anillo aromático.
- Bandas a  $1260\text{-}1245\text{ cm}^{-1}$  características de las vibraciones de tensión del enlace C-O-C.
- $1245\text{ cm}^{-1}$  banda de elongación por el enlace C-O.
- Vibraciones de tensión fuera del plano a  $932\text{ cm}^{-1}$  banda característica del grupo metilendioxi.

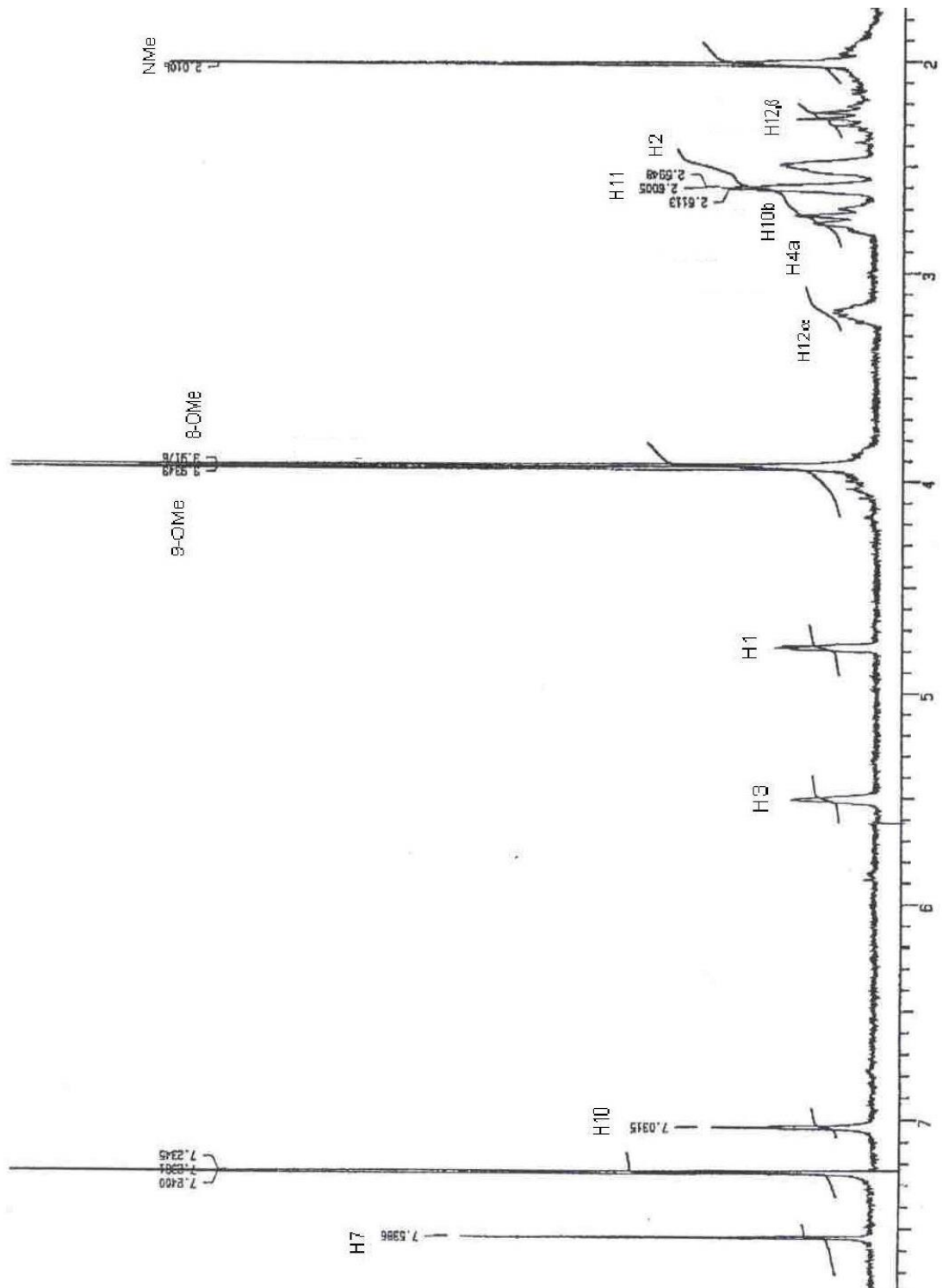


Figura 47. Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de homolitorina (3)

Así en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de homolicorina (3) (figura 47) se observa una serie de señales características que luego se pueden ver repetidas en otros alcaloides del mismo origen biosintético:

- 2 singuletes en zona aromática,  $\delta$  7.54 y 7.03 ppm, que corresponden a los protones aromáticos H-7 y H-10. El protón H-7 aparece a campos más bajos que el H-10 debido al efecto de desapantallamiento inducido por el carbonilo lactónico en *peri*. La posición relativa en posición *para* entre los dos protones aromáticos se justifica por la ausencia de acoplamiento entre ellos.
- 2 singuletes solapados a  $\delta$  3.93 y 3.92 ppm el primero de los cuales integra 3 protones y corresponde a los dos grupos metoxilo del anillo aromático.
- Más apantallado a  $\delta$  2.01 ppm integra para 3 protones correspondientes al grupo N-metilo.
- Un doble doblete de dobletes a  $\delta$  4.81 ppm, debido a su triple acoplamiento con los dos protones H-2 y con el protón metínico H-10b y H-1 presenta la evidencia de estar en posición  $\alpha$  por comparación del desplazamiento químico y de la multiplicidad con compuestos análogos (Hawksworth) La magnitud del acoplamiento H-1/H-10 justifica la unión *cis* entre los anillos B y C, siendo la conformación de mínima energía para esta molécula en la figura 51, con una conformación de semisilla esperada para el anillo C.
- Los protones H-2, dentro de una señal ancha a  $\delta$  2.49 ppm.
- Doble doblete a  $\delta$  2.64 ppm para los protones H-10b.
- Multiplete que engloba a los protones 11 a  $\delta$  2.61 ppm.
- El protón olefínico H-3, dentro de una señal ancha a  $\delta$  5.50 ppm.
- El protón metínico H-4a, como un multiplete a  $\delta$  2.72 ppm, a causa de su acoplamiento con H-10b, junto con un acoplamiento arílico transoide con H-3. La constante de acoplamiento entre H-4 a y H-10 b, con un valor de 9.6 Hz, sólo puede deberse a una relación *trans*-di axial entre los dos protones.



- Los protones H-12 $\alpha$  y H-12 $\beta$  aparecen como multipletes a  $\delta$  3.14 ppm y 2.24 ppm respectivamente. El protón  $\alpha$  está mas apantallado debido a la orientación cis respecto al par electrónico no compartido del nitrógeno <sup>130</sup>. La inversión conformacional de este está restringida, ya que si el grupo N-metilo está en posición  $\alpha$  tiene lugar un impedimento estérico con el H-10.

Tabla 19 Datos espectro <sup>1</sup>HRMN de homolicorina (3)

H	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	4.81	ddd	1,2 endo=4.2 1,2 exo= 1.8 1,10b=1.7
2	2.49	m	
3	5.50	sa	
4a	2.72	dd	4 a,10b=9.6 4 a,3=2.0
7	7.54	s	
10	7.03	s	
10b	2.64	dd	10b,4a=9.6 10b,1=1.8
11	2.61	m	
12 $\alpha$	3.14	ddd	12 $\alpha$ ,12 $\beta$ =9.2 12 $\alpha$ ,11 $\beta$ =5.3 12 $\alpha$ ,11 $\alpha$ =4.1
12 $\beta$	2.24	dd	12 $\beta$ ,11 $\alpha$ =18.0 12 $\beta$ ,12 $\alpha$ =9.2
N-Me	2.01	s	
8-O-Me	3.92	s	
9-O-Me	3.93	s	

### Espectro de <sup>13</sup>C-RMN

En cuanto al espectro de <sup>13</sup>C-RMN de homolicorina (3) (figura 48) presenta unas señales características que proporcionan información valiosa sobre la estructura del compuesto como se describe a continuación:

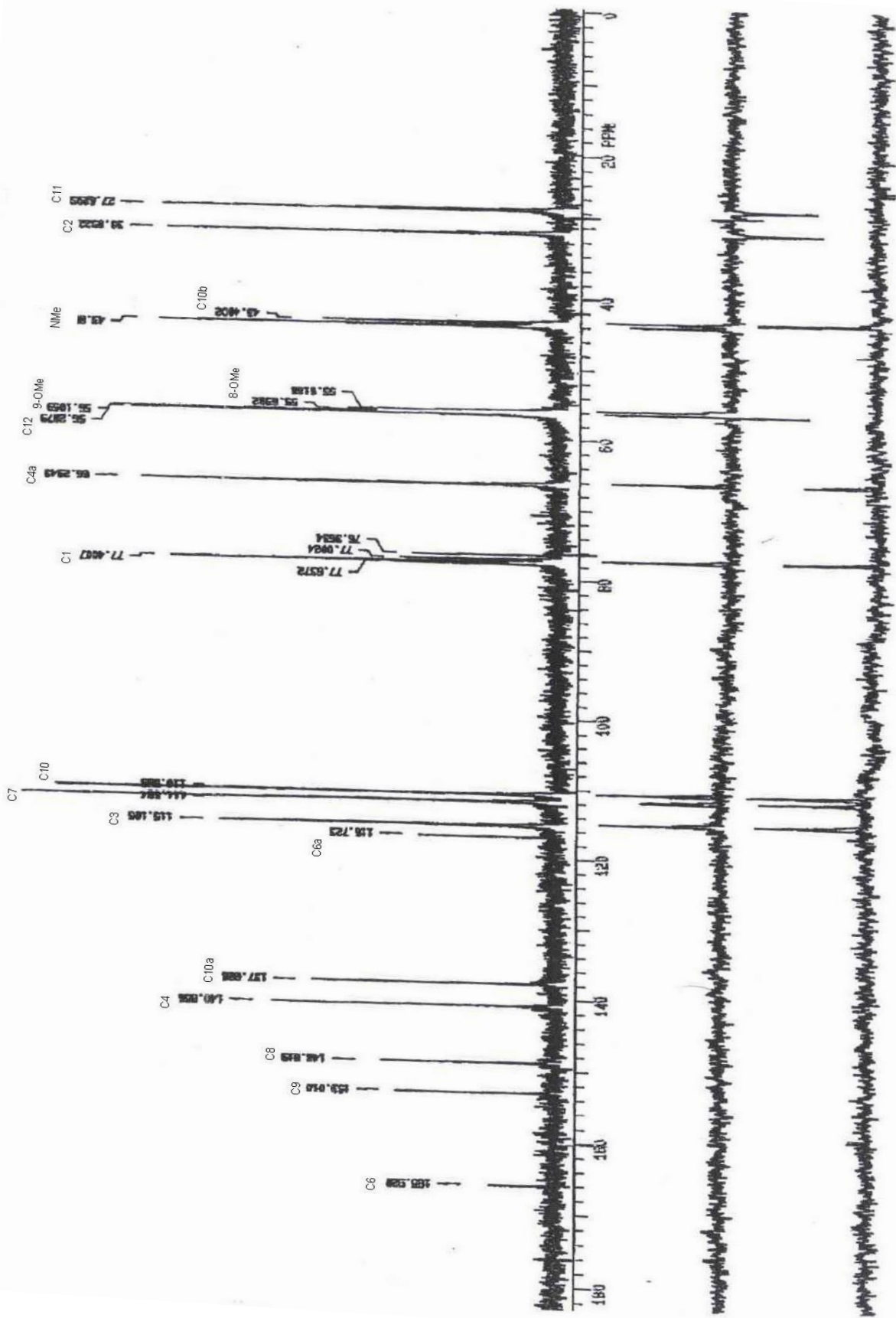


Figura 48. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de homolichorina (3)

Las señales más típicas corresponden:

- Al carbonilo lactónico, que en este caso aparece a  $\delta$  165.9 ppm.
- A  $\delta$  44.0 ppm atribuida al grupo N-metilo.
- Los metoxilos aromáticos a 56.1 y 55.8 ppm y del metileno en C-12 a 56.3 ppm.
- El carbono olefínico C-3, como doblete a  $\delta$  115.1 ppm, mientras que el C-4 perteneciente al mismo olefínico y además cuaternario lo hace a 140.8 ppm.
- Un doblete a  $\delta$  77.4 ppm, atribuible al carbono en  $\alpha$  respecto a la lactona.
- El carbono metínico C-4a, que está en posición  $\alpha$  respecto al nitrógeno, como doblete a 66.2 ppm.
- El carbono metínico en C-10 b, en  $\alpha$  respecto al anillo aromático a  $\delta$  43.4 ppm.
- El carbono metilénico C-2 a  $\delta$  30.8 ppm, mientras que el también metilénico aparece  $\delta$  27.6 ppm.

Tabla 20. Datos espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN – DEPT de homolicorina (3).

C	$\delta$ (ppm)	DEPT
1	77.4	CH
2	30.8	CH <sub>2</sub>
3	115.1	CH
4	140.8	C
4a	66.2	CH
6	165.9	C
6a	116.7	C
7	111.5	CH
8	148.8	C
9	153.0	C
10	110.5	CH
10a	137.6	C
10b	43.4	CH
11	27.6	CH <sub>2</sub>
12	56.3	CH <sub>2</sub>
MeOAr-9	56.1	CH <sub>3</sub>
MeOAr-8	55.8	CH <sub>3</sub>
MeN	44.0	CH <sub>3</sub>

En la zona más desapantallada aparecerían las señales que corresponden a los carbonos del anillo aromático, cuatro de ellos cuaternarios y dos terciarios, los carbonos olefínicos, y el ya referido carbonilo lactónico. La asignación de las señales se ha basado en estudios realizados por Jeffs y colaboradores sobre homolicorina y otros derivados con el mismo esqueleto base <sup>132</sup>.

### **Espectro de Masas**

El espectro de EM de homolicorina (3) (figura 49) muestra una poca abundancia para el ión molecular a  $m/z = 315$ . Esta molécula presenta un tipo de fragmentación dominante, consistente en la rotura de enlaces débiles en el anillo C y obtención de dos fragmentos, uno que representa al anillo pirrolidina (con sus sustituyentes), y otro que contiene la mitad de el grupo lactona.

El espectro de EM de homolicorina (3) muestra una poca abundancia para el ión molecular a  $m/z= 315$ . Esta molécula presenta un tipo de fragmentación dominante, consistente en la rotura de enlaces débiles en el anillo C y obtención de fragmentos, uno que representa el anillo pirrolidina (con sus sustituyentes) y otro que contiene la mitad lactona.

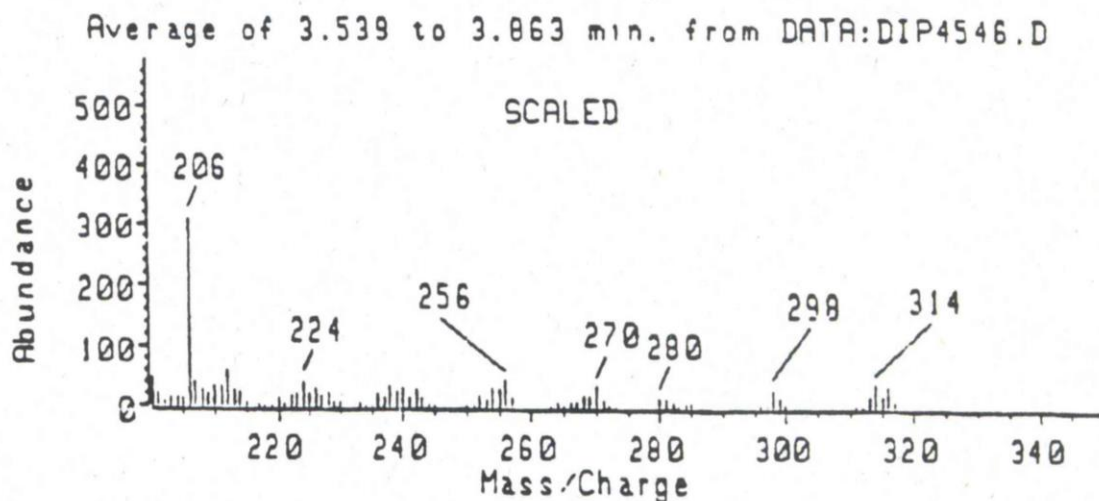
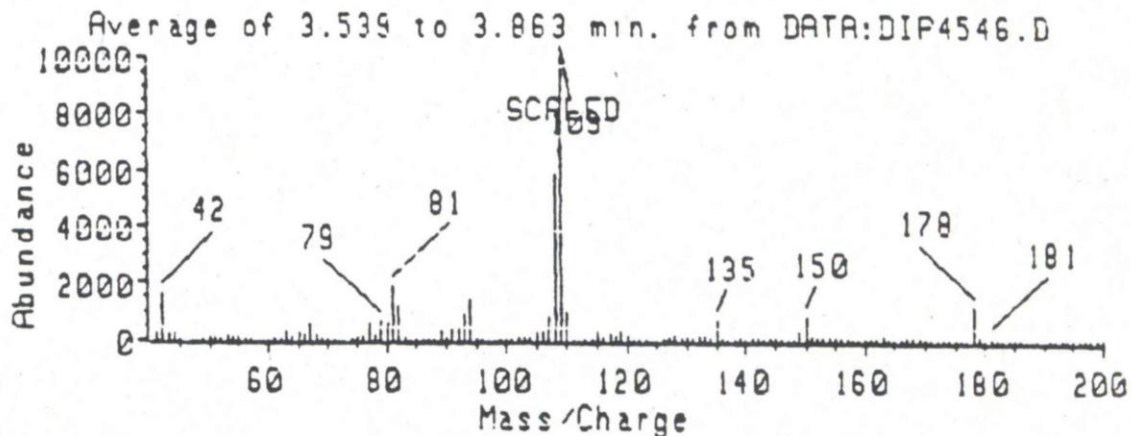


Figura 49. Espectro de masas de homolichorina (3)

El fragmento más característico de homolichorina (3) y derivados se da a  $m/z = 109$ . Un mecanismo explicativo para esta fragmentación puede basarse en un proceso tipo retro Diels-Alder con formación del fragmento de  $m/z = 109$ , que experimenta una pérdida subsiguiente de hidrógeno radical para dar el pico a  $m/z = 108$ . A continuación puede tener lugar la eliminación del CO del ión radical de  $m/z = 206$ , dando el fragmento benzofuranilo  $m/z = 178$ . Una eliminación posterior de CO y de metilo daría las especies de  $m/z = 150$  y  $m/z = 135$ , respectivamente. La pérdida de un radical hidrógeno, metilo o etilénico del fragmento de  $m/z = 109$  puede dar lugar, respectivamente, a los picos a  $m/z = 108$ ,  $m/z = 94$  y  $m/z = 82$

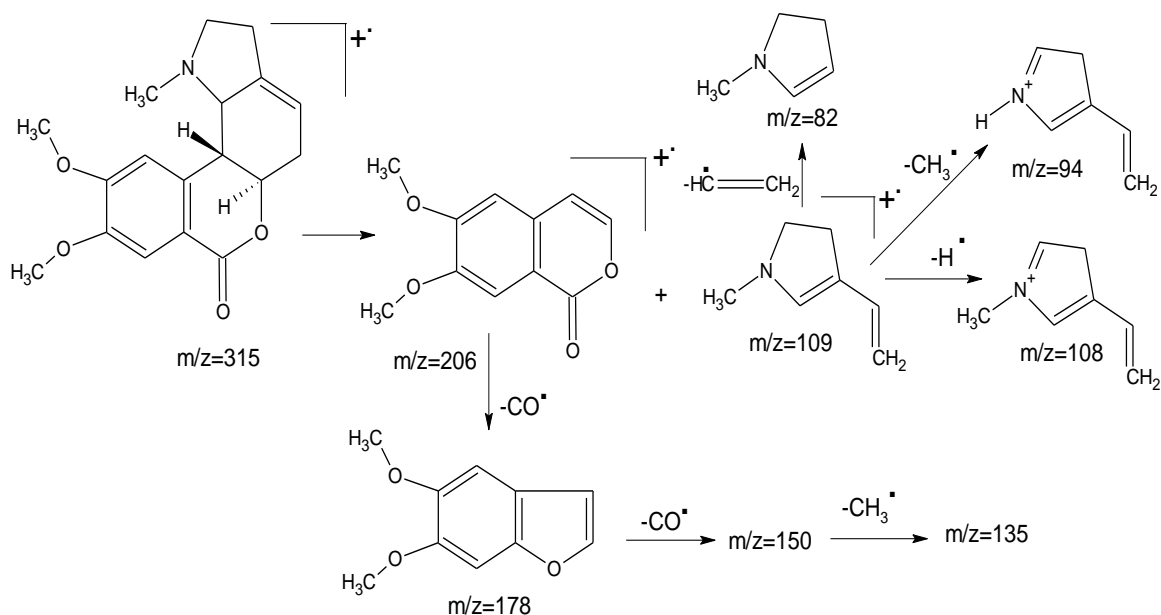


Figura 50. Fragmentación de masas de homolicorina (3)

En el modelo molecular de mínima energía (figura 51), no sólo evidencia la relación en *cis* entre los anillos B y C, sino que determina los ángulos de torsión entre H-1 y H-10b y entre H-4 a y H10b ( $132.5^\circ$ ), que están en relación directa con las constantes de acoplamiento observadas.

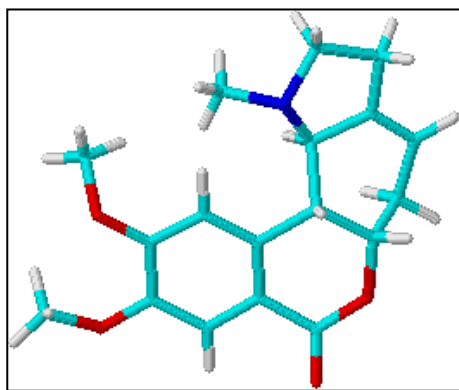


Figura 51. Estructura de mínima energía de homolicorina (3)

## 7.2 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE DIACETATO DE LICORINA

Con el fin de verificar la presencia de los dos grupos hidroxilo en la molécula, se procedió a la preparación del diacetato de licorina. El procedimiento fue descrito en la parte experimental.

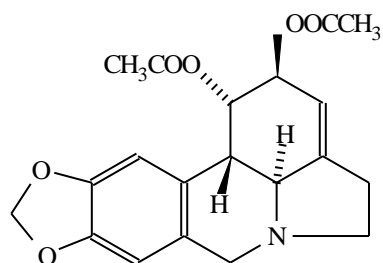


Figura 52. Diacetato de licorina

### Espectro de $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (figura 52) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (figura 53) muestran las señales típicas para el diacetato de licorina, alcaloide reportado en *Crinum pratense*, *C. bulbispermun* y últimamente en *Brunsvigia littoralis*<sup>12</sup>. Este compuesto muestra una actividad citotóxica y antimalárica moderada en cultivos de *Plasmodium falciparum*.<sup>137</sup>

Tabla 21 Datos espectro  $^1\text{H}$ -RMN de 1,2 diacetil-licorina (52).

Protón	Licorina (2) (200 MHz)	1,2-diacetil-licorina Reportado	Experimental
1	4.55	5.73(s)a	5.73 (s) a
2	4.25	5.25 (s)a	5.24 (s) a
3	5.65	5.53 (s)a	5.53 (s) a
4a	2.93	2.76 (d)	2.66 (m)
6 $\alpha$	3.65	3.52 (d)	3.60 (d)
6 $\beta$	4.23	4.12 (d)	4.12 (d)
7	6.73	6.57 (s)	6.57 (s)
10	6.97	6.73 (s)	6.74 (s)
10b	2.79	2.86 (d)a	2.87 (m)
11 $\alpha$	2.65-2.70	2.65 (m)	2.64 (m)
12 $\alpha$	2.55	2.39 (dd)	2.42 (m)
12 $\beta$	3.40	3.36 (ddd)	3.36 (m)
OCH <sub>2</sub> O	6.00	5.91 (s)	5.91 (s)
OOCCH <sub>3</sub>	---	1.84 (s)	1.94 (s)
OOCCH <sub>3</sub>	---	2.07 (s)	2.07 (s)

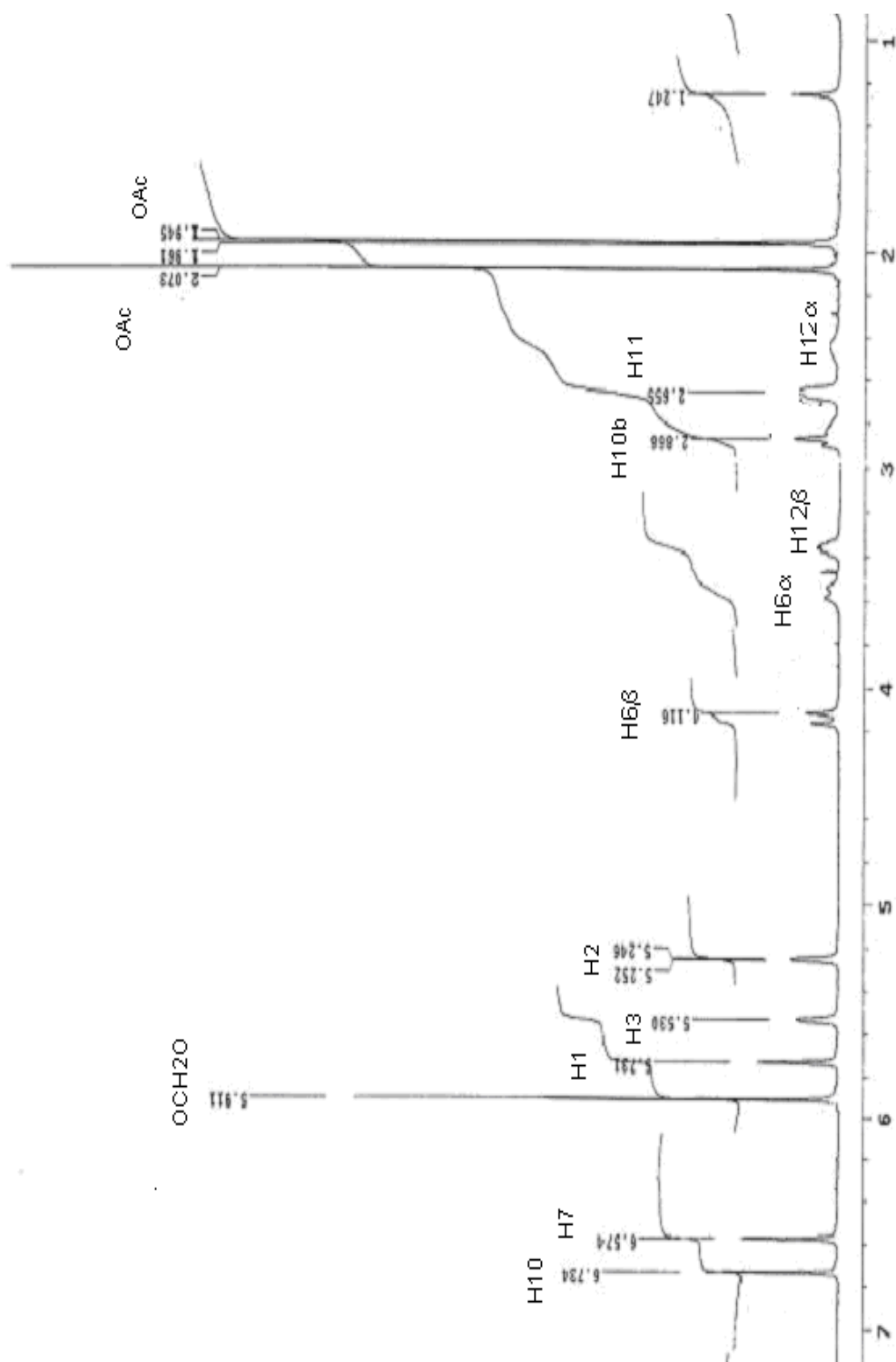


Figura 53. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de diacetil-licorina .



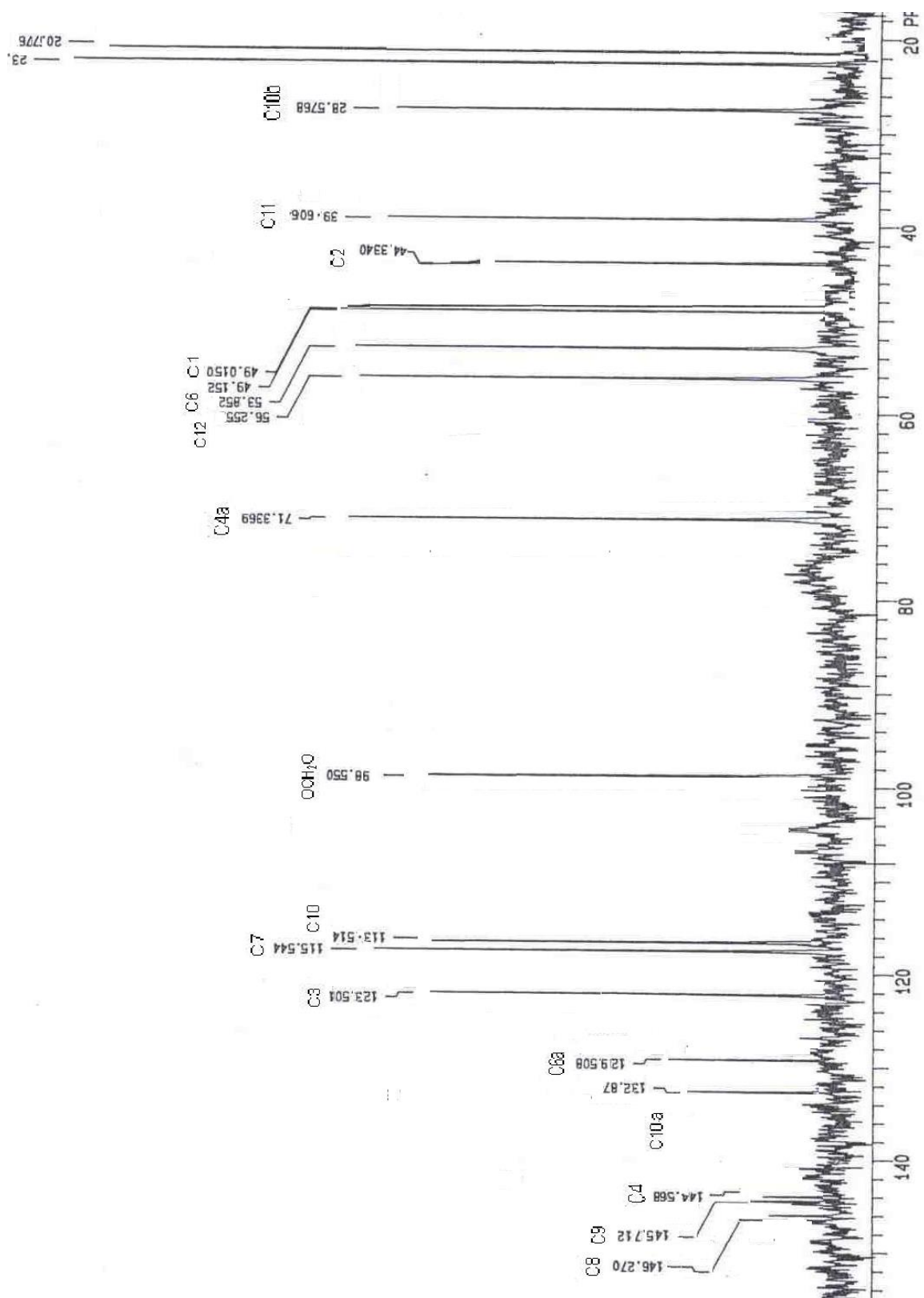


Figura 54. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de diacetil-licorina (52).

Tabla 22 Datos espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN 1,2 diacetil-licorina (52)

C	$\delta$ (ppm)	DEPT
1	49.152	CH
2	44.33	CH
3	123.50	CH
4	144.57	C
4a	71.34	CH
6	53.85	CH <sub>2</sub>
6a	129.51	C
7	115.54	CH
8	146.27	C
9	145.71	C
10	113.51	CH
10a	132.87	C
10b	25.58	CH
11	39.61	CH <sub>2</sub>
12	56.26	CH <sub>2</sub>
OCH <sub>2</sub> O	99.55	CH <sub>2</sub>
OOCCH <sub>3</sub>	20.776	CH <sub>3</sub>
OOCCH <sub>3</sub>	23.568	CH <sub>3</sub>

El espectro de masas (figura 54), presenta los siguientes fragmentos de relación m/z (intensidad relativa). El ión molecular a m/z 371 consistente con la fórmula molecular y el pico base a m/z 252 correspondiente a la pérdida de 2 grupos acetato (m/z 119); otros picos importantes son: m/z 31, 226, 221, 220, 194. Estos siguen el patrón de fraccionamiento de los alcaloides tipo licorina (2)<sup>33</sup>.

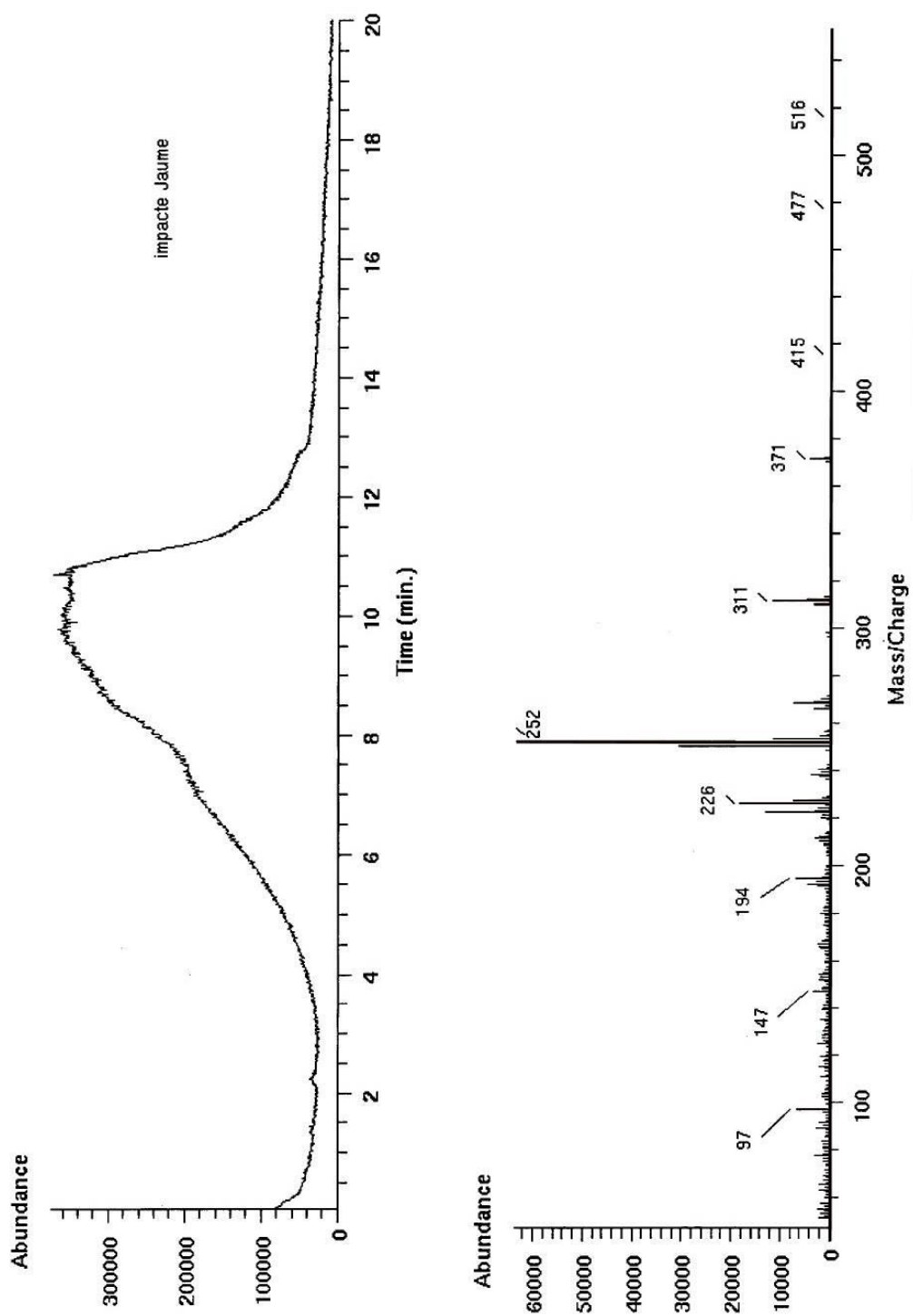


Figura 54. Espectro de masas de 1,2-O- diacetillicorina (52)

### 7.3. ANÁLISIS DE LOS PORCENTAJES DE RENDIMIENTO OBTENIDOS.

En la tabla número 23 se muestran los porcentajes de rendimiento tanto del crudo de alcaloides como de cada uno de los alcaloides aislados en base seca.

Tabla 23 Porcentaje de rendimiento en base seca de los alcaloides aislados.

MUESTRA	%Rendimiento con respecto a la planta seca	%Rendimiento con respecto al crudo de alcaloides.
Crudo de alcaloides	0.48%	-----
Licorina	0.052%	10.8%
Hemantamina	0.032%	6.65%
Galantamina	0.026%	5.32%
Hamayna	0.01%	2.18%
Homolicorina	$9.5 \times 10^{-3}\%$	1.98
Maritidina	0.018%	3.68%

Como ya se describió en la parte experimental los crudos alcaloídicos fueron obtenidos mediante el método tradicional ácido-base que ha permitido alcanzar rendimientos de extracción entre 0.6-0.8%, según lo reportado en la literatura <sup>122</sup>. Para el caso de *Caliphruria subedentata* específicamente se obtuvo un rendimiento de 0.48% en base seca que comparado con los reportados para otras especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae es bajo debido posiblemente a la poca cantidad de crudo en la especie en particular o a que su recolección fue en época previa a la floración donde hay una mayor biosíntesis de alcaloides en la planta.

El porcentaje de rendimiento (5.32%) para galantamina con respecto al crudo alcaloídico esta por encima de los valores encontrados para otras especies como en el caso de *Eucharis amazonica* que presenta un porcentaje de rendimiento de 0.476%; siendo esta de las pocas especies que se han estudiado en Colombia<sup>12</sup>.

En Europa algunas especies cultivadas del género *Narcissus* también contienen apreciables cantidades de este alcaloide calculándose que aproximadamente diez toneladas de bulbos producen un kilogramo de galantamina<sup>139</sup>; de *Caliphruria subedentata* obtenida en condiciones de laboratorio se necesitarían 158 toneladas de planta fresca para obtener esta misma cantidad del alcaloide; aunque la diferencia es apreciable se debe reconocer que la optimización del proceso

ayudaría a mejorar los rendimientos y que además *C. subdentata* es hasta el momento la mejor fuente de obtención del compuesto en nuestro país.

El alcaloide con mayor porcentaje de rendimiento es licorina (0.052% base seca); confirmándose lo reportado en la literatura para otras especies de **Amaryllidaceae**<sup>16</sup>; los alcaloides con menores porcentajes son Hamayna y homolicorina con 0.01% y  $9.5 \times 10^{-3}\%$  en base seca respectivamente demostrando que son alcaloides poco comunes en la especie.

Otro alcaloide importante hallado es maritidina con un 3.68% el cual es usado como precursor en la síntesis de galantamina además de ser poco común en especies de Amaryllidaceae<sup>140</sup>.

El extracto D (fase acuosa), que teóricamente podría contener alcaloides poco solubles en solventes orgánicos como por ejemplo, los N-óxidos y alcaloides cuaternarios, el análisis espectroscópico posterior descarto la presencia de este tipo de alcaloides en la planta.

## CONCLUSIONES

1. Se comprobó la presencia de alcaloides en *Caliphruria subdentata* identificados como:  
Tipo licorina-licorenina: licorina (1), homolicorina (6)  
Tipo Galantamina: galantamina (3)  
Tipo Hemantamina-crinina: hemantamina (2); maritidina (4), Hamayna (5);  
que podría facilitar la clasificación quimiotaxonómica de la especie.
2. El rendimiento de extracción del crudo alcaloídico es bajo comparado con otras especies de la familia Amaryllidaceae por el método tradicional de extracción ácido-base obteniéndose 0.48% de rendimiento en base seca.
3. El porcentaje de galantamina encontrado es bajo (5.32% con respecto al crudo de alcaloides) en relación con otras especies de Amaryllidaceae no endémicas, pero es la mejor fuente hasta el momento para la obtención del alcaloide en nuestro país.
4. El alcaloide con mayor porcentaje de rendimiento es licorina (0.052% base seca); confirmándose lo reportado en la literatura para otras especies de **Amaryllidaceae**; los alcaloides con menores porcentajes son Hamayna y homolicorina con 0.01% y  $9.5 \times 10^{-3}$  % que son poco comunes en esta familia botánica.
5. La presencia de maritidina en la planta constituye un aporte valioso ya que se utiliza como precursor de galantamina.

## 9. PROYECCIONES

- Continuar con las investigaciones para la implementación de planta piloto la cual permita vislumbrar la producción industrial con el paso de los años de galantamina; iniciando con el estudio de las concentraciones alcaloídicas en las diferentes etapas metabólicas de la planta.
- Promover el uso de este material vegetal medicinal (*Caliphruria subedentata*) de donde se obtiene galantamina como alternativa a mejores condiciones de vida a los pacientes de mal de Alzheimer.
- Efectuar ensayos para el establecimiento de la dosis mínima letal con planta seca y molida, permitiendo el empleo de toda la planta y reducir el costo en la extracción de galantamina además de desarrollar investigaciones que fortalezcan la obtención de nuevos derivados, su tipo y grado de actividad biológica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Meerow, A. W., Systematics of the Amazon lilies, *Eucharis* y *Caliphruria* (**Amaryllidaceae**) Ann. Missouri Bot. Gard., **76.**, 136-220. (1989)
2. Meerow, A. W. Biosystematics of tetraploid *Eucharis* (**Amaryllidaceae**)., Ann. Missouri Bot. Gard., **74**, 291-309. (1987).
3. Stephen, F. M. The **Amaryllidaceae** Alkaloids., The Department of Chemistry the University of Texas.**30.**, Austin, Texas., 252-253. (1987).
4. Djerassi y col., CHCD Alcaloides d' **Amaryllidaceae** en el DNP-CD ROM-96. Chapman & Hall., (1996).
5. Ficha de Novedad Terapéutica. Campus Universitario de Cartuja. Granada. Cadime. EASP. No 5 (2002).
6. Dahlgren, R. M. T. A Revised System of Classification of the Angiosperms. Bot. J. Linnan Soc. (1980).
7. Calderón, E. Lista roja preliminar de plantas vasculares de Colombia, incluyendo las orquídeas, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (2001).
8. Almanza, G., Contribución al estudio alcaloídico del género *Brunsvigia* (**Amaryllidaceae**) . Ph.D Tesis. Universidad de Barcelona. España.149.
9. Bergoñon, S. Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo **Amaryllidaceae**. Producción de galantamina por cultivos In Vitro de *Narcissus confusus*. Ph.D. Tesis Universidad de Barcelona.
10. Bornner, J., Flower bulbs slow brain disease New Scientist, 21. (1995).



11. Shieh, W. Ch. & Carlson, J. A., Asymmetric transformation of either enantiomer of narwedine via total spontaneous resolution process, a concise solution to the Synthesis of (-) – galanthamine. *J. Org. Chem.*, 59: 5463.
12. Cabezas, F., Estudio Químico de alcaloides en *Crinum kunthianum* ROEM y *Eucharis amazonica* PLANCHON EX. LINDEN, familia **Amaryllidaceae**. Tesis doctoral, Universidad del Valle., 80-97,(2002).
13. Cacabelos, R., *Revista Colombiana de Psiquiatría*. Vol 30. No 4. (2001).
14. Gerrad, A. W., *Pharm J.* **8**: 214 (1877).
15. Bastida, J., Villadomat, F., Llabres, J. M., Ramirez, G., Codina, C., & Rubiralta, M. Narcissus alkaloids, VIII. Mesembrenone, an unexpected alkaloid from *Narcissus pallidulus*. *J. Nat. Prod.* 52:478. (1989).
16. Jeffs, D.N., Abou-Dania, A., Campau, B., and Slarger, P., *J. Org. Chem. So.*, 1732. (1985).
17. Bogdanov, O. V., Shaitor, V. M. & Losev, N. A., Method of treatment of spastic forms of infantile cerebral spinal paralysis by muscle biotrainning and galanthamine. U. S. S. R. S. U. ( 1988).
18. Burandt, Ch. L., jr, Moraes-Cerdeira, Bastos, J. K., Nanayakkara, D., Mikell, J. & McCHEJNTY, S. D., Variation in galanthanine content among cultivars of narcissus 36 th Annual meeting of American Society of Farmacognosy. Oxford, Mississipi, July 23-27., (1995).
19. Takao, T., Polev, A., and Meinbart, H., Zenk. Radioimmunoassay for the quantitative Determination of galanthamine., *Planta Médica.* **56**. (1990).
20. Acosta, C.D., Alvarez R.E., Bonilla L.M., Martinez, C.E., Evaluación del Efecto Citotóxico, genotóxico “*in vitro*” de los extractos crudo y de alcaloides

del lirio pequeño (*Caliphruria subedentata*). Trabajo de Grado, Universidad del Cauca, Popayán., 100. (1995).

21. Kobayashi, S., Ishikawa, H., Sasakawa, E., Kihara, M., Shingu, T., and Kato, A. Chem. Pharm. Bull. **28**, 1827 (1980).
22. El-Din, A. S., Korany, M., Abou-Donia, A. and Sabry, N. N. Acta Pharm. Jugost. **33**, 143 (1983); Chem. Abstr. 99 117286h (1983).
23. Murav'eva, D. A. and Popota, O. I. Khim. Prir. Soedin., 263 (1982); Chem. Abstr. **97**, 107077K (1982).
24. Ochi, M., Otsuki H. And Nagao, K. Bull. Chem. Soc. J. Prod. Nat. **49**, 3363 (1976).
25. Ali, A. A., Kating, H., Frahm, A. W., El-Moghazi, A. M. and Ramadan, M. A. Phytochemistry **20**, 1121 (1981).
26. El-Moghazi, A. M. and Ali, A. A., Planta Med. **29**, 156 (1976).
27. El-Moghazi, A. M. and Ali, A. A., Planta Med. **30**, 369 (1976).
28. Jeffs, P. W., Abou-Donia, A., Campeu, D. and Staiger, D. J. Org. Chem. **50**, 1732 (1985).
29. Kobayashi, S., Tokumoto, T., Kihara, M., Imakura, Y., Shigu, T. and Taira, Z. Chem. Pharm. Bull. **32**, 3015 (1984).
30. Ghosal, S., Saini, K. S. and Frahm A. W., Phytochemistry. **22**, 2305 (1983).
31. Onyiriuka, O. S. and Jackson, A. H., Isr. J. Chem. **17**, 185 (1978).
32. Döpke, W., sewerin, E., Trimiño, Z. and Gutierrez, C. Chem **23**, 101 (1983).

33. Ghosal, S., Rao, P. H., Jaiswal, D. K., Kumar, Y. and
34. Tsuda, y., Kashiwaba, N. and Kumar, Y. Chem. Pharm. Bull. **32**, 3023 (1984).
35. Rao., R. V. K., Ali, N. And Reddy, M. N., Indian J. Pharm. Sci. **40**, 104 (1978).
36. Ghosal, S., Lochan, R., Ashutosh, Kumar., Y. And Srivastava, R. S., Phytochemistry **24**, 1825 (1985).
37. Pacheco, P., Silva, M. J., Sammes, P. G. And Watson, W. H., Rev. Latinoam. Quim. **9**, 28 (1978); Chem Abstr. **89**, 103746q., (1978).
38. Sepulveda, B. A., Pacheco, P., Silva, M. J. And Zemelman, R. Bol. Soc. Chil. Quim. **27**, 178 (1982); Chem. Abstr. **96**, 214307m (1982).
39. Alam, A. H. M., and Murav-eva D. A., Khim. Prir, soedin., 401 (1982); Chem. Abstr. **97**, 6321a (1982).
40. Ali, A.A., El-Moghazi, A.M., and Mesbah, M. K., Planta Med. **28**, 336 (1975).
41. Döpke, W., and Trimino, Z., Chem. **17**, 101 (1977).
42. Döpke, W., Sewerin, E., and Trimino, Z., Chem. **19**, 215 (1979).
43. Stefanov, Zh., Savchev, P. And Mitkov, I. Farmatsiya (sofia) **24**, 16 (1974); Chem Abstr. **83**, 4997s (1975).
44. Kobayashi, S., Yussa, K., Sato, K., Imakura, Y. and Shingu, T. Heterocycles **24**, 1219 (1982).

45. Ma, G. E., Li, H. Y., Lu, C. E., Yang, X. M. And Hong, S. H., *Heterocycles* **24**, 2089 (1986).
46. Numata, A., Takemura, T., Ohbayashi, H., Katsuno, T., Yamamoto, K., Sato, K. And Kobayashi, S., *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2146 (1983).
47. Kobayashi, S., Yuasa, K., Imakura, Y., Kihara, M. and Shingu, T., *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 3433 (1980).
48. Kobayashi, S., Takeda, S., Ishikawa, H., Matesumoto, H., Kihara, M., Shingu, T., Numata, A. and Uyeo, *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 1537 (1976).
49. Takagi, S., And Yamaki, M., *Yakugaku Zasshi. Chem.* **94**, 617 (1974).
50. Hung, S-H., Ma, G-E. and Spng, G-Q., *Huaxue Xuebo* **39**, 529 (1981); *Chem. Abstr* 96, 139653h (1982).
51. Döpke, W. and Dang, N. Z. *Chem.* **14**, 57 (1974).
52. Furusawa, E., Furasawa, S., Tani, S., Irie, H., Kitamura, K., and Wildaman. W.C., *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 336 (1975).
53. Tani, S., Kobayashi, N., Fujiwara, H., Shingu. T., And Kato, A., *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3381 (1981).
54. Ma, G.E., Hong. S-H., Zhang, S-Y., Lu, J-L., Hang. J-X., And Xu. B., *Zhongliou Fangzhi Yangjiou* 6, 1 (1979)
55. Ghosal. S. Kumar, Y. and Singh. S. *Phytochemistry* **23**, 1167 (1984).
56. Amico, A., Bruno, S. and Bonvino, V., *Ann. Fac. Agrar., Univ. Bari* 25, 129 (1972).

57. Dabire, F.M. and Murav'eva, D. A. *Khim. Prir. Soedin.*, 534 (1982); *Chem. Abstr.* 98, 50345k (1983).
58. Evidente. A. Iasiello, I. and Randazzo, G., *J. Natu. Prod.* **47**, 1003 (1984).
59. Evidente, A., Iasiello, I. and Randazzo. G., *Chem Ind. (London)*. 348 (1984).
60. Sadikov, T. Zatorskaya, I. N. and Shakirov, T.T., *Khim. Prir. Soedin.* **10**, 110 (1974); *Chem. Abstr.* 81, 68419w (1974).
61. Sadikov, T. and Sahikirov, T.T., *Khim. Prir. Soedin.*, 818 (1978); *Chem. Abstr.* **90**, 200284r (1979).
62. Kadyrov, K. A. and Khamidkhodzhaev, S.A., *Khim. Prir. Soedin.*, 418 (1979); *Chem. Abstr.* **91**, 189801e (1979).
63. Kobayashi, S., Inshikawa, H., Kihara, M., Shingu, T. and Hashimoto, T., *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 2244 (1977).
64. Kao, R.V. K. and Rao, J. V. L. N. S. *Curr. Sci.* **48**, 110 (1979).
65. Döpke W., and Roshan, Z., *Chem.* **21**, 223 (1981).
66. Pachexo, P., Silva, M., Steglich, W. and Watson, W. H. *Rev. Latinoam. Quím.* **9**, 28 (1978); *Chem. Abstr.* 89, 103746q (1978)
67. Murav'eva, D. A. and Alam, A. H. M. *Khim. Prir. Soedin.*, 533 (1982); *Chem. Abstr.* **98**. 2770y (1983)
68. Ghosal, S. Ashutosh, and Razdan, S. *Phytochemistry* **24**, 635 (1985).

69. Boit, H. G., Döpke, W. And Beitner, A., Chem. Ber., **90.**, 2197-2202. (1957).
70. Boit, H. G. And Döpke, W. Chem. Ber., **89**, 2462-2465. (1956).
71. Cherkasov, O. A., Khim.-Farm. Zh., 84 (1977); Chem. Abstr. **87**, 81252e (1977).
72. Döpke, W. And Sewerin, E., Z. Chem . **21**, 71 (1981).
73. Ma, G-E., Tang, R-J., Lu, C. And Hong, S-H, Yaoxve Tongbao **14**, 204 (1979).
74. Khamidkhodzhaev, S. A. And Abdusamatov, A., Uzb. Biol. Zh., **36** (1978); Chem. Abstr. 88, 148987q (1978).
75. Gude, M., Hausen, B. M., Heitsch, H. And König, W. A., Contact Dermatitis, **19**, 1-10., (1988).
76. Kreh, M. And Matusch, R., Phytochemistry, **38**, 1533-1535. (1995).
77. Döpke, W., Naturwissenschaften, **50**. 354, (1963).
78. Pham, L.H., Döpke W., Wagner J., and Mügger. C., Alkaloids from Crinum Amabile. Phytochemistry, **48** No.2. 371-376. ( 1998 ).
79. Nair, J.J., Codina, C., Bastida, J., Viladomat, F., Smith, P.J., and Albrecht, C.F., Structure Activity studies on Alkaloids from Indigenous Amaryllidaceous Species., Natural Product Analysis., Chromatography-Spectroscopy-Biological Testing. 327-629. (1998).
80. Ghosal, S.S., Singh, S.K., Kumar, Y. And Srivastara, R. S., Phytochemistry, Vol. **28**. 611. (1989).

81. Wildman, W. C., and Olesen, B., *J. Chem., Soc. Chem. Comm.* :551 (1976).
82. Autoyan, S. G., Zaplishy, V. N., Pogosyan, G. M., Libinzen, R. F., Lavertskaya, E. F., Pyzlov, V. K., Bessudnova, N. V., Sarkisyan, D. A., & Valtolkiana, O. E., Síntesis and biological activity of simtriazine containing dicarboxylic-acid amino ester bisiodomethylates. *Khim. Pharm. Zh*, 20. 172. (1986).
83. Marinova. V., Kirov, M., Grigorov, M., & Kotsev, P., Energix, a clinical and pharmacological Study. Part II. *Med. Biol. Inf.*, 5., 24, 107: 51982 g. (1987).
84. Henderson, V. W., Alzheimer's disease. *En Conn's Current Therapy*, R. E. Rakel, Ed. W.B. Saunders Company Philadelphia. (1994).
85. Schurderet, M., Alzheimer's disease: Fundamental and therapeutic. *Aspects experiential*, 51, 99. (1995).
86. Goldman, J., & Cote, Aging of the brain dementia of the Alzheimer's type: *Principles of Neuronal Science.*, 3<sup>rd</sup> Edition. E. R., Kandel, J. M., Schwartz & T. M., Jessell. Elsevier Science Publishing Co. Amsterdam. (1991).
87. Monthes, K., Schutte, H. R., & Luckner, M., *Biochemistry of alkaloids*. VEB Deutscher Verlagder Wissenchaf Berlin. (1985).
88. Suhadolnik, R. J., y Zulalian, J., *Proc. Chem. Soc.*, 216 (1963).
89. Ghosal, S., Kumar, Y., Singh, S.K., y Shanthi, A., *J. Chem. Research (s)*, **28** (1996).
90. Ghosal, S., Sankara, U., And Sushil, K.S., *Phytochemistry*, **28**(9), 2535. (1989).
91. Antoun, M.D., Mendoza, N.T., Ríos, Y.R., Mahinda Wickramaratne, D.B., Pezzuto, J.M. y Douglas Kinghom, A. (1993). *J. Nat. Prod.*, **56**: 1423.

92. Gude, M., Hausen, B.M., Heitsch, H. y Konig, W.A. (1988). A review of daffodil dermatitis. *Contact Dermatitis*, **19**: 1.
93. Ghosal, S., Singh, S.K. y Srivastava, R.S. (1986a). Alkaloids of *Zephyranthes flava*. *Phytochemistry*, **25**: 1975.
94. Arrigoni, O., Arrigoni-Liso, R. y Calabrese, G. (1975). *Nature*, **256**:513.
95. Arrigoni, O., Arrigoni-LISO, R. y Calabrese, G. (1977). *FEBS Lett.*, **81**: 135.
96. Lavermicocca, P., Garuccio, I., Surico, G. y Arrigoni, O. (1989). *Ann. Microbial. Enzimol.*, **39**: 93.
97. Zhu, R., Jiang, J., Gong, J. y Cao, R. (1984). *Zhuru Shenglixne Tongxuu*: **22**.
98. Amico, A. y Stefanizzi, L. (1980). *Fitoterapia*, **51**: 211.
99. Greathouse, G.A. y Rigler, N.E. (1941). *Ann. J. Botany*, **28**: 702. *En. Chem. Abstr.*, **36**: 519 (1942).
100. Perrone, C. y Garuccio, I. (1983). *Phycology*, **22**: 395.
101. Singh, R.P. y Pant, N.C. (1980). *Experientia*, **36**: 552.
102. Ghosal, S., Singh, S.K. y Unnikrishnan, S. (1987). *Phytochemistry*, **26**: 823.
103. Okamoto, T., Tori, Y. y Isogai, Y. (1968). *Chem. Phar. Bull.*, **14**: 1860.
104. Kang, B.G., Lee, J.S. Oh Se y col. (1984). *Plant Cell Physiol.*, **25**: 249.



105. Jiménez, A., Sánchez, I. y Vázquez, D. (1975). FEBS Lett., **55**: 53.
106. Embodem, W.A., Jr. (1972). Narcotic plants. Mac Millan, New York.
107. Codina, C., Bastida, J., Viladomat, F., Schmeda-Hirschmann, G., Loyola, J. And Rodriguez, J., Proceedings of Congress "Etnobotánica-92", Córdoba, Spain, 20-26, 499. (1992).
108. Lin, L.-Z., Hu, S.-F., Chai, H-B., Pengsuparp, T., Pezzuto, J. M., Cordell, G.A. and Ruangrunsi, N., Phytochemistry, **40**, 1295-1298. (1995).
109. Wenger, B., Italiano, L., Beck, J. R., Bastida, J., Bergoñon, S., Codina, C., Lobstein, A. And Anton, R., Planta Med, 61 77-79, (1995).
110. Furusawa, E., Irie, H., Combs, D. And Wildman W. C., Chemotherapy, **26**. 36-45. (1980).
111. Jiménez, A., Santos, A., Alonso, G. And Vasquez, D., Biochim. Biophys. Acta, 425. 342-348.(1976).
112. Jiménez, A., Sánchez, I. And Vasquez, D., FEBS Lett., **60**. 66-70., (1975).
113. Cozaniotis, D, A., Friedmann. T. and Fürst, S., Arch Int. Pharmacodyn., **266**. 229-238, (1983).
114. Losev, N. A. and Tkachenko, E. I., Bull. Exp. Biol. Med., 101. 436-438. (1986).
115. Chao, K.C., Chao, K. L. and Hu, C.C., Yao. Hsueh. Hsueh. Pao, **12**. 36-44. (1965).
116. Smirnova, Q. I. And Fesonyuk, V. P., Farmakol. Toksikol., **50**: 102-103.,

(1987).

117. Mihailova, D., Velkov, M. and Zhivkova, Z., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., **12**. 25-30 (1987).
118. Cozantitis, D. A., Anaesthetist, 26. 649-650. (1977).
119. Han, S. Y., Sweeney, J. E., Bachman, E. S., Schweiger, E. J., Forloni, G., Coyle, J. T., Davis, B. M., and Joullie, M. M. Eur. J. Med. Chem., 27 673-687. (1992).
120. Opitz, K., Eur. Pat. Appl. EP 449, 247 (Cl. A61K31/55) 02 Oct.1991.
121. Vigneau, C., Tsao, J., Ducluzeau and Galzot, J. Toxicol. Med., **4**. 21-26. (1984).
122. Domínguez, X., Métodos de Investigación Fitoquímica., Editorial Limusa., México. 211-226. (1973).
123. Llabres, R. and col. Phytochemistry, **25**: 1453. (1986).
124. Velásquez M.R., Aislamiento y elucidación estructural de alcaloides de la familia Amaryllidaceae. Universidad de Barcelona. (1999 ).
125. Dalmanses, P., & Bonet, J. J., Técnicas cromatografía líquido sólido en columna. Afinidad. (1984) **41**: 111.
126. Boit H.G. & Mehlis B., Clivimin und clivatin, Zeíneve alkaloide aus Clivia miniata. Naturwissens Chaften. **48**:603
127. Wildman, W.C., Alkaloids on the Amaryllidaceae., The Alkaloids. Vol 4. R.I.H. Manske ,Ed. Academic Press. Londo (1960).

128. Fales HM & Wildman W.C., Interconversions of Amaryllidaceae alkaloids by sodium and amylalcohol. *J. Am. Chem. Soc.*(1958)
129. Haygwitz, R.D., Jeffs, PW & Wenkert, E., Proton magnetic resonance spectral studies of some Amaryllidaceae alkaloids of the 5,10 b ethanophenanthridine series and of criwelline and tazetine. *J. Chem. Soc.* (2001).
130. Moyenehan, T.M., Schofie, I K., Jones, R. & Katrizky, R.A., The alkaloids of *Nerine bowdenii* W. Watts and *Crinum moorei* J. D. The synthesis and stereochemistry of quinolizidine and monoethylquinilizidines, and of their salts and quaternary salts. *J. Chem. Soc.* 2637 (1962).
131. Pabuccuoglu, V., Richonmme, P., Gözler, T., Kivcak, B., Freyer, AJ & Shamma M. Four new crinine-type alkaloids from *Sternbergia* species. *J. Nat. Prod.* **52**:785. (1998)
132. Frahm, A.W., Ali, AA & Rivas, M.A., <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance spectra of Amaryllidaceae alkoids. I- Alkaloids with the crinane skeleton. *Magn. Reson. Chem.* **23**:804. (1985)
133. Duffield, A.M., Aplin R.T., Budzikiewich, H. Djerassi, C., Murphy, C.F & Wildman, WC., Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXXII. A study of the fragmentation of some Amaryllidaceae alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **87**.4902. (1965).
134. Longeville, P. Fales, H.M Hight, R.J. & Burlingame, A.L. Fales, H.M. & Hight R.J., High resolution mass spectrometry in molecular structures studies-V. The fragmentation of Amaryllis alkaloids in the crinine series. Compounds bearing a hydroxyl substituent at C-11 ( and some 11-oxo derivates). *Org. Mass Spectr.* 7.417. (1973).
135. De Angelis, G., and Wildman. W.C., *Tetrahedron.* **25**.5099. (1969).

136. Studies in Natural Products Chemistry. Structure and Chemistry (Part F) (including cumulative index volumes 1-20). Vol 20. Atta-ur-Rahman Ed. Elsevier.(1998).
137. Cambell, W.E., Nair, J.J., Gammon, D.E., Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F., Smith, P.S. y Albrecht, C.J., *Planta Med.* **64**,91-9
138. Bastida, J., Bergoñon, S, *Planta Med.* **60**,95-96. (1994).
139. Mullineaux, R. & Smith, L. Do daffodils hold key to Alzheimer's?. *Sunday Express.* (1995).
140. Schwartz, M.A., Holton, R. A., *Molecules*; Institute of Organic chemistry, Vienna, Austria; (2002).