



Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)

Jean Paulo de Andrade

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE PRODCUTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN ALCALOÍDICA DE *NARCISSUS*
BROUSSONETII Y DE TRES ESPECIES BRASILEÑAS DEL GÉNERO
HIPPEASTRUM (AMARYLLIDACEAE)**

JEAN PAULO DE ANDRADE

2014

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE PRODCUTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORAT:
RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN ALCALOÍDICA DE *NARCISSUS BROUSSONETII* Y DE TRES ESPECIES BRASILEÑAS DEL GÉNERO *HIPPEASTRUM* (AMARYLLIDACEAE)

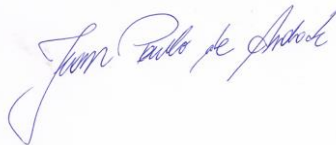
Memòria presentada per Jean Paulo de Andrade per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona



Director:
Dr. Jaume Bastida Armengol



Director:
Dr. José Angelo S. Zuanazzi



Doctorando:
Jean Paulo de Andrade

JEAN PAULO DE ANDRADE
2014

AGRADECIMIENTOS

La experiencia de haber vivido estos casi 5 años en Barcelona ha sido única, tanto a nivel profesional como personal. En primer lugar, agradezco profundamente a mi Director de Tesis, Dr. Jaume Bastida, por haberme aceptado bajo su tutoría y por los conocimientos adquiridos en el ámbito de la fitoquímica y del RMN, así como en el campo de la investigación en general. Extiendo este agradecimiento a los doctores Carles Codina y Francesc Viladomat que, conjuntamente con Jaume, conducen de manera ejemplar este grupo caracterizado por una amplia trayectoria científica y dedicada labor docente, tan manifestada por todos aquellos que han tenido la oportunidad de conocerles. La actitud siempre cercana e interesada en el bien estar de cada uno de sus estudiantes y colaboradores también les diferencia. En este sentido, les agradezco profundamente todos estos años ahí vividos.

Agradezco a la Agencia Española de Cooperación para el Desarrollo (AECID) por haberme concedido beca de 4 años para la realización de ésta Tesis Doctoral. Hago llegar un especial agradecimiento a Sra. Teresa María de Manuel Ochoa.

Por otra parte, quiero expresar mi agradecimiento a aquellos que han, probablemente, compartido más tiempo conmigo tanto a nivel laboral como personal. Laura, Ying, Natalia y Strahil, muchas gracias por todo lo que he aprendido de ustedes, de vuestros trabajos, de vuestros ejemplos y, por supuesto, por su amistad. Natalia y Strahil, muchas gracias por lo que aprendí de ustedes respecto a la técnica de GC-MS. A Natalia, sobretodo, gracias por la siempre dispuesta ayuda con el castellano.

Extiendo además mis agradecimientos a las personas quienes he tenido el gusto de coincidir en alguna temporada en el laboratorio. Michella, Edison, Stefania, Buket, Alina, Beatrice, Matteo, Nikoletta y Carmelina, gracias por la huella que habéis dejado y por las amistades que perduran.

De la misma forma, quiero agradecer a los compañeros de otros laboratorios por las comidas, charlas, partidos, cumpleaños, viajes, en fin... Oscar, Susana, Miriam, Joan, Marta, Ana Gallego, Ana Belén, Dani, Dulce, Jann, Kosta, Diego, Liliana, Miren, Lucie, Xavi, Alejandra y un especial agradecimiento a Rafa, Karla y Marta Strzelec. De la misma manera, extiendo el agradecimiento a los amigos de otros Departamentos como Esperanca, Mathias, Paloma, Andrea y, sobretodo, Brezana. Muchas gracias por su amistad.

A todos aquellos quiénes hemos compartido piso: Marc, Lourdes, Mireia y Pepito, gracias por su amistad y por el constante intercambio cultural que hemos disfrutado, sobretodo al enseñarme la cultura catalana. En la misma línea, vuelvo a agradecer al Mathias en conjunto con Paulete y Martini. Gracias por nuestro compañerismo y las tantas anécdotas que hemos vivido. Un abrazo muy cálido a todos mis compañeros del “Consulado del Gremio de Barcelona”, especialmente a Marta y Gi, por el haberme acogido en sus casas cuando fue necesario. Agradezco también a Carmina, Cisco, Benjamin por todo lo que compartimos juntos.

Quisiera expresar un fuerte agradecimiento al personal del CCiT-UB, por su grandiosa colaboración en la realización de los experimentos que hicieron posible esta Tesis. Principalmente a la Dra. Asunción Marín (GC-MS, Facultad de Farmacia), a la Dra. Ana Linares (RMN, Facultad de Farmacia), al Dr. Miguel Feliz y a la Dra. Ma. Antonia Molins (RMN, PCB), al Dr. Alberto Adeva y a la Dra. Olga Jáuregui (HPLC-MS, PCB) y a la Dra. Mercè Font-Bardia (Rayos-X, SCT).

Desde mi laboratorio de origen, hago llegar un abrazo de agradecimiento al Dr. Jose Angelo S. Zuanazzi, por todos estos años de investigación. Extiendo la gratitud a todos del laboratorio de Farmacognosia (UFRGS), especialmente a Raquel, Rafaela, Eduardo, Marina, Leticia, Roger y Miriam, quiénes hemos estado más tiempo trabajando juntos. Agradezco también al cuadro docente de la Universidad de Costa Rica (UCR), CIPRONA (UCR) y de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) por haber hecho posible mi estancia allá, colaborando en distintos proyectos de investigación a parte de la experiencia docente. Un agradecimiento especial al Franklin Binns, Jonathan Parra, Juan Araya, Nien Tzu Weng, Roy Pérez y, sobretodo, Don Luis Poveda.

Expreso mi profundo agradecimiento a mi familia por siempre haberme apoyado en la realización de mis sueños, por el amor sin límites y por los valores que me hacen fuerte al caminar por la vida. No hay palabras para describirlo. Simplemente gracias.

En los momentos de mayor dificultad, siempre he tenido la oportunidad de contar con la ayuda incondicional especialmente de dos personas. Xavier Zarza y Marcelino Wagner, al igual que para mi familia, no tengo palabras para describirlo: simplemente les digo ¡GRACIAS!

A todos ustedes que han sido partícipes de que hoy esté aquí... ¡MUCHAS GRACIAS!

Listado de Abreviaciones

AChE	Enzima acetilcolinesterasa
AD	Enfermedad de Alzheimer
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BSTFA	<i>N,O-bis</i> -(trimetilsilil)trifluoroacetamida
Calcd	calculado
CD	Dicroísmo Circular
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
COSY	Correlation spectroscopy (¹ H- ¹ H)
EI	Ionización por impacto de electrones
EIMS	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (¹ H- ¹³ C)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-ESI-MS	Cromatografía líquida de alta resolución – Electrospray – Espectrometría de masas
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución – Electrospray – Espectrometría de masas en tándem
HR-ESI-MS	Espectrometría de Masa – Electrospray – Alta Resolución
HRMS	Espectrometría de Masa de Alta Resolución
HR-QTOF-MS	Espectrometría de Masa – Analizador Cuadrupolo – Analizador de Tiempo de Vuelo – Alta Resolución
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation (¹ H- ¹³ C)
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria de 50%
IR	Infrarrojo
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L-Phe	L-Fenilalanina
L-Tyr	L-Tirosina
Me	Grupo metilo
MeOH	Metanol
MHz	<i>Megahertz</i>
MS	Espectrometría de Masas
MS/MS	Espectrometría de Masas en tándem
MS ⁿ (n = 2,3 o 4)	Espectros de orden “n”
<i>m/z</i>	masa/carga
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexano
NH ₃	Amoníaco
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
N,S,E,O	Norte, Sur, Este, Oeste
OH	Grupo hidroxilo
OMe	Grupo metoxilo
PAL	Fenilalanina amonio liasa
p.e.	por ejemplo
rDA	Retro-Diels-Alder
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
1D-RMN	Resonancia Magnética Nuclear monodimensional
2D-RMN	Resonancia Magnética Nuclear bidimensional
sp	especies
TMS	Tetrametilsilano
TIC	<i>Total Ion Current</i>
TLC	Cromatografía de capa fina
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
VLC	Cromatografía líquida en vacío
α[D]	Rotación óptica
δ	Desplazamiento químico

"Seja quem você for, seja qualquer posição que você tenha na vida, de nível altíssimo ou mais baixo social, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna da Silva (1960 – 1994)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La farmacognosia y el desarrollo de fármacos.....	3
1.2. Las Amaryllidaceae: distribución, géneros y especies	4
1.3. Alcaloides de las Amaryllidaceae	7
1.3.1. Biosíntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae: precursor norbelladina.....	7
1.3.2. Esqueletos tipo: clasificación y numeración	9
1.3.3. Biogénesis de los esqueletos tipo	11
1.3.3.1. <i>Acoplamiento fenol-oxidativo orto-para'</i>	11
1.3.3.2. <i>Acoplamiento fenol-oxidativo para-para'</i>	13
1.3.3.3. <i>Acoplamiento fenol-oxidativo para-orto'</i>	14
1.3.4. Importancia quimiotaxonómica de los alcaloides de las Amaryllidaceae y excepciones a la regla	15
1.3.5. Nuevos subgrupos.....	16
1.4. GC-MS y RMN en el estudio de alcaloides de Amaryllidaceae.....	17
1.4.1. Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (GC-MS).....	18
1.4.1.1. <i>Tipo licorina</i>	19
1.4.1.2. <i>Tipo homolicorina</i>	20
1.4.1.3. <i>Tipos crinina y hemantamina</i>	21
1.4.1.4. <i>Tipo tazetina</i>	23
1.4.1.5. <i>Tipo montanina</i>	24
1.4.1.6. <i>Tipo galantamina</i>	25
1.4.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN): consideraciones generales.....	26
1.4.3. Características del espectro ¹ H-RMN de los alcaloides de Amaryllidaceae	27
1.4.3.1. <i>Tipo licorina</i>	27
1.4.3.2. <i>Tipo homolicorina</i>	27
1.4.3.3. <i>Tipos crinina y hemantamina</i>	28
1.4.3.4. <i>Tipo tazetina</i>	29

1.4.3.5. Tipo narciclasina	29
1.4.3.6. Tipo montanina	29
1.4.3.7. Tipo galantamina	29
1.4.4. Características del espectro ¹³ C-RMN de los alcaloides de Amaryllidaceae	30
1.4.5. Experimentos bidimensionales: consideraciones generales.....	30
1.5. Actividad biológica	31
1.5.1. Usos tradicionales	31
1.5.2. Actividades biológicas de los diferentes esqueletos tipo.....	33
1.5.2.1. Licorina	33
1.5.2.2. Homolicorina	35
1.5.2.3. Crinina	35
1.5.2.4. Hemantamina.....	36
1.5.2.5. Tazetina	36
1.5.2.6. Montanina	37
1.5.2.7. Narciclasina	37
1.5.2.8. Galantamina.....	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivos	43
2.2. Objectives	44
3. RESULTADOS.....	45
3.1. Resultados: consideraciones generales.....	47
3.2. Artículo 1 – Alkaloids from <i>Hippeastrum papilio</i>	49
3.3. Artículo 2 - Bioactive alkaloids from <i>Narcissus broussonetii</i> : mass spectral studies	59
3.4. Artículo 3 - Crinine-type alkaloids from <i>Hippeastrum aulicum</i> and <i>H. calyptratum</i>	75
4. DISCUSIÓN.....	85
4.1. Discusión: consideraciones generales.....	87
4.2. Alcaloides de <i>Hippeastrum papilio</i>	88

4.2.1. 11 β -Hidroxigalantamina.....	89
4.2.2. Otros alcaloides identificados	90
4.2.3. Actividad de inhibición del enzima acetilcolinesterasa.....	90
4.3. Extractos de alcaloides bioactivos de <i>Narcissus broussonetii</i> : estudios de espectrometría de masas.....	92
4.3.1. HPLC-ESI-MS/MS de obliquina y plicamina	93
4.3.2. HPLC-ESI-MS/MS de secoplicamina	97
4.3.3. Tazetina y Pretazetina	98
4.3.4. Total de alcaloides identificados	100
4.4. Alcaloides del tipo crinina de <i>Hippeastrum aulicum</i> y <i>H. calyptratum</i>	101
4.4.1. Aulicina	101
4.4.2. 3-O-Metil-epimacowina	102
4.4.3. 11-Oxohemantamina.....	102
4.4.4. 7-Metoxi-O-metillicorenina.....	103
4.4.5. Nerinina	103
4.4.6. Albomaculina.....	104
4.4.7. Consideraciones finales.....	104
5. CONCLUSIONES	107
5.1. Conclusiones.....	109
5.2. Conclusions.....	111
6. BIBLIOGRAFÍA	113
7. ANEXOS.....	127
7.1. Anexo I: Artículo de Revisión - Alkaloids from the <i>Hippeastrum</i> genus: chemistry and biological activity.....	129
7.2. Anexo II – Tablas de RMN y principales espectros.....	147
7.2.1. 11 β -Hidroxigalantamina.....	147
7.2.2. Aulicina	151
7.2.3. 3-O-Metil-epimacowina	156

7.2.4. 11-Oxohemantamina.....	160
7.2.5. 7-Metoxi-O-metillicorenina.....	163
7.2.6. Nerinina	167
7.2.7. Albomaculina.....	171

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La farmacognosia y el desarrollo de fármacos

Los productos de origen natural siguen siendo la principal fuente de inspiración para la obtención de una gran mayoría de los fármacos aprobados para uso clínico. El uso tradicional de las plantas como remedios para curar las enfermedades forma parte de la historia y de la evolución de la propia humanidad. Dicha tradición en valores numéricos se hace patente a través de la cuantificación de los fármacos disponibles actualmente en clínica, especialmente los antitumorales y los antimicrobianos. Considerando todos los agentes terapéuticos aprobados para uso clínico en el intervalo 1981-2010, el porcentaje de medicamentos cuyo origen procede directa o indirectamente (tras una modificación estructural) de los productos naturales se encuentra alrededor del 50%, contabilizando vacunas y derivados biológicos, y del 65% si excluimos a ambos. En este porcentaje también se incluyen las moléculas sintéticas inspiradas en productos naturales que presentan el mismo farmacóforo o cuya síntesis es mimética a la del producto natural. Un caso especialmente remarcable son los fármacos antitumorales; en el intervalo 1940-2010, los productos naturales y sus derivados semisintéticos constituyeron alrededor del 75% de los fármacos aprobados (Balunas y Kinghorn, 2005; Newman y Cragg, 2007; 2012).

Entre los recursos naturales disponibles, los vegetales representan una fuente importante de moléculas de estructuras complejas. Tanto es así, que las plantas pueden ser vistas como verdaderos laboratorios naturales que sintetizan compuestos útiles para su protección, adaptación y dispersión en el medio ambiente. El conocimiento de los recursos naturales es esencial para el desarrollo de nuevos fármacos, lo que resulta fundamental para nuestra propia supervivencia y, además, permite promover la conservación de las especies productoras (Lubbe y Verpoorte, 2011).

Junto al estudio de los recursos naturales, el creciente desarrollo de la química combinatoria, la genómica y los ensayos basados en “high-throughput screening” (HTS), la investigación en este campo tiene un importante aliado para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Una tendencia que sigue observándose, ya

mencionada en revisiones anteriores (Newman y Cragg, 2007), es la creación de librerías de compuestos para unas determinadas dianas lo que da lugar a bases de datos más pequeñas pero, a su vez, más específicas. El estudio y conocimiento de los procesos metabólicos tanto de plantas como de microorganismos para llevar a cabo la biosíntesis de dichas moléculas favorece también la síntesis mimética que dará lugar a la obtención de estructuras potencialmente candidatas para una determinada acción biológica (Furst y Stephenson, 2011; Jones *et al.*, 2011). De esta manera, tanto los propios productos naturales como los procesos biosintéticos que los generan siguen jugando un importante papel en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

1.2. Las Amaryllidaceae: distribución, géneros y especies

Las Amaryllidaceae constituyen una gran familia de plantas (clado Monocotiledóneas, orden Asparagales) de gran importancia en horticultura; a ésta pertenecen los narcisos (género *Narcissus*), las campanillas de invierno (género *Galanthus*), y diversas plantas denominadas comúnmente lirios (géneros *Hippeastrum*, *Amaryllis*, *Rhodophiala*) (Heywood, 1985) entre los más conocidos. Según la última actualización y clasificación del *Angiosperm Phylogeny Group* (APG), apoyada por estudios de biología molecular y taxonómicos (Meerow *et al.*, 1999; Meerow y Snijman, 2006), la familia Amaryllidaceae J.St.-Hil. está integrada por tres subfamilias: Agapanthoideae, Allioideae y Amaryllidoideae (Chase *et al.*, 2009; APG III, 2009). Dichas subfamilias habían sido consideradas previamente como familias: Agapanthaceae, Alliaceae y Amaryllidaceae, respectivamente. Es importante recalcar que pueden producirse malentendidos a raíz de la utilización de ambas nomenclaturas en paralelo y la presencia o no de alcaloides. Con la finalidad de precisar la terminología, hablaremos de la subfamilia Amaryllidoideae mientras que la denominación general de *alcaloides de las Amaryllidaceae* se corresponderá, única y exclusivamente, con aquellos alcaloides sintetizados por esta subfamilia.

Las especies de la subfamilia Amaryllidoideae se distribuyen preferentemente en regiones tropicales y subtropicales, pero también en zonas templadas, siendo uno de sus rasgos distintivos la gran capacidad de adaptación. Podemos encontrar especies de esta subfamilia en zonas montañosas del trópico como p.e. en la cordillera andina, en ecosistemas de clima templado de Europa, Asia Menor y Central, y Oceanía (Heywood,

1985; Meerow y Snijman, 1998); se adaptan a condiciones extremadamente áridas, donde los bulbos pueden permanecer latentes por periodos prolongados (géneros *Leptochiton*, *Paramongaia*); varios géneros están adaptados a los bosques húmedos neotropicales e incluso a ambientes acuáticos (*Hippeastrum angustifolium* y especies del género *Hymenocallis*) (Meerow y Snijman, 1998); algunas especies del género *Crinum* pueden formar extensas poblaciones en lechos de los ríos africanos (p.e. *Crinum calamistratum*); otras especies son de gran importancia ecológica, como las pertenecientes a los géneros *Amaryllis* y *Hessea* en el *fynbos* sudafricano o el género *Cyrtanthus* en la sabana africana. En su conjunto, la subfamilia Amaryllidoideae comprende alrededor de 54 géneros y unas 796 especies. Si consideramos toda la familia Amaryllidaceae, con las subfamilias Allioideae y Agapanthoideae, los valores alcanzan los 73 géneros y aproximadamente 1600 especies (Dutilh *et al.*, 2013; Dutilh, J.H., *comunicación personal*, Campinas, São Paulo, Brasil, 2014).

Los estudios filogenéticos de la subfamilia Amaryllidoideae proponen como origen probable de su aparición el antiguo bloque continental denominado *Gondwana*, de la porción más meridional de la *Pangea*. Los cambios climáticos y geológicos en el sur de África y América fueron determinantes para su diseminación, y ambos continentes se consideran actualmente como los centros de máxima diversificación primaria y secundaria, respectivamente, de esta subfamilia (Ito *et al.*, 1999; Meerow y Snijman, 1998).

Se conocen numerosos endemismos neotropicales y, de todos ellos, se pueden mencionar como más importantes los géneros *Hippeastrum* (con unas 70 sp), *Hymenocallis* (con cerca de 50 sp), *Zephyranthes* (alrededor de 50 sp) y *Clinanthus* (30 sp aproximadamente) (Judd *et al.*, 1999; Meerow, 2004). El género *Narcissus*, con endemismos en Europa meridional, Norte de África y Asia Menor, es el más numeroso, con alrededor de un centenar de especies (Bastida *et al.*, 2006), sin olvidar también que su uso en horticultura ha propiciado la creación de un gran número de híbridos (Meerow y Snijman, 1998). El género *Lycoris*, de origen asiático, China Central, Corea y Japón, está representado por una veintena de especies. Los géneros *Crinum*, *Cyrtanthus* y *Gethyllis* con unas 65, 50 y 32 especies, respectivamente, son los géneros de origen africano más numerosos, especialmente en la zona meridional (Meerow y Snijman, 1998). *Crinum* es el único género pantropical con endemismos en los 3

continentes: América, África y Asia (Meerow, 2004). Una relación de las tribus, sus respectivos géneros y su área de distribución puede consultarse en la Tabla 1.1, de acuerdo a la revisión realizada por Meerow y Snijman (1998).

Tabla 1.1: Géneros de la subfamilia Amaryllidoideae, adaptado de Meerow y Snijman (1998).

Tribu	Género	Nº aproximado de especies - Localización
Amaryllideae	<i>Amaryllis</i> L.	1 – Sudáfrica
	<i>Ammocharis</i> Herb	5 – África subsahariana
	<i>Boophane</i> Herb.	2 – África subsahariana
	<i>Brunsvigia</i> Heist.	20 – Sudáfrica
	<i>Carpolyza</i> Salisb.	1 – Sudáfrica
	<i>Crinum</i> L.	65 – Pantropical, mayoría África subsahariana
	<i>Crossyne</i> Salisb.	2 – Sudáfrica
	<i>Cybistetes</i> Milne-Redh. & Schweick	1 – Sudáfrica
	<i>Hessea</i> Herb.	13 – Sudáfrica
	<i>Nerine</i> Herb.	23 – Sudáfrica
	<i>Strumaria</i> Jacq.	23 – Sudáfrica
Calostemmateae	<i>Calostemma</i> R. Br.	2 – Australia
Cyrtantheae	<i>Cyrtanthus</i> Aiton	50 – África subsahariana
Eucharideae	<i>Caliphruria</i> Herb.	4 – Andes Colombia y Perú
	<i>Eucharis</i> Planchon & Linden	17 – Centroamérica hasta Bolivia
	<i>Plagillirion</i> Baker	1 - Colombia
	<i>Urceolina</i> Reichb., nom. cons.	5-7 – Perú
Eustephieae	<i>Chlidanthus</i> Herb.	6 – Perú, Bolivia hasta Argentina
	<i>Eustephia</i> Cav.	4 – S de Perú hasta Bolivia
	<i>Hieronymiella</i> Pax	4-6 – Argentina y Bolivia
Galantheae	<i>Galanthus</i> L.	19 – Europa, Asia Menor y Cáucaso
	<i>Hannonia</i> Braun-Blanq. & Maire	1 – Marruecos
	<i>Lapiedra</i> Lag.	1 – España y Marruecos
	<i>Leucojum</i> L.	10-11 – Mediterráneo, N de África hasta Armenia
Gethyllideae	<i>Apodolirion</i> Baker	6 – Sudáfrica
	<i>Gethyllis</i> L.	32 – Sudáfrica
	<i>Proiphys</i> Herb.	2-3 – Malasia, Filipinas y Australia
Haemantheae	<i>Clivia</i> Lindl.	4 – Sudáfrica
	<i>Cryptostephanus</i> Welw. Ex Baker	5 – África tropical
	<i>Haemanthus</i> L.	22 – Sudáfrica
	<i>Scadoxus</i> Raf.	9 – África subsahariana
Hippeastreae	<i>Griffinia</i> Ker Gawler	15-20 – Mata Atlántica (Brasil)
	<i>Habranthus</i> Herb.	30-40 – SE de EEUU hasta Argentina
	<i>Hippeastrum</i> Herb.	70 – México hasta Argentina, Este Brasileño y Andes
	<i>Phycella</i> Lindley	6 – Chile, Argentina y Uruguay
	<i>Placea</i> Miers ex Lindley	6 – Chile
	<i>Pyrolirion</i> Herb.	5-10 – Perú y Bolivia
	<i>Rhodophiala</i> Presl	30 – Chile, Bolivia, Argentina, Uruguay y Brasil
	<i>Sprekelia</i> Heist.	1-2 – México
	<i>Traubia</i> Moldenke	1 – Chile
	<i>Worsleya</i> Traub	1 – Río de Janeiro, Brasil
Hymenocallideae	<i>Zephyranthes</i> Herb.	50 – SE de EEUU hasta Argentina
	<i>Hymenocallis</i> Salisb.	50 – S de EEUU hasta Colombia
	<i>Ismene</i> Salisb.	10-15 – Andes Ecuador hasta Bolivia
Lycorideae	<i>Leptochiton</i> Sealy	2-3 – Ecuador y Perú
	<i>Lycoris</i> Herb.	20 – China Central, Corea y Japón
Narcisseae	<i>Ungernia</i> Bunge	6 – Turkestán
	<i>Narcissus</i> L.	100 – Europa, N de África y Asia occidental
	<i>Sternbergia</i> Walst. & Kit.	7-8 – Mediterráneo, Asia Menor, Cáucaso e Irán
Pancratieae	<i>Pancratium</i> L.	20 – Mediterráneo, S de Asia y África subsahariana
	<i>Vagaría</i> Herb.	1-2 – Mediterráneo
Stenomessaeae	<i>Eucrosia</i> Ker Gawler	7 – O de Ecuador y Perú
	<i>Mathieua</i> Klotzsch	1 – Perú
	<i>Pamianthe</i> Stapf	2 – Perú, Ecuador y Bolivia
	<i>Paramongaia</i> Velarde	1 – Andes de Perú y Bolivia
	<i>Phaedranassa</i> Herb.	9 – Ecuador, Colombia y Costa Rica
	<i>Pucara</i> Ravenna	1 – Perú
	<i>Rauhia</i> Traub	2-3 – Valles de ríos Marañón y Uicumbamba, Perú
<i>Stenomesson</i> Herb.	35-40 – Andes, NE de Chile y Perú	

En una reciente revisión de las especies de la subfamilia Amaryllidoideae distribuidas en Brasil, se han contabilizado 134 especies, de las cuales alrededor de 75 son endemismos. Dicha revisión se ha centrado en el potencial de riesgo de extinción de las mismas. *Hippeastrum papilio*, por ejemplo, se ha catalogado en peligro crítico, debido a la observación de una reducción de la población de casi el 80% a lo largo de 10 años o de 3 generaciones (Dutilh *et al.*, 2013).

1.3. Alcaloides de las Amaryllidaceae

Tal como se ha citado en la sección anterior, una de las particularidades más destacables de las plantas pertenecientes a lo que actualmente se considera la subfamilia Amaryllidoideae, es la presencia de un grupo de alcaloides exclusivos, con un amplio rango de actividades biológicas, que se conocen comúnmente como alcaloides de Amaryllidaceae.

1.3.1. Biosíntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae: precursor norbelladina

Ya en los años 50, la estructura peculiar de estos alcaloides hizo que se llevaran a cabo los primeros estudios de su proceso biosintético. Utilizando precursores marcados, se pudo demostrar que dichos alcaloides derivan del metabolismo de los aminoácidos L-Phe y L-Tyr. En 1957, Barton y Cohen postularon que su biosíntesis se llevaba a cabo vía un precursor común, la norbelladina, intermediario con una estructura química base $C_6-C_1-N-C_2-C_6$ que representa la transición entre el metabolismo primario y secundario (Figura 1.1).

Una vez formado el intermediario clave, éste es convenientemente metilado para orientar el posterior acoplamiento fenol-oxidativo. A partir de este compuesto se obtendrán los diferentes esqueletos tipo mediante procesos de ciclación secundaria y diversificación. Estudios en torno a la biosíntesis de estos compuestos (Battersby y Binks, 1960; Battersby *et al.*, 1961; Barton y Kirby, 1962; Jeffs, 1962; Suhadolnik *et al.*, 1962; Barton *et al.*, 1963; Wightman *et al.*, 1972) confirmaron y añadieron detalles en relación a los primeros postulados (Barton y Cohen, 1957).

La L-Phe es el precursor primario del fragmento C_6-C_1 (anillo aromático A y carbono de la posición bencílica 6), mientras que la L-Tyr es el precursor del fragmento C_6-C_2-N (que incluye el anillo C y los carbonos de las posiciones 11 y 12). Aunque

ambos aminoácidos están estructuralmente relacionados, se forman de manera independiente a partir del prefenato y no son interconvertibles en las plantas. La formación de la unidad C₆-C₁ a partir de L-Phe implica la desaminación y pérdida de dos átomos de carbono de la cadena lateral, además de la introducción de dos sustituyentes oxigenados en el anillo aromático (este último paso *via* ácidos cinámicos). La desaminación oxidativa se realiza gracias al enzima PAL (Figura 1.1). Luego, estos derivados sufren una β -oxidación obteniéndose, preferentemente, el aldehído protocatéquico. La actividad del enzima PAL sería uno de los pasos claves de la utilización de L-Phe a partir del *pool* de aminoácidos para la formación de metabolitos secundarios (Wightman *et al.*, 1972; Bastida *et al.*, 2011).

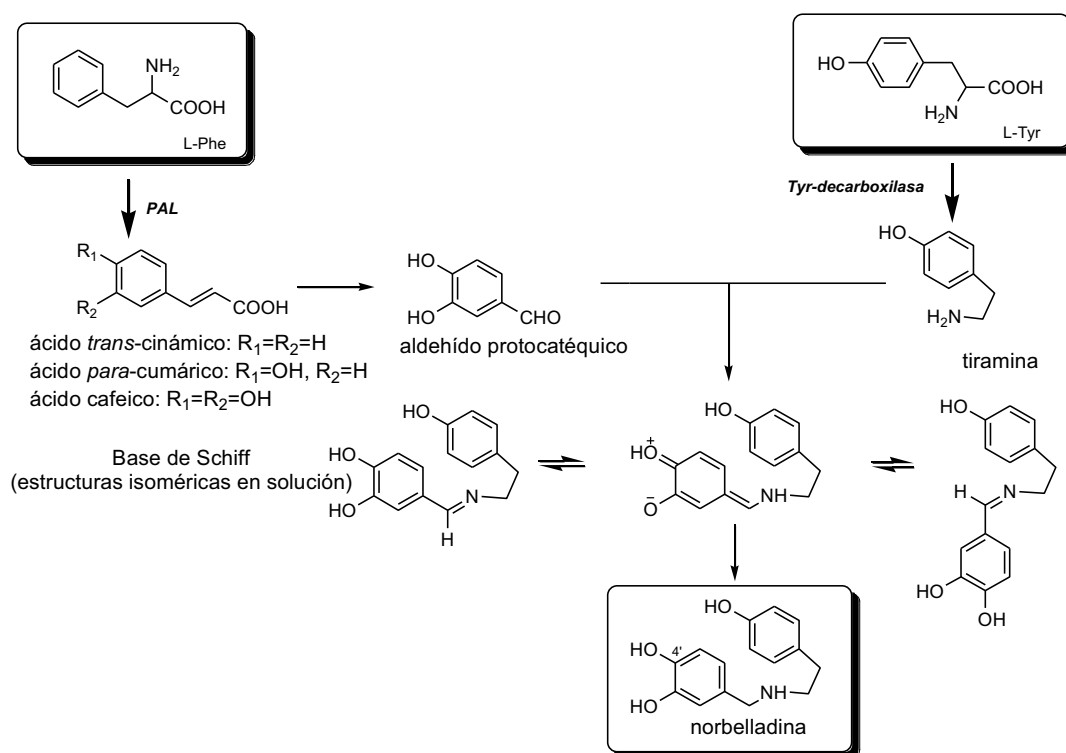


Figura 1.1: Biosíntesis del precursor norbelladina.

La L-Tyr, por su parte, se incorpora como tiramina tras sufrir una decarboxilación mediada por el enzima Tyr-decarboxilasa. La condensación del aldehído protocatéquico y la tiramina da lugar a una base de Schiff. Hasta el momento, dos de estas bases han sido aisladas del género *Crinum*: craugsodina y isocraugsodina (Ghosal *et al.*, 1986; 1988a) lo que confirmaría la biosíntesis propuesta por Barton y Cohen. La reducción a norbelladina es seguida por una metilación en la posición 4' dando lugar a

O-metilnorbelleadina, metilación que dirige las diferentes posibilidades de acoplamiento fenol-oxidativo: *orto-para'* (*o-p'*), que da lugar a los esqueletos tipo licorina y homolicorina; *para-para'* (*p-p'*), que origina los esqueletos tipo crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina y montanina; y, *para-orto'* (*p-o'*), que da lugar al esqueleto tipo galantamina (Figura 1.2).

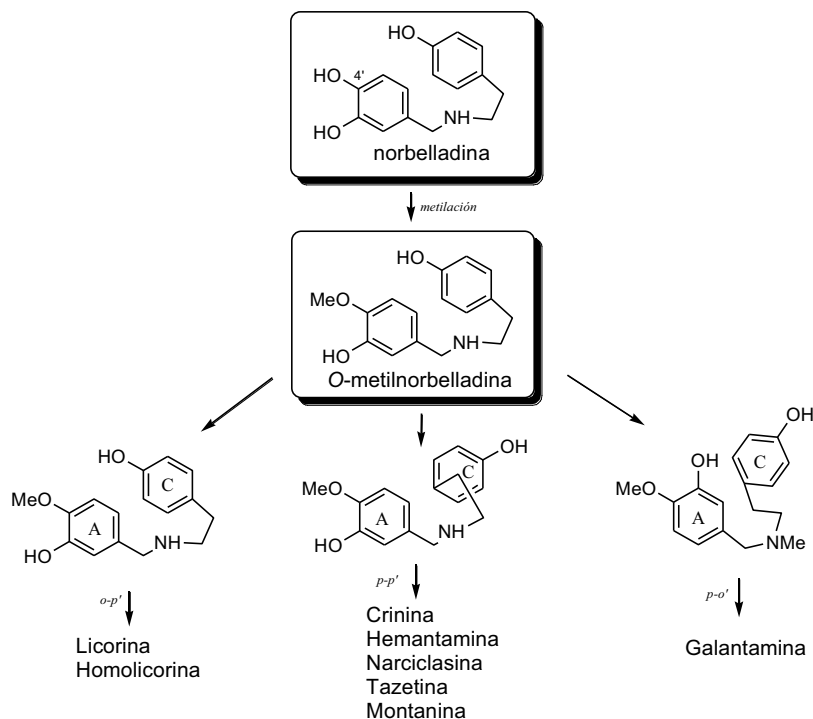


Figura 1.2: Acoplamiento fenol-oxidativo en los distintos alcaloides de las Amaryllidaceae.

1.3.2. Esqueletos tipo: clasificación y numeración

La diversidad estructural de los alcaloides de las Amaryllidaceae dificultaba la numeración de los esqueletos tipo para su estudio comparativo. Ghosal *et al.* (1985a), propusieron un sistema de numeración que, si bien en la mayoría de casos no sigue las reglas de la IUPAC, facilita el estudio comparado de las diferentes estructuras (Tabla 1.2):

- I. El anillo aromático que proviene de la L-Phe constituye el anillo A y posee siempre la misma numeración, independiente del esqueleto tipo. Apenas en los alcaloides del tipo norbelladina, se utiliza la notación (') para hacer referencia a ello.

- II. El anillo que proviene de la L-Tyr da lugar al anillo C y su numeración se lleva a cabo en el sentido de las agujas del reloj, excepto para los alcaloides de tipo homolicorina por razones biosintéticas.
- III. La posición bencílica, en α con respecto al heteroátomo, es siempre la posición 6 y la posición libre más próxima al N en el anillo pirrolidínico, es decir, no comprometida con los anillos B o C, es siempre la posición 12.

Tabla 1.2: Esqueletos tipo y su numeración.

Grupo estructural	Esqueleto	Relación de los anillos	Estructura y numeración
<i>N</i> -bencil- <i>N</i> -feniletilamina	<i>norbelladina</i>		
pirrolo[<i>d,e</i>]fenantridina	<i>licorina</i>		
2-benzopirano[3,4- <i>g</i>]indol	<i>homolicorina</i>		
5,10 <i>b</i> -etanofenantridina (<i>crinano</i>)	<i>crinina</i> (puente en β)		
	<i>hemantamina</i> (puente en α)		
<i>fenantridina</i>	<i>narciclasina</i>		
2-benzopirano[3,4- <i>c</i>]indol	<i>tazetina</i>		
5,11-metanomorfantridina	<i>montanina</i>		
<i>dibenzofurano</i>	<i>galantamina</i>		

1.3.3. Biogénesis de los esqueletos tipo

El estudio de la biogénesis de los alcaloides de Amaryllidaceae se realizó mediante la utilización de aminoácidos e intermediarios marcados, prioritariamente en cultivares del género *Narcissus*. A continuación se presenta el origen de los ocho esqueletos tipo a partir de los distintos acoplamientos fenol-oxidativo.

1.3.3.1. Acoplamiento fenol-oxidativo orto-para'

El estudio de los mecanismos de hidroxilación en plantas superiores fue determinante para el entendimiento de la biosíntesis de norpluviína a partir del precursor *O*-metilnorbelladina (Bastida *et al.*, 2006; 2011), sobretodo en la formación de oxo-intermediarios. En la síntesis de licorina y derivados, utilizando L-Tyr marcada, se confirmó la formación de un intermediario epóxido, con inversión de configuración, para dar lugar al alcaloide licorina, hidroxilado en la posición 2β (Figura 1.3).

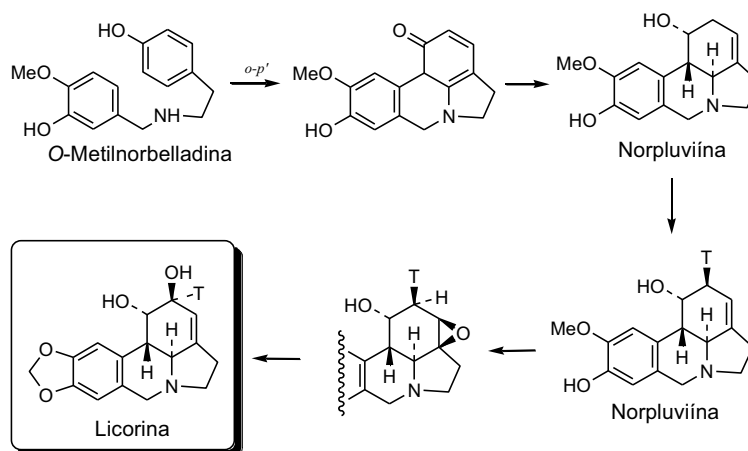


Figura 1.3: Biogénesis del esqueleto tipo licorina.

En la biosíntesis de derivados de narcisidina, la metilación de norpluviína da lugar a pluviína (Harken *et al.*, 1976), que sufre una hidroxilación a través de un mecanismo de inversión de configuración similar al observado en la biosíntesis de licorina. La metilación del hidroxilo de la posición 2 da lugar a galantina (Kirby y Tiwari, 1966; Bastida *et al.*, 2006). Desde el principio se postulaba la formación de un intermediario epóxido para la biosíntesis de narcisidina y de sus derivados, a partir de galantina. El

aislamiento del alcaloide incartina de *Lycoris incarnata* (Kihara *et al.*, 1992) y *Galanthus elwesii* (Berkov *et al.*, 2007) sustenta esta hipótesis (Figura 1.4).

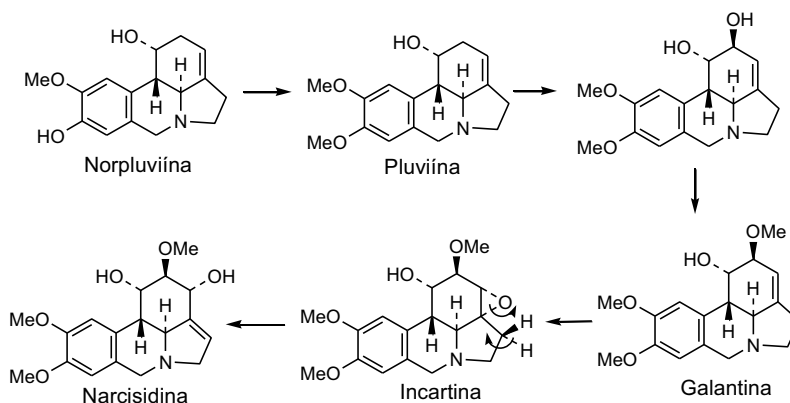


Figura 1.4: Biogénesis de narcisidina *via* incartina.

Finalmente, el esqueleto tipo homolicorina se forma tras una oxidación en la posición 6 de la norpluviina, seguido por la rotura del enlace C-6/N, y un giro de 180°. La formación del hemiacetal, combinada con la metilación del hidroxilo aromático de la posición 8 y del nitrógeno, da lugar al alcaloide licorenina, que posteriormente, por oxidación de la posición 6, se transforma en homolicorina (Bowman *et al.*, 1969; Harken *et al.*, 1976) (Figura 1.5).

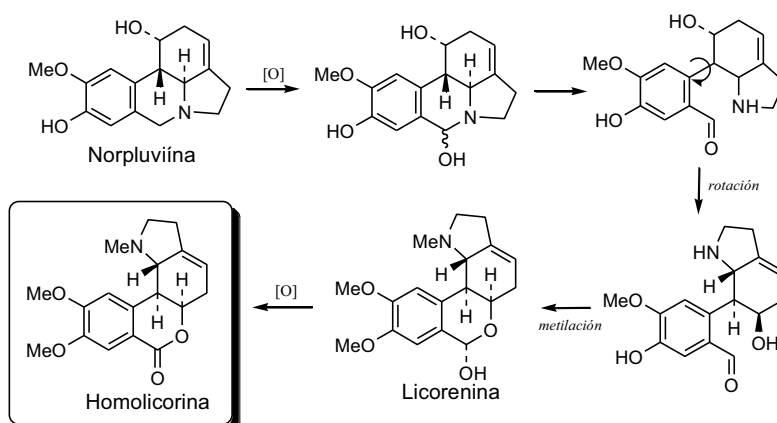


Figura 1.5: Biogénesis del esqueleto tipo homolicorina.

1.3.3.2. Acoplamiento fenol-oxidativo *para-para'*

El alcaloide hemantamina ha sido el compuesto más estudiado de los alcaloides obtenidos mediante el acoplamiento fenol-oxidativo *para-para'*. Utilizando precursores marcados, pudo concluirse que las dos series enantioméricas en relación al puente 5,10b-etano (crinina y hemantamina) no son intercambiables, sintetizándose de manera independiente (Figura 1.6) (Bastida *et al.*, 2006; 2011).

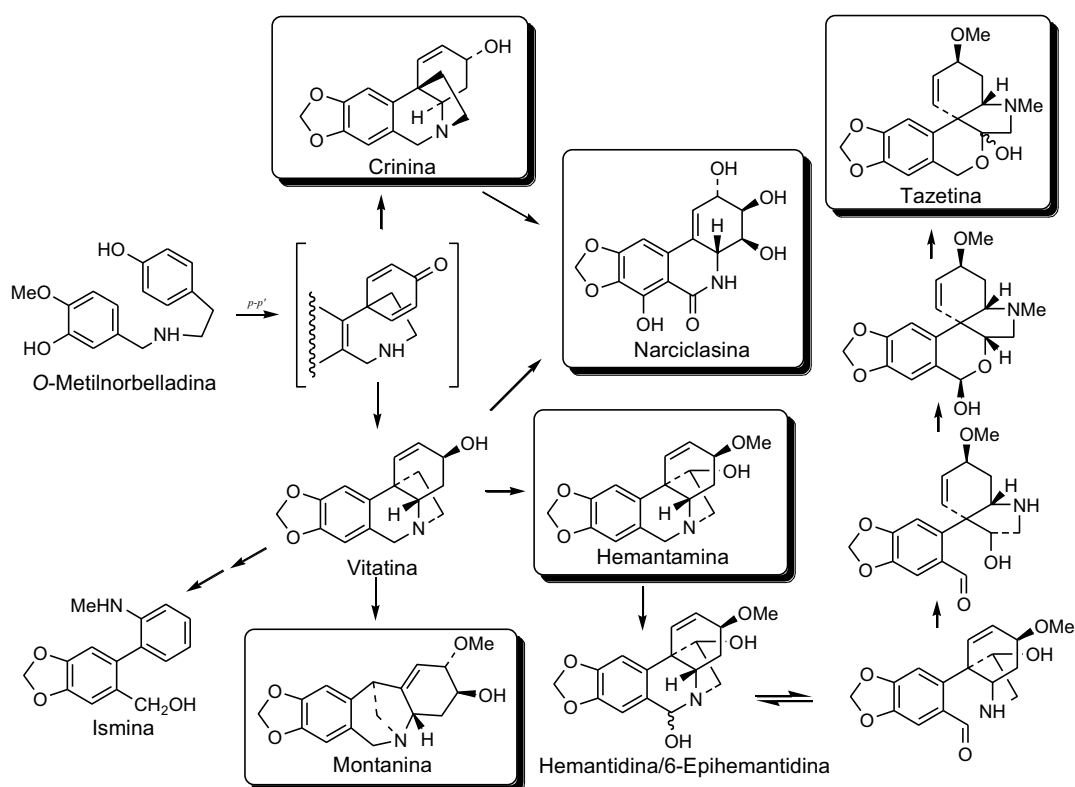


Figura 1.6: Biogénesis de los alcaloides procedentes del acoplamiento fenol-oxidativo *para-para'*.

Siguiendo la biogénesis, la oxidación bencílica da lugar a la formación de los dos epímeros del alcaloide hemantidina que son intercambiables entre sí y de difícil separación. Tras estudios de biosíntesis en *Sprekelia formosissima*, se observó que la conversión del esqueleto 5,10b-etanofenantridina a 2-benzopirano[3,4-c]indol se lleva a cabo por la ruta hemantamina → hemantidina/6-epihemantidina → pretazetina, de manera irreversible (Wildman y Bailey, 1969).

Los estudios de retención de tritio a partir del precursor *O*-metilnorbelladina demostraron que los alcaloides del tipo narciclasina provienen del esqueleto crinano

(Fuganti y Mazza, 1971, 1972). Por otra parte, tras los estudios de marcaje realizados en *Haemanthus coccineus* y *Rhodophiala bifida*, se concluyó que montanina proviene de la serie hemantamina (Fuganti y Mazza, 1972; Feinstein y Wildman, 1976) (Figura 1.6).

1.3.3.3. Acoplamiento fenol-oxidativo *para-orto'*

Las primeras hipótesis sobre la biosíntesis de galantamina y sus derivados postulaban que la misma transcurría a partir del precursor *N,O*-dimetilnorbelladina, en lugar de *O*-metilnorbelladina. Sin embargo, a finales de los años 90, en un estudio utilizando *Leucojum aestivum*, se observó que la biosíntesis de galantamina se desarrollaba *via* acoplamiento fenol-oxidativo *para-orto'* en *O*-metilnorbelladina, dando lugar a una dienona. Dicho intermediario, de manera espontánea, se convierte en *N*-demetilnarwedina la cual, tras la reducción de la cetona a hidroxilo, da lugar a *N*-demetilgalantamina. Este estudio confirmó que la *N*-metilación ocurre al final de la ruta biosintética y que narwedina no es el precursor directo de galantamina, sino que ambos pueden coexistir en un cierto equilibrio (Figura 1.7) (Eichhorn *et al.*, 1998; Bastida *et al.*, 2006; 2011).

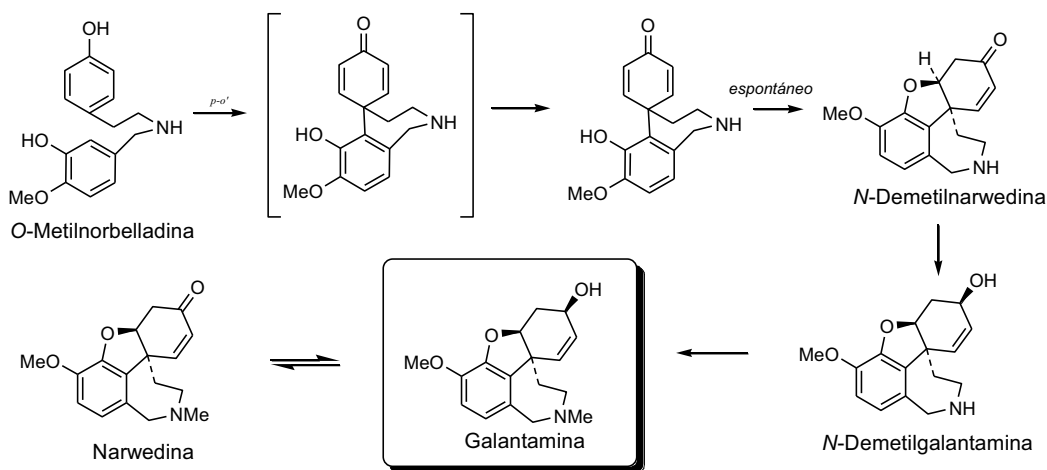


Figura 1.7: Biogénesis del esqueleto tipo galantamina.

1.3.4. Importancia quimiotaxonómica de los alcaloides de las Amaryllidaceae y excepciones a la regla

La familia botánica Amaryllidaceae (subfamilia Amaryllidoideae) está considerada como una de las veinte familias más importantes en relación a su contenido en alcaloides, habiéndose caracterizado hasta el momento más de 400 compuestos (Jin, 2009). Como ya se ha mencionado, su biosíntesis es específica, razón por la cual se encuentran casi exclusivamente en estas especies, lo que les confiere un importante valor quimiotaxonómico. Sin embargo, existen algunas excepciones, tanto de alcaloides típicos de otras familias hallados en Amaryllidaceae, como de alcaloides de Amaryllidaceae aislados a partir de especies de otras familias.

Alcaloides del tipo mesembrano (*Scelletium*), que generalmente están presentes en la familia Aizoaceae, se han aislado en algunas especies de la subfamilia Amaryllidoideae. Entre ellos podemos citar el mesembrenol, obtenido en *Crinum oliganthum* (Döpke *et al.*, 1981) y la mesembrenona, aislada y caracterizada de la especie *Narcissus pallidulus* (Bastida *et al.*, 1989). Recientemente, se han aislado e identificado por GC-MS numerosos alcaloides del tipo mesembrano en especies de *Narcissus* de la sección Ganymedes, entre los cuales podemos destacar los alcaloides 6-epimesembrenol, 4'-*O*-demetilmesembrenona y 6-epimesembranol (Pigni *et al.*, 2013). Asimismo, los alcaloides capnoidina y bulbocapnina, típicos de las familias Fumaraceae, Lauraceae y Papaveraceae, han sido aislados de la especie *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus* (Kaya *et al.*, 2004) (Figura 1.8).

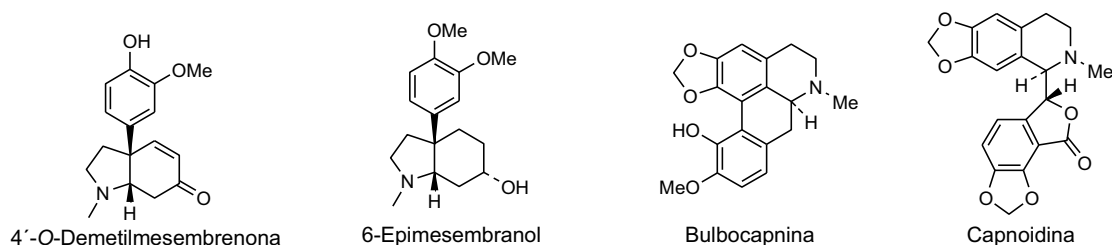


Figura 1.8: Ejemplos de alcaloides típicos de otras familias determinados en especies de Amaryllidaceae.

En el sentido contrario, se han descrito dos casos de aislamiento y caracterización de alcaloides típicos de las Amaryllidaceae en otras familias de plantas.

Así, el alcaloide crinamina, aislado de *Dioscorea dregeana*, constituye el primer alcaloide de las Amaryllidaceae reportado en otra familia botánica, la familia Dioscoreaceae (Mulholland *et al.*, 2002). Recientemente, se han identificado algunos alcaloides del esqueleto homolicorina y narciclasina en la especie *Hosta plantaginea* (Asparagaceae) (Wang *et al.*, 2007). No obstante, a falta de una confirmación definitiva de estos resultados, y en términos relativos, el número de excepciones es poco significativo, hecho que permite utilizar dichos metabolitos secundarios como una herramienta de gran interés en los estudios quimiotaxonómicos de la familia Amaryllidaceae (subfamilia Amaryllidoideae).

1.3.5. Nuevos subgrupos

Aunque la gran mayoría de los alcaloides hallados en la subfamilia Amaryllidoideae puedan ser catalogados en uno de los nueve esqueletos tipo comentados hasta ahora, se han descrito algunas estructuras que pueden ser representativas de nuevos subgrupos. Los derivados de plicamina, aislados de los géneros *Galanthus* (Ünver *et al.*, 1999), *Cyrtanthus* (Brine *et al.*, 2002) y, más recientemente, en *Narcissus* (de Andrade *et al.*, 2012a), han sido propuestos como un nuevo esqueleto tipo dentro de los alcaloides de esta familia (Ünver, 2007). Sin embargo, su similitud con el esqueleto de la tazetina debe ser considerada.

Otro caso lo constituye el grupo de alcaloides encabezado por el galantindol. Dicho compuesto, aislado inicialmente de *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus*, se ha descrito como representante de un nuevo subgrupo que presentaría un anillo indólico no fusionado (Ünver *et al.*, 2003; Ünver, 2007). Sin embargo, la apertura del anillo B de los alcaloides tipo homolicorina o tazetina podría igualmente originar dicho alcaloide. Licosinina A y derivados (Yang *et al.*, 2005) podrían tener igualmente el mismo origen. De hecho, ambas estructuras se asemejan mucho a ismina (Suau *et al.*, 1990), considerada como uno de los productos del catabolismo de dichos alcaloides (Bastida *et al.*, 2006).

Posiblemente, los derivados de gracilina, augustamina y cherillina representan las estructuras más diferenciadas dentro de los nueve esqueletos tipo clásicos. Cherillina es un alcaloide fenólico inusual, aislado por primera vez a partir de *Crinum powellii* (Brossi *et al.*, 1970). Augustamina fue descrita en *Crinum augustum* (Ali *et al.*,

1981; 1983) y algunos de sus derivados se aislaron años más tarde de *Crinum kirkii* (Machocho *et al.*, 2004). Gracilina y derivados se han aislado en distintas especies del género *Galanthus* (Noyan *et al.*, 1998; Ünver *et al.*, 2001). Se han reportado también algunos monodímeros, como la latindina y clivimina, que poseen en su estructura dos unidades de alcaloides tipo licorina y homolicorina, respectivamente. La pallidiflorina, obtenida de *Narcissus pallidiflorus* (Codina *et al.*, 1990), es el único heterodímero en el que se une una unidad del tipo galantamina (concretamente, licoramina) y una unidad derivada de tazetina. En la Figura 1.9 se representan algunos alcaloides de estos subgrupos.

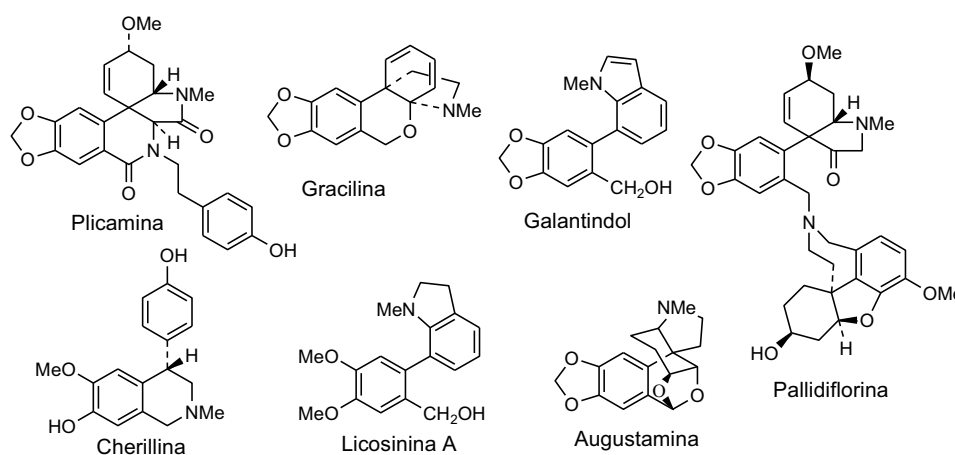


Figura 1.9: Algunos nuevos subgrupos de alcaloides de Amaryllidaceae

1.4. GC-MS y RMN en el estudio de alcaloides de Amaryllidaceae

El estudio de la composición de los extractos vegetales, así como la identificación de nuevos alcaloides en especies de la subfamilia Amaryllidoideae, ha sido posible en gran medida gracias a dos técnicas de estudio que han pasado a formar parte de los procedimientos de aplicación rutinaria: la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN). La extensa investigación llevada a cabo durante los últimos 50 años en el ámbito de alcaloides de Amaryllidaceae ha dado lugar a la caracterización de patrones de fragmentación para los diversos tipos estructurales, posibilitando la rápida

identificación de los compuestos ya conocidos y la elucidación estructural detallada en el caso de los compuestos aislados por primera vez.

1.4.1. Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (GC-MS)

La cromatografía de gases (GC), introducida en los años 50, es una técnica conocida por su capacidad para separar componentes de una mezcla, que implica la volatilización de la muestra mediante su calentamiento. El equipo incluye una columna con la fase estacionaria, un gas portador inerte, y un detector. Sólo las moléculas que pueden ser vaporizadas sin experimentar descomposición son adecuadas para este análisis. Por otra parte, un espectrómetro de masas es, básicamente, un instrumento que mide la relación masa-carga (m/z) de iones en fase gaseosa, proporciona información sobre la abundancia de cada especie iónica y, como factor de interés adicional, ofrece la posibilidad de ser acoplado como detector (Kitson *et al.*, 1996). Los compuestos orgánicos presentan patrones de fragmentación característicos después de ser ionizados, lo que permite su identificación mediante comparación con los datos obtenidos previamente. La combinación de ambas técnicas es una poderosa herramienta comúnmente conocida como GC-MS, la cual tiene un costo relativamente bajo, unido a una alta resolución y eficiencia.

Los extractos de las plantas pertenecientes a la subfamilia Amaryllidoideae suelen ser mezclas complejas con un número elevado de compuestos. La técnica de GC-MS, ya sea en modo de impacto electrónico (EI) o de ionización química (CI), ha demostrado ser útil para la rápida separación y detección de sus componentes. Los alcaloides de Amaryllidaceae pueden ser analizados sin necesidad de una derivatización previa ya que retienen sus patrones de fragmentación particulares bajo las condiciones de GC, permitiendo la identificación de compuestos ya caracterizados, o la obtención de información estructural valiosa cuando se trata de nuevas moléculas (Berkov *et al.*, 2008). Es importante señalar que pequeños cambios en la estereoquímica de estos alcaloides suelen ser suficientes para causar diferencias remarcables en el espectro de masas de los estereoisómeros (Duffield *et al.*, 1965; Berkov *et al.*, 2012).

Al abordar el estudio del contenido en alcaloides de una especie es de gran utilidad obtener un perfil general mediante GC-MS, tanto del extracto crudo como de

las fracciones derivadas del mismo. Además de proporcionar información sobre la presencia de alcaloides conocidos y posibles nuevas estructuras, permite el análisis de rendimientos y potenciales pérdidas que pueden surgir durante la aplicación de las diferentes técnicas de aislamiento. Recientemente, nuestro grupo ha validado una metodología de GC-MS como sistema de elección para el control de calidad de materias primas vegetales usadas en la producción de galantamina (Berkov *et al.*, 2011a), lo que demuestra las ventajas de su utilización en el análisis cualitativo y cuantitativo de estas plantas, en comparación con otras metodologías (Gotti *et al.*, 2006).

Durante los años 60 y 70 se llevaron a cabo numerosos estudios de espectrometría de masas de impacto electrónico (EIMS) de los alcaloides de Amaryllidaceae, permitiendo establecer patrones de fragmentación característicos para varios esqueletos tipo (Bastida *et al.*, 2006). Además, el posterior desarrollo de nuevas metodologías, así como la caracterización de otras estructuras, ha dado lugar a la generación de información bien documentada con valor diagnóstico considerable para la identificación de este grupo de alcaloides, con excepción del esqueleto tipo narciclasina, con pocos datos hasta la fecha del patrón de fragmentación de sus derivados. Los ejemplos que se describirán a continuación demuestran el gran valor de la metodología de GC-MS en la identificación de alcaloides de Amaryllidaceae, aunque cabe destacar que no todas las estructuras pertenecientes a este grupo pueden ser asignadas inequívocamente, como ocurre p.e. en el caso de los derivados *N*-óxidos.

1.4.1.1. Tipo licorina

El patrón de fragmentación de este esqueleto tipo se mantiene en condiciones de GC. El pico molecular aparece con una intensidad apreciable y suele experimentar una pérdida de agua, así como de C-1 y C-2, junto con los respectivos sustituyentes, por medio de una fragmentación de tipo retro-Diels-Alder (rDA).

Curiosamente, la pérdida de agua a partir del ion molecular depende de la estereoquímica del grupo hidroxilo en C-2, y no ocurre en derivados acetilados (Bastida *et al.*, 2006). En estructuras con dos grupos metoxilo en el anillo A en lugar del grupo metilendioxi de licorina (como es el caso de galantina) el pico base del espectro es 16 unidades mayor, apareciendo a m/z 242 (Figura 1.10).

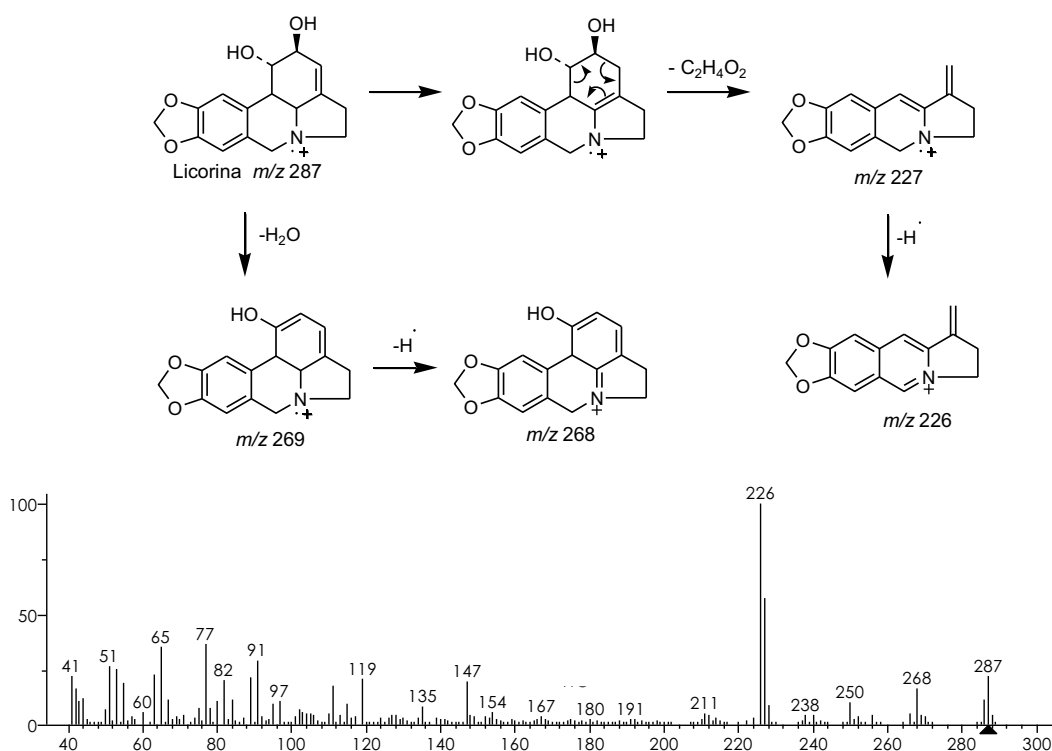


Figura 1.10: Patrón de fragmentación de licorina.

1.4.1.2. Tipo homolicorina

El fragmento dominante en el espectro de masas de los compuestos de tipo homolicorina surge de la rotura de los enlaces lábiles del anillo C por un reordenamiento rDA que genera dos fragmentos (Figura 1.11), siendo el más característico y abundante el correspondiente al anillo de pirrolidina, unido a los sustituyentes de la posición 2 (Bastida *et al.*, 2006). Por lo tanto, en el caso de homolicorina, el pico base se observa a m/z 109, mientras que hipeastrina (con un grupo hidroxilo en C-2) lo presenta a m/z 125. Los alcaloides de esta serie suelen ser difíciles de diferenciar debido a la reducida abundancia del ion molecular.

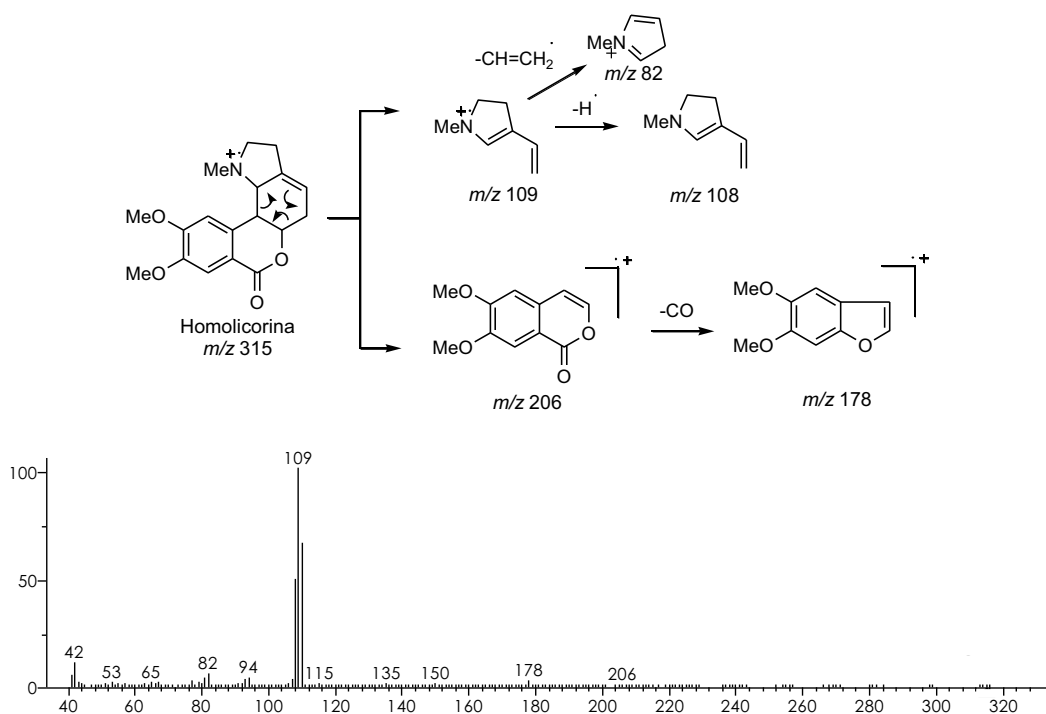


Figura 1.11: Patrón de fragmentación de homolicorina.

1.4.1.3. Tipos crinina y hemantamina

La fragmentación de este tipo de alcaloides ha sido estudiada en detalle para varias estructuras. En la mayoría de los casos, el ion molecular corresponde al pico base; el anillo aromático juega un papel fundamental en la estabilización de los fragmentos, mientras que el átomo de *N* suele perderse, y el paso inicial en los mecanismos de fragmentación implica la apertura del puente etano. Se han descrito varios patrones característicos teniendo en cuenta la presencia de sustituyentes en diversas posiciones, la saturación del anillo C, y la influencia de la estereoquímica (Longevialle *et al.*, 1973; Bastida *et al.*, 2006). Sin embargo, con respecto a la aplicación de la metodología de GC-MS, es interesante destacar que algunos alcaloides, como hemantamina, son susceptibles a la descomposición térmica, lo que modifica el espectro observado en condiciones de GC, en comparación con el obtenido mediante inyección directa en un espectrómetro de masas. Particularmente, en el caso de dicho alcaloide, Kreh *et al.* (1995) han propuesto un mecanismo para explicar los iones producidos por el efecto de una alta temperatura, involucrando la ruptura del puente 5,10b-etano, seguida de una rotura en α .

En la figura 1.12 se puede apreciar los principales fragmentos para el caso de hemantamina bajo condiciones de GC-MS, así como el respectivo espectro de masas. En la figura 1.13, se muestra el espectro de masas de hemantamina mediante de inyección directa.

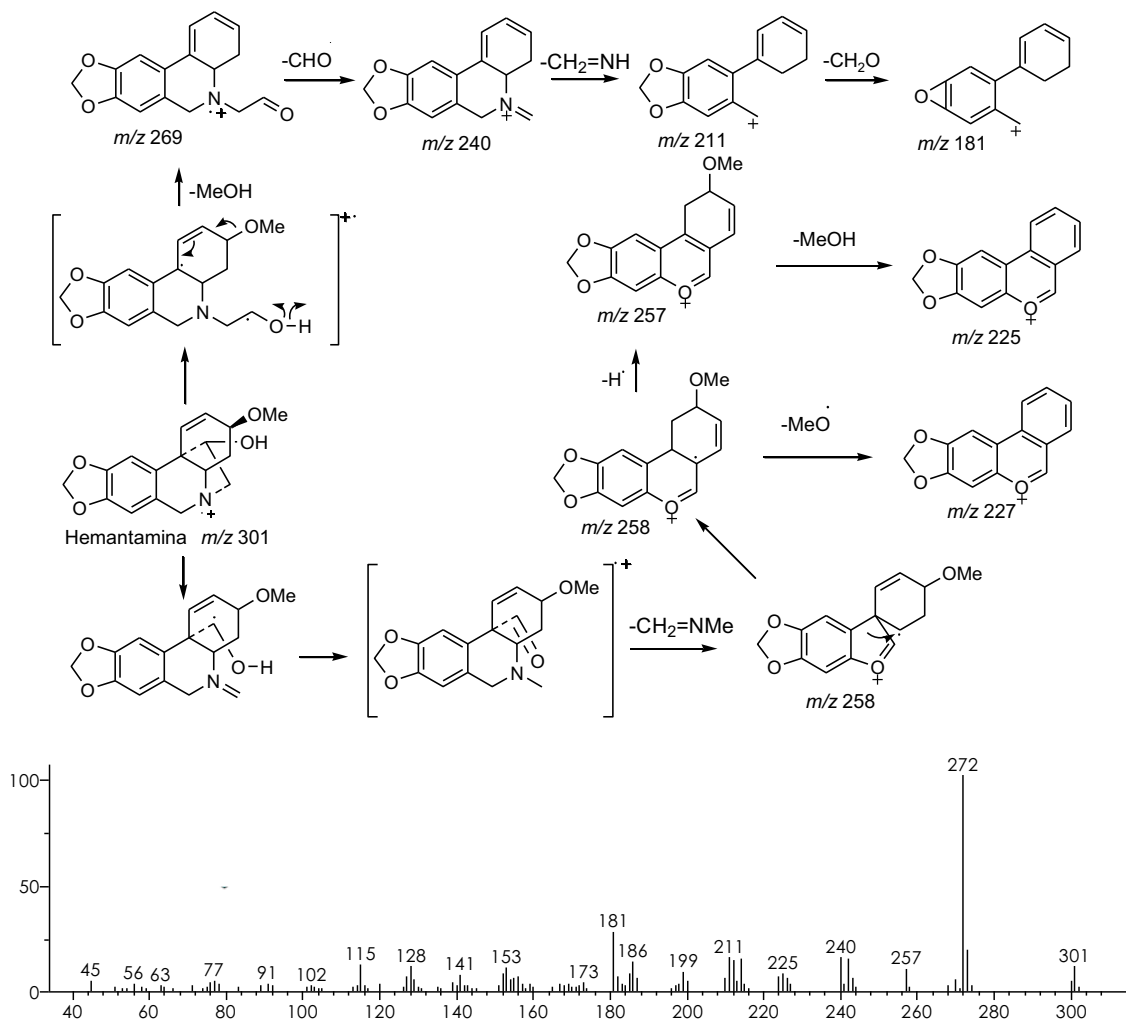


Figura 1.12: Patrón de fragmentación de hemantamina en condiciones de GC

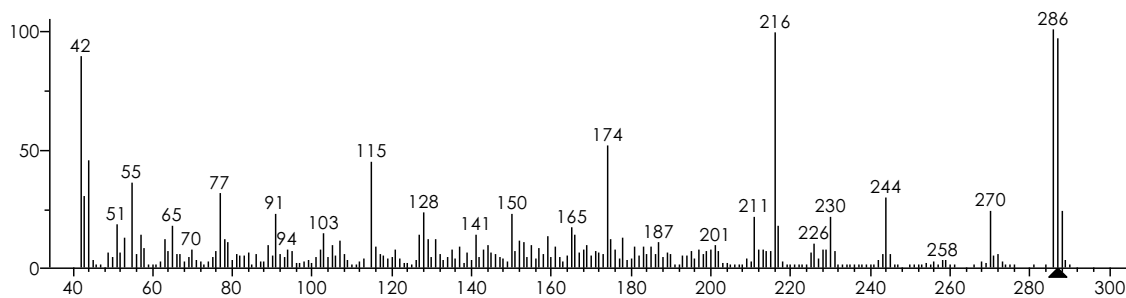


Figura 1.13: MS de hemantamina mediante inyección directa

1.4.1.4. Tipo tazetina

El esqueleto del tipo tazetina es un buen ejemplo para ilustrar cómo pequeños cambios en la estereoquímica pueden verse reflejados en los patrones de fragmentación. Tazetina y criwellina difieren sólo en la configuración del grupo metoxilo en C-3, pero ello es suficiente para producir importantes variaciones en sus espectros de masas (Figura 1.14).

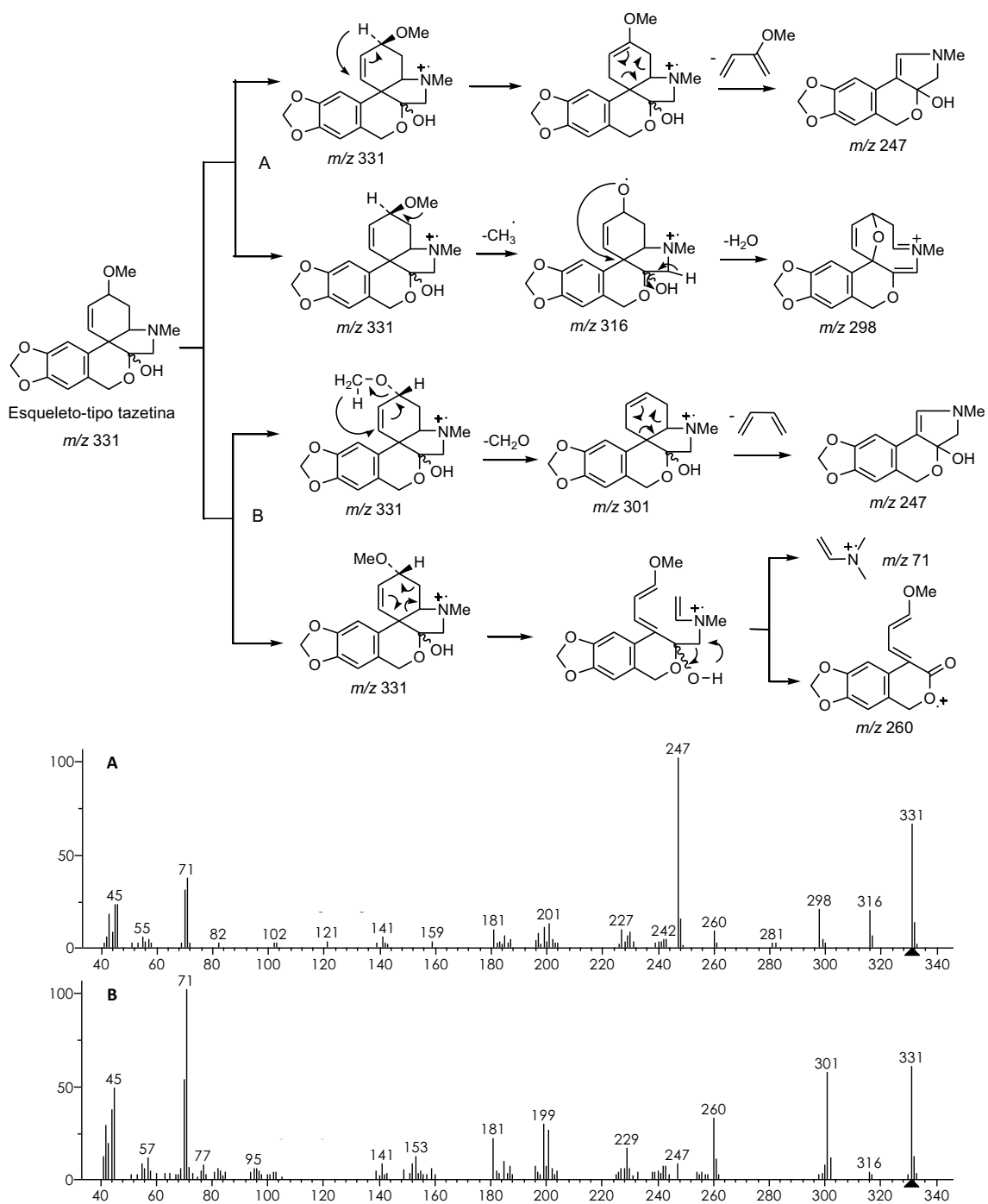


Figura 1.14: Patrones de fragmentación de tazetina (A) y criwellina (B).

La reacción principal involucra una fragmentación de tipo rDA, la cual en criwellina está precedida por la pérdida del grupo metoxilo, dado que su configuración la favorece, mientras que en tazetina ocurre tras una simple reorganización de protones. Así, queda de manifiesto el ion a m/z 247 como pico base en tazetina, presentando muy poca abundancia relativa en el espectro de criwellina (Figura 1.14).

Además, ambas estructuras experimentan la pérdida sucesiva de un radical metilo y agua, resultando en la formación de los iones a m/z 316 y m/z 298, así como posteriores fragmentaciones (Duffield *et al.*, 1965).

1.4.1.5. Tipo montanina

El patrón de fragmentación de alcaloides con el núcleo 5,11-metano-morfantridina depende en gran medida de la naturaleza y configuración de los sustituyentes de las posiciones C-2 y C-3. Las estructuras que contienen un grupo metoxilo dan lugar a un fragmento 31 unidades menor que el ion molecular (Figura 1.15). Por otra parte, la configuración del sustituyente en C-2 tiene una considerable influencia en cómo transcurre la fragmentación de tipo rDA, que se ve aumentada cuando el sustituyente en C-2 se encuentra en posición α (Bastida *et al.*, 2006).

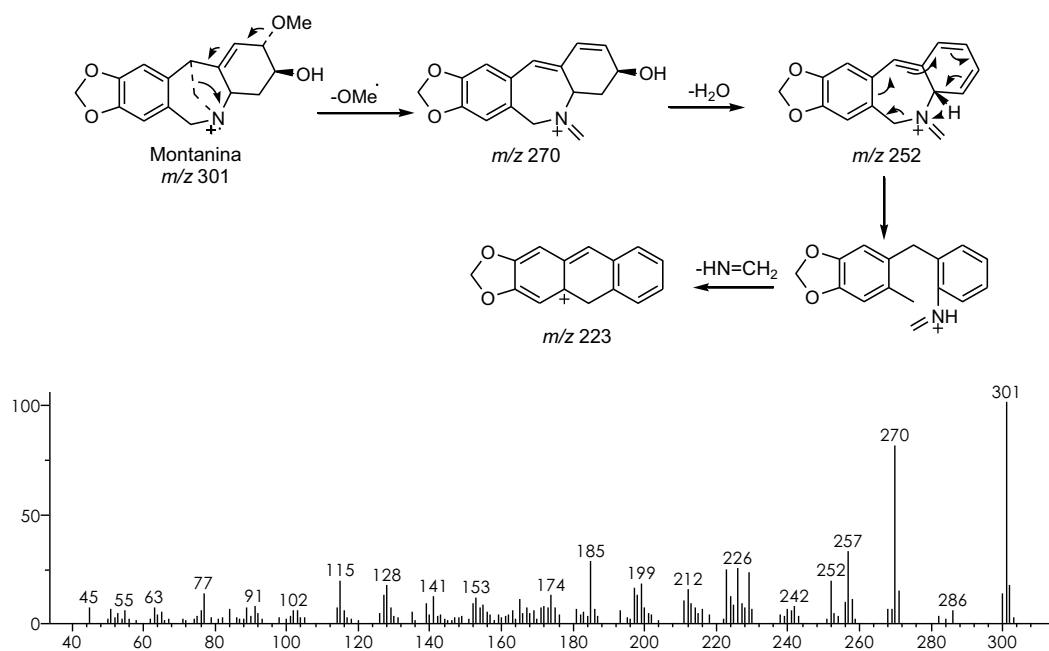


Figura 1.15: Patrón de fragmentación de montanina.

1.4.1.6. Tipo galantamina

Las estructuras de esta serie son probablemente las más estudiadas entre los alcaloides de Amaryllidaceae. Durante la década de 1970, se propuso que la fragmentación de algunos compuestos de este grupo incluía tres pasos principales que comprenden la eliminación del sustituyente en C-3, del anillo C, y del átomo de N (Figura 1.16). Más recientemente, se ha utilizado la metodología de GC-MS para el análisis detallado del comportamiento de varios derivados de tipo galantamina, demostrando que sus patrones de fragmentación se mantienen en dichas condiciones. Esto ha permitido su establecimiento como una técnica de rutina para el estudio de extractos vegetales que contienen este tipo de alcaloides (Berkov *et al.*, 2012).

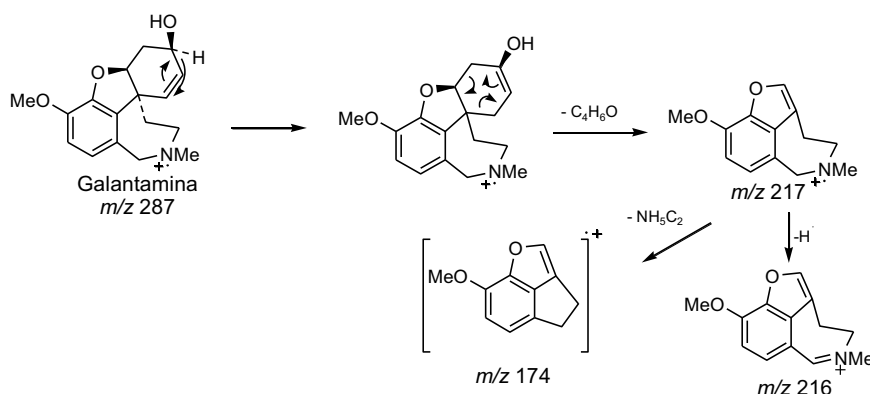


Figura 1.16: Fragmentación de galantamina.

En la citada referencia se reportaron además numerosos factores que influyen en la fragmentación, como por ejemplo la posición de diversos sustituyentes. Una vez más, es interesante mencionar cómo una modificación estereoquímica puede afectar el espectro de masas de un compuesto, tal es el caso de galantamina y su epímero en posición 3. Ambos presentan diferentes tiempos de retención bajo las mismas condiciones cromatográficas, junto a una pequeña, pero significativa, diferencia en sus espectros: la abundancia del fragmento a m/z 216, la cual se explica por la presencia de un puente de hidrógeno intramolecular que estabiliza el ion molecular de galantamina (Figura 1.17).

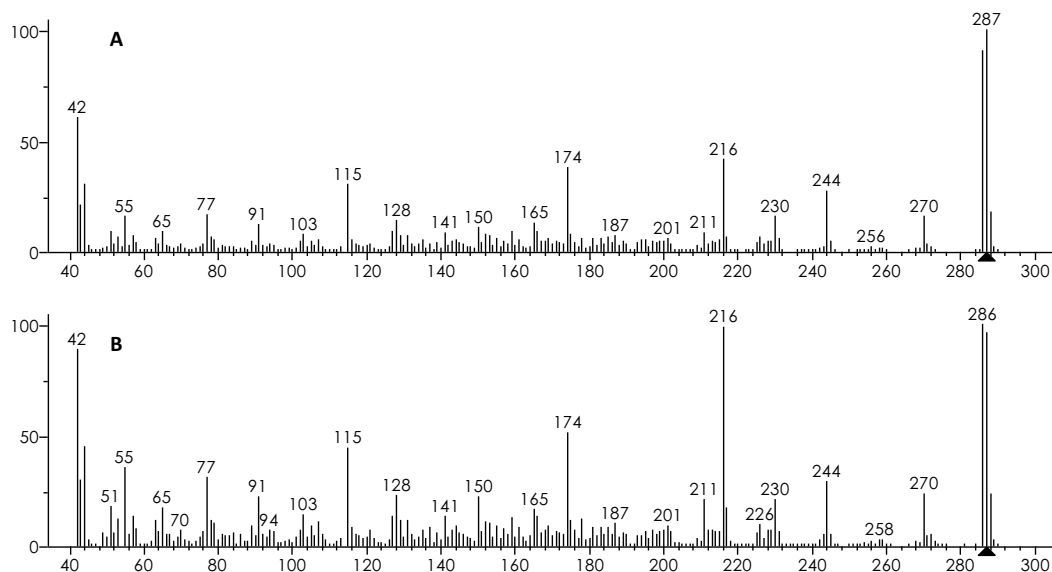


Figura 1.17: Espectro de masas de galantamina (A) y 3-epigalantamina (B).

1.4.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN): consideraciones generales

La resonancia magnética nuclear (RMN) es un tipo de espectroscopia de absorción, tal como la de infrarrojo (IR) o ultravioleta (UV). De forma breve, bajo la influencia de un campo magnético y en las condiciones apropiadas, una muestra es capaz de absorber radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias dependiendo de sus características particulares. La absorción es una función que depende de ciertos núcleos presentes en la molécula (Silverstein y Webster, 1998). La técnica de RMN se aplica principalmente en la identificación de compuestos orgánicos puros, pero durante los últimos años también se ha extendido al análisis de mezclas complejas en el ámbito de la metabolómica, siendo utilizada en numerosos estudios de extractos vegetales, incluyendo el análisis de especies y variedades de amarillidáceas (Kim *et al.*, 2010; Lubbe *et al.*, 2010).

Además de los datos obtenidos a partir de IR, UV, dicroísmo circular (CD) y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), entre otras metodologías, la elucidación estructural de un compuesto desconocido se logra generalmente mediante la combinación de diversas técnicas de RMN complementarias. Con respecto a los alcaloides de Amaryllidaceae, la espectroscopia de ^1H -RMN permite obtener información fundamental sobre los distintos tipos estructurales, mientras que su

combinación con la espectroscopia de ^{13}C -RMN y las técnicas de RMN bidimensional (2D-RMN), suele permitir la identificación inequívoca de la molécula en estudio, así como el establecimiento de su estereoquímica en la mayoría de los casos.

1.4.3. Características del espectro ^1H -RMN de los alcaloides de Amaryllidaceae

Las características más significativas de los espectros de ^1H -RMN de los alcaloides de las Amaryllidaceae han sido descritas, detallando las claves para su identificación (Bastida *et al.*, 2011). En general, la región aromática (δ 6.5-8.5) contribuye a definir el tipo de esqueleto, mientras que la sustitución del anillo aromático suele ser evidente por la observación de las señales correspondientes a uno o más grupos metoxilo alrededor de δ 3.6-4.0, o la presencia de la señal típica de un grupo metilendioxi sobre δ 6.0. En muchas estructuras en las que la posición bencílica en C-6 está saturada, como licorina, hemantamina y galantamina, la presencia de un sistema AB es característica de dichos protones, y su desplazamiento químico se ve influenciado por la orientación del par de electrones libre del átomo de *N*. Además de estos rasgos comunes, vale la pena mencionar algunas particularidades para cada tipo de alcaloide.

1.4.3.1. Tipo licorina

Entre las características principales del espectro de ^1H -RMN de licorina y sus derivados, se encuentran los dos singuletes de los protones aromáticos en orientación *para*, junto con un único protón olefínico, y los dobletes correspondientes a la posición bencílica 6. El desapantallamiento observado en las señales de los protones β de las posiciones 6 y 12, en relación a sus homólogos en α , se debe al efecto del par de electrones libre en *cis* del átomo de nitrógeno.

Generalmente, los alcaloides aislados del género *Narcissus* muestran una configuración *trans* en la unión de los anillos B/C, con una constante de acoplamiento entre H-4a y H-10b de $J \sim 11$ Hz. Únicamente kirkina presenta una configuración *cis*, con una constante de acoplamiento menor.

1.4.3.2. Tipo homolicorina

Estos alcaloides incluyen un grupo característico que puede ser una lactona, un hemiacetal o un éter cíclico. En su espectro de ^1H -RMN suelen observarse dos

singuletes correspondientes a los protones aromáticos en *para*, siendo la señal del H-7 la que usualmente se encuentra más desapantallada debido a la proximidad del grupo carbonilo en *peri*.

La mayoría de estos compuestos pertenecen a una única serie enantiomérica con la unión *cis* entre los anillos B/C, lo cual es congruente con la pequeña constante de acoplamiento entre los protones 1-10b. En el género *Narcissus* no se ha encontrado ninguna excepción a esta regla. Por otra parte, el elevado valor de la constante de acoplamiento entre H-4a y H-10b ($J \sim 10$ Hz) sólo es compatible con una relación *trans*-diaxial.

Por lo general, el anillo C presenta un protón vinílico. Si la posición 2 se encuentra sustituida por un grupo hidroxilo, metoxilo o acetilo, siempre muestra una disposición α . El grupo *N*-metilo suele hallarse en el intervalo de δ 2.0-2.2, pero en el caso de alcaloides con el anillo C saturado, se han descrito algunas correlaciones empíricas para la estereoquímica de las uniones entre los anillos B/C y C/D, en las que se reportan señales más desapantalladas (Jefferis *et al.*, 1988).

1.4.3.3. Tipos *crinina* y *hemantamina*

La configuración absoluta de estos alcaloides se determina mediante dicroísmo circular (CD). Los alcaloides del género *Narcissus* son exclusivamente del tipo hemantamina, mientras que en los géneros como *Crinum*, *Brunsvigia* y *Boophane*, entre otros, los alcaloides de tipo *crinina* son predominantes. Además, es importante mencionar que los alcaloides aislados del género *Narcissus* no muestran sustituciones adicionales en el anillo aromático, aparte de las de C-8 y C-9, mientras que en los géneros dominados por los esqueletos del tipo *crinina* es bastante común la presencia de compuestos con un sustituyente metoxilo en C-7.

Utilizando CDCl_3 como solvente, la magnitud de las constantes de acoplamiento entre H-3 y cada uno de los protones olefínicos (H-1 y H-2) ofrece información sobre la configuración del sustituyente en C-3. En aquellos alcaloides en los que el puente 5,10b-etano, es decir, los carbonos C-11 y C-12, se halla en configuración *cis* respecto al sustituyente en C-3, H-1 presenta un acoplamiento alílico con H-3 ($J_{1,3} \sim 1-2$ Hz) y H-2 muestra una constante más pequeña con H-3 ($J_{2,3} \sim 0-1.5$ Hz), tal como ocurre en *crinamina*. Por el contrario, en la serie epimérica de la hemantamina, se observa una

constante de acoplamiento mayor entre H-2 y H-3 ($J_{2,3} = 5$ Hz), mientras que el acoplamiento entre H-1 y H-3 no es detectable. Esta regla también se aplica a los alcaloides tipo crinina.

Los compuestos con un sustituyente hidroxilo en C-6, como papiramina/6-epipapiramina o hemantidina/6-epihemantidina, aparecen como una mezcla de epímeros que no pueden ser separados ni mediante sistemas de HPLC.

1.4.3.4. Tipo tazetina

La presencia de un grupo *N*-metilo (δ 2.4-2.5) distingue a este tipo de alcaloides de los tipos hemantamina o crinina, de los que proceden biosintéticamente. Por lo demás, el espectro de ^1H -RMN siempre muestra la señal correspondiente al grupo metilendioxi.

1.4.3.5. Tipo narciclasina

En los alcaloides de este tipo, el único protón aromático aparece como un singulete con desplazamiento químico superior a 7 ppm. Además, los compuestos que no presentan el clásico doble enlace en C-1/C-10b manifiestan una fusión *trans* del anillo B/C, confirmado por su constante de acoplamiento J_{4a-10b} .

1.4.3.6. Tipo montanina

La configuración absoluta de los alcaloides de tipo montanina debe determinarse mediante CD. Su espectro de ^1H -RMN es muy similar a los alcaloides con esqueleto de tipo licorina, aunque las estructuras de tipo montanina pueden diferenciarse a través del análisis del experimento COSY. Las señales atribuidas a los protones H-4 (las más apantalladas) muestran correlación con las correspondientes a H-3 y H-4a, mientras que en el espectro de un esqueleto de tipo licorina, las señales más apantalladas corresponden a los dos protones de la posición 11 y al protón 12α .

1.4.3.7. Tipo galantamina

Entre los alcaloides de Amaryllidaceae, sólo los de tipo galantamina muestran una constante de acoplamiento en *orto* ($J_{7,8} \sim 8$ Hz) entre los protones aromáticos del anillo A. La asignación de la estereoquímica del sustituyente en C-3 se realiza en base a

las constantes de acoplamiento del protón olefínico H-4. Cuando la constante $J_{3,4}$ tiene un valor de alrededor de 5 Hz, el sustituyente es *pseudo*-axial, mientras que si el valor es próximo a 0 Hz indica que el sustituyente en C-3 es *pseudo*-ecuatorial. Este tipo de alcaloides suele mostrar la presencia de un grupo *N*-metilo aunque, ocasionalmente, también se ha reportado la existencia de grupos *N*-formilo o incluso *N*-alquilo. La presencia del anillo furano provoca un efecto de desapantallamiento sobre H-1.

1.4.4. Características del espectro ^{13}C -RMN de los alcaloides de Amaryllidaceae

Con respecto a la espectroscopia de ^{13}C -RMN, la misma se ha utilizado ampliamente en la determinación del esqueleto carbonado de estos alcaloides. En líneas generales, el espectro de ^{13}C -RMN de los alcaloides de Amaryllidaceae puede dividirse en dos regiones: a campos más bajos (>90 ppm) se observan las señales correspondientes a grupos carbonilo, carbonos olefínicos y aromáticos, así como la señal del grupo metilendioxi; mientras que las señales de los carbonos alifáticos se encuentran a campos más altos, siendo la señal del grupo *N*-metilo la única fácilmente reconocible, entre 40-46 ppm. El efecto del sustituyente (OH, OMe, OAc) en las resonancias de carbono es de gran importancia para la localización de la posición de los grupos funcionales.

1.4.5. Experimentos bidimensionales: consideraciones generales

Finalmente, tal como ya se ha mencionado, los experimentos bidimensionales son de importancia significativa para realizar una correcta asignación de las señales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, especialmente en el caso de estructuras desconocidas. Entre las técnicas de 2D-RMN que se utilizan más ampliamente, pueden citarse las siguientes:

- I. **^1H - ^1H COSY (COrrrelation Spectroscopy)**, en la cual las correlaciones observadas corresponden a acoplamientos directos entre los protones involucrados, siendo de gran utilidad en la asignación de acoplamientos geminales y vecinales.

- II. **^1H - ^1H NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)**, de gran valor para obtener información sobre la proximidad espacial entre protones y, por ende, sobre la estereoquímica.
- III. **^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)**, que muestra las correlaciones entre ^1H - ^{13}C directamente enlazados, permitiendo la adecuada asignación de todos los carbonos, a excepción de los cuaternarios.
- IV. **^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)**, muy útil en la determinación de correlaciones a larga distancia entre ^1H - ^{13}C . Permite la identificación de los carbonos cuaternarios a través de la observación de su correlación con protones situados a tres enlaces de distancia.

1.5. Actividad biológica

1.5.1. Usos tradicionales

Especies de la familia Amaryllidaceae han sido utilizadas o se utilizan en gran medida en la medicina tradicional. El caso más representativo es la utilización por parte de Hipócrates de Cos, en el siglo IV AC, del aceite de *Narcissus* para tratar tumores uterinos (Pettit *et al.*, 1986). Asimismo, *Narcissus poeticus* es citado en la Biblia indicándose su uso para determinadas sintomatologías tumorales (Pettit *et al.*, 1990). El uso en medicina tradicional de especies del género *Narcissus* como una terapia eficaz frente al cáncer (Pettit *et al.*, 1993) también se pone de manifiesto tanto en la medicina tradicional China como en poblaciones del norte de África. Hoy en día, muchas de las especies utilizadas del género *Narcissus* (*N. poeticus*, *N. pseudonarcissus* y *N. tazetta*), se han estudiado fitoquímicamente pudiéndose constatar que presentan alcaloides derivados de narciclasina y/o pretazetina, compuestos con una remarcable actividad antitumoral (Bastida *et al.*, 2011).

En el continente americano, también está documentada la utilización de especies de las Amaryllidaceae en medicina tradicional. Así, en Centroamérica, el decocto de hojas de *Crinum amabile* se ha utilizado como expectorante y el de sus bulbos como

antiinflamatorio para tratar contusiones. Por otra parte, el extracto del bulbo de *Crinum erubescens* se indicaba como colirio. Dicha especie también se utilizó para tratar problemas uterinos, tras macerar sus bulbos y aplicar el extracto obtenido con aceite. Sus hojas, mezcladas con vinagre, solían ser utilizadas para la terapia de hemorroides. En Venezuela, el decocto de las flores frescas de esta misma especie era utilizado en baños corporales (Morton, 1981). Un gran número de hallazgos arqueológicos indican la utilización de flores de especies de los géneros *Ismene*, *Pyolirion* y *Stenomesson*, en rituales y ceremonias del Imperio Inca (Nair y van Staden, 2013). El decocto de los bulbos de la especie caribeña *Hymenocallis litorallis* mezclado con jabón de barra se aplicaba en los tratamientos de acné y forúnculos (Gutrye, M., *comunicación personal*, Puerto Viejo, Limón, Costa Rica, 1975). En Brasil, los extractos de los bulbos de *Hippeastrum psitacinum* se indicaban para la tos y como estimulante sexual (Albuquerque *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2012).

Sin embargo, el mayor uso de las Amaryllidaceae en medicina tradicional se concentra en el S y SO de África y, especialmente, en Sudáfrica. Incluso hoy en día, en áreas de difícil acceso, existe un predominio de la medicina tradicional, especialmente debido a falta de medicinas convencionales disponibles para la mayoría de la población. A ello hay que añadir el notorio problema socio-económico que hace que todavía cerca de 27 millones de sudafricanos soliciten primero la ayuda de curanderos o prácticos en medicina tradicional en lugar del profesional médico (Nair y van Staden, 2013).

Las especies del género *Crinum*, principalmente *C. macowanii* y *C. bulbispermum*, se utilizan para problemas reumáticos, artritis, varices, aumento de lactancia y para el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual (Nair y van Staden, 2013). Especies del género *Clivia* se utilizan para favorecer el parto, así como para tratar infertilidad, infecciones urinarias y mordeduras de serpientes. *Boophane disticha* posee una serie de indicaciones terapéuticas, entre ellas, en trastornos de origen psicótico, ansiedad, y de tipo ginecológico. Además, presenta propiedades narcóticas, antiinflamatorias y antitumorales, entre otras (Nair y van Staden, 2013; 2014).

Las especies de los géneros *Scadoxus* y *Haemanthus* suelen utilizarse como antieméticos y en problemas de origen asmático y tos. *Cyrtanthus breviflorus* también presenta actividad frente a la emesis, ascariasis y parasitosis por tenias, además de ser

utilizada como amuleto protector en casos de hechizos. *Amaryllis belladonna* posee indicación como antiespasmódico y antitumoral. Los bosquimanos de Sudáfrica, solían utilizar *Pancratium tenuifolium* y *Brunsvigia radulosa* en rituales para inducir alucinaciones (Nair y van Staden, 2013). Muchas de las especies citadas también son utilizadas como veneno en las puntas de flechas de caza de tribus africanas.

En relación a las intoxicaciones, las estimaciones indican que cerca del 10% de los casos registrados en los Centros de Salud son debidos a la utilización de plantas de uso tradicional, siendo las especies de la familia Amaryllidaceae las que registran una mayor problemática. Casos de diarrea, alucinaciones, o incluso más graves como parálisis u otros efectos de tipo psíquico son frecuentes tras la utilización de estas especies. Una de las especies más peligrosas es la previamente citada *Boopbane disticha*, agente causal de la muerte por intoxicación entre integrantes de las etnias sudafricanas Zulú, Sotho y Xhosa (Nair y van Staden, 2013; 2014).

Así pues, las especies de la familia Amaryllidaceae siguen siendo importantes plataformas de estudio fitoquímico como base para el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos biológicamente activos. A pesar de los efectos tóxicos de algunas de ellas, cuya utilización precisa de mayor vigilancia y control, los inconvenientes son superados por los posibles efectos beneficiosos que sus extractos y alcaloides pueden aportar a la terapia, lo que justifica su uso extensivo en medicina tradicional (Nair y van Staden, 2013).

1.5.2. Actividades biológicas de los diferentes esqueletos tipo

Desde el aislamiento de licorina a finales del siglo XIX (Cook y Loudon, 1952), el primer alcaloide obtenido de las Amaryllidaceae, se han ido sucediendo numerosos estudios fitoquímicos de estas plantas conjuntamente con su evaluación biológica. A continuación, se realiza un breve resumen de las principales actividades biológicas de los alcaloides ordenados por esqueleto tipo.

1.5.2.1. Licorina

Entre las múltiples actividades biológicas constatadas para los alcaloides del esqueleto tipo licorina, la antitumoral posee una importancia destacable. El alcaloide licorina es el más estudiado del grupo. Se ha observado que posee capacidad para

inhibir las células del melanoma murino BL6, carcinoma pulmonar de Lewis, ascitis murina, células de leucemia humanas HL-60 y células HeLa (Ghosal *et al.*, 1985a, 1985b; Likhitwitayawuid *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1995; Weniger *et al.*, 1995; Nair *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2001). Caranina, galantina y pseudolicorina también han demostrado actividad frente a variadas líneas tumorales (Suzuki *et al.*, 1974; Pettit *et al.*, 1984; Weniger *et al.*, 1995). Ungeremina, un metabolito natural de la licorina, es la responsable parcial de la inhibición del crecimiento celular y del efecto citotóxico de la licorina, siendo también activo frente a leucemia (Ghosal *et al.*, 1988b).

Licorina es, además, un potente inhibidor de la biosíntesis del ácido ascórbico (Evidente *et al.*, 1983). En plantas superiores, algas y levaduras, licorina inhibe la organogénesis, la respiración resistente al cianuro, la actividad peroxidasa y la síntesis de proteínas. Es interesante hacer notar que los derivados glucosilados de licorina, como licorina-1-*O*- β -D-glucósido, pueden comportarse de manera opuesta a licorina en plantas superiores, actuando como estimulantes del crecimiento celular, de la germinación de semillas y del desarrollo de raíces (Bastida *et al.*, 2006; 2011).

También se ha reportado una actividad antiviral remarcable para los alcaloides de este grupo. Licorina y pseudolicorina han demostrado actividad frente a virus de la familia Flaviviridae y, en menor escala, Bunyaviridae. Licorina muestra actividad frente a los virus de la poliomielitis, Coxsackie y herpes tipo 1. La actividad antiviral está relacionada con su capacidad de acción frente al ADN y ARN viral (Bastida *et al.*, 2006; 2011).

Los alcaloides de este grupo también pueden considerarse importantes inhibidores del enzima acetilcolinesterasa, destacando asoanina y oxoasoanina (López *et al.*, 2002).

Asimismo, licorina y sus derivados presentan actividad frente a parásitos como *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Toriizuka *et al.*, 2008). Licorina es capaz de inducir la muerte celular a través de un mecanismo conocido como paraptosis en *Trichomonas vaginalis* (Giordani *et al.*, 2011). Al igual que otros alcaloides, licorina y sus derivados también muestran actividad antifúngica, antiinflamatoria, analgésica e hipotensora (Bastida *et al.*, 2011).

1.5.2.2. Homolicorina

Los alcaloides de este grupo han mostrado efectos citotóxicos, concretamente frente a líneas no tumorales de células fibroblásticas LMTK, así como una inhibición del crecimiento *in vivo* e *in vitro* de una variedad de líneas celulares de tumores hepáticos y de próstata (Antoun *et al.*, 1993; Weniger *et al.* 1995, Fennell y van Staden, 2001). Homolicorina e hipeastrina poseen actividad anti-retroviral, y el alcaloide hipeastrina se muestra también activo frente a *Candida albicans* (Bastida *et al.*, 2006).

Asimismo, se ha puesto de manifiesto el efecto hipotensor de algunos alcaloides de este esqueleto tipo (Bastida *et al.*, 2006). La licorenina también ha mostrado una acción vasodepresora y capacidad de producir bradicardia por modificación de la actividad vagal (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2000).

Recientemente, una actividad digna de atención es la de candimina frente a *Trichomonas vaginalis*. Dicho alcaloide ha demostrado la capacidad de inhibir los enzimas NTPDasas y ecto-5'-nucleotidasa del parásito, además de inducir la muerte celular por un mecanismo de paraptosis, al igual que licorina (Giordani *et al.*, 2010). A pesar del potencial biológico del grupo, la gran mayoría de los derivados de homolicorina han sido escasamente explorados (de Andrade *et al.*, 2012b).

1.5.2.3. Crinina

La acción antiproliferativa parece ser la diana más promisoras de los alcaloides del tipo crinina. El alcaloide 6-hidroxicrinamina mostró actividad frente a células de melanoma murino BL-6 (Tram *et al.*, 2002; Berkov *et al.*, 2011b). Crinina, bufanamina, 6-hidroxibufanidrina y 6-etoxibufanidrina mostraron efectos antiproliferativos frente a variadas líneas de células tumorales, siendo bufanamina el compuesto de mayor interés por su buena tolerancia en estudios *in vivo*, incluso a dosis altas (Evidente *et al.*, 2009).

Con respecto a otras actividades, crinamina exhibe capacidad antibacteriana, siendo de interés su efecto frente a *Entamoeba histolytica*. Otros compuestos presentan una actividad entre moderada y débil frente a cepas de *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *Plasmodium falciparum* (Tram *et al.*, 2002).

1.5.2.4. Hemantamina

Al igual que los alcaloides del tipo crinina, la inhibición de líneas celulares tumorales es una de las actividades destacadas de los alcaloides del tipo hemantamina. Hemantidina, crinamina, maritidina y papiramina, aparte de la propia hemantamina, mostraron una pronunciada inhibición en leucemia, linfoma, melanoma, hepatoma, tumor prostático y, especialmente, frente a linfoma murino L5178 resistente a multidrogas (Furusawa *et al.*, 1980; Antoun *et al.*, 1993; Likhitwitayawuid *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1995; Weniger *et al.*, 1995; Youssef y Frahm, 1998). Los alcaloides que presentan el esqueleto tipo hemantamina son inductores de apoptosis a concentraciones μM (McNulty *et al.*, 2007). Vitatina presentó actividad citotóxica frente a líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT29, carcinoma pulmonar y carcinoma renal RXF393 (da Silva *et al.*, 2008).

Hemantamina, hemantidina y crinamina son activos frente a *Plasmodium falciparum*. Se ha observado también actividad frente a cepas de *Trypanosoma* y algunas cepas de bacterias, especialmente para hemantidina y vitatina, respectivamente. Al igual que otros alcaloides de Amaryllidaceae, algunos derivados de hemantamina han demostrado actividades antiinflamatorias, antiretrovirales, analgésicas e hipotensivas (Bastida *et al.*, 2006; 2011).

1.5.2.5. Tazetina

Los alcaloides tazetina y pretazetina presentan actividad citotóxica. Pretazetina, que se convierte en tazetina en el proceso de extracción ácido-base, resulta mucho más interesante que su artefacto tazetina debido a su actividad antiviral y antitumoral (Bastida *et al.*, 2006; de Andrade *et al.*, 2012a). Pretazetina es activa frente a líneas de células fibroblásticas LMTK e inhibe el crecimiento de células HeLa, siendo además efectiva frente a algunas líneas celulares de leucemia y carcinoma (Furusawa *et al.*, 1975; 1981; Bastida *et al.*, 2006; 2011).

Pretazetina también presenta otras actividades biológicas. Podemos citar su capacidad de inhibición de la transcriptasa inversa de algunos virus oncogénicos, así como su acción frente a algunos flavovirus y bunyavirus, además de una remarcable actividad frente al herpes simple tipo 1 (Bastida *et al.*, 2006; 2011).

1.5.2.6. Montanina

El alcaloide montanina es, posiblemente, el compuesto más estudiado del grupo en los últimos años. Anteriormente se conocía la capacidad antibacteriana de pancracina, su derivado demetilado, así como su moderada actividad frente a cepas de *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum* (Labraña *et al.*, 2002). Tras el aislamiento de montanina de *Hippeastrum vittatum* en cantidades importantes, dicho alcaloide ha sido sometido a una serie de ensayos psicofarmacológicos en roedores, *via* inyección intraperitoneal, cuyos resultados demostraron que posee una notable actividad antidepresiva, anticonvulsivante y ansiolítica (da Silva *et al.*, 2006). Montanina también se ensayó frente a algunas líneas de células tumorales, presentando actividad citotóxica (da Silva *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha reportado una nueva diana biológica para montanina, debido a que demostró una inhibición significativa del enzima AChE a concentraciones de 1 mM, 500 y 100 μ M, utilizando una modificación del método de Ellman (Pagliosa *et al.*, 2010). En ensayos bioquímicos, este alcaloide es capaz de activar cascadas de fosforilaciones y mediadores intracelulares responsables de la memoria (da Silva, 2005). De esta manera, ha quedado demostrado que el esqueleto tipo montanina es un firme candidato para futuras evaluaciones biológicas.

1.5.2.7. Narciclasina

Entre todos los alcaloides de Amaryllidaceae candidatos a fármacos o cabezas de serie por su actividad antitumoral, probablemente los alcaloides narciclasina y pancratistatina sean las bases más estudiadas hasta la fecha. Narciclasina es un conocido antimetabólico que afecta la división celular en el estadio de metafase, además de inhibir la síntesis proteica en ribosomas de células eucariotas, actuando específicamente en la unidad 60S (Jimenez *et al.*, 1975; Baez y Vazquez, 1978; Rodriguez-Fonseca *et al.*, 1995; Bastida *et al.*, 2011). A su vez, pancratistatina inhibe el crecimiento de células HeLa, posee propiedades antileucémicas y es activa frente a líneas de células tumorales, como el carcinoma de laringe y cervical, entre otros (Pettit *et al.*, 1995; Hoshino, 1998; Bastida *et al.*, 2006; 2011). Narciclasina también inhibe el citocromo P450 3A4 humano y, a pesar de su toxicidad, esta problemática puede ser superada. Recientemente se ha propuesto la aplicación potencial de este alcaloide y

sus derivados para el tratamiento de tumores cerebrales (Van Goietsenoven *et al.*, 2013).

Narciclasina también presenta efectos profilácticos sobre la artritis, además de actividad antifúngica y antibacteriana, incluyendo al patógeno *Neisseria gonorrhoeae*. Algunos derivados de narciclasina presentan efectos antivirales, como es el caso de trisfaeridina, mientras que ismina ha demostrado efectos hipotensivos.

En plantas, la narciclasina inhibe la germinación, el desarrollo de las semillas y la síntesis de ácido ascórbico, al igual que el alcaloide licorina (Bastida *et al.*, 2006; 2011).

1.5.2.8. Galantamina

Galantamina es el único alcaloide de Amaryllidaceae aprobado por la FDA para su utilización como forma farmacéutica. La galantamina es un reconocido inhibidor del enzima AChE y un estimulante directo de sinapsis nicotínicas, a través de su capacidad moduladora alostérica en receptores nicotínicos pre- y post-sinápticos (Maelicke *et al.*, 2001). Existen evidencias de que dicha estimulación protege, además, la formación de las placas β -amiloides, que llevan a la muerte neuronal (Matharu *et al.*, 2009; Bastida *et al.*, 2011). Asimismo, galantamina es bien tolerada, presenta una farmacocinética adecuada y, comparativamente con otros fármacos, posee unos efectos adversos menos severos (Bastida *et al.*, 2011).

En el antiguo bloque soviético, galantamina se utilizó en casos de parálisis, *miastenia gravis* y otros problemas asociados a la transmisión colinérgica (Heinrich y Teoh, 2004). Dicho alcaloide afecta procesos iónicos transmembrana y puede ser utilizado en la terapia neuromuscular post-quirúrgica (Ghosal *et al.*, 1985a; Bastida *et al.*, 2006; 2011). Además, puede ser utilizada en casos de reversión de anestesia y ha sido patentada como fármaco para tratamiento de casos de dependencia a nicotina (Bastida *et al.*, 2006). Galantamina también posee un moderado efecto analéptico y antimalárico, además de un notable efecto analgésico y una moderada actividad hipotensora (Bastida *et al.*, 2006; 2011).

Sin embargo, el mayor éxito de galantamina ha sido su utilización en el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer (AD). Estudios de modelado molecular y rayos-X han constatado el modo de enlace del alcaloide al centro activo del enzima (Greenblat *et al.*, 1999; Bartolucci *et al.*, 2001). Sanguinina, un derivado de

galantamina, presenta una capacidad inhibidora de la AChE 10 veces superior a la que muestra galantamina, posiblemente debido a presencia de un hidroxilo aromático en su estructura (Bartolucci *et al.*, 2001). Recientemente, se han aislado estructuras con sustituyentes *N*-alquilo de *Leucojum aestivum* con un rango de inhibición del enzima AChE similar al de sanguinina (Berkov *et al.*, 2008), de manera que este esqueleto tipo es de interés para la búsqueda de nuevos compuestos inhibidores del enzima AChE.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos

La continua búsqueda por productos naturales proporciona una importante fuente de moléculas bioactivas. Las plantas de las Amaryllidaceae, subfamilia Amaryllidoideae, sintetizan un tipo particular de alcaloides del grupo de las tetrahidroisoquinolinas que han demostrado un amplio espectro de actividades biológicas, además de un reconocido valor quimiotaxonómico.

El objetivo principal de la presente Tesis es el estudio químico y biológico de la especie africana *Narcissus broussonetii* y de otras tres especies del género sudamericano *Hippeastrum*, en concreto de *H. papilio*, *H. aulicum* y *H. calyptratum*.

Objetivos Específicos:

- I. Evaluar el contenido de alcaloides de las especies *N. broussonetii*, *H. papilio*, *H. aulicum* y *H. calyptratum* mediante GC-MS. Caracterizar los compuestos nuevos y reportar los datos espectrales completos para los compuestos que no los posean. Para ello, se utilizarán distintas técnicas espectroscópicas incluyendo RMN y HRMS. Cuando se precise se llevarán a cabo los estudios de CD y rayos-X.
- II. Reportar los datos de fragmentación de masas de los compuestos que se aíslen por primera vez, así como de los considerados inusuales.
- III. Evaluar los extractos o alcaloides aislados como antiprotozoarios y constatar si presentan actividad inhibidora del enzima acetilcolinesterasa.
- IV. Contribuir a la revisión quimiotaxonómica de la familia, tomando como base los alcaloides nuevos o inusuales aislados en las especies estudiadas.

2.2. Objectives

The continuous search for natural compounds is an important source of bioactive molecules. Amaryllidaceae plants of the subfamily Amaryllidoideae synthesize a specific type of tetrahydroisoquinoline alkaloids, which have demonstrated a wide-range of biological activities, as well as having a notable chemotaxonomic value.

The main aim of this Thesis is the chemical and biological study of the African species *Narcissus broussonetii* and three other species from the South American genus *Hippeastrum*, specifically *H. papilio*, *H. aulicum* and *H. calyptratum*.

Specific Objectives:

- I. To evaluate the alkaloid content of the species *N. broussonetii*, *H. papilio*, *H. aulicum* and *H. calyptratum* through GC-MS, and characterize new compounds, providing complete spectral data for known compounds when missing. For these aims, different spectroscopic techniques will be used, including NMR and HRMS, as well as CD and X-ray analyses when necessary.
- II. To report mass spectral fragmentation for those compounds isolated for the first time or considered uncommon.
- III. To evaluate antiprotozoal activity in extracts or isolated alkaloids as well as acetylcholinesterase inhibition activity.
- IV. To contribute to the chemotaxonomical revision of the family, based on the isolation of new or unusual alkaloids in the studied species

3. RESULTADOS

3.1. Resultados: consideraciones generales

Los resultados de la presente tesis están publicados en los siguientes artículos científicos, presentados a continuación precedidos por un breve resumen en castellano:

Artículo 1. de Andrade, J.P., Berkov, S., Viladomat, F., Codina, C., Zuanazzi, J.A.S., Bastida, J. (2011). Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. *Molecules*, 16, 7097-7104.

Artículo 2. de Andrade, J.P., Pigni, N.B., Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2012). Bioactive alkaloids extracts from *Narcissus broussonetii*: mass spectral studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 13-25.

Artículo 3. de Andrade, J.P., Guo, Y., Font-Bardia, M., Calvet, T., Dutilh, J., Viladomat, F., Codina, C., Nair, J.J., Zuanazzi, J.A.S., Bastida, J. (2014). Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. *Phytochemistry*, 103, 188-195.

3.2. Artículo 1 – Alkaloids from *Hippeastrum papilio*

Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. *Molecules*, 16, 7097-7104 (2011).

La especie *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen se localizó en el sur de Brasil (Caxias do Sul, RS). Se recolectaron aproximadamente 2 kg de bulbos para realizar la extracción fraccionada de sus alcaloides. Mediante el análisis por GC-MS se observaron altos niveles del alcaloide galantamina en la fracción obtenida con *n*-Hexano, siendo posteriormente aislado a través de sucesivos pasos de purificación y cristalización. Este compuesto es de especial interés debido a su utilización en el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer (AD). A pesar de que su síntesis ha sido establecida, la galantamina que se utiliza con fines comerciales proviene, casi en su totalidad, de especies del género *Leucojum*, *Narcissus*, *Lycoris* y *Ungernia*. La creciente demanda de galantamina fomenta la búsqueda de nuevas especies capaces de biosintetizar dicho compuesto, así como moléculas alternativas.

Todas las fracciones obtenidas del extracto se analizaron por GC-MS con el objetivo de detectar nuevas estructuras que presentaran el esqueleto tipo galantamina. En la fracción EtOAc se detectó el compuesto **1**, con un espectro de masas muy parecido al de habrantina, un derivado de galantamina que posee un sustituyente hidroxilo en posición 11 cuya estereoquímica aún no se encontraba definida con certeza. Así, el extracto se sometió a fraccionamiento por VLC, aislando y purificando dicho compuesto con el objeto de llevar a cabo su completa caracterización estructural.

El espectro ^1H -RMN de **1** también resultó similar al de habrantina, con pequeñas diferencias en los desplazamientos de H-1 y H-11. Por otra parte, la constante de acoplamiento *trans*-diaxial observada entre H-12 β y H-11 ($J = 10.8$ Hz) fue clave para su correcta asignación, indicando una orientación α para H-11 y, por lo tanto, llevando a inferir que el sustituyente hidroxilo se encuentra en β . El experimento NOESY confirmó la disposición de los protones en la estructura propuesta, permitiendo así identificar el compuesto **1** como 11 β -hidroxigalantamina y, a su vez, confirmar que el alcaloide habrantina correspondía al epímero 11 α -hidroxigalantamina.

En el transcurso del aislamiento del compuesto **1**, también se obtuvieron galantamina, hemantamina, 11-hidroxivitatina y 8-*O*-demetilmartidina, lo que, sumado a la identificación de los alcaloides vitatina y narwedina por GC-MS, totalizó siete compuestos detectados en *H. papilio*. Asimismo, por tratarse de un derivado de galantamina, el compuesto 11 β -hidroxigalantamina demostró una destacada capacidad de inhibición del enzima AChE (IC₅₀ 14.5 \pm 0.33 μ M), aunque inferior a la de galantamina.

Article

Alkaloids from *Hippeastrum papilio*

Jean Paulo de Andrade ^{1,2}, Strahil Berkov ^{1,3}, Francesc Viladomat ¹, Carles Codina ¹, José Angelo S. Zuanazzi ² and Jaume Bastida ^{1,*}

¹ Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

³ AgroBioInstitute, 8 Dragan Tzankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jaumbastida@ub.edu; Tel.: +34 934020268.

Received: 9 June 2011; in revised form: 20 July 2011 / Accepted: 26 July 2011 /

Published: 18 August 2011

Abstract: Galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor marketed as a hydrobromide salt (Razadyne®, Reminyl®) for the treatment of Alzheimer's disease (AD), is obtained from Amaryllidaceae plants, especially those belonging to the genera *Leucojum*, *Narcissus*, *Lycoris* and *Ungernia*. The growing demand for galanthamine has prompted searches for new sources of this compound, as well as other bioactive alkaloids for the treatment of AD. In this paper we report the isolation of the new alkaloid 11 β -hydroxygalanthamine, an epimer of the previously isolated alkaloid habranthine, which was identified using NMR techniques. It has been shown that 11 β -hydroxygalanthamine has an important *in vitro* acetylcholinesterase inhibitory activity. Additionally, *Hippeastrum papilio* yielded substantial quantities of galanthamine.

Keywords: galanthamine; 11 β -hydroxygalanthamine; *Hippeastrum papilio*; 2D NMR

1. Introduction

The object of many studies, Amaryllidaceae alkaloids contain a wide range of chemical structures and interesting biological properties [1], showing pronounced antimalarial [2], antitumoral [3] and acetylcholinesterase inhibitory activity [4]. The use of galanthamine in palliative therapy for mild-

moderate AD [5] has prompted the search for analogous compounds bearing the galanthamine-type skeleton. Additionally, as most of the galanthamine used in clinics is supplied from natural sources, there is considerable interest in finding new Amaryllidaceae species for a sustainable production of galanthamine [4,6].

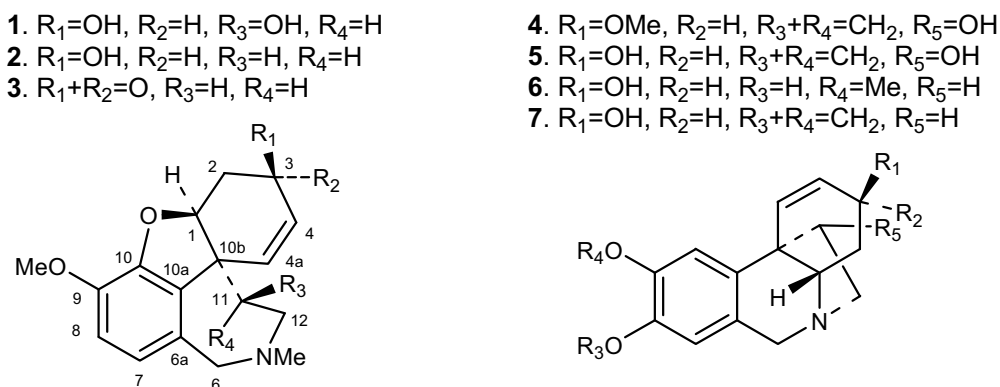
Plants of the genus *Hippeastrum*, which is endemic to South America, have yielded interesting bioactive compounds such as montanine, with significant psychopharmacological and acetylcholinesterase inhibitory activity [7,8] and candimine, active against *Trychomonas vaginalis* [9]. Recent nrDNA ITS sequences data have included it within the Hippeastroid subclade and alluded to a probable Brazilian origin [10].

We have identified six known alkaloids, including significant quantities of galanthamine which was the main alkaloid isolated, from the bulbs and leaves of *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen, which grows in Southern Brazil. Furthermore, we have clarified the correct position of the hydroxyl-substituent in the alkaloid habranthine through the isolation of its epimer, the new alkaloid 11 β -hydroxygalanthamine. Habranthine was isolated from *Pancreatium maritimum* without certainty about the stereochemistry of the hydroxyl substituent at position 11 in the galanthamine-type skeleton. Using modern 2D NMR, we report the correct assignment of 11 β -hydroxygalanthamine, a new alkaloid from *Hippeastrum papilio*, confirming that the previously reported habranthine is in fact 11 α -hydroxygalanthamine. Furthermore, 11 β -hydroxygalanthamine has demonstrated a good ability to inhibit the acetylcholinesterase enzyme, with IC₅₀ of 14.5 \pm 0.33 μ M.

2. Results and Discussion

Bulbs and leaves of the plant showed similar alkaloid profiles by analytical TLC. After Vacuum Liquid Chromatography (VLC) and a purification process, the new alkaloid, 11 β -hydroxygalanthamine (**1**), as well as six known alkaloids, namely galanthamine (**2**), which was found in relatively high quantities, narwedine (**3**), haemanthamine (**4**), 11-hydroxyvittatine (**5**), 8-*O*-demethylmaritidine (**6**) and vittatine (**7**), were isolated and identified by NMR, CD and MS spectrometry (Figure 1). Earlier studies have reported the isolation of galanthamine and other galanthamine-type alkaloids from *Hippeastrum* species, including European cultivars, but mainly as minor compounds.

Figure 1. Isolated alkaloids from *Hippeastrum papilio*.



Compound **1**, 11 β -hydroxygalanthamine, crystallized as white needles. EI-MS showed a molecular ion peak at m/z 303. The base peak at m/z 230 evidenced the loss of the hydroxyl group at C-3 and the C-11/C-12/NMe residue, in agreement with other galanthamine-type alkaloids [11]. The $^1\text{H-NMR}$ of compound **1** (Table 1) was very similar to that of habranthine previously isolated from *Habranthus brachyandrum* and *Pancreatium maritimum* [12,13], with small differences in the chemical shifts of H-11 and H-1. The key to the assignment was the large coupling constant $J_{(11\alpha,12\beta)} = 10.8$ Hz, observed in compound **1**, which indicates a *trans* diaxial relationship between H-11 α and H-12 β , and therefore a β -position for the hydroxyl substituent. In contrast, the coupling constants observed for the H-11 of habranthine ($J_{(11\beta,12\beta)} = 1.6$ Hz) and ($J_{(11\beta,12\alpha)} = 4.5$ Hz) indicated that the hydroxyl-substituent should be in the α -position (endo). Moreover, the H-12 protons in compound **1** are clearly separated in a double doublet, and 2D analysis confirmed the correct assignment, where NOESY correlations between H-12 β and H-4/H-6 β and between H-12 α and NMe were observed. The complete assignment of the 11 β -hydroxygalanthamine is presented in Table 1.

Alkaloid **1** has also proven to be an inhibitor of acetylcholinesterase like the majority of the galanthamine-type alkaloids. In an acetylcholinesterase inhibition screening of several Amaryllidaceae alkaloids, López *et al.* [14] found that habranthine, epimer of compound **1**, showed similar activity to galanthamine. The β -configuration of the hydroxyl group at position 11 in **1** could be unfavourable for its interactions within the active site of the acetylcholinesterase enzyme. The IC_{50} for **1** was 14.5 ± 0.33 μM , while galanthamine showed an IC_{50} of 1.18 ± 0.07 μM .

3. Experimental

3.1. General

NMR spectra were recovered in a Varian Mercury 400 MHz instrument using CDCl_3 (CD_3OD for compound **5**) as a solvent and TMS as the internal standard. Chemical shifts were reported in δ units (ppm) and coupling constants (J) in Hz. EIMS were obtained on a GC-MS Hewlett-Packard 6890+ MSD 5975 operating in EI mode at 70 eV.

An HP-5 MS column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) was used. The temperature program was: 100–180 $^\circ\text{C}$ at 15 $^\circ\text{C min}^{-1}$, 1 min hold at 180 $^\circ\text{C}$ and 180–300 $^\circ\text{C}$ at 5 $^\circ\text{C min}^{-1}$ and 10 min hold at 300 $^\circ\text{C}$. Injector temperature was 280 $^\circ\text{C}$. The flow rate of carrier gas (Helium) was 0.8 mL min^{-1} . Split ratio was 1:20. A QSTAR Elite hybrid Quadrupole-Time of Flight (QToF) mass spectrometer (Applied Biosystems, PE Sciex, Concord, ON, Canada) was used for HR-MS analysis. ToF MS data were recorded from m/z 70 to 700 amu with an accumulation time of 1 s and a pause between the mass range of 0.55 ms, operating in the positive mode. Reserpine (1 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) in product ion scan mode of m/z 609 was used for calibration of the mass spectrometer. Optical rotations were carried out on a Perkin-Elmer 241 polarimeter. A Jasco-J-810 Spectrophotometer was used to run CD spectra, all recorded in MeOH. UV spectra were obtained on a DINKO UV2310 instrument and IR spectra were recorded on a Nicolet Avatar 320 FT-IR spectrophotometer.

COSY, NOESY, HSQC and HMBC data of 11 β -hydroxygalanthamine (400 MHz, CDCl₃).

δ (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
	H-2 α , H-2 β	H-2 α , H-2 β , H-11 α	89.0 <i>d</i>	C-3, C-4a, C-11
5.6, 5.2, 2.8)	H-1, H-2 β	H-1, H-2 β , H-3	32.3 <i>t</i>	C-1, C-3, C-4, C-10b
15.6, 1.6)	H-1, H-2 α , H-3	H-1, H-2 α , H-3		--
8)	H-2 β , H-4	H-2 α , H-2 β , H-4	62.2 <i>d</i>	C-1, C-4, C-4a
4, 4.8)	H-3, H-4a	H-3, H-4a	133.1 <i>d</i>	C-2, C-10b
)	H-4	H-4, H-6 β , H-12 β	122.6 <i>d</i>	C-1, C-3, C-10b
)	H-6 β	H-6 β , H-7, NMe	59.5 <i>t</i>	C-6a, C-7, C-10a, C-12, NMe
)	H-6 α	H-4a, H-6 α , H-12 β		C-6a, C-7, C-10a, C-12, NMe
			129.9 <i>s</i>	
	H-8	H-6 α , H-8	122.4 <i>d</i>	C-6, C-9, C-10a
	H-7	H-7, OMe	111.8 <i>d</i>	C-6a, C-10
			144.6 <i>s</i>	
			146.9 <i>s</i>	
			128.9 <i>s</i>	
			53.4 <i>s</i>	
8, 4.0)	H-12 α , H-12 β	H-1, H-12 α , H-12 β , NMe	72.0 <i>d</i>	C-1, C-4a
0, 3.2)	H-11 α , H-12 β	H-11 α , H-12 β , NMe		C-6, C-10b, C-11
6, 10.8)	H-11 α , H-12 α	H-4a, H-6 β , H-11 α , H-12 α	62.1 <i>t</i>	C-6, C-11, NMe
		H-8	56.2 <i>q</i>	C-9
		H-6 α , H-11 α , H-12 α	43.2 <i>q</i>	C-6, C-12

3.2. Plant Material

Hippeastrum papilio was collected during the flowering period (November, 2009) in the South of Brazil (Caxias do Sul-RS). A voucher specimen (ICN-149428) has been deposited in the Institute of Botany, Universidade do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, and identified by Julie Dutilh PhD, University of Campinas.

3.3. Extraction and Isolation of Alkaloids

Fresh bulbs (2 Kg) were crushed and exhaustively extracted with EtOH (96% v/v) at room temperature for 48 h and the combined macerate was filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The bulb crude extract (50 g) was acidified to pH 2 with diluted H₂SO₄ and extracted with Et₂O (4 × 250 mL) to remove neutral material. The aqueous solution was basified with 25% ammonia up to pH 11 and extracted with *n*-hexane (8 × 250 mL) to give extract A (0.55 g). Another extraction using EtOAc (8 × 250 mL) gave extract B (1.2 g) and the last extraction using EtOAc-MeOH (3:1, 3 × 250 mL) gave extract C (3.4 g). Extract A yielded galanthamine (**2**) by crystallization from acetone. Extract B was subjected to a VLC column (3 × 6 cm) using silica gel (250 g – Kieselgel – mesh 0.15/0.30), eluting with *n*-hexane gradually enriched with EtOAc (0 → 100%) and then with MeOH (0→50%). Fractions of 100 mL were collected (190 in total) monitored by TLC (Dragendorff's reagent, UV light λ 254 nm) and combined according to their TLC profiles, obtaining three fractions: 70–90 (fraction **I**), 100–124 (fraction **II**) and 125 – 145 (fraction **III**). From **I**, galanthamine (**2**, 150 mg, 0.0075% of fresh bulbs) was isolated again by crystallization from acetone. Fraction **II** (250 mg) was subjected to a VLC column (1,5 × 3,5 cm) using *n*-hexane gradually enriched with EtOAc (0–100%) and then with MeOH (0–50%), providing 100 fractions. After combining fractions 55–85, PTLC (20 cm × 20 cm × 0.25 mm, Silica gel F₂₅₄, EtOAc:CHCl₃:*n*-Hexane:MeOH = 4:2:2:1, v/v/v/v, in NH₃ atmosphere) was used to isolate haemanthamine (**4**, 80 mg) and 8-*O*-demethylmaritidine (**6**, 3.5 mg). From **III**, using PTLC (20 cm × 20 cm × 0.25 mm, Silica gel F₂₅₄, EtOAc-CHCl₃-MeOH = 4:2:1, in NH₃ atmosphere) 11-hydroxyvittatine (**5**, 10mg) and 11β-hydroxygalanthamine (**1**, 55 mg, 0.00275% of fresh bulbs) were isolated. Fresh leaves (approx. 1Kg) were also submitted to alkaloid extraction. Their alkaloid profile obtained by TLC and GC-MS was quite similar to that observed for bulbs, with additional traces of narwedine (**3**) and vittatine (**7**), which were identified by comparing their GC-EI-MS spectra and Kovats retention indices (RI) with our own library database. All known alkaloids isolated were identified by comparing their physical and spectroscopic data with those of alkaloids previously isolated and characterized by our group [4,15-18].

3.4. Microplate AChE Assay

The assay for measuring AChE activity was performed as described by López *et al.* [14]. Galanthamine hydrobromide was used as a positive control. The IC₅₀ of 11β-hydroxygalanthamine, galanthamine hydrobromide and galanthamine was measured in triplicate and the results are presented as a mean ± standard deviation using the software package Prism (Graph Pad Inc., San Diego, USA). Both isolated alkaloids and the positive control were evaluated at a concentration ranging from 10⁻³ M to 10⁻⁸ M.

11β-Hydroxygalanthamine (1). White needles. UV (MeOH) λ_{max} nm: 212.5, 287. $[\alpha]_{24}^{\text{D}} = -20^{\circ}$ (*c* 1.1, CHCl₃); CD $[\Theta]_{20}^{\lambda}$: $[\Theta]_{230} +586$, $[\Theta]_{247} -1950$, $[\Theta]_{291} +3782$. IR (CHCl₃) ν_{max} cm⁻¹: 3360, 2925, 2854, 1730, 1624, 1590, 1508, 1440, 1280, 1096, 1044, 977, 756. ¹H-NMR, COSY, NOESY, HSQC, HMBC (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) see Table 1. EI-MS 70eV (rel. int.): 303(M⁺, 32), 302(18), 286(11), 231(22), 230(100), 213(25), 181(12), 174(10), 97(96), 57(12). HR-QTOF-MS [M + H]⁺: 304.1550 (calcd for C₁₇H₂₂NO₄, 304.1549).

4. Conclusions

Although the chemical synthesis of galanthamine has been achieved, its supply for clinical use still comes from natural sources. *Hippeastrum papilio* is able to produce great quantities of galanthamine but more studies on its genetic improvement, hybridization or *in vitro* culture are needed. Our search for new sources of galanthamine and acetylcholinesterase inhibitors has resulted in the isolation and identification of 11β-hydroxygalanthamine (**1**), a new acetylcholinesterase inhibitor alkaloid. The compound was structurally elucidated by 2D NMR, which allowed us to distinguish it from its epimer, habranthine. Galanthamine-type alkaloids are well-known for their inhibitory activity of the acetylcholinesterase enzyme. The action of galanthamine as an allosterically potentiating ligand in nicotinic acetylcholine receptors [5] and its ability to inhibit β-amyloid aggregation [19] could also play a role in successful AD therapy. The discovery of new galanthamine-type candidates is therefore of real interest for the future management of this disease.

Acknowledgments

The authors are grateful for the collaboration of SCT-UB technicians and the Generalitat de Catalunya (2009-SGR-1060) for the financial support. The authors also thank Julie Dutilh for authentication of plant material. J.P.A. thanks Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (BECAS-MAEC-AECID) for a doctoral fellowship.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bastida, J.; Lavilla, R.; Viladomat, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In *The Alkaloids*; Cordell, G.A., Ed.; Elsevier Scientific Publishing: Amsterdam, The Netherlands, 2006; Volume 63, pp. 87-179.
2. Sener, B.; Orhan, I.; Satayavivad, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 1220-1223.
3. McNulty, J.; Nair, J.J.; Bastida, J.; Pandey, S.; Griffin, C. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: a potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 913-919.

4. Berkov, S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J. *N*-alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2263-2266.
5. Maelicke, A.; Samochocki, M.; Jostock, R.; Fehrenbacher, A.; Ludwig, J.; Albuquerque, E.X.; Zerlin, M. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* **2001**, *49*, 279-288.
6. Berkov, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Development and validation of a GC-MS method for rapid determination of galanthamine in *Leucojum aestivum* and *Narcissus* ssp.: A metabolomic approach. *Talanta* **2011**, *83*, 1455-1465.
7. da Silva, A.F.S.; de Andrade, J.P.; Bevilaqua, L.R.M.; de Souza, M.M.; Izquierdo, I.; Henriques, A.T.; Zuanazzi, J.A.S. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, *85*, 148-154.
8. Pagliosa, L.B.; Monteiro, S.C.; Silva, K.B.; de Andrade, J.P.; Dutilh, J.; Bastida, J.; Cammarota, M.; Zuanazzi, J.A.S. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 698-701.
9. Giordani, R.B.; Vieira, P.B.; Weizenmann, M.; Rosemberg, D.B.; Souza, A.P.; Bonorino, C.; de Carli, G.A.; Bogo, M.R.; Zuanazzi, J.A.S.; Tasca, T. Candimine-induced cell death of the Mitochondriate Parasite *Trichomonas vaginalis*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 2019-2023.
10. Meerow, A.W.; Guy, C.L.; Li, Q.B.; Yang, S.L. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Syst. Bot.* **2000**, *25*, 708-726.
11. Hesse, M.; Berhard, H.O. Amaryllidaceae alkaloids. In *Progress in Mass Spectrometry*; von Budzikiewicz, H., Ed.; Verlag Chemie: Weinheim, Germany, 1975; Volume 3, pp. 164-184.
12. Wildman, W.C.; Brown, C.L. The structure of habranthine. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *43*, 4573-4576.
13. Tato, M.P.V.; Castedo, L.; Riguera, R. New alkaloids from *Pancreatum maritimum* L. *Heterocycles* **1988**, *27*, 2833-2838.
14. López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.* **2002**, *71*, 2521-2529.
15. Bastida, J.; Viladomat, F.; Llabrés, J.M.; Codina, C.; Feliz, M.; Rubiralta, M. Alkaloids from *Narcissus confusus*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1519-1524.
16. Bastida, J.; Contreras, J.L.; Codina, C.; Wright, C.W.; Phillipson, J.D. Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1549-1551.
17. Berkov, S.; Bastida, J.; Tsvetkova, R.; Viladomat, F.; Codina, C. Alkaloids from *Sternbergia colchiciflora*. *Z. Naturforsch. C* **2009**, *64*, 311-316.
18. Bastida, J.; Bergoñón, S.; Viladomat, F.; Codina, C. Alkaloids from *Narcissus primigenius*. *Planta Med.* **1994**, *60*, 95-96.

19. Matharu, B.; Gibson, G.; Parsons, R.; Huckerby, T.N.; Moore, S.A.; Cooper, L.J.; Millichamp, R.; Allsop, D.; Austen, B. Galantamine inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity. *J. Neurol. Sci.* **2009**, *280*, 49-58.

Sample Availability: Not available.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

3.3. Artículo 2 - Bioactive alkaloids from *Narcissus broussonetii*: mass spectral studies

Bioactive alkaloids from *Narcissus broussonetii*: mass spectral studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 13-25 (2012).

Narcissus es uno de los géneros endémicos de la Península Ibérica y norte de África. Se recolectaron aproximadamente 2 kg de bulbos de *Narcissus broussonetii* en las cercanías de Casablanca (Marruecos) y se extrajeron los alcaloides utilizando la metodología habitual. Los análisis preliminares de GC-MS revelaron la presencia de alcaloides con fragmentos de masas muy inusuales y tiempos de retención bastante tardíos, cuyo aislamiento se abordó realizando el fraccionamiento del extracto mediante VLC y posterior seguimiento por GC-MS. En total, se logró la identificación de 23 compuestos.

Los análisis de RMN y de HRMS permitieron reconocer los alcaloides inusuales obliquina, plicamina y secoplicamina. Dichos compuestos dinitrogenados se encuentran muy raramente en especies de la familia Amaryllidaceae, siendo este trabajo el primero en reportarlos en el género *Narcissus*. La estructura química peculiar de estos alcaloides, con un segundo átomo de N en la posición 5 del esqueleto tipo tazetina, ha motivado tanto los estudios de su actividad biológica como de su síntesis química.

Para el estudio de la fragmentación de dichos compuestos, se llevaron a cabo análisis por HPLC-ESI-MS/MS. Una vez optimizada la energía de colisión y las condiciones cromatográficas, se pudo proponer una ruta de fragmentación para los mismos. Obliquina y plicamina se fragmentan de manera similar, observándose una pérdida inicial del sustituyente 4-hidroxifeniletil de la posición 5. Son característicos los fragmentos m/z 212.07 (calcd para 212.0706), en el caso de obliquina, y m/z 226.05 (calcd para 226.0499) para plicamina. Por lo general, las diferencias de masa observadas para los fragmentos propuestos corresponden al oxígeno del carbonilo de la posición 6 que, junto a la configuración del sustituyente en posición 3, constituyen las únicas características distintivas entre ambas estructuras.

Por otra parte, el alcaloide dinitrogenado secoplicamina mostró fragmentos poco abundantes en el experimento MS². El ion característico del sustituyente 4-hidroxifeniletíl no se observó. Mediante la interpretación de los espectros de MS/MS se pudo concluir que, debido a que el anillo D está completamente abierto, la apertura del anillo C queda favorecida en detrimento de la pérdida del sustituyente 4-hidroxifeniletíl, confirmándose así la existencia de una ruta distintiva de fragmentación para la secoplicamina.

El estudio fitoquímico de *N. broussonetii* también dió lugar al aislamiento del alcaloide pretazetina, a pesar de no haber sido detectado en el análisis por GC-MS. En los años 60 se postuló que este alcaloide, una molécula extremadamente lábil a pH básico, se convertía en tazetina en el transcurso de la extracción. Lo mismo se observó en condiciones de GC-MS. Debido a lo expuesto, se planteó un paso previo de derivatización para proteger la posición hidroxilada en 6, impidiendo la apertura del anillo B y la conversión a tazetina. Tras la derivatización con BSTFA se pudo identificar la pretazetina-TMS por medio de GC-MS. Con el objetivo de confirmar la hipótesis de que la tazetina aislada de especies de la familia Amaryllidaceae proviene de pretazetina, se evaluaron extractos crudos de *N. broussonetii* y de otros cultivares del género *Narcissus*, lo que permitió confirmar, por primera vez, que pretazetina es el único alcaloide natural mientras que tazetina es, en realidad, un artefacto inexistente en la especie vegetal.

Finalmente, con el extracto enriquecido en alcaloides se llevó a cabo un estudio de actividad biológica *in vitro* frente a diferentes protozoos, cuyos resultados demostraron un marcado efecto inhibitor frente a *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ 1.77 µg/ml), a pesar de que los compuestos evaluados individualmente no presentaron una actividad significativa.



Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies

Jean Paulo de Andrade^a, Natalia Belén Pigni^a, Laura Torras-Claveria^a, Strahil Berkov^{a,b}, Carles Codina^a, Francesc Viladomat^a, Jaume Bastida^{a,*}

^a Department of Natural Products, Plant Biology and Soil Science, Faculty of Pharmacy, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^b AgroBioInstitute, 8 Dragan Tzankov Blvd., Sofia 1164, Bulgaria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2012

Received in revised form 21 April 2012

Accepted 4 May 2012

Available online 14 May 2012

Keywords:

Amaryllidaceae

Narcissus

Dinitrogenous alkaloids

Pretazettine

Antiprotozoal studies

ABSTRACT

Plants of the Amaryllidaceae family are a well-known source of tetrahydroisoquinoline alkaloids with a wide range of biological activities, including antiviral, antitumoral, antiparasitic, psychopharmacological, and acetylcholinesterase inhibitory, among others. Recent advances in the use of GC or LC coupled to MS have allowed a chemically guided isolation of uncommon and bioactive alkaloids. In the present work, analytical methods were applied to study the alkaloid profile of *Narcissus broussonetii*, a plant endemic to North Africa. Using the GC–MS technique and an in-home mass fragmentation database, twenty-three alkaloids were identified, including the very rare dinitrogenous alkaloids obliquine, plicamine, and secoplicamine. Applying LC–ESI–LTQ–Orbitrap–MS, fragmentation profiles were found to be similar for obliquine and plicamine but different for secoplicamine. Pretazettine, a potent cytotoxic alkaloid, was also isolated from *N. broussonetii*, although its identification by GC–MS was only possible after a BSTFA-derivatization. The silylated crude methanolic extract only showed the presence of pretazettine–TMS, confirming that tazettine was formed after the alkaloid extraction. The same observation was made in *Narcissus* cultivars in which tazettine had been detected as the major alkaloid. As part of an ongoing project on MS of Amaryllidaceae alkaloids, the silylated tazettine and pretazettine were studied by GC–MS/MS, and found to differ in their fragmentation routes. Finally, the EtOAc extract of *N. broussonetii* showed notable *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*, with an IC₅₀ value of 1.77 μg/ml.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Narcissus is the most common genus of the Amaryllidaceae family in the Iberian Peninsula and North Africa, comprising 80–100 wild species. The alkaloids found in Amaryllidaceae species possess putative pharmacological properties such as antiprotozoal, antiviral, antitumoral, and acetylcholinesterase inhibitory activity [1–3]. The well-known Amaryllidaceae alkaloid, galanthamine, is a marketed drug for Alzheimer's disease therapy (Razadyne[®], formerly Reminyl[®]). Alkaloids like narciclasine, pretazettine and others bearing haemanthamine- and lycorine-type skeletons have demonstrated interesting antitumoral and/or apoptotic effects [4–6]. Some compounds of the lycorine series have shown interactions with the human cytochrome P450 3A4 [7]. From a biosynthetic point of view, the Amaryllidaceae alkaloids in the genus *Narcissus* are grouped in eight skeleton types formed from the common precursor *O*-methylnorbelladine [2].

The development of metabolite profiling methods using capillary electrophoresis, gas chromatography (GC), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) or

high-performance liquid chromatography (HPLC) has allowed the identification and quantification of many Amaryllidaceae alkaloids [8–11]. In biological samples, liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS) has been successfully used to quantify alkaloids bearing the galanthamine-type skeleton [12]. It has been found that Amaryllidaceae alkaloids, with a few exceptions, can be analyzed by GC–MS without any previous derivatization, and they show a mass spectral fragmentation pattern very similar to those recorded by direct insertion probe [13]. Furthermore, the high resolution ability of the capillary column allows the separation of more than 60–70 compounds from complex mixtures, while the identification of known alkaloids is achieved through the specific mass fragmentation by electron impact mass spectrometry (EI–MS) and retention indices using deconvolution software [14]. These features facilitate the development of an in-home spectral database of known compounds, allowing their rapid identification and the isolation of compounds showing unusual EI–MS fragmentations. Nevertheless, a drawback of GC–MS is the lack of information about some unstable compounds (or those in *N*-oxide form) together with the low stability of several molecular ions, as found in homolycorine-type alkaloids. Compounds such as haemanthamine may undergo thermal degradation and hence show different mass fragmentation under GC conditions [13].

* Corresponding author. Tel.: +34 934020268; fax: +34 934029043.

E-mail address: jaumbastida@ub.edu (J. Bastida).

The growing interest in Amaryllidaceae alkaloids after the therapeutic success of galanthamine has also prompted the study of these compounds using metabolomic approaches. GC–MS analysis was performed to investigate the alkaloid profile of *N. broussonetii*, a plant species with remarkable *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity. Since the dinitrogenous alkaloids obliquine, plicamine, and secoplicamine were not very well detected by GC–MS, they were also analyzed by LC–ESI–MS/MS.

The sole presence of pretazettine rather than tazettine in the methanolic macerates was confirmed by previous *N,O*-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) derivatization and also corroborated in *Narcissus* cultivars in which tazettine had been detected as the major alkaloid. The GC–MS/MS spectra of silylated tazettine and pretazettine are also discussed.

2. Experimental

2.1. Used chemicals and standards

Methanol (MeOH), diethyl ether (Et₂O), *n*-hexane (*n*-Hex), ethyl acetate (EtOAc), chloroform (CHCl₃), acetone (Me₂CO), sulfuric acid (H₂SO₄) and ammonia (NH₃) of analytical grade were used for the extraction and isolation procedure, being purchased from SDS (France). MeOH, CHCl₃, and acetic acid (MeCOOH) of HPLC grade were used in GC–MS (/MS) and HPLC procedures, being also purchased from SDS (France). Deuterated methanol (CD₃OD) and deuterated chloroform (CDCl₃) with trimethylsilane (TMS) as the internal standard were used for recording nuclear magnetic resonance (NMR) spectra. Tazettine and pretazettine isolated from *N. broussonetii* were used as positive standards for derivatization and/or GC–MS (/MS) study. The hydrocarbon mixture (C9–C36, Restek, Cat no. 31614) was supplied by Teknokroma (Spain). The solutions of BSTFA and pyridine were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. General experimental procedures

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded in a Varian Gemini 300 MHz or Varian VNMRS 400 MHz spectrometer. Chemical shifts were reported in δ units (ppm) and coupling constants (*J*) were expressed in Hz. A Jasco-J-810 Spectrophotometer was used to run CD spectra, all recorded in MeOH. Silica gel SDS chromagel 60 A CC (6–35 μ m) was used for vacuum liquid chromatography (VLC), and silica gel 60 F254 SDS for analytical and semi-preparative thin layer chromatography (TLC). Spots on chromatograms were detected under UV light (254 nm) and with Dragendorff's reagent.

2.3. Plant material

N. broussonetii Lag. was collected on Wad Mouzeg dar Bouaza beach, near Casablanca (Morocco), in October 2008. A voucher specimen was deposited at the University of Barcelona Herbarium (BCN 58745). *Narcissus* cultivars 'Toto' and 'Pencrebar' were obtained from Ludwig Ltd. (The Netherlands).

2.4. Extraction procedure

Fresh bulbs (2 kg) of *N. broussonetii* were macerated thoroughly with MeOH at room temperature for 48 h (4 \times 2.0 l), then the combined macerate was filtered and the solvent evaporated to dryness under reduced pressure. The bulb crude extract (70.7 g) was acidified to pH 3 with dilute H₂SO₄ (2%, v/v) and the neutral material was removed using Et₂O (4 \times 500 ml). EtOAc (4 \times 500 ml) was used to carry out a first alkaloid extraction in acid media but with negative results. The aqueous solution was basified up to pH 9–10 with NH₃

(25%, v/v) and extracted with *n*-Hex (5 \times 500 ml) to give the *n*-Hex extract (274 mg), followed by extraction with EtOAc (7 \times 500 ml) to provide the EtOAc extract (1.2 g). Finally, the basic solution was extracted with an EtOAc–MeOH mixture (3:1) but no alkaloids were detected.

A rapid alkaloid extraction was performed using 50 mg of dried bulbs from *Narcissus* cultivars 'Toto' and 'Pencrebar' in screw-top 1.5 ml Eppendorf tubes (6 tubes for each cultivar). The maceration procedure was carried out with 1 ml of MeOH adjusted to pH 8 with NH₃ (25%, v/v). After 2 h of extraction at room temperature assisted by 15 min ultrasonic baths every 30 min, the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 2 min. Three tubes of each cultivar were used for alkaloid extraction as follows: 500 μ l aliquots of methanolic macerate were acidified with 750 μ l of H₂SO₄ (2%, v/v) and the neutral material was removed with CHCl₃ (3 \times 700 μ l). The aqueous fraction was then basified with 250 μ l of NH₃ (25%, v/v) and the alkaloids were extracted with CHCl₃ (3 \times 700 μ l). Finally, the purified alkaloid extract was dried under N₂ and re-dissolved in 300 μ l of CHCl₃ for GC–MS analysis. The alkaloid extraction of *Narcissus* cultivars was carried out to confirm the presence of tazettine by GC–MS.

The other three glass tubes for each cultivar were reserved for the derivatization process, transferring aliquots of 500 μ l to vials to be dried under N₂. The derivatization method is explained below in Section 2.6.

2.5. GC–MS

The EI–MS spectra were obtained on an Agilent 6890N GC 5975 inert MSD operating in EI mode at 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A DB-5 MS column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m, Agilent Technologies) was used. The temperature program was: 100–180 °C at 15 °C min^{−1}, 1 min hold at 180 °C and 180–300 °C at 5 °C min^{−1} and 40 min hold at 300 °C. The injector temperature was 280 °C. The flow rate of carrier gas (helium) was 0.8 ml min^{−1}. The split ratio was 1:20 for the analysis of the *N. broussonetii* extracts, 1:10 for extracts from the *Narcissus* cultivars 'Toto' and 'Pencrebar', and 1:5 for isolated compounds.

2.6. Derivatization method

Five mg of the EtOAc extract from *N. broussonetii* was dissolved in 150 μ l of pyridine and derivatized with 150 μ l of BSTFA for 2 h at 70 °C. After cooling, 300 μ l of CHCl₃ was added and the samples were analyzed by GC–MS. Derivatization of the crude extracts from *Narcissus* 'Toto' and 'Pencrebar' was also carried out using the same method and quantities. For the GC–MS/MS study, one mg of pretazettine and tazettine were each dissolved in 200 μ l of pyridine and derivatized at 70 °C with 200 μ l of BSTFA for 2 h. The derivatized solution was diluted up to 1 ml with CHCl₃ and 100 μ l of diluted solution was evaporated to dryness with N₂ and dissolved in 300 μ l of CHCl₃ before GC–MS/MS injection.

2.7. GC–MS/MS

GC–MS/MS spectra were obtained on a Thermo Scientific Trace GC Ultra operating in EI mode at 70 eV coupled with an ITQ 900 Ion Trap detector (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, United Kingdom). An HP-5 MS column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m, Agilent Technologies) was used. The temperature program was: 180–300 °C at 5 °C min^{−1}, 1 min hold at 180 °C and 5 min hold at 300 °C. The flow rate of carrier gas (helium) was 0.8 ml min^{−1}. The analyses were carried out in splitless mode.

2.8. LC–ESI–LTQ–Orbitrap–MS

The LC–MS/MS analysis of the dinitrogenous alkaloids obliquine, plicamine, and secoplicamine were performed on an Accela LC (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, United Kingdom) system coupled with ESI–LTQ–Orbitrap–MS. The chromatographic method was optimized using a Luna C₁₈(2)–HST column (100 mm × 2.00 mm, 2.5 μm particle size; Phenomenex®, Torrance, CA, USA) at a constant solvent flow rate of 150 μl/min with aqueous MeCOOH (0.05%, v/v) as solvent A and MeOH (100%) as solvent B. An increasing linear gradient (v/v) of solvent B was applied (min, %B): (0, 55), (30, 65), (31, 100), (36, 55) and (46, 55). The compound obliquine and a mixture of plicamine and secoplicamine were dissolved in 100 μl CHCl₃ and a volume of 5 μl was injected for each.

An LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, United Kingdom) equipped with an ESI source in positive mode was used to acquire mass spectra of obliquine, plicamine, and secoplicamine in profile mode with a setting of 15,000 resolution at *m/z* 400. Operating parameters were as follows: source voltage, 3.5 kV; sheath gas, 40; auxiliary gas, 10 (arbitrary units); sweep gas, 10 (arbitrary units); and capillary temperature, 275 °C. The collision energy for MSⁿ experiments (expressed as a % of 5 V) varied between 20 and 80. The isolation width (*m/z*) was 2 and the Activation Q was 0.25 for all MSⁿ experiment. All the MSⁿ experiments were done using CID activation with the exception of the MS² spectra, which required a higher energy CID (HCD). The MS² spectra of secoplicamine were performed using both CID activation and HCD. The mass range was from *m/z* 100 to 600 in FTMS experiments. Calibration was done using LTQ Velos ESI positive ion calibration solution. Data analyses were performed using XCalibur software.

2.9. Identification of alkaloids by GC–MS

The alkaloids were identified by comparing their GC–MS spectra and Kovats retention indices (RI) with our own library database. This library has been continually updated and reviewed with alkaloids repeatedly isolated by our group and identified using other spectroscopic techniques such as NMR, UV, CD and MS [2,15–21]. The alkaloids pretazettine and homolycorine-*N*-oxide were identified after NMR experiments since they could not be identified by GC–MS analysis. Their NMR spectral data were in agreement with those previously reported [16,22]. Additionally, the dinitrogenous alkaloids obliquine, plicamine, and secoplicamine were isolated for the first time in a *Narcissus* species, being therefore added to our library database after their identification by 2D NMR experiments. Their spectral data were in agreement with those previously published [17,23]. Galanthindole was identified by comparison of its ¹H NMR data and EI mass fragmentation with those previously reported [24]. Mass spectra were deconvoluted using AMDIS 2.64 software (NIST). Kovats retention indices (RI) of the compounds were recorded with a standard calibration *n*-hydrocarbon mixture (C9–C36) using AMDIS 2.64 software.

The proportion of each individual compound in the alkaloid fractions analyzed by GC–MS (Table 1) is expressed as a percentage of the total alkaloids (TIC – total ion current). The area of the GC–MS peaks depends not only on the concentration of the corresponding compound but also on the intensity of their mass spectral fragmentation. Although data given in Table 1 do not express a real quantification, they can be used for a relative comparison of the alkaloids, which is the aim of this work.

2.10. Isolation of alkaloids

Nineteen alkaloids were obtained during the phytochemical isolation procedure. Homolycorine (4, 25 mg) and lycorine (1, 124 mg)

Table 1
GC–MS data for *Narcissus broussonetii* alkaloids. Values are expressed as a relative percentage of TIC.

Compound	R.T.	[M] ⁺	MS data	% in <i>n</i> -Hex	% in EtOAc
Ismine (19) ^{a,**}	19.28	257 (35)	238(100), 211(6), 196(8), 168(6), 154(3), 106(4), 77(3)	2.75	2.55
Triphaeridine (18) ^{a,**}	20.16	223 (100)	222(38), 167(8), 165(9), 164(14), 138(20), 137(9), 111(13)	0.19	0.27
O-Methylcorine (7) ^{a,**}	22.20	331 (-)	300(3), 191(8), 110(9), 109(100), 108(15), 94(3), 82(2), 42(2)	Traces	Traces
Anhydrolycorine (3) ^b	22.49	251 (43)	250(100), 192(13), 191(11), 165(4), 164(3), 139(2), 124(7)	Traces	Traces
Papiramine (9)/6- <i>epi</i> -papyramine (10) ^{a,**}	22.77	317 (-)	302(20), 301(100), 286(33), 270(34), 246(23), 231(73), 217(19), 123(22)	0.92	6.13
Galanthindole (20) ^{a,**}	22.83	281 (100)	280(7), 264(13), 263(17), 262(20), 252(15), 238(0.5), 204(7), 191(14), 132(8), 107(6)	8.32	0.15
Galanthindole (13) ^a	23.03	287 (97)	268(15), 244(32), 215(100), 203(56), 189(22), 128(23), 115(26), 71(11), 56(20)	-	Traces
6-Deoxytazettine (17) ^b	23.96	315 (21)	300(15), 260(5), 231(100), 227(10), 211(15), 197(10), 152(8), 115(9), 141(8)	0.10	Traces
Lycorine (6) ^{a,**}	24.17	317 (-)	299(3), 191(1), 179(1), 110(9), 109(100), 108(17), 94(2), 82(2), 44(4)	Traces	66.40
Tazettine (14) ^{a,**}	25.22	331 (31)	316(15), 298(23), 247(100), 230(12), 201(15), 181(11), 152(7)	20.30	Traces
Haemanthidine (11)/6- <i>epi</i> -haemanthidine (12) ^{a,**}	25.79	317 (59)	284(52), 233(48), 211(45), 201(80), 199(70), 181(69), 173(71), 115(100), 56(71)	Traces	Traces
Homolycorine (4) ^{a,**}	26.52	315 (-)	206(<1), 178(2), 109(100), 150(1), 108(22), 94(3), 82(3)	55.61	2.53
Lycorine (1) ^{a,**}	26.53	287 (31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)	1.15	2.35
8-O-Deethylhomolycorine (5) ^{a,**}	27.38	301 (-)	192(<1), 164(2), 110(8), 109(100), 108(23), 94(3), 82(3)	9.01	14.49
3- <i>epi</i> -Macrorine (16) ^{a,**}	27.42	329 (27)	314(23), 245(100), 225(14), 201(83), 139(16), 70(18)	1.18	3.50
2-O-Acetyllycorine (2) ^b	28.31	329 (16)	328(20), 270(34), 269(57), 268(83), 252(35), 251(33), 250(100), 226(55), 43(36)	Traces	Traces
Obliquine (21) [*]	47.25	448 (-)	342(22), 341(100), 327(4), 270(6), 258(7), 242(4), 212(2), 121(3), 107(4), 77(4)	-	0.77
Secoplicamine (23) [*]	49.43	464 (-)	432(100), 379(38), 348(23), 272(29), 253(22), 228(48), 216(39), 121(13), 107(13), 77(12)	-	Traces
Plicamine (22) [*]	54.92	462 (-)	355(34), 344(19), 343(100), 258(5), 254(4), 226(5), 139(2), 120(5), 107(5), 77(3)	-	Traces
				ap. 100	ap. 100

Identification: ^acompounds identified using in-home MS database; ^bNIST 05 database; recursive procedure, HR-MS and literature data. The compounds marked with * together with pretazettine (15) and homolycorine-*N*-oxide (8) were identified after isolation and NMR experiment. The compounds marked with ** were also isolated in the course of phytochemical procedure. Values less than 0.10 are described as "traces". R.T.: retention time.

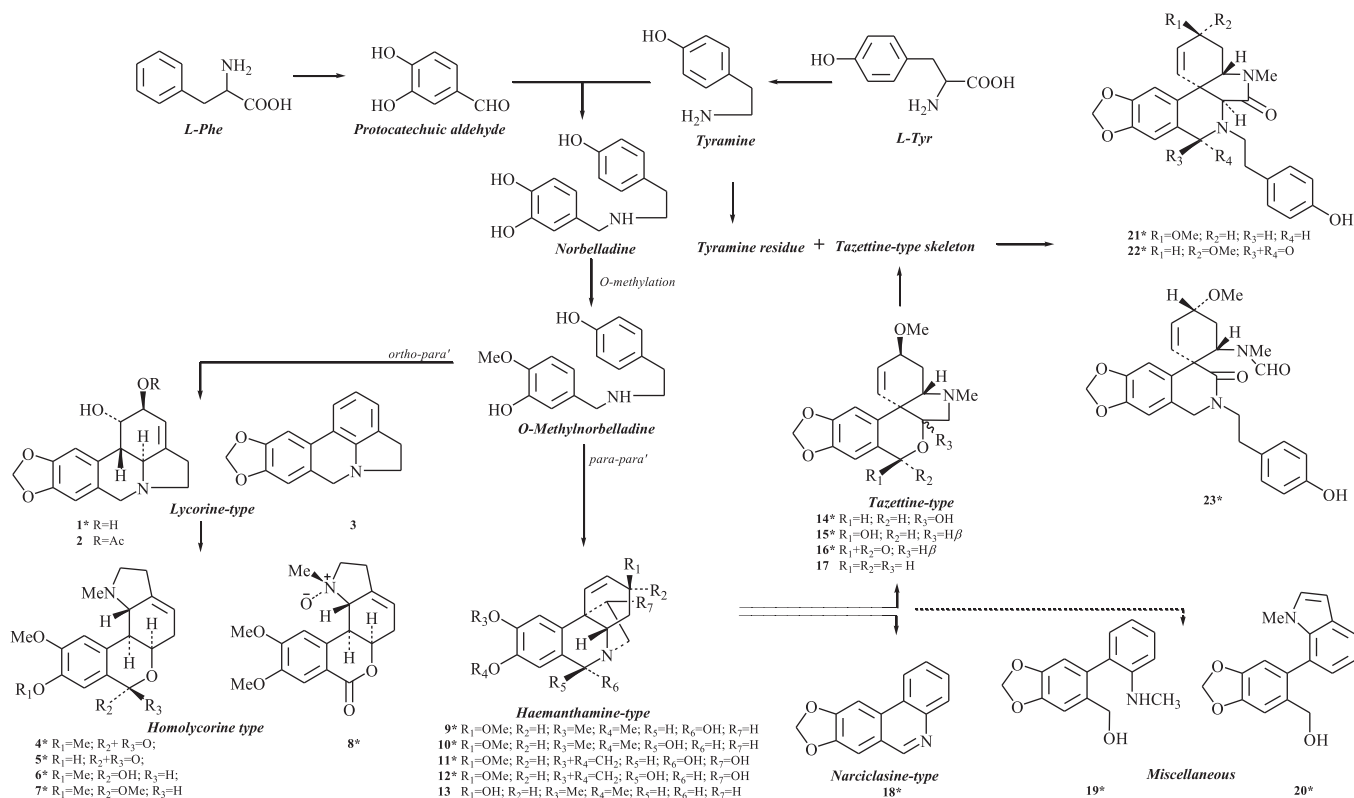


Fig. 1. Biogenetic pathway of the identified alkaloids in *Narcissus broussonetii*. * isolated alkaloids. The alkaloids are listed based in the skeleton-type [2]. ... → alkaloids classified as "Miscellaneous" due to still uncertain biogenesis.

precipitated spontaneously from the *n*-Hex and EtOAc extracts, respectively, after re-suspension in MeOH. The *n*-Hex extract was subjected to VLC (3 cm × 4.5 cm) over silica gel, eluting with *n*-Hex, EtOAc and EtOAc–MeOH (1:1, v/v) in increasing order of polarity. Fractions of 100 ml were collected (100 in total) and combined according to their TLC profiles monitored by UV light 254 nm and Dragendorff's reagent. From the first fractions (17–34) the alkaloids ismine (**19**, 4 mg), trisphaeridine (**18**, 2.5 mg) and again homolycorine (**4**, 9 mg) were isolated after purification by semi-preparative TLC using *n*-Hex–EtOAc (7:2, v/v). All remaining fractions from the *n*-Hex extract showed a similar alkaloid profile in GC–MS to those observed in the EtOAc extract and so were not purified and quantified.

The EtOAc extract was subjected to VLC (5 cm × 5 cm) over silica gel, eluting with *n*-Hex, EtOAc and EtOAc–MeOH (1:1, v/v) in increasing order of polarity. Fractions of 200 ml were collected (150 in total) and combined according to their TLC profiles monitored by UV light 254 nm and Dragendorff's reagent. Combined fractions were submitted to GC–MS and separately processed in three groups. From the first group (fractions 27–31), tazettine (**14**, 230 mg) precipitated spontaneously and obliquine (**21**, 7.2 mg) was isolated along with 3-*epi*-macronine (**16**, 5.4 mg) after optimization of a semi-preparative TLC using *n*-Hex–acetone–EtOAc (7:3:0.5, v/v/v). From the second group (fractions 32–43), plicamine (**22**) and secoplicamine (**23**), which were isolated as a mixture (7 mg), lycorenine (**6**, 2 mg), *O*-methyllycorenine (**7**, 1.5 mg) and tazettine (**14**, 40 mg) were isolated after purification using a semi-preparative TLC run with *n*-Hex–acetone–EtOAc (6:2:0.5, v/v/v). Lycorenine (**6**, 2.5 mg) and *O*-methyllycorenine (**7**, 2 mg) were purified once more by semi-preparative TLC using *n*-Hex–acetone–EtOAc (4:2:0.5, v/v/v). The last group (fractions 60–110, 350 mg) was submitted to a new VLC (3 cm × 4.5 cm) resulting in 100 fractions of 100 ml each. After purification by

semi-preparative TLC using EtOAc–acetone–MeOH (3:2:1, v/v/v), pretazettine (**15**, 7 mg), papyramine and 6-*epi*-papyramine (**9** and **10**, 5 mg), haemanthidine and 6-*epi*-haemanthidine (**11** and **12**, 3 mg) together with homolycorine-*N*-oxide (**8**, 1.5 mg) were isolated. Finally, using semi-preparative TLC optimized with an EtOAc–acetone–MeOH (3:0.5:1, v/v/v) mixture, 8-*O*-demethylhomolycorine (**5**, 5 mg) was isolated along with a trace of the alkaloid galanthindole (**20**, around 1 mg).

2.11. Antiprotozoal in vitro assay

T. cruzi. Rat skeletal myoblasts (L-6 cells) were seeded in 96-well microtiter plates at 2000 cells/well/100 ml in RPMI 1640 medium with 10% FBS and 2 mM L-glutamine. After 24 h, 5000 trypomastigotes of *T. cruzi* (Tulahuen strain C2C4 containing the β-galactosidase (Lac Z) gene) were added in 100 ml per well with 2 × of a serial drug dilution. The plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 4 days. For measurement of the IC₅₀, the substrate CPRG/Nonidet was added to the wells. The color reaction that developed during the following 2–4 h was read photometrically at 540 nm. IC₅₀ values were calculated from the sigmoidal inhibition curve.

Trypanosoma brucei rhodesiense. Serial drug dilutions in supplemented Minimum Essential Medium were added to microtiter plates. Trypomastigotes of *T. brucei rhodesiense* STIB 900 were added to each well and the plates were incubated for 72 h. Viability was assessed by Alamar Blue and read in a fluorescence scanner (Millipore Cytofluor 2300). Fluorescence development was expressed as a percentage of the control, and IC₅₀ values determined.

Leishmania donovani. Mouse peritoneal macrophages were seeded in RPMI 1640 medium with 10% heat-inactivated FBS into Lab-tek 16-chamber slides. After 24 h, *L. donovani* amastigote were added and the medium containing free amastigotes was replaced

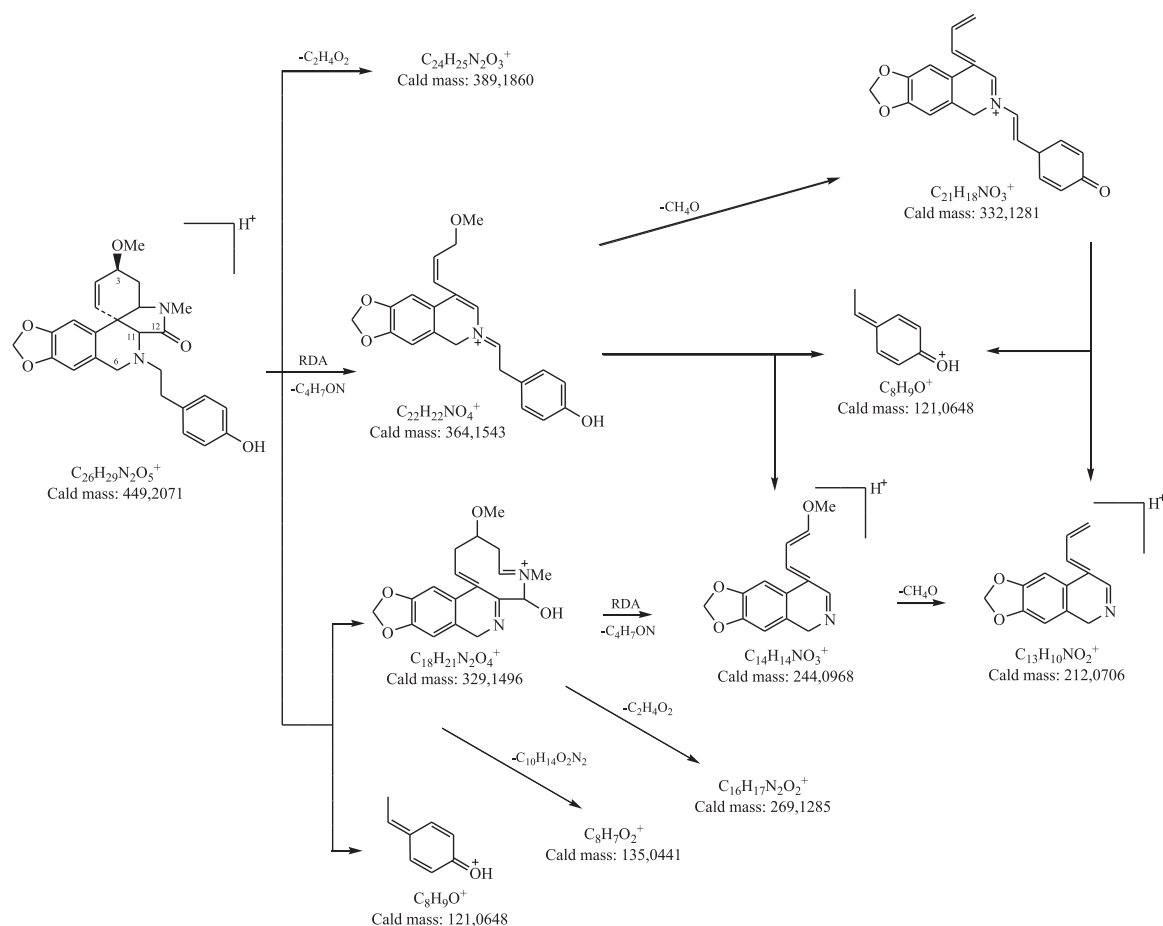


Fig. 2. Tentative fragmentation of obliquine (21).

by fresh medium 4 h later. The following day, the medium was replaced by fresh medium containing different drug concentrations. The slides were incubated at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere for 96 h. The ratio of infected to non-infected macrophages was determined microscopically, expressed as a percentage of the control and the IC₅₀ value calculated by linear regression.

Plasmodium falciparum. Antiplasmodial activity was determined using NF54 (sensitive to all known drugs) and K1 (resistant to chloroquine and pyrimethamine) strains of *P. falciparum*. Briefly, infected human red blood cells were exposed to serial drug dilutions in microtiter plates for 48 h. Viability was assessed by measuring the incorporation of [3H]-hypoxanthine by liquid scintillation counting. IC₅₀ values were calculated from the sigmoidal inhibition curves.

The EtOAc extract and the isolated alkaloids lycorine (1), tazettine (14), homolycorine (4), 8-*O*-demethylhomolycorine (5), *O*-methyllycorenine (7), papyramine/6-*epi*-papyramine (9 and 10) and obliquine (21) were evaluated against these protozoal parasites following the methodology mentioned above and published in previous work [25–27].

3. Results and discussion

3.1. GC–MS results

The *n*-Hex and EtOAc fractions showed compounds with EI-MS fragmentation patterns characteristic of Amaryllidaceae alkaloids. The GC–MS data from the *n*-Hex and EtOAc extracts are presented in Table 1 and the alkaloids are shown in Fig. 1. Lycorine (1), tazettine (14), homolycorine (4), and to a lesser extent,

8-*O*-demethylhomolycorine (5) and galanthindole (20) were the main alkaloids observed in *N. broussonetii*.

Tazettine (14) was the main alkaloid observed by GC–MS, isolated in a higher amount than any other alkaloid, although tazettine is in fact an artifact from pretazettine. Pretazettine showed no EI mass fragmentation under GC–MS conditions due to its rapid conversion to tazettine in the chromatographic column. A previous BSTFA-derivatization carried out in the present work was able to avoid this conversion (Section 3.3). Another notable divergence was observed with lycorine (1), which appeared at only 2.35% in the EtOAc extract analyzed by GC–MS due to its precipitation before injection into the chromatographic column. It should be emphasized that the quantities of each isolated alkaloid only refer to the amounts obtained, purified and quantified (Section 2.10). Not all the fractions were studied: those from the *n*-Hex extract, which was found to contain known alkaloids by GC–MS, were not quantified. A list of the alkaloids from *N. broussonetii* observed by GC–MS analysis is included in Table 1. However, it should be borne in mind that in these GC–MS studies: (i) alkaloids that precipitate could not be quantified accurately (lycorine and homolycorine); (ii) some alkaloids underwent thermal degradation (haemanthamine derivatives), and (iii) some alkaloids could not be detected without previous silylation (pretazettine).

The GC–MS results also showed the presence of compounds with unknown EI fragmentation patterns. The complete phytochemical procedure, therefore, allowed the isolation of the alkaloid obliquine (21, 7.2 mg), followed by the isolation of a mixture (7.0 mg) of plicamine (22) and secplicamine (23). The structures of these dinitrogenous alkaloids were elucidated by 2D NMR and high resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS). Compounds 22 and 23

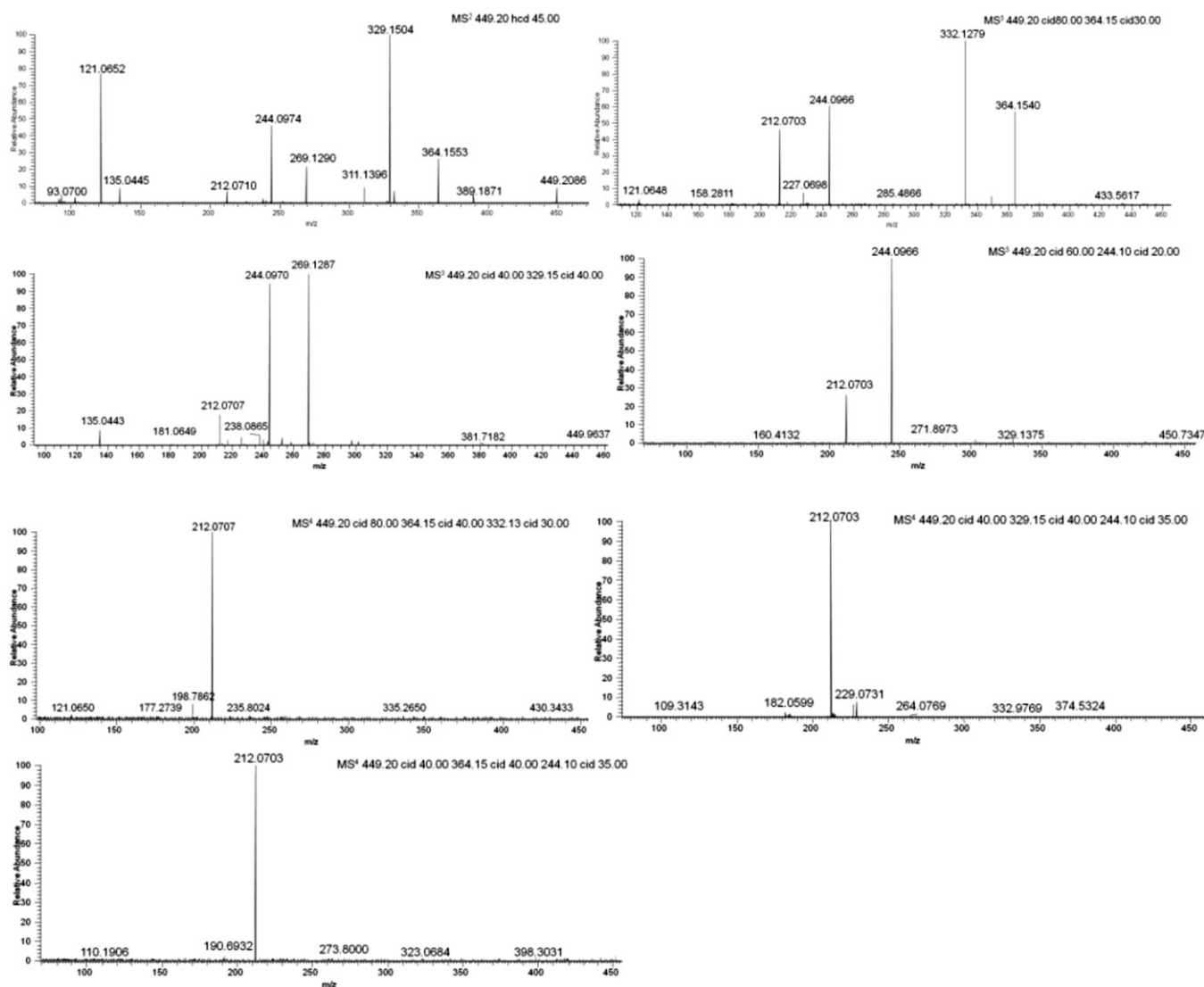


Fig. 3. ESI-MS/MS of the $[M+H]^+$ ions of obliquine (**21**).

have previously been found in *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* [23] and, together with **21**, in *Cyrthanthus obliquus* [17]. These compounds have an unusual modification in the basic tazettine-type skeleton, in which the oxygen atom at position 5 is replaced by a nitrogen atom, which has a pendant 4-hydroxyphenethyl moiety as a substituent. Biogenetically, this replacement probably occurs via aminoaldehyde followed by Schiff base formation with a tyramine molecule [23]. Galanthindole (**20**) is another example of an unusual compound that has been classified as a new skeleton-type [24], although the possibility that it is an artifact from the homolycorine series should be considered.

3.2. LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS

Under GC-MS conditions, dinitrogenous compounds eluted much later than the other alkaloids and their $[M]^+$ ions appeared in very low abundance (<1%). Due to the interesting skeletal arrangement presented by these alkaloids and the difficulties for their study by GC-MS, we performed an LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysis.

Compounds **21** and **22** have a closed ring D like tazettine and pretazettine, even though they have a carbonyl group at

C-12 forming a cyclic amide function. In contrast, compound **23** shows an open ring D with an *N*-methyl-*N*-formylamino moiety attached to C-4a and a carbonyl group at C-11. Considering the MS^n of the main fragments from compound **21**, the MS^2 [449.20 \rightarrow] showed the two most abundant ion peaks at m/z 329.1504 $[C_{18}H_{21}N_2O_4]^+$ and m/z 121.0652 $[C_8H_9O]^+$, which suggests that compound **21** initially tends toward losing the substituent 4-hydroxyphenethyl (see Figs. 2 and 3). All other fragments displayed less than 50% of relative abundance. In some fragments, the ion peaks at m/z 389.1871 $[C_{24}H_{25}N_2O_3]^+$ and m/z 364.1553 $[C_{21}H_{18}NO_3]^+$ are in agreement with the loss of 60 amu ($C_2H_4O_2$) and 85 amu (C_4H_7NO), respectively. The loss of 85 amu after a Retro-Diels Alder (RDA) process in ring C is in agreement with related compounds Latifaliumin A and B [29].

The MS^3 [449.20 \rightarrow 364.15] showed a very abundant fragment at m/z 332.1279 $[C_{21}H_{18}NO_3]^+$ along with less abundant peaks at m/z 244.0966 $[C_{14}H_{14}NO_3]^+$, m/z 212.0703 $[C_{13}H_{10}NO_2]^+$ and m/z 121.0648 $[C_8H_9O]^+$. Interestingly, the only abundant ion peak shown by MS^4 [449.20 \rightarrow 364.15 \rightarrow 332.13] was at m/z 212.0707. An ion peak at m/z 121.0650 was also observed, although in low abundance and these results suggest a straightforward fragmentation of

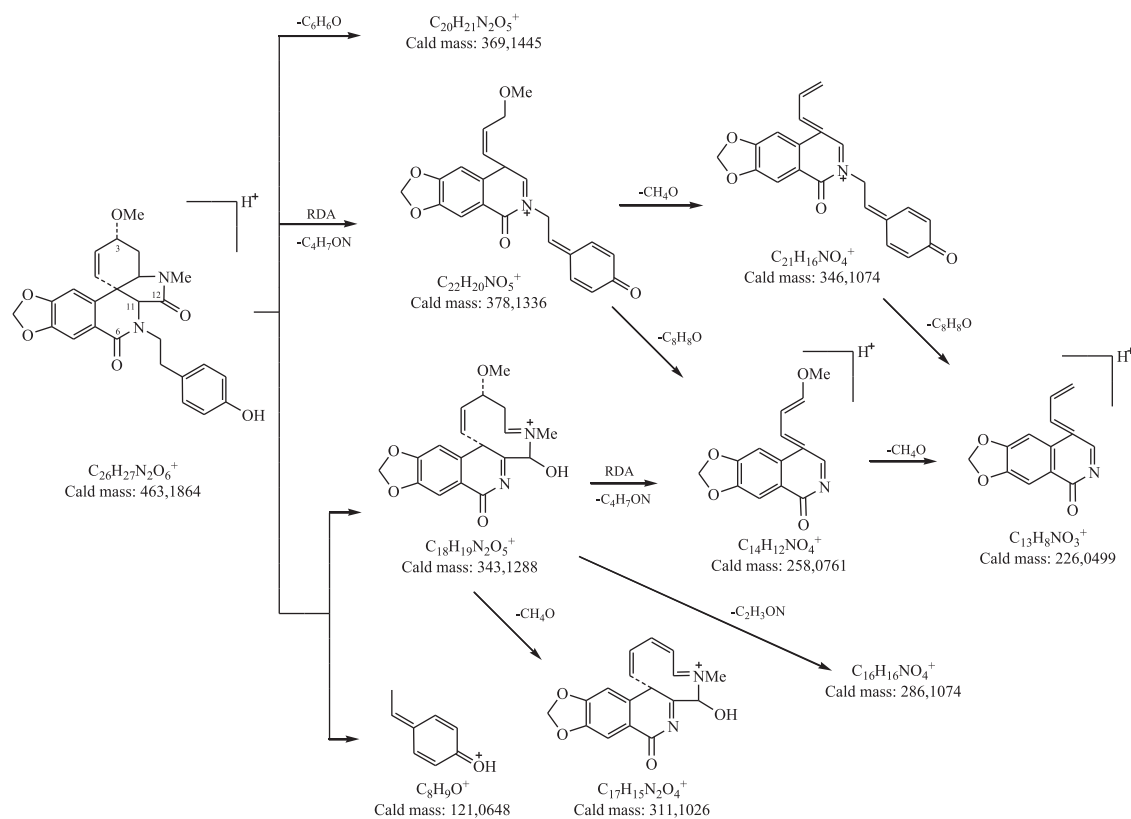


Fig. 4. Tentative fragmentation of plicamine (22).

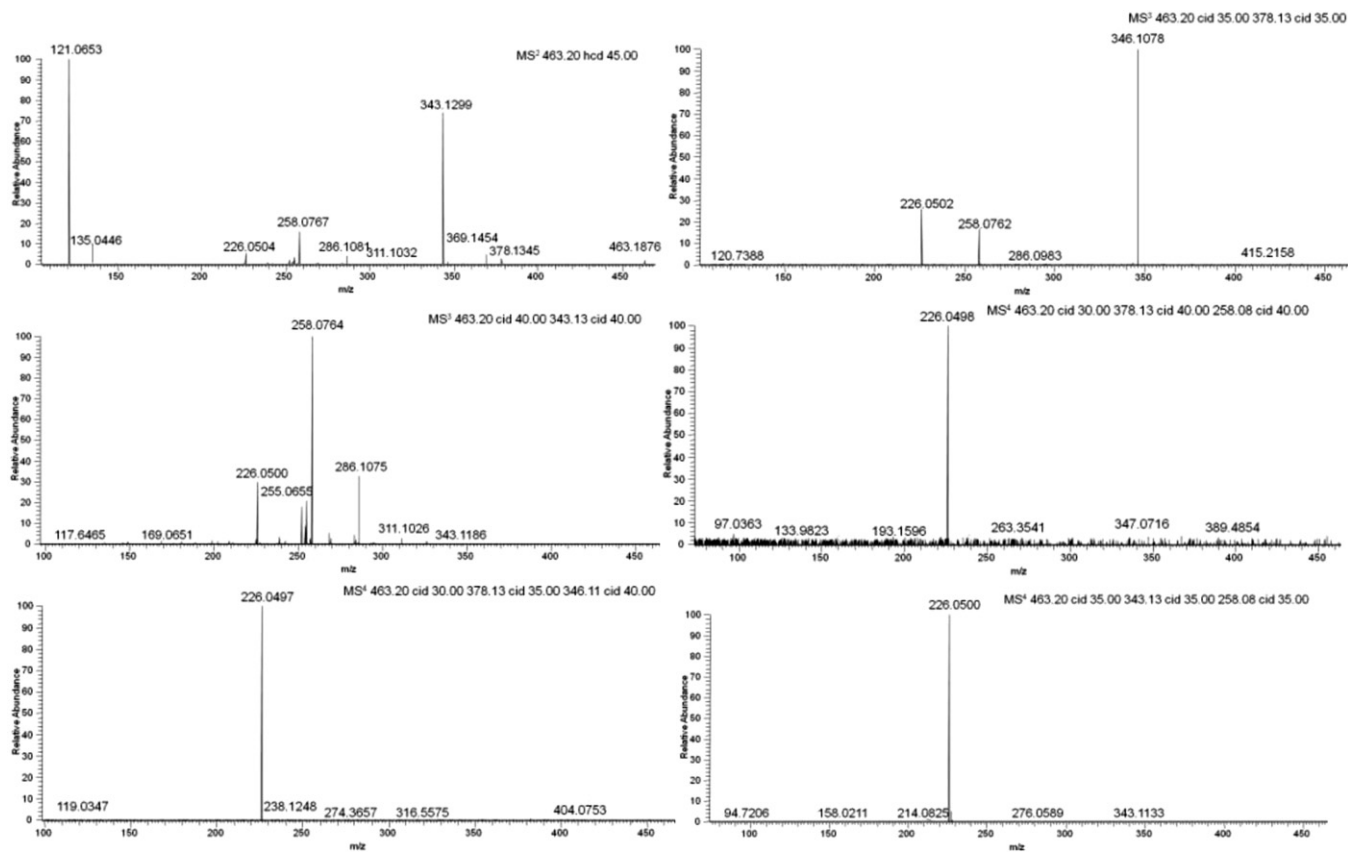


Fig. 5. ESI-MS/MS of the $[M+H]^+$ ions of plicamine (22).

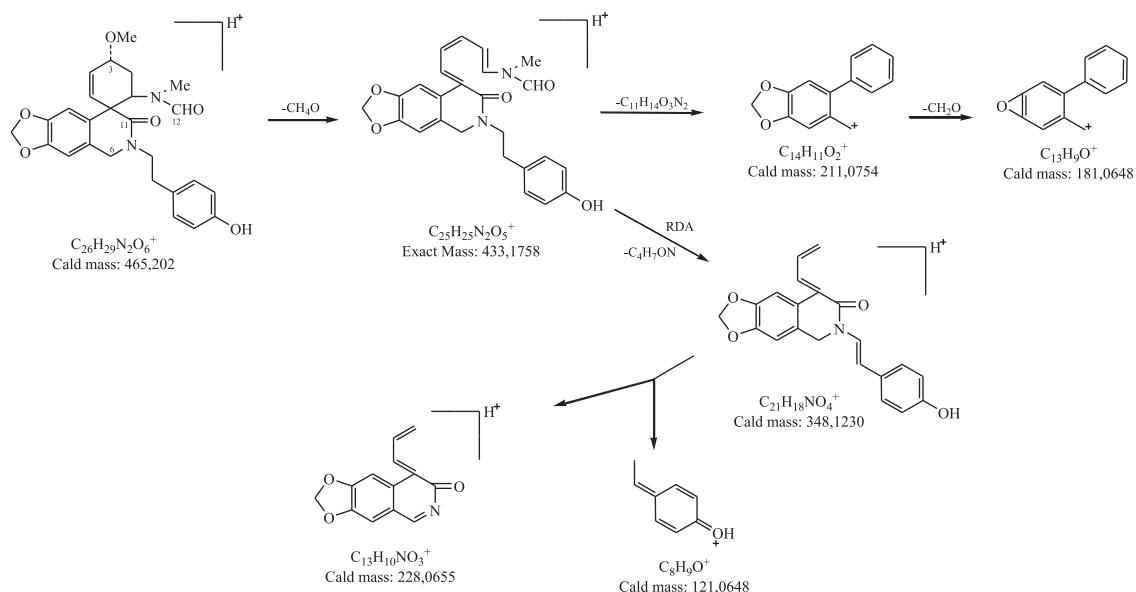


Fig. 6. Tentative fragmentation of secoplicamine (23).

m/z 332.1283 to m/z 212.0707 through the loss of the substituent 4-hydroxyphenethyl.

The MS^3 [449.20 \rightarrow 329.15] showed an ion peak at m/z 269.1287 [$C_{16}H_{17}N_2O_2$] $^+$, followed by ion peaks at m/z 244.0970 and m/z 212.0707. The fragment at m/z 269.1287 agrees with the loss of 60 amu ($C_2H_4O_2$) from the ion peak at m/z 329.15. The most interesting result was observed with the MS^4

spectra. The MS^4 [449.20 \rightarrow 329.15 \rightarrow 244.10] along with MS^4 [449.20 \rightarrow 364.15 \rightarrow 244.10] spectra showed the ion peak at m/z 212.0703, which means that the fragment [$C_{13}H_{10}NO_2$] $^+$ (calculated mass of 212.0706) arose from three different routes, since it was also observed in MS^4 [449.20 \rightarrow 364.15 \rightarrow 332.13] spectra. The very minor fragment at m/z 135.0443 [$C_8H_7O_2$] $^+$ coming from the ion peak at m/z 329.15 was also observed, as in other related

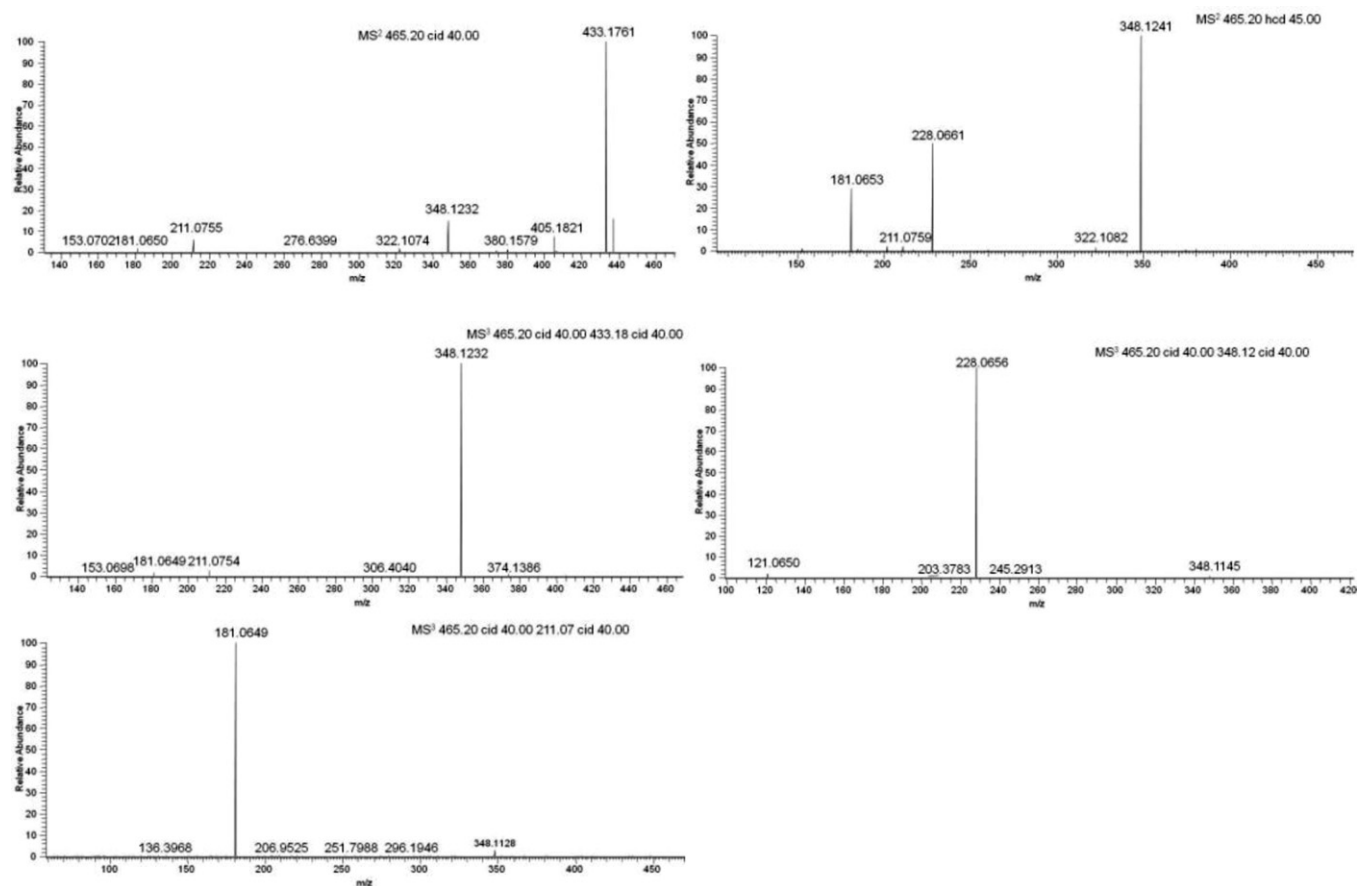


Fig. 7. ESI-MS/MS of the $[M+H]^+$ ions of secoplicamine (23).

compounds [29]. All the proposed fragments showed an error of around ± 1 mDa (Fig. 2).

A carbonyl group at C-6 and the methoxy substituent at the α -position at C-3 are the only differences presented by compounds **21** and **22**. Again, the loss of the 4-hydroxyphenethyl substituent gave ion peaks at m/z 121.0653 [C_8H_9O] $^+$ and m/z 343.1299 [$C_{18}H_{19}N_2O_5$] $^+$ as was observed in the MS² of compound **22** (see Figs. 4 and 5). This first fragmentation seemed to be more predominant for compound **22** than compound **21** since the remaining fragments showed no more than 20% of relative abundance using the same collision energy in both cases. Other similarities were observed in their fragmentation mode. The MS² [463.20 \rightarrow] spectra showed minor fragments at m/z 378.1345 [$C_{22}H_{20}NO_5$] $^+$, m/z 258.0767 [$C_{14}H_{12}NO_4$] $^+$ and m/z 226.0504 [$C_{13}H_8NO_3$] $^+$. The MS³ [463.20 \rightarrow 378.13] showed ion peaks at m/z 346.1078 [$C_{21}H_{16}NO_4$] $^+$, m/z 258.0762 and m/z 226.0502. The MS⁴ [463.20 \rightarrow 378.13 \rightarrow 346.11] along with MS⁴ [463.20 \rightarrow 378.13 \rightarrow 258.08] and MS⁴ [463.20 \rightarrow 343.13 \rightarrow 258.08] spectra only showed an ion peak at m/z 226.05 (m/z 226.0497, m/z 226.0498 and m/z 226.0500, respectively), confirming that they yielded the same fragment [$C_{13}H_8NO_3$] $^+$ through different routes, which was in agreement with a calculated mass of 226.0499 amu. In the case of the fragmentation of the ion peaks at m/z 378.13 and m/z 346.11, the substituent 4-hydroxyphenethyl should be eliminated as neutral loss. It was also difficult to observe this ion peak in the MS³ and MS⁴ of compound **21**. Other very small fragments were observed in the MS², such as the ion peak at m/z 369.1454 [$C_{20}H_{21}N_2O_5$] $^+$ and m/z 311.1032 [$C_{17}H_{15}N_2O_4$] $^+$. The ion peak at m/z 369.1454 is in agreement with the loss of C_6H_6O residue and the ion peak at m/z 311.1026 was observed in the MS³ [463.20 \rightarrow 343.13], which is in agreement with the loss of a methanol residue. All the proposed fragments showed an error of around ± 1 mDa (Fig. 4).

The MS² [465.20 \rightarrow] for compound **23** showed an abundant ion peak at m/z 433.1761 [$C_{25}H_{25}N_2O_5$] $^+$ and minor fragments at m/z 348.1232 [$C_{21}H_{18}NO_4$] $^+$ and m/z 211.0755 [$C_{14}H_{11}O_2$] $^+$ (see Figs. 6 and 7). The first loss of the 4-hydroxyphenethyl observed in compounds **21** and **22** was not observed in compound **23**, even when applying stronger collision energy. The ion peak at m/z 433.1761 was formed after the loss of a methanol residue from the methoxy group at C-3. The ion peak at m/z 348.1232 arose from m/z 433.18 after an RDA process in ring C, which led to the loss of [C_4H_7NO] residue. This sequence is suggested by the MS³ [465.20 \rightarrow 433.18]. A careful look at this fragmentation revealed very small ion peaks at m/z 211.0754 and m/z 181.0649 [$C_{13}H_9O$] $^+$. The MS³ [465.20 \rightarrow 211.07] spectra confirmed that the ion peak at m/z 181.0649 arose from m/z 211.07. Both these ion peaks are

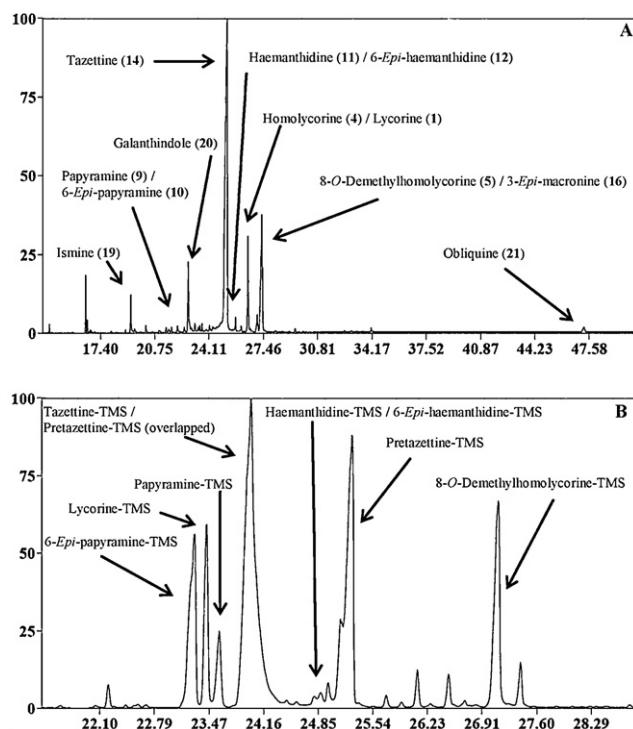


Fig. 8. (A) GC-MS chromatogram of EtOAc extract with main alkaloids identified. (B) Section of chromatogram of TMS-derivatized EtOAc extract with identification of silylated tazettine and pretazettine along with 6-epimers of papyramine and haemanthidine.

well-known fragments from tazettine, crinine and haemanthamine-type alkaloids [28,29]. Regarding the ion peak at m/z 348.1232, the MS³ [465.20 \rightarrow 348.12] showed the presence of both fragments at m/z 228.0656 [$C_{13}H_{10}NO_3$] $^+$ and m/z 121.0650 [C_8H_9O] $^+$, which was indicative of the loss of 4-hydroxyphenethyl residue. The fragments proposed for **23** are shown in Fig. 6 with an error of around ± 1 mDa.

3.3. BSTFA-derivatization

Tazettine (**14**), one of the most widely distributed Amaryllidaceae alkaloids, is considered to be an artifact from pretazettine due to a rearrangement during the routine acid-base alkaloid extraction [30,31]. In the course of the phytochemical procedure tazettine was isolated as a major alkaloid although a small quantity

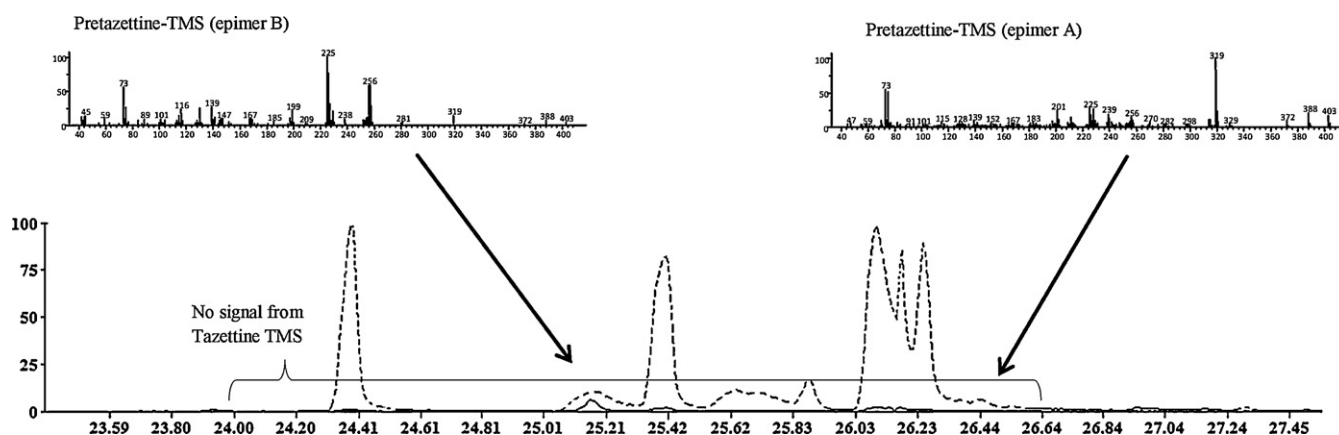


Fig. 9. Chromatogram of *Narcissus* cultivar 'Toto' with selected ions at m/z 256 (continuous line) and m/z 319 (discontinuous line). In detail, identification of epimers A and B of pretazettine-TMS. No signal from tazettine-TMS was observed.

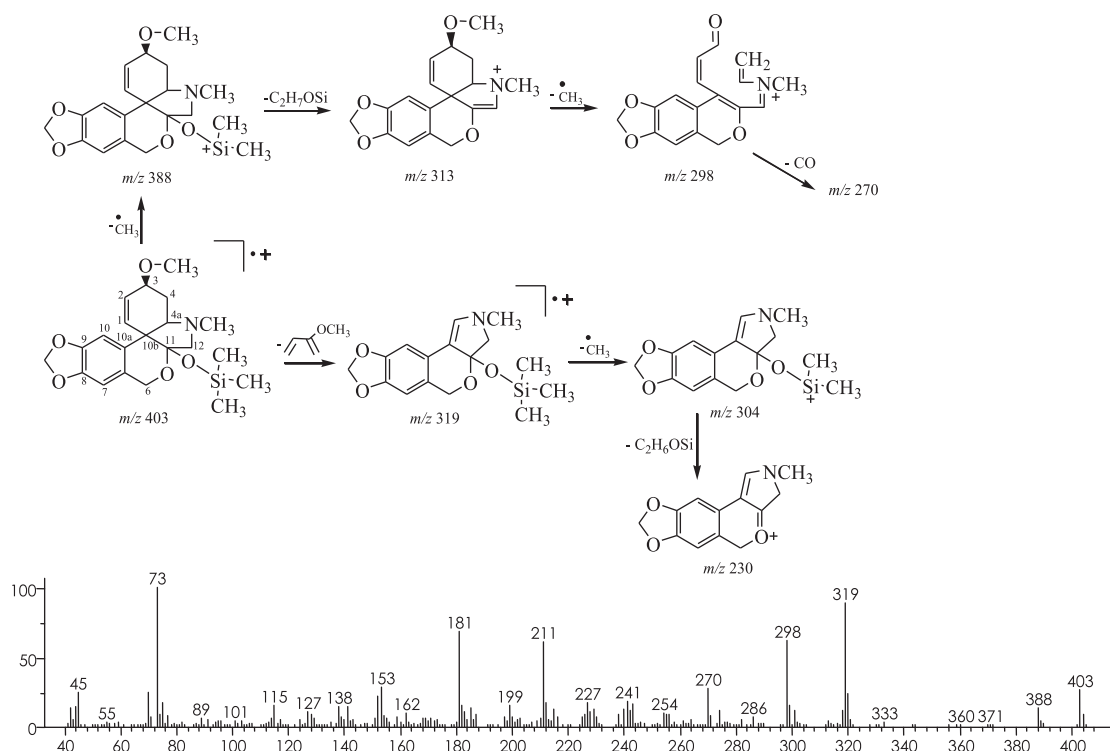


Fig. 10. Tentative fragmentation of tazettine-TMS assigned after GC-MS/MS experiments.

of pretazettine (**15**, 7 mg) was also isolated and identified by NMR. Pretazettine shows an EI mass fragmentation and retention index identical to those observed in tazettine, which indicates that it also converts to tazettine in GC-MS analysis.

The well-known instability of pretazettine, especially in strong basic conditions, is due to its *trans* B–D ring fusion resulting in a relatively strained molecule, while the *cis* B–D fusion of tazettine allows more flexibility. The driving force for the B-ring opening would appear to be the relief of this internal strain. The completion of the rearrangement may be considered an intramolecular crossed-Cannizzaro reaction with subsequent hemiacetal formation [31,32]. The BSTFA-derivatization introduces a bulky group as a substituent at position 6, thus blocking the reaction. It is accepted that pretazettine is converted into tazettine in extraction processes, although the presence of small quantities of tazettine in the initial plant extract cannot be ruled out. Aiming to clarify their detection, we submitted the isolated tazettine and pretazettine together with both alkaloid and crude methanolic extracts to a derivatization process. Fig. 8 compares the EtOAc extract before and after the derivatization process and pretazettine-TMS was only identified after derivatization.

To check the presence of tazettine in the crude extract, a rapid maceration in MeOH was carried out with bulbs of *N. broussonetii* and two *Narcissus* cultivars “Toto” and “Pencrebar” previously found to contain important quantities of tazettine by GC-MS. This extraction procedure, with a slightly basic pH (pH 8) and ultrasonic bath-assisted, is frequently used in metabolomic studies [11]. In the silylated crude extracts of both *Narcissus* cultivars and *N. broussonetii*, no peak for silylated tazettine was observed, which strongly suggests that 100% of the tazettine arose from pretazettine (Fig. 9). Previously published work [30,31] has raised this hypothesis, but the unique presence of pretazettine as a real metabolite in the crude plant extract (without any traces of tazettine) has been confirmed here for the first time using analytical methods.

3.4. GC-MS/MS

Silylated tazettine and pretazettine demonstrated different fragmentation patterns by GC-MS/MS analysis. Tazettine-TMS displayed a molecular ion peak at m/z 403, a base peak at m/z 319 and an abundant peak at m/z 298. Its MS fragmentation, rationalized following Duffield et al. [28], is proposed in Fig. 10. GC-MS/MS experiments showed that the ion fragment at m/z 388 is formed from the molecular ion as a result of the loss of a methyl group, most probably from the O-TMS substituent at position 11, while the base peak at m/z 319 appeared after an RDA process in ring C. Further loss of $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ from the ion fragment at m/z 388 produced an ion at m/z 313, from which the ion at m/z 298 arose after the loss of a methyl radical. The loss of 28 amu from the m/z 298 corresponded to a CO group, which led to a fragment at m/z 270. An MS/MS experiment with the ion at m/z 319 displayed peaks at m/z 304 and m/z 230 with low abundance, which was in agreement with the loss of a methyl radical from O-TMS together with the subsequent expulsion of dimethylsilane residue.

Although the ^1H NMR of pretazettine confirmed the purity of the sample, two peaks with similar fragmentation patterns were observed by GC-MS, differing only in the relative abundance of fragments. This suggests the co-existence of C-6 epimers of pretazettine, as reported in alkaloids bearing crinine- and haemanthamine-type skeletons [16,31]. In the GC-MS spectrum of epimer A (Fig. 11) of silylated pretazettine, a molecular ion peak was observed at m/z 403 along with a base and abundant peak at m/z 319 and m/z 388, respectively. The GC-MS/MS data for pretazettine showed that, similarly to tazettine, the ions at m/z 388 and m/z 319 arose from the molecular ion (at m/z 403). The ion peak at m/z 388 may also be formed after the loss of a methyl radical from the methoxyl group at C-3. Further elimination of the $(\text{CH}_3)_3\text{SiO}$ residue resulted in the formation of an ion at m/z 298 from which an ion fragment at m/z 256 was formed after the loss of $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$. The MS spectrum of pretazettine showed a characteristic

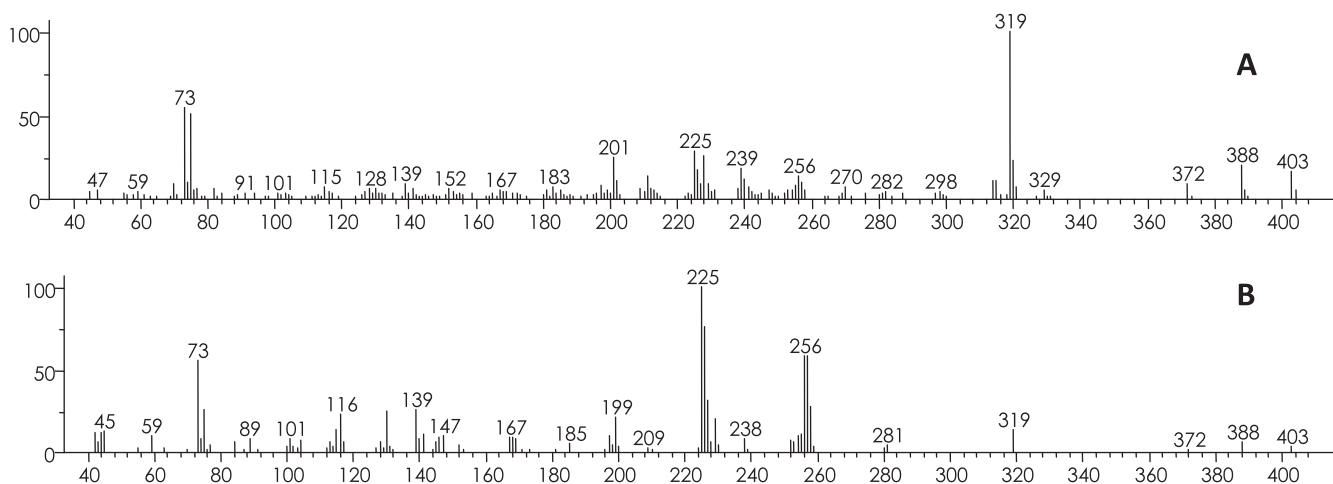
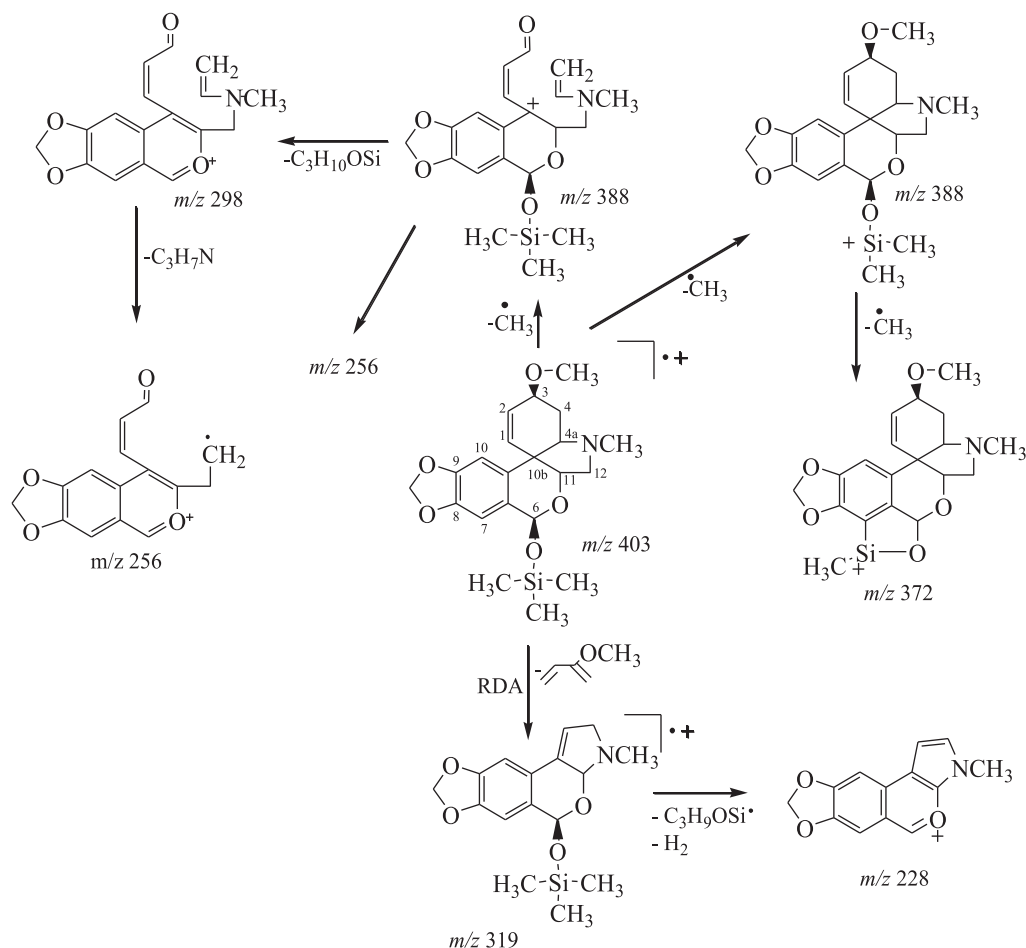


Fig. 11. Tentative fragmentation of the epimer (A) and epimer (B) from pretazettine-TMS assigned after GC-MS/MS experiments.

ion at m/z 372 $[M-31]^+$ arising from the ion at m/z 388 $[M-15]^+$, indicating a cyclization process [33]. This rearrangement process has been frequently observed in silylated hydroxypyrene derivatives showing an aromatic ring at the alpha position of the carbon that bears the hydroxyl group undergoing the silylation reaction [34,35]. A tentative fragmentation of pretazettine assigned after GC-MS/MS analysis is presented in Fig. 11.

3.5. In vitro assay

The EtOAc extract and some isolated compounds were tested against the parasitic protozoa *T. cruzi*, *T. brucei rhodesiense*, *L. donovani* and *P. falciparum*. This assay was performed as described by Labraña et al. [27]. Only the EtOAc extract showed significant *in vitro* activity against *T. cruzi*, with an IC_{50} of 1.77 $\mu\text{g/ml}$

(ref. value of 0.349 µg/ml for Benznidazole). Although the alkaloid-rich extract demonstrated notable activity, the main alkaloids tazettine (**14**), lycorine (**1**) and homolycorine (**4**), and those found to a lesser extent, such as 8-*O*-demethylhomolycorine (**5**), *O*-methyllycorine (**7**), papyramine/6-*epi*-papyramine (**9** and **10**) and obliquine (**21**), showed no significant activity against *T. cruzi*.

4. Conclusion

The alkaloids identified in *N. broussonetii* are commonly found in *Narcissus* species, with the exception of galanthindole and the dinitrogenous obliquine, plicamine, and secoplicamine, which are reported here for the first time in the *Narcissus* genus. The main alkaloids were lycorine, homolycorine and tazettine (arising from pretazettine). Also noteworthy is the absence of crinine-type alkaloids in this plant species, as occurs in all the *Narcissus* species studied to date.

The alkaloids obliquine, plicamine, and secoplicamine, along with some related compounds, have been the subject of several total syntheses, prompted by the particular interest of their distinctive dinitrogenous skeletal arrangement [36,37]. GC–MS/MS analysis of dinitrogenous alkaloids using BSTFA-derivatization was carried out to improve their elution and detection, but without any success. Using an LC–ESI–LTQ–Orbitrap–MS a very similar fragmentation mode was observed for obliquine and plicamine, which yielded the fragments $[C_{13}H_{10}NO_2]^+$ and $[C_{13}H_8NO_3]^+$, respectively, through different routes. The compounds obliquine and plicamine showed a very similar structure, particularly with respect to the closed ring D, which seemed to influence their fragmentation pattern, since the fragments corresponding to the loss of the substituent 4-hydroxyphenethyl appeared as base peaks. Otherwise, the compound secoplicamine showed a pendant 4-hydroxyphenethyl moiety on the core structure and the remaining fragments presented very low abundance.

It is accepted that the conversion of pretazettine to tazettine in a routine alkaloid extraction is near total, without ruling out the presence of small quantities of tazettine in the initial plant extract. A BSTFA-derivatization step confirmed that all the tazettine present in the plant extract arose from pretazettine, and was therefore absent as a natural alkaloid. The crude methanolic extract obtained by a fast extraction in a slightly basic environment from *N. broussonetii* and two *Narcissus* cultivars previously found to contain tazettine as a major alkaloid revealed the sole presence of pretazettine.

As part of an ongoing project on the chemical aspects of Amaryllidaceae alkaloids, silylated pretazettine and tazettine were submitted to an MS/MS study. In contrast with the dinitrogenous alkaloids, the GC–MS/MS analysis proved to be an important tool for the study of their fragmentation. Silylated tazettine and pretazettine showed distinct fragmentation routes in GC–MS/MS, although a Retro-Diels Alder process formed the base peak at *m/z* 319 in both.

Finally, *N. broussonetii* exhibited important *in vitro* activity against *T. cruzi*, which could be due to a synergic action of some of the identified alkaloids, since they showed no significant activity when tested individually.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Generalitat de Catalunya (2009 – SGR1060) for financial support of this work. The authors are also thankful to the SCT-UB technicians, mainly Dr. Asunción Marín, Dr. Alberto Adeva and Dr. Olga Jáuregui for performing GC/MS and LC–ESI–MS spectra, as well for Dr. Marcel Kaiser and Prof. Reto Brun for antiprotozoal studies. Special thanks to Prof. Mohammed

Benaissa and Dr. Abdelaziz Elamrani for their helpful collaboration in the collection of *N. broussonetii* and Dr. Nehir Ünver for providing us with the 1H NMR and EI–MS spectra of galanthindole. J.P.A. is thankful to the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (BECAS-MAEC-AECID) for a doctoral fellowship.

References

- [1] S. López, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts, *Life Sci.* 71 (2002) 2521–2529.
- [2] J. Bastida, R. Lavilla, F. Viladomat, Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids, in: G. Cordell (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2006, pp. 87–179.
- [3] E.J. Osorio, S.M. Robledo, J. Bastida, Alkaloids with antiprotozoal activity, in: G. Cordell (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2008, pp. 113–190.
- [4] J. McNulty, J.J. Nair, C. Codina, J. Bastida, S. Pandey, J. Gerasimoff, C. Griffin, Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids, *Phytochemistry* 68 (2007) 1068–1074.
- [5] J. McNulty, J.J. Nair, J. Bastida, S. Pandey, C. Griffin, Structure–activity studies on the lycorine pharmacophore: a potent inducer of apoptosis in human leukemia cells, *Phytochemistry* 70 (2009) 913–919.
- [6] I. Zupkó, B. Réthy, J. Hohmann, J. Molnár, I. Ocsovszki, G. Falkay, Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species, *In Vivo* 23 (2009) 41–48.
- [7] J. McNulty, J.J. Nair, M. Singh, D.J. Crankshaw, A.C. Holloway, J. Bastida, Selective cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of Amaryllidaceae alkaloids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 3233–3237.
- [8] R. Gotti, J. Fiori, M. Bartolini, V. Cavrini, Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC–MS and capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 17–24.
- [9] S. Berkov, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, Analysis of galanthamine-type alkaloids by capillary gas chromatography–mass spectrometry in plants, *Phytochem. Anal.* 19 (2008) 285–293.
- [10] L. Torras-Claveria, S. Berkov, O. Jáuregui, J. Caujapé, F. Viladomat, C. Codina, J. Bastida, Metabolic profiling of bioactive *Pancreum canariense* extracts by GC–MS, *Phytochem. Anal.* 21 (2010) 80–88.
- [11] S. Berkov, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, Development and validation of a GC–MS method for a rapid determination of galanthamine in *Leucorum aestivum* and *Narcissus* ssp.: a metabolomic approach, *Talanta* 83 (2011) 1455–1465.
- [12] T. Verhaeghe, L. Diels, R. de Vries, M. De Meulder, J. de Jong, Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for the determination of galanthamine in human heparinised plasma, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 789 (2003) 337–346.
- [13] M. Kreh, R. Matusch, L. Witte, Capillary gas chromatography–mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids, *Phytochemistry* 38 (1995) 773–776.
- [14] C. Wagner, M. Seřkow, J. Kopka, Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI–TOF–MS metabolite profiles, *Phytochemistry* 62 (2003) 887–900.
- [15] F. Viladomat, J. Bastida, G. Tribó, C. Codina, M. Rubiralta, Alkaloids from *Narcissus bicolor*, *Phytochemistry* 29 (1990) 1307–1310.
- [16] J. Bastida, C. Codina, F. Viladomat, M. Rubiralta, J.C. Quirion, H.P. Husson, G. Ma, *Narcissus* alkaloids XIII. Complete assignment of the NMR spectra of papyramine and 6-*epi*-papyramine by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Nat. Prod.* 53 (1990) 1456–1462.
- [17] N.D. Brine, W.E. Campbell, J. Bastida, M.R. Herrera, F. Viladomat, C. Codina, P.J. Smith, A dinitrogenous alkaloid from *Cyrtanthus obliquus*, *Phytochemistry* 61 (2002) 443–447.
- [18] A.K. Machocho, J. Bastida, C. Codina, F. Viladomat, R. Brun, S.C. Chhabra, Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*, *Phytochemistry* 65 (2004) 3143–3149.
- [19] S. Berkov, C. Codina, F. Viladomat, J. Bastida, Alkaloids from *Galanthus nivalis*, *Phytochemistry* 68 (2007) 1791–1798.
- [20] S. Berkov, R. Reyes-Chilpa, C. Codina, F. Viladomat, J. Bastida, Revised NMR data for incartine: an alkaloid from *Galanthus elwesii*, *Molecules* 12 (2007) 1430–1435.
- [21] S. Berkov, J. Bastida, B. Sidjimova, F. Viladomat, C. Codina, Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): a case study, *Biochem. Syst. Ecol.* 36 (2008) 638–645.
- [22] R. Suau, A.I. Gómez, R. Rico, M.P. Vázquez Tato, L. Castedo, R. Riguera, Alkaloid *N*-oxides of Amaryllidaceae, *Phytochemistry* 27 (1988) 3285–3287.
- [23] N. Ünver, T. Gözler, N. Walch, B. Gözler, M. Hesse, Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* (Amaryllidaceae), *Phytochemistry* 50 (1999) 1255–1261.
- [24] N. Ünver, G.I. Kaya, C. Werner, R. Verpoorte, B. Gözler, Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*, *Planta Med.* 69 (2003) 869–871.
- [25] R.G. Ridley, W. Hofheinz, H. Matile, C. Jacquet, A. Dorn, R. Masciadri, S. Jolidon, W.F. Richter, A. Guenzi, M.A. Girometta, H. Urwyler, W. Huber, S. Thaitong, W. Peters, 4-Aminoquinolone analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 1846–1854.

- [26] B. Ráz, M. Iten, Y. Grether-Bühler, R. Kaminsky, R. Brun, The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*) in vitro, *Acta Trop.* 68 (1997) 139–147.
- [27] J. Labraña, A.K. Machocho, V. Kricsfalusy, R. Brun, C. Codina, F. Viladomat, J. Bastida, Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae), *Phytochemistry* 60 (2002) 847–852.
- [28] A.M. Duffield, R.T. Aplin, H. Budzikiewicz, C. Djerassi, C.F. Murphy, W.C. Wildman, Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXXII. A study of the fragmentation of some Amaryllidaceae alkaloids, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 4902–4912.
- [29] X. Zhang, H. Huang, X. Liang, H. Huang, W. Dai, Y. Shen, S. Yan, W. Zhang, Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2903–2916.
- [30] W.C. Wildman, D.T. Bailey, Pretazettine, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 5514–5515.
- [31] W.C. Wildman, D.T. Bailey, Amaryllidaceae interconversions. Partial synthesis of [2]benzopyrano[3,4-c]indoles, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 150–157.
- [32] W.C. Wildman, D.T. Bailey, Novel alkaloids containing the [2]benzopyrano[3,4-c]indole nucleus, *J. Org. Chem.* 33 (1968) 3749–3753.
- [33] J. Jacob, A. Schmoldt, G. Grimmer, Influence of monooxygenase inducers on the metabolic profile of phenanthrene in rat liver microsomes, *Toxicology* 25 (1982) 333–343.
- [34] G. Gmeiner, P. Gärtner, C. Krassnig, H. Tausch, Identification of various urinary metabolites of fluorene using derivatization solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 766 (2002) 209–218.
- [35] C. Schummer, O. Delhomme, B.M.R. Appenzeller, R. Wennig, M. Millet, Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis, *Talanta* 77 (2009) 1473–1482.
- [36] I.R. Baxendale, S.V. Ley, M. Nessi, C. Piutti, Total synthesis of the Amaryllidaceae alkaloid (+)-plicamine using solid-supported reagents, *Tetrahedron* 58 (2002) 6285–6304.
- [37] I.R. Baxendale, S.V. Ley, Synthesis of the alkaloid natural products (+)-plicane and (–)-obliquine, using polymer-supported reagents and scavengers, *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (2005) 8588–8592.

3.4. Artículo 3 - Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*

Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. *Phytochemistry*, 103, 188-195 (2014).

Hippeastrum aulicum Herb. (370 g de bulbos secos) e *Hippeastrum calyptratum* Herb. (135 g de bulbos secos) se recolectaron en Cunha, provincia de São Paulo (Brasil). A partir de los bulbos secos de ambas especies se procedió a la extracción de alcaloides. En el análisis por GC-MS se pudieron detectar algunas estructuras que posiblemente correspondían a nuevos compuestos. Las fracciones obtenidas de la extracción fueron sometidas a cromatografía por exclusión y VLC, llevando a cabo el seguimiento por GC-MS. Tras un proceso de purificación, se identificaron en total 23 compuestos, de los cuales 13 fueron coincidentes en ambas especies. A partir de *H. aulicum* se pudieron aislar los nuevos alcaloides aulicina, 11-oxohemantamina y 7-metoxi-*O*-metillicorenina, aparte del aislamiento y reporte de los datos espectrales completos del alcaloide nerinina. De *H. calyptratum*, se aisló el nuevo compuesto 3-*O*-metil-epimacowina y el alcaloide ya conocido albomaculina. Para este último también se reportan sus datos espectrales completos por primera vez.

Aulicina presentó espectros de masas y de ^1H -RMN característicos de un alcaloide tipo crinano, con un anillo aromático A pentasustituido y un anillo C saturado. Los demás datos de 1D y 2D-RMN eran concordantes con una estructura similar a hipeastidina, un derivado tipo crinano que presenta un metoxilo en la posición 3 con estereoquímica indeterminada. En base a la constante de acoplamiento observada entre H-3 y H-4 ($J_{3,4\text{axial}} = 12.4 \text{ Hz}$), el grupo metoxilo en 3 fue asignado en posición ecuatorial, *cis* respecto al puente etano. Por otra parte, para confirmar la orientación del puente, se llevó a cabo un análisis de CD que reveló el efecto Cotton positivo alrededor de 250 nm y negativo alrededor de 290 nm, indicando un esqueleto tipo crinina, que posteriormente se corroboró mediante rayos-X.

En relación al alcaloide 3-*O*-metil-epimacowina, sus espectros de masas y de ^1H -RMN eran característicos de los alcaloides del tipo crinano, y similares a los correspondientes al alcaloide macowina, aislado de *Crinum macowanii*, siendo la diferencia principal la presencia y orientación del grupo metoxilo unido a la posición 3.

La magnitud de la constante de acoplamiento ($J = 10.5$ Hz) entre H-4 axial y H-3, *trans*-di axial, sugería una orientación *cis* entre el sustituyente de la posición 3 y el puente etano, al contrario de lo observado en macowina. El esqueleto tipo crinina se confirmó por CD. El aislamiento de dos derivados tipo crinina en especies del género *Hippeastrum* representa un importante dato quimiotaxonómico, siendo la primera vez que se confirma este tipo de alcaloides en este género utilizando datos de CD y difracción de Rayos-X.

El compuesto 11-oxohemantamina mostró espectros de masas y de ^1H -RMN característicos de una estructura 5,10b-etanofenantridina. El grupo carbonilo en la posición 11 es congruente con los datos obtenidos por HRMS. Las pequeñas constantes de acoplamiento entre H-3 y los protones de la posición 4, junto a la constante de 5.5 Hz entre H-2 y H-3, confirman la orientación *trans* entre el sustituyente de la posición 3 y el puente etano. Mediante el análisis de CD se verificó que se trataba de un derivado tipo hemantamina. En este trabajo se realiza la revisión y reporte de los datos de ^1H -RMN de dicho compuesto.

El compuesto 7-metoxi-*O*-metillicorenina presentó características espectrales típicas de los alcaloides del tipo homolicorina. Los espectros de GC-MS y ^1H -RMN se asemejaban al compuesto *O*-metillicorenina, diferenciándose únicamente por presentar un anillo A pentasustituido. El experimento NOESY fue clave para asignar el protón aromático en la posición 10, tras observarse su correlación con los protones del grupo *N*-metilo. Finalmente, se aislaron otros dos derivados con el mismo esqueleto tipo homolicorina pentasustituido, nerinina y albomaculina, cuyos datos espectrales, publicados parcialmente en la literatura previa, se aportan revisados en este trabajo.



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochemCrinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*Jean Paulo de Andrade^{a,b}, Ying Guo^a, Mercè Font-Bardia^{c,d}, Teresa Calvet^c, Jullie Dutilh^e, Francesc Viladomat^a, Carles Codina^a, Jerald J. Nair^a, Jose A. Silveira Zuanazzi^f, Jaume Bastida^{a,*}^a Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain^b Facultat de Farmàcia, INIFAR and CIPRONA, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica^c Cristal·lografia, Mineralogia i Dipòsits Minerals, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès s/n, 08028 Barcelona, Spain^d Unitat de Difracció RX, Centre Científic i Tecnològic (CCiTUB), Universitat de Barcelona, Sole Sabaris 1-3, 08028 Barcelona, Spain^e Departamento de Botânica, Universidade de Campinas, Cidade Universitária, Campinas 13083-970, Brazil^f Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Av., Porto Alegre 90610-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2013

Received in revised form 10 February 2014

Available online 23 April 2014

Keywords:

Alkaloid

Amaryllidaceae

Circular dichroism

Crinine-type

Hippeastrum

X-ray crystallography

ABSTRACT

An ongoing search for alkaloids in the Amaryllidaceae species using GC–MS resulted in the identification of two crinine-type alkaloids, aulicine (**1**) and 3-*O*-methyl-epimacowine, (**2**) from the indigenous Brazilian species *Hippeastrum aulicum* and *Hippeastrum calyptratum*, respectively. In addition, two alkaloids, 11-oxohaemanthamine (**3**) and 7-methoxy-*O*-methyllycorenine (**4**) were both isolated from *H. aulicum*. Furthermore, we provide here complete NMR spectroscopic data for the homolycorine analogues nerinine (**5**) and albomaculine (**6**). The absolute stereochemistry of the 5,10b-ethano bridge in the crinine variants was determined by circular dichroism and X-ray crystallographic analysis, thus presenting the first direct evidence for the presence of crinine-type alkaloids in the genus *Hippeastrum*.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

GC–MS has proven to be a useful tool in the identification and quantification of Amaryllidaceae alkaloids (Berkov et al., 2011; Torras-Claveria et al., 2013). This spectroscopic technique has been used with success to assist with the isolation of new or unusual structures from alkaloid-rich extracts by comparing their component electron impact-mass fragmentation spectra (EI-MS) with those of known standards (Berkov et al., 2011; Torras-Claveria et al., 2013). For example, candimine from *H. morelianum* Lem. and 11β-hydroxygalanthamine from *H. papilio* (Ravenna) Van Scheepen were both isolated based on prior GC–MS screening of these endemic Brazilian species (de Andrade et al., 2012a). Interestingly, both alkaloids have since exhibited promising anti-*Trichomonas vaginalis* and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activities (de Andrade et al., 2011; Giordani et al., 2010). Therefore, a similar guided approach is attractive in that it circumvents the need for time and labour-intensive chromatographic steps for extracts and alkaloid fractions devoid of new bioactive compounds.

Since the 1970s, X-ray crystallographic and/or circular dichroism (CD) analyses of 5,10b-ethanophenanthridine alkaloids from *Hippeastrum* have indicated that they belong exclusively to the

haemanthamine series, which are enantiomeric to the crinine series. Earlier, a few crinine-type alkaloids were detected in European *Hippeastrum* cultivars (Boit and Döpke, 1960; Döpke, 1962), but their absolute configurations have been questioned based on the lack of any tangible evidence, such as CD and X-ray crystallography. These two techniques have since become integral to the unambiguous assignment of the orientation of the 5,10b-ethano bridge in the crinine/haemanthamine series of alkaloids (Bastida et al., 2006; De Angelis and Wildman, 1969; Wagner et al., 1996). In the present study, the use of CD and X-ray crystallographic techniques as well as NMR and GC–MS analysis resulted in the identification of the novel crinine-type alkaloids aulicine (**1**) and 3-*O*-methyl-epimacowine (**2**) (Fig. 1) along with two new alkaloids [11-oxohaemanthamine (**3**) and 7-methoxy-*O*-methyllycorenine (**4**)] from the Brazilian species *Hippeastrum aulicum* Herb. and *Hippeastrum calyptratum* Herb. Nineteen additional known alkaloids were identified in the process, and a complete NMR data set for nerinine (**5**) and albomaculine (**6**) is also reported herein. These findings are significant in that they represent the first direct evidence for the presence of crinine-type alkaloids in *Hippeastrum*.

2. Results and discussion

Of the twenty-three alkaloids identified in *H. aulicum* and *H. calyptratum*, thirteen were common to both, while five were

* Corresponding author. Tel.: +34 934020268; fax: +34 934029043.

E-mail address: jaumbastida@ub.edu (J. Bastida).

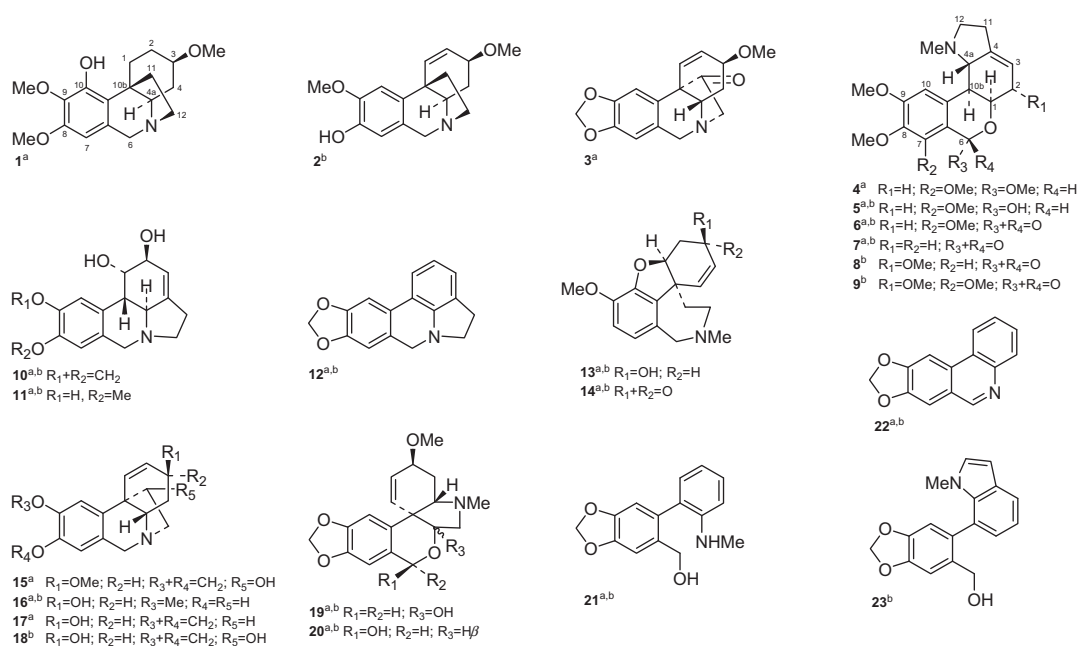


Fig. 1. Alkaloids identified in *H. aulicum* (^a) and *H. calyptatum* (^b).

unique to either species (Table 1). The major alkaloids detected in *H. aulicum* were aulicine (1), lycorine (10) and haemanthamine (15), while lycorine (10) was the main constituent present in *H. calyptatum*. HRESIMS gave a mass of 320.1864 for alkaloid 1, which is expected for the molecular formula C₁₈H₂₆NO₄ and the theoretical mass (320.1856) for the parent [M+H]⁺ ion. Its GC–MS fragmentation pattern was similar to that of the 1,2-dihydroethanophenantridines powellane and deacetylbowdensine (Duffield et al., 1965). As expected, no olefinic proton signals were observed

in the ¹H-NMR spectrum of 1 and the only low-field resonance signal was assignable to H-7 (δ 6.10, s) due to HSQC correlation with C-7 (δ 101.0, d), spatial NOESY connectivity to the benzylic 2H-6 protons and HMBC contour correlation with C-6 (δ 62.7, t). These data indicated that aulicine (1) possessed a penta-substituted aromatic A-ring and a saturated C-ring moiety. In essence, its ¹H-NMR spectrum (Table 2) was similar to that of hippeastidine (Kulhánková et al., 2013; Pacheco et al., 1978; Watson and Zabel, 1982). Although the basic crinine structure of hippeastidine is

Table 1

GC–MS data for *H. aulicum* and *H. calyptatum* alkaloids. Values are expressed as a relative percentage of TIC.

Alkaloid	RI	<i>H. aulicum</i> ^a (%)		<i>H. calyptatum</i> ^b (%)		M ⁺	MS
		IA	IIA	IC	IIC		
Ismine (21) [*]	2280	–	tr ^c	–	0.45	257(35)	238(100), 211(6), 196(8), 168(6), 154(3), 106(4), 77(3)
Trisphaeridine (22) [*]	2282	tr	0.61	–	tr	223(100)	222(38), 167(8), 165(9), 164(14), 138(20), 137(9), 111(13)
Galanthamine (13) [*]	2395	11.26	1.75	12.93	6.60	287(83)	286(100), 270(13), 244(24), 230(12), 216(33), 174(27), 115(12)
Vittatine (17) [*]	2472	–	0.34	–	–	271(100)	228(25), 199(95), 187(85), 173(28), 128(32), 115(33), 56(22)
3-O-Methyl-epimacowine (2) [*]	2477	–	–	14.68	13.45	287 (100)	272(39), 256(34), 217(71), 203(21), 174(18), 157(18), 128(14)
Narwedine (14) [*]	2483	0.98	–	0.72	tr	285(84)	284(100), 242(18), 216(20), 199(18), 174(31), 128(16), 115(16)
Galanthindol (23) [*]	2487	–	–	–	1.11	281(100)	280(7), 264(13), 263(17), 262(20), 252(15), 204(7), 1(14), 132(8)
Anhydrolycorine (12) ^{**}	2501	–	1.84	–	5.31	251(43)	250(100), 192(13), 191(11), 165(4), 164(3), 139(2), 124(7)
Nerinine (5) [*]	2509	2.38	5.75	0.36	0.91	347(<1)	222(1), 207(2), 179(1), 164(1), 110(8), 109(100), 108(18), 94(2)
8-O-Demethylmaritidine (16) [*]	2510	–	2.41	–	tr	273(100)	256(22), 230(20), 201(83), 189(42), 174(22), 128(23), 115(24)
7-Methoxy-O-methyllycorine (4) [*]	2538	1.60	–	–	–	361(<1)	330(8), 221(10), 191(2), 110(8), 109(100), 108(15), 94(2), 83(2)
11-Oxohaemanthamine (3) [*]	2585	1.50	tr	–	–	299(<1)	271(100), 270(37), 240(10), 238(10), 211(23), 181(77), 152(20)
Aulicine (1) [*]	2607	43.65	5.47	–	–	319(100)	304(19), 288(37), 246(18), 233(73), 218(19), 206(26), 163(7)
Haemanthamine (15) [*]	2641	30.3	71.58	–	–	301(14)	272(100), 257(10), 240(16), 181(21), 214(12), 211(14), 128(8)
Tazettine (19)/Pretazettine (20) ^{d,e}	2653	tr	tr	–	0.62	331(31)	316(15), 298(23), 247(100), 230(12), 201(15), 181(11), 152(7)
11-Hydroxyvittatine (18) [*]	2728	–	–	–	9.50	287(5)	258(100), 211(15), 186(20), 181(23), 153(13), 128(24), 115(23)
Lycorine (10) [*]	2746	–	9.26	0.89	41.89	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
Homolycorine (7) [*]	2767	2.43	–	3.21	–	315(<1)	206(<1), 178(2), 109(100), 150(1), 108(22), 94(3), 82(3)
Albomaculine (6) [*]	2815	7.16	–	66.41	13.39	345(<1)	221(1), 193(1), 165(1), 110(10), 109(100), 108(25), 94(2), 82(3)
Pseudolycorine (11) [*]	2823	–	0.64	–	4.02	289(23)	270(21), 252(12), 228(100), 214(10), 147(17), 111(18), 82(10)
2 α -Methoxyhomolycorine (8) ^{**}	2870	–	–	–	0.64	345(<1)	206(<1), 178(2), 150(1), 139(100), 124(64), 96(5), 94(5), 81(3)
2 α ,7-Dimethoxyhomolycorine (9) [*]	2962	–	–	0.80	1.88	375(<1)	236(<1), 139(100), 124(54), 221(2), 193(2), 96(3), 94(3), 81(2)

RI: Retention Index.

^a Alkaloid percentage in the total mixture of alkaloids from *H. aulicum*.

^b Alkaloid percentage in the total mixture of alkaloids from *H. calyptatum*.

^c Traces <0.20 of TIC.

^d Tazettine detection by GC–MS mean identification of both alkaloids tazettine (19) and pretazettine (20) (de Andrade et al., 2012b).

^e Alkaloids identified using an in-home MS database.

** Alkaloids identified using the NIST 05 database; recursive procedure, HR-MS and literature data.

Table 2
¹H NMR, COSY, NOESY, HSQC, and HMBC data of aulicine (**1**) (400 MHz, CDCl₃).

Position	δ_{H} (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
1 α (ax)	1.77 <i>td</i> (14.0, 4.4)	H-1 β , H-2 α , H-2 β	H-1 β , H-2 α	26.8 <i>t</i>	C-2, C-10b, C-11
1 β (eq)	3.10–3.20 <i>m</i>	H-1 α , H-2 α , H-2 β	H-1 α , H-2 β , H-11 exo		C-10b
2 α (eq)	2.04 <i>m</i>	H-1 α , H-1 β , H-2 β , H-3	H-1 α , H-2 β , H-3, 3-OMe	27.7 <i>t</i>	
2 β (ax)	1.44 <i>tdd</i> (13.5, 11.5, 4.0)	H-1 α , H-1 β , H-2 α , H-3	H-1 β , H-2 α , H-4 β , H-11 exo		C-3
3 (ax)	3.10–3.20 <i>m</i>	H-2 α , H-2 β , H-4 α , H-4 β	H-2 α , H-4 α , H-4 β	77.6 <i>d</i>	3-OMe
4 α (eq)	2.13 <i>br d</i> (12.4)	H-3, H-4 β , H-4 α	H-3, H-4 β , H-4 α , 3-OMe	33.8 <i>t</i>	C-10b
4 β (ax)	1.21 <i>q</i> (12.4)	H-3, H-4 α , H-4 β	H-2 β , H-4 α , H-11 exo , H-12 exo		C-2, C-3, C-4 α
4 α	2.93 <i>dd</i> (12.4, 5.2)	H-4 α , H-4 β	H-3, H-4 α , H-6 α	67.9 <i>d</i>	C-4, C-6, C-10 α , C-11, C-12
6 α	4.38 <i>d</i> (16.8)	H-6 β , H-7	H-4 α , H-6 β , H-7	62.7 <i>t</i>	C-6 α , C-7, C-10 α , C-12
6 β	3.71 <i>d</i> (16.8)	H-6 α , H-7	H-6 α , H-7, H-12 endo		C-4 α , C-6 α , C-7, C-10 α , C-12
6 α				130.1 <i>s</i>	
7	6.10 <i>s</i>	H-6 α , H-6 β , 8-OMe	H-6 α , H-6 β , 8-OMe	101.0 <i>d</i>	C-6, C-8, C-9, C-10 α
8				150.2 <i>s</i>	
9				133.9 <i>s</i>	
10				146.8 <i>s</i>	
10 α				126.0 <i>s</i>	
10 β				43.2 <i>s</i>	
11 endo	1.90 <i>ddd</i> (12.0, 8.8, 3.2)	H-11 exo , H-12 endo , H-12 exo	H-11 exo , H-12 endo	36.5 <i>t</i>	C-4 α , C-10b
11 exo	2.23 <i>ddd</i> (12.4, 10.4, 6.4)	H-11 endo , H-12 endo , H-12 exo	H-1 β , H-2 β , H-4 β , H-11 endo , H-12 exo		C-1, C-10 α , C-10b, C-12
12 endo	2.78 <i>ddd</i> (12.8, 8.8, 6.4)	H-11 endo , H-11 exo , H-12 exo	H-6 β , H-11 endo , H-12 exo	52.2 <i>t</i>	C-4 α , C-6, C-11
12 exo	3.36 <i>ddd</i> (12.8, 10.0, 3.2)	H-11 endo , H-11 exo , H-12 endo	H-4 β , H-11 exo , H-12 endo		C-6
3-OMe	3.38 <i>s</i> (3H)		H-2 α , H-4 α	55.6 <i>q</i>	C-3
8-OMe	3.80 <i>s</i> (3H)	H-7	H-7	55.7 <i>q</i>	C-8
9-OMe	3.87 <i>s</i> (3H)			61.0 <i>q</i>	C-9

known with certainty, its absolute stereochemistry still remains unresolved due to its missing CD and X-ray crystallographic data, i.e., it is not clear from the literature whether the compound is of the α - or β -crinine alkaloid series (Kulhánková et al., 2013; Pacheco et al., 1978; Watson and Zabel, 1982).

A comparison of the ¹H-NMR data of **1** with that of hippastidine revealed that the only striking differences pertained to the splitting of the H-3 and H-4 protons, both of which are crucial to the stereochemical relationship between the 3-methoxyl substituent and the 5,10b-ethano bridge. The resonance at δ 1.21 ascribed to H-4 β was split into a quartet with an accompanying large coupling constant ($J = 12.4$ Hz), indicative of two *trans*-diaxial couplings (with H-3 and H-4 α) and the geminal coupling with H-4 α (Table 2). Large coupling constants were also observed for H-2 β . Thus, the H-4 β and H-2 β splitting patterns are consistent with a *cis* relationship between the 3-methoxyl substituent and the 5,10b-ethano bridge. Interestingly, H-1 β was shifted to a lower field when compared to H-1 α due to its *syn*-proximity to the hydroxyl group at C-10. The complete NMR data set for aulicine (**1**) is listed in Table 2. Confirmation of the absolute stereochemistry in **1** was arrived at via CD and X-ray crystallography. The CD spectrum of **1** (Fig. 2A) showed a positive Cotton effect at ca. 250 nm and negative Cotton effect at ca. 290 nm, in agreement with a crinine-type alkaloid (De Angelis and Wildman, 1969; Wagner et al., 1996). X-ray crystallographic data analysis was carried out using a copper source (see Materials and methods), leading to the unambiguous structural assignment of **1** as a crinine-type alkaloid (Fig. 2B).

The new crinine alkaloid 3-*O*-methyl-epimacowine (**2**) from *H. calyptrotum* exhibited a parent [M+H]⁺ ion at m/z 288.1595 in its HRESIMS spectrum, thereby suggesting the molecular formula C₁₇H₂₂NO₃ (calcd. 288.1594). The NMR data of **2** (Table 3) were similar to those of macowine (Nair et al., 2000), with the only notable difference arising from the differential substitution pattern at C-3. An aliphatic methoxyl group was indicated by the chemical shift and splitting pattern of the resonance at δ 3.42 (3H, s), in accordance with previous studies on 3-substituted alkaloids of the crinine series (Viladomat et al., 1995). A small H-3/H-4 β coupling ($J = 4.0$ Hz) is consistent with the pseudoaxial orientation for the 3-hydroxyl substituent in macowine (Nair et al., 2000). By

contrast, in **2**, the large coupling constant ($J_{3,4\beta} = 10.5$ Hz) suggested a pseudoequatorial disposition for the 3-methoxyl substituent and therefore a *cis* relationship between this substituent and the 5,10b-ethano bridge. The bridge orientation was confirmed by CD analysis, which showed positive and negative Cotton effects at ca. 250 and ca. 290 nm, respectively (Fig. 2C).

The remaining two new alkaloids, 11-oxohaemanthamine (**3**) and 7-methoxy-*O*-methyllycorenine (**4**), were identified in *H. aulicum*. The HRESIMS of **3** suggested the molecular formula C₁₇H₁₈NO₄ for the parent [M+H]⁺ ion at m/z 300.1239 (calcd. 300.1230). Its GC-MS fragmentation pattern was similar to that of an alkaloid tentatively assigned to 11-oxohaemanthamine by Kreh et al. (1995). The CD data determined for **3** (see Experimental) were in agreement with those of a crinine-type alkaloid of the α -series (Wagner et al., 1996). Characteristic ¹H-NMR signals included the following: (1) two *para*-oriented aryl protons (δ 6.83 and 6.52, for H-10 and H-7, respectively), (2) two AB doublets at δ 4.58 and 3.83, correspondent with the C-6 benzylic proton system in which H-6 β was assigned to a lower field due to its *cis* relationship with the nitrogen lone pair, and (3) two vicinal olefinic proton resonances (δ 6.54 and δ 6.21, $J_{1,2} = 10.0$ Hz), the more shielded of which was assigned to H-2 due to its COSY correlation with H-3 resonant at δ 3.84. The magnitude of the coupling constant between H-2 and H-3 ($J_{2,3} = 5.5$ Hz) and the small coupling constants between H-3 and both H-4 protons ($J_{3,4\alpha} \sim 4.0$ and $J_{3,4\beta} = 2.0$ Hz) are in agreement with a pseudoequatorial orientation for H-3, thus suggesting a *trans* relationship between the 3-methoxyl substituent and the 5,10b-ethano bridge (Pabuççuoğlu et al., 1989). The NMR data for **3** (Table 4) are consistent with 11-oxohaemanthamine, which was recently synthesised by Cedrón et al. (2012). The isolation of **3** from a natural source is reported here for the first time.

Homolycorine-type alkaloids bearing trimethoxyaryl substituents were originally reported during the 1950s (Boit and Döpke, 1957; Briggs et al., 1956). The mass fragmentation pattern of 7-methoxy-*O*-methyllycorenine (**4**) was in agreement with patterns typical for homolycorine-type alkaloids (Kreh et al., 1995; Schnoes et al., 1962). The HRESIMS data for **4** was consistent with the molecular formula C₂₀H₂₈NO₅ for the parent ion [M+H]⁺ at m/z 362.1964 (calcd. 362.1962). The ¹H-NMR data of **4** (Table 5) were

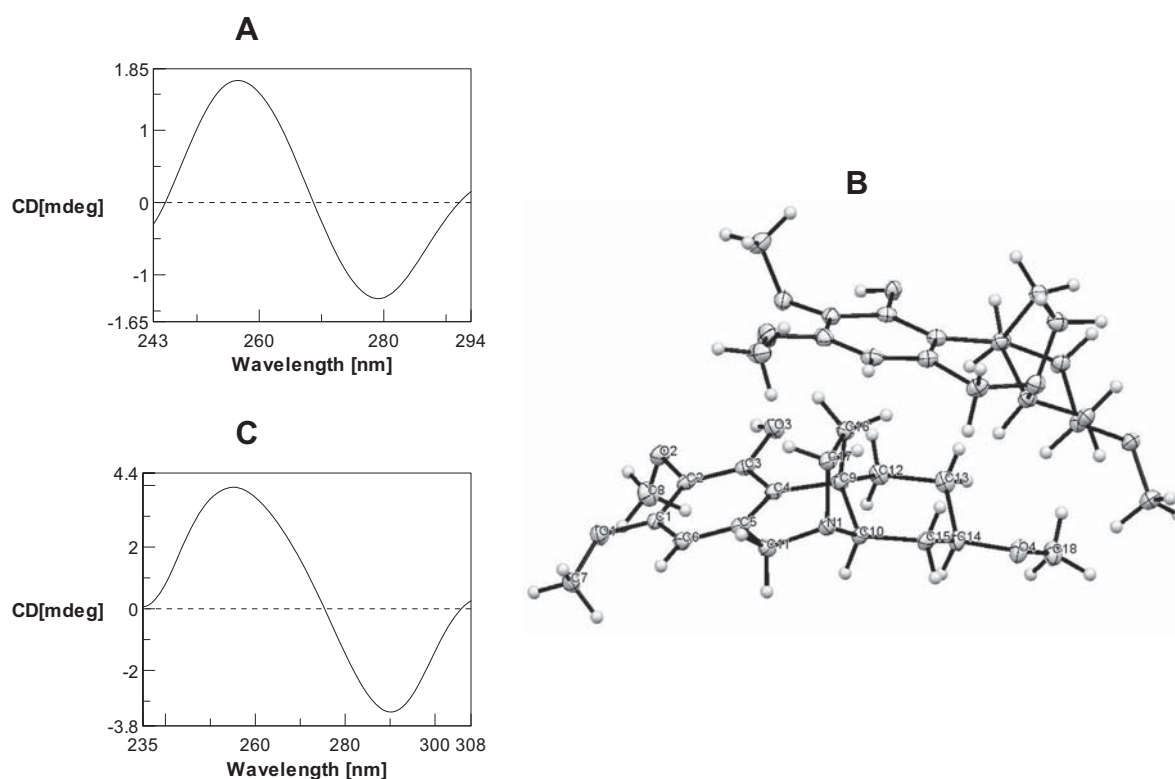


Fig. 2. CD spectrum (A) and ORTEP projection (B) of alkaloid 1. CD spectrum (C) of alkaloid 2.

Table 3

¹H NMR, COSY, NOESY, HSQC, and HMBC data of 3-O-methyl-epimacowine (**2**) (500 MHz, CDCl₃).

Position	δ_{H} (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
1	6.48 <i>dd</i> (10.0, 2.0)	H-2	H-2, H-10	129.1 <i>d</i>	C-3, C-4a, C-10a, C-11
2	5.84 <i>dt</i> (10.0, 1.5)	H-1	H-1, H-3, 3-OMe	129.2 <i>d</i>	C-4, C-10b
3	4.00 <i>ddt</i> (10.5, 5.5, 2.0)	H-4 α , H-4 β	H-2, H-4 α , H-4a, 3-OMe	76.3 <i>d</i>	C-1, 3-OMe
4 α	2.29 <i>m</i>	H-3, H-4 β , H-4a	H-3, H-4a, H-4 β	30.8 <i>t</i>	C-2, C-3, C-4a, C-10b
4 β	1.58 <i>ddd</i> (13.5, 12.0, 10.5)	H-3, H-4 α , H-4a	H-4 α , H-11 exo , H-12 exo		C-3, C-4a, C-10b
4a	3.28 <i>dd</i> (13.5, 4.0)	H-4 α , H-4 β	H-3, H-4 α , H-6 α	66.8 <i>d</i>	C-12
6 α	4.45 <i>d</i> (16.5)	H-6 β	H-4a, H-6 β , H-7	61.5 <i>t</i>	C-6a, C-7, C-10a, C-12
6 β	3.82 <i>d</i> (17.0)	H-6 α	H-6 α , H-7, H-12 endo		C-4a, C-6a, C-7, C-10a, C-12
6a				125.0 <i>s</i>	
7	6.59 <i>s</i>		H-6 α , H-6 β	113.0 <i>d</i>	C-6, C-9, C-10a
8				144.3 <i>s</i>	
9				145.3 <i>s</i>	
10	6.78 <i>s</i>		H-1, 9-OMe	104.9 <i>d</i>	C-6a, C-8, C-10a, C-10b
10a				136.7 <i>s</i>	
10b				44.7 <i>s</i>	
11 endo	2.20 <i>ddd</i> (12.0, 9.0, 4.5)	H-11 exo , H-12 endo , H-12 exo	H-11 exo , H-12 endo	44.8 <i>t</i>	C-4a, C-10a, C-10b, C-12
11 exo	2.12 <i>ddd</i> (12.0, 10.5, 6.0)	H-11 endo , H-12 endo , H-12 exo	H-4 β , H-11 endo , H-12 exo		C-1, C-10a, C-10b, C-12
12 endo	2.95 <i>ddd</i> (13.0, 9.0, 6.0)	H-11 endo , H-11 exo , H-12 exo	H-6 β , H-11 endo , H-12 exo	53.2 <i>t</i>	C-4a, C-6, C-10b
12 exo	3.50 <i>ddd</i> (13.0, 10.5, 4.5)	H-11 endo , H-11 exo , H-12 endo	H-4 β , H-12 endo , H-11 exo		C-6
3-OMe	3.42 <i>s</i> (3H)		H-2, H-3	56.2 <i>q</i>	C-3
9-OMe	3.89 <i>s</i> (3H)		H-10	56.2 <i>q</i>	C-9

similar to of the data for *O*-methyllycorenine, originally reported by Codina et al. (1993) and differing only by the presence of a third aromatic methoxyl group resonance at δ 3.89 (3H, s). Thus, the 7,8,9-trimethoxyaryl substitution in **4** was confirmed by the NOESY correlation evident between H-10 and the *N*-methyl group. The C-7 and C-8 methoxyl carbon resonances (δ 61.5 and δ 61.2, respectively) were diagnostically downfield shifted from that of C-9 (δ 56.6), as previously indicated (Bastida et al., 1992). The large coupling constant $J_{4a,10b} = 10.0$ Hz confirmed a *trans*-diaxial relationship between H-4a and H-10b. A *cis* B/C ring junction was suggested based on the small value of the coupling constant measured

between H-1 and H-10b ($J = 2.0$ Hz). NOESY correlation between 6-OMe and H-1 confirmed the β -orientation for H-6, a feature characteristic of hemiacetal functionalised homolycorine alkaloids (Bastida et al., 2006; Codina et al., 1992). The complete NMR data of **4** are provided in Table 5.

The structures of nerinine (**5**) and albomaculine (**6**) were confirmed by comparing their respective physical and spectroscopic data with the data available in the literature (Berkov et al., 2011; Codina et al., 1992; Jeffs and Hawksworth, 1963; Kreh et al., 1995; Schnoes et al., 1962). However, in both instances, these were found to be incomplete and are therefore comprehensively

Table 4
¹H NMR, COSY, and HSQC data of 11-oxohaemanthamine (**3**) (500 MHz, CDCl₃).

Position	δ_{H} (J in Hz)	COSY	HSQC
1	6.54 <i>d</i> (10.0)	H-2	126.8 <i>d</i>
2	6.21 <i>ddd</i> (10.0, 5.5, 1.5)	H-1, H-3	129.5 <i>d</i>
3	3.84 <i>ddd</i> (5.5, 3.5, 2.0)	H-2, H-4 α ; H-4 β	71.8 <i>d</i>
4 α	1.47 <i>td</i> (14.0, 4.0)	H-3; H-4 β , H-4 α	29.8 <i>t</i>
4 β	2.25 <i>br d</i> (14.0)	H-3; H-4 α , H-4 α	
4 α	3.55 <i>m</i>	H-4 α ; H-4 β	61.5 <i>d</i>
6 α	3.83 <i>d</i> (17.0)	H-6 β , H-7	60.6 <i>t</i>
6 β	4.58 <i>d</i> (17.0)	H-6 α , H-7	
7	6.52 <i>s</i>	H-6 α , H-6 β	106.9 <i>d</i>
10	6.83 <i>s</i>		104.2 <i>d</i>
12 <i>endo</i>	3.27 <i>dd</i> (18.5, 1.5)	H-12 <i>exo</i>	59.3 <i>t</i>
12 <i>exo</i>	3.56 <i>d</i> (18.5)	H-12 <i>endo</i>	
3-OMe	3.37 <i>s</i> (3H)		56.8 <i>q</i>
OCH ₂ O	5.92 <i>2d</i> (1.5)		101.3 <i>t</i>

presented here in the Experimental section as well as in Tables 6 and 7.

Aulicine (**1**): white crystals; $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -2.3$ (c 0.38, CHCl₃); CD $[\theta]_{\lambda}^{20}$: $[\theta]_{255}^{20} +1043$, $[\theta]_{279}^{20} -768$; UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 233 (3.50), 273 (2.70) nm; IR (CHCl₃) ν_{max} 3291, 2931, 2858, 1605, 1577, 1495, 1455, 1424, 1126, 1103 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) and ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) see Table 2; EIMS data shown in Table 1; HRESIMS of $[\text{M}+\text{H}]^+$ *m/z* 320.1864 (calcd for C₁₈H₂₆NO₄, 320.1856).

3-O-Methyl-epimacowine (**2**): white needles; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -47$ (c 0.42, CHCl₃); CD $[\theta]_{\lambda}^{20}$: $[\theta]_{254}^{20} +2528$, $[\theta]_{290}^{20} -2215$; UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 230 (3.31), 288 (3.23) nm; IR (CHCl₃) ν_{max} 2925, 2854, 1507, 1461, 1312, 1277, 1219, 1098, 754 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) see Table 3; EIMS data shown in Table 1; HRESIMS of $[\text{M}+\text{H}]^+$ *m/z* 288.1595 (calcd for C₁₇H₂₂NO₃, 288.1594).

11-Oxohaemanthamine (**3**): white needles; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +44$ (c 0.12, CHCl₃); CD $[\theta]_{\lambda}^{20}$: $[\theta]_{255}^{20} -3429$, $[\theta]_{320}^{20} +3298$; UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 250 (2.94), 295 (2.92), 313 (2.82) nm; IR (CHCl₃) ν_{max} 2924, 2854, 1744, 1503, 1481, 1463, 1377, 1238, 1086, 1038 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) see Table 4; EIMS data shown in Table 1; HRESIMS of $[\text{M}+\text{H}]^+$ *m/z* 300.1239 (calcd for C₁₇H₁₈NO₄, 300.1230).

7-Methoxy-O-methyllycorenine (**4**): amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +31$ (c 0.33, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 230 (3.55), 270 (2.75) nm; IR (CHCl₃) ν_{max} 2924, 2853, 2783, 1601, 1460, 1336, 1128, 1053, 1025; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) see Table 5; EIMS data shown in Table 1; HRESIMS of $[\text{M}+\text{H}]^+$ *m/z* 362.1964 (calcd for C₂₀H₂₈NO₅, 362.1962).

Nerinine (**5**): amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +40$ (c 0.33, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 232 (3.59), 273 (2.89) nm; IR (CHCl₃) ν_{max} 3145, 2918, 2849, 1587, 1460, 1410, 1336, 1243, 1122, 1018 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) and ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) see Table 6; EIMS data shown in Table 1; HRESIMS of $[\text{M}+\text{H}]^+$ *m/z* 348.1807 (calcd for C₁₉H₂₆NO₅, 348.1805).

Albomaculine (**6**): amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +25$ (c 0.95, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 222 (4.26), 266 (3.86), 298 (3.34) nm; IR (CHCl₃) ν_{max} 2929, 2849, 2783, 1725, 1592, 1334, 1254, 1111, 1022 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) and ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) see Table 7; EIMS data shown in Table 1; HRESIMS of $[\text{M}+\text{H}]^+$ *m/z* 346.1651 (calcd for C₁₉H₂₄NO₅, 346.1649).

3. Conclusions

In summary, phytochemical investigation of *H. aulicum* and *H. calypttratum* led to the identification of 23 Amaryllidaceae

alkaloids. Of these alkaloids, aulicine, 3-O-methyl-epimacowine, 11-oxohaemanthamine and 7-methoxy-O-methyllycorenine are reported here for the first time. The structures of these alkaloids were determined by physical and spectroscopic methods, including GC-MS, NMR, CD and X-ray crystallography. The identification of the β -crinane alkaloids aulicine and 3-O-methyl-epimacowine in *Hippeastrum* is of considerable biosystematic significance because previous findings have revealed that all crinane compounds from this genus are reminiscent of the α -series. Efforts to further delineate this anomaly via targeted studies of other species of *Hippeastrum* are presently underway in our laboratories.

4. Materials and methods

4.1. General procedure

NMR spectra were recorded on a Mercury 400 MHz (Palo Alto, CA, USA) or a Varian 500 MHz (Palo Alto, CA, USA) instrument using CDCl₃ (CD₃OD for **4** and **10**) as the solvent and TMS as the internal standard. Chemical shifts are reported in δ units (ppm) and coupling constants (*J*) in Hz. The GC-MS spectra were obtained on an Agilent 6890N GC 5975 inert MSD operating in the EI mode at 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a DB5 MS column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m, Agilent Technologies). The temperature program was as follows: 100–180 °C at 15 °C min⁻¹, 1 min hold at 180 °C and 180–300 °C at 5 °C min⁻¹ and 40 min hold at 300 °C. The injector temperature was 280 °C. The flow rate of carrier gas (helium) was 0.8 ml min⁻¹, and the split ratio was 1:20. HRESIMS spectra were obtained on a LC/MSD-TOF (2006) mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) by direct injection of the compounds dissolved in H₂O-MeCN (1:1). Optical rotations were carried out on a Perkin-Elmer 241 polarimeter (Waltham, MA, USA). A Jasco-J-810 Spectrophotometer (Easton, MD, USA) was used to run CD spectra, all recorded in MeOH. UV spectra were obtained on a DINKO UV2310 instrument (Barcelona, Spain) and IR spectra were recorded on a Nicolet Avatar 320 FT-IR spectrophotometer (Waltham, MA, USA). Silica gel (Kieselgel – mesh 0.15/0.30, Val-de-Reuil, France) was used for all vacuum liquid chromatography procedures (VLC). For thin layer chromatography (TLC), silica gel F₂₅₄ was used as the stationary phase with a plate dimension of 20 cm \times 20 cm \times 0.20 mm for analytical TLC and 20 cm \times 20 cm \times 0.25 mm for semi-preparative TLC (SPTLC) (Val-de-Reuil, France). Exclusion chromatography was carried out using a Sephadex LH-20 (Uppsala, Sweden).

4.2. Plant material

Bulbs of *H. aulicum* Herb. and *H. calypttratum* Herb. were collected in October 2011 during the flowering period from a population located in Cunha City, Sao Paulo Province (Brazil). Both species were identified by Mr. Mauro Peixoto and Dr. Jullie Dutilh (University of Campinas, Unicamp, Brazil). The voucher specimens of *H. aulicum* were deposited in the herbarium at the Plantarum Institute under the reference number HPL 13043. The voucher specimens of *H. calypttratum* were deposited in the Herbarium of the University of Campinas (Unicamp, Brazil) under the reference number UEC 59648.

4.3. Extraction and isolation of alkaloids

Dried bulbs (370 g) of *H. aulicum* were crushed and thrice extracted for 48 h with MeOH at room temperature, and the combined macerate was filtered and evaporated under reduced pressure. The crude extract (90 g) was acidified with sulphuric acid (2%) to pH 2 and extracted with Et₂O (4 \times 250 ml) and EtOAc

¹ CCDC 963600 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)

Table 5¹H NMR, COSY, NOESY, HSQC, and HMBC data of 7-methoxy-*O*-methyllycorenine (**4**) (500 MHz, CD₃OD).

Position	δ_{H} (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
1	4.40 <i>br d</i> (6.5)	H-2 α , H-2 β , H-3, H-10b	H-2 α , H-2 β , H-10b, 6-OMe	67.0 <i>d</i>	C-3, C-4a, C-6, C-10a
2 α	2.67 <i>ddt</i> (19.0, 6.5, 3.0)	H-1, H-2 β , H-3, H-4a	H-1, H-2 β , H-3	32.5 <i>t</i>	
2 β	2.29 <i>dt</i> (19.5, 3.0)	H-1, H-2 α , H-3, H-4a	H-1, H-2 α , H-3		
3	5.55 <i>br s</i>	H-1, H-2 α , H-2 β , H-4a, H-11 α/β	H-2 α , H-2 β , H-11 α/β	118.1 <i>d</i>	
4				140.2 <i>s</i>	
4a	2.92 <i>br d</i> (10.0)	H-2 α , H-2 β , H-3, H-10b	NMe	69.2 <i>d</i>	
6 β	5.52 <i>s</i>		6-OMe	97.8 <i>d</i>	C-1, C-7, C-6a, C-10a, 6-OMe
6a				121.7 <i>s</i>	
7				153.2 <i>s</i>	
8				142.9 <i>s</i>	
9				154.7 <i>s</i>	
10	6.85 <i>s</i>	9-OMe	H-10b, 9-OMe, NMe	110.0 <i>d</i>	C-6a, C-8, C-9, C-10a, C-10b, C-7
10a				134.1 <i>s</i>	
10b	2.47 <i>dd</i> (10.0, 2.0)	H-1, H-4a	H-1, H-10, H-12 α	44.1 <i>d</i>	C-4a, C-6a, C-10, C-10a
11 α/β	2.49–2.58 <i>m</i>	H-3, H-12 α , H-12 β	H-3, H-12 α	28.6 <i>t</i>	
12 α	3.22 <i>ddd</i> (10.5, 7.5, 3.0)	H-11 α/β , H-12 β	H-10b, H-11 α/β , H-12 β , NMe	57.7 <i>t</i>	
12 β	2.42 <i>m</i>	H-11 α/β , H-12 α	H-12 α , NMe		
6-OMe	3.51 <i>s</i> (3H)		H-1, H-6 β	55.6 <i>q</i>	C-6
7-OMe	3.89 <i>s</i> (3H)			61.5 <i>q</i>	C-7
8-OMe	3.82 <i>s</i> (3H)			61.2 <i>q</i>	C-8
9-OMe	3.87 <i>s</i> (3H)	H-10	H-10	56.6 <i>q</i>	C-9
NMe	2.11 <i>s</i> (3H)		H-4a, H-10, H-12 α , H-12 β	44.0 <i>q</i>	C-4a, C-12

Table 6¹H NMR, COSY, NOESY, HSQC, and HMBC data of nerinine (**5**) (400 MHz, CDCl₃).

Position	δ_{H} (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
1	4.52 <i>ddd</i> (5.6, 2.0, 1.0)	H-2 α , H-2 β , H-10b	H-2 α , H-2 β , H-10b	66.3 <i>d</i>	C-3, C-4a, C-6
2 α	2.65 <i>ddt</i> (19.2, 6.0, 2.8)	H-1, H-2 β , H-3	H-1, H-2 β , H-3	31.9 <i>t</i>	
2 β	2.34 <i>dt</i> (19.2, 2.5)	H-1, H-2 α , H-3	H-1, H-2 α , H-3		
3	5.47 <i>br m</i>	H-2 α , H-2 β , H-4a, H-11 α/β	H-2 α , H-2 β , H-11 α/β	115.8 <i>d</i>	
4				141.1 <i>s</i>	
4a	2.73 <i>d</i> (9.6)	H-3, H-10b	H-6 β , H-12 β , NMe	67.5 <i>d</i>	
6 β	6.14 <i>s</i>		H-4a, 7-OMe	89.8 <i>d</i>	C-1, C-7, C-10a
6a				121.2 <i>s</i>	
7				151.3 <i>s</i>	
8				141.2 <i>s</i>	
9				153.1 <i>s</i>	
10	6.77 <i>s</i>		H-10b, 9-OMe, NMe	109.1 <i>d</i>	C-6a, C-8, C-9, C-10b
10a				133.6 <i>s</i>	
10b	2.41 <i>dd</i> (9.6, 1.5)	H-1, H-4a	H-1, H-10	44.5 <i>d</i>	C-4a, C-6a, C-10, C-10a
11 α/β	2.44–2.51 <i>br m</i>	H-3, H-12 α , H-12 β	H-3, H-12 α , H-12 β	28.4 <i>t</i>	
12 α	3.14 <i>m</i>	H-11 α/β , H-12 β	H-11 α/β , H-12 β , NMe	57.1 <i>t</i>	C-4, C-4a
12 β	2.24 <i>q</i> (9.2)	H-11 α/β , H-12 α	H-4a, H-11 α/β , H-12 α , NMe		NMe
7-OMe	3.99 <i>s</i> (3H)		H-6 β	61.4 <i>q</i>	C-7
8-OMe	3.87 <i>s</i> (3H)			61.0 <i>q</i>	C-8
9-OMe	3.86 <i>s</i> (3H)		H-10, NMe	56.3 <i>q</i>	C-9
NMe	2.06 <i>s</i> (3H)		H-4a, H-10, H-12 α , H-12 β , 9-OMe	44.6 <i>q</i>	C-4a, C-12

(4 × 250 ml) to remove neutral material. The aqueous solution was basified with ammonia (25%) up to pH 10 and extracted with *n*-hexane (8 × 250 ml) to give extract IA (0.86 g). Another extraction using EtOAc (8 × 250 ml) produced extract IIA (2.0 g), wherein lycorine (**10**) precipitated spontaneously. A final extraction using EtOAc–MeOH (3:1, 3 × 250 ml) showed negative results for alkaloids as confirmed by Dragendorff's reagent stain and GC–MS.

Extract IA was subjected to VLC (2.5 × 6 cm) on silica gel (10 g), starting with *n*-hexane (100%), gradually enriching with EtOAc (0 → 100%), and finally with MeOH (0 → 30%). A total of 150, 50 ml fractions were collected, monitored by analytical TLC (Dragendorff's reagent, UV light λ 254 nm) and combined after TLC analysis. Nerinine (**5**, 15 mg) was isolated by precipitation of fractions 65–86, and the supernatant was submitted to SPTLC (EtOAc–Me₂CO–*n*-hexane–MeOH – 6:2:1:1, in NH₃ atmosphere), which allowed for the isolation of 7-methoxy-*O*-methyllycorenine (**4**, 6.5 mg) and galanthamine (**13**, 10 mg). Fractions 87–118 gave haemanthamine (**15**) and aulicine (**1**) again by precipitation and further purification by SPTLC (*n*-hexane–EtOAc–Me₂CO–MeOH–*n*-

BuOH – 4:3:3:2:1, in NH₃ atmosphere). The supernatant was loaded onto a VLC column (1.5 × 4 cm) of silica gel (3 g), using *n*-hexane (100%) as the starting solvent, gradually enriched with EtOAc (0 → 100%), and finally with MeOH (0 → 30%), ultimately yielding 250 fractions (each 10 ml). After combining the fractions according to the TLC profiles, 11-oxohaemanthamine (**3**, 5.3 mg) was isolated from pooled fractions 93–113 using SPTLC (*n*-hexane–Me₂CO–EtOAc–MeOH – 15:10:5:2, in NH₃ atmosphere). Fractions 222–250 were combined and subjected to SPTLC (*n*-hexane–EtOAc–Me₂CO–MeOH–*n*-BuOH – 4:3:3:2:1, in NH₃ atmosphere), after which **1** and **15** were again isolated.

Alkaloid **15** precipitated spontaneously from extract IIA after resuspension in MeOH. The supernatant (700 mg) was purified by silica gel VLC (2 × 6 cm column, 10 g), starting with *n*-hexane (100%), gradually enriching with EtOAc (0 → 100%) and finally with MeOH (0 → 30%), ultimately yielding 200 fractions (50 ml each) that were then pooled according to TLC profile analysis. SPTLC (*n*-hexane–EtOAc–Me₂CO–MeOH–*n*-BuOH – 4:3:3:2:1, in NH₃ atmosphere) of fractions 134–190 gave **1** (152 mg), **15**

Table 7
¹H NMR, COSY, NOESY, HSQC, and HMBC data of albomaculine (**6**) (400 MHz, CDCl₃).

Position	δ_{H} (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
1	4.68 <i>br m</i>	H-2 α / β , H-3, H-10b	H-2 α / β , H-10b	76.3 <i>d</i>	C-3, C-4a, C-10a
2 α / β	2.55–2.60 <i>br m</i>	H-1, H-3, H-11 α / β	H-1, H-3	31.0 <i>t</i>	C-1, C-3, C-10b
3	5.48 <i>br m</i>	H-1, H-2 α / β , H-4a, H-11 α / β	H-2 α / β , H-11 α / β	115.6 <i>d</i>	
4				140.6 <i>s</i>	
4a	2.72 <i>d</i> (10.0)	H-3, H-10b	NMe	66.0 <i>d</i>	
6				162.4 <i>s</i>	
6a				111.6 <i>s</i>	
7				156.3 <i>s</i>	
8				142.7 <i>s</i>	
9				157.2 <i>s</i>	
10	6.78 <i>s</i>		H-10b, 9-OMe, NMe	107.4 <i>d</i>	C-6a, C-8, C-10b
10a				140.8 <i>s</i>	
10b	2.63 <i>d</i> (10.0)	H-1, H-4a	H-1, H-10	45.5 <i>d</i>	
11 α / β	2.45–2.53 <i>br m</i>	H-2 α / β , H-3, H-12 α , H-12 β	H-3, H-12 α , H-12 β	28.1 <i>t</i>	C-4
12 α	3.13 <i>ddd</i> (9.6, 7.2, 3.6)	H-11 α / β , H-12 β	H-11 α / β , H-12 β , NMe	56.6 <i>t</i>	
12 β	2.23 <i>q</i> (9.6)	H-11 α / β , H-12 α	H-11 α / β , H-12 α		C-11, NMe
7-OMe	3.99 <i>s</i> (3H)			62.1 <i>t</i>	C-7
8-OMe	3.89 <i>s</i> (3H)			61.3 <i>t</i>	C-8
9-OMe	3.91 <i>s</i> (3H)		H-10, NMe	56.5 <i>t</i>	C-9, C-10
NMe	2.05 <i>s</i> (3H)		H-4a, H-10, H-12 α , 9-OMe	43.7 <i>t</i>	

(161.1 mg) and **10** (135 mg), while a small quantity of tazettine (**19**, 3.2 mg) precipitated from fractions 191–205. GC–MS spectra of the remaining fractions indicated the presence of only known compounds (Table 1), which therefore precluded the need for further chromatographic analyses.

Dried bulbs (135 g) of *H. calyptratum* were crushed and extracted by stirring with MeOH at room temperature for 48 h (repeating three times), and the combined macerate was filtered and evaporated under reduced pressure. The crude extract (50 g) was acidified with sulphuric acid (2%) to pH 2 and extracted with Et₂O (4 × 250 ml) and EtOAc (4 × 250 ml) to remove neutral material. The aqueous solution was then basified with ammonia (25%) up to pH 10 and extracted with *n*-hexane (8 × 250 ml) to give extract IC (100 mg). Extraction with EtOAc (8 × 250 ml) gave extract IIC (300 mg). A final extraction using EtOAc–MeOH (3:1) showed negative results for alkaloids as confirmed by Dragendorff's reagent and GC–MS analysis.

Extracts IC and IIC (400 mg) were combined after GC–MS showed them to be similar. Alkaloid **10** precipitated after re-suspension in MeOH and the supernatant was purified by VLC (2.5 × 4 cm column, 10 g of silica gel) using the same solvent system as that for *H. ulicum*. Alkaloid **10** (115 mg) precipitated directly from fractions 93–140. Fractions 71–170 were combined (250 mg) and subjected to VLC (1.5 × 4 cm column) in silica gel (3 g) using *n*-hexane (100%) followed by EtOAc (0 → 100%) and finally with MeOH (0 → 30%), ultimately yielding 250 fractions (10 ml each). Only fractions 145–200 (110 mg) showed alkaloids with unknown GC–MS fragmentation patterns and were therefore selected for further VLC, which was carried out on silica gel (3 g) using a 1.5 × 4 cm column, starting with *n*-hexane (100%) and increasing solvent polarity with EtOAc (0 → 50%). Thereafter, CHCl₃ and EtOAc were gradually added until a CHCl₃–EtOAc ratio of 1:1 was reached. Finally, the system was gradually enriched with MeOH (0 → 30%), ultimately yielding 200 fractions (10 ml each). Albomaculine (**6**, 19.3 mg) was isolated from fractions 69–88 by SPTLC (Me₂CO–CH₂Cl₂ – 3:10, in NH₃ atmosphere) together with 2 α ,7-dimethoxyhomolycorine (**9**, 3.2 mg). Likewise, 3-*O*-methyl-epimacowine (**2**, 18.3 mg) and alkaloid **13** (7.7 mg) were isolated from fractions 89–148 using SPTLC (EtOAc–Me₂CO–CH₂Cl₂–MeOH – 3:1:1:0.5, in NH₃ atmosphere).

4.4. Identification of alkaloids by GC–MS

The alkaloids were identified by comparing their GC–MS spectra and Kovats retention indices (RI) with our library database. This

library has been regularly updated with alkaloids isolated and unequivocally identified via physical and spectroscopic means (Berkov et al., 2008; de Andrade et al., 2011, 2012b; Giordani et al., 2011; Llabrés et al., 1986). NMR data for the known alkaloids described here closely matched those reported elsewhere (Bastida et al., 2006; Kobayashi et al., 1980). Mass spectra were deconvoluted using the AMDIS 2.64 software (NIST) (WA, USA), and RIs were recorded using a standard *n*-hydrocarbon calibration mixture (C9–C36). The proportion of individual components in the alkaloid fractions are expressed as a percentage of total alkaloid content. GC–MS peak areas are dependent on the concentration of the injected alkaloid as well as the intensity of its mass spectral fragmentation. Although the data given in Table 1 are not representative of a validated alkaloid quantification method, these data can be used for relative comparison purposes.

4.5. Crystals of aulicine (**1**)

Compound **1** was dissolved in a MeOH–CHCl₃ (1:1) mixture under a pentane atmosphere. After 14 days standing at ~5 °C, small crystals of **1** formed and were selected for X-ray crystallography.

4.6. X-ray analysis

A prismatic crystal (0.1 × 0.1 × 0.2 mm) was selected and mounted on a Bruker D8 Venture four-circle diffractometer (Karlsruhe, Germany). Intensities were collected with a multilayer monochromator and a Cu high brilliance microfocus sealed tube using the ϕ and ω scan-technique. A total of 24158 reflections were measured in the range of $2.93 \leq \theta \leq 74.32$, with 6377 of the reflections non-equivalent by symmetry ($R_{\text{int}}(\text{on } I) = 0.031$). Overall, 6028 reflections were assumed to be as observed by applying the condition $I > 2\sigma(I)$. Lorentz-polarisation and absorption corrections were performed.

The structure was solved by direct methods, using the SHELXS computer program (and refined by a full-matrix least-squares method with the SHELXL97 computer program (Sheldrick, 2008)) and 24158 reflections, (very negative intensities were not assumed). The function minimised was $\sum w ||F_o|^2 - |F_c|^2|^2$, where $w = [\sigma^2(I) + (0.0343P)^2 + 0.8335P]^{-1}$, and $P = (|F_o|^2 + 2 |F_c|^2)/3$, f , f' and f'' were taken from the International Tables of X-ray Crystallography (1974). All H atoms were computed and refined using a riding model, with an isotropic temperature factor equal to 1.2 times the equivalent temperature factor of the atoms that

are linked. The final $R(\text{on } F)$ factor was 0.0298, $wR(\text{on } |F|^2) = 0.074$ and goodness of fit = 1.042 for all observed reflections. The number of refined parameters was 423. Max. shift/esd = 0.00, Mean shift/esd = 0.00. Max. and min. peaks in the final difference synthesis were 0.215 and -0.164 e\AA^{-3} , respectively.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Generalitat de Catalunya (2009 – SGR1060) for the financial support of this research and to the SCT-UB personnel for technical assistance. Special thanks is given to Mr. Mauro Peixoto for the collection of plant material. J.A.S.Z. acknowledges CNPq (Brazil) for a research fellowship. J.P.A. thanks the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (BECAS-MAEC-AECID) for a doctoral fellowship.

References

- Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F., Rubiralta, M., Quirion, J.C., Weniger, B., 1992. *Narcissus* alkaloids, XV: Roserine from *Narcissus pallidulus*. *J. Nat. Prod.* 55, 134–136.
- Bastida, J., Lavilla, R., Viladomat, F., 2006. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In: Cordell, G.A. (Ed.), *The Alkaloids*, vol. 63. Elsevier Inc., Amsterdam, pp. 87–179.
- Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., 2008. *N*-Alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 2263–2266.
- Berkov, S., Bastida, J., Sidjimova, B., Viladomat, F., Codina, C., 2011. Alkaloid diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*. *Chem. Biodivers.* 8, 115–130.
- Boit, H.G., Döpke, W., 1957. Alkaloids of the Amaryllidaceae. XVIII. Alkaloids from *Urceolina*, *Hymenocallis*, *Elisena*, *Calostemma*, *Eustephia*, and *Hippeastrum*. *Chem. Ber.* 90, 1827–1830.
- Boit, H.G., Döpke, W., 1960. New alkaloids from *Hippeastrum* hybrids and *Nerine flexuosa*. *Naturwissenschaften* 47, 470–471.
- Briggs, C.K., Highet, P.F., Highet, R.J., Wildman, W.C., 1956. Alkaloids of the Amaryllidaceae. VII. Alkaloids containing the hemiacetal or lactone group. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2899–2904.
- Cedron, J.C., Gutiérrez, D., Flores, N., Ravelo, Á.G., Estévez-Braun, A., 2012. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 5464–5472.
- Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., Rubiralta, M., Quirion, J.C., 1992. 2D NMR studies of lycorenine as a model for the structural assignment of lycorenine-type alkaloids. *Nat. Prod. Lett.* 1, 85–92.
- Codina, C., Bastida, J., Viladomat, F., Fernández, J.M., Bergoñón, S., Rubiralta, M., Quirion, J.C., 1993. Alkaloids from *Narcissus muñozii-garmendiae*. *Phytochemistry* 32, 1354–1356.
- de Andrade, J.P., Berkov, S., Viladomat, F., Codina, C., Zuanazzi, J.A.S., Bastida, J., 2011. Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. *Molecules* 16, 7097–7104.
- de Andrade, J.P., Pigni, N.B., Torras-Claveria, L., Guo, Y., Berkov, S., Reyes-Chilpa, R., El Amrani, A., Zuanazzi, J.A.S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., 2012a. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Rev. Latinoam. Quim.* 40, 83–98.
- de Andrade, J.P., Pigni, N.B., Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., 2012b. Bioactive alkaloids from *Narcissus broussonetii*: mass spectral studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70, 13–25.
- De Angelis, G.G., Wildman, W.C., 1969. Circular dichroism studies – I. A quadrant rule for the optically active aromatic chromophore in rigid polycyclic systems. *Tetrahedron* 25, 5099–5112.
- Döpke, W., 1962. Alkaloids of the *Hippeastrum* type. *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.* 295, 920–924.
- Duffield, A.M., Aplin, R.T., Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Murphy, C.F., Wildman, W.C., 1965. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXXII. A study of the fragmentation of some Amaryllidaceae alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 4902–4912.
- Giordani, R.B., Vieira, P.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., Souza, A.P., Bonorino, C., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T., 2010. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trypanomonas vaginalis*. *J. Nat. Prod.* 73, 2019–2023.
- Giordani, R.B., de Andrade, J.P., Verli, H., Dutilh, J.H., Henriques, A.T., Berkov, S., Bastida, J., Zuanazzi, J.A.S., 2011. Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae). *Magn. Reson. Chem.* 49, 668–672.
- International Tables of X-ray Crystallography, 1974. Ed. Kynoch Press, Birmingham, vol. IV, pp 99–100, 149.
- Jeffs, P.W., Hawksorth, W.A., 1963. Aromatic oxygenation patterns of some trioxyaryl Amaryllidaceae alkaloids belonging to the hemi-acetal and lactone group. *Tetrahedron Lett.* 4, 217–223.
- Kobayashi, S., Kihara, M., Shingu, T., Shingu, K., 1980. Transformation of tazettine to pretazettine. *Chem. Pharm. Bull.* 80, 2924–2932.
- Kreh, M., Matusch, R., Witte, L., 1995. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry* 38, 773–776.
- Kulhánková, A., Čahlíková, L., Novák, Z., Macáková, K., Kunes, J., Opletal, L., 2013. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chem. Biodivers.* 10, 1120–1127.
- Labrés, J.M., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., Serrano, M., Rubiralta, M., Feliz, M., 1986. Two alkaloids from *Narcissus requiemii*. *Phytochemistry* 25, 1453–1459.
- Nair, J.J., Machocho, A.K., Campbell, W.E., Brun, R., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J., 2000. Alkaloids from *Crinum macowanii*. *Phytochemistry* 54, 945–950.
- Pabuççoğlu, V., Richomme, P., Gözler, T., Kivçak, B., Freyer, A.J., Shamma, M., 1989. Four new crinine-type alkaloids from *Sternbergia* species. *J. Nat. Prod.* 52, 785–791.
- Pacheco, P., Silva, M., Steglich, W., 1978. Alkaloids of Chilean Amaryllidaceae I. Hippeastidine and epi-homolycorine two novel alkaloids. *Rev. Latinoam. Quim.* 9, 28–32.
- Schnoes, H.K., Smith, D.H., Burlingame, A.L., Jeffs, P.W., Döpke, W., 1962. Mass spectra of Amaryllidaceae alkaloids – the lycorenine series. *Tetrahedron* 24, 2825–2837.
- Sheldrick, G.M., 2008. A program for automatic solution of crystal structure refinement. *Acta Crystallogr.* A64, 112–221.
- Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., 2013. Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Ind. Crops Prod.* 43, 237–244.
- Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J., Mathee, S., Campbell, W.E., 1995. Further alkaloids from *Brunsvigia josephinae*. *Phytochemistry* 40, 961–965.
- Wagner, J., Pham, H.L., Döpke, W., 1996. Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. – 5. Circular dichroism studies. *Tetrahedron* 52, 6591–6600.
- Watson, W.H., Zabel, V., 1982. Hippeastidine $C_{17}H_{23}O_4N$. *Cryst. Struct. Commun.* 11, 157–162.

4. DISCUSIÓN

4.1. Discusión: consideraciones generales

Para realización de esta Tesis Doctoral cabe señalar que las especies del género *Hippeastrum* fueron seleccionadas en base a los estudios previos por GC-MS. A su vez, la especie africana fue elegida para completar el estudio del género *Narcissus*, investigación que el grupo de Productos Naturales de esta Universidad viene realizando desde inicios de los años 80.

De manera esquemática, y considerando las técnicas utilizadas, el trabajo desarrollado ha transcurrido, secuencialmente, por los cinco apartados que a continuación se detallan:

- I. **Búsqueda de nuevos compuestos.** La técnica GC-MS es la herramienta más adecuada para esta finalidad. Se realiza un estudio previo de la especie utilizando una pequeña cantidad de muestra con el objetivo de seleccionar las especies que presenten el mayor número de compuestos nuevos, o que no estén incluidos en nuestra propia base de datos (librería específica de MS de alcaloides de Amaryllidaceae que actualmente contempla unos 200 componentes). Gracias al patrón de fragmentación característico de los distintos esqueletos tipo podemos inferir si un determinado alcaloide es de interés para su posterior aislamiento y caracterización.
- II. **Purificación y aislamiento.** Las fracciones ricas en alcaloides se someten a purificación utilizando distintas técnicas cromatográficas y, posteriormente, se analizan por GC-MS; los resultados obtenidos permiten dirigir el aislamiento hacia las fracciones de mayor interés.
- III. **Elucidación estructural.** Una vez aislados y purificados los nuevos compuestos se lleva a cabo su completa elucidación estructural utilizando, principalmente, 1D y 2D-RMN, GC-MS, HRMS, CD y, cuando se precisa, la difracción de rayos-X.

- IV. **Aporte de datos de fragmentación de masas.** Un aspecto nuevo documentado en esta tesis fue la identificación de compuestos que presentan problemas de elución/detección por GC-MS, por ello se propuso como alternativa la utilización de HPLC-ESI-MS. Con esta herramienta se llevó a cabo el estudio de las rutas de fragmentación de estos compuestos, siendo posible identificar aspectos estructurales relacionados con dichos patrones. Es importante señalar que el estudio del patrón de fragmentación de moléculas ya conocidas también está estrechamente relacionado con la búsqueda de nuevas estructuras.
- V. **Actividad biológica.** A lo largo de este trabajo, siempre que ha sido posible, se han llevado a cabo estudios de actividad biológica y, en concreto, de la actividad inhibidora del enzima AChE y de la actividad antiparasitaria. Cabe destacar que en la mayoría de los casos, el principal factor limitante a la hora de concretar estudios de bioactividad suele ser que la cantidad de material resulta insuficiente.

Con la finalidad de realizar la discusión de los resultados de manera ordenada, ésta se llevará a cabo en 3 apartados que hacen referencia a los trabajos publicados:

- i) Alcaloides de *Hippeastrum papilio*.
- ii) Extractos de alcaloides bioactivos de *Narcissus broussonetii*: estudios de espectrometría de masas.
- iii) Alcaloides de tipo crinina de *Hippeastrum aulicum* y *H. calypratrum*.

4.2. Alcaloides de *Hippeastrum papilio*

La especie *Hippeastrum papilio* presenta bulbos de un tamaño notable, que en algunos casos pueden superar el kg de peso fresco, característica bastante general en el género *Hippeastrum*. Así, la recolección del material vegetal se reduce a unos pocos ejemplares, favoreciendo su preservación. El análisis previo del extracto de esta

especie por GC-MS reveló la presencia de un posible compuesto nuevo, similar al alcaloide habrantina (también conocido como 11-hidroxicigantamina). Dicho compuesto se encontraba en nuestra base de datos pero se observaban diferencias significativas entre sus índices de retención, resultando de interés para plantear la recolección de dicha especie y su posterior estudio fitoquímico.

Utilizando los procedimientos habituales de extracción y purificación se obtuvieron aproximadamente 55 mg del compuesto mencionado, cuya posterior caracterización estructural permitió identificarlo como 11 β -hidroxigantamina.

4.2.1. 11 β -Hidroxigantamina

El espectro obtenido mediante GC-MS presentaba fragmentos característicos de los alcaloides del tipo galantamina. Dicho esqueleto tipo puede ser fácilmente identificado debido a la notable abundancia relativa de los iones $[M]^+$ y $[M-1]^+$, sobrepasando el 20%, sólo comparable a lo observado para alcaloides del esqueleto tipo licorina. El patrón de fragmentación de los compuestos tipo galantamina está influenciado por: i) el sustituyente en C-3; ii) la presencia o ausencia de una olefina; iii) la presencia o no de un sustituyente en C-11; iv) los sustituyentes del nitrógeno.

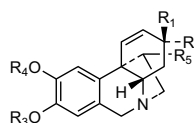
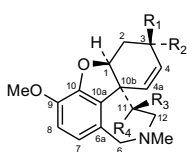
El compuesto en estudio presentaba un ion a m/z 230 como pico base, lo cual se correspondía con la pérdida de un fragmento conteniendo el átomo de N. Dicha fragmentación está favorecida por la presencia de un sustituyente hidroxilo en C-11. También se observó el ion a m/z 286, procedente de la pérdida del hidroxilo de la posición 3. Dichas observaciones estaban de acuerdo con los estudios de Hesse y Bernhard (1975), posteriormente revisados (Berkov *et al.*, 2012). Por otra parte, el resultado de HRMS indicó un valor de 304.1550 para el ion $[M+1]^+$, correspondiente a la fórmula empírica $C_{17}H_{22}NO_4$ (calculado para 304.1549), la misma de habrantina, sugiriendo que la diferencia de índices de retención observada entre ambos compuestos podría deberse a algún tipo de isomería, tal como la orientación alternativa del sustituyente hidroxilo en C-11.

El estudio de 1H -RMN permitió caracterizar ambos compuestos. De manera general, el espectro observado coincidía con el descrito para habrantina, excepto para los protones H-1 y H-11. Así, en habrantina el protón de la posición 11 tiene un desplazamiento de δ 3.47, bastante más apantallado que el protón de la misma

posición del compuesto en estudio (δ 4.05). Por otra parte, el protón de la posición 1 se encuentra 0.45 ppm más apantallado que homólogo en habrantina (Tato *et al.*, 1988). La constante de acoplamiento de 10.8 Hz observada entre los protones H-11 y H-12 axial, a diferencia del valor de 1.6 Hz observado para habrantina (Tato *et al.*, 1988), respaldó la correcta asignación del compuesto. El H-12 axial corresponde al protón β , confirmado por las correlaciones NOE observadas entre H-4a/H-6 β /H-12 β . De esta manera, la relación *trans* diaxial entre H-12 β y H-11 pone de manifiesto la orientación de este último en α , indicando la configuración β del hidroxilo. La correlación NOESY entre los protones H-1 y H-11 α también apoyaba la estructura propuesta. En consecuencia, la asignación del compuesto como 11 β -hidroxigalantamina confirmó que habrantina, aislado previamente de *Habranthus brachyandrum* y *Pancratium maritimum*, se corresponde con 11 α -hidroxigalantamina.

4.2.2. Otros alcaloides identificados

Además de 11 β -hidroxigalantamina, se identificaron los alcaloides galantamina, narwedina, vitatina, hemantamina, 11-hidroxitatina y 8-*O*-demetilmaritidina. Esta es la primera vez que se detecta la presencia de galantamina en cantidades apreciables en el género *Hippeastrum*. En la figura 4.1 se muestran los alcaloides identificados en *H. papilio*.



11 β -Hidroxisgalantamina: R₁=OH, R₂=H, R₃=OH, R₄=H
Galantamina: R₁=OH, R₂=R₃=R₄=H
Narwedina: R₁+R₂=O, R₃=R₄=H

Hemantamina: R₁=OMe, R₂=H, R₃+R₄=CH₂, R₅=OH
11-Hidroxitatina: R₁=OH, R₂=H, R₃+R₄=CH₂, R₅=OH
8-*O*-Demetilmaritidina: R₁=OH, R₂=H, R₃=H, R₄=Me, R₅=H
Vitatina: R₁=OH, R₂=H, R₃+R₄=CH₂, R₅=H

Figura 4.1: Alcaloides aislados de *H. papilio*

4.2.3. Actividad de inhibición del enzima acetilcolinesterasa

Los alcaloides del tipo galantamina poseen una remarcable actividad inhibidora del enzima AChE. Desde los años 50, la galantamina se ha utilizado para la terapia de distintas enfermedades (Nivalin[®]), particularmente aquellas relacionadas con

problemas neuromotores, como la miastenia *gravis* y la poliomielitis (Heinrich y Teoh, 2004). En los años 90, dicho compuesto empezó a vincularse con el tratamiento de la AD (Reminyl[®], Razadyne[®]), tras observarse su actividad agonista sobre los receptores nicotínicos, lo que conducía a una mayor actividad colinérgica cuando se comparaba con otros fármacos inhibidores de la AChE, como p.e. fisostigmina o tacrina (Maelicke *et al.*, 2001).

Estudios previos indicaban que habrantina presentaba una importante actividad inhibidora de la AChE, con valores similares a los cuantificados para galantamina (López *et al.*, 2002). Utilizando la misma metodología de análisis, se evaluó la actividad de 11 β -hidroxigalantamina. El resultado indicó un valor de IC₅₀ de 14.5 μ M, del orden de 10 veces inferior al de galantamina y, a su vez, también inferior al de su epímero habrantina. En la figura 4.2 se muestran los resultados del ensayo, expresados como porcentaje de inhibición a distintas concentraciones, de 11 β -hidroxigalantamina y galantamina (1.18 \pm 0.07 μ M). Si bien se han realizado estudios cristalográficos del complejo de galantamina-AChE (enzima AChE aislado de *Torpedo californica*) que permitieron plantear la discusión sobre los principales requerimientos estructurales para favorecer dicha actividad, no hay referencias a los derivados sustituidos en posición 11 (Greenblat *et al.*, 1999; Bartolucci *et al.*, 2001).

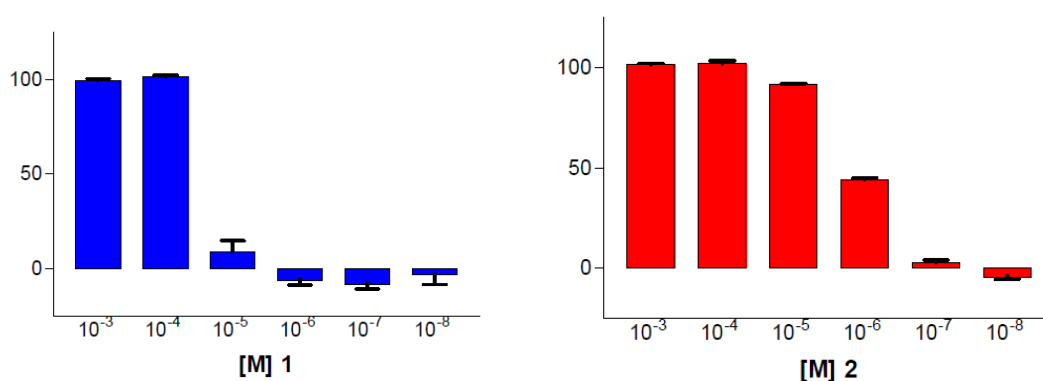


Figura 4.2: Porcentaje de inhibición *versus* concentración de 11 β -hidroxigalantamina (1) y galantamina (2).

4.3. Extractos de alcaloides bioactivos de *Narcissus broussonetii*: estudios de espectrometría de masas.

Narcissus broussonetii es una especie nativa del norte de África. Una población importante fue identificada cerca de Casablanca (Marruecos), procediéndose a su recolección. Inicialmente, llamó la atención la actividad inhibitoria de la fracción EtOAc frente al *Trypanosoma cruzi* (1.77 µg/mL, valor referencia 0.349 µg/mL para benznidazol). Al mismo tiempo, los estudios previos por GC-MS del extracto de esta especie revelaron en torno a una veintena de alcaloides, tres de los cuales se detectaron a tiempos de retención muy tardíos mostrando, además, picos moleculares pares en sus espectros de masas que indicarían la presencia de un número par de átomos de *N* en sus estructuras. Así, la purificación del extracto se direccionó hacia el aislamiento de dichos compuestos con la finalidad de realizar su caracterización estructural.

El extracto se fraccionó mediante VLC. En el transcurso del estudio los alcaloides tazetina, licorina, homolicorina y 8-*O*-demetilhomolicorina se detectaron en mayor proporción. Algunas consideraciones importantes para el entendimiento de los resultados de GC-MS y del aislamiento de alcaloides se comentan a continuación:

- I. Algunas bases precipitan al resuspender los extractos, hecho que dificulta la correcta comparación entre los resultados de GC-MS y aquellos correspondientes al aislamiento, ya que los alcaloides que precipitan no son cuantificados por GC-MS, pero sí lo son como alcaloides aislados. Es el caso de la licorina, que precipita fácilmente en CHCl₃ o MeOH; el alcaloide homolicorina, también precipitó en la fracción *n*-Hexano.
- II. El alcaloide tazetina, como se comentará a continuación, es un artefacto de extracción de pretazetina. Pretazetina se identifica y cuantifica como tazetina en las condiciones de GC-MS, aunque su detección es posible si realizamos previamente la derivatización.

III. Se observó que algunas fracciones del extracto *n*-Hexano presentaban únicamente alcaloides conocidos, lo que condujo a no continuar su aislamiento. No obstante, estas fracciones fueron cuantificadas por GC-MS.

Se aislaron los alcaloides que presentaban tiempos de retención tardíos y fragmentaciones de masas no identificadas. Los análisis de RMN y HRMS confirmaron que dichas bases correspondían a los compuestos dinitrogenados plicamina, secoplicamina y obliquina. Estos alcaloides son muy poco comunes, habiendo sido aislados únicamente en los géneros *Galanthus* y *Cyrtanthus* (Ünver *et al.*, 1999, Brine *et al.*, 2002). Su síntesis química ha sido desarrollada (Baxendale *et al.*, 2002; Baxendale y Ley, 2005) al resultar de interés los dos átomos de *N* de su estructura y la peculiar fusión del residuo de tiramina incorporado a un esqueleto tipo tazetina (Ünver *et al.*, 1999).

Los aspectos estructurales particulares de estas moléculas llevaron a plantear un estudio más profundo de su fragmentación de masas. Inicialmente, se procedió al análisis mediante GC-MS/MS, pero dificultades de detección y una alta variabilidad en los espectros condujeron a la utilización de HPLC-ESI-MS/MS como alternativa. Existen numerosos trabajos sobre la identificación de compuestos utilizando esta técnica (Mroczek, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011).

4.3.1. HPLC-ESI-MS/MS de obliquina y plicamina

En los espectros MS² de los alcaloides obliquina [449.20→] y plicamina [463.20→] se observan dos iones predominantes: a m/z 329.1504 [C₁₈H₂₁N₂O₄]⁺ y m/z 121.0652 [C₈H₉O]⁺ para obliquina, y a m/z 343.1299 [C₁₈H₁₉N₂O₅]⁺ y m/z 121.0653 [C₈H₉O]⁺ para plicamina. La masa calculada para el fragmento [C₈H₉O]⁺ (calcd 121.0648) se ajusta con la del residuo 4-hidroxifeniletíl, indicando que en ambos alcaloides la primera fragmentación corresponde a la pérdida de dicho sustituyente. Los demás fragmentos presentan una abundancia inferior a 50% en obliquina, e inferior a 20% en plicamina. Además, la diferencia de masas de los fragmentos a m/z 329.1504 y a m/z 343.1299 se debe a la presencia de metileno o carbonilo de la posición 6, respectivamente, demostrando mecanismos similares en la fragmentación inicial (Figura 4.3).

Al profundizar en el espectro MS² de obliquina [449.20→], se pueden apreciar algunos iones abundantes a m/z 364.1553 [C₂₂H₂₂NO₄]⁺, m/z 244.0974 [C₁₄H₁₄NO₃]⁺ y m/z 212.0710 [C₁₃H₁₀NO₂]⁺. Si adicionamos el carbonilo de la posición 6 de dichos fragmentos, obtenemos los iones correspondientes del espectro MS² de plicamina [463.20→] (m/z 378.1345 [C₂₂H₂₀NO₅]⁺, m/z 258.0767 [C₁₄H₁₂NO₄]⁺ y m/z 226.0504 [C₁₃H₈NO₃]⁺), quedando de manifiesto que estas fragmentaciones secuenciales también transcurren por mecanismos compartidos por ambos compuestos.

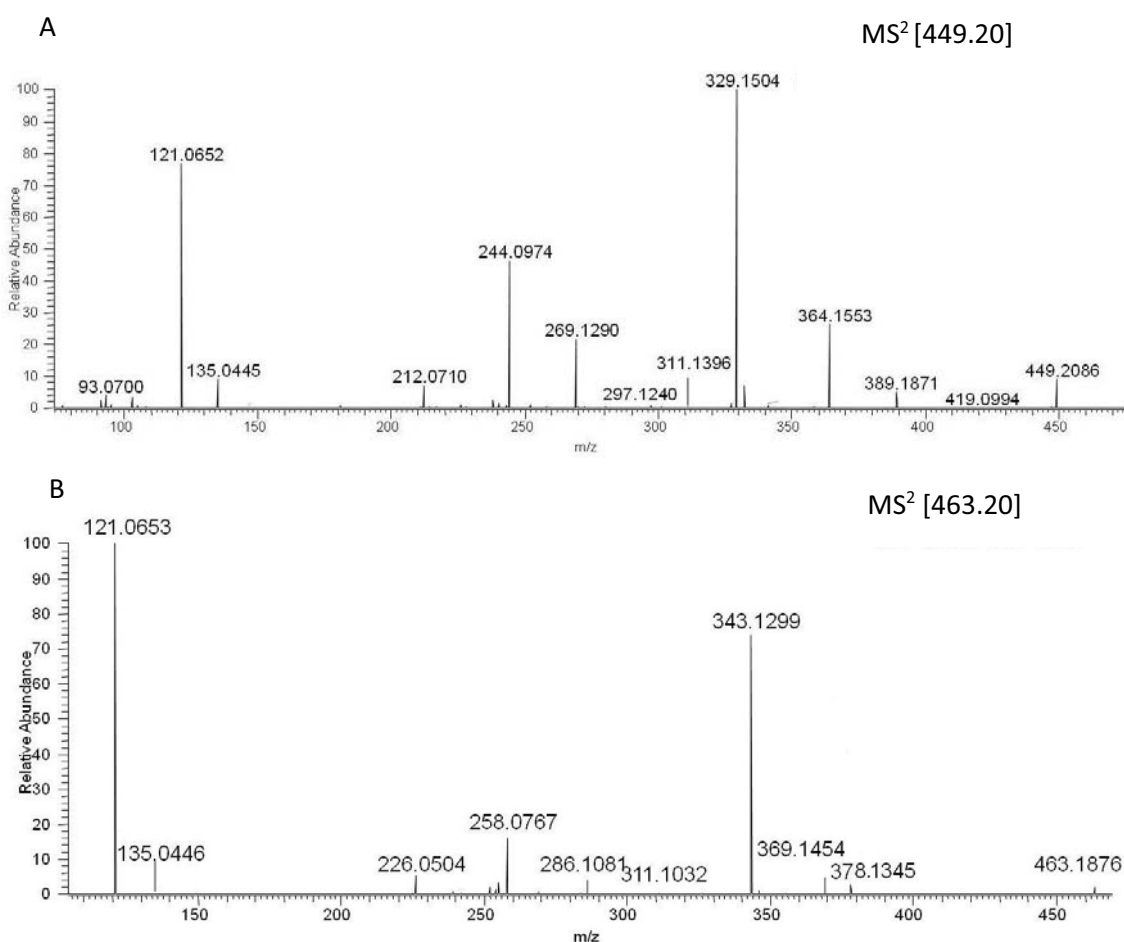


Figura 4.3: Espectros MS² de obliquina (A) y plicamina (B).

La fragmentación desde el ion molecular hasta el m/z 364.1553 en obliquina podría ser explicada por un proceso de rDA en el anillo C, mecanismo ya observado en los derivados benzopirandólicos latifaliumina A y B (Zhang *et al.*, 2009). En dicho trabajo de HPLC-ESI-MS, se reporta la pérdida de 85 uma tras el proceso de rDA. Al analizar el espectro de MS³ de obliquina [449.20→364.15], se observan un ion

abundante a m/z 332.1279 [$C_{21}H_{18}NO_3$]⁺, además de iones de menor abundancia a m/z 244.0966, m/z 212.0703 y m/z 121.0648. El MS⁴ de obliquina [449.20→364.15→332.13] solo presenta el ion a m/z 212.0707, aparte del ion a m/z 121.0650, indicando que el intermediario m/z 332.13 contiene el sustituyente 4-hidroxifeniletíl. Por lo tanto, la fragmentación desde m/z 364.15 hasta m/z 212.07 debe obligatoriamente pasar por el ion a m/z 332.13 (Figura 4.4), aparte de existir una ruta de fragmentación directa [449.20→244.10→212.07] (confirmado en el experimento MS³ [449.20→244.10]).

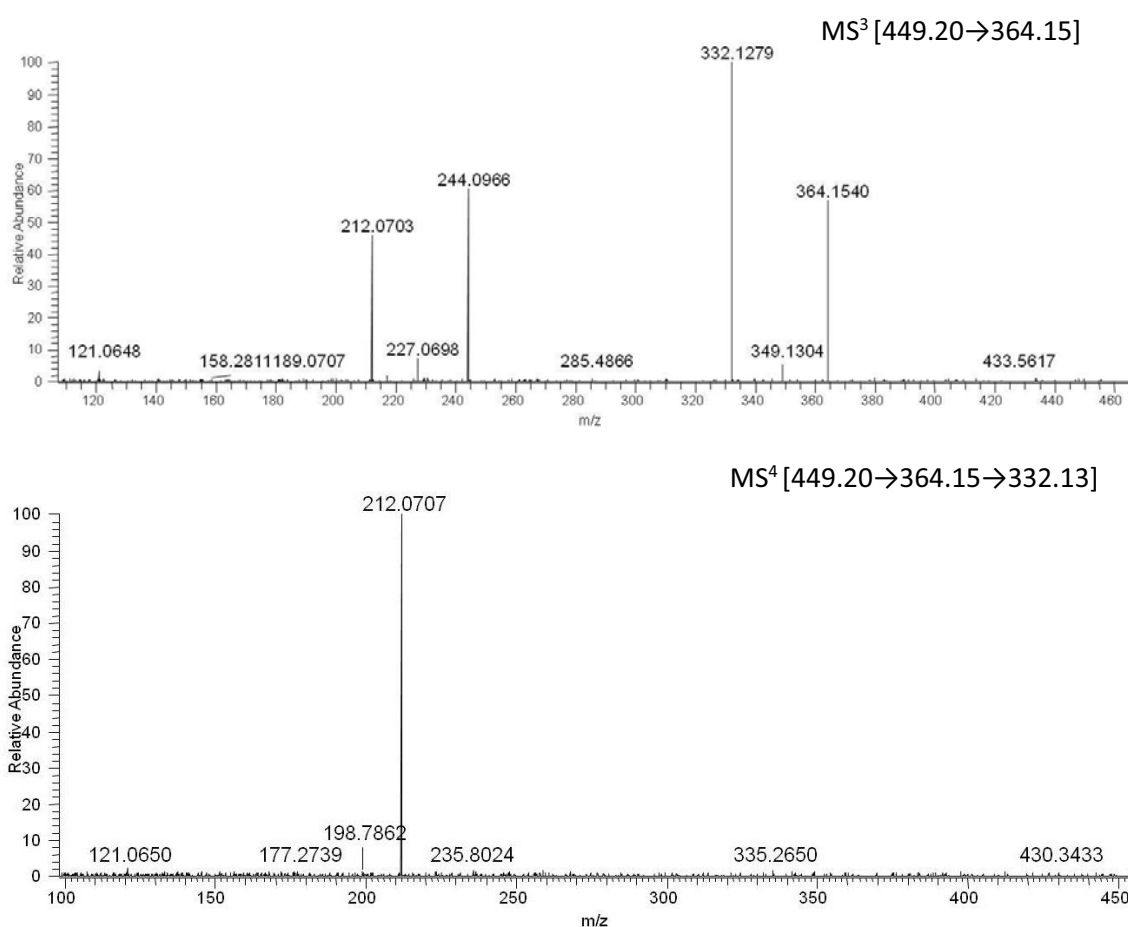


Figura 4.4: Espectros MS³ y MS⁴ de obliquina.

Para comprobar que el patrón de fragmentación transcurría de manera similar en plicamina, se llevó a cabo el experimento MS³ [463.20→378.13], en el que se observan los iones a m/z 346.1078 [$C_{21}H_{16}NO_4$]⁺, m/z 258.0762 y m/z 226.0502,

mientras que el experimento de MS⁴ [463.20→378.13→346.11] solo muestra el ion a *m/z* 226.0497. La ruta presenta intermediarios similares a los de obliquina, con la diferencia ya referenciada de la presencia del carbonilo (Figura 4.5).

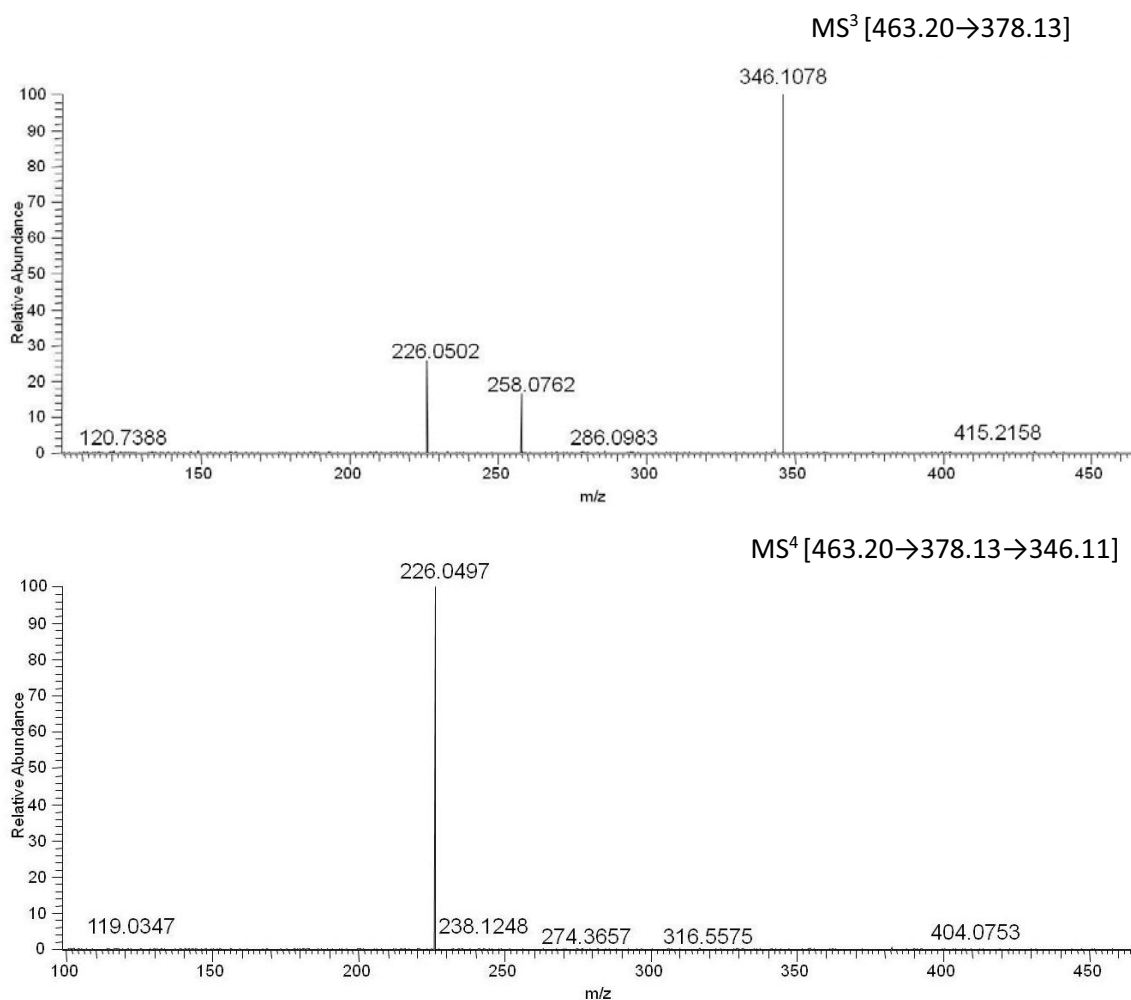


Figura 4.5: Espectros de MS³ y MS⁴ de plicamina.

Los experimentos MS⁴ que se resumen en la Tabla 4.1, apenas confirmaron que la formación del ion a *m/z* 212.07 en obliquina y *m/z* 226.05 en plicamina se llevaba a cabo a través de distintas rutas.

Tabla 4.1: Experimentos MS⁴ de obliquina y plicamina

OBLIQUINA		PLICAMINA	
EXPERIMENTO MS ⁴ (<i>m/z</i>)	ION OBSERVADO	EXPERIMENTO MS ⁴ (<i>m/z</i>)	ION OBSERVADO
[449.20→329.15→244.10]	212.0703	[463.20→343.13→258.08]	226.0500
[449.20→364.15→244.10]	212.0703	[463.20→378.13→258.08]	226.0498

4.3.2. HPLC-ESI-MS/MS de secoplicamina

El experimento MS² de la secoplicamina [465.20→], inicialmente mostró pocas señales, con un pico base a m/z 433.1761 [C₂₅H₂₅N₂O₅]⁺ y otros poco abundantes. Tras el aumento de la energía de colisión (HCD 45), se pudieron observar los fragmentos a m/z 348.1241 [C₂₁H₁₈NO₄]⁺, m/z 228.0661 [C₁₃H₁₀NO₃]⁺ y m/z 181.0653 [C₁₃H₉O]⁺. Es importante remarcar que, incluso tras dicho aumento de la energía de colisión, no se observa el ion a m/z 121.06 (Figura 4.6). Los datos apuntaban a pensar que el sustituyente 4-hidroxifeniletíl queda como núcleo inicial, comenzando la secuencia de fragmentaciones en los anillos C y D, este último abierto.

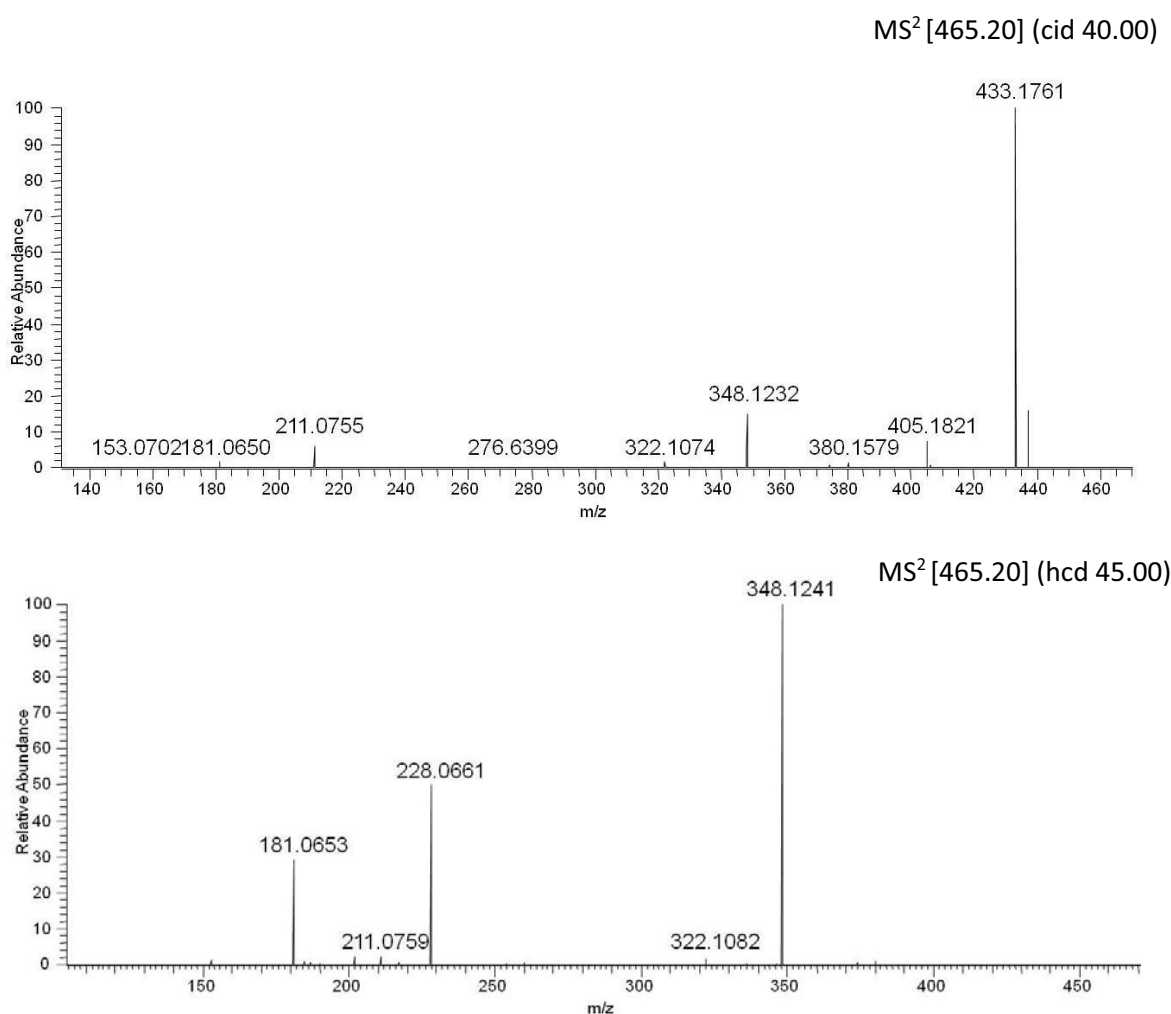


Figura 4.6: Espectros de MS² de secoplicamina.

El ion a m/z 433.1761 proviene del pico molecular, y es congruente con la pérdida del grupo metoxilo de la posición 3, ya documentado para otras isoquinolinas

(Zhang *et al.*, 2009). El experimento MS³ [465.20→433.18] indicó que el ion m/z 348.1232 procede del fragmento a m/z 433.18 por un reordenamiento tipo rDA en el anillo B, resultando en la pérdida de 85 uma, ya comentada en el caso de obliquina y plicamina. Además, se pudieron observar los iones a m/z 211.0754 [C₁₄H₁₁O₂]⁺ y m/z 181.0649, confirmando que este último procedía del anterior (m/z 211.07), a través del experimento MS³ [465.20→211.07]. Para finalizar, la presencia de los fragmentos a m/z 228.0656 y m/z 121.0650 [C₈H₉O]⁺ en el experimento MS³ [465.20→348.12] confirmó que, tras la pérdida de *N* del anillo D ocurre la salida del sustituyente 4-hidroxifeniletíl. Los nitrógenos del compuesto secoplicamina poseen un entorno semejante, con un carbonilo en α en ambos casos. Ésta puede ser una de las razones por la cual la fragmentación se inicia con una rDA en el anillo B, en lugar de comenzar con la pérdida del sustituyente 4-hidroxifeniletíl, observada tanto en obliquina como en plicamina.

4.3.3. Tazetina y Pretazetina

La transformación del alcaloide pretazetina en tazetina durante el proceso de extracción está bien documentada, siendo el cambio a pH básico el factor determinante para la apertura del anillo B de pretazetina, favoreciendo la relajación de su fusión *trans*, la cual presenta una mayor tensión que la *cis* característica de tazetina (Wildman y Bailey, 1968). En el proceso de extracción de alcaloides, se han obtenido pequeñas cantidades de pretazetina junto a una elevada proporción de tazetina debido a su casi completa conversión. Sin embargo, la presencia inicial de tazetina en la especie vegetal no estaba completamente descartada. Dado que las condiciones analíticas de GC-MS también ocasionan dicha conversión, se planteó llevar a cabo la derivatización con BSTFA, con la finalidad de introducir grupos voluminosos de trimetilsilano en los sustituyentes hidroxilo de la molécula para evitar la apertura del anillo B. El procedimiento resultó efectivo, ya que la pretazetina aislada fue detectada bajo su forma derivatizada, es decir, como pretazetina-TMS en el análisis por GC-MS.

Una vez optimizada la metodología, se llevó a cabo pues la derivatización del extracto crudo metanólico de *N. broussonetii*, así como de dos cultivares del género *Narcissus* en los que previamente se había detectado tazetina como alcaloide mayoritario por GC-MS. La ausencia de tazetina derivatizada en dichos extractos

demuestra que toda la tazetina observada en los análisis de GC-MS procede de pretazetina, siendo este alcaloide el único de los dos que se produce naturalmente en las plantas Amaryllidaceae (Figura 4.7).

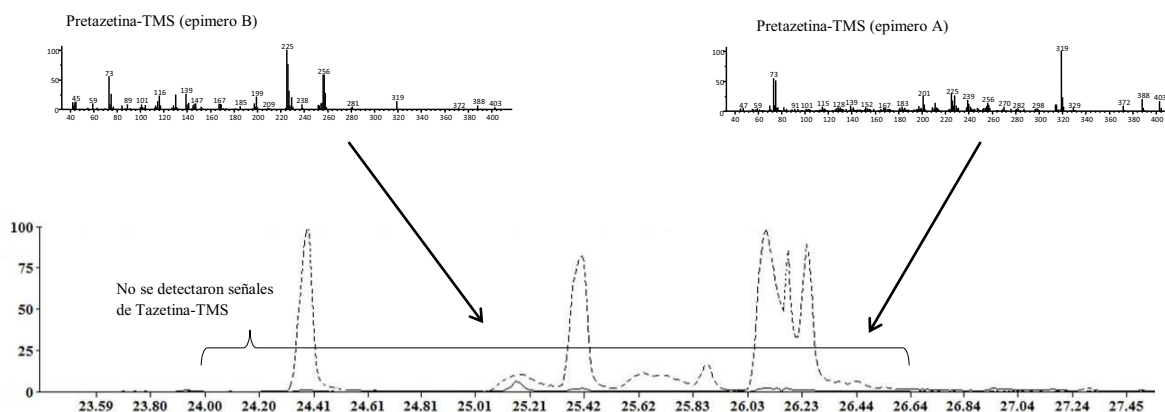


Figura 4.7: Cromatograma del cultivar de *Narcissus* "Toto" con la selección de iones a m/z 256 (línea continua) y a m/z 319 (línea discontinua). En detalle, la identificación de los epímeros A y B de pretazetina-TMS. No se detectó tazetina-TMS.

Asimismo, tras la derivatización, se constató la presencia de 2 señales correspondientes a pretazetina-TMS en el cromatograma de GC-MS, lo que llevó a pensar en la posibilidad que pudiera tratarse de dos epímeros en la posición 6, al igual que sucede con los pares papiramina/6-epipapiramina y hemantidina/6-epihemantidina, también detectados en *N. broussonetii*. El interés en el estudio de la fragmentación de estos alcaloides motivó a realizar el análisis de tazetina-TMS y pretazetina-TMS mediante GC-MS/MS.

El patrón de fragmentación de tazetina-TMS fue bastante similar al del alcaloide tazetina sin derivatizar. La fragmentación de tipo rDA del anillo B que forma el ion a m/z 247 en tazetina (Duffield *et al.*, 1965), se observó también en tazetina-TMS originando el pico a m/z 319 (se adiciona la masa correspondiente al residuo de TMS). Este último fue uno de los iones más abundantes en tazetina-TMS, así como el fragmento a m/z 298, que se origina desde el ion a m/z 313 tras la pérdida de un grupo metilo.

Curiosamente, las dos señales observadas para pretazetina-TMS presentaban los mismos iones pero con distintas abundancias relativas. Se destaca el ion a m/z 256 en

pretazetina-TMS, procedente del fragmento a m/z 298, como resultado de la pérdida de 42 uma (C_3H_7N). Además, en la fragmentación de pretazetina-TMS, también se observan señales que sugieren la ciclación que ocurre en estructuras que presentan un anillo bencénico en posición α respecto al carbono con el sustituyente O -TMS. Esto último está descrito para derivados de hidroxipireno y no se observa en tazetina-TMS, dado que el grupo O -TMS se encuentra en posición 11.

4.3.4. Total de alcaloides identificados

Finalmente, el estudio químico de *N. broussonetii* condujo a la identificación de 23 alcaloides, presentados en la Figura 4.8. Cabe mencionar que el extracto EtOAc mostró una remarcable actividad frente a *Trypanosoma cruzi* a pesar de que los alcaloides ensayados individualmente no presentaron una actividad significativa frente al parásito.

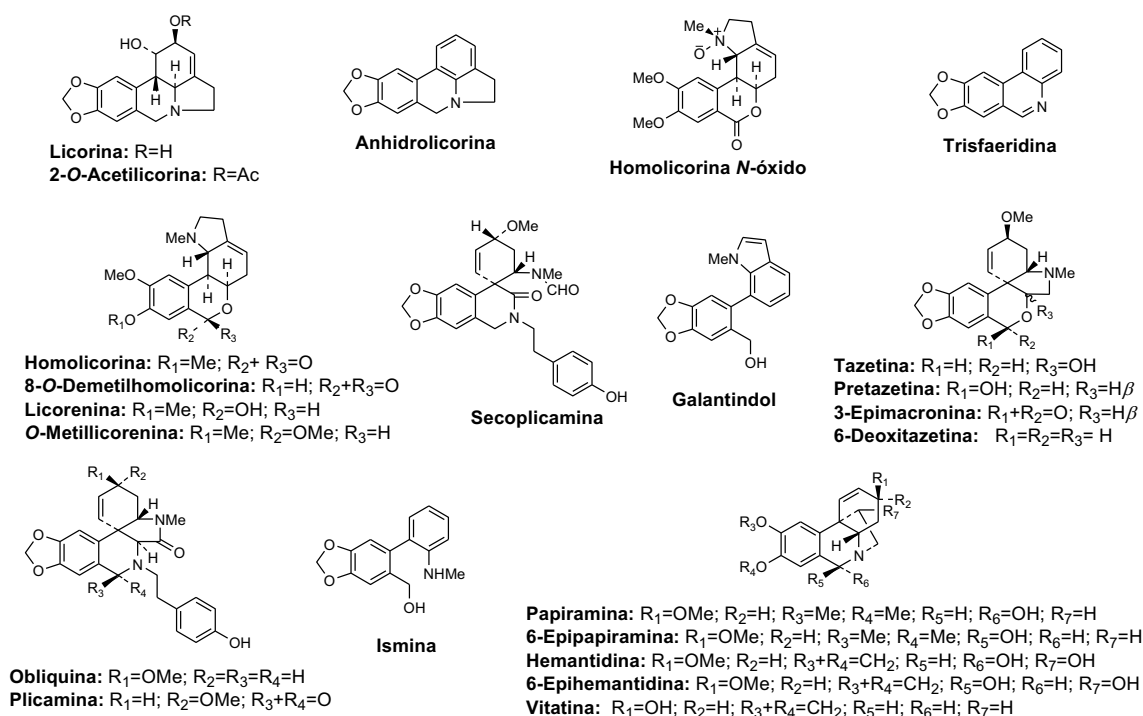


Figura 4.8: Alcaloides identificados en *Narcissus broussonetii*.

4.4. Alcaloides del tipo crinina de *Hippeastrum aulicum* y *H. calyptratum*

Los estudios preliminares de los extractos de diferentes especies del género *Hippeastrum* por GC-MS, condujeron a la selección de las especies *H. aulicum* y *H. calyptratum* debido a que presentaron señales que posiblemente correspondían a nuevos compuestos. Ambas especies se recolectaron en las proximidades de São Paulo (Brasil). A continuación se describen los compuestos aislados por primera vez, así como aquellos para los que se han completado sus datos espectroscópicos.

4.4.1. Aulicina

Aislada de *Hippeastrum aulicum*, el espectro de GC-MS de aulicina (HRMS [M + H]⁺ *m/z* 320.1864 - calculado para C₁₈H₂₆NO₄, 320.1856) exhibió características de un representante del tipo 5,10b-etanofenantridina con ausencia de la olefina del anillo C, tal como ocurre con el alcaloide powellano (Duffield *et al.*, 1965). Dado que se trataba de la base mayoritaria, se procedió a su aislamiento (152 mg).

El espectro de ¹H-RMN confirmó lo inicialmente observado por GC-MS. Una única señal en la región aromática (δ 6.10, s) presentaba correlación NOESY con los dos protones bencílicos del sistema AB de la posición 6, indicando que el anillo A estaba pentasustituido y el protón aromático se encontraba en posición 7, característica muy inusual para alcaloides 5,10b-etanofenantridínicos. El compuesto presentaba el puente etano y el sustituyente metoxilo de la posición 3 en orientación *cis*, orientación respaldada por la constante *trans* diaxial de 12.4 Hz observada para el cuadruplete a δ 1.21 (asignado a H-4 axial). Este compuesto presentó una estructura similar al alcaloide hipeastidina, aislado inicialmente de *Rhodophiala ananuca* (Phil.) Traub (Pacheco *et al.*, 1978; Watson y Zabel, 1982), especie erróneamente clasificada como *Hippeastrum añañuca* Phil. (Traub, 1953). En un principio, dicho alcaloide fue asignado como un derivado de crinina, presentando una relación *trans* entre el puente en β y el sustituyente en posición 3 (Pacheco *et al.*, 1978). Pocos años después, los mismos autores reportaron los datos cristalográficos de hipeastidina y rectificaron la disposición del puente, revelando que el derivado correspondía a un esqueleto tipo hemantamina (Watson and Zabel, 1982). Más recientemente, también se reportó el aislamiento de este mismo compuesto de *Zephyranthes robusta* (Kulhánková *et al.*,

2013), pero en dicho trabajo no se detallan los datos de CD ni de difracción de rayos-X, lo que imposibilita aclarar las dudas estructurales existentes.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, el estudio de CD de aulicina indica que se trata de un alcaloide tipo crinina. Además, tras una cristalización minuciosa, el análisis de la estructura utilizando un difractor de rayos-X con fuente de cobre ha permitido confirmar con certeza dicha asignación.

4.4.2. 3-O-Metil-epimacowina

La 3-O-metil-epimacowina (HRMS $[M + H]^+$ m/z 288.1595 - calculado para $C_{17}H_{22}NO_3$, 288.1594) se aisló de *H. calyptatum*. El espectro obtenido por GC-MS también presentó las características típicas de un derivado etanofenantridínico. El espectro de 1H -RMN demostró la presencia de una olefina y un sustituyente en posición 3. Las constantes de acoplamiento ($J_{1,3} = 2.0$ y $J_{2,3} = 1.5$) indicaban una relación *cis* entre el puente etano y el sustituyente en posición 3. Además, la constante de acoplamiento entre H-4 axial y H-3 ($J = 10.5$ Hz) confirmó la orientación ecuatorial de dicho sustituyente.

El efecto Cotton negativo a longitud de onda de 290 nm y positivo alrededor de 250 nm, observado en el análisis de CD, permitió confirmar que se trataba de un derivado de tipo crinina.

4.4.3. 11-Oxohemantamina

La 11-oxohemantamina se aisló como compuesto minoritario de *H. aulicum*. Su espectro de GC-MS había sido tentativamente asignado en el trabajo de Kreh *et al.* (1995). La pérdida neutra de 28 uma a partir del ion molecular a m/z 299, que da lugar al pico base a m/z 271 (HRMS $[M + H]^+$ m/z 300.1239 - calculado para $C_{17}H_{18}NO_4$, 300.1230), podría ser indicativa de un carbonilo en C-11, a diferencia de los alcaloides etanofenantridínicos con un grupo hidroxilo en dicha posición, como p.e. hemantamina u 11-hidroxitatina, en los que se observa una pérdida de 29 uma del ion molecular.

En el espectro de 1H -RMN de la 11-oxohemantamina se observaron características típicas de un derivado etanofenantridínico, con una constante de acoplamiento $J_{2,3} = 5.5$ Hz y ausencia del acoplamiento alílico $J_{1,3}$, indicando una

disposición *trans* entre el grupo metoxilo en 3 y el puente etano. La constante de acoplamiento $J_{3,4\text{axial}} = 4.0$ Hz confirmó dicha disposición.

El estudio de CD mostró un efecto Cotton positivo alrededor de 290 nm y negativo a 250 nm, propio de los alcaloides del tipo hemantamina. De esta manera, se logró la correcta asignación de 11-oxohemantamina, que había sido previamente sintetizada por Cedrón *et al.* (2012). Se aportan los datos espectroscópicos completos del compuesto, además de confirmarse por primera vez su aislamiento a partir de una fuente natural.

4.4.4. 7-Metoxi-*O*-metillicorenina

En la especie *Hippeastrum aulicum* se detectó mediante GC-MS un nuevo derivado de homolicorina, por lo que se procedió a su aislamiento, purificación y caracterización estructural. El espectro de ^1H -RMN permitió resolver gran parte de la estructura, observándose la presencia de un solo protón aromático, 3 metoxilos unidos al anillo A (a δ 3.82, 3.87 y 3.89), y un grupo metoxilo no aromático (δ 3.51) que podía corresponder al sustituyente en 6. La masa exacta para dicha estructura (HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 362.1964 - calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_5$, 362.1962) indicó una fórmula molecular que se ajustaba a la de un derivado de *O*-metillicorenina. En el experimento NOESY se observó una correlación entre el protón aromático y el grupo *N*-metilo, llevando a concluir que la estructura correspondía a 7-metoxi-*O*-metillicorenina. La posición del sustituyente en 6α fue confirmada por su correlación NOESY con el protón H-1. Para la asignación del espectro ^{13}C -RMN se tuvo en consideración que los grupos metoxilo *ortho* sustituidos presentan un desplazamiento químico a campos más bajos, siendo los resultados corroborados mediante HSQC y HMBC.

4.4.5. Nerinina

A partir del extracto de *H. aulicum* purificamos otro derivado de homolicorina detectado por GC-MS y no identificado en nuestra base de datos. El GC-MS de *H. calyptatum* también reveló la presencia del mismo alcaloide aunque en menor abundancia. La masa exacta era congruente con la fórmula empírica $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NO}_5$ (HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 348.1807 – calculado 348.1805). El espectro de ^1H -RMN mostraba características muy similares a 7-metoxi-*O*-metillicorenina, con la ausencia del grupo

metoxilo no aromático. La correlación NOESY entre el protón aromático y el grupo *N*-metilo confirmó que la sustitución en el anillo aromático era la misma que la del alcaloide precedente. La fórmula empírica y el ^1H -RMN eran coherentes con un sustituyente hidroxilo en 6α , lo cual se confirmó también con el experimento NOESY en el que se verificó la proximidad espacial entre el H- 6β y el H-4a. En el ^{13}C -RMN, la señal a $\delta 56.3$ se asignó al grupo metoxilo unido a la posición 9 al ser mono-*orto* sustituido. Las señales restantes concordaban con la estructura de nerinina, alcaloide conocido desde los años 60 (Jeffer y Hawksworth, 1963), cuyos datos espectroscópicos se han completado en el presente trabajo.

4.4.6. Albomaculina

Este alcaloide, del tipo homolicorina, se detectó por GC-MS en ambas especies, con mayor abundancia en *H. calyptratum*. Su fórmula empírica, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_5$ para el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 346.1651 (calculado 346.1649), así como el espectro de GC-MS, coinciden con los datos previamente reportados (Schnoes *et al.*, 1968). Así, el espectro de ^1H -RMN evidenció la presencia de un anillo A pentasustituido y, a diferencia de 7-metoxi-*O*-metillicorenina y nerinina, su espectro de ^{13}C -NMR presentó un grupo carbonilo poco desapantallado ($\delta 162.4$), típico de las lactonas de los derivados de homolicorina. Se han completado los datos espectroscópicos para este compuesto.

4.4.7. Consideraciones finales

Se ha identificado un total de 23 compuestos de los cuales 13 son compartidos por ambas especies (Figura 4.9). El resultado de mayor relevancia ha sido la demostración inequívoca de la presencia de representantes del grupo crinina en el género *Hippeastrum*. Es interesante destacar que *H. aulicum* es capaz de sintetizar en proporciones similares tanto derivados de la etanofenantridina de la serie β (tipo crinina, como aulicina) como de la serie α (tipo hemantamina).

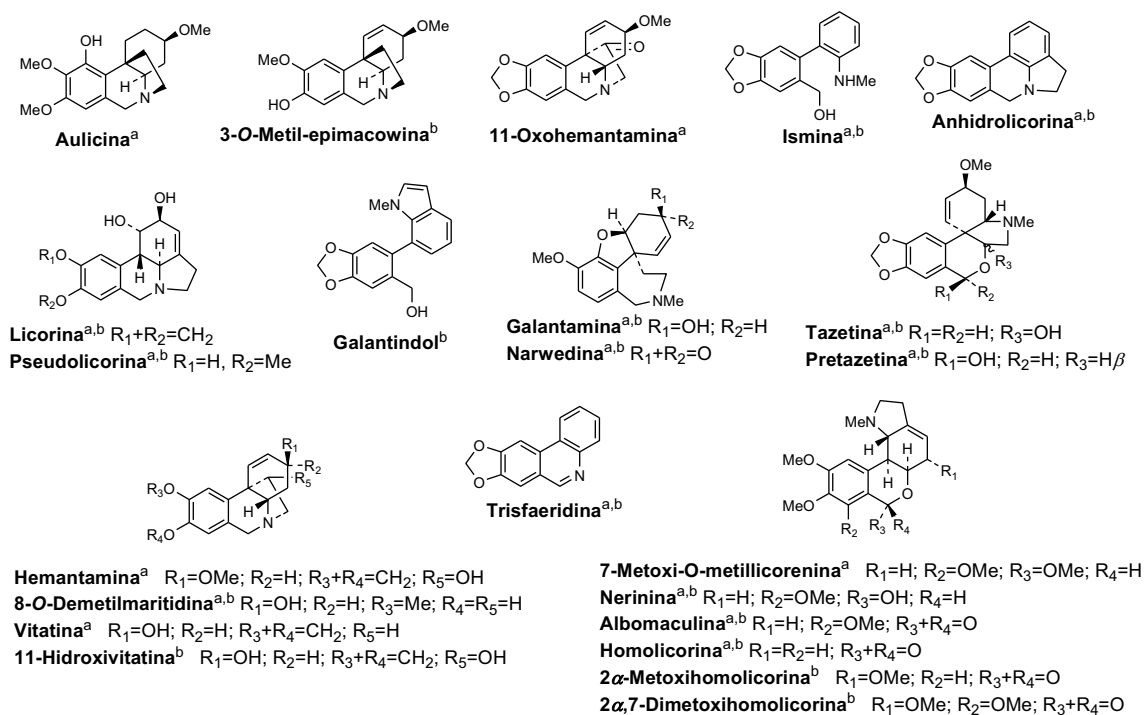


Figura 4.9: Alcaloides identificados en *Hippeastrum aulicum* (a) y *H. calyptstratum* (b).

5. CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones

- I. Se han identificado cinco nuevos alcaloides de Amaryllidaceae: (i) 11 β -hidroxigalantamina de *Hippeastrum papilio*; (ii) aulicina, 11-oxohemantamina y 7-metoxi-O-metillicorenina de *H. aulicum*; (iii) 3-O-metil-epimacowina de *H. calyptratum*. Además, se reportan los datos espectrales completos de los compuestos nerinina y albomaculina, aislados de *H. aulicum* y *H. calyptratum*, respectivamente.
- II. La especie *Hippeastrum papilio* biosintetiza el alcaloide galantamina en cantidades significativas y puede considerarse de interés para la extracción del principio activo con fines comerciales. No obstante, la regresión de la especie, actualmente catalogada en peligro crítico de extinción, requiere que cualquier iniciativa a este respecto se dirija a través de un procedimiento biotecnológico de micropropagación.
- III. Los alcaloides que presentan el esqueleto tipo galantamina poseen, por lo general, una marcada capacidad inhibidora del enzima AChE. Se constata que el sustituyente hidroxilo en la posición 11 de dicho esqueleto no favorece la inhibición de esta diana ya que disminuye parcialmente su actividad. La caracterización de 11 β -hidroxigalantamina permitió confirmar que habrantina correspondía con el compuesto 11 α -hidroxigalantamina.
- IV. Se reportan por primera vez alcaloides del tipo crinina en el género *Hippeastrum*, confirmados inequívocamente mediante los estudios de CD y difracción por rayos-X.
- V. Se reporta por primera vez la presencia de galantindol así como el aislamiento de los alcaloides dinitrogenados obliquina, plicamina y secoplicamina en una especie del género *Narcissus*. Dado que los compuestos dinitrogenados no pueden analizarse adecuadamente por GC-MS/MS, se realizó su estudio por HPLC-ESI-MS/MS. Esta metodología permitió constatar que obliquina y plicamina, presentan un patrón similar

de fragmentación. Por su parte, secoplicamina, con el anillo D abierto, posee un patrón de fragmentación diferente. El estudio representa una contribución de interés para la caracterización de análogos.

- VI. Se confirma que tazetina es un artefacto producido en el proceso de extracción y que pretazetina es el alcaloide biosintetizado de forma natural. Se constata la ausencia de tazetina en los extractos crudos de la especie *Narcissus broussonetii* así como de dos cultivares (*Narcissus* cv Toto y *Narcissus* cv Pencrebar) mediante derivatización y análisis por GC-MS.

5.2. Conclusions

- I. Five new Amaryllidaceae alkaloids have been identified: (i) 11 β -hydroxygalanthamine from *Hippeastrum papilio*; (ii) aulicine, 11-oxohamenthamine and 7-methoxy-*O*-methyllycorenine from *H. aulicum*; (iii) 3-*O*-methyl-epimacowine from *H. calyptratum*. Furthermore, the complete NMR data have been reported for nerinine and albomaculine from *H. aulicum* and *H. calyptratum*, respectively.
- II. The species *H. papilio* is able to produce significant quantities of the alkaloid galanthamine, and therefore has potential use for its commercial extraction. However, the severe decline of this species in the wild, and its current highly endangered status, will require the development of a biotechnological procedure of micropropagation.
- III. Typically, alkaloids with a galanthamine-type skeleton have a remarkable capacity for AChE inhibition. It has been confirmed that an 11-hydroxy substituent decreases this activity. Additionally, the characterization of 11 β -hydroxygalanthamine from *H. papilio* allowed concluding that the previously published habranthine corresponds to 11 α -hydroxygalanthamine.
- IV. Through CD data and X-ray diffractometry, the crinine-type skeleton is reported for the first time in the genus *Hippeastrum*.
- V. The alkaloid galanthindole, as well as the dinitrogenous alkaloids obliquine, plicamine and secoplicamine are reported for the first time in the genus *Narcissus*. As GC-MS technique has proven to be unsuitable for analyzing these dinitrogenous compounds, HPLC was considered as an appropriate alternative. HPLC-ESI-MS/MS demonstrated a similar fragmentation mechanism for obliquine and plicamine. Otherwise, secoplicamine showed a different fragmentation pattern due to the presence of an open D ring.

This study represents an important contribution to the characterization of analogues.

VI. Tazettine has been recognized to be an artifact produced in the extraction process, while pretazettine is the naturally biosynthesized alkaloid. The absence of tazettine in crude extracts of the species *Narcissus broussonetii* and two cultivars (*Narcissus* cv Toto and *Narcissus* cv Pencrebar) was confirmed by GC-MS analysis of derivatized samples.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, U.P., de Medeiros, P.M., de Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Neto, E.M.F.L., de Melo, J.G., dos Santos, J.P. (2007). Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, *114*, 325-354.
- Ali, A.A., Kating, H., Frahm, A.W., El Moghazy, A.M., Ramadan, M.A. (1981). Two non-hydroxylated alkaloids in *Crinum augustum*. *Phytochemistry*, *20*, 1121-1123.
- Ali, A.A., Hambloch, H., Frahm, A.W. (1983). Relative configuration of the alkaloid augustamine. *Phytochemistry*, *22*, 283-287.
- Antoun, M.D., Mendoza, N.T., Ríos, Y.R., Proctor, G.R., Wickramaratne, D.B.M., Pezzuto, J.M., Kinghorn, D. (1993). Cytotoxic of *Hymenocallis expansa* alkaloids. *Journal of Natural Products*, *56*, 1423-1425.
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *161*, 105-121.
- Baez, A., Vazquez, D. (1978). Binding of [³H]narciclasine to eukaryotic ribosomes. A study on a structure-activity relationship. *Biochimica et Biophysica Acta*, *518*, 95-103.
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery of medicinal plants. *Life Science*, *78*, 431-441.
- Bartolucci, C., Perola, M., Christian, P., Fels, G., Lamba, D. (2001). Three-dimensional structure of a complex of Galanthamine (Nivalin®) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: implications for the drug design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins*, *42*, 182-191.
- Barton, D.H.R., Cohen, T. (1957). Some biogenetic aspects of phenol oxidation. *Festschrift Arthur Stoll*, 117-143.
- Barton, D.H.R., Kirby, G.W. (1962). Phenol oxidation and biosynthesis. Part V. The synthesis of galanthamine. *Journal of the Chemical Society*, *153*, 806-817.
- Barton, D.H.R., Kirby, G.W., Taylor, J.B., Thomas, G.M. (1963). Phenol oxidation and biosynthesis. Part VI. The biogenesis of Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of the Chemical Society*, 4545-4558.
- Bastida, J., Viladomat, F., Llabrés, J.M., Ramirez, G., Codina, C., Rubiralta, M. (1989). Narcissus alkaloids, VIII. Mesembrenone: an unexpected alkaloid from *Narcissus pallidulus*. *Journal of Natural Products*, *52*, 478-480.
- Bastida, J., Lavilla, R., Viladomat, F. (2006). Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. En Cordell, G. (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. The Netherlands: Elsevier Inc, pp. 87-179.
- Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Pigni, N.B., de Andrade, J.P., Martínez, V., Codina, C., Viladomat, F. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. En Muñoz-Torrero, D. (Ed.),

- Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. Kerala, India: Transworld Research Network, pp. 65-100.
- Battersby, A.R., Binks, R. (1960). Biosynthesis of lycorine. *Proceedings of the Chemical Society*, 410.
- Battersby, A.R., Binks, R., Breuer, S.W. (1961). Biosynthesis in the Amaryllidaceae: incorporation of norbelladine into lycorine and norpluvine. *Proceedings of the Chemical Society*, 243.
- Baxendale, I.R., Ley, S.V., Nessi, M., Piutti, C. (2002). Total synthesis of the Amaryllidaceae alkaloid (+)-plicamine using solid-supported reagents. *Tetrahedron*, 58, 6285-6304.
- Baxendale, I.R., Ley, S.V. (2005). Synthesis of the alkaloid natural products (+)-plicane and (-)-obliquine, using polymer-supported reagents and scavengers. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44, 8588-8592.
- Berkov, S., Reyes-Chilpa, R., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2007). Revised NMR data for incartine: an alkaloid from *Galanthus elwesii*. *Molecules*, 12, 1430-1435.
- Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2008). N-alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 2263-2266.
- Berkov, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. (2011a). Development and validation of a GC-MS method for rapid determination of galanthamine in *Leucojum aestivum* and *Narcissus* ssp.: A metabolomic approach. *Talanta*, 83, 1455-1465.
- Berkov, S., Romani, S., Herrera, M., Viladomat, F., Codina, C., Momekov, G., Ionkova, I., Bastida, J. (2011b). Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy Research*, 25, 1686-1692.
- Berkov, S., Viladomat, F., Codina, C., Suárez, S., Ravelo, A., Bastida, J. (2012). GC-MS of amaryllidaceous galanthamine-type alkaloids. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 1065-1073.
- Bowman, W.R., Bruce, I.T., Kirby, W.C. (1969). Biosynthetic incorporation of [β - ^{14}C ; 3,5- $^2\text{H}_2$; 4- ^3H]cinnamic acid into capsaicin and norpluviine: lack of an apparent isotope effect following and NIH shift. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, 1969, 1075-1077.
- Brine, N.D., Campbell, W.E., Bastida, J., Herrera, M.R., Viladomat, F., Codina, C., Smith, P.J. (2002). A dinitrogenous alkaloid from *Cyrtanthus obliquus*. *Phytochemistry*, 61, 443-447.
- Brossi, A., Grethe, G., Teitel, S., Wildman, W.C., Bailey, D.T. (1970). Cherylline, a 4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline alkaloid. *The Journal of Organic Chemistry*, 35, 1100-1104.
- Cedrón, J.C., Gutiérrez, D., Flores, N., Ravelo, Á.G., Estévez-Braun, A. (2012). Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 5464-5472.

- Chase, M.W., Reveal, J.L., Fay, M.F. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 132-136.
- Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., Rubiralta, M., Quirion, J.C. (1990). A heterodimer alkaloid from *Narcissus pallidiflorus*. *Phytochemistry*, 29, 2685-2687.
- Cook, J.W., Loudon, J.D. (1952). Chapter XI: Alkaloids of the Amaryllidaceae. En Manske, R.H.F., Holmes, H.L. (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. New York, USA: Academic Press, pp. 331-352.
- da Silva, A. F. S. (2005). *Hippeastrum vittatum* (L'Hérb) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados. [PhD thesis]. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Farmácia.
- da Silva, A.F.S., de Andrade, J.P., Bevilaqua, L.R., de Souza, M.M., Izquierdo, I., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S. (2006). Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 85, 148-54.
- da Silva, A.F.S., de Andrade, J.P., Machado, K.R.B., Rocha, A.B., Apel, M.A., Sobral, M.G.E., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S. (2008). Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine*, 15, 882-885.
- da Silva, C.V., Borges, F.M., Veloso, E.S. (2012). Phytochemistry of some Brazilian plants with aphrodisiac activity. En Rao, V. (Ed.), *Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health*. InTech, pp. 307-326. ISBN: 978-953-51-0296-0, Available from: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-andhealth/phytochemistry-of-some-brazilian-plants-with-aphrodisiac-activity>.
- de Andrade, J.P., Pigni, N.B., Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2012a). Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: mass spectral studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 13-25.
- de Andrade, J.P., Pigni, N.B., Torras-Claveria, L., Guo, Y., Berkov, S., Reyes-Chilpa, R., El Amrani, A., Zuanazzi, J.A.S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2012b). Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Revista Latinoamericana de Química*, 40, 83-98.
- Döpke, W., Sewerin, E., Trimiño, Z. (1981). Isolierung, struktur und stereochemie eines neuen alkaloids aus *Crinum oliganthum*. *Zeitschrift für Chemie*, 21, 358-358.
- Duffield, A.M., Aplin, R.T., Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Murphy, C.F., Wildman, W.C. (1965). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXXII. A study of the fragmentation of some Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*, 87, 4902-4912.

- Dutilh, J.H., Fernandez, E.P., Penedo, T.S.A., de Moraes, M.M.V., Messina, T. (2013). Amaryllidaceae. En Martinelli, G., Moraes, M.A. (Org.), *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Brasil, CNCFLOA, pp. 126-139.
- Eichhorn, J., Takada, T., Kita, Y., Zenk, M.H. (1998). Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. *Phytochemistry*, *49*, 1037-1047.
- Evidente, A., Cicala, M.R., Randazzo, G., Riccio, R., Calabrese, G., Liso, R., Arrigoni, O. (1983). Lycorine structure-activity relationship. *Phytochemistry*, *22*, 2193-2196.
- Evidente, A., Kireev, A.S., Jenkins, A.R., Romero, A.E., Steelant, W.F.A., Van Slambrouck, S., Kornienko, A. (2009). Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Medica*, *75*, 501-507.
- Feinstein, A.I., Wildman, W.C. (1976). Biosynthetic oxidation and rearrangement of vittatine and its derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*, *41*, 2447-2450.
- Fennell, C.W., van Staden, J. (2001). *Crinum* species in traditional and modern medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *78*, 15-26.
- Fuganti, C., Mazza, M. (1971). Late intermediates in the biosynthesis of narciclasine. *Journal of the Chemical Society: Chemical Communications*, *1971*, 1388-1389.
- Fuganti, C., Mazza, M. (1972). The absolute configuration of narciclasine: a biosynthetic approach. *Journal of the Chemical Society: Chemical Communications*, *1972*, 239.
- Furst, L., Stephenson, C.R.J. (2011). Nature-inspired total synthesis. *Nature Chemical Biology*, *7*, 582-583.
- Furusawa, E., Suzuki, N., Furusawa, S., Lee, J.Y. (1975). Combination chemotherapy of Rauscher leukemia and ascites tumors by narcissus alkaloid with standard drugs and effect on cellular immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *149*, 771-778.
- Furusawa, E., Irie, H., Combs, D., Wildman, W.C. (1980). Therapeutic activity of pretazettine on Rauscher leukemia: comparison with the related Amaryllidaceae alkaloids. *Chemotherapy*, *26*, 36-45.
- Furusawa, E., Lum, M.K., Furusawa, S. (1981). Therapeutic activity of pretazettine on Ehrlich ascites carcinoma: adjuvant effect on standard drugs in ABC regimen. *Chemotherapy*, *27*, 277-86.
- Ghosal, S., Saini, K.S., Razdan, S. (1985a). *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. *Phytochemistry*, *24*, 2141-2156.
- Ghosal, S., Shanthy, A., Kumar, A., Kumar, Y. (1985b). Palmilycorine and lycoriside: acyloxy and acylglucosyloxy alkaloids from *Crinum asiaticum*. *Phytochemistry*, *24*, 2703-2706.
- Ghosal, S., Kumar, Y., Singh, S.K., Shanthy, A. (1986). Chemical constituents of Amaryllidaceae 19. The occurrence of *N*-(3-hydroxy-4-methoxybenzylidene)-4'-hydroxyphenethylamine in *Crinum augustum* and its biological significance. *Journal of the Chemical Research-S*, *1*, 28-29.

- Ghosal, S., Shanthy, A., Singh, S.K. (1988a). Isocraugsodine, an *N*-arylidenephenethylamine from *Crinum asiaticum* and its *E-Z* isomerism. *Phytochemistry*, *27*, 1849-1852.
- Ghosal, S., Singh, S. K., Kumar, Y., Unnikrishnan, S., Chattopadhyay, S. (1988b). The role of ungeremine in the growth-inhibiting and cytotoxic effects of lycorine: evidence and speculation. *Planta Medica*, *54*, 114-116.
- Giordani, R.B., Vieira, P.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., Souza, A.P., Bonorino, C., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T. (2010). Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products*, *73*, 2019-2023.
- Giordani, R.B., Vieira, P.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., Souza, A.P., Bonorino, C., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T. (2011). Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, *72*, 645-50.
- Gotti, R., Fiori, J., Bartolini, M., Cavrini, V. (2006). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC-MS and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *42*, 17-24.
- Greenblat, H.M., Kryger, G., Lewis, T., Silman, I., Sussman, J.L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Letters*, *463*, 321-326.
- Harken, R.D., Christensen, C.P., Wildman, W.C. (1976). Interconversions in the pluviine-lycorenine series. *The Journal of Organic Chemistry*, *41*, 2450-2454.
- Heinrich, M., Teoh, H.L. (2004). Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, *92*, 147-162.
- Hesse, M.; Bernhard, H.O. (1975). Amaryllidaceae alkaloids. En von Budzikiewicz, H., (Ed.), *Progress in Mass Spectrometry*. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, pp. 164-184.
- Heywood, V.H. (1985). *Las Plantas con Flores*. Barcelona, España: Editora Reverté.
- Hoshino, O. (1998). The Amaryllidaceae alkaloids. En Cordell, G. (Ed.), *The Alkaloids; Chemistry and Biology*. San Diego, CA., USA: Academic Press, pp. 323-424.
- Ito, M., Kawamoto, A., Kita, Y., Yukawa, T., Kurita, S. (1999). Phylogenetic relationships of Amaryllidaceae based on *matK* sequence data. *Journal of Plant Research*, *112*, 207-216.
- Jefferies, P.W. (1962). Alkaloids of the Amaryllidaceae. X. Biosynthesis of haemanthamine. *Proceedings of the Chemical Society*, 80-81.
- Jefferies, P.W., Hawksworth, W.A. (1963). Aromatic oxygenation patterns of some trioxyl-aryl Amaryllidaceae alkaloids belonging to the hemi-acetal and lactone group. *Tetrahedron Letters*, *4*, 217-223.

- Jefferies, P.W., Mueller, L., Abou-Donia, A.H., Seif El-Din, A.A., Campau, D. (1988). Nobilisine, a new alkaloid from *Clivia nobilis*. *Journal of Natural Products*, 51, 549-554.
- Jimenez, A., Sanchez, L., Vazquez, D. (1975). Yeast ribosomal sensitivity and resistance to the Amaryllidaceae alkaloids. *FEBS Letters*, 60, 66-70.
- Jin, Z. (2009). Amaryllidaceae and *Scelletium* alkaloids. *Natural Products Reports*, 26, 363-381.
- Jones, S.B., Simmons, B., Mastracchio, A., MacMillan, D.W.C. (2011). Collective synthesis of natural products by means of organocascade catalysis. *Nature*, 475, 183-188.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg E.A., Stevens, P.F. (1999). *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Sunderland, USA: Sinauer Associates Inc.
- Kaya, I., Ünver, N., Gözler, B., Bastida, J. (2004). (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species, *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 1059-1062.
- Kihara, M., Xu, L., Konishi, K., Nagao, Y., Kobayashi, S., Shingu, T. (1992). Incartine, a biosynthetic intermediate, from flowers of *Lycoris incarnata*. *Heterocycles*, 34, 1299-1301.
- Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5, 536-549.
- Kirby, G.M., Tiwari, H.P. (1966). Phenol oxidation and biosynthesis. Part IX. The biosynthesis of norpluviine and galanthine. *Journal of the Chemical Society C*, 1966, 676-682.
- Kitson, F.G., Larsen, B.S., McEwen, C.N. (1996). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A practical guide*. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Kreh, M., Matusch, R., Witte, L. (1995). Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, 38, 773-776.
- Kulhánková, A., Cahlíková, L., Novák, Z., Macáková, K., Kunes, J., Opletal, L., (2013). Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity*, 10, 1120-1127.
- Labraña, J., Machocho, A.K., Kricsfalusy, V., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2002). Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry*, 60, 847-852.
- Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Chai, H., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., Ruangrunsi, N. (1993). Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products*, 56, 1331-1338.
- Lin, L. Z., Hu, S. F., Chai, H. B., Pengsuparp, T., Pezzuto, J. M., Codell, G. A., Ruangrunsi, N. (1995). Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. *Phytochemistry*, 40, 1295-1298.

- Liu, F., Li, Z., Shi, X., Zhong, M. (2011). Determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine in rabbit plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *56*, 1006-1015.
- Longevialle, P., Smith, D.H., Burlingame, A.L., Fales, H.M., Highet, R.J. (1973). High resolution mass spectrometry in molecular structure studies – V: The fragmentation of amaryllis alkaloids in the crinine series. *Organic Mass Spectrometry*, *7*, 401-415.
- López, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. (2002). Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Science*, *71*, 2521-2529.
- Lubbe, A., Pomahacová, B., Choi, Y.H., Verpoorte, R. (2010). Analysis of metabolic variation and galanthamine content in *Narcissus* bulbs by ¹H NMR. *Phytochemical Analysis*, *21*, 66-72.
- Lubbe, A., Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, *34*, 785-801.
- Machocho, A.K., Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F., Brun, R., Chhabra, S.C. (2004). Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. *Phytochemistry*, *65*, 3143-3149.
- Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E.X., Zerlin, M. (2001). Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biology Psychiatry*, *49*, 279-288.
- Matharu, B., Gibson, G., Parsons, R., Huckerby, T.N., Moore, S.A., Cooper, L.J., Millichamp, R., Allsop, D., Austen, B. (2009). Galanthamine inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity. *Journal of Neurological Science*, *280*, 49-58.
- McNulty, J., Nair, J.J., Codina, C., Bastida, J., Pandey, S., Gerasimoff, J., Griffin, C. (2007). Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, *68*, 1068-1074.
- Meerow, A.W., Snijman, D.A. (1998) Amaryllidaceae. En Kubitzki, K. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, pp. 83-110.
- Meerow, A.W., Fay, M.F., Guy, C.L., Li, Q.B., Zaman, F.Q., Chase, M.W. (1999). Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany*, *86*, 1325-1345.
- Meerow, A.W. (2004). Amaryllidaceae (Amaryllis Family). En Smith, N., Mori, S.A., Henderson, A., Stevenson, D.W., Heald, S.V. (Ed.), *Flowering plants of the Neotropics*. New York: USA, Princeton University Press and The New York Botanical Garden, pp. 410-412.
- Meerow, A.W., Snijman, D.A. (2006). The never-ending story: multigene approaches to the phylogeny of Amaryllidaceae. *Aliso*, *22*, 355-366.

- Min, B. S., Gao, J. J., Nakamura, N., Kim, Y. H., Hattori, M. (2001). Cytotoxic alkaloids and a flavan from the bulbs of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 49, 1217-1219.
- Morton, J.F. (1981). *Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Bahamas to Yucatan*. Illinois, EUA: Thomas C.C. Publisher.
- Mroczek, T. (2009). Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2519-2528.
- Mulholland, D.A., Crouch, N., Decher, B., Smith, M.T. (2002). The isolation of the Amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana* (Dioscoreaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 183-185.
- Nair, J.J., Campbell, W.E., Gammon, D.E., Albrecht, C.F., Viladomat, F., Codina, C. (1998). Alkaloids from *Crinum dalagoense*. *Phytochemistry*, 49, 2539-2443.
- Nair, J.J., van Staden, J. (2013). Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 262-275.
- Nair, J.J., van Staden, J. (2014). Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of the South African medicinal plant *Boophone disticha* (L.f.) Herb. (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 12-26.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007). Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461-477.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2012). Natural products as source of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 311-335.
- Noyan, S., Rentsch, G.H., Önür, M.A., Gözler, T., Gözler, B., Hesse, M. (1998). The gracilines: a novel subgroup of the Amaryllidaceae alkaloids. *Heterocycles*, 48, 1777-1791.
- Pacheco, P., Silva, M., Steglich, W. (1978). Alkaloids of Chilean Amaryllidaceae I. Hippeastidine and epihomolycorine two novel alkaloids. *Revista Latinoamericana de Química*, 9, 28-32.
- Pagliosa, L.B., Monteiro, S.C., Silva, K.B., de Andrade, J.P., Dutilh, J., Bastida, J., Cammarota, M., Zuanazzi, J.A.S. (2010). Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*, 17, 698-701.
- Pettit, G.R., Gaddamidi, V., Goswami, A., Cragg, G.M. (1984). Antineoplastic agents, 99: *Amaryllis belladonna*. *Journal of Natural Products*, 47, 796-801.
- Pettit, G.R., Gaddamidi, V., Herald, D.L., Singh, S.B., Cragg, G.M., Schmidt, J.M., Boettner, F.E., Williams, M., Sagawa, Y. (1986). Antineoplastic agents, 120: *Pancratium littorale*. *Journal of Natural Products*, 49, 995-1002.

- Pettit, G.R., Cragg, G.M., Singh, S.B., Duke, J.A., Doubek, D.L. (1990). Antineoplastic agents, 162. *Zephyranthes candida*. *Journal of Natural Products*, *53*, 176-178.
- Pettit, G. R., Pettit III, G. R., Backhaus, R. A., Boyd, M.R., Meerow, A.W. (1993). Antineoplastic agents, 256. Cell growth inhibitory isocarbostryls from *Hymenocallis*. *Journal of Natural Products*, *56*, 1682-1687.
- Pettit, G. R., Pettit III, G. R., Backhaus, R. A., Boettner, F. E. (1995). Antineoplastic agents, 294. Variations in the formation of pancratistatin and related isocarbostryls in *Hymenocallis littoralis*. *Journal of Natural Products*, *58*, 37-43.
- Pigni, N.B., Ríos-Ruiz, S., Luque, F.J., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J. (2013). Wild daffodils of the section *Ganymedes* from the Iberian Peninsula as a source of mesembrane alkaloids. *Phytochemistry*, *95*, 384-393.
- Rodriguez-Fonseca, C., Amils, R., Garret, R.A. (1995). Fine structure of the peptidyl transferase centre on 23 S-like rRNAs detected from chemical probing of antibiotic-ribosome complexes. *Journal of Molecular Biology*, *247*, 224-235.
- Schmeda-Hirschmann, G., Rodríguez, J.A., Loyola, J.I., Astudillo, L., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. (2000). Activity of Amaryllidaceae alkaloids on the blood pressure of normotensive rats. *Pharmacy and Pharmacology Communications*, *6*, 309-312.
- Schoes, H.K., Smith, D.H., Burlingame, A.L., Jeffs, P.W., Döpke, W. (1968). High resolution mass spectrometry in molecular structure studies. IX. Mass spectra of Amaryllidaceae alkaloids – The Lycorenine Series. *Tetrahedron*, *24*, 2825-2837.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X. (1998). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. New York, USA: John Wiley.
- Suau, R., Gómez, A.I., Rico, R. (1990). Ismine and related alkaloids from *Lapiedra martinezii*. *Phytochemistry*, *29*, 1710-1712.
- Suhadolnik, R.J., Fischer, A.G., Zulalian, J. (1962). The biogenetic origin of the C₆-C₁ unit of lycorine. *Journal of the American Chemical Society*, *84*, 4348-4349.
- Suzuki, N., Tani, S., Furusawa, S., Furusawa, E. (1974). Therapeutic activity of *Narcissus* alkaloids on Rauscher leukemia: antiviral effect *in vitro* and rational drug combination *in vivo*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *145*, 771-777.
- Tato, M.P.V., Castedo, L., Riguera, R. (1988). New alkaloids from *Pancreatium maritimum* L. *Heterocycles*, *27*, 2833-2838.
- Toriizuka, Y., Kinoshita, E., Kogure, N., Kitajima, M., Ishiyama, A., Otoguro, K., Yamada, H., Ōmura, S., Takayama, H. (2008). New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of

- antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*, 10182-10189.
- Tram, N.T.N., Titorenkova, Tz.V., Bankova, V.St., Handjieva, H.V., Popov, S.S. (2002). *Crinum* L. (Amaryllidaceae). *Fitoterapia*, *73*, 183-208.
- Traub, H.P. (1953). The genera *Rhodophiala* Presl., *Phycella* Lindl., and *Amaryllis* L. *Plant Life*, *9*, 59-63.
- Van Goietsenoven, G., Mathieu, V., Lefranc, F., Kornienko, A., Evidente, A., Kiss, R. (2013). Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isocarbostryils are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers. *Medicinal Research Reviews*, *33*, 439-455.
- Ünver, N., Gözler, T., Walch, N., Gözler, B., Hesse, M. (1999). Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry*, *50*, 1255-1261.
- Ünver, N., Noyan, S., Gözler, B., Gözler, T., Werner, C., Hesse, M. (2001). Four new Amaryllidaceae alkaloids from *Galanthus gracilis* and *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus*. *Heterocycles*, *55*, 641-652.
- Ünver, N., Kaya, G.I., Werner, C., Verpoorte, R., Gözler, B. (2003). Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*. *Planta Medica*, *69*, 869-871.
- Ünver, N. (2007). New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry Reviews*, *6*, 125-135.
- Yang, Y., Huang, S., Zhao, Y., Sun, H. (2005). Alkaloids from the bulbs of *Lycoris aurea*. *Helvetica Chimica Acta*, *88*, 2550-2553.
- Youssef, D.T.A., Frahm, A.W. (1998). Alkaloids of the flowers of *Pancratium maritimum*. *Planta Medica*, *64*, 669-670.
- Wang, Y.H., Zhang, Z.K., Yang, F.M., Sun, Q.Y., He, H.P., Di, Y.T., Mu, S.Z., Lu, Y., Chang, Y., Zheng, Q.T., Ding, M., Dong, J.H., Hao, X.J. (2007). Benzylphenethylamine alkaloids from *Hosta plantaginea* with inhibitory activity against Tobacco mosaic virus and acetylcholinesterase. *Journal of Natural Products*, *70*, 1458-1461.
- Watson, W.H., Zabel, V. (1982). Hippeastidine C₁₇H₂₃O₄N. *Crystal Structure Communication*, *11*, 157-162.
- Weniger, B., Italiano, L., Beck, J.-P., Bastida, J., Bergoñon, S., Codina, C., Lobstein, A., Anton, R. (1995). Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, *61*, 77-79.
- Wildman, W.C., Bailey, D.T. (1968). Novel alkaloids containing the [2]benzopyrano[3,4-c]indole nucleus. *The Journal of Organic Chemistry*, *33*, 3749-3753.
- Wildman, W.C., Bailey, D.T. (1969). Amaryllidaceae interconversions. Partial synthesis of [2]benzopyrano[3,4-c]indoles. *Journal of the American Chemical Society*, *91*, 150-157.

- Wightman, R.H., Stauton, J., Battersby, A.R., Hanson, K.R. (1972). Studies of enzyme-mediated reactions. Part I. Syntheses of deuterium or tritium labeled (3S)- and (3R)- phenylalanines: stereochemical course of the elimination catalysed by L-phenylalanine ammonia-lyase. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 1*, 2355-2364.
- Zhang, X., Huang, H., Liang, X., Huang, H., Dai, W., Shen, Y., Yan, S., Zhang, W. (2009). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23*, 2903-2916.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. Anexo I: Artículo de Revisión - Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity

Jean Paulo de Andrade, Natalia Belén Pigni, Laura Torras-Claveria, Ying Guo, Strahil Berkov, Ricardo Reyes-Chilpa, Abdelaziz El Amrani, Jose Angelo Silveira Zuanazzi, Carles Codina, Francesc Viladomat y Jaume Bastida.

En: *Revista Latinoamericana de Química* 40/2, 83-98 (2012).

Print ISSN: 0370-5943.

ALKALOIDS FROM THE *HIPPEASTRUM* GENUS: CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITY

JEAN PAULO DE ANDRADE^A, NATALIA BELÉN PIGNI^A, LAURA TORRAS-CLAVERIA^A, YING GUO^A, STRAHIL BERKOV^B, RICARDO REYES-CHILPA^C, ABDELAZIZ EL AMRANI^D, JOSÉ ANGELO S. ZUANAZZI^E, CARLES CODINA^A, FRANCESC VILADOMAT^A, JAUME BASTIDA^{A*}

(Received June 2012; Accepted September 2012)

ABSTRACT

In recent years alkaloids from the genus *Hippeastrum* have been shown to exhibit a broad spectrum of biological activities, including antiparasitic, antiproliferative, apoptosis-induced, psychopharmacological, acetylcholinesterase-inhibitory, among others. This work presents a brief chemical and biological review of the alkaloids found in the genus *Hippeastrum*. www.relaquim.com

Keywords: Amaryllidaceae, “hippeastroid” clade, *Hippeastrum*, montanine, candimine, 11 β -hydroxygalanthamine.

RESUMEN

En los últimos años, los alcaloides aislados del género *Hippeastrum* han mostrado un amplio espectro de actividades incluyendo, entre otras, la antiparasitaria, antiproliferativas, inductoras de apoptosis, psicofarmacológicas y como inhibidores de la acetilcolinesterasa. En este trabajo se presenta una breve revisión química y biológica de los alcaloides del género *Hippeastrum*. www.relaquim.com

Palabras clave: Amaryllidaceae, clado “hippeastroid”, *Hippeastrum*, montanina, candimina, 11 β -hidroxigalantamina.

^ADepartament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, España

^BAgroBioInstitute, 8 Dragan Tzankov Blvd., Sofia, 1164, Bulgaria

^CInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México DF

^DFaculté des Sciences Aïn -Chock, Laboratoire de Synthèse, Extraction et Etude Physico-Chimique des Molécules Organiques, BP5366, Maarif – Casablanca, Morocco

^EFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brasil

*Corresponding author. Tel.: +34 934020268; fax: +34 934029043. E-mail address: jaumbastida@ub.edu (J. Bastida).

1. INTRODUCTION

Hippeastrum is a well-known ornamental Amaryllidaceae genus from South America, particularly Brazil. The Amaryllidaceae family is one of the 20 most important alkaloid-containing plant families, comprising about 1100 perennial bulbous species classified in 85 genera. A particular characteristic of Amaryllidaceae plants is the consistent presence of a large, exclusive and still expanding group of isoquinoline alkaloids, the majority of which are not known to occur in any other plant family (Bastida *et al.*, 2006).

Their highly particular skeleton arrangements and broad spectrum of biological activities have prompted numerous chemical and pharmacological studies of this group of alkaloids. As an example, the well-known Amaryllidaceae alkaloid galanthamine (**50**) is a long-acting, selective, reversible and competitive inhibitor of the acetylcholinesterase enzyme (Thomsen *et al.*, 1998) as well as acting as an allosterically potentiating ligand in nicotinic acetylcholine receptors (Maelicke *et al.*, 2001). Due to these attributes, galanthamine (**50**) is one of the most important drugs used for the clinical management of Alzheimer's disease (AD) and is also useful in poliomyelitis and other neurological diseases. It is marketed as a hydrobromide salt under the name of Razadyne® (formerly Reminyl®). As a result of these and other activities demonstrated by the other skeleton-types (da Silva *et al.*, 2006; McNulty *et al.*, 2007; Giordani *et al.*, 2010a, 2011a), plants from the Amaryllidaceae family are currently seen as an important source of new and bioactive molecules.

The Amaryllidaceae are found mainly in the Southern Hemisphere, especially in South Africa and South America, which are considered to be the primary and secondary centers of diversification, respectively, of this family (Ito *et al.*, 1999). Recent nrDNA ITS sequence studies have divided the American Amaryllidaceae species in Andean

tetraploid and extra-Andean "hippeastroid" clades. In addition, a probable Brazilian origin of the *Hippeastrum* genus has been accepted, based on its nrDNA ITS sequences (Meerow *et al.*, 2000). The *Hippeastrum* genus comprises approximately 70 species (Judd *et al.*, 1999), 34 being found in Brazil with 22 endemics (Dutilh, 2010). Although few of them have been studied to date, compounds with remarkable biological activity have been isolated in *Hippeastrum* species. Presented here is a brief overview of the phytochemical and biological studies of the *Hippeastrum* genus up to May, 2012.

2. GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION, TAXONOMICAL ASPECTS

The *Hippeastrum* genus is distributed from Mexico and the West Indies to Argentina, the majority in eastern Brazil, the Peruvian Andes and Bolivia. It basically consists of large herbs of annual leaves, mostly hysteranthous, sessile, rarely persistent, and subpetiolate. Generally, the leaves are more than 2 cm wide. The scape is hollow with 2 free bracts. The flowers (2-13) are usually large and mostly purple or red. They are funnellform, zygomorphic, declinate, usually with a short tube and paraperigonal fibriae or with a callose ridge present at the throat. The stamens are fasciculate and declinate-ascendent. The stigma is trifid or shortly 3-lobed. The seeds are dry, flattened, obliquely winged or irregularly discoid, hardly ever turgid and globose or subglobose, with a brown or black phytomelanous testa (Dahlgren *et al.*, 1985; Meerow and Snijman, 1998).

A diploidism of $2n=22$ is characteristic of the *Hippeastrum* genus, which is inarguably monophyletic with the exception of a single species, *Hippeastrum blumenavium*. This was first described as *Griffinia blumenavia* Koch and Bouche ex Carr and further studies are required to clarify its correct position (Meerow *et al.*, 2000).

The beauty of their flowers has led to numerous *Hippeastrum* species being grown as ornamentals after hybridization (Meerow and Snijman, 1998), although in horticultural circles the use of the name "*Amaryllis*" for this genus persists (Meerow *et al.*, 1997).

3. BIOSYNTHESIS AND STRUCTURAL TYPES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOIDS

As mentioned above, the consistent presence of an exclusive group of isoquinoline alkaloids is the outstanding feature of the Amaryllidaceae plant species. Amaryllidaceae alkaloids are formed biogenetically by intramolecular oxidative coupling of the key intermediate *O*-methylnorbelladine, derived from the amino acids L-phenylalanine and

L-tyrosine (Bastida *et al.*, 2006). Most of them can be classified into nine skeleton-types (Figure 1), namely lycorine, crinine, haemanthamine, narciclasine, galanthamine, tazettine, homolycorine, montanine and norbelladine (Bastida *et al.*, 2006). *Ortho-para'* phenol oxidative coupling of the precursor *O*-methylnorbelladine results in the formation of a lycorine-type skeleton, from which homolycorine-type compounds proceed. *Para-para'* phenol oxidative coupling leads to the formation of crinine, haemanthamine, tazettine, narciclasine and montanine structures. The galanthamine-type skeleton is the only one that originates from *para-ortho'* phenol oxidative coupling (Bastida *et al.*, 2006). In the present review, the numbering system according to Ghosal *et al.* (1985) has been adopted for the structures (Figure 1).

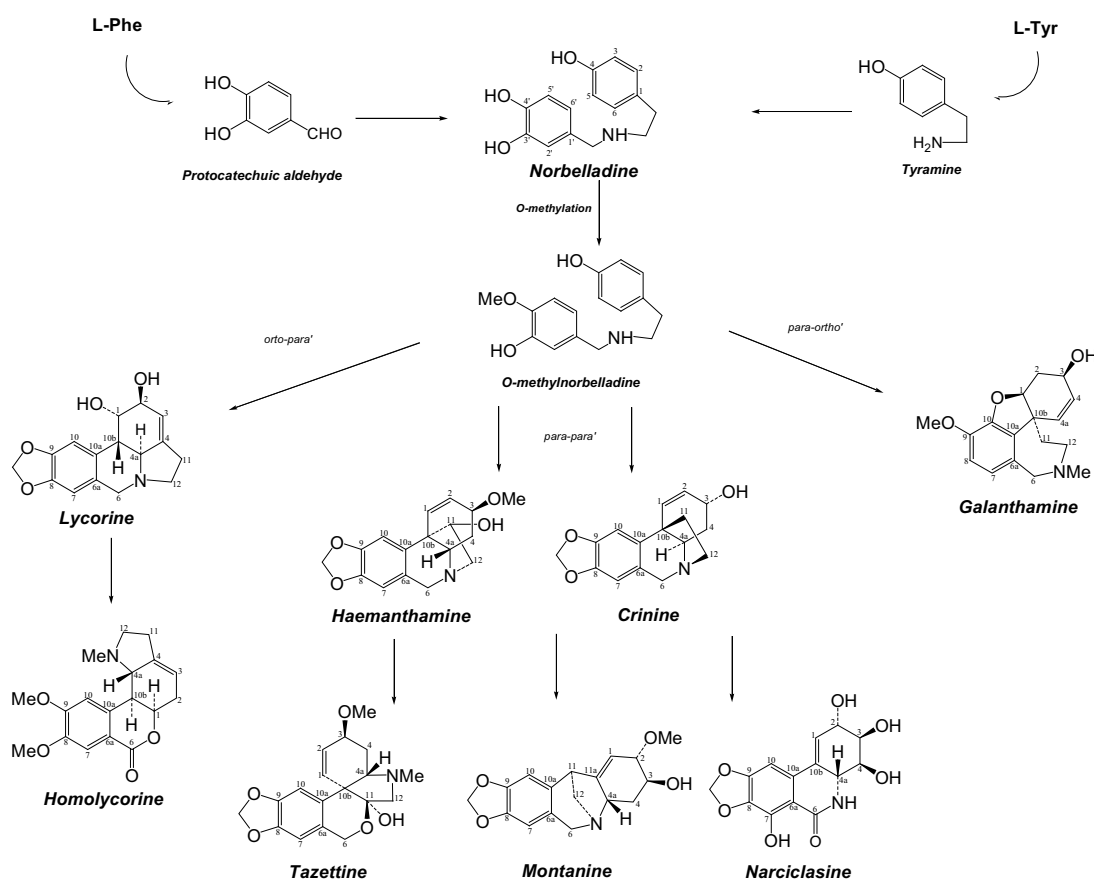


Figure 1. Biosynthetic pathway of the main skeleton-type found in the genus *Hippeastrum*.

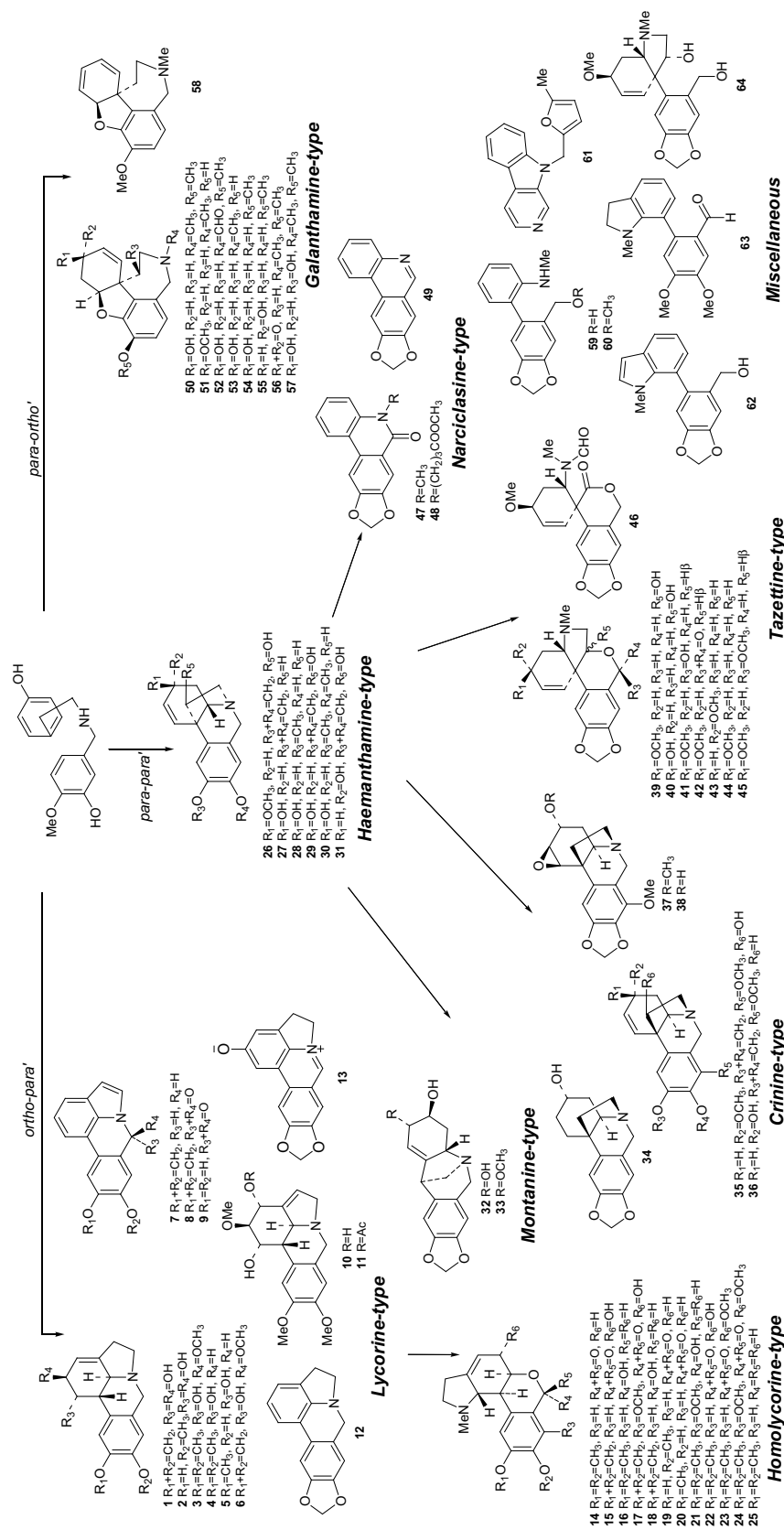
Some new structural subgroups have been proposed recently (Ünver, 2007). Graciline and plicamine-type alkaloids have been found in species of *Galanthus*, *Cyrthanthus* and *Narcissus* (Ünver *et al.*, 1999; Brine *et al.*, 2002; de Andrade *et al.*, 2012). The biogenetic pathway of gracilines possibly originates from the 6-hydroxy derivatives of haemanthamine-type alkaloids (Noyan *et al.*, 1998), while plicamine-type alkaloids most probably proceed from the tazettine-type skeleton, considering their structural similarities. Augustamine-type alkaloids represent a very rare structure found in *Crinum* species (Ali *et al.*, 1983; Machocho *et al.*, 2004). Galanthindole (**62**) is another example of an unusual compound isolated from the *Galanthus* genus and also found in *Hippeastrum* genus. It has been classified as a new skeleton-type (Ünver *et al.*, 2003), although the possibility that it is an artifact from the homolycorine series should be considered. Another uncommon alkaloid found in *Hippeastrum* was a simple carboline, isolated from *Hippeastrum vittatum* (Youssef, 2001).

A few alkaloids commonly found in other plant families have also been described in Amaryllidaceae plants, for example, the mesembrane-type alkaloids, which were isolated in *Narcissus* species (Bastida *et al.*, 2006) despite being typical of the genus *Sceletium* (Aizoaceae). Phtalideisoquinoline-, benzyltetrahydroisoquinoline- and aporphine-type alkaloids were found in *Galanthus trojanus* (Kaya *et al.*, 2004, 2011), being most commonly associated with Papaveraceae and Fumariaceae. Tyramine-type protoalkaloids, which are biosynthesized in Poaceae, Cactaceae, some algae and fungi, have also been found in *Galanthus* and *Leucojum* species (Berkov *et al.*, 2008, 2011a, 2011b). However, it should be borne in mind that these unusual alkaloids have always been isolated together with typical Amaryllidaceae alkaloids. To date, nearly 500 alkaloids have been isolated from amaryllidaceous plants (Zhong, 2005).

4. DISTRIBUTION OF ALKALOIDS IN THE GENUS *HIPPEASTRUM*

Phytochemical studies of the genus *Hippeastrum*, as well as of other genera of the Amaryllidaceae family, started in the early 1950s. The alkaloids reported in the genus *Hippeastrum* are summarized in Table 1 and their respective structures are shown in Figure 2. The first phytochemical study was described with varieties of *H. vittatum*, which yielded the alkaloids tazettine (**39**) and lycorine (**1**) (Boit, 1954). Two years later, a new phytochemical study of the same species yielded the alkaloids haemanthamine (**26**), homolycorine (**14**), hippeastrine (**15**), and vittatine (**27**), as well as tazettine (**39**) and lycorine (**1**) (Boit, 1956). In 1957, a study of *H. bifidum* only yielded lycorine (**1**) (Boit and Döpke, 1957). One year later, galanthamine (**50**) was found for the first time in a *Hippeastrum* species, specifically in *H. rutilum*, although it was isolated as a minor compound (Boit *et al.*, 1958). The work carried out in the 1950s and 60s was notable for the isolation of montanine (**33**) in *H. aulicum* along with some crinine-type representatives (Boit and Döpke, 1959). The main research on the genus in these two decades can be found by searching for the authors Boit, HG and Döpke, W.

There was little phytochemical research on *Hippeastrum* species between the 1970s and 1990s. An interesting study was carried out with *H. vittatum* grown in Egypt in different years, which allowed the elucidation of the alkaloids pancracine (**32**) (formerly hippagine) and hippadine (**8**) (El Mohgazi *et al.*, 1975; Ali *et al.*, 1981, 1984). A phytochemical study of *H. añañuca* from Chile yielded a new alkaloid but with undefined stereochemistry (Pacheco *et al.*, 1978). Quirion *et al.*, (1991) isolated the new compound 3-O-acetylnarcissidine (**11**) from *H. puniceum*, and Döpke *et al.*, (1995a) isolated a new phenantridone alkaloid named phamine (**48**) from *H. equestre*. Several known alkaloids were also isolated

Figure 2. Structure of the alkaloids reported in the genus *Hippeastrum*.

	<i>H. vitatum</i>	<i>H. bifidum</i>	<i>H. rutilum</i>	<i>H. brachyandrum</i>	<i>H. aulicum</i>	<i>H. hybrids*</i>	<i>H. candidum</i>	<i>H. johnsonii</i>	<i>H. ahauca</i>	<i>H. bicolor</i>	<i>H. equestre</i>	<i>H. punctatum</i>	<i>H. solandriiflorum</i>	<i>H. glaucescens</i>	<i>H. moreletianum</i>	<i>H. psittacinum</i>	<i>H. striatum</i>	<i>H. santacatarina</i>	<i>H. papilio</i>	<i>H. breviflorum</i>
Crinine-type																				
Crimidine (34)						8														
Ambelline (35)				5	6	7														
Powelline (36)						7.8														
Undulatine (37)				5																
Crimamidine (38)				5		7														
Tazettine-type																				
Tazettine (39)	1,2, 12					8,21	10			11,17,18 22,23,26	26		28,29	29,32	29	29	29	29	29	29
3-O-demethylazettine (40)																				
Pretazettine (41)										25			28	32	31					
3-Epi-macronine (42)										25			29	29,32	29	29	29	29	29	29
3-Epi-deoxytazettine (43)													29	29	29	29	29	29	29	29
Deoxytazettine (44)													29	29	29	29	29	29	29	29
6-Methoxypretazettine (45)													29	29	29	29	29	29	29	29
Tazettamide (46)														29						
Naretziasine-type																				
N-Methylcrinasiadine (47)										22										
Phamine (48)										22,23										
Trisphaeridine (49)										22				29	29,32	29	29	29	29	29
Galanthamine-type																				
Galanthamine (50)	29	4,5				7,8				18			29	29	29	29	29	29	29	29,34
Chlidanthine (51)												6								
N-Formylnorgalanthamine (52)													29							
Sanguinine (53)													29							29
N-Demethylgalanthamine (54)													29							
3-Epi-norgalanthamine (55)													29							
Narwedine (56)													29							29,34
11 β -hydroxygalanthamine (57)													29							29,34
Anhydrogalanthamine (58)													29							
Miscellaneous																				
Ismine (59)										25			24							29
O-Methylismine (60)																				
Vitiacarboline (61)																				
Galanthindole (62)																				29
Lycosinine B (63)																				29
Egonine (64)											26									

1) Boit, 1954; 2) Boit, 1956; 3) Boit and Döpke, 1957; 4) Boit et al., 1958; 5) Boit and Döpke, 1959; 6) Boit and Döpke, 1960a; 7) Boit and Döpke, 1960b; 8) Döpke, 1962; 9) Döpke and Bienert, 1966; 10) Rao et al., 1971; 11) Rao and Vimaladevi, 1972; 12) El Moghazi et al., 1975; 13) El Moghazi and Ali, 1976; 14) Pacheco et al., 1978; 15) Ali et al., 1981; 16) Sepúlveda et al., 1982; 17) Alam and Murav'eva, 1982; 18) Murav'eva and Alam, 1982; 19) Ali et al., 1984; 20) Quirion et al., 1991; 21) Mügge et al., 1994; 22) Döpke et al., 1993b; 23) Döpke et al., 1995a; 24) Bastida et al., 1996; 25) Pham et al., 1997; 26) Pham et al., 1999; 27) Yousef, 2001; 28) Hofmann et al., 2003; 29) de Andrade et al., Personal communication, 12 June 2012; 30) da Silva et al., 2008; 31) Pagliosa et al., 2010; 32) Giordani et al., 2011a; 33) Giordani et al., 2011a; 34) de Andrade et al., 2011. * mixture of hybrids from *Hippeastrum*.

from *H. equestre* and submitted to circular dichroism studies (Wagner *et al.*, 1996). A few years later, *H. equestre* yielded another new alkaloid, egonine (**64**) (Pham *et al.*, 1999). This structure has been related as a typical *Sceletium* mesembrine-type alkaloid (Aizoaceae), although its similarity with tazettine-type skeleton should be considered.

Phytochemical studies of *H. vittatum* flowers in 2001 yielded a representative alkaloid of the carboline group named vittacarboline (**61**), as well as the new alkaloid *O*-methylismine (**60**) (Youssef, 2001). A rapid phytochemical study of *H. glaucescens* provided lycorine (**1**), pretazettine (**41**) and tazettine (**39**), but not all alkaloid fractions were studied (Hoffman *et al.*, 2003). In the last decade, most *Hippeastrum* studies have been focused on the biological activity of alkaloids isolated from the genus, although the new alkaloids 2 α ,7-dimethoxyhomolycorine (**24**) and 11 β -hydroxygalanthamine (**57**) found in *H. morelianum* and *H. papilio*, respectively, should be mentioned (Giordani *et al.*, 2011b, de Andrade *et al.*, 2011).

In the last decade, the GC-MS technique has proved to be very effective for rapid separation and identification of complex mixtures of Amaryllidaceae alkaloids obtained from low mass samples (Kreh *et al.*, 1995, Berkov *et al.*, 2008, 2011a). The high resolution ability of the capillary column and numerous EI-MS spectra available in the literature allow the identification and quantification of known Amaryllidaceae alkaloids, avoiding time-consuming and laborious isolation procedures. This technique has been much applied with the genera *Pancreatum*, *Galanthus*, *Leucojum* and *Narcissus* (Kreh *et al.*, 1995; Torras-Claveria *et al.*, 2010; Berkov *et al.*, 2011b; de Andrade *et al.*, 2012). The only study applying GC-MS in the genus *Hippeastrum*, carried out with species from South Brazil, identified more compounds than had been isolated previously and two species were found to

produce significant levels of galanthamine (**50**) (de Andrade *et al.*, Personal communication, 12 June 2012).

To the best of our knowledge, 19 species, including hybrids, from the genus *Hippeastrum* have been phytochemically studied to date. Sixty-four different alkaloids with defined structures have been isolated, while fourteen remain undefined (Boit and Döpke, 1959, 1960a, 1960b; Pacheco *et al.*, 1978; de Andrade *et al.*, Personal communication, 12 June 2012). Table 1 and Figure 2 summarize the alkaloids found in the genus *Hippeastrum*.

5. BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF THE ALKALOIDS FOUND IN HIPPEASTRUM

Like most Amaryllidaceae alkaloids, the compounds found in the genus *Hippeastrum* have been little evaluated for their biological activity. However, some of them have demonstrated a broad spectrum of interesting properties.

5.1. *Ortho-para*' phenolic coupling

5.1.1 *Lycorine-type*

Lycorine (**1**) is probably the most frequent occurring alkaloid in Amaryllidaceae plants and has been found in almost all *Hippeastrum* species. This compound possesses a vast array of biological properties, being reported as a potent inhibitor of ascorbic acid synthesis, cell growth and division, and organogenesis in higher plants, algae and yeasts, inhibiting the cell cycle during the interphase (Bastida *et al.*, 2006). Additionally, lycorine (**1**) exhibits antiviral, anti-inflammatory, antifungal and anti-protozoan activities (Çitoğlu *et al.*, 1998; McNulty *et al.*, 2009; Giordani *et al.*, 2010b, 2011a). Lycorine (**1**) has also been shown to have insect antifeedant activity (Evidente *et al.*, 1986), as does 3-*O*-acetylnarcissidine (**11**), isolated from *H. puniceum*, which is particularly active against the polyphagous

insect *Spodora littoralis* but not against the olphage *Leptinotarsa decemlineata* (Santana *et al.*, 2008).

As a potential chemotherapeutic drug, lycorine (**1**) has been studied as an antiproliferative agent against a number of cancer cell lines (Likhitwitayawuid *et al.*, 1993; McNulty *et al.*, 2009). The *in vitro* mode of action in a model HL-60 leukemia cell line is associated with suppressing tumor cell growth and reducing cell survival via cell cycle arrest and induction of apoptosis. Furthermore, lycorine (**1**) was able to decrease tumor cell growth and increase survival rates with no observable adverse effects in treated animals, thus being a good candidate for a therapeutic agent against leukaemia (Liu *et al.*, 2004, 2007; Liu *et al.*, 2009).

Lycorine (**1**) isolated from *H. santacatarina* showed remarkable inhibitory activity of the enzymes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase from *Trichomonas vaginalis*, which contributes to an increased susceptibility of this parasite to the host immune response (Giordani *et al.*, 2010b). Lycorine (**1**) was also demonstrated to have anti-*T. vaginalis* activity, involving a mechanism of cell death induction associated with paraptosis rather than the apoptosis observed in tumor cells. This mechanism also differs from the one associated with other pro-apoptotic compounds tested against *T. vaginalis* such as staurosporine, doxorubicin, etoposide and methyl jasmonate. The authors have called for additional molecular studies for a better characterization of the different cell death mechanisms (Giordani *et al.*, 2011a). Lycorine (**1**) has also been tested *in vitro* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), results of antiviral showed low inhibition of the replication of HIV-1(NL4-3) with an $EC_{50} > 0.5 \mu\text{g/ml}$ with infected lymphoid MT-4 human cells (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011).

Compared to other lycorine-type alkaloids, anhydrolycorine (**12**) showed a greater ability to inhibit ascorbic acid syn-

thesis (Evidente *et al.*, 1986). Analgesic, hypotensive and antiparasitic activities have been reported for galanthine (**3**). Ungeremine (**13**) has shown acetylcholinesterase inhibitory activity (Bastida *et al.*, 2006). In summary, the lycorine skeleton-type is a promising target for further biological assessments.

5.1.2 Homolycorine-type

Homolycorine (**14**), 8-*O*-demethylhomolycorine (**20**) and hippeastrine (**15**) are well-known cytotoxic alkaloids. Homolycorine (**14**) has also shown high antiretroviral activity, while hippeastrine (**15**) is active against *Herpes simplex* type 1. Homolycorine (**14**) and 8-*O*-demethylhomolycorine (**20**) have a hypotensive effect on normotensive rats. In addition, hippeastrine (**15**) shows antifungal activity against *Candida albicans* and also possesses a weak insect antifeedant activity (Bastida *et al.*, 2006). Candimine (**17**), first found in *H. candidum* (Döpke, 1962), has been tested against *Trichomonas vaginalis* and found to inhibit the *T. vaginalis* enzymes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase to a greater extent than lycorine (**1**) (Giordani *et al.*, 2010b). Candimine (**17**) was also active against *T. vaginalis*, apparently inducing cell death by paraptosis, as in the case of lycorine (**1**) (Giordani *et al.*, 2010a). Homolycorine (**14**) and 8-*O*-demethylhomolycorine (**20**) were tested against the parasitic protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani* and *Plasmodium falciparum* but showed no significant activity (de Andrade *et al.*, 2012). However, the bioactivity of most homolycorine-type alkaloids is largely unknown.

5.2. Para-para' phenolic coupling

5.2.1. Haemanthamine-type

Haemanthamine (**26**), as well as crinamine, has proven to be a potent inducer of apoptosis in tumor cells at micromolar concentrations (McNulty *et al.*, 2007). This

compound also possesses antimalarial activity against strains of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum*, hypotensive effects and antiretroviral activity (Bastida *et al.*, 2006; Kaya *et al.*, 2011). Vittatine (**27**), isolated from *H. vittatum*, and maritidine (**30**), have shown cytotoxic activity against HT29 colon adenocarcinoma, lung carcinoma and RXF393 renal cell carcinoma (Bastida *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2008). Vittatine (**27**) also showed antibacterial activity against Gram-positive *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli*, as well as 11-hydroxyvittatine (**29**) (Kornienko and Evidente, 2008).

5.2.2. Crinine-type

The alkaloids crinine, 6-hydroxybuphanidrine and 6-ethoxybuphanidrine showed antiproliferative effects against human tumor cell lines, crinine being the most active (Berkov *et al.*, 2011c). A comparative study of skeleton-types concluded that the crinine-type alkaloid buphanamine was the most promising, since it showed important anti-proliferative effects and was well tolerated even at high concentration (Evidente *et al.*, 2009). Further evaluations are needed to gain more insight into the biological activity of the crinine-type skeleton.

5.2.3. Tazettine-type

The alkaloids 3-*epi*-macronine (**42**) and tazettine (**39**) showed moderate cytotoxic activity. Tazettine (**39**) is an isolation artefact of chemically labile pretazettine (**41**) (de Andrade *et al.*, 2012), the latter being far more interesting due to its antiviral and anticancer activities (Bastida *et al.*, 2006). Pretazettine (**41**) shows cytotoxicity against fibroblastic LMTK cell lines and inhibits HeLa cell growth, being therapeutically effective against advanced Rauscher leukemia, Ehrlich ascites carcinoma, spontaneous AKR lymphocytic leukemia, and Lewis lung carcinoma (Bastida *et al.*, 2006). Pretazettine (**41**) isolated from *H. psittacinum* was tested for its ability to inhibit the

AChE enzyme but showed no significant result (Pagliosa *et al.*, 2010).

5.2.4. Montanine-type

This group has very few representatives. The alkaloids montanine (**33**) and pancracine (**32**) have been isolated in different periods from *Hippeastrum* species growing in Europe and South America, such as *H. vittatum*. In recent work montanine (**33**) showed anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects in mice (da Silva *et al.*, 2006). Montanine (**33**) and vittatine (**27**) were also submitted to an antiproliferative study, the former showing the highest level of cytotoxicity (da Silva *et al.*, 2008). Furthermore, montanine (**33**) significantly inhibited AChE activity at concentrations of 1 milimolar, and 500 and 100 micromolar using the Ellman method (Pagliosa *et al.*, 2010). Pancracine (**32**) showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, as well as weak activity against *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium falciparum* (Bastida *et al.*, 2006). The montanine-type skeleton represents one of the most interesting alkaloids for biological evaluations due to its remarkable and broad spectrum of activities.

5.2.5. Narciclasine-type

Trisphaeridine (**49**) has a high retroviral activity but a low therapeutic index (Bastida *et al.*, 2006). Narciclasine and pancratistatin are the most studied alkaloids of this group but they have never been found in the *Hippeastrum* genus. Both compounds show strong antimitotic and antitumoral activities (Bastida *et al.*, 2006). No biological evaluation of the alkaloids *N*-methylcrinasiadine (**47**) and phamine (**48**) has been carried out to date.

5.3. Para-ortho' phenolic coupling

5.3.1. Galanthamine-type

Galanthamine (**50**) is a long-acting, selective, reversible and competitive inhibitor of

acetylcholinesterase (AChE) and an allosteric modulator of the neuronal nicotinic receptor for acetylcholine. Its action increases acetylcholine levels, thus facilitating cholinergic synapses and helping in the management of patients suffering certain stages of AD (Maelicke *et al.*, 2001; Bastida *et al.*, 2006; Heinrich and Teoh, 2004). Galanthamine (**50**), therefore, is the most studied Amaryllidaceae alkaloid in terms of biological activity, clinical response, tolerance and safety, being marketed as a hydrobromide salt under the name of Razadine[®], formerly Reminyl[®]. Galanthamine (**50**) has superior pharmacological profiles and higher tolerance than the original AChE inhibitors physostigmine or tacrine (Grutzendler and Morris, 2001).

After the therapeutic success of galanthamine (**50**), the search for new AChE inhibitors has intensified. *Epi-galanthamine*, with a hydroxyl group at the α -position, and narwedine (**56**), with a keto group at C3, are also active AChE inhibitors, but about 130-times less powerful than galanthamine (**50**) (Thomsen *et al.*, 1998). The loss of the methyl group at the *N* atom, as in *N*-demethylgalanthamine (**54**), decreases the activity 10-fold. The alkaloids habranthine and its new epimer 11 β -hydroxygalanthamine (**57**), isolated from *H. papilio*, which shows a hydroxyl-substituent at C11, were both also *ca.* 10-times less active than galanthamine (**50**) (López *et al.*, 2002; de Andrade *et al.*, 2011). Hydrogenation of the C4-C4a double bond, as in lycoramine, results in a complete loss of AChE inhibitory activity (López *et al.*, 2002).

On the other hand, sanguinine (**53**), which has a hydroxyl group at C9 instead of a methoxyl group, is *ca.* 10 times more active than galanthamine (**50**). Recently, *N*-alkylated galanthamine derivatives were isolated from *Leucojum* species and were also *ca.* 10 times more active than galanthamine (**50**). It has been suggested that these naturally occurring AChE inhi-

bitors can act as ecological pesticides, since the AChE-inhibitory activity of synthetic pesticides, such as phospho-organic derivatives, is non-reversible (Houghton *et al.*, 2006).

Galanthamine (**50**) has also been tested *in vitro* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), results of antiviral assays indicated that galanthamine (**50**), as well as its structural isomer chlidanthine (**51**) and galanthamine *N*-oxide, did not showed inhibition of the replication of HIV-1(NL4-3) with infected lymphoid MT-4 human cells, but they were also not toxic to non infected cells showing EC₅₀ and CC₅₀ > 20 μ g/ml, respectively (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011). The galanthamine-type skeleton is currently the most studied group in terms of biological activity.

5.4. Miscellaneous

Ismine (**59**) shows a significant hypotensive effect on rats and cytotoxicity against Molt 4 lymphoid and LMTK fibroblastic cell lines (Bastida *et al.*, 2006). Recently, extracts from *H. breviflorum* showing different ratios between lycosinine B (**63**) and lycorine (**1**) by HPLC demonstrated significant anti-*Trichomonas vaginalis* activity (Vieira *et al.*, 2011). To date, the alkaloids vittacarboline (**61**), galanthindole (**62**) and *O*-methylismine (**60**) have not been biologically evaluated.

6. CONCLUSION

Over the last 50 years, the bulbous genus *Hippeastrum* has yielded 64 different alkaloids, together with others whose structures remain undefined. Further studies on the isolation of these compounds are called for, especially after recent biological studies showing their significant antiparasitic, psychopharmacological and AChE-inhibitory activities. Notably, some *Hippeastrum* species are able to produce a high level of galanthamine (**50**), comparable with species

of other genera currently being used for the commercial production of this alkaloid. The lack of biological activity shown by most of the alkaloids found in the *Hippeastrum* genus may be due to the small amounts isolated. Consequently, their synthesis or *in silico* studies will facilitate further bioactivity assessment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Generalitat de Catalunya (2009 - SGR1060) for financial support of this work. J.P.A. is thankful to the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (BECAS-MAEC-AECID) for a doctoral fellowship.

REFERENCES

- Alam, A.H.M., Murav'eva, D.A. (1982) Alkaloids of the underground organs of *Hippeastrum equestre*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* **3**: 401.
- Ali, A.A., Mesbah, M.K., Frahm, A.W. (1981) Phytochemical investigation of *Hippeastrum vittatum* growing in Egypt. Part III: structural elucidation of hippadine. *Planta Medica* **43**: 407-409.
- Ali, A.A., Hambloch, H., Frahm, A.W. (1983) Relative configuration of the alkaloid augustamine. *Phytochemistry* **22**: 283-287.
- Ali, A.A., Mesbah, M.K., Frahm, A.W. (1984) Phytochemical investigation of *Hippeastrum vittatum*. Part IV: stereochemistry of pancracine, the first 5,11-methano-morphanthridine alkaloid from *Hippeastrum* – structure of “hippagine”. *Planta Medica* **50**: 188-189.
- Bastida, J., Codina, C., Porrás, C.L., Paiz, L. (1996) Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum*. *Planta Medica* **62**: 74-75.
- Bastida, J., Lavilla, R., Viladomat, F. (2006) Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In Cordell, G. (eds) *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. The Netherlands: Elsevier Inc, pp. 87-179.
- Berkov, S., Bastida, J., Sidjimova, B., Viladomat, F., Codina, C. (2008) Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii*: a case study. *Biochemical Systematic and Ecology* **36**: 638-645.
- Berkov, S., Bastida, J., Sidjimova, B., Viladomat, F., Codina, C. (2011a) Alkaloid diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*. *Chemistry and Biodiversity* **8**: 115-130.
- Berkov, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. (2011b) Development and validation of a GC-MS method for a rapid determination of galanthamine in *Leucojum aestivum* and *Narcissus* ssp.: A metabolomic approach. *Talanta* **83**: 1455-1465.
- Berkov, S., Romani, S., Herrera, M., Viladomat, F., Codina, C., Momekov, G., Ionkova, I., Bastida, J. (2011c) Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy Research* **25**: 1686-1692.
- Boit, H.G. (1954) Alkaloids of the Amaryllidaceae. VI. The alkaloids of *Nerine sarniensis*, *Crinum moorei*, *Hippeastrum vittatum* and *Clivia miniata*. *Chemische Berichte* **87**: 1704-1707.
- Boit, H.G. (1956) Amaryllidaceous alkaloids. XI. Alkaloids of *Chlidanthus fragrans*, *Vallota purpurea*, *Nerine undulate*, and *Hippeastrum vittatum*. *Chemische Berichte* **89**: 1129-1134.
- Boit, H.G., Döpke, W. (1957) Alkaloids of the Amaryllidaceae. XVIII. Alkaloids from *Urceolina*, *Hymenocallis*, *Elisena*, *Calostemma*, *Eustephia*, and *Hippeastrum*. *Chemische Berichte* **90**: 1827-1830.
- Boit, H.G., Döpke, W., Stender, W. (1958) Alkaloids from *Hippeastrum rutilum*, *Lycoris albiflora*, *Zephyranthes andersoniana*, and *Sternbergia fischeriana*. *Naturwissenschaften* **45**: 390.

- Boit, H.G., Döpke, W. (1959) Alkaloids from *Hippeastrum brachyandrum* and *Hippeastrum rutilum*. *Chemische Berichte* **92**: 2582-2584.
- Boit, H.G., Döpke, W. (1960a) Alkaloids from *Hippeastrum aulicum* var. *robustum*. *Naturwissenschaften* **47**: 109.
- Boit, H.G., Döpke, W. (1960b) New alkaloids from *Hippeastrum* hybrids and *Nerine flexuosa*. *Naturwissenschaften* **47**: 470-471.
- Brine, N.D., Campbell, W.E., Bastida, J., Herrera, M.R., Viladomat, F., Codina, C., Smith, P.J. (2002) A dinitrogenous alkaloid from *Cyrthanthus obliquus*. *Phytochemistry* **61**: 443-447.
- Çitoğlu, G., Tanker, M., Gümüsel, B. (1998) Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. *Phytotherapy Research* **12**: 205-206.
- da Silva, A.F.S., de Andrade, J.P., Bevilacqua, L.R., de Souza, M.M., Izquierdo, I., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S. (2006) Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsivant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* **85**: 148-54.
- da Silva, A.F.S., de Andrade, J.P., Machado, K.R.B., Rocha, A.B., Apel, M.A., Sobral, M.G.E., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S. (2008) Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine* **15**: 882-885.
- Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T., Yeo, P.F. (1985) The families of the monocotyledons. Structure, evolution, and taxonomy. 1st Edition. Springer-Verlag, Berlin pp. 199-206.
- de Andrade, J.P., Berkov, S., Viladomat, F., Codina, C., Zuanazzi, J.A.S., Bastida, J. (2011) Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. *Molecules* **16**: 7097-7104.
- de Andrade, J.P., Pigni, N.B., Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2012) Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: mass spectral studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **70**: 13-25.
- de Andrade, J.P. GC-MS approach and acetylcholinesterase inhibition of some Brazilian Amaryllidaceae species. (Personal communication, 12 June 2012).
- Döpke, W. (1962) Alkaloids of the *Hippeastrum* type. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* **295**: 920-924.
- Döpke, W., Bienert, M. (1966) Alkaloids from Amaryllidaceae; structure of oduline. *Pharmazie* **21**: 323-324.
- Döpke, W., Pham, L.H., Gruendemann, E., Bartoszek, M., Flatau, S. (1995a) Alkaloids from *Hippeastrum equestre*; Part I: phamine, a new phenanthridone alkaloid. *Planta Medica* **61**: 564-566.
- Döpke, W., Pham, L.H., Gruendemann, E., Bartoszek, M., Flatau, S. (1995b) Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. *Pharmazie* **50**: 511-512.
- Dutilh, J.H.A. (2010) Amaryllidaceae. In: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (eds). *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil*. Rio de Janeiro, Brasil: Sindicato Nacional de Editores de Livros, pp. 596-599.
- El Moghazi, A.M., Ali, A.A., Mesbah, M.K. (1975) Phytochemical investigation of *Hippeastrum vittatum* growing in Egypt. II. Isolation and identification of new alkaloids. *Planta Medica* **28**: 336-342.
- El Moghazi, A.M., Ali, A.A. (1976) Microchemical identification of Amaryllidaceae alkaloids. Part I. Crinidine, vittatine, crinamine, powelline, hippacine, lycorine and B II. *Planta Medica* **30**: 369-374.
- Evidente, A., Arrigoni, O., Luso, R., Calabrese, G., Randazzo, G. (1986) Further experiments on structure-activity relationships among lycorine alkaloids. *Phytochemistry* **25**: 2739-2743.
- Evidente, A., Kireev, A.S., Jenkins, A.R., Romero, A.E., Steelant, W.F.A., Slambrouck, S.V.,

- Kornienko, A. (2009) Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Medica* **75**: 501-507.
- Ghosal, S., Saini, K.S., Razdan, S. (1985) *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. *Phytochemistry* **24**: 2141-2156.
- Giordani, R.B., Vieira, P.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., Souza, A.P., Bonorino, C., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T. (2010a). Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trychomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products* **73**: 2019-23.
- Giordani, R.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T. (2010b) *Trychomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitology International* **59**: 226-231.
- Giordani, R.B., Vieira, P.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., Souza, A.P., Bonorino, C., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T. (2011a) Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry* **72**: 645-50.
- Giordani, R.B., de Andrade, J.P., Verli, H., Dutilh, J., Henriques, A.T., Berkov, S., Bastida, J., Zuanazzi, J.A.S. (2011b). Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry* **49**: 668-72.
- Grutzendler, J., Morris, J.C. (2001) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's Disease. *Drugs* **61**: 41-52.
- Heinrich, M., Teoh, H.L. (2004) Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* **92**: 147-162.
- Hofmann Jr. A.E., Sebben, C., Sobral, M., Dutilh, J.H.A., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S. (2003) Alkaloids of *Hippeastrum glaucescens*. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**: 1455-1456.
- Houghton, P., Ren, Y., Howes, M.J. (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports* **23**: 181-199.
- Ito, M., Kawamoto, A., Kita, Y., Yukawa, T., Kurita, S. (1999) Phylogenetic relationships of Amaryllidaceae based on *matk* sequence data. *Journal of Plant Research* **112**: 207-216.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg E.A., Stevens, P.F. (1999) Plant Systematics: A phylogenetic approach. Sinauer Associates, Inc: Sunderland, USA pp. 190-191.
- Kaya, G.I., Ünver, N., Gözler, B., Bastida, J. (2004) (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species, *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*. *Biochemical Systematics and Ecology* **32**: 1059-1062.
- Kaya, G.I, Sarikaya, B., Onur, M.A, Ünver, N., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J., Lauinger, I.L., Kaiser, M., Tasdemir, D. (2011) Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochemistry Letters* **4**: 301-305.
- Kornienko, A., Evidente, A. (2008) Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews* **108**: 1982-2014.
- Kreh, M., Matusch, R., Witte, L. (1995). Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry* **38**: 773-76.
- Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Chai, H., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A. (1993) Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products* **56**: 1331-1338.
- Liu, J., Hu, W.X., He, L.F., Ye, M., Li, Y. (2004) Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting

- cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS Letters* **578**: 245-250.
- Liu, J., Li, Y., Tang, L.J., Zhang, G.P., Hu, W.X. (2007) Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **61**: 229-234.
- Liu, X.S., Jiang, J., Jiao, X.Y., Wu, Y.E., Lin, J.H., Cai, Y.M. (2009) Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells. *Cancer Letters* **274**: 16-24.
- López, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences* **71**: 2521-2529.
- Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E.X., Zerlin, M. (2001) Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biology Psychiatry* **49**: 279-288.
- Machocho, A.K., Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F., Brun, R., Chhabra, S.C. (2004) Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. *Phytochemistry* **65**: 3143-3149.
- McNulty, J., Nair, J.J., Codina, C., Bastida, J., Pandey, S., Gerasimoff, J., Griffin, C. (2007) Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry* **68**: 1068-1074.
- McNulty, J., Nair, J.J., Bastida, J., Pandey, S., Griffin, C. (2009) Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: a potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry* **70**: 913-919.
- Meerow, A.W., Scheepen, J., Dutilh, J.H.A. (1997) Transfer from *Amaryllis* to *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Taxon* **46**: 15-19.
- Meerow, A.V., Snijman, D.A. (1998) Amaryllidaceae. In Kubitzki, K. (eds) *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 83-110.
- Meerow, A.V., Guy, C.L., Li, Q.B., Yang, S.L. (2000) Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Systematic Botany* **25**: 708-726.
- Mügge, C., Schablinski, B., Obst, K., Döpke, W. (1994) Alkaloids from *Hippeastrum* hybrids. *Pharmazie* **49**: 444-447.
- Murav'eva, D.A., Alam, A.H.M. (1982) Alkaloids of the aboveground organs of *Hippeastrum equestre*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* **4**: 533.
- Noyan, S., Rentsch, G.H., Önür, M.A., Gözler, T., Gözler, B., Hesse, M. (1998) The gracilines: a novel subgroup of the Amaryllidaceae alkaloids. *Heterocycles* **48**: 1777-1791.
- Pagliosa, L.B., Monteiro, S.C., Silva, K.B., de Andrade, J.P., Dutilh, J., Bastida, J., Cammarota, M., Zuanazzi, J.A.S. (2010). Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine* **17**: 698-701.
- Pacheco, P., Silva, M., Steglich, W., Watson, W.H. (1978) Alkaloids of Chilean Amaryllidaceae. I. Hippeastidine and *epi*-homolycorine, two novel alkaloids. *Revista Latinoamericana de Química* **9**: 28-32.
- Pham, L.H., Grundemann, E., Döpke, W. (1997) Alkaloids from *Hippeastrum equestre*. Part 3. *Pharmazie* **52**: 160-162.
- Pham, L.H., Grundemann, E., Wagner, J., Bartoszek, M., Döpke, W. (1999) Two novel Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb.: 3-*O*-demethylazettine and egonine. *Phytochemistry* **51**: 327-332.
- Quirion, J.C., Husson, H.P., Weniger, B., Jiménez, F., Zannoni, T.A. (1991) (-)-3-*O*-acetylnarcissidine, a new alkaloids from *Hippeastrum puniceum*. *Journal of Natural Products* **54**: 1112-1114.
- Rao, R.V.K., Nazar, A., Vimaladevi, R. (1971) Phytochemical studies on *Hippeastrum johnsonii* bulbs. *Indian Journal of Pharmacy* **33**: 56-58.
- Rao, R.V.K., Vimaladevi, R. (1972) Crystalline alkaloids from *Hippeastrum equestre* [*Amaryllis belladonna*]. *Planta Medica* **21**: 142-143.
- Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Hernández-Ortega, S., Jankowski, C.K., Arseneau, S., Clotet-

- Codina, I., Esté, J.A., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2011). Acetylcholinesterase inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules* **16**: 9520-9533.
- Santana, O., Reina, M., Anaya, A.L., Hernández, F., Izquierdo, M.E., González-Coloma, A. (2008) 3-O-acetyl-narcissidine, a bioactive alkaloid from *Hippeastrum puniceum* Lam. (Amaryllidaceae). *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **63**: 639-643.
- Sepúlveda, B.A., Pacheco, P., Silva, M.J., Zemelman, R. (1982) Alkaloids of the Amaryllidaceae chilensis. III. Chemical study and biological activity in *Hippeastrum bicolor* (RetP) Baker. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **27**: 178-180.
- Thomsen, D., Bickel, U., Fischer, J., Kewitz, H. (1998) Stereoselectivity of cholinesterase inhibition by galanthamine and tolerance in humans. *European Journal of Clinical Pharmacology* **39**: 603-605.
- Torras-Claveria, L., Berkov, S., Jáuregui, O., Caujapé, J., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J. (2010) Metabolic profiling of bioactive *Pancratium canariense* extracts by GC-MS. *Phytochemical Analysis* **21**: 80-88.
- Ünver, N., Gözler, T., Walch, N., Gözler, B., Hesse, M. (1999) Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* (Amaryllidaceae), *Phytochemistry* **50**: 1255-1261.
- Ünver, N., Kaya, G.I., Werner, C., Verpoorte, R., Gözler, B. (2003) Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*. *Planta Medica* **69**: 869-871.
- Ünver, N. (2007) New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemical Reviews* **6**: 125-135.
- Vieira, P.B., Giordani, R.B., De Carli, G.A., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T. (2011) Screening and bioguided fractionation of Amaryllidaceae species with anti-*Trychomonas vaginalis* activity. *Planta Medica* **77**: 1054-1059.
- Wagner, J., Pham, H.L., Döpke, W. (1996) Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb.-5. Circular dichroism studies. *Tetrahedron* **52**: 6591-6600.
- Youssef, D.T.A. (2001) Alkaloids of the flowers of *Hippeastrum vittatum*. *Journal of Natural Products* **64**: 839-841.
- Zhong, J. (2005) Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Products Reports* **22**: 111-126.

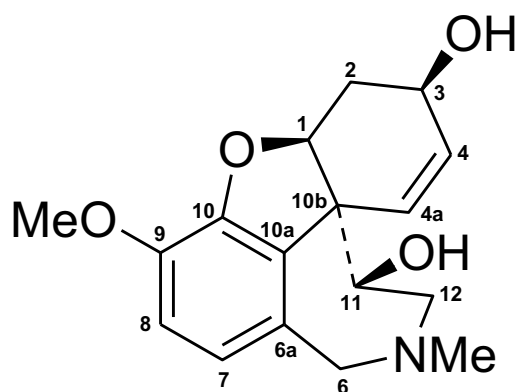
7.2. Anexo II – Tablas de RMN y principales espectros

7.2.1. 11 β -Hidroxicigalantamina

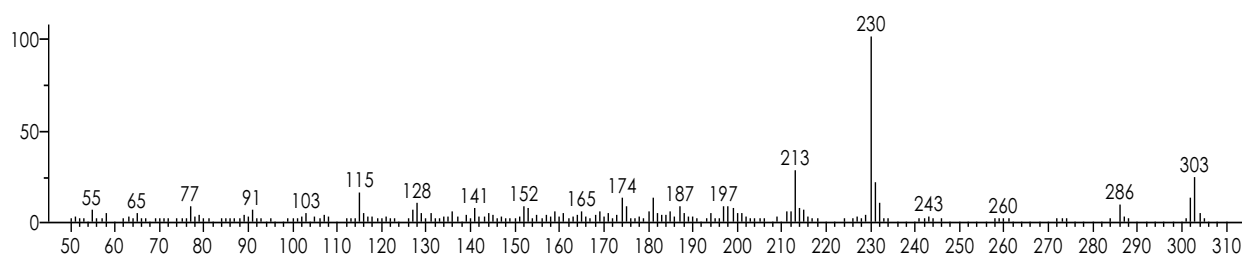
Tabla de RMN

Posición	δ_H (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
1	4.88 <i>br s</i>	H-2 α , H-2 β	H-2 α , H-2 β , H-11 α	89.0 <i>d</i>	C-3, C-4a, C-11
2 α	2.70 <i>ddd</i> (15.6, 5.2, 2.8)	H-1, H-2 β	H-1, H-2 β , H-3	32.3 <i>t</i>	C-1, C-3, C-4, C-10a
2 β	2.37 <i>br dt</i> (15.6, 1.6)	H-1, H-2 α , H-3	H-1, H-2 α , H-3	--	--
3	4.20 <i>br t</i> (4.8)	H-2 β , H-4	H-2 α , H-2 β , H-4	62.2 <i>d</i>	C-1, C-4, C-4a
4	6.29 <i>dd</i> (10.4, 4.8)	H-3, H-4a	H-3, H-4a	133.1 <i>d</i>	C-2, C-10b
4a	5.96 <i>d</i> (10.0)	H-4	H-4, H-6 β , H-12 β	122.6 <i>d</i>	C-1, C-3, C-10b
6 α	3.60 <i>d</i> (15.2)	H-6 β	H-6 β , H-7, NMe	59.5 <i>t</i>	C-6a, C-7, C-10a, C-10b
6 β	3.93 <i>d</i> (14.8)	H-6 α	H-4a, H-6 α , H-12 β	129.9 <i>s</i>	C-6a, C-7, C-10a, C-10b
6a				129.9 <i>s</i>	
7	6.61 <i>d</i> (8.0)	H-8	H-6 α , H-8	122.4 <i>d</i>	C-6, C-9, C-10a
8	6.68 <i>d</i> (8.0)	H-7	H-7, OMe	111.8 <i>d</i>	C-6a, C-10
9				144.6 <i>s</i>	
10				146.9 <i>s</i>	
10a				128.9 <i>s</i>	
10b				53.4 <i>s</i>	
11 α	4.05 <i>dd</i> (10.8, 4.0)	H-12 α , H-12 β	H-1, H-12 α , H-12 β , NMe	72.0 <i>d</i>	C-1, C-4a
12 α	3.02 <i>dd</i> (14.0, 3.2)	H-11 α , H-12 β	H-11 α , H-12 β , NMe	62.1 <i>t</i>	C-6, C-10b, C-11
12 β	3.17 <i>dd</i> (13.6, 10.8)	H-11 α , H-12 α	H-4a, H-6 β , H-11 α , H-12 α	56.2 <i>q</i>	C-6, C-11, NMe
OMe	3.84 <i>s</i> (3H)		H-8	56.2 <i>q</i>	C-9
NMe	2.45 <i>s</i> (3H)		H-6 α , H-11 α , H-12 α	43.2 <i>q</i>	C-6, C-12

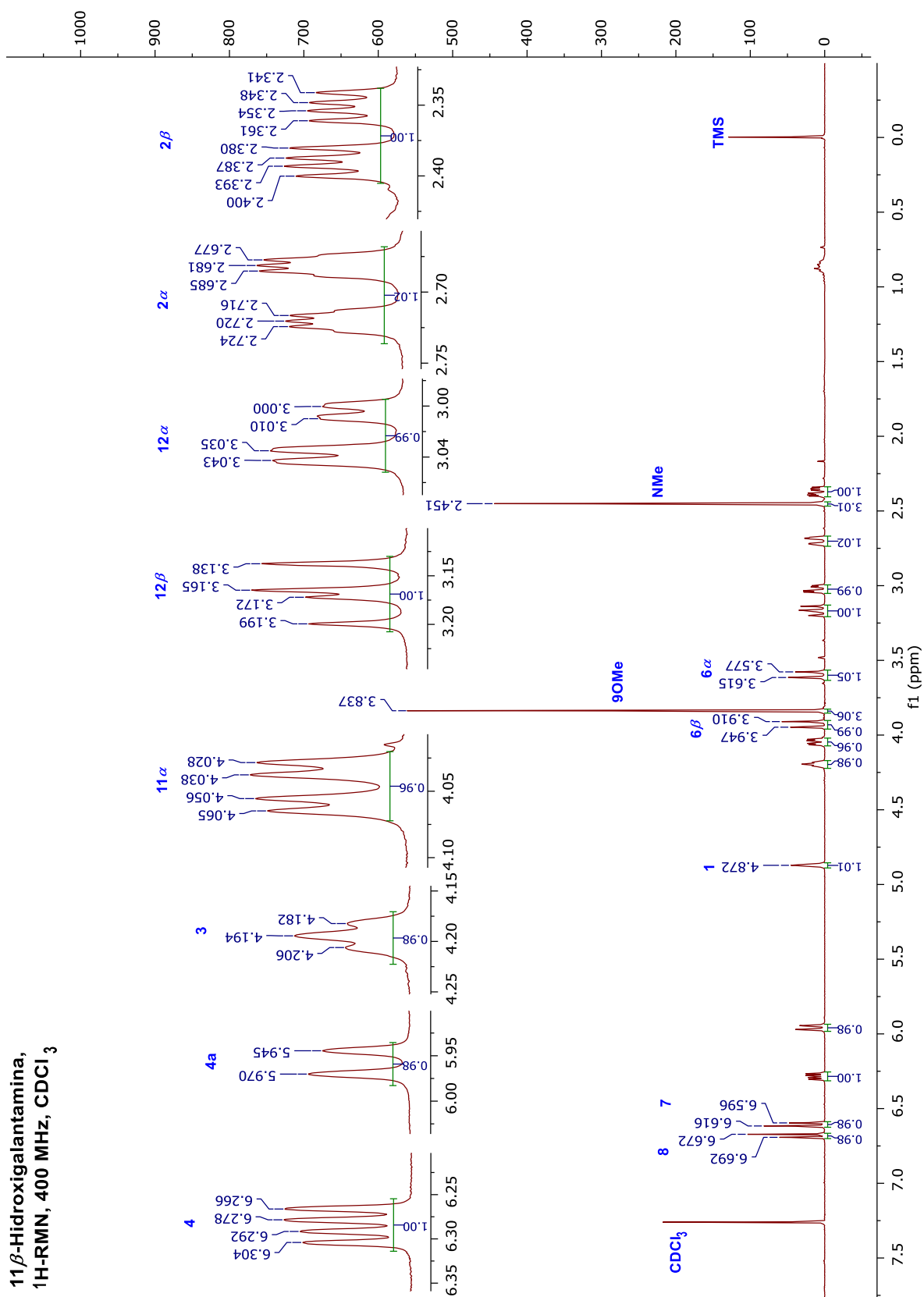
Estructura química

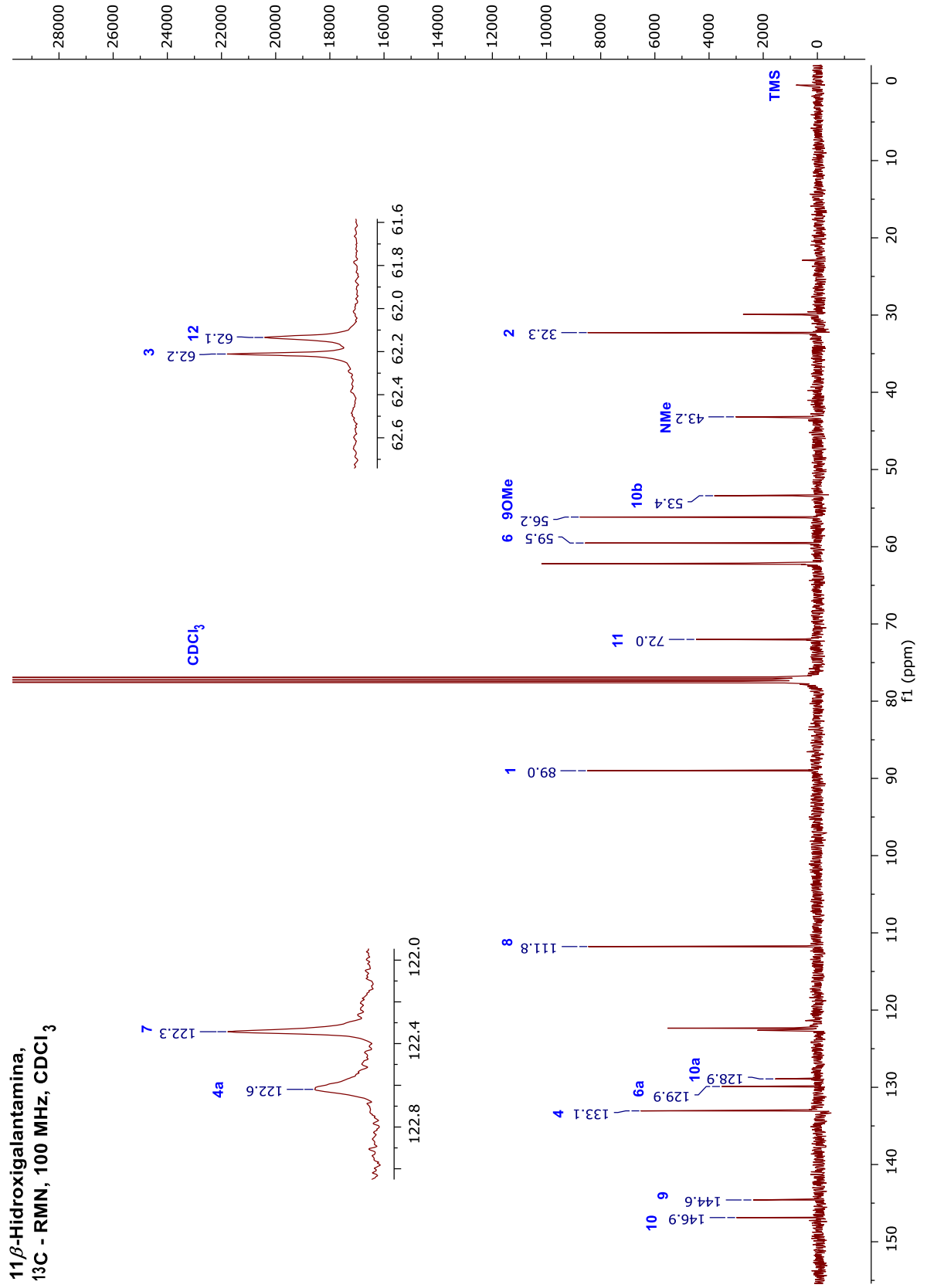


Espectro bajo condiciones de GC-MS



**11 β -Hidroxigalantamina,
1H-RMN, 400 MHz, CDCl₃**



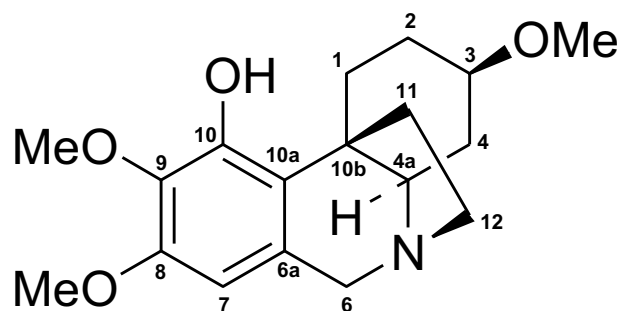


7.2.2. Aulicina

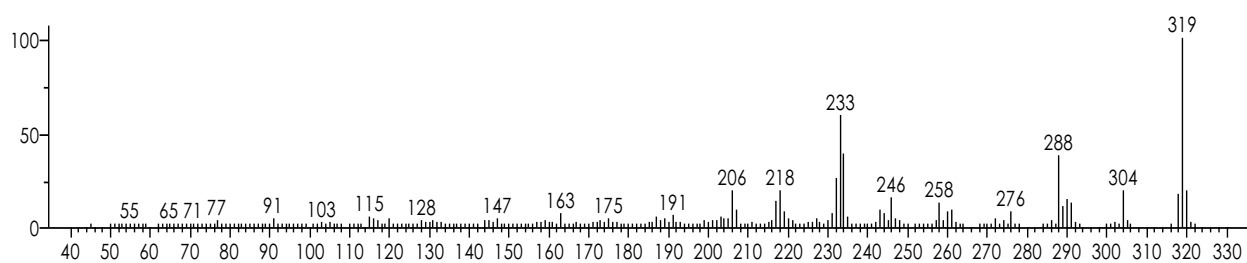
Tabla de RMN

Posición	δ_H (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC
1 α (ax)	1.77 <i>td</i> (14.0, 4.4)	H-1 β , H-2 α , H-2 β	H-1 β , H-2 α	26.8 <i>t</i>
1 β (eq)	3.10 – 3.20 <i>m</i>	H-1 α , H-2 α , H-2 β	H-1 α , H-2 β , H-11 exo	
2 α (eq)	2.04 <i>m</i>	H-1 α , H-1 β , H-2 β , H-3	H-1 α , H-2 β , H-3, 3-OMe	27.7 <i>t</i>
2 β (ax)	1.44 <i>tdd</i> (13.5, 11.5, 4.0)	H-1 α , H-1 β , H-2 α , H-3	H-1 β , H-2 α , H-4 β , H-11 exo	77.6 <i>d</i>
3 (ax)	3.10 – 3.20 <i>m</i>	H-2 α , H-2 β , H-4 α , H-4 β	H-2 α , H-4 α , H-4 α	33.8 <i>t</i>
4 α (eq)	2.13 <i>br d</i> (12.4)	H-3, H-4 β , H-4 α	H-3, H-4 β , H-4 α , 3-OMe	67.9 <i>d</i>
4 β (ax)	1.21 <i>q</i> (12.4)	H-3, H-4 α , H-4 α	H-2 β , H-4 α , H-11 exo , H-12 exo	
4 α	2.93 <i>dd</i> (12.4, 5.2)	H-4 α , H-4 β	H-3, H-4 α , H-6 α	
6 α	4.38 <i>d</i> (16.8)	H-6 β , H-7	H-4 α , H-6 β , H-7	
6 β	3.71 <i>d</i> (16.8)	H-6 α , H-7	H-6 α , H-7, H-12 $endo$	62.7 <i>t</i>
6 α				130.1 <i>s</i>
7	6.10 <i>s</i>	H-6 α , H-6 β , 8-OMe	H-6 α , H-6 β , 8-OMe	101.0 <i>d</i>
8				150.2 <i>s</i>
9				133.9 <i>s</i>
10				146.8 <i>s</i>
10 α				126.0 <i>s</i>
10 β				43.2 <i>s</i>
11 $endo$	1.90 <i>ddd</i> (12.0, 8.8, 3.2)	H-11 exo , H-12 $endo$, H-12 exo	H-11 exo , H-12 $endo$	
11 exo	2.23 <i>ddd</i> (12.4, 10.4, 6.4)	H-11 $endo$, H-12 $endo$, H-12 exo	H-1 β , H-2 β , H-4 β , H-11 $endo$, H-12 exo	36.5 <i>t</i>
12 $endo$	2.78 <i>ddd</i> (12.8, 8.8, 6.4)	H-11 $endo$, H-11 exo , H-12 exo	H-6 β , H-11 $endo$, H-12 exo	52.2 <i>t</i>
12 exo	3.36 <i>ddd</i> (12.8, 10.0, 3.2)	H-11 $endo$, H-11 exo , H-12 $endo$	H-4 β , H-11 exo , H-12 $endo$	
3-OMe	3.38 <i>s</i> (3H)		H-2 α , H-4 α	55.6 <i>q</i>
8-OMe	3.80 <i>s</i> (3H)	H-7	H-7	55.7 <i>q</i>
9-OMe	3.87 <i>s</i> (3H)			61.0 <i>q</i>

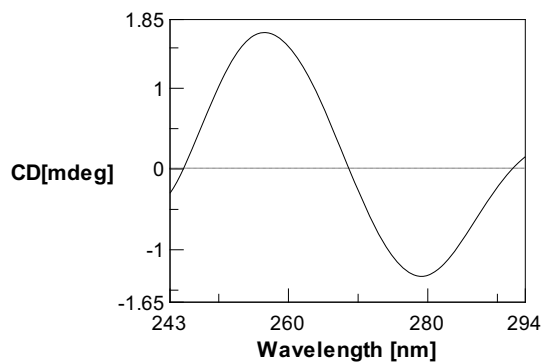
Estructura Química



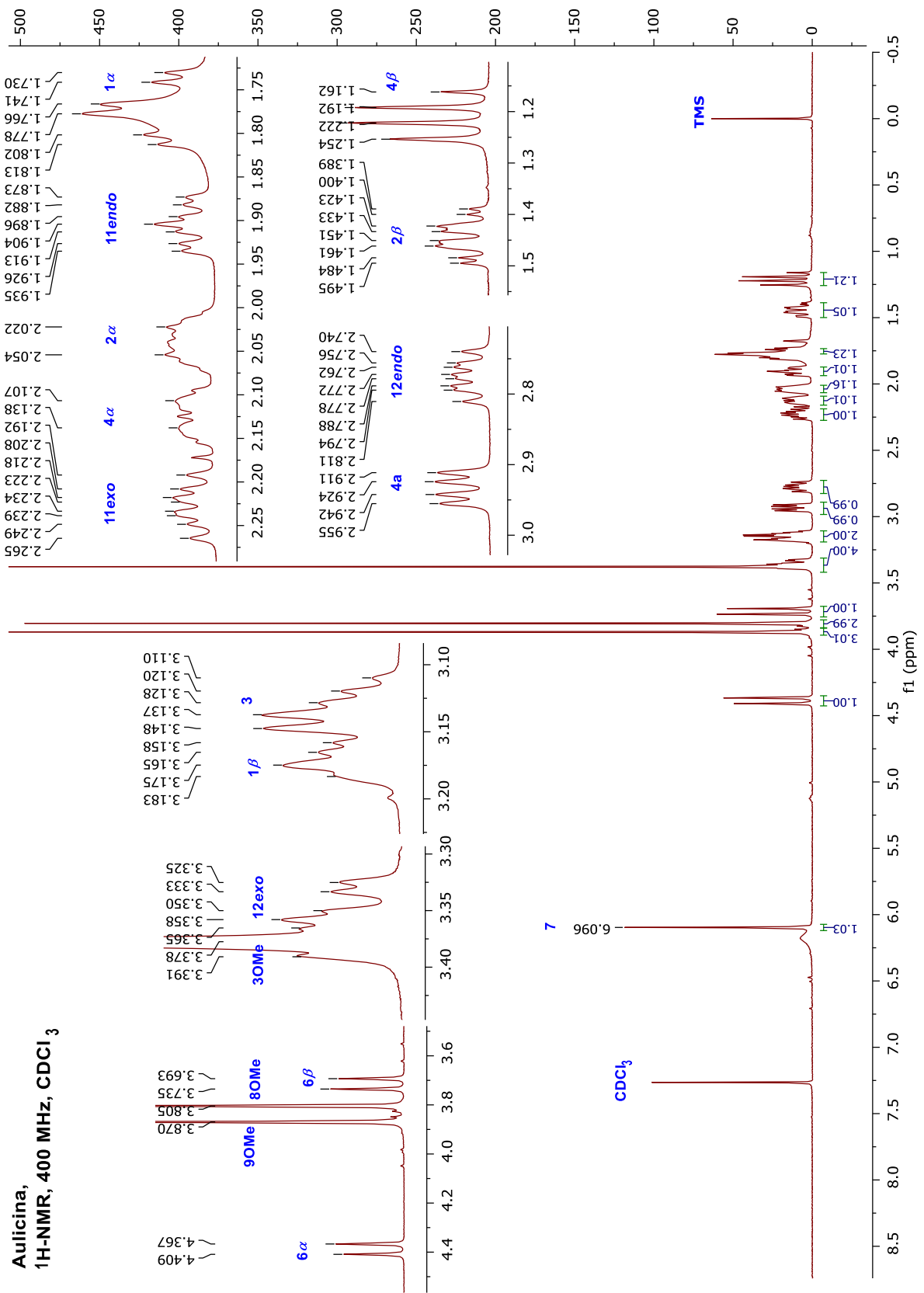
Espectro bajo condiciones de GC-MS

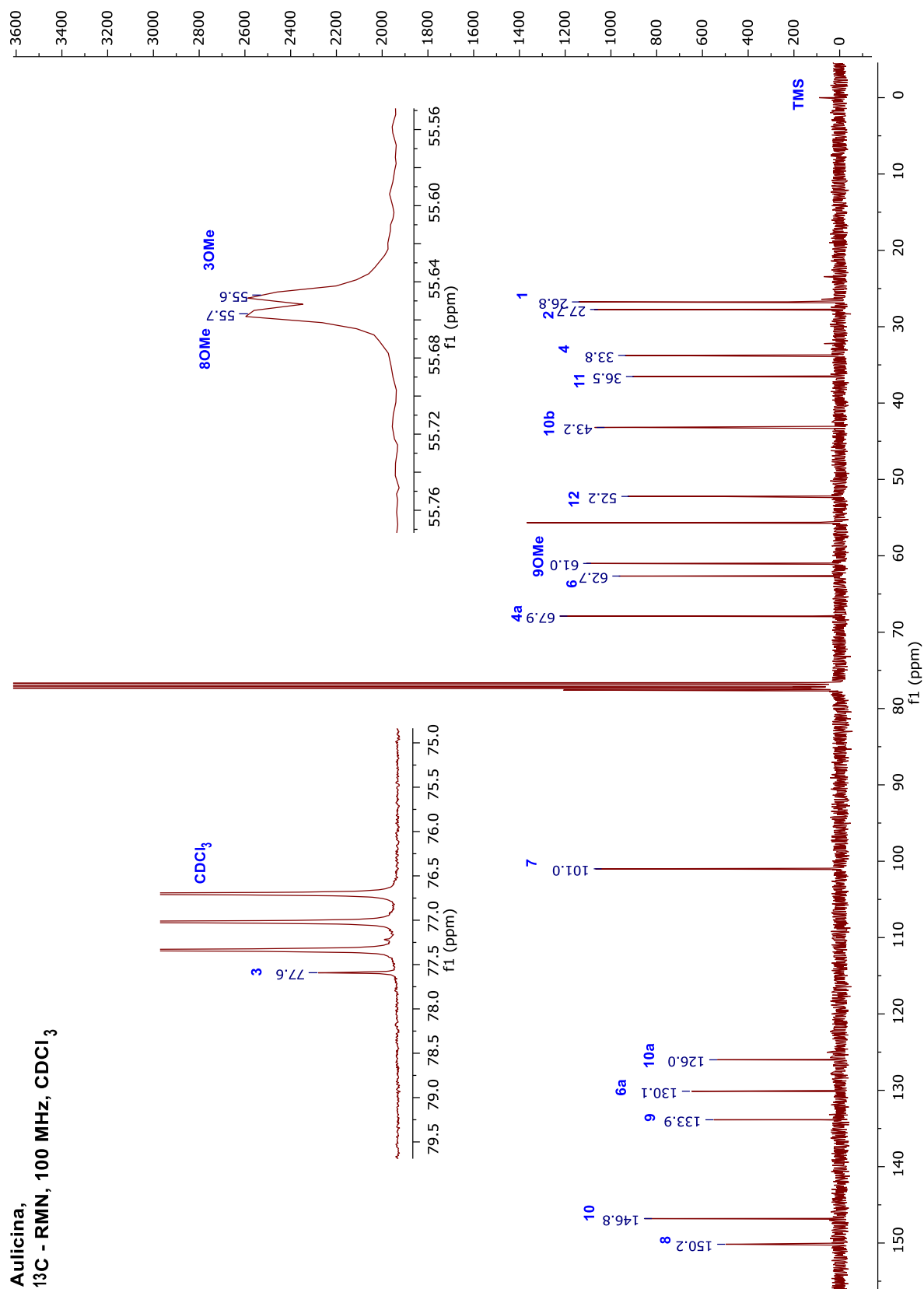


Espectro de CD

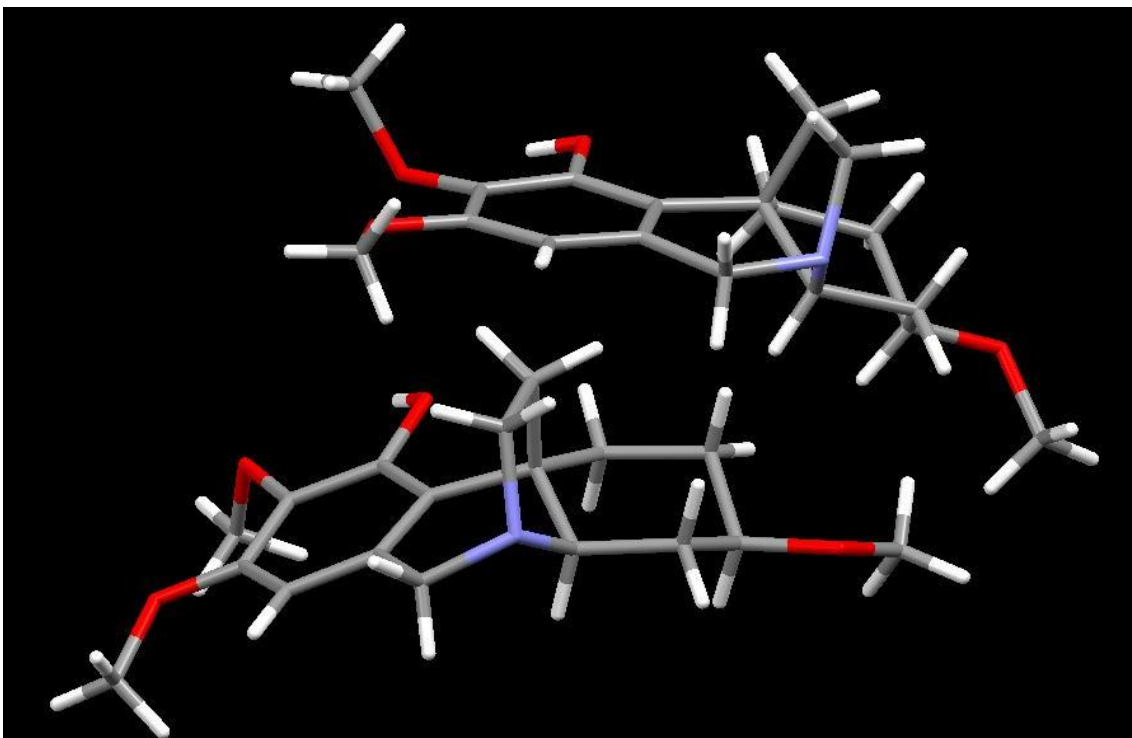
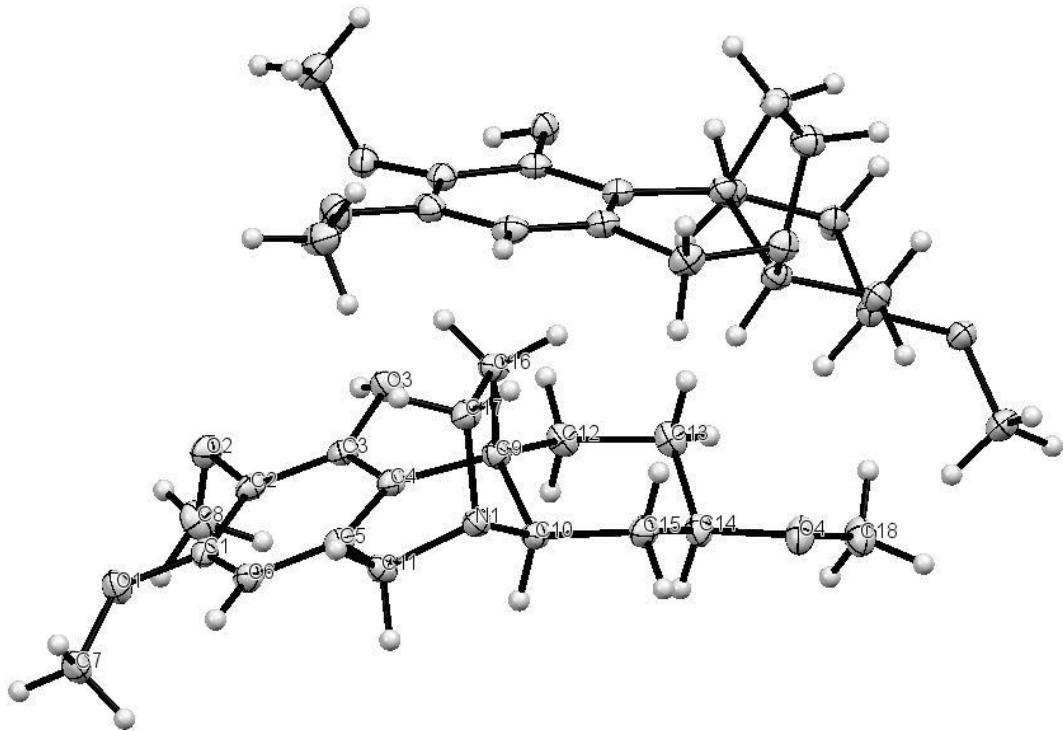


Aulicina,
¹H-NMR, 400 MHz, CDCl₃





Estructura en Rayos-X

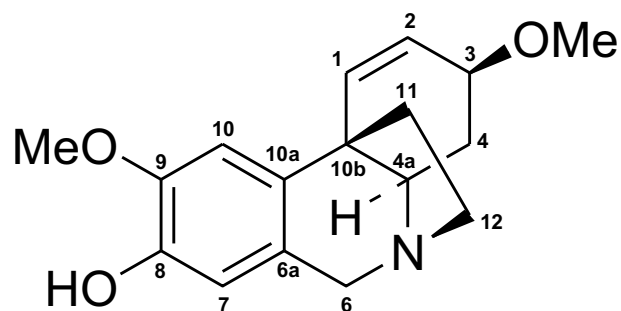


7.2.3. 3-O-Metil-epimacowina

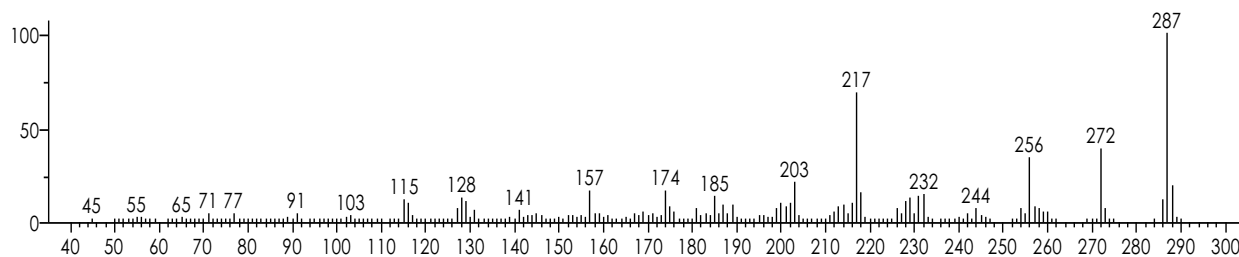
Tabla de RMN

Posición	δ_H (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMB
1	6.48 <i>dd</i> (10.0, 2.0)	H-2	H-2, H-10	129.1 <i>d</i>	C-3, C-
2	5.84 <i>dt</i> (10.0, 1.5)	H-1	H-1, H-3, 3-OMe	129.2 <i>d</i>	C-4, C-
3	4.00 <i>ddt</i> (10.5, 5.5, 2.0)	H-4 α , H-4 β	H-2, H-4 α , H-4a, 3-OMe	76.3 <i>d</i>	C-1, 3-
4 α	2.29 <i>m</i>	H-3, H-4 β , H-4a	H-3, H-4a, H-4 β	30.8 <i>t</i>	C-2, C-
4 β	1.58 <i>ddd</i> (13.5, 12.0, 10.5)	H-3, H-4 α , H-4a	H-4 α , H-11 exo , H-12 exo		C-3, C-
4a	3.28 <i>dd</i> (13.5, 4.0)	H-4 α , H-4 β	H-3, H-4 α , H-6 α	66.8 <i>d</i>	C-12
6 α	4.45 <i>d</i> (16.5)	H-6 β	H-4a, H-6 β , H-7		C-6a, C-
6 β	3.82 <i>d</i> (17.0)	H-6 α	H-6 α , H-7, H-12 $endo$	61.5 <i>t</i>	C-4a, C-12
6a				125.0 <i>s</i>	
7	6.59 <i>s</i>		H-6 α , H-6 β	113.0 <i>d</i>	C-6, C-
8				144.3 <i>s</i>	
9				145.3 <i>s</i>	
10	6.78 <i>s</i>		H-1, 9-OMe	104.9 <i>d</i>	C-6a, C-
10a				136.7 <i>s</i>	
10b				44.7 <i>s</i>	
11 $endo$	2.20 <i>ddd</i> (12.0, 9.0, 4.5)	H-11 exo , H-12 $endo$, H-12 exo	H-11 exo , H-12 $endo$	44.8 <i>t</i>	C-4a, C-
11 exo	2.12 <i>ddd</i> (12.0, 10.5, 6.0)	H-11 $endo$, H-12 $endo$, H-12 exo	H-4 β , H-11 $endo$, H-12 exo		C-1, C-
12 $endo$	2.95 <i>ddd</i> (13.0, 9.0, 6.0)	H-11 $endo$, H-11 exo , H-12 exo	H-6 β , H-11 $endo$, H-12 exo	53.2 <i>t</i>	C-4a, C-
12 exo	3.50 <i>ddd</i> (13.0, 10.5, 4.5)	H-11 $endo$, H-11 exo , H-12 $endo$	H-4 β , H-12 $endo$, H-11 exo		C-6
3-OMe	3.42 <i>s</i> (3H)		H-2, H-3	56.2 <i>q</i>	C-3
9-OMe	3.89 <i>s</i> (3H)		H-10	56.2 <i>q</i>	C-9

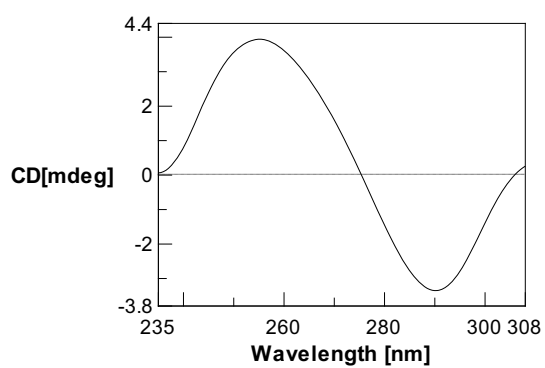
Estructura química

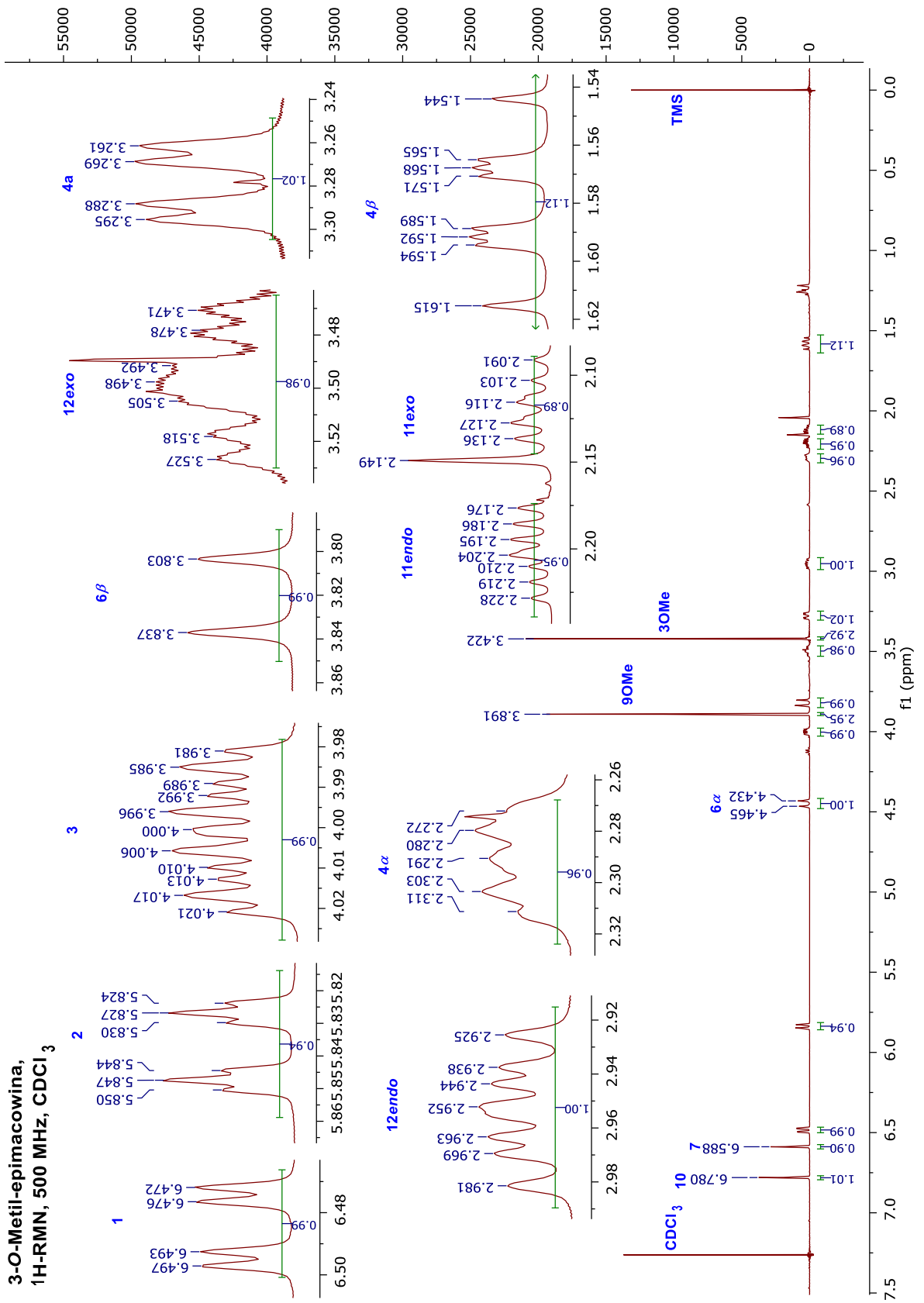


Espectro bajo condiciones de GC-MS

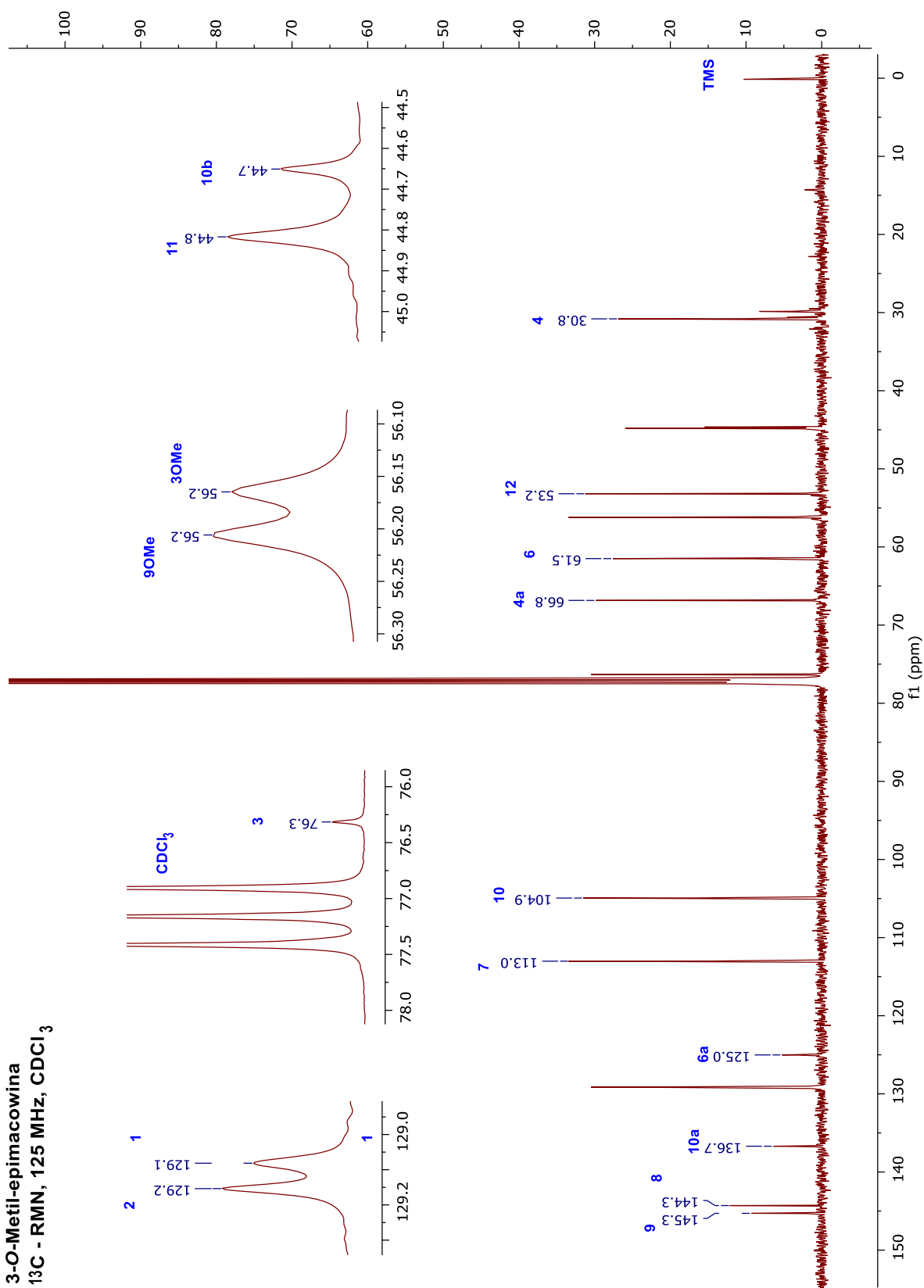


Espectro de CD





3-O-Metil-epimacowina
¹³C - RMN, 125 MHz, CDCl₃

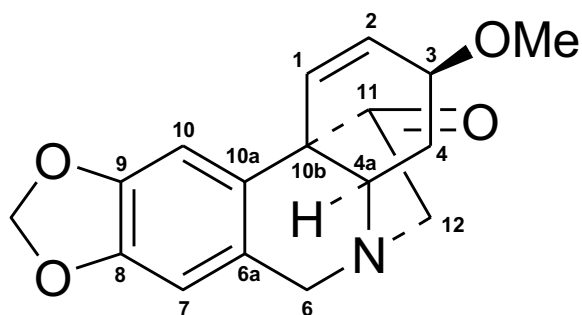


7.2.4. 11-Oxohemantamina

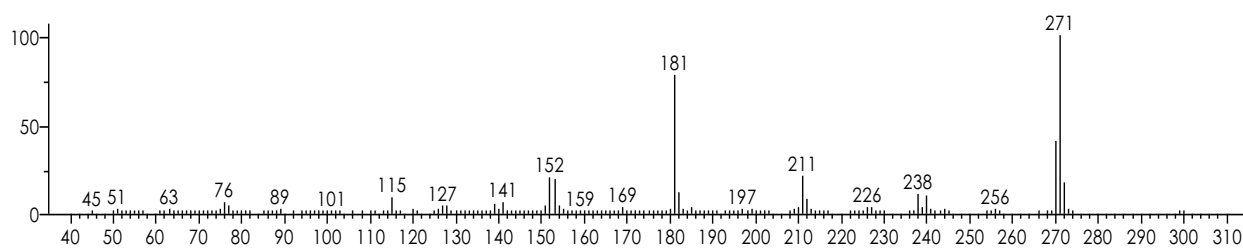
Tabla de RMN

Posición	δ_H (J in Hz)	COSY	HSQC
1	6.54 <i>d</i> (10.0)	H-2	126.8 <i>d</i>
2	6.21 <i>ddd</i> (10.0, 5.5, 1.5)	H-1, H-3	129.5 <i>d</i>
3	3.84 <i>ddd</i> (5.5, 3.5, 2.0)	H-2, H-4 α ; H-4 β	71.8 <i>d</i>
4 α	1.47 <i>td</i> (14.0, 4.0)	H-3; H-4 β , H-4a	29.8 <i>t</i>
4 β	2.25 <i>br d</i> (14.0)	H-3; H-4 α , H-4a	
4a	3.55 <i>m</i>	H-4 α ; H-4 β	61.5 <i>d</i>
6 α	3.83 <i>d</i> (17.0)	H-6 β , H-7	60.6 <i>t</i>
6 β	4.58 <i>d</i> (17.0)	H-6 α , H-7	
7	6.52 <i>s</i>	H-6 α , H-6 β	106.9 <i>d</i>
10	6.83 <i>s</i>		104.2 <i>d</i>
12 $endo$	3.27 <i>dd</i> (18.5, 1.5)	H-12 exo	59.3 <i>t</i>
12 exo	3.56 <i>d</i> (18.5)	H-12 $endo$	
3-OMe	3.37 <i>s</i> (3H)		56.8 <i>q</i>
OCH ₂ O	5.92 <i>2d</i> (1.5)		101.3 <i>t</i>

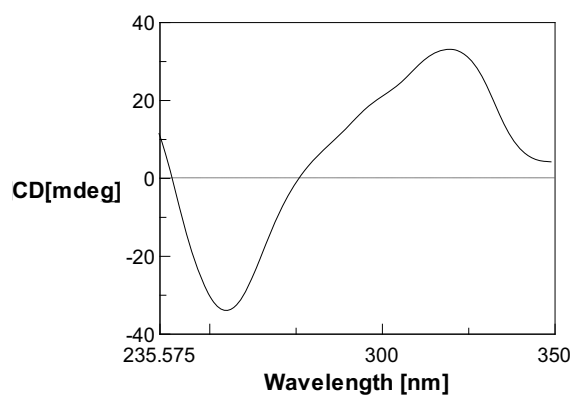
Estructura química

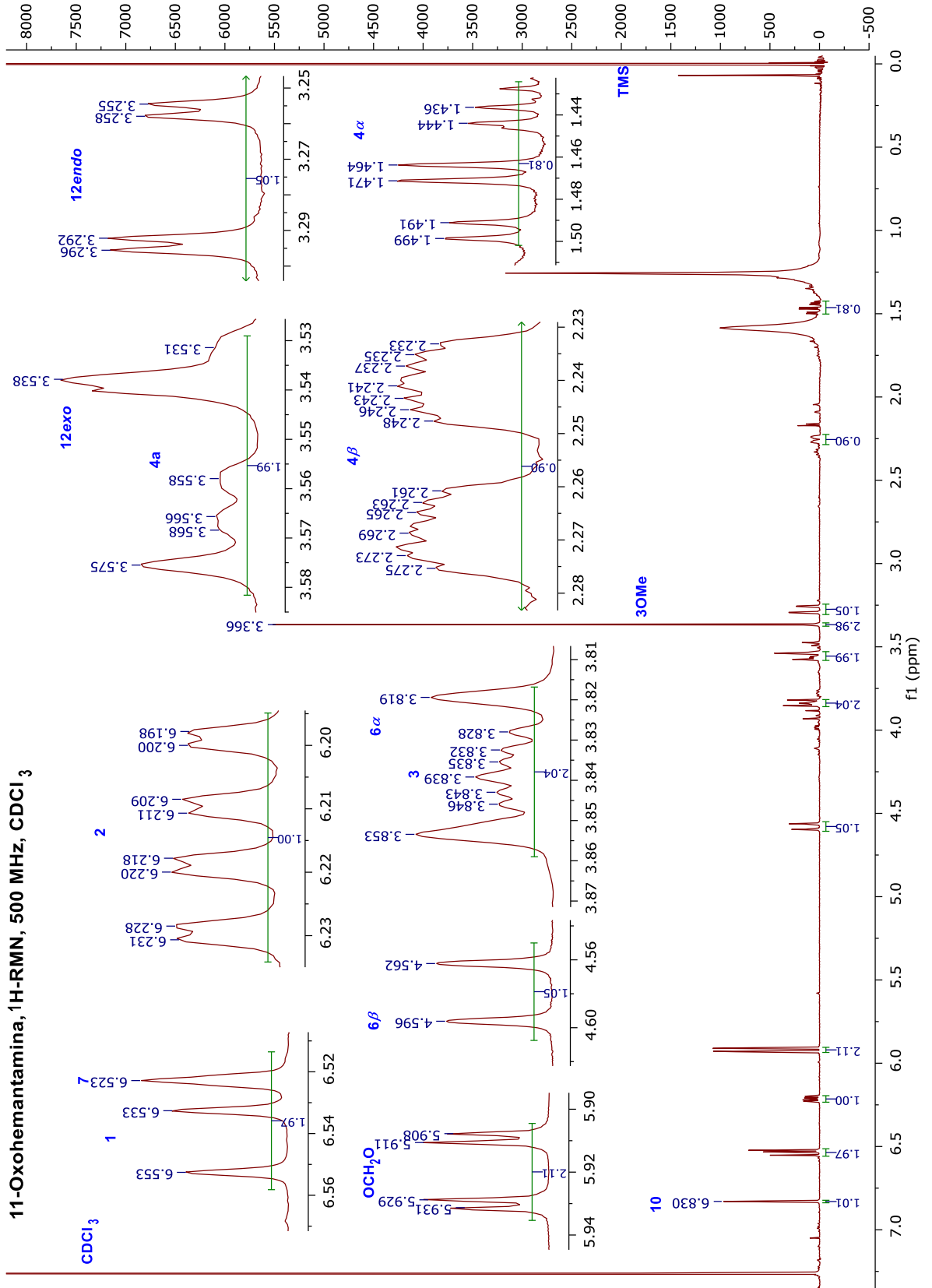


Espectro bajo condiciones de GC-MS



Espectro de CD



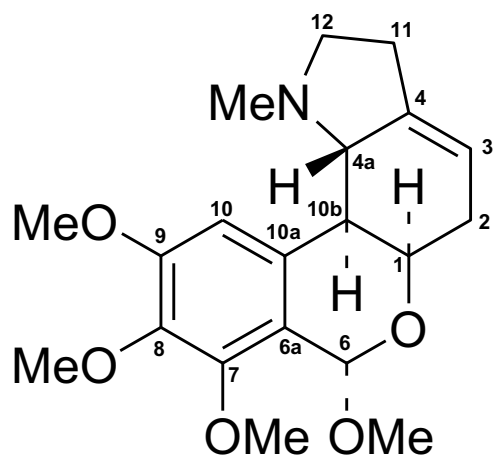


7.2.5. 7-Metoxi-*O*-metillicorenina

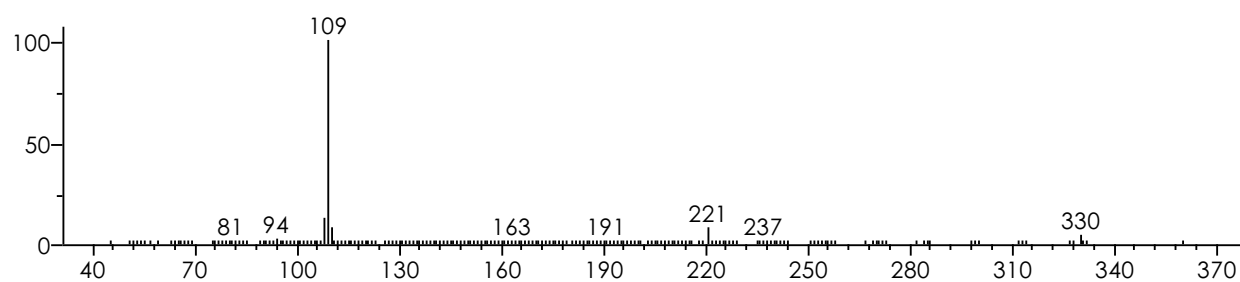
Tabla de RMN

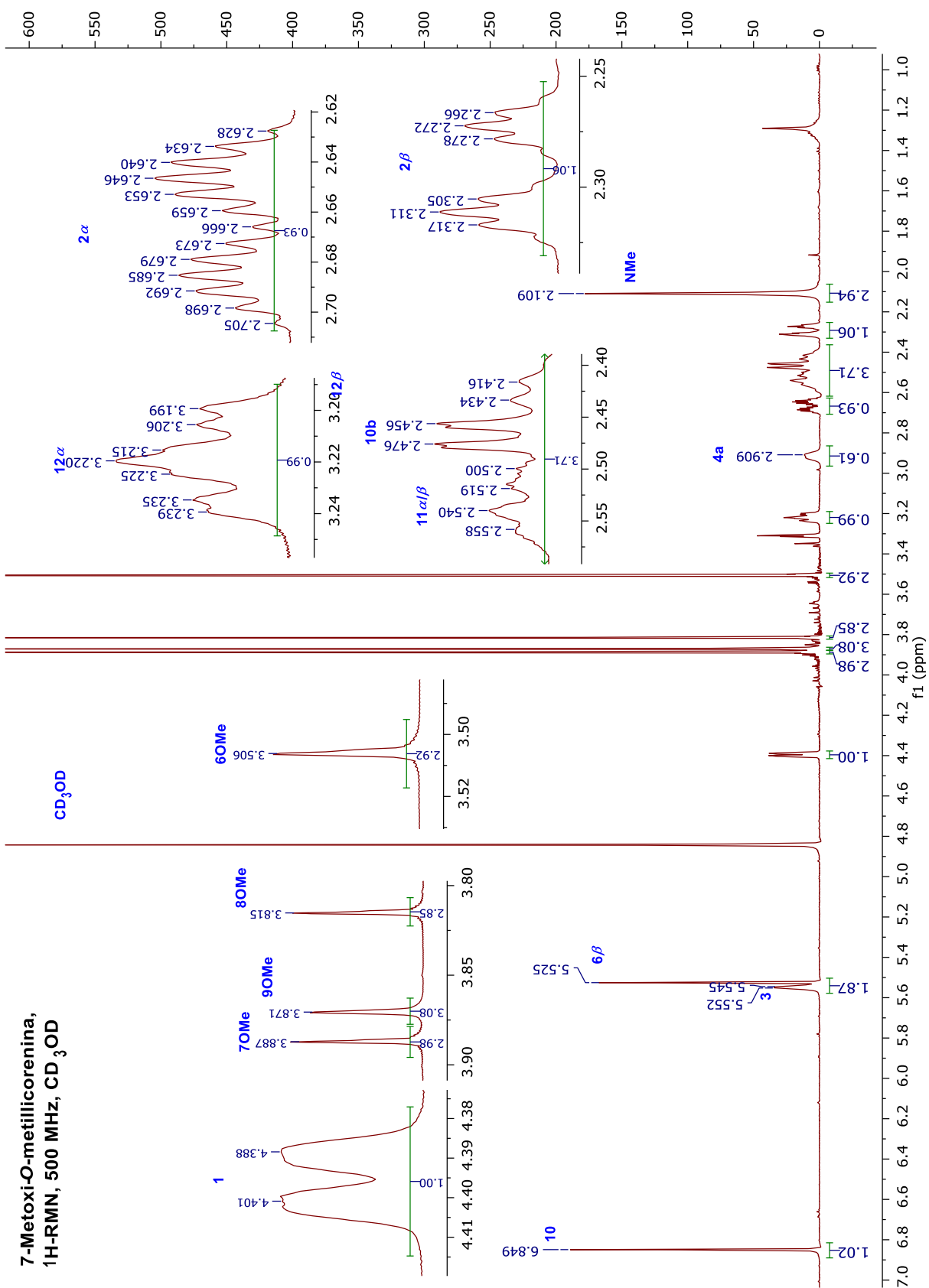
Posición	δ_H (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	H
1	4,40 <i>br d</i> (6.5)	H-2 α , H-2 β , H-3, H-10b	H-2 α , H-2 β , H-10b, 6-OMe	67.0 <i>d</i>	C
2 α	2,67 <i>ddt</i> (19.0, 6.5, 3.0)	H-1, H-2 β , H-3, H-4a	H-1, H-2 β , H-3	32.5 <i>t</i>	
2 β	2,29 <i>dt</i> (19.5, 3.0)	H-1, H-2 α , H-3, H-4a	H-1, H-2 α , H-3		
3	5,55 <i>br s</i>	H-1, H-2 α , H-2 β , H-4a, H-11 α/β	H-2 α , H-2 β , H-11 α/β	118.1 <i>d</i>	
4				140.2 <i>s</i>	
4a	2,92 <i>br d</i> (10.0)	H-2 α , H-2 β , H-3, H-10b	NMe	69.2 <i>d</i>	
6 β	5,52 <i>s</i>		6-OMe	97.8 <i>d</i>	C
6a				121.7 <i>s</i>	
7				153.2 <i>s</i>	
8				142.9 <i>s</i>	
9				154.7 <i>s</i>	
10	6.85 <i>s</i>	9-OMe	H-10b, 9-OMe, NMe	110.0 <i>d</i>	C
10a				134.1 <i>s</i>	
10b	2.47 <i>dd</i> (10.0, 2.0)	H-1, H-4a	H-1, H-10, H-12 α	44.1 <i>d</i>	C
11 α/β	2.49-2.58 <i>m</i>	H-3, H-12 α , H-12 β	H-3, H-12 α	28.6 <i>t</i>	
12 α	3.22 <i>ddd</i> (10.5, 7.5, 3.0)	H-11 α/β , H-12 β	H-10b, H-11 α/β , H-12 β , NMe	57.7 <i>t</i>	
12 β	2.42 <i>m</i>	H-11 α/β , H-12 α	H-12 α , NMe		
6-OMe	3.51 <i>s</i> (3H)		H-1, H-6 β	55.6 <i>q</i>	C
7-OMe	3.89 <i>s</i> (3H)			61.5 <i>q</i>	C
8-OMe	3.82 <i>s</i> (3H)			61.2 <i>q</i>	C
9-OMe	3.87 <i>s</i> (3H)	H-10	H-10	56.6 <i>q</i>	C
NMe	2.11 <i>s</i> (3H)		H-4a, H-10, H-12 α , H-12 β	44.0 <i>q</i>	C

Estructura química

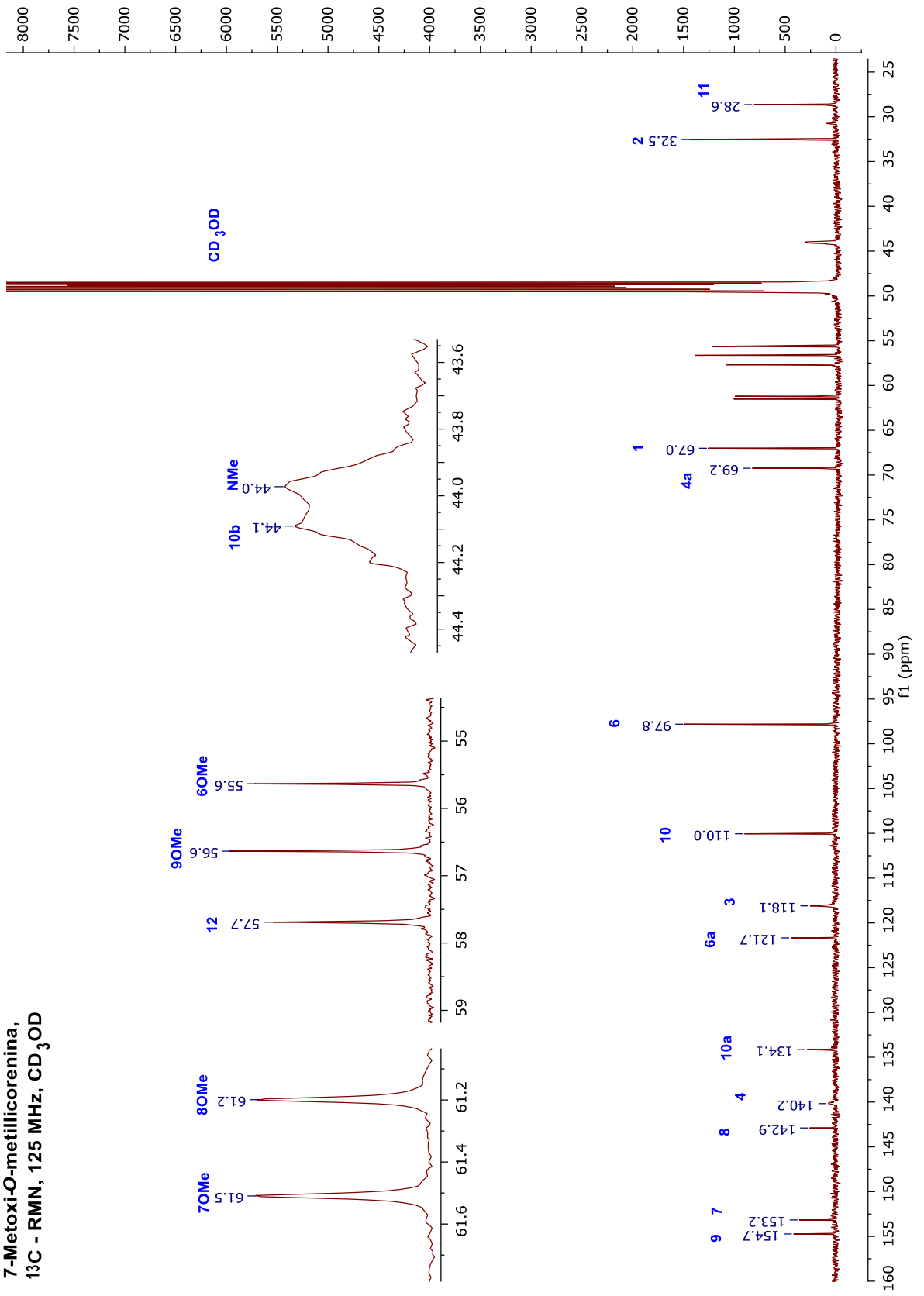


Espectro bajo condiciones de GC-MS





**7-Metoxi-O-metillicorenina,
¹³C - RMN, 125 MHz, CD₃OD**

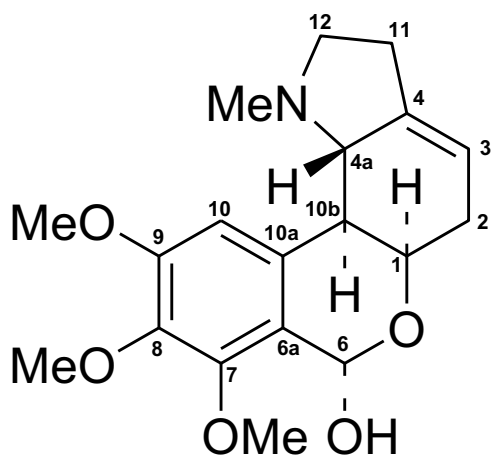


7.2.6. Nerinina

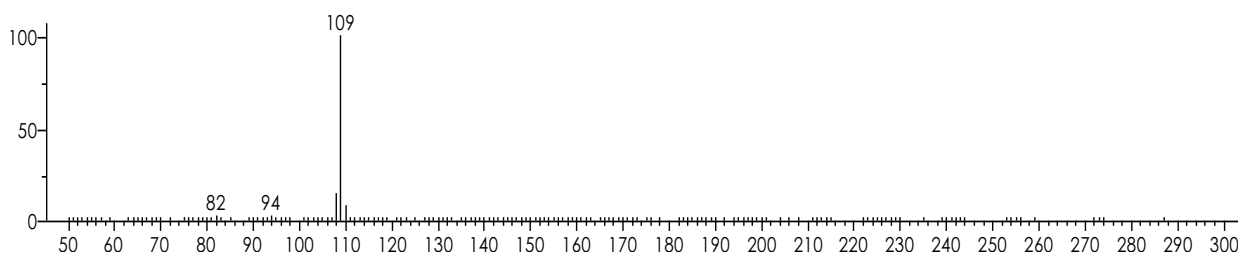
Tabla de RMN

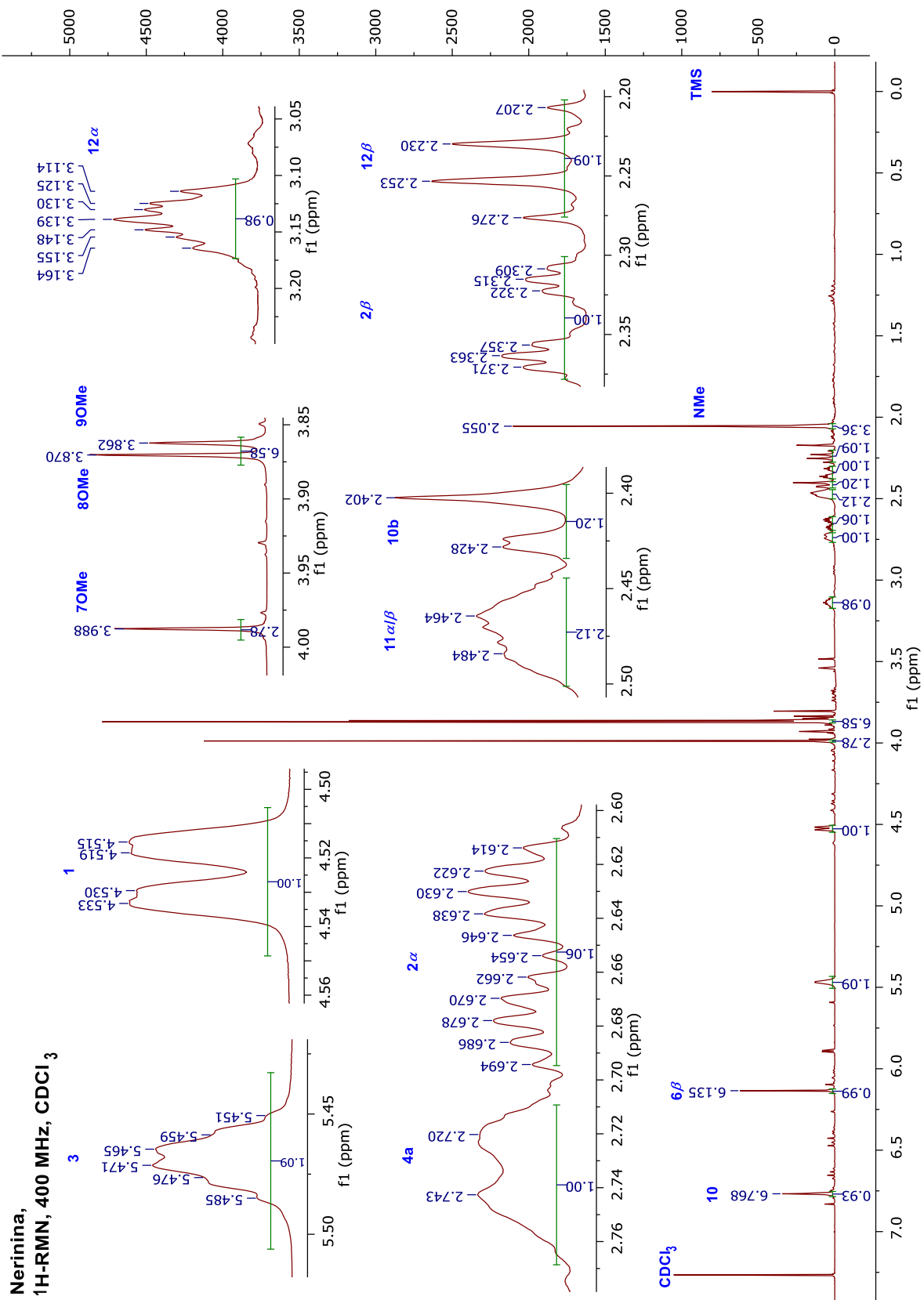
Posición	δ_H (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HM
1	4.52 <i>ddd</i> (5.6, 2.0, 1.0)	H-2 α , H-2 β , H-10b	H-2 α , H-2 β , H-10b	66.3 <i>d</i>	C-3
2 α	2.65 <i>ddt</i> (19.2, 6.0, 2.8)	H-1, H-2 β , H-3	H-1, H-2 β , H-3	31.9 <i>t</i>	
2 β	2.34 <i>dt</i> (19.2, 2.5)	H-1, H-2 α , H-3	H-1, H-2 α , H-3		
3	5.47 <i>br m</i>	H-2 α , H-2 β , H-4a, H-11 α/β	H-2 α , H-2 β , H-11 α/β	115.8 <i>d</i>	
4				141.1 <i>s</i>	
4a	2.73 <i>d</i> (9.6)	H-3, H-10b	H-6 β , H-12 β , NMe	67.5 <i>d</i>	
6 β	6.14 <i>s</i>		H-4a, 7-OMe	89.8 <i>d</i>	C-1
6a				121.2 <i>s</i>	
7				151.3 <i>s</i>	
8				141.2 <i>s</i>	
9				153.1 <i>s</i>	
10	6.77 <i>s</i>		H-10b, 9-OMe, NMe	109.1 <i>d</i>	C-6
10a				133.6 <i>s</i>	
10b	2.41 <i>dd</i> (9.6, 1.5)	H-1, H-4a	H-1, H-10	44.5 <i>d</i>	C-4
11 α/β	2.44-2.51 <i>br m</i>	H-3, H-12 α , H-12 β	H-3, H-12 α , H-12 β	28.4 <i>t</i>	
12 α	3.14 <i>m</i>	H-11 α/β , H-12 β	H-11 α/β , H-12 β , NMe	57.1 <i>t</i>	C-4
12 β	2.24 <i>q</i> (9.2)	H-11 α/β , H-12 α	H-4a, H-11 α/β , H-12 α , NMe		NM
7-OMe	3.99 <i>s</i> (3H)		H-6 β	61.4 <i>q</i>	C-7
8-OMe	3.87 <i>s</i> (3H)			61.0 <i>q</i>	C-8
9-OMe	3.86 <i>s</i> (3H)		H-10, NMe	56.3 <i>q</i>	C-9
NMe	2.06 <i>s</i> (3H)		H-4a, H-10, H-12 α , H-12 β , 9-OMe	44.6 <i>q</i>	C-4

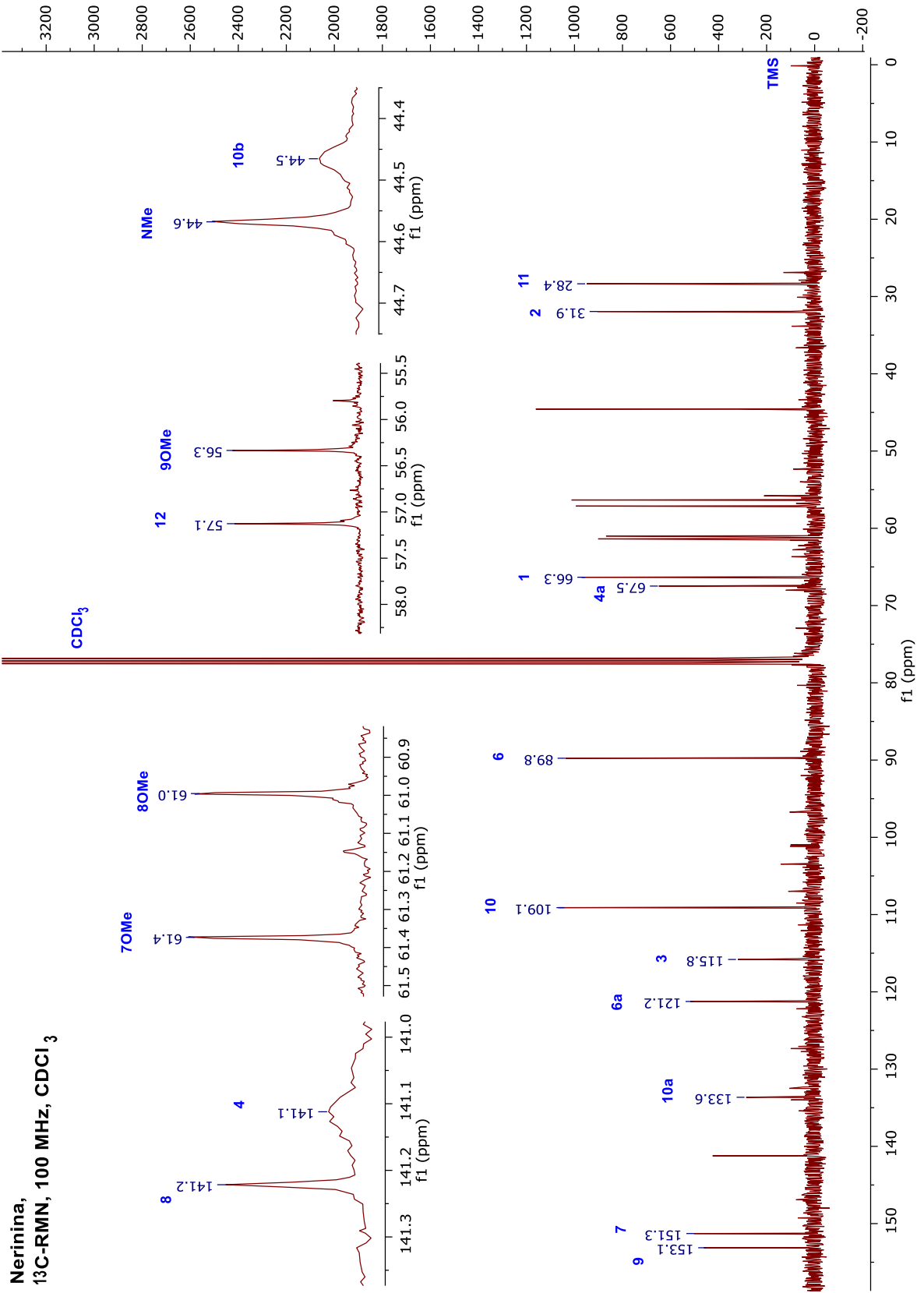
Estructura química



Espectro bajo condiciones de GC-MS





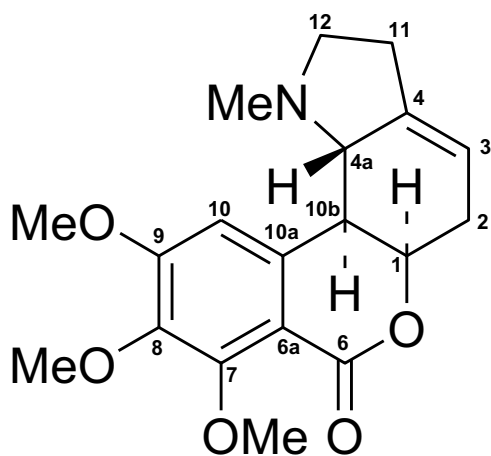


7.2.7. Albomaculina

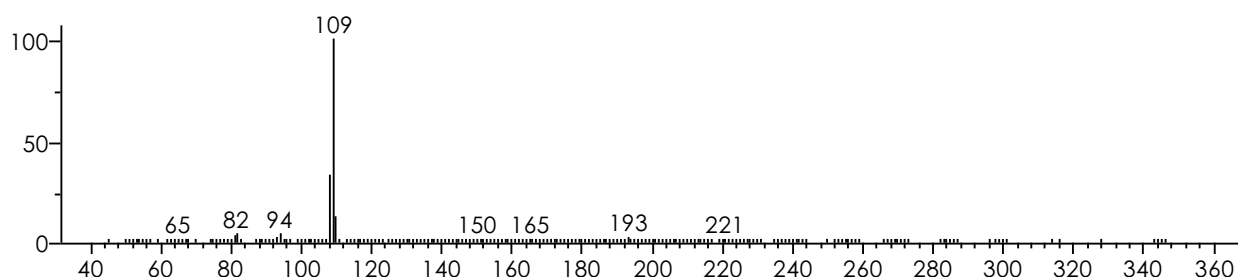
Tabla de RMN

Position	δ_H (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
1	4.68 <i>br m</i>	H-2 α/β , H-3, H-10b	H-2 α/β , H-10b	76.3 <i>d</i>	C-1
2 α/β	2.55-2.60 <i>br m</i>	H-1, H-3, H-11 α/β	H-1, H-3	31.0 <i>t</i>	C-2
3	5.48 <i>br m</i>	H-1, H-2 α/β , H-4a, H-11 α/β	H-2 α/β , H-11 α/β	115.6 <i>d</i>	C-3
4				140.6 <i>s</i>	
4a	2.72 <i>d</i> (10.0)	H-3, H-10b	NMe	66.0 <i>d</i>	
6				162.4 <i>s</i>	
6a				111.6 <i>s</i>	
7				156.3 <i>s</i>	
8				142.7 <i>s</i>	
9				157.2 <i>s</i>	
10	6.78 <i>s</i>		H-10b, 9-OMe, NMe	107.4 <i>d</i>	C-10
10a				140.8 <i>s</i>	
10b	2.63 <i>d</i> (10.0)	H-1, H-4a	H-1, H-10	45.5 <i>d</i>	
11 α/β	2.45-2.53 <i>br m</i>	H-2 α/β , H-3, H-12 α , H-12 β	H-3, H-12 α , H-12 β	28.1 <i>t</i>	C-11
12 α	3.13 <i>ddd</i> (9.6, 7.2, 3.6)	H-11 α/β , H-12 β	H-11 α/β , H-12 β , NMe		
12 β	2.23 <i>q</i> (9.6)	H-11 α/β , H-12 α	H-11 α/β , H-12 α	56.6 <i>t</i>	C-12
7-OMe	3.99 <i>s</i> (3H)			62.1 <i>t</i>	C-7
8-OMe	3.89 <i>s</i> (3H)			61.3 <i>t</i>	C-8
9-OMe	3.91 <i>s</i> (3H)		H-10, NMe	56.5 <i>t</i>	C-9
NMe	2.05 <i>s</i> (3H)		H-4a, H-10, H-12 α , 9-OMe	43.7 <i>t</i>	

Estructura química



Espectro bajo condiciones de GC-MS



**Albomaculina,
1H-RMN, 400 MHz, CDCl₃**

