



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas-Programa de Doctorado en
Ciencias Biológicas área Botánica

Quimiotaxonomía de Amaryllidaceae chilenas: Alcaloides como marcadores taxonómicos

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas área
Botánica

ISABEL DEL ROSARIO LIZAMA BIZAMA
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

Profesor Guía: José Becerra Allende
Profesor Co-guía: Claudia Pérez Manríquez
Dpto. de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción



Esta Tesis ha sido desarrollada en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía

Dr. José Becerra Allende

Profesores Evaluadores

Dr. Carlos Marcelo Baeza Perry

Dra. Claudia Isabel Pérez Manríquez

Dr. Eugenio Uriarte Villares

Director del Programa de Doctorado

Dr. Pablo César Guerrero Martin

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor de Tesis doctoral, Dr. José Becerra, por permitirme desarrollar este trabajo bajo su supervisión en el Laboratorio de Química de Productos Naturales, por su buena disposición y por todas sus enseñanzas entregadas.

A la Dra. Claudia Pérez, del Laboratorio de Química de Productos Naturales, por su permanente apoyo y por sus numerosos consejos durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Mario Silva, también del Laboratorio de Química de Productos Naturales, por su ayuda en la comprensión del aspecto químico de esta investigación.

Al Dr. Carlos Marcelo Baeza del Departamento de Botánica, por su constante ayuda en el aspecto taxonómico de esta tesis.

Al Dr. Eugenio Uriarte, de la Universidad de Santiago de Compostela, España, por permitirme desarrollar una pasantía doctoral en su laboratorio de Química Orgánica, de la Facultad de Farmacia, y apoyarme constantemente en el análisis de mis resultados y en el desarrollo de mi investigación.

A todos los profesores del Departamento de Botánica, de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, de la Universidad de Concepción, que me apoyaron y me entregaron otros puntos de vista valiosos para enriquecer esta investigación.

A todas y todos mis compañeros del Laboratorio de Química de Productos Naturales con quienes compartí diversas etapas de mi doctorado y de quienes guardo muy buenos recuerdos.

A mi Familia, por su constante e invaluable apoyo durante toda esta etapa.

A Fernando Figueroa, por acompañarme y apoyarme permanentemente.

Al proyecto MECESUP UCO0708, por beneficiarme con una beca para una pasantía doctoral en España.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, CONICYT, por otorgarme tres becas para el desarrollo de mi postgrado: una Beca de Doctorado Nacional, una Beca de término de tesis y una Beca para asistencia a congresos.

A la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción, por todas las facilidades entregadas.

A la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción, por su apoyo en el desarrollo de esta investigación.

Les agradezco enormemente a todas las personas e instituciones que hicieron posible la concreción de esta tesis doctoral.

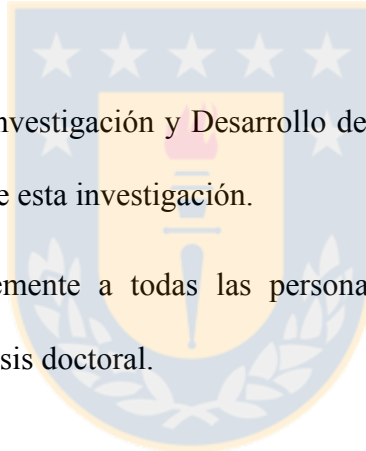


TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | IX |
| LISTA DE TABLAS..... | XI |
| RESUMEN | XII |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA FAMILIA AMARYLLIDACEAE..... | 1 |
| ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE..... | 4 |
| IMPORTANCIA BIOMÉDICA DE AMARYLLIDOIDEAE | 7 |
| IMPORTANCIA ECONÓMICA ORNAMENTAL DE AMARYLLIDOIDEAE..... | 9 |
| AMARYLLIDOIDEAE EN CHILE..... | 11 |
| QUIMIOTAXONOMÍA | 14 |
| HIPÓTESIS..... | 21 |
| OBJETIVOS | 22 |
| PUBLICACIONES..... | 23 |
| CAPÍTULO I: ALCALOIDES DEL GÉNERO <i>RHODOPHIALA</i> | 24 |
| ALKALOIDS FROM CHILEAN SPECIES OF THE GENUS <i>RHODOPHIALA</i> C. PRESL (AMARYLLIDACEAE) AND THEIR CHEMOTAXONOMIC IMPORTANCE..... | 26 |
| <i>ABSTRACT</i> | 26 |
| <i>RESUMEN</i> | 27 |

| | |
|--|-----------|
| <i>INTRODUCTION</i> | 28 |
| <i>MATERIAL AND METHODS</i> | 30 |
| <i>RESULTS</i> | 31 |
| <i>DISCUSSION</i> | 41 |
| <i>ACKNOWLEDGMENTS</i> | 42 |
| <i>REFERENCES</i> | 42 |
| CAPÍTULO II: ALCALOIDES DEL GÉNERO <i>PHYCELLA</i> | 45 |
| ALCALOIDES FROM CHILEAN SPECIES OF THE GENUS <i>PHYCELLA</i> LINDL. (AMARYLLIDACEAE) | |
| | 47 |
| <i>GRAPHICAL ABSTRACT</i> | 48 |
| 1. <i>INTRODUCTION</i> | 49 |
| 2. <i>RESULTS AND DISCUSSION</i> | 50 |
| 3. <i>CONCLUSIONS</i> | 52 |
| <i>DISCLOSURE STATEMENT</i> | 52 |
| <i>FUNDING</i> | 53 |
| <i>References</i> | 53 |
| <i>SUPPLEMENTARY MATERIAL</i> | 57 |
| EXPERIMENTAL | 58 |
| TABLES | 61 |
| CAPÍTULO III: ALCALOIDES DEL GÉNERO <i>RHODOLIRIUM</i> | 67 |
| ALCALOIDES DE ESPECIES CHILENAS DEL GÉNERO <i>RHODOLIRIUM</i> PHIL. | |
| (AMARYLLIDACEAE) | 69 |
| <i>RESUMEN</i> | 69 |

| | |
|---|-----------|
| <i>INTRODUCCIÓN</i> | 70 |
| <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> | 72 |
| <i>RESULTADOS</i> | 74 |
| <i>DISCUSIÓN</i> | 81 |
| <i>BIBLIOGRAFÍA</i> | 83 |
| DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES | 86 |
| BIBLIOGRAFÍA GENERAL | 91 |



LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| FIGURA 1. VÍAS DE BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES DE AMARILIDÁCEAS (EXTRAÍDO DE DEWICK 2002)..... | 5 |
| FIGURA 2. TIPOS DE ESQUELETOS DE ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE DERIVADOS DE LOS DIFERENTES ACOPLAMIENTOS OXIDATIVOS (EXTRAÍDO DE BASTIDA <i>ET AL.</i> 2011)..... | 6 |
| FIGURA 3. ALCALOIDES REPRESENTATIVOS DE LOS TIPOS DE ESQUELETOS (EXTRAÍDO DE BASTIDA <i>ET AL.</i> 2011)..... | 7 |
| FIGURA 4. PLANTAS DE <i>GALANTHUS</i> (IZQUIERDA) Y <i>NARCISSUS</i> (DERECHA), GÉNEROS ORNAMENTALES POPULARES EN JARDINES (EXTRAÍDO DE TAKOS Y ROOK 2013)..... | 10 |
| CAPÍTULO I: ALCALOIDES DEL GÉNERO <i>RHODOPHIALA</i> | 24 |
| FIGURE 1. (A) <i>R. BAGNOLDII</i> IN ITS NATURAL HABITAT. (B) FLOWERS OF <i>R. PRATENSIS</i> . (C) <i>R. VOLCKMANNII</i> IN ITS NATURAL HABITAT (A AND C: PHOTOS BY C. M. BAEZA. B: PHOTO BY I. LIZAMA-BIZAMA)..... | 37 |
| FIGURE 2. REPRESENTATIVE CHROMATOGRAM OF EXTRACT FOR <i>R. BAGNOLDII</i> | 38 |
| FIGURE 3. TYPES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOIDS IDENTIFIED IN THE EXTRACTS: LYCORINE, CRININE, GALANTHAMINE, HOMOLYCORINE, TAZETTINE AND MONTANINE..... | 39 |
| CAPÍTULO II: ALCALOIDES DEL GÉNERO <i>PHYCELLA</i> | 45 |
| FIGURE 1. ALKALOID TYPES IDENTIFIED IN THE EXTRACTS: GALANTHAMINE, CRININE, LYCORINE, HOMOLYCORINE AND HAEMANTHAMINE..... | 56 |

CAPÍTULO III: ALCALOIDES DEL GÉNERO *RHODOLIRIUM* 67

FIGURA 1. *RHODOLIRIUM LAETUM* EN SU HÁBITAT NATURAL, REGIÓN DE ANTOFAGASTA, CHILE 75

FIGURA 2. *RHODOLIRIUM MONTANUM* PHIL. [= *RHODOPHIALA RHODOLIRION* (BAKER) TRAUB] EN SU AMBIENTE NATURAL (FOTOGRAFÍAS EXTRAÍDAS DE ARROYO-LEUENBERGER Y DUTILH 2008)..... 76

FIGURA 3. INFLORESCENCIAS DE *RHODOLIRIUM SPECIOSUM*: VISTA FRONTAL (IZQUIERDA), VISTA VENTRAL (CENTRO) Y VISTA LATERAL (DERECHA) 76

FIGURA 4. TIPOS DE ALCALOIDES IDENTIFICADOS EN LOS EXTRACTOS: CRININA, GALANTAMINA, HOMOLICORINA, LICORINA Y TAZETINA 77



LISTA DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| TABLA 1. GÉNEROS DE AMARYLLIDOIDEAE PRESENTES EN CHILE SEGÚN RAVENNA (2003) | 12 |
| TABLA 2. GÉNEROS DE AMARYLLIDOIDEAE PRESENTES EN CHILE SEGÚN ARROYO- LEUENBERGER Y DUTILH (2008A)..... | 12 |
| TABLA 3. DISTRIBUCIÓN POR FAMILIA DE LOS PRINCIPALES ALCALOIDES DE PLANTAS VASCULARES (EXTRAÍDO DE ALSTON Y TURNER 1963)..... | 16 |
| CAPÍTULO I: ALCALOIDES DEL GÉNERO <i>RHODOPHALA</i> | 24 |
| TABLE 1. ALKALOIDS IN SPECIES OF THE GENUS <i>RHODOPHALA</i> | 33 |
| TABLE 2. PRESENCE OF DIFFERENT TYPES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOIDS IN THE STUDIED SPECIES | 40 |
| CAPÍTULO II: ALCALOIDES DEL GÉNERO <i>PHYCELLA</i> | 45 |
| TABLE S1. ALKALOIDS IN SPECIES OF THE GENUS <i>PHYCELLA</i> | 61 |
| TABLE S2. TYPES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOIDS IDENTIFIED IN <i>PHYCELLA</i> SPECIES STUDIED..... | 66 |
| CAPÍTULO III: ALCALOIDES DEL GÉNERO <i>RHODOLIRIUM</i> | 67 |
| TABLA 1. ALCALOIDES EN ESPECIES DEL GÉNERO <i>RHODOLIRIUM</i> | 78 |
| TABLA 2. TIPOS DE ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE IDENTIFICADOS EN LAS TRES ESPECIES DE <i>RHODOLIRIUM</i> ESTUDIADAS | 81 |

RESUMEN

La familia Amaryllidaceae J. St.-Hil. es un grupo de monocotiledóneas distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales del Hemisferio Sur. Esta familia incluye a muchas plantas ornamentales y especies que han sido utilizadas en medicina popular.

Dentro de la familia Amaryllidaceae, las plantas de la subfamilia Amaryllidoideae se caracterizan por sintetizar un gran número de alcaloides estructuralmente diversos que presentan actividad antitumoral, antiviral, antimalárica, inhibidora de la acetilcolinesterasa, e inmunoestimulante.

En Chile, se describen entre 9 a 11 géneros de Amaryllidoideae, que comprenden 35 a 45 especies nativas e introducidas, distribuidas principalmente en la zona central del país.

La delimitación morfológica de los géneros de esta subfamilia es bastante difícil, ya que los caracteres utilizados son variables. Esto genera un problema taxonómico dentro de esta subfamilia.

Hasta el momento en Chile no se han utilizado los alcaloides como herramienta quimiotaxonómica. La presencia de estos alcaloides en todos los representantes de la subfamilia Amaryllidoideae, la amplia variación estructural y la relación biosintética entre todos ellos, hacen que estos compuestos puedan ser un buen carácter químico taxonómico.

De las Amarilidáceas chilenas sólo se han estudiado los alcaloides de dos especies. En éstas se identificaron los alcaloides licorina, 17-epihomolicorina, homolicorina, 11-hidroxi-1,2-dihidromaritidina, maratidina, hippeastidina y hemantamina.

Dado el escaso conocimiento sobre los alcaloides presentes en las especies de Amaryllidoideae que se encuentran en Chile y el problema taxonómico dentro de esta subfamilia, el objetivo general de esta investigación consistió en comparar géneros y especies de Amaryllidoideae chilenas utilizando los alcaloides como herramienta quimiotaxonómica.

Para cumplir con el objetivo planteado se llevaron a cabo extracciones de alcaloides presentes en bulbos de especies de los géneros *Phycella*, *Rhodolirium* y *Rhodophiala*. Se estudiaron tres especies de cada uno de estos géneros: *Phycella* aff. *cyrtanthoides*, *P. angustifolia*, *P. australis*, *Rhodolirium laetum*, *R. montanum*, *R. speciosum*, *Rhodophiala bagnoldii*, *R. pratensis* y *R. volckmannii*, respectivamente. Los extractos alcaloídeos se analizaron por CG-EM y se compararon los tipos de alcaloides encontrados en estos géneros. Como resultado, se obtuvieron perfiles de alcaloides específicos para cada género y especie analizados. En las especies estudiadas de *Rhodophiala* se identificaron alcaloides de tipo licorina, crinina, galantamina, homolicorina, tazetina y montanina. Por otro lado, las especies de *Phycella* presentaron alcaloides de tipo licorina, crinina, galantamina, homolicorina y hemantamina. Finalmente, las especies de *Rhodolirium* presentaron alcaloides de tipo crinina, galantamina, homolicorina, licorina y tazetina.

Los resultados de esta investigación indican que es posible utilizar a los alcaloides de Amaryllidaceae como herramienta quimiotaxonómica para diferenciar géneros y especies chilenas.

INTRODUCCIÓN

Características generales de la familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae J. St.-Hil. es un grupo de monocotiledóneas pertenecientes al orden Asparagales, que comprende alrededor de 1100 especies agrupadas en 75 géneros y distribuidas principalmente en zonas cálidas y tropicales (Jin 2013). Actualmente, esta familia incluye a las subfamilias Amaryllidoideae, Agapanthoideae y Allioideae (Chase *et al.* 2009). Los géneros de la subfamilia Amaryllidoideae con un mayor número de especies son *Crinum*, *Hippeastrum*, *Zephyranthes*, *Hymenocallis* y *Haemanthus* (Zomlefer 1994). La mayoría de los géneros de Amaryllidoideae son endémicos de Sudamérica o Sudáfrica, pero algunos tienen una distribución más amplia (Arroyo y Cutler 1984). Las especies de esta subfamilia están adaptadas para vivir en hábitats xerofíticos, mesofíticos o hidrofíticos (Arroyo y Cutler 1984).

Las Amaryllidoideae se caracterizan por ser plantas perennes o bianuales, con tallo floral o escapo, con bulbos tunicados y raramente con rizomas (Hutchinson 1959, Parodi 1959, Muñoz 1959, Zomlefer 1994). Sus hojas son simples, lineares, con venación paralela y agrupadas basalmente. Las flores son actinomorfas, hermafroditas, solitarias a muchas y umbeladas en el extremo del escapo, sustentadas por un involucre de 2 o más (raramente una sola) brácteas generalmente membranosas (Parodi 1959 y Muñoz 1959). Perianto petaloideo compuesto por 6 tépalos libres o soldados en la base, dispuestos en 2 series y 6 estambres libres o conniventes insertos en la base de los segmentos del perianto y opuestos a los tépalos (Parodi 1959 y Zomlefer 1994). Anteras biloculares introrsas. Todos los

tépalos son similares o los más internos más pequeños o más largos que los externos (Hutchinson 1959). Ovario generalmente ínfero, trilocular, con muchos óvulos en cada celda y con placentas axilares. Estilo simple y estigma punteado, capitado o trilobulado. El fruto es una cápsula loculicida o raramente una baya (Zomlefer 1994). Las semillas generalmente son numerosas, con una cubierta negra, con un endosperma carnoso rodeando al pequeño embrión, algunas veces angulares o comprimidas y aladas (Muñoz 1959).

La subfamilia Amaryllidoideae ha sido dividida en varias tribus que están restringidas a ciertas áreas geográficas y que están basadas en numerosos caracteres, tales como la simetría floral, la composición de la inflorescencia, morfología de los estambres y del polen, y tipos de frutos y semillas (Traub 1957). Esta es una subfamilia bien definida por otros caracteres además de los moleculares, tales como la combinación de las inflorescencias umbeladas, ovario ínfero y una química única en alcaloides (Meerow y Snijman 2006); pero los caracteres morfológicos por sí solos fallan para establecer adecuadamente las relaciones filogenéticas dentro de esta subfamilia (Meerow y Snijman 2006).

La subfamilia Amaryllidoideae previamente estuvo en la categoría taxonómica de familia, denominándosele Amaryllidaceae (Chase *et al.* 2009). Esta familia ha protagonizado diferentes modificaciones taxonómicas a lo largo de los años.

Pax y Hoffmann (1930) establecieron para Amaryllidaceae las subfamilias Amaryllidoideae, Agavoideae, Hypoxidoideae y Campynematoideae. Esta clasificación sufrió transformaciones con el tiempo; especies de las subfamilias Agavoideae, Hypoxidoideae y Campynematoideae posteriormente se agruparon en las familias Agavaceae, Alstroemeriaceae, Hypoxidaceae y Campynemataceae. Estas clasificaciones estaban basadas en rasgos morfológicos, pero el desarrollo de técnicas moleculares durante

el siglo XX ha aportado más antecedentes para definir la relación de Amaryllidaceae con familias cercanas taxonómicamente.

Sobre la base del ovario ínfero, muchas familias segregadas (tales como Agavaceae, Hypoxidaceae, Haemodoraceae y Alstroemeriaceae) fueron incluidas en Amaryllidaceae. Desde que Hutchinson (1959) desestimara la posición del ovario, pero destacara la presencia de una inflorescencia umbelada como un carácter taxonómico importante, Alliaceae ha sido asociada con Amaryllidaceae. Además del tipo de inflorescencia, tanto Alliaceae como Amaryllidaceae se caracterizaban por tener escapo y bulbos, y las semillas tienen una cubierta con fitomelanina, perdida en algunas Amaryllidaceae.

Sin embargo, además de la posición del ovario, estas familias diferían en otros caracteres químicos y anatómicos. Los caracteres químicos consideraban, entre otros, la presencia de alcaloides en Amaryllidaceae y su ausencia en Alliaceae (Hegnauer 1963). Las diferencias anatómicas entre ambas familias se basaban en la presencia de vasos con perforaciones simples en raíces de Aliáceas y de placas perforadas escaleriformes en Amarilidáceas (Zomlefer 1994).

En el último tiempo, los análisis moleculares han permitido establecer relaciones entre Amaryllidaceae y otras familias del orden Asparagales. Meerow *et al.* (1999) presentaron análisis cladísticos de secuencias de ADN plastidial *rbcL* y *trnL-F* para 48 géneros de Amaryllidaceae y 29 géneros de familias de Asparagales relacionadas. Los análisis combinados de estos genes proveían un buen antecedente para la monofilia de Amaryllidaceae e indicaban que Agapanthaceae era su familia hermana y a su vez, Alliaceae era hermana del clado Amaryllidaceae/Agapanthaceae.

La última clasificación taxonómica aceptada, agrupa a las antiguas familias Amaryllidaceae, Alliaceae y Agapanthaceae dentro de una sola familia, Amaryllidaceae.

Según Chase *et al.* (2009) esta nueva clasificación simplifica la taxonomía del orden Asparagales y facilita la enseñanza de las familias comprendidas en el mismo.

Otro aspecto a considerar es que las plantas de la subfamilia Amaryllidoideae se distinguen por biosintetizar alcaloides estructuralmente diversos, denominados “alcaloides de Amaryllidaceae” (Tako y Rook 2013). Estos alcaloides pueden ser utilizados como marcadores químicos para esclarecer las relaciones taxonómicas dentro de esta subfamilia (Elgorashi *et al.* 2003, Berkov *et al.* 2008a).

Alcaloides de Amaryllidaceae

El estudio de los alcaloides en Amaryllidaceae comenzó en 1877 con el aislamiento del alcaloide licorina (Figs. 1, 2 y 3) desde *Narcissus pseudonarcissus* (Bastida y Viladomat 2002). Desde entonces, se han aislado más de 500 alcaloides en esta familia (Jin 2013). Los alcaloides se han aislado desde diferentes órganos de la planta y en diferentes fases vegetativas de alrededor de 150 especies pertenecientes a 36 géneros (Evidente y Kornienko 2009).

Los alcaloides de esta familia se originan por mecanismos alternativos de acoplamiento oxidativo, de precursores relacionados con norbeladina, la cual es formada a través de la combinación de 3,4-dihidroxibenzaldehído con tiramina, precursores originados a partir de fenilalanina y tirosina, respectivamente (Dewick 2002). Tres tipos estructurales de alcaloides pueden relacionarse con 4-*O*-metilnorbeladina mediante diferentes alineamientos de los anillos fenólicos, permitiendo acoplamientos para-orto (A), para-para (B) u orto-para (C) (Fig. 1). Para la galantamina, la dienona formada vía

acoplamiento oxidativo (C) sufre una adición nucleofílica desde el grupo fenol, formando una unión éter, y la secuencia es completada por las reacciones de reducción y metilación. Para licorina y crinina, aparentemente el átomo de nitrógeno actúa como un nucleófilo para el sistema dienona en una forma similar, generando un nuevo sistema de anillo heterocíclico. Alcaloides como licorina, crinina y galantamina pueden sufrir modificaciones, las que incluyen reacciones de escisión, generando muchas variaciones más (Dewick 2002).

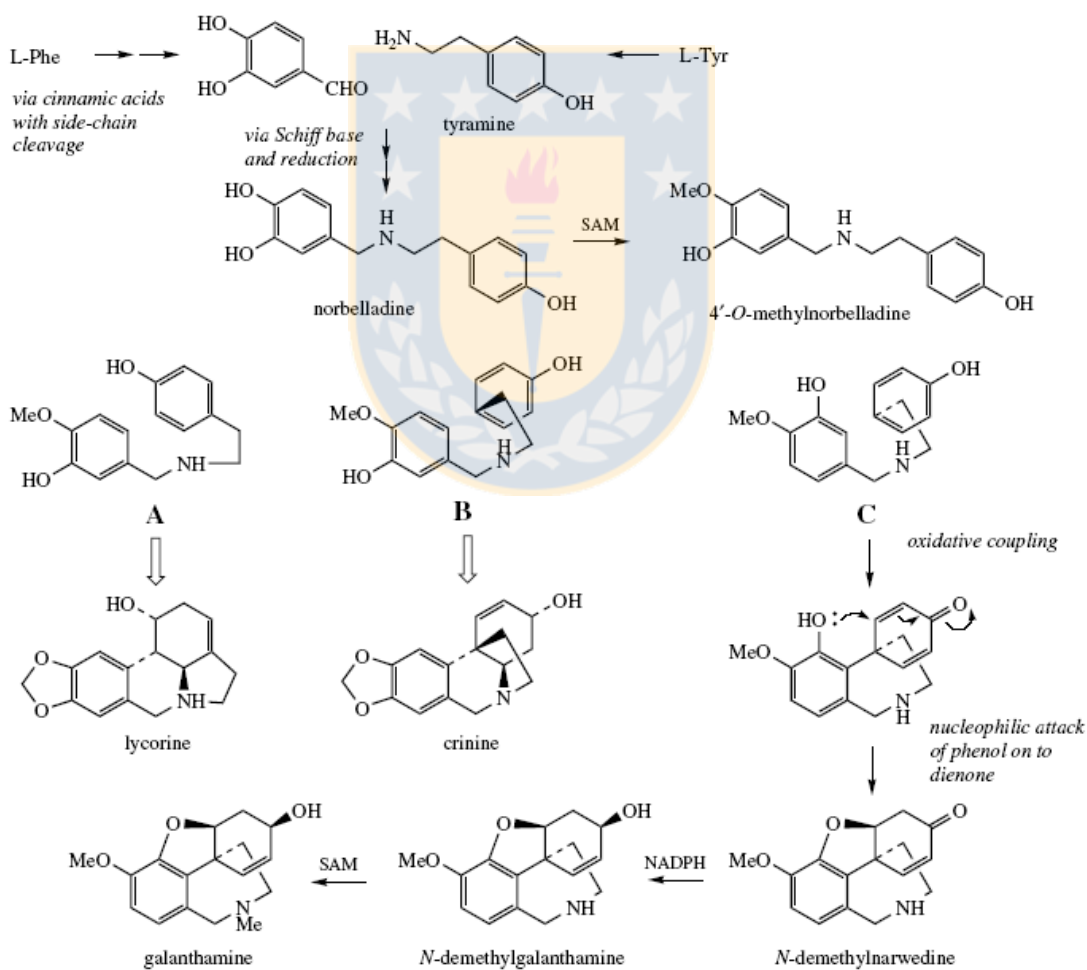


Figura 1. Vías de biosíntesis de alcaloides de Amarilidáceas (extraído de Dewick 2002).

Los alcaloides de Amaryllidaceae se pueden clasificar en nueve tipos de esqueletos, dependiendo del tipo de acoplamiento oxidativo que ocurra (Bastida *et al.* 2011). Los alcaloides representativos de estos esqueletos son: norbeladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y galantamina (Bastida *et al.* 2011) (Figs. 2 y 3).

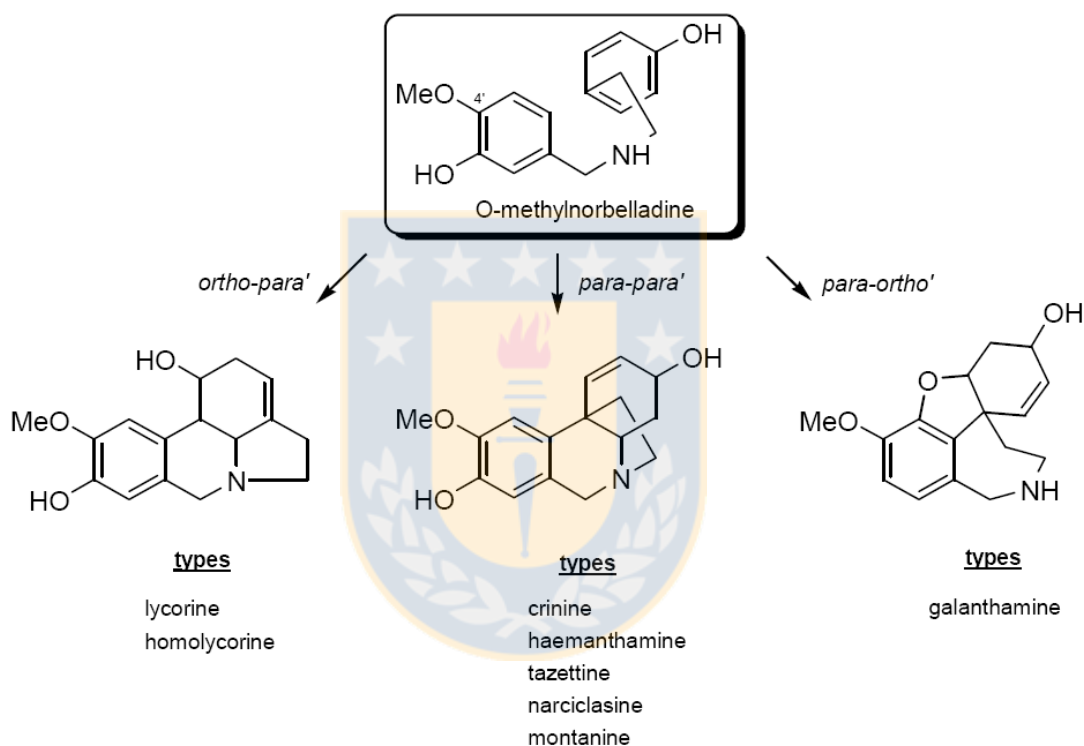


Figura 2. Tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae derivados de los diferentes acoplamientos oxidativos (extraído de Bastida *et al.* 2011).

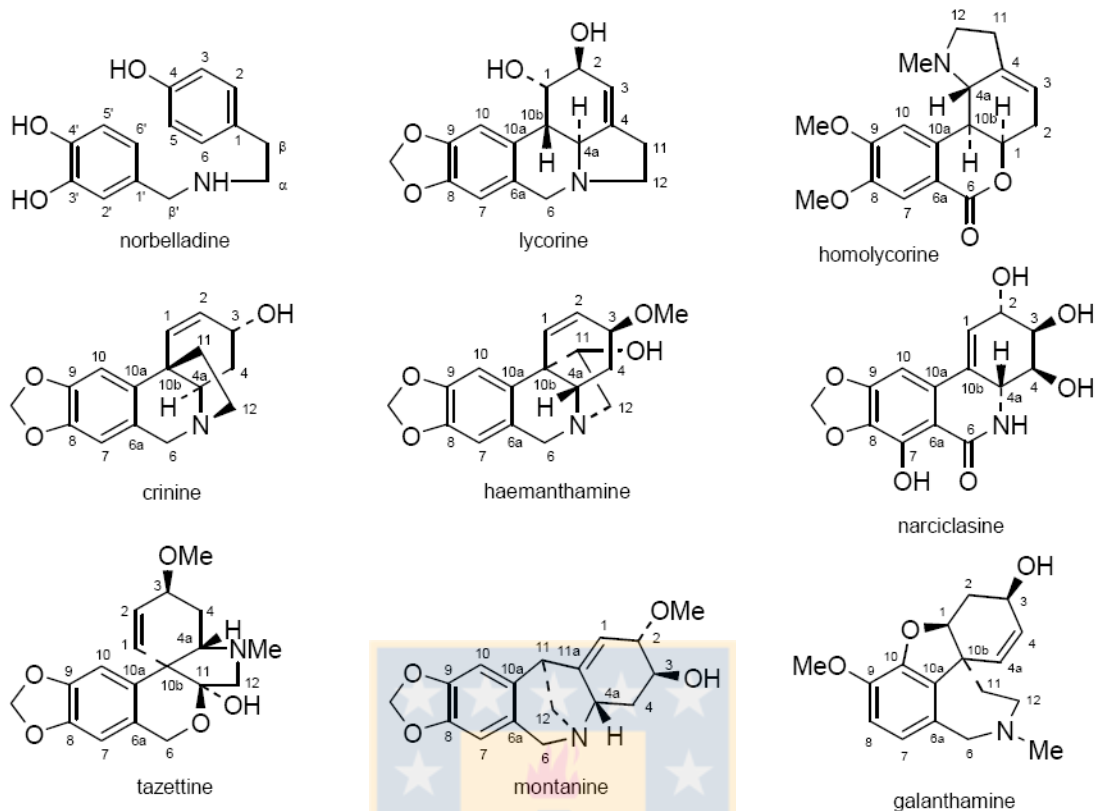


Figura 3. Alcaloides representativos de los tipos de esqueletos (extraído de Bastida *et al.* 2011).

Importancia biomédica de Amaryllidoideae

Los alcaloides de las Amarilidáceas destacan por sus propiedades biomédicas (He *et al.* 2015, Ding *et al.* 2017). Entre las actividades con potencial farmacológico que presentan estos alcaloides, se encuentra el efecto hipotensor detectado en animales de laboratorio (Schmeda-Hirschmann *et al.* 2000).

La propiedad anticáncer de *Narcissus poeticus* ya era conocida por el padre de la medicina, Hipócrates de Kos (*ca.* 460-370 AC), quien recomendaba un preparado a partir del aceite de narciso para el tratamiento de tumores uterinos (Kornienko y Evidente 2008).

Sus sucesores, los médicos griegos Pedanius Dioscórides (ca. 40-90 DC) y Soranus de Efeso (98-138 DC), continuaron usando esta terapia en los siglos I y II DC. Además, se registra el uso anticancerígeno de esta especie y de *Narcissus pseudonarcissus* en la primera centuria DC por el filósofo romano Plinio el Viejo (23-79 DC). Incluso la Biblia provee múltiples referencias para *Narcissus tazetta*, especie con una larga historia de uso contra el cáncer. Las aplicaciones del aceite de narciso en el manejo del cáncer continuaron durante los siglos posteriores en la medicina de China, África del Norte, América central y de países árabes. Otras especies también fueron comúnmente utilizadas, tales como *Hymenocallis caribaea*, especie empleada por médicos europeos para tratar tumores inflamatorios (Kornienko y Evidente 2008).

En la actualidad, numerosos estudios respaldan el potencial antitumoral de los alcaloides de Amaryllidaceae (Ingrassia *et al.* 2008, Zupkó *et al.* 2009, Lamoral-Theys *et al.* 2010). Se ha demostrado *in vitro* su potente capacidad citotóxica contra líneas de células cancerígenas e *in vivo* su actividad antitumoral contra el sarcoma de células reticulares M-5076 y leucemia P388 de ratón (Pettit *et al.* 1993). Además, se han sintetizado nuevos derivados con el fin de estudiar la relación entre estructura y actividad y de obtener candidatos potenciales para el desarrollo preclínico (Ingrassia *et al.* 2008).

Algunos de estos alcaloides pueden inhibir la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (López *et al.* 2002, Houghton *et al.* 2006). La AChE hidroliza a la acetilcolina, neurotransmisor asociado a procesos cognitivos y a la memoria en el sistema nervioso central, y a la contracción de músculos esqueléticos. Por lo tanto, la inhibición de la acetilcolinesterasa se traducirá en una prolongación del estímulo nervioso de la acetilcolina, al restaurar sus niveles en el espacio sináptico (Houghton *et al.* 2006). Los pacientes con Alzheimer sufren de una fuerte reducción de la función colinérgica y los tratamientos se

han focalizado en los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI) (Orhan 2000). El alcaloide galantamina es un AChEI, de actividad prolongada, selectivo, reversible y competitivo (López *et al.* 2002, Orhan 2000, Houghton *et al.* 2006), y es comercializado para el tratamiento del Alzheimer bajo diferentes nombres comerciales, tales como Reminyl®, Galanvitae®, entre otros. La sanguinina (9-*O*-demetilgalantamina) es otro alcaloide de Amaryllidaceae que presenta una inhibición *in vitro* más potente que la galantamina (López *et al.* 2002). El alcaloide 11-hidroxisgalantamina también es un AChEI (Houghton *et al.* 2006).

Extractos de muchas especies de Amaryllidaceae poseen una importante actividad antibacteriana y antifúngica (Elgorashi y van Staden 2004, Evidente *et al.* 2004). También han exhibido actividad contra varios tipos de virus humanos (Ding *et al.* 2017). Duri *et al.* (1994) observaron el efecto inhibitorio de extractos metanólicos liofilizados de *Crinum macowanii* en células infectadas con virus causantes de la fiebre amarilla y de la encefalitis japonesa.

Importancia económica ornamental de Amaryllidoideae

Además de las propiedades medicinales de estas plantas, destaca su gran importancia económica como plantas ornamentales. Esto gracias a las inflorescencias de colores vistosos que presentan. Actualmente, especies de alrededor de 30 géneros se usan como ornamentales, entre los cuales se encuentran *Clivia*, *Crinum*, *Eucharis*, *Galanthus*, *Haemanthus*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Lycoris*, *Narcissus* y *Zephyranthes* (Zomlefer 1994) (Fig. 4).

Sin lugar a dudas que las especies chilenas de Amarilidáceas también tienen potencial ornamental (Schiappacasse *et al.* 2002). El género *Rhodophiala*, por ejemplo, presenta flores de color rojo, rosado, naranja y amarillo. Estas plantas podrían ser cultivadas para maceteros y/o para el corte de flores (Bridgen 1994). Actualmente, las especies *Rhodophiala bagnoldii*, *Rhodophiala phycelloides*, *Rhodolirium laetum* y *Rhodolirium montanum* se están cultivando para estos fines (Bridgen 1994). Otros géneros con potencial ornamental son *Placea* y *Phycella*. Este hecho explica el interés en estudios de propagación y del desarrollo de estas plantas en las últimas décadas (Peñailillo y Schiappacasse 2000, Schiappacasse *et al.* 2002, Ferrando 2002).



Figura 4. Plantas de *Galanthus* (izquierda) y *Narcissus* (derecha), géneros ornamentales populares en jardines (extraído de Takos y Rook 2013).

Amaryllidoideae en Chile

En Chile, Ravenna (2003) describe 11 géneros y 35 especies de Amaryllidoideae (Tabla 1). La mayoría de estos géneros está representada por sólo 1 o 2 especies. Este autor se basa principalmente en caracteres morfológicos de la flor para definir a los géneros, tales como forma y posición de los filamentos del estambre y del perigonio, tamaño y posición de los tépalos, presencia o ausencia de apéndices estaminales, forma del estigma, posición y largo del estilo. También considera la forma de germinación de las semillas y la distribución geográfica del género. La clasificación de Ravenna ha estado en constante revisión hasta la actualidad.

Posteriormente, se publicó un catálogo de las Amaryllidaceae presentes en el Cono Sur (Arroyo-Leuenberger y Dutilh 2008a). De acuerdo a este catálogo, el número de géneros para Chile disminuye a 9, dentro de los cuales se agrupan 45 especies (Tabla 2). Se consideran 2 géneros introducidos: *Pyrolirion*, introducido desde el Perú (Ravenna 2003) y *Amaryllis*, originario de Sudáfrica (Hurrell y Delucchi 2007). Arroyo-Leuenberger y Dutilh (2008a) no consideran en su catálogo a los géneros *Bathya*, *Miltinea*, *Myostemma*, *Rhodolirion*, ni *Stenomesson*. Especies de los géneros *Myostemma* y *Rhodolirion* se consideran sinónimos de *Rhodophiala*. A su vez, una de las dos especies de *Bathya*, *B. andina*, es sinónimo de *Phycella herbertiana*, y una de las dos especies de *Stenomesson*, *S. humile*, es sinónimo de *Clinanthus humilis* (Arroyo-Leuenberger y Dutilh 2008a). *Miltinea* es sinónimo de *Famatina* (Arroyo-Leuenberger y Dutilh 2008a). Estudios posteriores aceptan el género *Rhodolirium*, diferenciándolo de *Rhodophiala* (Muñoz *et al.* 2011). Ravenna (2003) había incluido a este género bajo el nombre de *Rhodolirion*.

Tabla 1. Géneros de Amaryllidoideae presentes en Chile según Ravenna (2003).

| Género | Número de especies en Chile | Estatus |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------|
| <i>Bathya</i> Rav. | 2 | Endémico |
| <i>Habranthus</i> Herb. | 1 | Introducido |
| <i>Famatina</i> Rav. | 1 | Nativo |
| <i>Miltinea</i> Rav. | 1 | Endémico |
| <i>Myostemma</i> Salisb. | 12 | Nativo |
| <i>Phycella</i> Lindl. | 4 | Endémico |
| <i>Placea</i> Miers ex Lindl. | 5 | Endémico |
| <i>Pyrolirion</i> Herb. | 1 | Introducido |
| <i>Rhodolirion</i> Phil. | 5 | Nativo |
| <i>Stenomesson</i> Herb. | 2 | Nativo |
| <i>Traubia</i> Mold. | 1 | Endémico |
| Número total de especies | 35 | |

Tabla 2. Géneros de Amaryllidoideae presentes en Chile según Arroyo-Leuenberger y Dutilh (2008a).

| Género | Número de especies en Chile | Estatus |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------|
| <i>Amaryllis</i> L. | 1 | Introducido |
| <i>Clinanthus</i> Herb. | 1 | Nativo |
| <i>Famatina</i> Rav. | 2 | Endémico |
| <i>Habranthus</i> Herb. | 1 | Nativo |
| <i>Phycella</i> Lindl. | 6 | Endémico |
| <i>Placea</i> Miers ex Lindl. | 5 | Endémico |
| <i>Pyrolirion</i> Herb. | 1 | Introducido |
| <i>Rhodophiala</i> C. Presl | 27 | Endémico |
| <i>Traubia</i> Mold. | 1 | Endémico |
| Número total de especies | 45 | |

Es difícil delimitar morfológicamente los géneros de Amaryllidoideae, ya que los caracteres utilizados son variables. Entre estos caracteres se cuenta la presencia de un perigonio infundibuliforme o campanulado y la coloración variable de los tépalos del perigonio en individuos de una misma población, además de que el grado de división del estigma varía según el grado de maduración del gineceo (Baeza *et al.* 2009a). Además, la flor de estas especies, necesaria para la identificación, tiene un período de duración de sólo algunas semanas y su conservación en herbarios dificulta la observación de los caracteres distintivos. Por otra parte, estudios enfocados en el cariotipo han sido capaces de detectar diferencias entre algunos géneros chilenos de Amaryllidoideae, además de caracterizar algunas de sus especies (Baeza y Schrader 2004, Baeza *et al.* 2006, Baeza *et al.* 2007, Baeza *et al.* 2009a, Baeza *et al.* 2009b, Cisternas *et al.* 2010, Muñoz *et al.* 2011, Baeza *et al.* 2012, Baeza *et al.* 2016, Baeza *et al.* 2017).

Estudios moleculares han permitido agrupar a géneros endémicos de Chile y de otros países americanos en dos subtribus pertenecientes a la tribu Hippeastreae: Traubiinae e Hippeastrinae (García *et al.* 2014, García *et al.* 2017). Traubiinae comprende los géneros *Placea*, *Phycella* (incluyendo a *Famatina maulensis*), *Rhodolirium* s. l., y *Traubia*, y se distribuye principalmente en Chile central (García *et al.* 2014). Por otro lado, Hippeastrinae comprende los géneros *Eithea*, *Habranthus*, *Hippeastrum*, *Rhodophiala* (incluyendo a *Famatina* p. p.), *Sprekelia*, *Tocantinia*, y *Zephyranthes* (incluyendo a *Haylockia (Zephyranthes) americana*), y está distribuida principalmente en regiones subtropicales y tropicales de Sudamérica, las Antillas Mayores, México y sur de Estados Unidos (García *et al.* 2014).

Es importante destacar el alto grado de endemismo de los géneros de esta subfamilia en Chile. De hecho, Ravenna (2003) clasifica como endémicos a 5 de los 11 géneros

presentes en Chile. Este hecho sugiere que Chile ha sido un activo centro evolutivo para estas plantas. Según Ravenna los géneros monotípicos *Miltinea* y *Traubia* al parecer son intermediarios en la evolución local de la familia. La mayoría de las especies nativas de Amaryllidoideae pertenecen al “hotspot” o punto caliente de biodiversidad localizado en Chile, caracterizado por una alta diversidad de especies y taxa superiores y altos niveles de endemismo (Arroyo *et al.* 2008b). El alto impacto antrópico sobre los hábitats de estas especies, hacen del “hotspot” chileno un sitio prioritario de conservación.

Quimiotaxonomía

Otra herramienta que podría ser útil para delimitar los géneros y las especies de las Amaryllidoideae nativas es la quimiotaxonomía. También llamada taxonomía química o sistemática química, es la ciencia que utiliza los caracteres químicos, en especial los metabolitos secundarios, para determinar la posición de un conjunto de organismos en una clasificación jerarquizada evolutivamente (Domínguez 1973). Es una ciencia híbrida entre la botánica y la química (Erdtman 1968).

Los caracteres químicos tienen la ventaja de que pueden ser definidos exactamente mediante la identificación de las moléculas, sus estructuras y sus reacciones (Erdtman 1968). Asimismo, y al igual que los caracteres morfológicos, los caracteres químicos son determinados por factores genéticos. La quimiotaxonomía puede añadir más evidencia confirmatoria a las clasificaciones taxonómicas previas o reforzar algunas decisiones taxonómicas (Domínguez 1973, Hegnauer 1963).

Entre las moléculas utilizadas para establecer las relaciones entre organismos

vegetales, también se encuentran algunas ampliamente distribuidas en el Reino Vegetal, pero cuya configuración varía según la maquinaria enzimática del organismo que la posea, tales como la lignina y proteínas (Alston y Turner 1963, Erdtman 1968). Es así como en la lignina pueden haber 3 tipos de núcleos aromáticos: p-hidroxifenil ($p\text{-C}_6\text{H}_4\text{OH}$), guaiacil ($\text{C}_6\text{H}_3\text{OHCH}_3\text{O}$) y siringil ($\text{C}_6\text{H}_2\text{OH}(\text{CH}_3\text{O})_2$). En helechos y gimnospermas predominan las ligninas del tipo guaiacil, en gramíneas las de tipo p-hidroxifenil y en dicotiledóneas las de tipo guaiacil y siringil (Erdtman 1968).

Otros compuestos de distribución más restringida y que han sido utilizados ampliamente en quimiotaxonomía corresponden a los flavonoides, alcaloides, betalainas y terpenoides (Domínguez 1973). Gracias a estos compuestos ha sido posible distinguir grupos vegetales en diferentes jerarquías taxonómicas, como órdenes, familias y especies. Incluso es posible distinguir químicamente a un híbrido, teniendo en cuenta la información del perfil químico de las especies que lo originan. Un ejemplo es el híbrido de *Eucalyptus cinerea* y *Eucalyptus macarthuri*, el cual posee la suma de los aceites encontrados en las especies parentales (Erdtman 1968).

A nivel de orden y familia, los alcaloides tienen un gran valor taxonómico. La Tabla 3 resume la distribución de los tipos de alcaloides en órdenes y familias de plantas vasculares (Alston y Turner 1963). La diversidad en los tipos de alcaloides, su complejidad y su amplia distribución le confieren importancia sistemática a estos metabolitos (Alston y Turner 1963). Son los grupos de alcaloides conformados según sus relaciones biosintéticas, más que los compuestos individuales, los que asignan los caracteres sistemáticos de mayor utilidad (Hegnauer 1963).

Tabla 3. Distribución por familia de los principales alcaloides de plantas vasculares (extraído de Alston y Turner 1963).

| Familia | Tipo de alcaloide presente |
|----------------|--|
| Lycopodiaceae | Piridínico |
| Equisetaceae | Protoalcaloide y piridínico |
| Taxaceae | Protoalcaloide |
| Gnetaceae | Protoalcaloide |
| Magnoliaceae | Isoquinolínico |
| Lauraceae | Isoquinolínico |
| Anonaceae | Isoquinolínico |
| Menispermaceae | Isoquinolínico |
| Ranunculaceae | Isoquinolínico, quinolizínico, terpénico |
| Berberidaceae | Isoquinolínico, quinolizínico |
| Nymphaeaceae | Terpénico |
| Papaveraceae | Isoquinolínico, quinolizínico, pirrolidónico |
| Crassulaceae | Piridínico |
| Leguminosae | Protoalcaloide, piridínico, pirrolizidínico, quinolizínico, isoquinolínico, indólico |
| Theaceae | Purínico |
| Sterculiaceae | Purínico |
| Rutaceae | Isoquinolínico, imidazólico |
| Celastraceae | Protoalcaloide |
| Aquifoliaceae | Purínico |
| Malvaceae | Protoalcaloide |
| Umbelliferae | Piridínico, pirrolidónico |
| Piperaceae | Piridínico, pirrolidónico |
| Moraceae | Piridínico |
| Euphorbiaceae | Piridínico |
| Santalaceae | Pirrolizidínico |
| Chenopodiaceae | Protoalcaloide, piridínico, quinolizínico, indólico |
| Cactaceae | Protoalcaloide, isoquinolínico, piridínico |
| Phytolaccaceae | Purínico |
| Nyctaginaceae | Purínico |
| Loganiaceae | Isoquinolínico, indólico |
| Apocynaceae | Indólico, esférico |
| Asclepiadaceae | Piridínico |
| Gentianaceae | Piridínico |
| Convolvulaceae | Pirrolidínico, tropánico |
| Boraginaceae | Pirrolizidínico |
| Labiatae | Piridínico |
| Solanaceae | Protoalcaloide, pirrolidónico, piridínico, pirrolizidínico, tropánico, esteroidal |
| Rubiaceae | Isoquinolínico, indólico, purínico |
| Lobeliaceae | Piridínico |
| Compositae | Piridínico, pirrolizidínico |
| Liliaceae | Protoalcaloide, isoquinolínico, esteroidal, purínico |

| | |
|----------------|--------------------------|
| Amaryllidaceae | Isoquinolínico |
| Dioscoreaceae | Tropánico |
| Gramineae | Protoalcaloide, indólico |
| Palmae | Piridínico |

Además, un requisito para que estos compuestos tengan importancia taxonómica, es que sean el resultado de procesos metabólicos exactamente equivalentes (homólogos) (Hegnauer 1963). Esto, porque dos especies pueden presentar los mismos alcaloides, pero la síntesis de éstos puede ser por rutas análogas y no homólogas. Un ejemplo es la nicotina que está presente en las familias Equisetaceae, Lycopodiaceae, Rosaceae, Fabaceae, Asclepiadaceae, Solanaceae y Asteraceae, pero presenta diferentes rutas biosintéticas, por lo que estas familias no se pueden relacionar taxonómicamente en base a este alcaloide (Erdtman 1968).

Según Domínguez (1973), los alcaloides tienen un gran valor taxonómico en las familias Amaryllidaceae, Fabaceae, Liliaceae, Papaveraceae y Rutaceae.

En Amaryllidaceae se han detectado alcaloides sólo en la subfamilia Amaryllidoideae. En este grupo es común encontrar rafidios en idioblastos y en tubos que contienen mucílago (Hegnauer 1963), además de ácido quelidónico (Zomlefer 1994), un pirano típicamente sintetizado por *Chelidonium majus* (Papaveraceae) (Malcolm y Gear 1971). Esta uniformidad de Amaryllidoideae desaparece al incluir a Allioideae en la familia, ya que este grupo no presenta alcaloides ni células con rafidios, pero sí contienen saponinas esteroidales y compuestos azufrados, ausentes en Amaryllidoideae (Hegnauer 1963).

Los alcaloides de Amaryllidaceae tienen gran importancia en estudios quimiosistemáticos, debido a su presencia en todos los representantes de la subfamilia

Amaryllidoideae, la amplia variación estructural y la relación biosintética entre todos ellos (Gros *et al.* 1985). Estas son algunas de las condiciones que hacen de estos alcaloides un buen carácter quimiotaxonómico.

Estudios a nivel de especie en Amaryllidaceae muestran diferentes patrones de alcaloides. Berkov *et al.* (2008a) detectaron diferencias en el perfil de alcaloides de las especies *Galanthus nivalis* y *Galanthus elwesii*. Las especies del género *Galanthus* han sido difíciles de clasificar debido a la carencia de caracteres morfológicos definidos. Berkov *et al.* (2008a) estudiaron poblaciones simpátricas de Bulgaria, con el objeto de definir quimiotaxonómicamente estas especies. Se detectaron 37 compuestos con espectros de masa característicos de alcaloides de amarilidáceas. En *G. nivalis* fueron encontrados 25 alcaloides predominantemente de tipo tazetina y hemantamina y en *G. elwesii*, 17 alcaloides predominantemente de tipo homolicorina y licorina. Sólo 5 de estos alcaloides fueron encontrados en ambas especies. No hubo variación en el perfil de alcaloides dentro de las poblaciones de cada especie. Por este motivo, el efecto de los factores ambientales (temperatura, composición del suelo, etc.) sobre el patrón de alcaloides de estas especies simpátricas puede ser excluido, y las diferencias sólo se deberían a su genética. Con estos antecedentes se concluye que hay una profunda diferencia en el metabolismo secundario entre estas 2 poblaciones simpátricas y dan un apoyo quimiotaxonómico para la clasificación de *G. nivalis* y *G. elwesii* como diferentes especies.

Otro estudio realizado por Elgorashi *et al.* (2003), analiza las variaciones interespecíficas en el contenido de alcaloides de 3 especies del género *Crinum*: *C. bulbispermum*, *C. macowanii* y *C. moorei*. Se analizaron 5 ejemplares de cada especie en 2 estaciones de crecimiento consecutivas. Se detectaron 12 alcaloides. *C. moorei* presentó el mayor contenido en todos los alcaloides, excepto crinamina, en comparación a *C.*

bulbispermum y *C. macowanii*. Estos alcaloides pueden ser utilizados para distinguir quimiotaxonómicamente a *C. moorei* del grupo formado por *C. bulbispermum* y *C. macowanii*. De acuerdo a estos resultados, *C. macowanii* estaría más relacionado con *C. bulbispermum*, que con *C. moorei*.

En Chile, aún no se han utilizado los alcaloides como herramienta quimiosistemática para definir a los géneros y especies nativas de Amaryllidoideae. De hecho, son escasos los estudios sobre la naturaleza química de esta subfamilia.

Una de las especies nativas estudiadas corresponde a *Rhodophiala ananuca* (= *Hippeastrum ananuca*). Los alcaloides licorina (Gopalakrishna *et al.* 1976), 17-epihomolicorina (Gopalakrishna *et al.* 1978), homolicorina, 11-hidroxi-1,2-dihidromaritidina (Pacheco y Silva 1992), maritidina (Zabel *et al.* 1979), hippeastidina (Watson *et al.* 1977) y hemantamina (Watson *et al.* 1984) fueron aislados de individuos de esta especie e identificados mediante técnicas de espectroscopía y difracción de rayos X.

Otra especie estudiada fue clasificada en su momento como *Hippeastrum bicolor* (Sepúlveda *et al.* 1982). Desde esta especie se aislaron los alcaloides licorina y hemantamina, siendo identificados por sus espectros de ultravioleta, infrarrojo, resonancia magnética nuclear y masa y por comparación de sus propiedades físicas y comportamiento en cromatografía en capa fina con los compuestos aislados de *R. ananuca* (Pacheco y Silva 1992). Actualmente, el género *Hippeastrum* no es válido para Chile (Ravenna 2003). De acuerdo al lugar de recolección, podemos inferir a qué especie correspondía la población estudiada. *H. bicolor* fue recolectado en el Fundo Hualpén, comuna de Hualpén, VIII Región (Sepúlveda *et al.* 1982), lugar en donde actualmente se encuentra una especie de *Rhodophiala* y otra especie de *Phycella*.

Dado el problema taxonómico de la subfamilia Amaryllidoideae en Chile y el

potencial de sus alcaloides como carácter taxonómico, en la presente investigación se evaluaron géneros nativos mediante la caracterización de su perfil de alcaloides. Se consideraron algunas modificaciones posteriores a la clasificación de Ravenna (2003), tales como el reemplazo del nombre del género *Rhodolirion* por *Rhodolirium* y del género *Myostemma* por *Rhodophiala*. Por lo tanto, se determinó el perfil de alcaloides de especies de los géneros *Phycella*, *Rhodolirium* y *Rhodophiala*, con el objeto de compararlos entre sí. Para este fin, se recolectaron ejemplares en diversas regiones del país durante las estaciones de floración de cada especie. Se analizaron los tipos de alcaloides que biosintetizan, definiendo un perfil para cada especie y género. Con esta información, se realizaron comparaciones quimiotaxonómicas entre estos taxones.



HIPÓTESIS

La clasificación taxonómica de las Amaryllidoideae chilenas se encuentra actualmente bajo revisión. Ravenna (2003) propone 9 géneros nativos para Amaryllidoideae, basado en la morfología de la flor, la germinación de sus semillas y la distribución geográfica. Los caracteres morfológicos de esta subfamilia son variables y esto, sumado a la escasa duración de la flor, ha llevado a confusiones en la determinación de géneros y especies. La presencia de alcaloides en este grupo es una gran oportunidad para utilizarlos como caracteres quimiotaxonómicos precisos y confiables. Estudios previos con otras especies de Amarilidáceas muestran diferencias en el perfil de alcaloides que permiten incluso diferenciar especies dentro de un mismo género. Dados los antecedentes entregados, se plantea la siguiente **Hipótesis**:

“Las Amaryllidoideae chilenas de los géneros *Phycella*, *Rhodolirium* y *Rhodophiala* biosintetizan alcaloides que permiten diferenciarlas taxonómicamente a nivel de género y especie.”

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comparar los géneros y especies de Amaryllidoideae nativas chilenas utilizando los alcaloides como herramienta quimiotaxonómica.



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer el perfil de alcaloides en especies de *Phycella*, *Rhodolirium* y *Rhodophiala*.
2. Evaluar la utilidad de los alcaloides de Amaryllidaceae como herramienta quimiotaxonómica en estos géneros y sus especies.

PUBLICACIONES



CAPÍTULO I: ALCALOIDES DEL GÉNERO

RHODOPHIALA



Referencia:

Lizama-Bizama, I., Pérez, C., Baeza, C. M., Uriarte, E. y J. Becerra. 2017. Alkaloids from Chilean species of the genus *Rhodophiala* C. Presl (Amaryllidaceae) and their chemotaxonomic importance.

Enviada a Gayana botánica.



Alkaloids from Chilean species of the genus *Rhodophiala*

C. Presl (Amaryllidaceae) and their chemotaxonomic importance

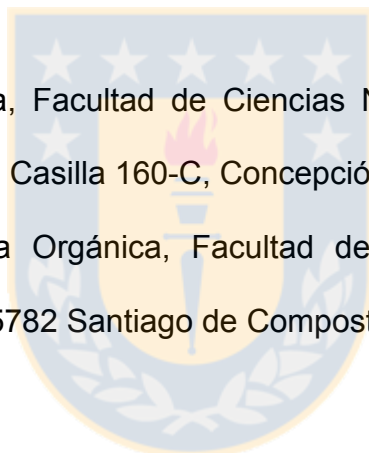
Alcaloides de especies chilenas del género *Rhodophiala* C. Presl (Amaryllidaceae) y su importancia quimiotaxonómica

ISABEL LIZAMA-BIZAMA ^{1*}, CLAUDIA PÉREZ ¹, CARLOS M. BAEZA ¹, EUGENIO URIARTE ² & JOSÉ BECERRA ¹

¹Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.

*ilizama@udec.cl

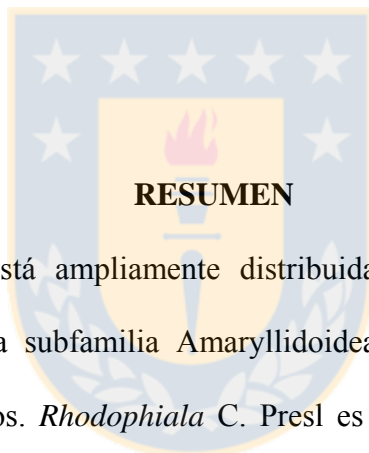


ABSTRACT

The family Amaryllidaceae is widely distributed from temperate to tropical regions. Amaryllidaceae species of the subfamily Amaryllidoideae biosynthesize alkaloids with important physiological effects. *Rhodophiala* C. Presl is one of the native genera of Amaryllidoideae of Chile, Argentina and Brazil. However, despite the diversity of this genus, the phytochemistry has been studied previously in only two Chilean species. The present work aimed to analyze the alkaloid profiles and chemotaxonomically compare three

Chilean species of *Rhodophiala*. Bulb extracts were analyzed by means of GC-MS and alkaloids were characterized according to retention time and fragmentation pattern. The skeleton type alkaloids detected were lycorine, crinine, galanthamine, homolycorine, tazettine and montanine. All analyzed species showed different alkaloid profiles, indicating these compounds can be used as a chemotaxonomic tool. Furthermore, the alkaloid types detected in this genus have multiple reported biological properties and these species can constitute new sources of important medicinal products.

KEYWORDS: Chilean species of Amaryllidaceae, alkaloids, *Rhodophiala*, GC-MS.



La familia Amaryllidaceae está ampliamente distribuida desde regiones templadas a tropicales. Las especies de la subfamilia Amaryllidoideae biosintetizan alcaloides con importantes efectos fisiológicos. *Rhodophiala* C. Presl es uno de los géneros nativos de Amaryllidoideae de Chile, Argentina y Brasil. Sin embargo, a pesar de la diversidad de este género, sólo se ha estudiado la fitoquímica de dos especies chilenas. En este trabajo se analiza el perfil alcaloideo de tres especies chilenas del género *Rhodophiala* y se comparan estas especies quimiotaxonómicamente. Se analizaron extractos de bulbos mediante CG-EM. Los alcaloides fueron caracterizados por su tiempo de retención y patrón de fragmentación. Los tipos de esqueletos de los alcaloides detectados fueron licorina, crinina, galantamina, homolicorina, tazetina y montanina. Todas las especies analizadas presentaron diferentes perfiles alcaloideos, por lo que estos compuestos pueden ser usados como una herramienta quimiotaxonómica. Además, los tipos de alcaloides detectados en este género

tienen múltiples propiedades biológicas reportadas en literatura y estas especies pueden constituir nuevas fuentes de productos de importancia medicinal.

PALABRAS CLAVE: Especies chilenas de Amaryllidaceae, alcaloides, *Rhodophiala*, CG-EM.

INTRODUCTION

The family Amaryllidaceae has three subfamilies: Amaryllidoideae, Agapanthoideae and Allioideae (Chase *et al.* 2009). Species of the subfamily Amaryllidoideae are widely known for biosynthesis of pharmacologically active alkaloids, including antitumor, antiviral, antimalaria and immunostimulant activity; as well as inhibition of the acetylcholinesterase enzyme (Bastida *et al.* 2011, Ding *et al.* 2017). These alkaloids are named Amaryllidaceae alkaloids and classified into nine skeleton types, for which the representative alkaloids are: norbelladine, lycorine, homolycorine, crinine, haemanthamine, narciclasine, tazettine, montanine and galanthamine (Bastida *et al.* 2011).

There are more than 30 native species of the subfamily Amaryllidoideae in Chile, from Arica and Parinacota Region to Los Lagos Region and with a wide altitudinal distribution (Ravenna 2003, Arroyo-Leuenberger & Dutilh 2008).

Rhodophiala C. Presl is one of the native genera of Chile, and is also distributed in Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay (Arroyo-Leuenberger & Dutilh 2008). In Chile, *Rhodophiala* species are found in the coastal desert and semidesert areas, in the coastal mountain range, the central valley and the plains and hills of the foothills and mountains of the Andes, between Antofagasta Region and Los Lagos Region (Schiappacasse *et al.* 2002).

This genus is characterized by a funnel-shaped perigon of 6 tepals; an androecium of 6 slightly unequal stamens, and a tricarpellary gynoecium of inferior ovary, terminating in a trifid stigma (Baeza *et al.* 2012). It also presents flowers of red, pink, orange and yellow. These plants have high ornamental value, with many lesser-known species, some of which even have conservation problems (Muñoz *et al.* 2009).

Despite the variety of Amaryllidoideae species in Chile, only two species have been chemically studied (Pacheco *et al.* 1978, 1981, 1982, Sepúlveda *et al.* 1982, Pacheco & Silva 1992). The knowledge of the chemistry of these species can help to solve the taxonomic problems of Chilean Amaryllidoideae due to their complex morphological variation (Baeza *et al.* 2009, Fuentes *et al.* 2007). In fact, the *Rhodophiala* genus requires an urgent taxonomic revision (Baeza *et al.* 2016).

Considering the limited knowledge on secondary metabolites regarding these native plants and the varied backgrounds on the biological activity of the alkaloids, in this work we analyze the alkaloid profiles for three species of this genus: *Rhodophiala bagnoldii* (Herb.) Traub, *Rhodophiala pratensis* (Poepp.) Traub and *Rhodophiala volckmannii* Phil (Fig. 1). *R. bagnoldii* lives in sandy coastal and inland areas from southern Antofagasta Region to the Coquimbo Region (Schiappacasse *et al.* 2002). *R. volckmannii* is located on the coast near Cobquecura, in the Bío-Bío Region of Chile (Muñoz-Schick 1973). Meanwhile, *R. pratensis* preferably grows in sandy soils of the Andean Precordillera of the Maule and Bío-Bío Regions (Baeza *et al.* 2012). Thus, the main objective of this research was to chemotaxonomically differentiate these species, contributing chemical characters to the taxonomy of this genus.

MATERIAL AND METHODS

PLANT MATERIAL

Plants of *Rhodophiala bagnoldii*, *R. pratensis* and *R. volckmannii* were collected. *R. bagnoldii* was collected in CHILE, Antofagasta Region, Huasco Province, 102 m (28°24'45''S-71°10'54''W), 19-X-2011, I. Lizama-Bizama 9. *R. pratensis* was collected in CHILE, Bío-Bío Region, Bío-Bío Province, 368 m (37°24'37''S-71°57'14''W), 27-I-2011, I. Lizama-Bizama w/n. *R. volckmannii* was collected in CHILE, Bío-Bío Region, Ñuble Province, 16 m (36°09'08''S-72°48'21''W), 15-XII-2010, I. Lizama-Bizama w/n. Collections were performed during the flowering periods of these species. Specimens were deposited at the herbarium of the University of Concepción (CONC), Concepción, Chile. Bulbs were separated from the flower scapes, leaves and roots, and then chopped for maceration.

ALKALOID EXTRACTION

Fresh bulbs (90 g of *R. pratensis*, 114 g of *R. volckmannii* and 430 g of *R. bagnoldii*) were extracted three times with MeOH at room temperature for 72 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue dissolved in 0.1 N HCl. The extracts were defatted three times with CH₂Cl₂. The solvent was evaporated under reduced pressure. The extracts were then basified with 25% ammonia solution and the alkaloids extracted with CH₂Cl₂. The organic solvent was evaporated and yielded the following extracts: 37 mg of *R. pratensis*, 23 mg of *R. volckmannii* and 266 mg of *R. bagnoldii*. Each alkaloid extract was dissolved in CHCl₃ to a final concentration of 10 mg/mL for further analysis.

GC/MS ANALYSIS

The GC/MS analysis of underivatized alkaloids was carried out on a gas chromatograph (Agilent 7890A) with a splitless injector (250 °C) and a mass detector (Agilent 5975C). A HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) and helium gas (constant flow 1 mL/min) were used for separation. The temperature program was: 5 min hold at 100 °C, 100-275 °C at 13 °C/min and 32 min hold at 275 °C. Detection range was m/z 50-550. The injector temperature was 250 °C. Identification of the alkaloid components was accomplished by matching mass spectra to records in the NIST 05 (NIST /EPA/NIH MASS 2005 Spectral Library) and by comparing the obtained spectra with those reported in the literature. NIST 05 collects representative alkaloids of all the skeletons referenced. The structure of an alkaloid is assigned when the overlap with the database exceeds 90%. Skeletons of unidentified compounds were proposed according to the highest index of similarity with those listed in the database. Furthermore, a standard was used for galanthamine identification.

Percentage of the compounds in the extracts was calculated based on the total area of the GC/MS peaks (Berkov *et al.* 2008).

RESULTS

In the present work, alkaloid profiles from three Chilean species were analyzed by GC-MS. This method is efficient and reliable for studies on Amaryllidaceae alkaloids (Berkov *et al.* 2008).

A total of 25 compounds with mass spectral characteristics of Amaryllidaceae alkaloids were found in the bulbs of the studied species (Table 1). Seventeen were found in

R. bagnoldii (Fig. 2), seven in *R. pratensis* and four in *R. volckmannii*. The retention time of alkaloids was between 18 and 24 minutes.

Each analyzed species showed a distinct alkaloid profile. In addition, all these species share tazettine. Only *R. bagnoldii* and *R. pratensis* share crinan-3-one. Major alkaloids for the three species were montanine type: A10 in *R. bagnoldii*, montanine in *R. pratensis* and A19 in *R. volckmannii* (Table 1).

The skeleton type alkaloids detected were lycorine, crinine, galanthamine, homolycorine, tazettine and montanine (Fig. 3, Table 2). *R. bagnoldii* bulbs had the highest variety of skeleton types. Galanthamine-type alkaloids were present only in *R. bagnoldii*. *R. pratensis* presented crinine-type and homolycorine-type alkaloids, in addition to tazettine-type and montanine-type alkaloids. Meanwhile, only *R. volckmannii* and *R. bagnoldii* presented lycorine-type alkaloids.

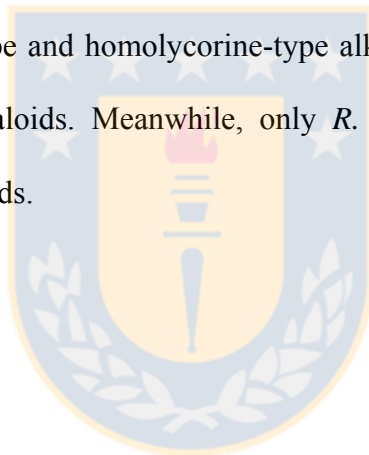


TABLE 1. Alkaloids in species of the genus *Rhodophiala*. / Alcaloides en especies del género *Rhodophiala*.

| RT ^a | Alkaloid (Skeleton type) | m/z (% relative intensity) | % ^b |
|--------------------------------------|--|---|----------------|
| <i>Rhodophiala bagnoldii</i>: | | | |
| 18.16 | A1 (Lycorine) | 269 (56), 268 (100), 241 (17), 224 (23), 209 (14), 207 (21), 196 (15), 182 (16), 167 (19), 84 (15) | 0.09 |
| 19.38 | A2 (Montanine) | 315 (87), 285 (53), 284 (55), 281 (33), 268 (45), 207 (63), 134 (100), 132 (55), 96 (36), 70 (40) | 0.10 |
| 19.49 | Galanthamine* (Galanthamine) | 288 (15), 287 (79), 286 (100), 270 (16), 244 (27), 230 (12), 216 (38), 174 (33), 128 (11), 115 (16) | 1.17 |
| 19.65 | A3 (Galanthamine) | 290 (10), 289 (59), 288 (100), 232 (7), 213 (6), 202 (10), 189 (7), 188 (8), 187 (9), 115 (10) | 5.05 |
| 20.05 | 1,2-didehydro-(3β)- Crinan-3-ol (Crinine) | 271 (100), 254 (25), 252 (27), 228 (28), 200 (26), 199 (80), 187 (65), 173 (25), 128 (27), 115 (29) | 0.47 |
| 20.10 | A4 (Homolycorine) | 285 (2), 284 (2), 207 (5), 115 (2), 110 (9), 109 (100), 108 (17), 94 (4), 93 (2), 77 (2) | 0.60 |
| 20.18 | A5 (Tazettine) | 315 (20), 300 (44), 232 (25), 231 (100), 230 | 0.48 |

| | | | |
|-------|-----------------------|---|-------|
| | | (19), 207 (18), 185 (17), 115 (21), 109 (59), 70 (68) | |
| 20.27 | A6 (Crinine) | 303 (100), 302 (26), 272 (46), 242 (22), 218 (37), 217 (38), 216 (20), 207 (23), 202 (21), 201 (30) | 0.15 |
| 20.36 | A7 (Crinine) | 288 (23), 287 (97), 244 (35), 217 (20), 216 (27), 215 (100), 203 (58), 189 (22), 128 (22), 115 (25) | 1.57 |
| 20.41 | A8 (Montanine) | 301 (100), 271 (38), 254 (53), 252 (33), 212 (31), 199 (43), 185 (68), 141 (35), 128 (31), 115 (38) | 1.06 |
| 20.62 | A9 (Crinine) | 290 (19), 289 (100), 288 (27), 272 (21), 260 (23), 218 (47), 217 (35), 216 (18), 202 (23), 201 (24) | 14.48 |
| 21.17 | A10 (Montanine) | 319 (23), 301 (100), 270 (88), 257 (36), 229 (24), 226 (28), 223 (26), 199 (21), 185 (31), 115 (22) | 27.23 |
| 21.42 | Tazettine (Tazettine) | 331 (24), 298 (18), 248 (16), 247 (100), 201 (16), 199 (15), 181 (13), 115 (15), 71 (21), 70 (23) | 7.27 |
| 21.64 | A11 (Lycorine) | 305 (16), 301 (15), 300 (14), 252 (14), 250 (16), 228 (18), 227 (78), 226 (100), 207 (22), 147 (17) | 0.47 |

| | | | |
|-------|------------------------|---|------|
| 22.28 | Lycorine (Lycorine) | 287 (19), 286 (16), 268 (20), 250 (16), 242 (11), 228 (13), 227 (63), 226 (100), 207 (11), 147 (11) | 1.77 |
| 22.97 | A12 (Homolycorine) | 281 (3), 207 (7), 193 (2), 165 (2), 110 (10), 109 (100), 108 (18), 94 (2), 82 (3), 81 (2) | 0.48 |
| 23.24 | Crinan-3-one (Crinine) | 284 (25), 281 (17), 271 (100), 270 (55), 240 (20), 211 (21), 207 (37), 181 (57), 153 (17), 152 (21) | 0.39 |

Rhodophiala pratensis:

| | | | |
|-------|-----------------------|---|------|
| 19.99 | A13 (Homolycorine) | 135 (5), 117 (7), 110 (10), 109 (100), 108 (16), 81 (5), 71 (4), 67 (4), 57 (8), 55 (7) | 1.06 |
| 20.06 | A14 (Tazettine) | 315 (18), 300 (38), 231 (100), 135 (27), 115 (25), 109 (27), 91 (19), 70 (79), 57 (19), 55 (27) | 0.57 |
| 20.23 | A15 (Crinine) | 269 (100), 240 (33), 212 (27), 186 (91), 185 (45), 135 (29), 128 (71), 127 (31), 115 (34), 55 (35) | 0.51 |
| 20.79 | A16 (Crinine) | 295 (24), 271 (100), 270 (44), 211 (24), 181 (85), 153 (27), 152 (31), 135 (26), 94 (38), 55 (25) | 0.66 |
| 21.07 | Montanine (Montanine) | 302 (23), 301 (100), 270 (91), 257 (36), 229 (26), 226 (31), 223 (29), 185 (36), 128 (24), 115 (28) | 5.90 |

| | | | |
|-------|-----------------------|---|------|
| 21.29 | Tazettine (Tazettine) | 331 (22), 298 (17), 248 (16), 247 (100), 201 (18), 199 (16), 181 (16), 115 (23), 71 (26), 70 (29) | 2.07 |
|-------|-----------------------|---|------|

| | | | |
|-------|------------------------|---|------|
| 23.06 | Crinan-3-one (Crinine) | 272 (21), 271 (100), 270 (44), 207 (29), 181 (65), 135 (29), 91 (25), 81 (21), 67 (24), 55 (30) | 0.30 |
|-------|------------------------|---|------|

Rhodophiala volckmannii:

| | | | |
|-------|----------------|--|------|
| 18.08 | A17 (Lycorine) | 269 (55), 268 (100), 135 (20), 91 (22), 83 (21), 77 (16), 69 (19), 67 (17), 57 (17), 55 (28) | 0.56 |
|-------|----------------|--|------|

| | | | |
|-------|---------------|---|------|
| 20.23 | A18 (Crinine) | 269 (92), 186 (91), 135 (78), 128 (68), 91 (59), 83 (58), 81 (64), 69 (69), 57 (56), 55 (100) | 0.28 |
|-------|---------------|---|------|

| | | | |
|-------|-----------------|---|------|
| 21.08 | A19 (Montanine) | 301 (100), 270 (94), 257 (36), 223 (40), 207 (36), 185 (47), 135 (46), 115 (43), 77 (37), 55 (56) | 2.02 |
|-------|-----------------|---|------|

| | | | |
|-------|-----------------------|---|------|
| 21.29 | Tazettine (Tazettine) | 331 (25), 298 (22), 248 (21), 247 (100), 135 (23), 115 (30), 71 (33), 70 (33), 57 (24), 55 (26) | 1.08 |
|-------|-----------------------|---|------|

^a RT: Retention time (min).

^b Percentage of the compound in the extract. Values are expressed as a percentage of the total ion chromatogram.

* Standard MS spectra.

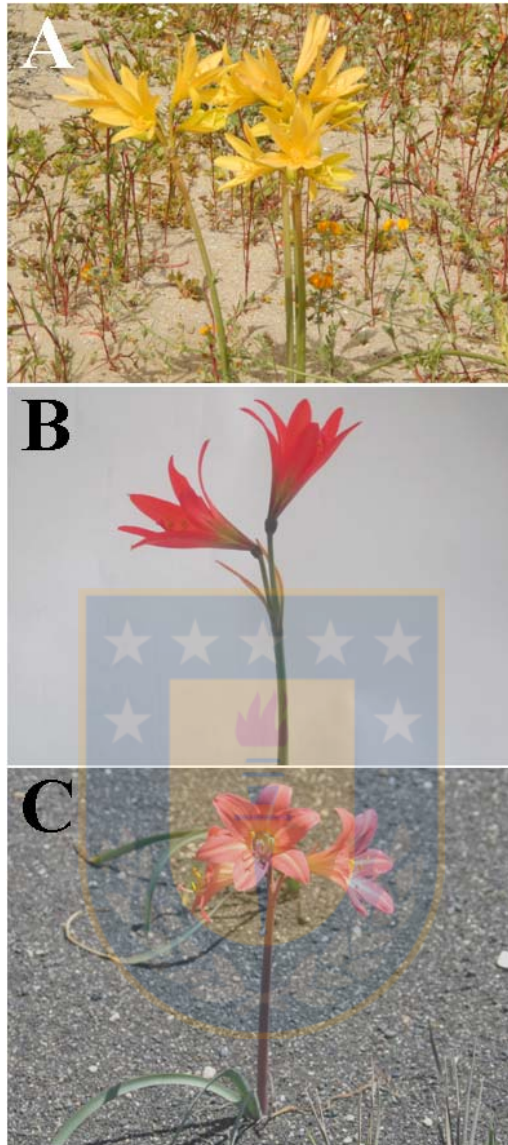


FIGURE 1. (A) *R. bagnoldii* in its natural habitat. (B) Flowers of *R. pratensis*. (C) *R. volckmannii* in its natural habitat (A and C: Photos by C. M. Baeza. B: Photo by I. Lizama-Bizama). / (A) *R. bagnoldii* en su habitat natural. (B) Flores de *R. pratensis*. (C) *R. volckmannii* en su habitat natural (A y C: Fotografías de C. M. Baeza. B: Fotografía de I. Lizama-Bizama).

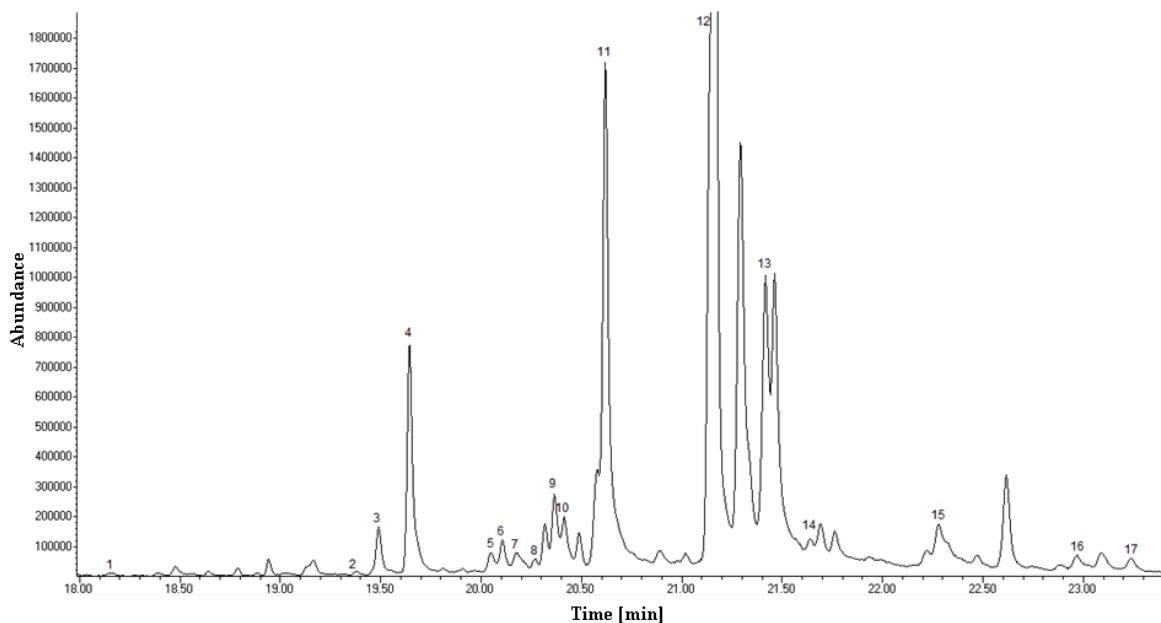


FIGURE 2. Representative chromatogram of extract for *R. bagnoldii*. 1: A1. 2: A2. 3: Galanthamine. 4: A3. 5: 1,2-didehydro-(3 β)-Crinan-3-ol. 6: A4. 7: A5. 8: A6. 9: A7. 10: A8. 11: A9. 12: A10. 13: Tazettine. 14: A11. 15: Lycorine. 16: A12. 17: Crinan-3-one. / Cromatograma representativo del extracto de *R. bagnoldii*. 1: A1. 2: A2. 3: Galantamina. 4: A3. 5: 1,2-didehidro-(3 β)-Crinan-3-ol. 6: A4. 7: A5. 8: A6. 9: A7. 10: A8. 11: A9. 12: A10. 13: Tazetina. 14: A11. 15: Licorina. 16: A12. 17: Crinan-3-ona.

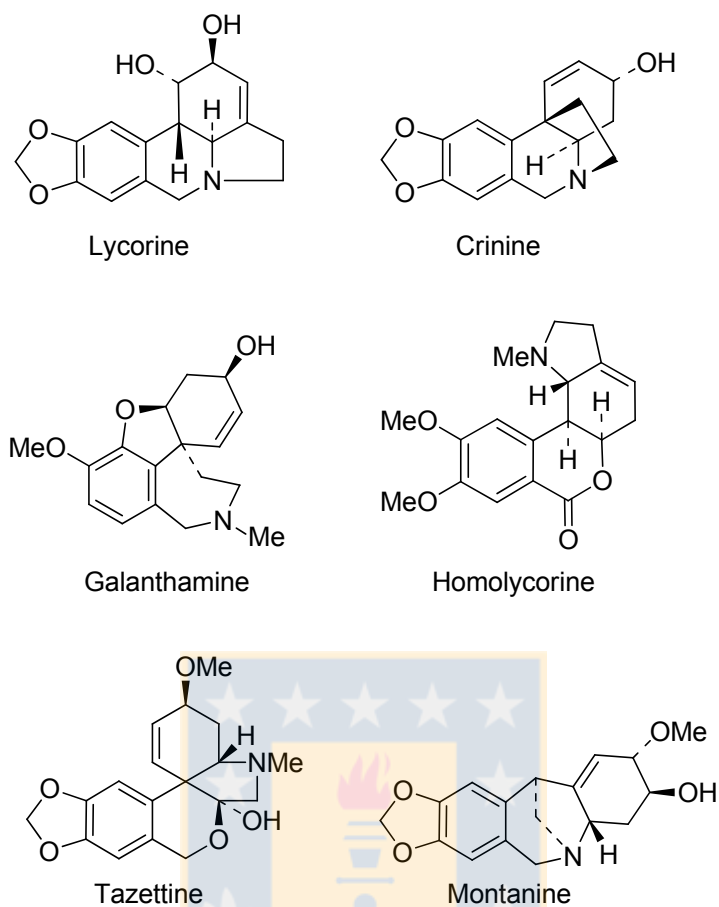


FIGURE 3. Types of Amaryllidaceae alkaloids identified in the extracts: lycorine, crinine, galanthamine, homolycorine, tazettine and montanine. / Tipos de alcaloides de Amaryllidaceae identificados en los extractos: licorina, crinina, galantamina, homolicorina, tazetina y montanina.

TABLE 2. Presence of different types of Amaryllidaceae alkaloids in the studied species. /
 Presencia de los diferentes tipos de alcaloides de Amaryllidaceae en las especies
 estudiadas.

| Skeleton type | <i>R. bagnoldii</i> | <i>R. pratensis</i> | <i>R. volckmannii</i> |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Crinine | ✓ | ✓ | ✓ |
| Galanthamine | ✓ | - | - |
| Homolycorine | ✓ | ✓ | - |
| Lycorine | ✓ | - | ✓ |
| Montanine | ✓ | ✓ | ✓ |
| Tazettine | ✓ | ✓ | ✓ |

DISCUSSION

The three species *R. bagnoldii*, *R. pratensis* and *R. volckmannii* share alkaloids with crinine, tazettine and montanine skeleton types (Table 2). The presence of these three skeleton types could be characteristic of the *Rhodophiala* genus, in comparison to other genera of Chilean Amaryllidoideae. On the other hand, only *R. bagnoldii* presented galanthamine-type alkaloids. The exclusive galanthamine-type alkaloids detected in *R. bagnoldii* could allow it to be chemotaxonomically differentiated. Lycorine-type alkaloids were absent only in *R. pratensis*, and homolycorine-type alkaloids were absent only in *R. volckmannii*. The absence and presence of these alkaloid types can be used as a chemotaxonomic tool for differentiating *Rhodophiala* species.

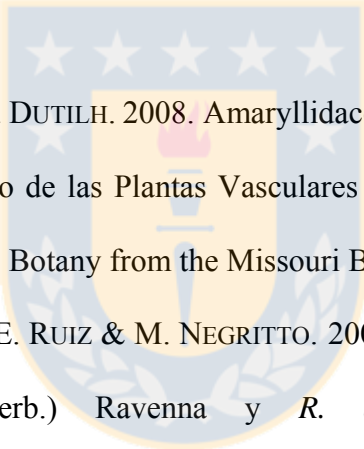
According to previous studies, lycorine-type, homolycorine-type and haemanthamine-type alkaloids were found in Chilean *Rhodophiala* species (Pacheco *et al.* 1982, Sepúlveda *et al.* 1982). In our study, only haemanthamine-type alkaloids were not found in the three analyzed species. Crinine-type, tazettine-type and montanine-type alkaloids shared by *R. bagnoldii*, *R. pratensis* and *R. volckmannii*, were not detected in the species studied by Pacheco *et al.* 1982 or Sepúlveda *et al.* 1982. These differences could be due to variations in separation and identification methods. Our study is the first to analyze Amaryllidaceae alkaloids of Chilean *Rhodophiala* by GC-MS.

Furthermore, it is important to mention that the alkaloid types identified in this genus have multiple biological properties reported in literature, and therefore these species can constitute new sources for products of medicinal importance.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Luis Astudillo (r.i.p.), University of Talca, for the donation of the galanthamine standard. I. L.-B. was funded by a CONICYT Scholarship for Doctorate studies in Chile, a CONICYT Scholarship for ending Thesis, a MECESUP Scholarship (UCO0708) for a Doctoral Internship abroad and with the funding from the Vice-rectory of Research and Development, University of Concepción.

REFERENCES

- 
- ARROYO-LEUENBERGER, S. & J. DUTILH. 2008. Amaryllidaceae. In: F. Zuloaga, O. Morrone & M. Belgrano (eds.), Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur, Vol. I, pp. 203-226. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 107, USA.
- BAEZA, C.M., C. MARIANGEL, E. RUIZ & M. NEGRITTO. 2009. El cariotipo fundamental en *Rhodolirium speciosum* (Herb.) Ravenna y *R. andicola* (Poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 66(1): 99-102.
- BAEZA, C., F. ALMENDRAS, E. RUIZ & P. PEÑAILILLO. 2012. Estudio comparativo del cariotipo en especies de *Miltinea* Ravenna, *Phycella* Lindl. y *Rhodophiala* C. Presl (Amaryllidaceae) de Chile. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo* 44(2): 193-205.
- BAEZA, C. M., P. PEÑAILILLO, P. NOVOA, M. ROSAS, V. L. FINOT & E. RUIZ. 2016. Recuentos cromosómicos en plantas que crecen en Chile. IV. *Gayana Botánica* 73(2): 183-190.
- BASTIDA, J., S. BERKOV, L. TORRAS, N.B. PIGNI, J.P. DE ANDRADE, V. MARTÍNEZ, C.

-
- CODINA & F. VILADOMAT. 2011. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: D. Muñoz-Torrero (ed.), Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, pp. 65-100. Transworld Research Network, Kerala, India.
- BERKOV, S., J. BASTIDA, B. SIDJIMOVA, F. VILADOMAT & C. CODINA. 2008. Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 638-645.
- CHASE, M.W., J.L. REVEAL, & M.F. FAY. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 132-136.
- DING, Y., D. QU, K.M. ZHANG, X.X. CANG, Z.N. KOU, W. XIAO & J.B. ZHU. 2017. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* 19(1): 53-100.
- FUENTES, L., F. SCHIAPPACASSE, R. HERRERA, P. PEÑAILILLO & H. VOGEL. 2007. Evaluación preliminar de las relaciones interespecíficas en *Rhodophiala* Presl. (Amaryllidaceae) mediante marcadores moleculares ISSR. *Agro Sur* 35(2): 47-49.
- MUÑOZ, M., P. SEEMANN, G. JARA & R. RIEGEL. 2009. Influence of vessel type, physical state of medium and temporary immersion on the micropropagation of three *Rhodophiala* species. *Chilean Journal of Agricultural Research* 69(4): 581-587.
- MUÑOZ-SCHICK, M. 1973. Complemento de "Las Especies de plantas descritas por R.A. Philippi en el siglo XIX". *Anales Universidad de Chile, serie 3*, 128: 5-69.
- PACHECO, P., M. SILVA, W. STEGLICH & W.H. WATSON. 1978. Alkaloids of Chilean Amaryllidaceae hippeastidine and epi-homolycorine. *Revista Latinoamericana de Química* 9: 28-32.
- PACHECO, P., M. SILVA, M. KIMURA & W.H. WATSON. 1981. Proanthocyanidins of

Hippeastrum ananuca I. Revista Latinoamericana de Química 12(1): 30-32.

PACHECO, P., M. SILVA, P.G. SAMMES & W.H. WATSON. 1982. Estudio químico en Amaryllidaceae chilenas II. Nuevos alcaloides de *Hippeastrum ananuca* Phil. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 27(2): 289-290.

PACHECO, P. & M. SILVA. 1992. Amaryllidaceae. In: O. Muñoz (ed.), Química de la flora de Chile, Serie de programas de desarrollo, Vol. 1, pp. 309-319. Departamento Técnico de Investigación, Universidad de Chile, Chile.

RAVENNA, P. 2003. Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. Botanica Australis 2: 1-21.

SCHIAPPACASSE, F., P. PEÑAILILLO & P. YÁÑEZ. 2002. Propagación de bulbosas chilenas ornamentales. Editorial Universidad de Talca, Chile. 65 pp.

SEPÚLVEDA, B.A., P. PACHECO, M.J. SILVA & R. ZEMELMAN. 1982. Alcaloides de Amarillidaceas chilensis III. Estudio químico y actividad biológica en *Hippeastrum bicolor* (R. et P.) Baker. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 27(2): 178-180.

CAPÍTULO II: ALCALOIDES DEL GÉNERO

PHYCELLA



Referencia:

Lizama-Bizama, I., Pérez, C., Baeza, C. M., Rosas, M., Uriarte, E. y J. Becerra. 2017.

Alkaloids from Chilean species of the genus *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae).

Enviada a Natural Product Research.



Alkaloids from Chilean species of the genus *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae)

Isabel Lizama-Bizama^a, Claudia Pérez^a, Carlos M. Baeza^a, Marcelo Rosas^a,
Eugenio Uriarte^b and José Becerra^{a,*}

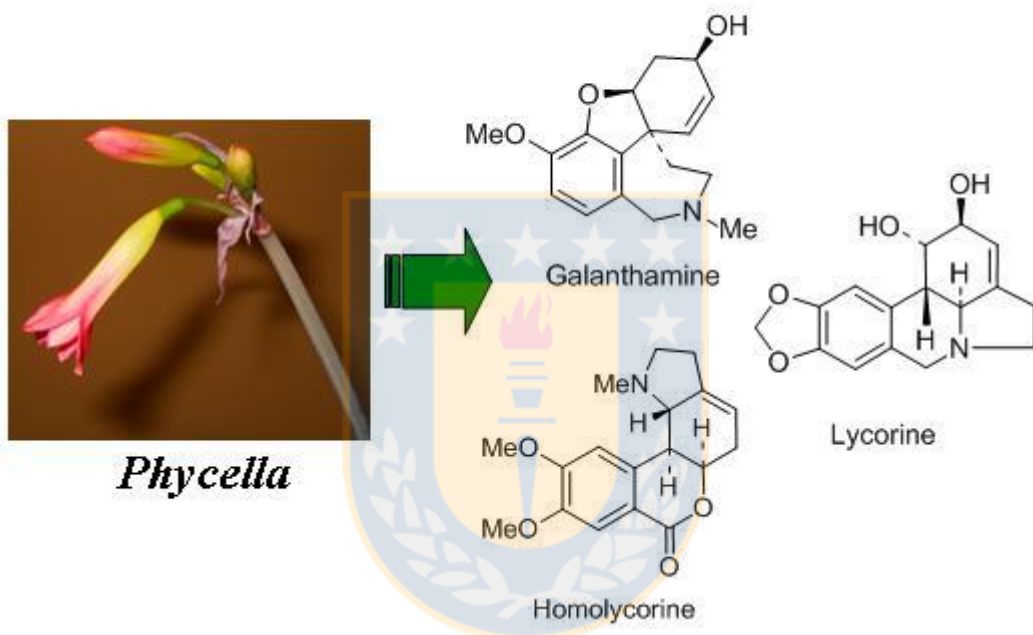
^a*Department of Botany, University of Concepción, Concepción, Chile;* ^b*Department of Organic Chemistry, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.*

*Corresponding author: Tel.: +56-41-2204114; Fax: +56-41-2221569; E-mail address:
jbecerra@udec.cl



GRAPHICAL ABSTRACT

Types of Amaryllidaceae Alkaloids shared by the species studied



Alkaloids from Chilean species of the genus *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae)

Extracts from three species of the native Chilean genus *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae) were analyzed by means of GC-MS. The aim of this work was to evaluate the utility of Amaryllidaceae alkaloids as taxonomic markers in order to differentiate species of this genus. This is the first chemical study for Chilean species of *Phycella*. Most common skeleton types alkaloids detected were galanthamine, lycorine and homolycorine, followed by the crinine-type skeleton, observed in both *P. australis* and *P. angustifolia*. Haemanthamine-type skeleton only was present in *P. angustifolia*. A total of 28 alkaloids were found and one of them was shared by the three species. This shared alkaloid was galanthamine, which is an important acetylcholinesterase inhibitor and it was in greater relative percentage in *P. aff. cyrtanthoides* (4.65 %).

Keywords: *Phycella*; Chilean species of Amaryllidaceae; alkaloids; GC-MS

1. INTRODUCTION

Plants of the subfamily Amaryllidoideae (Amaryllidaceae J. St.-Hil.) can biosynthesize structurally diverse alkaloids named Amaryllidaceae alkaloids and classified into nine skeleton types, for which the representative alkaloids are: norbelladine, lycorine,

homolycorine, crinine, haemanthamine, narciclasine, tazettine, montanine and galanthamine (Bastida et al. 2011). These metabolites are responsible for most of their medicinal properties, such as antitumor, antiviral, antimalarial, antibacterial, antifungal and immunostimulant activity; as well as inhibition of the acetylcholinesterase enzyme (Van Rijn et al. 2010; Iannello et al. 2014; Ding et al. 2017).

However, studies on the chemical nature of Amaryllidoideae plants native to Chile are scarce (Pacheco et al. 1982; Sepúlveda et al. 1982). In addition, Chilean Amaryllidaceae presents taxonomic problems due to their complex morphological variation (Baeza et al. 2009). The identification of alkaloids as chemosystematic tool has contributed to solve taxonomic problems of the amaryllidaceous species (Elgorashi et al. 2003; Berkov et al. 2008), nevertheless, in Chilean species this has not been yet utilized.

Phycella Lindl. is one of the Chilean genera of Amaryllidaceae (Ravenna 2003; Baeza et al. 2007; Arroyo-Leuenberger & Dutilh 2008). There are no chemical studies on the Chilean species of this genus. In order to differentiate species of the genus *Phycella* and given the proven usefulness of alkaloids as taxonomic markers in other species, the alkaloid profile of three species extracts was analyzed by GC-MS. Specifically, the alkaloid profile was determined for three populations of *Phycella* geographically separated, located in Northern, Central and Southern Chile and identified as *P. aff. cyrtanthoides*, *P. angustifolia* and *P. australis* respectively.

2. RESULTS AND DISCUSSION

In the extract from bulbs of *P. australis* seven alkaloids of four structural groups were detected. Two of them were identified, according to their mass spectra as galanthamine and

1,2-didehydro-(3 β)-crinan-3-ol (Figure 1, Table S1). From *P. aff. cyrtanthoides* extract, nine alkaloids of three structural types were detected and three of them were identified as galanthamine, 1-O-acetyl-lycorine and lycorine (Figure 1, Table S1). From *P. angustifolia* fourteen alkaloids of five structural types were detected. Galantamine, a known acetylcholinesterase inhibitor, was detected in the three species studied, being found in greater relative percentage (4.65 %) in the extract from *P. aff. cyrtanthoides*. In addition, major alkaloids are different for the three species: A3 in *P. australis*, A11 in *P. aff. cyrtanthoides* and A21 in *P. angustifolia*.

Alkaloids 1,2-didehydro-(3 β)-crinan-3-ol, A1, A2 and A3 were found exclusively in *P. australis*, so they could be chemotaxonomically used to differentiate this species from the other analyzed species. These alkaloids differ from the other compounds in their retention time and mass spectra. Six alkaloids were found exclusively in *P. aff. cyrtanthoides*: A6, A8, A9, 1-O-acetyl-lycorine, lycorine and A11. In turn, *P. angustifolia* presented the highest number of non-shared alkaloids: A12, A14, dihydrocrinine, A15, haemanthamine or crinamine, A16, A17, crinan-3-one and A19.

Although many alkaloids can be reliably determined through the GC-MS technique, it has been reported that haemanthamine suffers from thermal decomposition during chromatographic separation (Kreh et al. 1995; Gotti et al. 2006). As a result, it may have some degree of uncertainty respect to the identification of haemanthamine by means of this method (see Table S1) (Gotti et al. 2006). In addition, homolycorine-type alkaloids with $\Delta^{3,4}$ double bonds could not be identified without ambiguities, because they have M⁺ ions with low intensities (Kreh et al. 1995; Berkov et al. 2005).

Despite the advantages of the used method, compounds A1 to A21 were not identified due to the absence of similar spectra in both databases and available literature.

For a proper identification it will be necessary to purify these compounds and carry out further structural analysis on them. In any case, the exact structure of the different alkaloids was not considered essential in this work because the interest is to determine the presence or not of the same alkaloids in the analyzed species.

On the other hand, the alkaloids identified present mainly galanthamine, lycorine and homolycorine skeleton types (Table S1, Table S2, Figure 1). These types of alkaloids have diverse biological properties and some of them are of great impact in the pharmaceutical industry (Bastida et al. 2011; Ding et al. 2017).

3. CONCLUSIONS

The three studied species share alkaloids with galanthamine, lycorine and homolycorine skeleton types (Table S2). On the other hand, only *P. angustifolia* presented one haemanthamine-type alkaloid and only *P. australis* and *P. angustifolia* presented crinine-type alkaloids. Furthermore, exclusive alkaloids were detected in every species, that allow chemotaxonomically differentiate them. Also one alkaloid in common was detected (galanthamine), which would allow differentiating *Phycella* from other Chilean Amaryllidaceae genera. Thereby, this study provides further antecedents for the taxonomic classification of *Phycella* at both species and genus level.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

FUNDING

This work was supported by the CONICYT under a student Grant for Doctorate studies in Chile; MECESUP [grant number UCO0708].

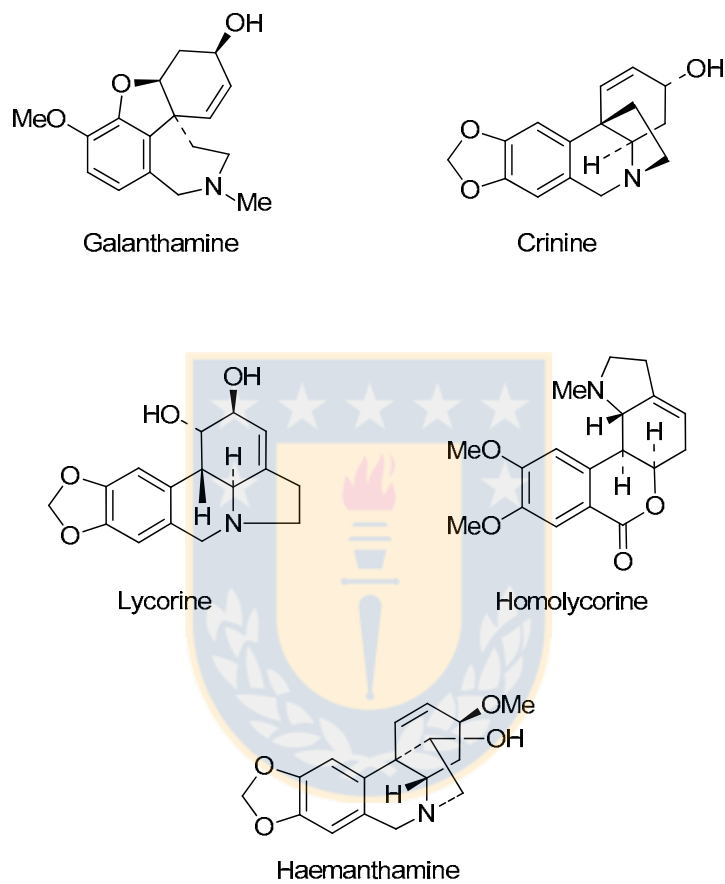
References

- Arroyo-Leuenberger S, Dutilh J. 2008. Amaryllidaceae. In: Zuloaga F, Morrone O, Belgrano M, editors. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur [Catalog of the vascular plants of the Southern Cone]. Volume 1. St. Louis, MO, USA: Missouri Botanical Garden; p. 203–226.
- Baeza CM, Ruiz E, Negritto M. 2007. El número cromosómico de *Phycella australis* Ravenna (Amaryllidaceae) [The chromosome number of *Phycella australis* Ravenna (Amaryllidaceae)]. *Gayana Bot.* 64:119–122.
- Baeza CM, Mariangel C, Ruiz E, Negritto M. 2009. El cariotipo fundamental en *Rhodolirium speciosum* (Herb.) Ravenna y *R. andicola* (Poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae) [The fundamental karyotype in *Rhodolirium speciosum* (Herb.) Ravenna and *R. andicola* (Poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae)]. *Gayana Bot.* 66:99–102.
- Bastida J, Berkov S, Torras L, Pigni NB, de Andrade JP, Martínez V, Codina C, Viladomat F. 2011. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: Muñoz-Torrero D, editor. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences. Kerala, India: Transworld Research Network; p. 65–100.

-
- Berkov S, Pavlov A, Ilieva M, Burrus M, Popov S, Stanilova M. 2005. CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their *in vitro* cultures. *Phytochem Anal.* 16:98–103.
- Berkov S, Bastida J, Sidjimova B, Viladomat F, Codina C. 2008. Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. *Biochem Syst Ecol.* 36:638–645.
- Ding Y, Qu D, Zhang KM, Cang XX, Kou ZN, Xiao W, Zhu JB. 2017. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *J Asian Nat Prod Res.* 19:53–100.
- Duffield AM, Aplin RT, Budzikiewicz H, Djerassi C, Murphy CF, Wildman WC. 1965. Mass spectrometry and stereochemical problems. LXXXII. A study of the fragmentation of some Amaryllidaceae alkaloids. *J Am Chem Soc.* 87:4902–4917.
- Elgorashi EE, Drewes SE, Morris C, van Staden J. 2003. Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. *Biochem Syst Ecol.* 31:601–615.
- Gotti R, Fiori J, Bartolini M, Cavrini V. 2006. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC-MS and capillary electrophoresis. *J Pharmaceut Biomed.* 42:17–24.
- Iannello C, Bastida J, Bonvicini F, Antognoni F, Gentilomi GA, Poli F. 2014. Chemical composition, and *in vitro* antibacterial and antifungal activity of an alkaloid extract from *Crinum angustum* Steud. *Nat Prod Res.* 28:704–710.
- Kreh M, Matusch R, Witte L. 1995. Capillary gas chromatography–mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry.* 38:773–776.

-
- Pacheco P, Silva M, Sammes PG, Watson WH. 1982. Estudio químico en Amaryllidaceae chilenas II. Nuevos alcaloides de *Hippeastrum ananuca* Phil. [Chemical study of Chilean Amaryllidaceae II. New alkaloids from *Hippeastrum ananuca* Phil.] Bol Soc Chil Quím. 27:289–290.
- Ravenna P. 2003. Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. Botanica Australis. 2:1–21.
- Sepúlveda BA, Pacheco P, Silva MJ, Zemelman R. 1982. Alcaloides de Amaryllidaceae chilenas III. Estudio químico y actividad biológica en *Hippeastrum bicolor* (R. et P.) Baker [Alkaloids of Chilean Amaryllidaceae III. Chemical study and biological activity of *Hippeastrum bicolor* (R. et P.) Baker]. Bol Soc Chil Quím. 27:178–180.
- Van Rijn RM, Rhee IK, Verpoorte R. 2010. Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*. Nat Prod Res. 24:222–225.

Figure 1. Alkaloid types identified in the extracts: galanthamine, crinine, lycorine, homolycorine and haemanthamine.



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Alkaloids from Chilean species of the genus *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae)

Isabel Lizama-Bizama^a, Claudia Pérez^a, Carlos M. Baeza^a, Marcelo Rosas^a,
Eugenio Uriarte^b and José Becerra^{a,*}

^aDepartment of Botany, University of Concepción, Concepción, Chile; ^bDepartment of Organic Chemistry, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

*Corresponding author: Tel.: +56-41-2204114; Fax: +56-41-2221569; E-mail address: jbecerra@udec.cl

Abstract

Extracts from three species of the native Chilean genus *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae) were analyzed by means of GC-MS. The aims of this work were to analyze the alkaloids profile of the native genus *Phycella*, compare this chemical pattern with morphologically related species and evaluate the utility of these alkaloids as taxonomic markers in order to differentiate species of this genus. This is the first chemical study for Chilean species of *Phycella*. Most common skeleton types alkaloids detected were galanthamine, lycorine and homolycorine, followed by the crinine-type skeleton, observed in both *P. australis* and *P. angustifolia*. Haemanthamine-type skeleton only was present in *P. angustifolia*. A total of 28 alkaloids were found and one of them was shared by the three species. This shared

alkaloid was galanthamine, which is an important acetylcholinesterase inhibitor and it was in greater percentage in *P. aff. cyrtanthoides* (4.65 %).

Keywords: *Phycella*; Chilean species of Amaryllidaceae; alkaloids; GC-MS.

EXPERIMENTAL

Plant material

Plants of *P. aff. cyrtanthoides*, *P. angustifolia* and *P. australis* were collected. *P. aff. cyrtanthoides* was collected at Las Tacas, Coquimbo Region in September 2009, *P. angustifolia* was collected at Altos de Abrantes, Santiago Metropolitan Region in November 2010 and *P. australis* at Concepción, Bío-Bío Region in October 2010. Collections were performed in the blooming periods of these species. Specimens of each species were deposited as backup at the herbarium of the University of Concepción (CONC), Concepción, Chile, and registered with numbers CONC 146515 (*P. aff. cyrtanthoides*), CONC 146514 (*P. angustifolia*) and CONC 184328 (*P. australis*). Bulbs were separated from the flower scapes, from leaves and roots. Then, they were chopped for its maceration.

Alkaloid extraction

Fresh bulbs (140 g of *P. aff. cyrtanthoides*, 19 g of *P. angustifolia* and 95 g of *P. australis*) were extracted three times with MeOH (350 mL) at room temperature for 72 h. The solvent

was evaporated under reduced pressure and the residue dissolved in 0.1 N HCl (100 mL). The extracts were defatted three times with CH₂Cl₂ (20 mL). The solvent was evaporated under reduced pressure. The extracts were basified with 25 % ammonia solution and the alkaloids extracted with CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). The organic solvent was evaporated (26 mg of *P. aff. cyrtanthoides* extract, 46 mg of *P. angustifolia* extract and 134 mg of *P. australis* extract) and 10 mg of each alkaloid extract was dissolved in CHCl₃ to a final concentration of 10 mg/mL for further analysis.

GC-MS analysis

The GC-MS analysis of underivatized alkaloids from *P. australis*, *P. aff. cyrtanthoides* and *P. angustifolia* was carried out on a gas chromatograph (Agilent 7890A) with a splitless injector (250 °C) and a mass detector (Agilent 5975C). A HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) and helium gas (constant flow 1 mL/min) were used for separation. The temperature program was: 5 min hold at 100 °C, 100-275 °C at 13 °C/min and 32 min hold at 275 °C. Detection range was *m/z* 50-550. The injector temperature was 250 °C. The identification of the alkaloid components was accomplished by matching their mass spectra with those recorded in the NIST 05 (NIST /EPA/NIH MASS 2005 Spectral Library) and by comparing the obtained spectra with those reported in the literature. NIST 05 collects representative alkaloids of all the skeletons referenced. The structure of an alkaloid is assigned when the overlap is above 90% with the database. The skeleton of unidentified compounds was proposed according to the highest index of similarity to any of those listed in the database. Furthermore a standard was used for galanthamine identification.

The percentage of the compounds in the extracts was calculated in basis of the total area of the GC-MS peaks (Berkov et al. 2008).



TABLES

Table S1. Alkaloids in species of the genus *Phycella*.

| RT ^a | Alkaloid (Skeleton type) | <i>m/z</i> (% relative intensity) | % ^b |
|-----------------------------|--|---|----------------|
| <i>Phycella australis</i> : | | | |
| 19.49 | Galanthamine ^{1,2} (Galanthamine) | 287(81), 286(100), 270(19), 244(29), 216(34), 207(25), 174(30), 165(24), 115(22), 77(23) | 0.14 |
| 20.05 | 1, 2-didehydro-(3 β)-Crinan-3- ol ² (Crinine) | 271(100), 201(19), 200(25), 199(73), 187(61), 173(20), 172(19), 129(22), 128(25), 115(26) | 0.53 |
| 20.32 | A1 (Lycorine) | 281(39), 269(26), 252(21), 251(40), 250(100), 207(34), 191(21), 186(28), 128(20), 96(24) | 0.13 |
| 20.62 | A2 (Crinine) | 289(100), 288(22), 272(22), 267(23), 218(52), 217(35), 207(33), 202(23), 190(24), 149(50) | 0.18 |
| 23.82 | A3 (Homolycorine) | 162(3), 134(2), 126(8), 125(100), 124(9), 97(3), 96(36), 94(4), 82(3), 81(3) | 59.67 |
| 24.65 | A4 (Homolycorine) | 178(2), 126(8), 125(100), 124(8), 97(2), 96(32), 95(2), 94(4), 82(3), 81(3) | 10.05 |

| | | | |
|-------|-------------------|---|-------|
| 26.28 | A5 (Homolycorine) | 126(8), 125(100), 124(7), 97(2), 96(29), 95(2), 94(3), 82(2), 81(2), 77(2) | 15.35 |
|-------|-------------------|---|-------|

Phycella aff. cyrtanthoides:

| | | | |
|-------|--|---|------|
| 19.49 | Galanthamine ^{1,2} (Galanthamine) | 288(14), 287(80), 286(100), 270(13), 244(23), 230(13), 216(36), 174(30), 165(10), 115(15) | 4.65 |
| 19.64 | A6 (Galanthamine) | 285(62), 284(100), 273(60), 272(61), 266(25), 216(19), 202(27), 160(31), 115(26), 69(20) | 0.64 |
| 20.11 | A7 (Homolycorine) | 285(4), 284(5), 207(3), 110(9), 109(100), 108(15), 85(7), 82(3), 71(11), 69(3) | 1.35 |
| 20.32 | A8 (Lycorine) | 252(6), 251(42), 250(100), 193(4), 192(12), 191(12), 190(4), 124(9), 109(25), 96(9) | 0.74 |
| 20.86 | A9 (Homolycorine) | 330(4), 221(7), 110(9), 109(100), 108(12), 85(8), 83(4), 82(4), 71(11), 69(4) | 0.91 |
| 21.99 | 1-O-acetyl-Lycorine ² (Lycorine) | 329(25), 281(15), 268(26), 250(18), 227(57), 226(100), 207(37), 97(14), 73(15), 69 (16) | 0.27 |
| 22.28 | Lycorine ² (Lycorine) | 287(21), 286(15), 268(20), 263(9), 250(14), 228(10), 227(63), 226(100), 147(10), 111(8) | 2.07 |

| | | | |
|-------|--------------------|---|------|
| 22.97 | A10 (Homolycorine) | 207(4), 149(2), 110(9), 109(100), 108(18), 94(3), 93(2), 82(3), 81(3), 69(4) | 0.98 |
|-------|--------------------|---|------|

| | | | |
|-------|----------------|---|------|
| 25.57 | A11 (Lycorine) | 373(21), 270(11), 269(10), 268(33), 252(12), 250(19), 240(11), 228(11), 227(70), 226(100) | 8.10 |
|-------|----------------|---|------|

Phycella angustifolia:

| | | | |
|-------|---|---|------|
| 19.49 | Galanthamine ^{1,2} (Galanthamine) | 288(14), 287(79), 286(100), 270(14), 244(23), 230(13), 216(38), 200(14), 174(35), 115(19) | 2.15 |
|-------|---|---|------|

| | | | |
|-------|----------------|--|------|
| 19.64 | A12 (Lycorine) | 290(10), 289(51), 288(100), 285(11), 284(18), 213(9), 202(9), 187(10), 174(8), 115(14) | 0.82 |
|-------|----------------|--|------|

| | | | |
|-------|--------------------|--|------|
| 20.11 | A13 (Homolycorine) | 285(3), 281(5), 224(4), 223(3), 207(7), 110(9), 109(100), 108(15), 94(5), 82(4) | 0.23 |
|-------|--------------------|--|------|

| | | | |
|-------|----------------|---|------|
| 20.32 | A14 (Lycorine) | 347(26), 316(19), 251(36), 250(100), 207(40), 192(19), 128(18), 115(22), 96(19), 95(21) | 0.11 |
|-------|----------------|---|------|

| | | | |
|-------|---------------------------------------|---|------|
| 20.37 | Dihydrocrinine ² (Crinine) | 273(100), 272(22), 256(30), 244(18), 226(21), 202(19), 201(52), 200(34), 185(27), 115(24) | 4.72 |
|-------|---------------------------------------|---|------|

| | | | |
|-------|--------------------|---|------|
| 20.49 | A15 (Homolycorine) | 330(3), 273(4), 221(6), 207(2), 201(3), 115(2), 110(8), 109(100), 108(14), 94(3) | 0.76 |
|-------|--------------------|---|------|

| | | | |
|-------|---|---|-------|
| 20.96 | Haemanthamine or Crinamine ^{2,3} (Haemanthamine) | 301(64), 272(40), 269(45), 257(58), 227(77), 225(100), 224(65), 211(42), 181(96), 115(47) | 0.47 |
| 21.29 | A16 (Haemanthamine) | 273(19), 272(100), 242(14), 240(15), 214(13), 212(14), 211(15), 186(13), 181(26), 128(12) | 11.22 |
| 22.27 | A17 (Lycorine) | 287(24), 286(20), 282(20), 281(27), 227(70), 226(100), 207(70), 177(19), 96(29), 73(26) | 0.20 |
| 22.97 | A18 (Homolycorine) | 207(5), 147(2), 110(8), 109(100), 108(18), 96(2), 94(3), 82(2), 81(2), 73(2) | 0.51 |
| 23.24 | Crinan-3-one ² (Crinine) | 272(17), 271(100), 270(40), 240(11), 238(9), 211(19), 182(9), 181(52), 153(12), 152(12) | 4.52 |
| 23.70 | A19 (Homolycorine) | 207(9), 126(8), 125(100), 124(9), 109(30), 108(9), 96(38), 94(9), 82(6), 81(6) | 0.63 |
| 24.61 | A20 (Homolycorine) | 178(2), 126(9), 125(100), 124(9), 97(2), 96(32), 94(4), 82(3), 81(3), 77(2) | 6.66 |
| 26.34 | A21 (Homolycorine) | 177(2), 126(8), 125(100), 124(7), 97(2), 96(29), 95(2), 94(4), 82(2), 81(2) | 58.10 |

^a RT: Retention time (min).

^b Percentage of the compound in the extract. Values are expressed as a percentage of the total ion chromatogram.

References: ¹ Standard MS spectra, ² NIST 05 and ³ Duffield et al. 1965.



Table S2. Types of Amaryllidaceae alkaloids identified in *Phycella* species studied.

| Skeleton type | <i>P. australis</i> | <i>P. aff. cyrtanthoides</i> | <i>P. angustifolia</i> |
|----------------------|---------------------|------------------------------|------------------------|
| Crinine | ✓ | - | ✓ |
| Galanthamine | ✓ | ✓ | ✓ |
| Haemanthamine | - | - | ✓ |
| Homolycorine | ✓ | ✓ | ✓ |
| Lycorine | ✓ | ✓ | ✓ |



CAPÍTULO III: ALCALOIDES DEL GÉNERO

RHODOLIRIUM



Referencia:

Lizama-Bizama, I., Pérez, C., Baeza, C. M., Rosas, M., Uriarte, E. y J. Becerra. 2017.

Alcaloides de especies chilenas del género *Rhodolirium* Phil. (Amaryllidaceae).

En preparación.



Alcaloides de especies chilenas del género *Rhodolirium*

Phil. (Amaryllidaceae)

Alkaloids from Chilean species of the genus *Rhodolirium*

Phil. (Amaryllidaceae)

RESUMEN

En Chile se han identificado más de 30 especies nativas de la subfamilia Amaryllidoideae (Amaryllidaceae). Esta subfamilia se caracteriza por biosintetizar alcaloides específicos de estas monocotiledóneas, y que presentan un amplio espectro de propiedades medicinales. Estos alcaloides también se han utilizado como herramienta quimiotaxonómica para diferenciar especies de Amaryllidoideae nativas de otros países.

Ya que la taxonomía de las Amaryllidoideae chilenas actualmente se encuentra en revisión, el presente trabajo tiene como objetivo comparar quimiotaxonómicamente especies endémicas del género *Rhodolirium*. Para tal fin, se analizó la química de sus alcaloides. Los extractos alcaloideos se obtuvieron a partir de bulbos de *R. laetum*, *R. montanum* y *R. speciosum*. Posteriormente, los extractos fueron analizados por GC-MS. Los alcaloides fueron caracterizados según su tiempo de retención y su espectro de masas.

Se detectaron seis alcaloides en *Rhodolirium laetum*, seis alcaloides en *R. montanum* y tres alcaloides en *R. speciosum*. Estos alcaloides se clasifican dentro de cinco

tipos estructurales: crinina, galantamina, homolicorina, licorina y tazetina. Todas las especies estudiadas presentaron diversos perfiles alcaloídeos, lo cual permite diferenciarlas quimiotaquímicamente.

INTRODUCCIÓN

Rhodolirium Phil. es uno de los géneros nativos de Amaryllidaceae en Chile. Hay cinco a seis especies descritas (Ravenna 2003, Baeza *et al.* 2009, Muñoz *et al.* 2011, Baeza *et al.* 2017) distribuídas en Chile desde la costa norteña hasta la Provincia de Osorno en el sur y en Argentina desde la zona costera hasta el lado este de los Andes, entre los 150 y 2500 m de altitud (Ravenna 2003).

Este género se caracteriza por presentar una inflorescencia con una a varias flores; perigonio infundibuliforme en la mitad inferior y ampliamente expandido en la parte superior; estigma capitado o capitado-trilobulado, húmedo; el fruto es una cápsula globosa-tricoca; semillas planas cubiertas con una membrana negra (Ravenna 2003).

Además, el género *Rhodolirium* pertenece a la subfamilia Amaryllidoideae. Esta subfamilia se caracteriza por biosintetizar alcaloides con importantes efectos en sistemas biológicos (Bastida *et al.* 2011), destacando sus actividades anti-cáncer y su actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa (Ding *et al.* 2017). Estos alcaloides se denominan “Alcaloides de Amaryllidaceae” por encontrarse casi exclusivamente en las especies de esta subfamilia (Takos y Rook 2013). Se clasifican en nueve tipos estructurales denominados: norbeladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y galantamina (Bastida *et al.* 2011).

En Chile, las Amaryllidoideae se distribuyen desde la Región de Arica y Parinacota a la Región de Los Lagos y se han identificado más de 30 especies nativas (Arroyo-Leuenberger y Dutilh 2008, Ravenna 2003). A pesar de esta variedad en especies, sólo se ha estudiado la química de alcaloides en dos especies nativas del género *Rhodophiala* C. Presl (Pacheco *et al.* 1982, Sepúlveda *et al.* 1982). Además, estudios previos en géneros de otros países, indican que los alcaloides de Amaryllidaceae pueden ser usados como una potencial herramienta quimiotaxonómica para diferenciar especies (Elgorashi *et al.* 2003, Berkov *et al.* 2008). Este hecho es de particular importancia cuando los caracteres morfológicos no son suficientes para delimitar taxones, como es el caso de ciertos géneros y especies de Amaryllidoideae chilenas (Baeza *et al.* 2009, Muñoz *et al.* 2011). Considerando estos problemas taxonómicos, los alcaloides de Amaryllidaceae pueden aportar como caracteres químicos (Hegnauer 1963) para diferenciar especies nativas chilenas.

El presente trabajo tiene como objetivo comparar quimiotaxonómicamente tres especies endémicas del género *Rhodolirium* Phil.: *R. laetum* (Phil.) Ravenna, *R. montanum* Phil. y *R. speciosum* (Herb.) Ravenna.

Rhodolirium laetum (Phil.) Ravenna [= *Rhodophiala laeta* Phil.] es una especie endémica de Chile que crece en las Regiones de Antofagasta y Atacama, sobre los 1000 m de altura (Arroyo-Leuenberger y Dutilh 2008) (Fig. 1). Presenta flores con 6 tépalos elíptico-lanceolados, reflexos, de 4 a 7 cm de largo (Baeza *et al.* 2017). Estas flores pueden ser de color rosado fuerte o fucsia, a veces con los nervios un poco más oscuros (Baeza *et al.* 2017). El estilo es algo más largo que los estambres y termina en un estigma capitado (Baeza *et al.* 2017).

Rhodolirium montanum Phil. [= *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub] es una especie endémica de Chile y Argentina. En Chile, se localiza en la Región Metropolitana de Santiago y en las Regiones de O'Higgins y del Maule, entre los 2000 y 2700 m de altura (Arroyo-Leuenberger y Dutilh 2008) (Fig. 2).

Rhodolirium speciosum (Herb.) Ravenna es una especie endémica de Chile que se distribuye principalmente en el valle central de las Regiones del Bío-Bío y de La Araucanía (Baeza *et al.* 2009). Su flores son acampanadas, rojo-amarillentas y con los tépalos reflejos (Baeza *et al.* 2009) (Fig. 3).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se recolectaron ejemplares de *R. laetum*, *R. montanum* y *R. speciosum*. *Rhodolirium laetum* fue recolectada en la Provincia de Antofagasta, Región de Antofagasta, en octubre de 2010, *R. montanum*, en la Provincia de Curicó, Región del Maule, en febrero de 2011 y *R. speciosum*, en la Provincia de Concepción, Región del Bío-Bío, en octubre de 2011. Las recolecciones se llevaron a cabo en los períodos de floración de estas especies. Se depositaron ejemplares de cada especie como respaldo en el Herbario de la Universidad de Concepción (CONC). Los bulbos fueron separados de los escapos florales, de las hojas y de las raíces y se trozaron para su maceración.

Extracción de alcaloides y separación

Los bulbos frescos (26 g de *R. laetum*, 52 g de *R. montanum* y 214 g de *R. speciosum*) fueron macerados hasta agotamiento en HCl 0,1 N por 72 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el extracto crudo fue filtrado y extraído tres veces con diclorometano (CH_2Cl_2) en una proporción 5:1, extracto crudo: CH_2Cl_2 .

Luego el extracto de alcaloides se basificó con NH_4OH 25% hasta alcanzar un pH superior a 10. Los alcaloides fueron extraídos con CH_2Cl_2 . El solvente fue evaporado en rotavapor a 40 °C bajo presión reducida y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El rendimiento de los extractos fue de 0,09% para *R. laetum*, 0,18% para *R. montanum* y 0,11% para *R. speciosum*, obteniéndose 22, 94 y 241 mg de extracto respectivamente.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

La composición de cada extracto fue determinada en un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masa (Agilent 7890) equipado con un inyector automático Agilent y usando una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno, con una película de 0,25 μm de espesor). El programa de temperatura comenzó con 100 °C por 5 min y luego tuvo un incremento de 5 °C/min hasta llegar a 275 °C, temperatura mantenida por 25 min. La temperatura del bloque de inyección fue de 250 °C. Se inyectó 1 μl de la muestra. Los porcentajes relativos de los componentes del extracto fueron obtenidos usando Helio como gas portador con un flujo de 1 ml/min a volumen constante en un detector de masa (Agilent 5975). Se identificaron los alcaloides utilizando la base de datos Nist/EPA/NIH MASS 2005 Spectral Library (NIST 05). Los compuestos representativos de los 9 tipos estructurales de los alcaloides de Amaryllidaceae están incluidos en NIST 05.

La estructura de un alcaloide se asignó cuando el porcentaje de similitud con la base de datos era mayor al 90%. Los compuestos no identificados se clasificaron en los tipos estructurales de acuerdo al mayor porcentaje de similitud que presentaron con aquellos encontrados en la base de datos. Además, se utilizó un estándar para la identificación de galantamina.

El porcentaje de los compuestos en los extractos fue calculado en función del área de los picos del CG-EM, la cual depende de la concentración de los compuestos correspondientes y de la intensidad de su fragmentación espectral de masas (Berkov *et al.* 2008).



RESULTADOS

Se analizaron extractos alcaloideos correspondientes a tres especies de *Rhodolirium* (Fig. 1 a 3), de un total de cinco a seis especies incluidas en este género (Ravenna 2003, Baeza *et al.* 2009, Muñoz *et al.* 2011, Baeza *et al.* 2017). En la separación cromatográfica los alcaloides aparecen entre los minutos 19 y 27 (Tabla 1).

Los análisis mediante espectrometría de masas indicaron que las tres especies presentan los esqueletos tipo galantamina, homolicorina, crinina, tazetina y licorina (Fig. 4, Tabla 1 y 2). Los bulbos de *R. montanum* presentaron la mayor variedad de esqueletos.

Las tres especies comparten compuestos con esqueleto tipo homolicorina (Tabla 2), correspondientes a los alcaloides A2, A3, A4, A5, A7 y A8 (Tabla 1). *R. laetum* presenta la mayor diversidad en alcaloides tipo homolicorina. Además, *R. laetum* y *R. montanum* comparten la mayor cantidad de tipos de alcaloides: galantamina, homolicorina y licorina. Por otra parte, los alcaloides de tipo tazetina sólo estuvieron presentes en *R. montanum*.

Los alcaloides mayoritarios son diferentes para cada especie: un alcaloide con esqueleto tipo galantamina (alcaloide A1) en *R. laetum*, uno tipo tazetina (alcaloide tazetina) en *R. montanum* y uno tipo homolicorina (alcaloide A8) en *R. speciosum*.

Las especies *R. laetum* y *R. montanum* comparten específicamente el alcaloide galantamina.

Si bien, al analizar según el tipo de alcaloide las tres especies estudiadas presentan tipos en común, se encontraron alcaloides específicos en cada una de ellas. Por lo tanto, el perfil alcaloideo fue diferente entre estas especies.

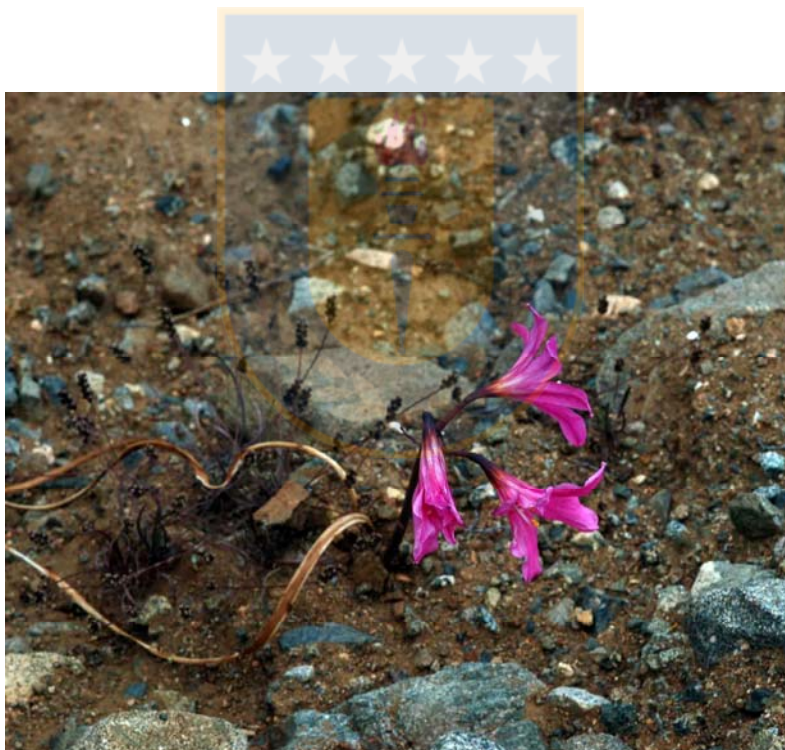


Figura 1. *Rhodolirium laetum* en su hábitat natural, Región de Antofagasta, Chile.



Figura 2. *Rhodolirium montanum* Phil. [= *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub] en su ambiente natural (Fotografías extraídas de Arroyo-Leueninger y Dutilh 2008).



Figura 3. Inflorescencias de *Rhodolirium speciosum*: vista frontal (izquierda), vista ventral (centro) y vista lateral (derecha). Fotografías de I. Lizama-Bizama.

Figura 4. Tipos de alcaloides identificados en los extractos: crinina, galantamina, homolicorina, licorina y tazetina.

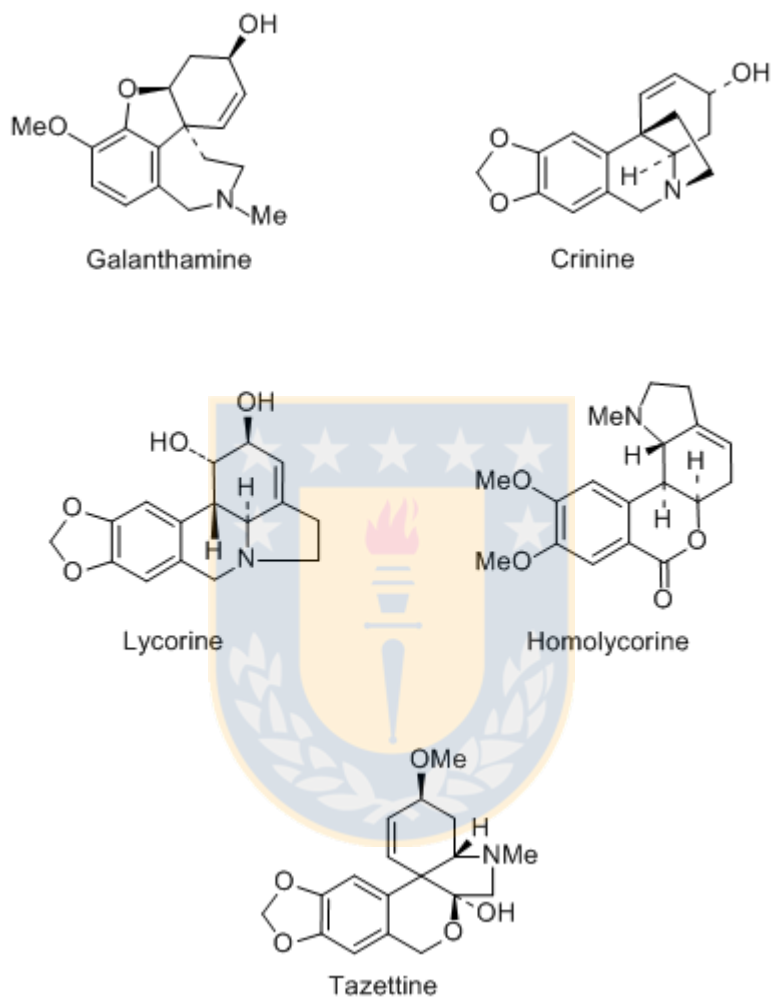


Tabla 1. Alcaloides en especies del género *Rhodolirium*.

| TR ^a | Alcaloide (Tipo de esqueleto) | m/z (% intensidad relativa) | % ^b |
|-----------------------------------|---|--|----------------|
| <i>Rhodolirium laetum</i>: | | | |
| 19,49 | Galantamina ^{1,2} (Galantamina) | 287(77), 286(100), 270(16), 244(27), 230(16), 216(35), 207(22), 174(28), 115(18), 109(17) | 0,16 |
| 19,66 | A1 (Galantamina) | 290(10), 289(58), 288(100), 232(7), 213(6), 202(10), 189(7), 188(7), 187(8), 115(9) | 13,64 |
| 20,49 | A2 (Homolicorina) | 330(4), 329(4), 275(3), 274(4), 221(6), 207(2), 110(9), 109(100), 108(13), 94(2) | 0,52 |
| 22,29 | Licorina ² (Licorina) | 287(23), 286(16), 268(19), 252(6), 250(15), 228(10), 227(63), 226(100), 147(11), 111(7) | 3,07 |
| 22,97 | A3 (Homolicorina) | 207(2), 115(1), 110(8), 109(100), 108(18), 94(3), 93(2), 82(3), 81(2), 67(1) | 1,11 |
| 23,71 | A4 (Homolicorina) | 207(4), 162(4), 126(9), 125(100), 124(9), 109(5), 96(36), 94(5), 82(3), 81(3) | 0,72 |

Rhodolirium montanum:

| | | | |
|-------|---|--|-------|
| 19,49 | Galantamina ^{1,2} (Galantamina) | 287(79), 286(100), 270(15), 256(13), 255(16), 244(24), 230(15), 216(42), 174(34), 115(19) | 0,27 |
| 20,10 | A5 (Homolicorina) | 238(3), 222(1), 207(3), 164(1), 110(8), 109(100), 108(16), 94(3), 93(2), 82(2) | 0,62 |
| 21,47 | Tazetina ² (Tazetina) | 331(28), 316(13), 298(20), 248(15), 247(100), 201(15), 199(13), 115(13), 71(13), 70(16) | 63,29 |
| 22,28 | A6 (Licorina) | 287(21), 286(13), 268(23), 250(22), 238(16), 227(58), 226(100), 207(24), 147(13), 77(12) | 0,23 |
| 22,90 | 3-Epimacronina ² (Tazetina) | 329(22), 314(18), 255(20), 246(16), 245(100), 244(24), 241(15), 225(17), 201(72), 197(15) | 2,20 |
| 23,24 | Crinan-3-ona ² (Crinina) | 272(18), 271(100), 270(39), 240(10), 238(9), 211(20), 182(9), 181(53), 153(13), 152(13) | 1,81 |

Rhodolirium speciosum:

| | | | |
|-------|--|---|-------|
| 20,87 | O-Acetildihidrocrinina ² (Crinina) | 315(100), 256(91), 254(25), 227(37), 226(57), 201(28), 200(30), 185(31), 115(23), 71(23) | 2,47 |
| 23,72 | A7 (Homolicorina) | 162(3), 126(9), 125(100), 124(9), 109(3), 97(3), 96(35), 94(4), 82(3), 81(3) | 4,79 |
| 26,24 | A8 (Homolicorina) | 126(8), 125(100), 124(7), 109(2), 97(2), 96(29), 95(2), 94(3), 82(2), 81(2) | 10,67 |

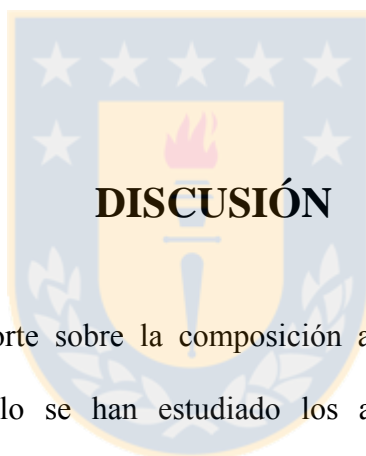
^a TR: Tiempo de retención (min).

^b Porcentaje del compuesto en el extracto. Los valores son expresados como un porcentaje del cromatograma total de iones.

Referencias: ¹ Espectro de EM del estándar y ² NIST 05.

Tabla 2. Tipos de alcaloides de Amaryllidaceae identificados en las tres especies de *Rhodolirium* estudiadas.

| Tipo de Esqueleto | <i>R. laetum</i> | <i>R. montanum</i> | <i>R. speciosum</i> |
|-------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| Crinina | - | ✓ | ✓ |
| Galantamina | ✓ | ✓ | - |
| Homolicorina | ✓ | ✓ | ✓ |
| Licorina | ✓ | ✓ | - |
| Tazetina | - | ✓ | - |



Este es el primer reporte sobre la composición alcaloídica de estas especies de *Rhodolirium*. Previamente sólo se han estudiado los alcaloides de dos especies de Amarilidáceas nativas (Pacheco y Silva 1992).

Los alcaloides de Amarilidáceas se distribuyen en todos los órganos de la planta, encontrándose en mayor diversidad en los bulbos. Por tal motivo, este estudio se focalizó en el análisis de los alcaloides presentes en los bulbos de estas plantas.

Las tres especies estudiadas comparten sólo alcaloides con esqueleto tipo homolicorina. Por otro lado, sólo *R. montanum* presentó alcaloides de tipo tazetina. Se detectaron alcaloides exclusivos en cada especie que permiten diferenciarlas quimiotaxonómicamente y un tipo de alcaloide en común (homolicorina) que podría ser

característico del género *Rhodolirium*, en comparación a los otros géneros de Amaryllidoideae chilenas.

Estudios previos también han analizado desde otros enfoques taxonómicos estas tres especies de *Rhodolorium* estudiadas (Baeza *et al.* 2009, Muñoz *et al.* 2011, Baeza *et al.* 2017). Estas investigaciones han contribuido en la diferenciación de géneros y especies de Amaryllidoideae chilenas. Por ejemplo, los resultados de los estudios cromosómicos y moleculares realizados por Muñoz *et al.* (2011), junto con diferencias en la morfología, apoyan la validez del género *Rhodolirium* y de la especie *R. montanum* dentro de las Amaryllidoideae chilenas. Además, estos investigadores observan al género *Rhodolirium* como grupo hermano de *Phycella* en el análisis filogenético (Muñoz *et al.* 2011). Dado esto, es importante mencionar que el hecho de que todas las especies de *Rhodolirium* del presente estudio compartieran alcaloides de tipo homolicorina, también se ha visto en otras tres especies de *Phycella* analizadas (datos no publicados). Por el contrario, especies de *Rhodophiala* estudiadas no compartieron la presencia de alcaloides tipo homolicorina en todas ellas (datos no publicados).

Asimismo, la investigación llevada a cabo por Baeza *et al.* (2009) permitió diferenciar los cariotipos de *Rhodolirium* y *Rhodophiala* en su número cromosómico. Además, se diferenció la fórmula haploide de las especies *Rhodolirium speciosum* y *R. andicola* con respecto a especies de *Placea* y *Phycella* (Baeza *et al.* 2009).

En el estudio realizado por Baeza *et al.* (2017) se observan diferencias en el cariotipo de *R. laetum* en comparación con otras especies de *Rhodolirium*. En el presente estudio si se analizan los tipos de alcaloides encontrados en *R. laetum* (galantamina, homolicorina y licorina), estos también están presentes en *R. montanum*. Sin embargo, al

analizar los alcaloides individualmente, las diferencias entre *R. laetum* y las otras especies son más notorias. De esta manera, sería interesante estudiar la química de alcaloides de otras especies de *Rhodolirium* para también compararlas quimiotaxonómicamente.

De acuerdo a lo mencionado previamente, esta investigación aporta con caracteres químicos que pueden permitir la diferenciación entre especies de *Rhodolirium* y que probablemente también permitan diferenciar géneros de Amaryllidoideae chilenas. Estos alcaloides utilizados junto con los caracteres morfológicos, cariotípicos y moleculares, podrían ser de utilidad para realizar análisis taxonómicos más robustos en Amaryllidoideae.

Además, es importante mencionar que todas las especies estudiadas constituyen nuevas fuentes naturales de alcaloides de interés farmacológico (Bastida *et al.* 2011, Ding *et al.* 2017).

De esta manera, nuestro estudio provee de más antecedentes para el conocimiento y aplicación de la química de alcaloides en amarilidáceas nativas chilenas, estableciendo las bases para múltiples investigaciones futuras.

BIBLIOGRAFÍA

Arroyo-Leuenberger, S y J Dutilh. 2008. Amaryllidaceae. En: Zuloaga, F, Morrone, O y M Belgrano (Eds.). Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. Volumen I. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 107: 203-226.

Baeza, CM, Mariangel, C, Ruiz, E y M Negritto. 2009. El cariotipo fundamental en

Rhodolirium speciosum (Herb.) Ravenna y *R. andicola* (Poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae). Gayana Botánica 66(1): 99-102.

Baeza, CM, García, N, Herrera, F, Ruiz, E y M Rosas. 2017. Caracterización cromosómica de *Rhodolirium laetum* (Phil.) Ravenna (Amaryllidaceae) a través de cariotipificación e hibridación *in-situ* de ADN ribosómico. Gayana Botánica 74(1).

Bastida, J, Berkov, S, Torras, L, Pigni, NB, de Andrade, JP, Martínez, V, Codina, C, y F Viladomat. 2011. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. En: Muñoz-Torrero, D (Ed.). Recent Advances in Pharmaceutical Sciences. Transworld Research Network. Kerala, India. 286 págs.

Berkov, S, Bastida, J, Sidjimova, B, Viladomat, F y C Codina. 2008. Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. Biochemical Systematics and Ecology 36: 638-645.

Ding, Y, Qu, D, Zhang, KM, Cang, XX, Kou, ZN, Xiao, W y JB Zhu. 2017. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. Journal of Asian Natural Products Research 19(1): 53-100.

Elgorashi, EE, Drewes, SE, Morris, C y J van Staden. 2003. Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. Biochemical Systematics and Ecology 31: 601-615.

Hegnauer, R. 1963. The Taxonomic Significance of Alkaloids. En: Swain, T (Edit.). Chemical Plant Taxonomy. Academic Press Inc. (London) Ltd. 543 págs.

Muñoz, M, Riegel, R, Seeman, P, Peñailillo, P, Schiappacasse, F y J Núñez. 2011. Relaciones filogenéticas de *Rhodolirium montanum* Phil. y especies afines, basadas en secuencias nucleotídicas de la región ITS y análisis cariotípico. Gayana Botánica 68(1): 40-

48.

Pacheco, P, Silva, M, Sammes, PG y WH Watson. 1982. Estudio químico en Amaryllidaceae chilenas II. Nuevos alcaloides de *Hippeastrum ananuca* Phil. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 27 (2): 289-290.

Pacheco, P y M Silva. 1992. Amaryllidaceae. En: Muñoz, O (Ed.). Química de la flora de Chile. Departamento Técnico de Investigación, Universidad de Chile. Serie de programas de desarrollo, Vol. 1. 351 págs.

Ravenna, P. 2003. Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. Botanica Australis 2: 1-21.

Sepúlveda, BA, Pacheco, P, Silva, MJ y R Zemelman. 1982. Alcaloides de Amarillidaceas chilensis III. Estudio químico y actividad biológica en *Hippeastrum bicolor* (R. et P.) Baker. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 27(2): 178-180.

Takos, AM y F Rook. 2013. Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. International Journal of Molecular Sciences 14: 11713-11741.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

La mayoría de los estudios sobre alcaloides de la flora chilena han sido publicados hace más de 10 años, reportándose los alcaloides de sólo el 12,5% de las familias, el 3,9% de los géneros y el 1,7% de las especies vegetales nativas (Echeverría y Niemeyer 2012). Considerando las aplicaciones farmacológicas de los alcaloides, es necesario potenciar el estudio de la química de especies chilenas de flora nativa (Echeverría y Niemeyer 2012).

Particularmente, la subfamilia Amaryllidoideae se destaca por biosintetizar alcaloides con actividad farmacológica y con potencial biomédico (Ding *et al.* 2017) y además por el amplio uso ornamental de diversos géneros (Zomlefer 1994), características que le confieren importancia científica e importancia económica en diferentes áreas comerciales.

Los alcaloides de Amaryllidaceae han sido extensamente estudiados desde finales del siglo XIX (Bastida y Viladomat 2002). El conocimiento de sus rutas biosintéticas permite su clasificación en nueve tipos de esqueletos estructurales (Bastida *et al.* 2011). Junto con lo señalado anteriormente, la presencia de estos alcaloides restringidos a la subfamilia Amaryllidoideae, permite su utilización como herramienta quimiotaxonómica dentro de este grupo de monocotiledóneas (Elgorashi *et al.* 2003, Berkov *et al.* 2008a).

Esta investigación contribuye al conocimiento de la química de alcaloides en especies chilenas de Amaryllidoideae. En todas las especies estudiadas fue posible reconocer compuestos químicos con espectros de masa característicos de alcaloides de Amaryllidaceae y derivados de diferentes vías biosintéticas (orto-para', para-para' y/o para-

orto’).

En los extractos de las especies estudiadas del género *Rhodophiala* se identificaron alcaloides de tipo licorina, crinina, galantamina, homolicorina, tazetina y montanina. Todas estas especies compartieron alcaloides de tipo crinina, tazetina y montanina.

A su vez, las especies del género *Phycella* presentaron alcaloides de tipo licorina, crinina, galantamina, homolicorina y hemantamina. Estas tres especies compartieron alcaloides de tipo galantamina, homolicorina y licorina.

Por su parte, todas las especies de *Rhodolirium* estudiadas presentaron alcaloides de tipo crinina, galantamina, homolicorina, licorina y tazetina. Estas tres especies compartieron sólo alcaloides de tipo homolicorina.

En general, estos tres géneros se diferenciaron por los tipos de alcaloides compartidos por todas sus especies analizadas. De esta manera, el grupo conformado por alcaloides de tipo crinina, tazetina y montanina podría ser característico del género *Rhodophiala*, y el grupo conformado por alcaloides de tipo galantamina, homolicorina y licorina, ser característico del género *Phycella*. Por otra parte, el género *Rhodolirium* podría caracterizarse por presentar en todas sus especies alcaloides de tipo homolicorina. Por lo tanto, es necesario analizar el perfil de alcaloides de todas las especies de cada uno de estos géneros para corroborar si este fenómeno es repetitivo y definir si estos grupos de alcaloides son efectivamente marcadores químicos de estos taxones.

También se detectaron diferencias del perfil de alcaloides entre las especies de cada género estudiado. Por ejemplo, en el género *Rhodophiala* sólo *R. bagnoldii* presentó alcaloides de tipo galantamina, en el género *Phycella* sólo *P. angustifolia* presentó

alcaloides de tipo hemantamina y en el género *Rhodolirium* sólo *R. montanum* presentó alcaloides de tipo tazetina. Previamente, Berkov *et al.* (2008a) también observaron diferencias en los tipos de alcaloides biosintetizados por dos especies del género *Galanthus*. El patrón de alcaloides de una población de *G. nivalis* estudiada se caracterizó por la dominancia de compuestos derivados de la vía biosintética para-para' (alcaloides de tipo tazetina y hemantamina). En contraste, el patrón de alcaloides de *G. elwesii* estuvo dominado por compuestos derivados de la vía orto-para' (alcaloides de tipo homolicorina y licorina). Estas diferencias en el metabolismo secundario de ambas especies de *Galanthus* otorgaron un respaldo quimiotaxonómico para su separación en diferentes taxones (Berkov *et al.* 2008a).

Un estudio preliminar de extracto alcaloideo de *Traubia modesta*, única especie de su género y endémica de Chile, mediante CG-EM, da cuenta de la importancia de profundizar en estudios de este grupo. *Traubia*, junto con *Phycella*, *Rhodolirium* y *Placea* conforman la subtribu Traubiinae (García *et al.* 2014). Específicamente, el perfil químico observado en *T. modesta*, indica que esta especie biosintetiza alcaloides aún no reportados para Amaryllidoideae. En el extracto sólo se detectó un alcaloide con un espectro de masas característico de alcaloides de Amaryllidaceae. No fue posible identificar este compuesto, debido a su bajo porcentaje de similitud con respecto a la base de datos NIST 05. Para identificar los alcaloides de esta especie será necesario aislarlos, purificarlos y determinar su estructura química.

Los resultados de esta investigación indican que es posible comparar quimiotaxonómicamente géneros y especies de Amaryllidoideae nativas chilenas, confirmando la hipótesis postulada originalmente. De esta forma, es factible considerar a la

química de alcaloides de Amaryllidaceae como un carácter taxonómico adicional a los ya empleados en la actualidad. Utilizados en conjunto los caracteres morfológicos, cariotípicos y moleculares, junto con estos caracteres químicos, se podrían desarrollar análisis más robustos para establecer las relaciones taxonómicas entre especies y géneros de Amaryllidoideae.

Los géneros pertenecientes a la subtribu Traubiinae, *Phycella* y *Rhodolirium*, se caracterizaron por presentar en todas sus especies estudiadas, tipos de alcaloides derivados de las vías para-orto' y/o orto-para'. Por el contrario, el género correspondiente a la subtribu Hippeastrinae, *Rhodophiala*, se caracterizó por presentar en todas sus especies estudiadas, tipos de alcaloides derivados de la vía para-para'. Preliminarmente y de acuerdo a estos resultados, existen tipos de alcaloides que pudieran tener importancia quimiotaxonómica a nivel de subtribu.

Por otra parte, es importante destacar que todas las especies de *Phycella* estudiadas constituyen nuevas fuentes naturales de galantamina, un conocido AChEI. El extracto de *P. aff. cyrtanthoides* presentó el mayor porcentaje relativo de galantamina (4.65 %).

Debido a la producción de alcaloides con actividad farmacológica y a las llamativas inflorescencias que proveen de valor ornamental a estas especies (Schiappacasse *et al.* 2002), *Rhodophiala*, *Rhodolirium* y *Phycella* pueden ser géneros de interés económico en Chile. Por este motivo, es importante tener en consideración proyectos de propagación y de conservación para sus especies.

Los extractos de todas las especies estudiadas fueron analizados mediante CG-EM. Esta técnica se distingue por entregar información rápida y confiable sobre los alcaloides de plantas de Amaryllidoideae, detallando la fragmentación del espectro de masas (disponible

tanto en literatura como en bases de datos), el tiempo de retención y el porcentaje de contribución en la mezcla de alcaloides (Berkov *et al.* 2008b). Además, esta técnica permite la identificación de compuestos traza presentes en la fracción de alcaloides (Berkov *et al.* 2005). Estas ventajas adquieren importancia cuando hay poco material disponible de poblaciones silvestres de plantas de Amaryllidoideae, como es el caso de algunas especies chilenas endémicas con poblaciones pequeñas, de difícil localización y/o con probables problemas de conservación.



BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Alston, RE y BL Turner. 1963. Biochemical Systematics. Prentice-Hall, Inc. 404 págs.
- Arroyo, SC y DF Cutler. 1984. Evolutionary and Taxonomic Aspects of the Internal Morphology in Amaryllidaceae from South America and Southern Africa. Kew Bulletin 39(3): 467-498.
- Arroyo-Leuenberger, S y J Dutilh. 2008a. Amaryllidaceae. En: Zuloaga, F, Morrone, O y M Belgrano (Eds.). Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. Volumen I. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 107: 203-226.
- Arroyo, MTK, Marquet, P, Marticorena, C, Simonetti, J, Cavieres, L, Squeo, F, Rozzi, R y F Massardo. 2008b. El Hotspot chileno: Prioridad mundial para la conservación. En: CONAMA (Ed.). Biodiversidad de Chile: Patrimonio y desafíos. 639 págs.
- Baeza, CM y O Schrader. 2004. Karyotype analysis of *Placea amoena* Phil. (Amaryllidaceae) by double fluorescence *in situ* hybridization. Caryologia 57(2): 209-214.
- Baeza, CM, Schrader, O e I Escobar. 2006. Estudio del cariotipo en *Rhodophiala aff. advena* (Ker-Gawl.) Traub de la VIII Región de Chile. Kurtziana 32: 45-51.
- Baeza, CM, Ruiz, E y M Negritto. 2007. El número cromosómico de *Phycella australis* Ravenna (Amaryllidaceae). Gayana Botánica 64(1): 119-122.

-
- Baeza, CM, Mariangel, C, Ruiz, E y M Negritto. 2009a. El cariotipo fundamental en *Rhodolirium speciosum* (Herb.) Ravenna y *R. andicola* (Poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 66(1): 99-102.
 - Baeza, CM, Novoa, P, Ruiz, E y M Negritto. 2009b. El cariotipo fundamental en *Traubia modesta* (Phil.) Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 66(2): 297-300.
 - Baeza, CM, Almendras, F, Ruiz, E y P Peñailillo. 2012. Estudio comparativo del cariotipo en especies de *Miltinea* Ravenna, *Phycella* Lindl. y *Rhodophiala* C. Presl (Amaryllidaceae) de Chile. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo* 44(2): 193-205.
 - Baeza, CM, Peñailillo, P, Novoa, P, Rosas, M, Finot, VL y E Ruiz. 2016. Recuentos cromosómicos en plantas que crecen en Chile. IV. *Gayana Botánica* 73(2): 183-190.
 - Baeza, CM, García, N, Herrera, F, Ruiz, E y M Rosas. 2017. Caracterización cromosómica de *Rhodolirium laetum* (Phil.) Ravenna (Amaryllidaceae) a través de cariotipificación e hibridación *in-situ* de ADN ribosómico. *Gayana Botánica* 74(1).
 - Bastida, J y F Viladomat. 2002. Alkaloids of *Narcissus*. En: Hanks, GR (Ed.). *Medicinal and Aromatic Plants: Industrial Profiles*. Vol. 21. *Narcissus* and Daffodil: The genus *Narcissus*. Editorial Taylor & Francis. 428 págs.
 - Bastida, J, Berkov, S, Torras, L, Pigni, NB, de Andrade, JP, Martínez, V, Codina, C, y F Viladomat. 2011. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. En: Muñoz-Torrero, D (Ed.). *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. Transworld Research Network. Kerala, India. 286 págs.

-
- Berkov, S, Pavlov, A, Ilieva, M, Burrus, M, Popov, S y M Stanilova. 2005. CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their *in vitro* cultures. *Phytochemical Analysis* 16: 98-103.
 - Berkov, S, Bastida, J, Sidjimova, B, Viladomat, F y C Codina. 2008a. Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 638-645.
 - Berkov, S, Bastida, J, Viladomat, F y C Codina. 2008b. Analysis of Galanthamine-type Alkaloids by Capillary Gas Chromatography–Mass Spectrometry in Plants. *Phytochemical Analysis* 19: 285-293.
 - Bridgen, MP. 1994. Flowering geophytes of Chile have ornamental potential. *Seminario Panamericano de Semillas*: 216-230.
 - Chase, MW, Reveal, JL y MF Fay. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 132-136.
 - Cisternas, M, Araneda, L, García, N y CM Baeza. 2010. Karyotypic Studies in the Chilean genus *Placea* (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 67(2): 198-205.
 - Dewick, PM. 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Segunda edición. John Wiley & Sons, Ltd. 507 págs.
 - Ding, Y, Qu, D, Zhang, KM, Cang, XX, Kou, ZN, Xiao, W y JB Zhu. 2017. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* 19(1): 53-100.

-
- Domínguez, XA. 1973. Métodos de investigación fotoquímica. Primera edición. Editorial Limusa, S.A. México. 281 págs.
 - Duri, ZJ, Scovill, JP y JW Huggins. 1994. Activity of a methanolic extract of Zimbabwean *Crinum macowanii* against exotic RNA viruses *in vitro*. *Phytotherapy Research* 8(2): 121-122.
 - Echeverría J y HM Niemeyer. 2012. Alkaloids from the native flora of Chile: a review. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11: 291-305.
 - Elgorashi, EE, Drewes, SE, Morris, C y J van Staden. 2003. Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 601-615.
 - Elgorashi, EE y J van Staden. 2004. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. *Journal of Ethnopharmacology* 90: 27-32.
 - Erdtman, H. 1968. En: Mabry, TJ, Alston, RE y VC Runeckles (Edits.). *Recent advances in Phytochemistry*. Vol. 1. Appleton Century Crofts. New York, EE.UU. 677 págs.
 - Evidente, A, Andolfi, A, Abou-Donia, AH, Soad M. Touema, SM, Hammada, HM, Shawky, E y A Motta. 2004. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry* 65: 2113-2118.
 - Evidente, A y A Kornienko. 2009. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews* 8: 449-459.

-
- Ferrando, MG. 2002. Multiplicación *in vitro* de las especies *Rhodophiala montana* (Phil.) Traub., *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub. y *Rhodophiala splendens* (Rengifo) Traub. Tesis para optar al grado de Licenciado en Agronomía. Universidad Austral de Chile. 71 págs.
 - García, N, Meerow, AW, Soltis, DE y PS Soltis. 2014. Testing deep reticulate evolution in Amaryllidaceae tribe Hippeastreae (Asparagales) with ITS and chloroplast sequence data. *Systematic Botany* 39(1): 75-89.
 - García, N, Folk, RA, Meerow, AW, Chamala, S, Gitzendanner, MA, de Oliveira, RS, Soltis, DE y PS Soltis. 2017. Deep reticulation and incomplete lineage sorting obscure the diploid phylogeny of rain-lilies and allies (Amaryllidaceae tribe Hippeastreae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 111: 231-247.
 - Gopalakrishna, EM, Watson, WH, Pacheco, P y M Silva. 1976. Lycorine C₁₆H₁₇NO₄. *Crystal Structure Communications* 5: 795-799.
 - Gopalakrishna, EM, Watson, WH, Silva, M y P Pacheco. 1978. 17-Epihomolycorine C₁₈H₂₁NO₄. *Crystal Structure Communications* 7: 41-46.
 - Gros, E, Pomilio, A, A. S. Seldes, A y G Burton. 1985. Introducción al estudio de los Productos Naturales. OEA. Washington, EEUU. 146 págs.
 - He, M, Qu, C, Gao, O, Hu, X y X Hong. 2015. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* 5: 16562-16574.
 - Hegnauer, R. 1963. The Taxonomic Significance of Alkaloids. En: Swain, T (Edit.). *Chemical Plant Taxonomy*. Academic Press Inc. (London) Ltd. 543 págs.

-
- Houghton, PJ, Ren, Y y MJ Howes. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports* 23: 181-199.
 - Hurrell, JA y G Delucchi. 2007. Amaryllidaceae adventicias en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 42 (3-4): 313-319.
 - Hutchinson, J. 1959. *The families of flowering plants*. Oxford Univ. Press. Segunda edición. Inglaterra. 792 págs.
 - Ingrassia, L, Lefranc, F, Mathieu, V, Darro, F y R Kiss. 2008. Amaryllidaceae Isocarbostryl Alkaloids and Their Derivatives as Promising Antitumor Agents. *Translational Oncology* (2008) 1: 1-13.
 - Jin, Z. 2013. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports* 30: 849-868.
 - Kornienko, A y A Evidente. 2008. Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners. *Chemical Reviews* 108(6): 1982-2014.
 - Lamoral-Theys, D, Decaestecker, C, Mathieu, V, Dubois, J, Kornienko, A, Kiss, R, Evidente, A y L Pottier. 2010. Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 10(1): 41-50.
 - López, S, Bastida, J, Viladomat, F y C Codina. 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences* 71: 2521-2529.

-
- Malcolm, MJ y JR Gear. 1971. The Biosynthesis of Chelidonic Acid. *Canadian Journal of Biochemistry* 49(4): 412-416.
 - Meerow, AW, Fay, MF, Guy, CL, Li, Q, Zaman, FQ y MW Chase. 1999. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid *rbcL* y *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* 86(9): 1325-1345.
 - Meerow, AW y DA Snijman. 2006. The never-ending story: multigene approaches to the phylogeny of Amaryllidaceae. *Aliso* 22: 355-366.
 - Muñoz, C. 1959. Sinopsis de la flora chilena: claves para la identificación de familias y géneros. Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago, Chile. 840 págs.
 - Muñoz, M, Riegel, R, Seeman, P, Peñailillo, P, Schiappacasse, F y J Núñez. 2011. Relaciones filogenéticas de *Rhodolirium montanum* Phil. y especies afines, basadas en secuencias nucleotídicas de la región ITS y análisis cariotípico. *Gayana Botánica* 68(1): 40-48.
 - Orhan, BS. 2000. Sustainable use of various Amaryllidaceae plants against Alzheimer's disease. *ISHS Acta Horticulturae* 678: III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants, Vol 4: Targeted Screening of Medicinal and Aromatic Plants, Economics and Law.
 - Pacheco, P y M Silva. 1992. Amaryllidaceae. En: Muñoz, O (Ed.). *Química de la flora de Chile*. Departamento Técnico de Investigación, Universidad de Chile. Serie de programas de desarrollo, Vol. 1. 351 págs.

-
- Parodi, L. 1959. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Volumen I: Descripción de las plantas cultivadas. Primera edición. Editorial ACME S.A.C.I. Buenos Aires, Argentina. 931 págs.
 - Pax, F y K Hoffman. 1930. Amaryllidaceae. En: Engler, H (Ed.). Die natürlichen Pflanzenfamilien, Vol. 15a. Leipzig, Alemania.
 - Peñailillo, P y F Schiappacasse. 2000. Los geófitos nativos y su importancia en la floricultura. Facultad de Agronomía e Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca. Talca, Chile. 79 págs.
 - Pettit, GR, Pettit, GR III, Backhaus, RA, Boyd MR y AW Meerow. 1993. Antineoplastic agents: 256. Cell growth inhibitory isocarbostryrls from *Hymenocallis*. Journal of Natural Products 56 (10): 1682-1687.
 - Ravenna, P. 2003. Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. Botanica Australis 2: 1-21.
 - Schiappacasse, F, Peñailillo, P y P Yáñez. 2002. Propagación de bulbosas chilenas ornamentales. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile. 65 págs.
 - Schmeda-Hirschmann, G, Rodríguez, JA, Loyola, JI, Astudillo, L, Bastida, J, Viladomat, F y C Codina. 2000. Activity of Amaryllidaceae Alkaloids on the Blood Pressure of Normotensive Rats. Pharmacy and Pharmacology Communications 6(7): 309-312.

-
- Sepúlveda, BA, Pacheco, P, Silva, MJ y R Zemelman. 1982. Alcaloides de Amarillidaceas chilensis III. Estudio químico y actividad biológica en *Hippeastrum bicolor* (R. et P.) Baker. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 27(2): 178-180.
 - Takos, AM y F Rook. 2013. Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. International Journal of Molecular Sciences 14: 11713-11741.
 - Traub, HP. 1957. Classification of the Amaryllidaceae-subfamilies, tribes and genera. Plant Life (Stanford) 13: 76-83.
 - Watson, WH, Taira, Z, Silva, M y P Pacheco. 1977. 1,2,3,4,4A,6-Hexahydro-10-hidroxy-3,8,9-trimetoxy-5,10 β -ethanophenanthridinium picrate ($C_{18}H_{25}O_4NH$) + ($C_6H_2N_3O_7$). Crystal Structure Communications 6: 797-801.
 - Watson, WH, Galloy, J y M Silva. 1984. Hemanthamine $C_{17}H_{19}NO_4$. Acta Crystallographica C40: 156-158.
 - Zabel, V, Watson, WH, Pacheco, P y M Silva. 1979. Maritidine $C_{17}H_{21}NO_3$. Crystal Structure Communications 8: 371-376.
 - Zomlefer, WB. 1994. Guide to flowering plant familias. Chapel Hill and London. EE.UU. 430 págs.
 - Zupkó, I, Réthy, B, Hohmann, J, Molnár, J, Ocsovski, I y G Falkay. 2009. Antitumor Activity of Alkaloids Derived from Amaryllidaceae Species. In Vivo 23: 41-48.