



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Departamento de Botánica



**Perfil químico y actividad biológica de las especies de
Amaryllidaceae nativas: *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes
maculata***

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Francisco Javier Crisosto Crisosto

Prof. Guía Dr. José Becerra

Marzo 2024

Concepción, Chile



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción



Profesor Guía

Dr. José Becerra Allende

Departamento de Botánica

Universidad de Concepción

Profesores Evaluadores

Dra. Claudia Pérez Manríquez

Departamento de Botánica

Universidad de Concepción

Dr. Eduardo Ruiz

Departamento de Botánica

Universidad de Concepción

Concepción marzo 2024

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó gracias a el apoyo de muchas personas humanas, agradezco profundamente a todas aquellas personas que me apoyaron en este proceso de mi vida, sin duda no habría podido terminar esta tesis de manera individual, el calor, la amabilidad y la calidez que cada persona me entrego y me brindo de manera desinteresada es lo que mas destaco en este proceso.

Quiero partir agradeciendo a mi profesor Guía, el Dr. José Becerra, quien me acogió como alumno en el laboratorio de química de Productos naturales, me enseñó y me guio durante todo el proceso de tesis, me hizo parte del equipo humano del laboratorio y me brindo herramientas para poder desarrollarme como profesional.

También quiero agradecer a la Dra. Claudia Pérez por su permanente apoyo y por sus numerosos consejos durante la realización de esta tesis.

Al profesor el Dr. Eduardo Ruíz, por aceptar ser parte de mi comisión y su ayuda en la revisión de este trabajo de tesis.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio de química de productos naturales, quienes me ayudaron en todo el proceso de aprendizaje, en especial a “Don Edu” y a “Don Fabian” quienes fueron de las personas mas importante en la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio y de carrera, en especial a todos aquellos que están desde el primer semestre de carrera a mi lado, ayudándonos siempre como equipo, quiero agradecer a Fernanda López, Natalia Aguayo, Ángel Torres y Belén Velozo, con quienes compartí muchos años de mi vida y son un pilar fundamental en todo mi proceso de aprendizaje. También agradecer a Ignacio Tello a quien lo conocí en el laboratorio y fue de gran ayuda para la realización de esta tesis, mas que compañero se convirtió en un gran amigo y pilar fundamental.

Sin duda agradecer especialmente a mi familia, quienes son el pilar principal de todo este proceso, agradecer profundamente a mis hermanas, Evelyn, Yesica y Patricia y a mi hermano Rodrigo, los cuales me ayudaron siempre a salir adelante y confiaron en mí.

Y, por último, quiero agradecer a la persona más importante en mi vida, a mi madre María Teresa Valenzuela Crisosto (Q.E.P.D), quien confió siempre en mí y me brindó todo lo necesario para cumplir con mis metas, sin duda las palabras no son suficiente para expresar todo el amor que me brindó, gracias por ser mi madre, TE AMO.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos.....	3
Índice de Contenidos.....	5
Índice de Figuras.....	7
Índice de Tablas.....	9
Resumen.....	10
Abstract.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Productos naturales.....	14
1.2. Metabolitos secundarios de plantas.....	15
1.3. Generalidades de los alcaloides.....	15
1.4. Familia Amaryllidaceae.....	17
1.5. Alcaloides en la familia Amaryllidaceae.....	19
1.5.1. Alcaloides tipo galantamina.....	22
1.5.2. Alcaloides tipo hemantamina.....	23
1.6. Actividades biológicas y farmacológicas de alcaloides de Amaryllidaceae.....	23
1.7. Importancia económica ornamental de Amaryllidaceae.....	23
2. ANTECEDENTES.....	24
2.1 <i>Phycella cyrtanthoides</i>	24
2.2 <i>Zephyranthes maculata</i>	25
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	27
4. OBJETIVOS.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1 Recolección y tratamiento del material vegetal.....	29
5.2 Extracción de alcaloides.....	29
5.3. Detección e identificación de alcaloides.....	29
5.3.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	29
5.3.2. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)	29
5.4. Separación de los alcaloides.....	30
5.4.1 Cromatografía en columna.....	30
5.5 Preparación de los extractos.....	30
5.6. Actividad antioxidante.....	31
5.6.1 Ensayo DPPH.....	31
5.7. Actividad antifúngica.....	31
5.7.1 Técnica poison food.....	31
5.8. Actividad antibacteriana.....	32
5.8.1. Ensayo de difusión en agar sobre cepas bacterianas.....	32
5.9. Análisis de datos.....	32
6. RESULTADOS.....	34

6.1. Obtención de extractos alcaloideos a partir de los bulbos de las especies <i>Phycella cyrtanthoides</i> y <i>Zephyranthes maculata</i>	34
6.2. Realización de un análisis cualitativo de los extractos alcaloideos mediante una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).....	34
6.2.1. Bulbos de <i>Phycella cyrtanthoides</i> y <i>Zephyranthes maculata</i>	34
6.3. Realización del ensayo antioxidante.....	40
6.3.1 Ensayo de neutralización del radical (DPPH).....	40
6.4. Realización de la prueba antifúngica.....	44
6.4.1. Técnica poison food.....	44
6.4.2. Observaciones morfológicas macroscópicas y microscópicas.....	45
6.5. Realización de prueba antibacteriana.....	48
6.5.1 Ensayo de difusión en agar sobre cepas bacterianas.....	48
7. DISCUSIÓN.....	49
7.1 Actividad antioxidante.....	50
7.2 Actividad antibacteriana.....	50
7.3 Actividad antifúngica.....	51
8. CONCLUSIONES.....	53
9. REFERENCIAS.....	54

Índice de figuras

Figura 1. Alcaloides representativos de Amaryllidaceae (fuente: Bastida et al. 2011)	21
Figura 2. Vías de biosíntesis de alcaloides de Amarillidaceaes (fuente: Dewick, 2002)	21
Figura 3. Tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae derivados de los diferentes acoplamientos oxidativos (fuente: Bastida et al. 2011)	22
Figura 4. A) Flor de <i>Phycella cyrtanthoides</i> . B) Bulbos de <i>Phycella cyrtanthoides</i>	25
Figura 5. A) Flor de <i>Zephyranthes maculata</i> . B) Bulbos de <i>Zephyranthes maculata</i>	26
Figura 6. Espectro GC-MS analizado en extracto alcaloideo de los bulbos de <i>Phycella cyrtanthoides</i> , el pico más representativo fue el alcaloide galantamina, con un tiempo de retención de 18.629.....	36
Figura 7. Espectro GC-MS analizado de <i>Phycella cyrtanthoides</i> , perteneciente a la fracción PF3, la molécula en mayor concentración en muestra es la: galantamina, con un porcentaje en área relativo del 50% total de la muestra.....	37
Figura 8. Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide galantamina, de <i>Phycella cyrtanthoides</i> por GC-MS.....	37
Figura 9. Espectro GC-MS analizados en extracto total de los bulbos de <i>Zephyranthes maculata</i> , el pick más representativo fue hemantamina con un tiempo de retención de 20.389.....	39
Figura 10. Espectro GC-MS analizado de <i>Zephyranthes maculata</i> , perteneciente a la fracción ZF2B, la molécula en mayor concentración en muestra es la: hemantamina, con un porcentaje en área relativo del 52% del total de la muestra.....	39
Figura 11. Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide hemantamine de <i>Zephyranthes maculata</i> por GC-MS.....	40
Figura 12. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH para las especies <i>Phycella cyrtanthoides</i> y <i>Zephyranthes maculata</i>	41
Figura 13. Inhibición del radical libre DPPH para el extracto total de <i>P. cyrtanthoides</i>	42
Figura 14. Inhibición del radical libre DPPH para la fracción PF3 de <i>P. cyrtanthoides</i>	42
Figura 15. Inhibición del radical libre DPPH para el extracto total de <i>Z. maculata</i>	43
Figura 16. Inhibición del radical libre DPPH para la fracción ZF2B de <i>Z. maculata</i>	43

Figura 17. Porcentaje de inhibición de micelio en hongos tratados, con extractos de <i>P.cyrtanthoides</i> y <i>Z.maculata</i>	45
Figura 18. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los extractos alcaloideos de <i>P. cyrtanthoides</i> y <i>Z. maculata</i> contra el hongo <i>Aspergillus niger</i> mediante microscopia óptica a un aumento de 40X, los micelios fueron teñidos con azul de lactofenol; A) Micelio de <i>A. niger</i> con extracto de <i>P. cyrtanthoides</i> ; B) Micelio de <i>A. niger</i> con extracto de <i>Z. maculata</i> ; C) Micelio placa control de <i>A. niger</i>	46
Figura 19. Actividad antifúngica de los extractos totales de <i>P. cyrtanthoides</i> y <i>Z. maculata</i> a una concentración de 1mg/ml; A) Micelio en placa de <i>Trichoderma</i> ssp con extracto de <i>P. cyrtanthoides</i> ; B) Placa control de <i>Trichoderma</i> ssp; C) Micelio en placa de <i>Trichoderma</i> ssp con extracto de <i>Z. maculata</i>	47
Figura 20. Actividad antifúngica de los extractos totales de <i>P. cyrtanthoides</i> y <i>Z. maculata</i> a una concentración de 1mg/ml; A) Placa con micelio de <i>Aspergillus fumigatus</i> con extracto de <i>P. cyrtanthoides</i> ; B) Placa control con <i>Aspergillus fumigatus</i> ; C) Micelio en placa de <i>Aspergillus fumigatus</i> con extracto de <i>Z. maculata</i>	47
Figura 21. Actividad antifúngica de los extractos totales de <i>P. cyrtanthoides</i> y <i>Z. maculata</i> a una concentración de 1 mg/mL; A) Micelio en placa de <i>Aspergillus niger</i> con extracto de <i>P. cyrtanthoides</i> ; B) Placa control de <i>Aspergillus niger</i> ; C) Micelio en placa de <i>Aspergillus niger</i> con extracto de <i>Z. maculata</i>	48
Figura 22. A) Cepas tratadas con extractos de <i>P. cyrtanthoides</i> y <i>Z. maculata</i> ; B) Placa con cepa de <i>E. coli</i> sin actividad ni halos de inhibición, después de 48 horas.....	48

Índice de tablas

Tabla 1. Cantidad de extracto obtenido en relación con el peso fresco de la muestra y su rendimiento	34
Tabla 2. Cantidad de extracto obtenido en relación con el peso seco de la muestra y su rendimiento.....	34
Tabla 3. Alcaloides en bulbos de <i>Phycella cyrtanthoides</i>	35
Tabla 4. Alcaloides en bulbos de <i>Zephyranthes maculata</i>	38

Resumen

La familia Amaryllidaceae consta de alrededor de 75 géneros y 1100 especies que están muy extendidas en las regiones tropicales y templadas cálidas. La familia Amaryllidaceae es de gran importancia tanto en la horticultura como en la medicina y la cultura. La mayoría de los géneros de Amaryllidoideae son endémicos de Sudamérica o Sudáfrica, pero algunos tienen una distribución más amplia. Esta familia se caracteriza por ser productoras de alcaloides. Estos metabolitos secundarios están biogenéticamente relacionados y exhiben potentes actividades biológicas. Desde el primer aislamiento de licorina, en las últimas tres décadas se han identificado más de 600 alcaloides de tipo Amaryllidaceae. El enorme número de alcaloides de las Amaryllidaceae se clasifican en diferentes grupos principalmente de acuerdo con sus características de las estructuras químicas. Alcaloides representativos son de esta familia tenemos: licorina, hippeasterina, hemantamina, pancratistatina, pretazetina y montanina.

Estudios recientes han revelado que los alcaloides de Amaryllidaceae exhiben una amplia gama de bioactividades, como antitumorales, antivirales, antibacterianas, antifúngicas, antipalúdicas y analgésicas. También se han informado actividades inhibitoras de la acetilcolinesterasa (AChE). La química y bioactividad de las especies chilenas del género *Phycella* y *Zephyranthes* de esta familia no han sido estudiadas hasta ahora. En el presente trabajo se estudiaron dos especies de Amaryllidaceae endémicas de Chile; *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes maculata*. Uno de los principales objetivos de esta tesis fue aislar alcaloides de Amaryllidaceae, la cual se realizó mediante diferentes técnicas cromatográficas, dentro de las que se encuentran, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en columna (CC), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se determinó que estas plantas presentan un variado perfil de alcaloides tipo galantamina, hemantamina, tazzetina y crinina, especialmente *Phycella cyrtanthoides* presentó una gran variedad de alcaloides estructuralmente diversos y un porcentaje elevado del alcaloide galantamina (15,1%). Otro de los objetivos fue evaluar la capacidad de inhibición que presentan estos alcaloides frente a diferentes cepas bacterianas de interés clínico como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre otros, y cepas fúngicas de interés agrícola como *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Trichoderma* ssp. En el

estudio de la actividad antifúngica, los extractos totales alcaloideos de *Z. maculata* y *P. cyrtanthoides* lograron una inhibición del micelio de *A. niger* del 68,8% y el 62,5%, respectivamente. En cambio, el micelio de las especies *A. fumigatus* y *Trichoderma* ssp se inhibió moderadamente. *A. fumigatus* se inhibió en un 56,3% con el extracto total de *Z. maculata* y en un 31,3% con el extracto total de *P. cyrtanthoides*, mientras que *trichoderma* ssp se inhibió en un 47,2 con el extracto total de *Z. maculata* y en un 33,3% con el extracto total de *P. cyrtanthoides*. Para las cepas bacterianas no hubo actividad alguna, en ninguna de las cepas y en ninguna concentración evaluada.

La capacidad antioxidante que presentan los alcaloides se evaluó frente al radical libre DPPH. El extracto total de *P. cyrtanthoides* es el que mostró un mayor poder de neutralización del radical con un 92,8% a una concentración de 10mg/mL. Por su parte la fracción PF3 presentó una inhibición del 82,5% a una concentración de 10mg/mL. Los valores IC_{50} observados fueron $3061 \pm 298,16 \mu\text{g/mL}$, para el extracto total y de $3862 \pm 271,125 \mu\text{g/mL}$ para la fracción PF3. *Z. maculata* presentó una inhibición del radical libre de hasta un 67,1% para el extracto alcaloideo total a una concentración de 5mg/mL, y un 73,4% para la fracción ZF2B, a una concentración de 10mg/mL. Los valores IC_{50} $2303,257 \pm 298,16 \mu\text{g/mL}$, para el extracto total y un IC_{50} de $7283,801 \pm 402,286 \mu\text{g/mL}$.

En promedio los extractos pertenecientes a *P. cyrtanthoides* mostraron un mayor poder de neutralización del radical libre DPPH, con una inhibición promedio de 87,7%, en tanto que los extractos de *Z. maculata*, con una inhibición del 73,4%.

Palabras claves: Metabolitos secundarios, Alcaloides, Amaryllidaceae, Bioactividades.

Abstract

The Amaryllidaceae family includes approximately 75 genera and 1,100 species that are amoly distributed in tropical and warm temperate regions. This family is essential in horticulture, medicine, and culture. Most of the genera of Amaryllidoideae are endemic to South America or South Africa, but some have a wider distribution. Alkaloids are produced by this family, which are potent secondary metabolites that are biogenetically related and exhibit potent biological activities. Over the last three decades, more than 600 Amaryllidaceae-type alkaloids have been identified, including lycorine, hippeasterine, haemanthamine, pancratistatin, pretazetine, and montanine. These alkaloids are classified into different groups based on their chemical structure characteristics. Recent studies have shown that Amaryllidaceae alkaloids have various bioactivities, including antitumor, antiviral, antibacterial, antifungal, antimalarial, and analgesic activities. In addition, inhibitory activities against acetylcholinesterase (AChE) have been reported. However, the chemistry and bioactivity of Chilean species of this family's genera *Phycella* and *Zephyranthes* have not been studied until now. This study aims to investigate two endemic species of Amaryllidaceae from Chile. The thesis aimed to isolate Amaryllidaceae alkaloids, using various extraction chromatographic techniques, from *Phycella cyrtanthoides* and *Zephyranthes maculata*. The plants were found to have a diverse profile of galantamine, haemanthamine, tazzetine, and crinine-type alkaloids. *Phycella cyrtanthoides*, in particular, had a wide variety of structurally diverse alkaloids and a high percentage of galantamine alkaloid (15.1%). The aim was to assess the inhibitory capacity of these alkaloids against various clinically relevant bacterial strains. Another objective was to evaluate the inhibition capacity of these alkaloids against different bacterial strains of clinical interest such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, among others, and fungal strains of agricultural interest such as *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichoderma* ssp.

In the study of antifungal activity, the total alkaloid extracts of *Z. maculata* and *P. cyrtanthoides* achieved an inhibition of *A. niger* mycelium of 68.8% and 62.5%, respectively. In contrast, the mycelium of *A. fumigatus* and *Trichoderma* ssp species was moderately inhibited. *A. fumigatus* was inhibited by 56.3% with the total extract of *Z. maculata* and 31.3% with the total extract of *P. cyrtanthoides*, while *Trichoderma* ssp was inhibited by 47.2 with the total extract of *Z. maculata* and 33.3% with the total extract of *P. cyrtanthoides*. For

the bacterial strains, there was no activity at all, in any of the strains and at any concentration evaluated.

The antioxidant capacity of the alkaloids was evaluated against the free radical DPPH. The total extract of *P. cyrtanthoides* showed the highest neutralizing power of the radical with 92.8% at a concentration of 10 mg/mL, the PF3 fraction presented an inhibition of 82.5% at a concentration of 10mg/mL. The IC₅₀ values observed were 3061±298.16 µg/mL for the total extract and 3862±271.125 µg/mL for the PF3 fraction. *Z. maculata* presented free radical inhibition up to 67.1% for the total alkaloid extract at a concentration of 5mg/mL, and 73.4% for the ZF2B fraction, at a concentration of 10mg/mL. The IC₅₀ values 2303.257±298.16 µg/mL, for the total extract and an IC₅₀ of 7283.801±402.286 µg/mL.

On average the extracts belonging to *P. cyrtanthoides* showed a higher neutralization power of the free radical DPPH, with an average inhibition of 87.7%, while the extracts of *Z. maculata*, with an inhibition of 73.4%.

Keywords: Secondary Metabolites, Alkaloids, Amaryllidaceae, Bioactivities

1. Introducción

1.1 Productos naturales

Al considerar que el uso de plantas y de preparados de hierbas con propósitos medicinales es una forma común de atender problemas de salud a nivel mundial, que su empleo ha sido documentado desde la antigüedad y que mantiene su popularidad por razones históricas y culturales. Durante muchas décadas, los médicos dependían de la disponibilidad de plantas de su región debido a que estas conformaban la fuente principal y único recurso que tenían para tratar a las personas y curar sus enfermedades (Baquero et al., 2009). Actualmente, los conocimientos medicinales ancestrales funcionan como base para realizar una gran cantidad de medicamentos (Baquero et al., 2009). La naturaleza y todos sus componentes han constituido un pilar importante en los sistemas de salud actuales, ya que investigaciones han mostrado la eficacia que tienen los productos naturales para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del ser humano (Guerrero, 2009; Gámez et al., 2014; Tunco-Cabana, 2019). Es por esto que, actualmente el desarrollo científico en el campo farmacéutico está enfocado en las plantas medicinales y las sustancias naturales que tienen algún porcentaje de valor biológico y/o económico, la necesidad de encontrar terapias nuevas para diversas afecciones, la gran diversidad de estructuras químicas y acciones biológicas de los principios activos, el desarrollo de técnicas analíticas novedosas para detectar productos bioactivos en plantas, y la disponibilidad de técnicas específicas para aislar, purificar y clasificar los elementos bioactivos de los productos naturales (López-Padrón et al., 2021). Estos principios activos o bioactivos se encuentran en varias partes de la planta (raíces, hojas, tallos o frutos), algunos ayudan en los procesos fisiológicos y otros en características adicionales como colores, olores, sabores, entre otros (Machin-Rodríguez, 2011). Hoy en día, los estudios enfocados en desarrollar productos a partir de las características adicionales de las plantas han generado interés en la sociedad, esto debido a las ventajas en la salud, alimentación y calidad de vida que ofrecen estos compuestos (Herrera-Castro, 2020). Generalmente, los compuestos de interés farmacéutico y los que generan beneficios para el ser humano son denominados compuestos secundarios (Herrera-Castro, 2020).

1.2 Metabolitos secundarios de plantas

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, organismos autótrofos, además de metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa (García et al., 2011). Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales. Estos últimos tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado este último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, ya se usaban en la medicina antigua como medicamentos, resinas, gomas, potenciador de sabor, aromas, colorantes, etc (García et al., 2011). Los metabolitos secundarios se agrupan en tres grandes grupos; los terpenos, los compuestos fenólicos y los alcaloides (García et al., 2011).

1.3 Generalidades de los alcaloides

Constituyen un grupo de numerosos de metabolitos secundarios nitrogenados aislados tradicionalmente de plantas vasculares (Henning et al., 2013), aunque actualmente se ha reportado también la presencia de un número creciente de este tipo de metabolitos en algunos animales, insectos y microorganismos.

Estructuralmente contienen uno o varios átomos de nitrógeno en su molécula, a menudo formando parte de un anillo heterocíclico. El término alcaloide fue introducido por un farmacéutico alemán, Carl Meissner a principios del siglo XIX, para designar sustancias naturales que reaccionan como los álcalis. En cuanto a sus propiedades, la mayoría son de carácter básico, cristalinos, aunque algunos forman precipitados amorfos y unos pocos son líquidos a temperatura ambiente (como la nicotina, la conína y la esparteína); no tienen olor, son amargos y en general incoloros, aunque también hay excepciones. Su peso molecular

oscila entre 100 y 900, y su basicidad se debe a que normalmente el nitrógeno posee un par de electrones no compartidos. Se comportan como auxiliares en el mantenimiento del equilibrio iónico debido a su carácter alcalino y también son absorbentes de rayos UV, por la presencia de núcleos aromáticos en sus estructuras. Precipitan de sus soluciones acuosas con sales de metales pesados (mercurio, cadmio, plomo), ácidos pícrico y taninos. En base a que la mayoría reaccionan positivamente en este tipo de reactivos, es que se los ha denominado “reactivos generales de alcaloides” (Henning et al., 2013). Otra propiedad es que la solubilidad del alcaloide base y de sus respectivas sales, en agua y disolventes orgánicos, es opuesta. Esta última característica es generalmente tenida en cuenta para extraer y purificar a los alcaloides presentes en un material vegetal (Henning et al., 2013).

De acuerdo con la estructura molecular y su ruta biosintética, los alcaloides se dividen en tres grupos, verdaderos o alcaloides propiamente dichos, protoalcaloides y/o pseudoalcaloides. hasta el momento se han aislado alrededor de 15000 alcaloides de las plantas, y quedan muchos por descubrir y aislar, para completar el “screening” o cribado alcaloídico, y si se considera que se ha examinado menos del 20% de las especies de plantas superiores del planeta, es evidente que queda aún un amplio campo para su investigación (Henning et al., 2013). Por su importancia farmacológica, medicinal y agroquímica existe un incentivo para continuar con el estudio químico-biológico de muchos alcaloides. Es uno de los grupos de compuesto más importantes dentro de las sustancias de origen natural con interés terapéutico. Presentan notables propiedades fisiológicas y toxicológicas que se ejercen fundamentalmente en el Sistema Nervioso Central (SNC) con predominio en alguno de sus niveles. Por estas razones pueden ser usados como fármacos (Henning et al., 2013). El uso prolongado de alguno de estos compuestos produce en el hombre dependencia, que constituyen verdaderas toxicomanías, con dependencia física y psíquica y un aumento de la tolerancia (Henning et al., 2013). Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos.

En cuanto a su detección de estos metabolitos, existen varios métodos, principalmente procedimientos cromatográficos, reacciones coloreadas como por ejemplo la reacción de Mayer, de Dragendorff o de Bouchardat (Robinson, 1981).

En cuanto a función de los alcaloides, la noción más común es que los alcaloides son productos de desecho que juegan un papel no preponderante como compuestos protectores de la planta y se acumulan en la planta porque la planta carece de un órgano excretor comparable a los riñones animales. Sin embargo, las plantas sí tienen un sistema efectivo de excreción, la abscisión de las plantas, en donde la planta bota los desechos mediante las hojas viejas (Saxton, 1975). Cada planta, sin excepción, produce nuevas hojas y elimina las maduras y/o las senescentes mientras crece. Antes de que la hoja se encuentre lista para ser desechada, todos los metabolitos que pueden ser útiles son translocados y solo los verdaderos residuos permanecen en la hoja. Si los alcaloides fueran residuos, estarían concentrados en las hojas muertas o convertidos en otra forma (Saxton, 1975). Un sistema ineficiente hace mucho tiempo habría sido erradicado por selección (Hesse, 1978). Sin embargo, el rol singular de algunos alcaloides puede ser diferente en distintas plantas, y este rol en una planta libre de alcaloides, puede ser cumplido por otros compuestos, pero la función protectora, tanto en el presente como en el pasado, puede ser la razón de existir de la mayoría de los alcaloides. Dentro de las funciones que se describen se relacionan con estructuras moleculares y las rutas biosintéticas, feromonas (atrayerentes), sustancias de defensa como bactericida (lupinina, lupanina, angustifolina), nematocidas (anagirina, matrinalina y citisina), antiviral (esparteína), crecimiento vegetal y regulación de hormonas, etc (Henning et al., 2013).

Los alcaloides en vegetales están presentes en Angiospermas especialmente en Dicotiledóneas y son más escasas en Monocotiledóneas y Gimnospermas (Henning et al., 2013). Algunas de las especies que tienen alcaloides pertenecen a las familias Rubiaceae (quina, café), Papaveraceae (adormidera, amapola), Solanaceae (tabaco, belladona, papa) Ranunculaceae (acónitos), Berberidaceae, entre otras. (Henning et al., 2013). En monocotiledóneas son más escasas, pero hay familias bien representadas como, las Lilaceae, Iridaceae, Araceae y Amaryllidaceae, esta última es de gran interés farmacológico.

1.4 Familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae es un grupo de monocotiledóneas pertenecientes al orden Asparagales, que comprende alrededor de 800 especies agrupadas en 59 géneros y

distribuidas principalmente en zonas cálidas y tropicales (Jin, 2019). Actualmente, esta familia incluye a las subfamilias Amaryllidoideae, Agapanthoideae y Allioideae (Chase et al., 2009).

Son plantas bulbosas (raramente rizomatosas), en su mayoría geófitas, perennes, terrestres, ocasionalmente acuáticas o epifitas, ricas en alcaloides específicos de la familia (Meerow & Snijman, 1998). Bulbos tunicados. Hojas anuales o persistentes, sésiles, lineares o pecioladas y lanceoladas a ampliamente elípticas, dísticas o dispuestas en espiral, a veces envainado basalmente y formando un pseudotallo aéreo, generalmente glabras, raramente con tricomas (Meerow & Snijman, 1998). Inflorescencia escamosa, pseudoumbeliforme (cimas helicoidales reducidas); escapo a veces totalmente subterráneo, terminado por dos o más brácteas espatáceas, obvolutas o quitantes, generalmente marcescentes, que encierran las flores en botón, bractéolas internas suelen estar presentes y sucesivamente más cortas y estrechas (Meerow & Snijman, 1998). Flores numerosas, perfectas, frecuentemente grandes y vistosas, sésiles o pediculadas, cada una generalmente subtendida por una bractéola, actinomorfa o zigomorfa, generalmente protándrico. Perigonio crateriforme, salveriforme, embudo tubular o ventricoso, formado por tres más tres segmentos (tépalos) connados por debajo de un tubo corto o largo o raramente libres en la base; tépalos internos generalmente más cortos que los externos. A veces presenta un crecimiento del perigonio, formando una corona llamativa (paraperigonio), o relativamente discreta, consiste en un borde calloso corto o anillo de escamas o fimbrias en la base. Estambres tres más tres, raramente 5 o 18 o más, subiguales o de longitud variable, insertados en la base del perigonio o por debajo, los filamentos a veces diversamente connados o de otro modo apendiculados, raramente adnatos al estilo, anteras generalmente dorsofijas, raramente centrifijas o basifijas, introsas, dehiscentes longitudinalmente o raramente de un poro terminal. Estilo filiforme, hueco, ocasionalmente estrumoso, raramente tripartito; estigma capitado, de tres lóbulos o profundamente trifido, generalmente papilado. Ovario sincárpico, tricarpelar, inferior, trilocular, con nectarios septales; óvulos axilares o basales en placentación, anatropicos, crasinucelados, bi, uni o ategmicos.(Meerow & Snijman, 1998). El fruto maduro es una cápsula loculicidamente dehiscente, a veces indehiscente, rara vez una baya (Meerow & Snijman, 1998). Semillas globosas o subglobosas y carnosas o duras, aplanadas y aladas, generalmente con un borde negro o testa filamentosa marrón, a veces con un elaiosoma

caruncular en el extremo chalazal; endospermo con hemicelulosa y lípidos, en los géneros más derivados rico en agua y/o almidón (Meerow & Snijman, 1998).

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 & Cutler, 1984).

En Chile, (Ravenna, 2003) describe 11 géneros y 35 especies de Amaryllidoideae. La mayoría de estos géneros está representada por pocas 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. Por otra parte, el catálogo de la flora de Chile del 2018 describe para la familia Amaryllidaceae un total de 22 géneros y aproximadamente 120 especies (Rodríguez et al., 2018).

Estudios moleculares han permitido agrupar a géneros endémicos de Chile y de otros países americanos (García *et al.* 2014, García et al., 2019). Es importante destacar el alto grado de endemismo de los géneros de esta subfamilia en Chile (Ravenna, 2003).

1.5 Alcaloides en la familia Amaryllidaceae

El estudio de los alcaloides en Amaryllidaceae (AA) y en especial los de la subfamilia Amaryllidoideae comenzó en 1877 con el aislamiento del alcaloide licorina desde *Narcissus pseudonarcissus* (Bastida y Viladomat 2002). Estos alcaloides son específicos para esta familia de plantas, en 1950 fueron estudiados con mayor intensidad (Jin, 2013). El tipo y la cantidad de alcaloides en estas plantas es muy variable, debido principalmente al hecho, que los alcaloides presentan un equilibrio dinámico entre biosíntesis y degradación, de manera que en una misma planta tiene lugar importantes fluctuaciones debidas a factores ecológicos, climáticos y fisiológicos. Por lo tanto, los alcaloides en un vegetal se encuentran en función de la situación ambiental, órgano de la planta y momento de la ontogénesis en que se realice

el estudio (Jin, 2013). Otro factor importante en la producción de alcaloides tiene relación con los organismos endófitos que viven dentro de las plantas, algunos endófitos (bacterias u hongos) potencian de manera significativa la producción de estos alcaloides (Arnold, 2007).

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 y montanina (**Figura 1**), (Bastida et al., 2011).

Los alcaloides de esta familia se originan por mecanismos alternativos de acoplamiento oxidativo, de precursores relacionados con norbeladina (**Figura 2**), la cual es formada a través de la combinación de 3,4-hidroxibenzaldehído con tiramina, precursores originados a partir de aminoácidos 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), (**Figura 3**). 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 la licorina y crinina, aparentemente el átomo de nitrógeno actúa como nucleofílico 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).

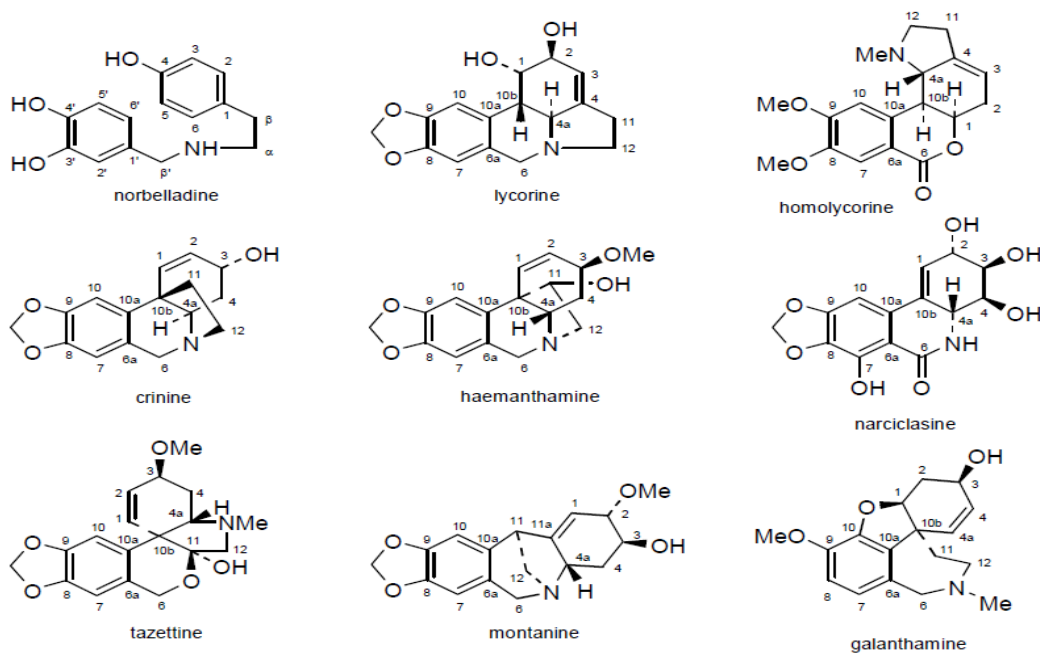


Figura 1. Alcaloides representativos de Amaryllidaceae (fuente: Bastida et al., 2011).

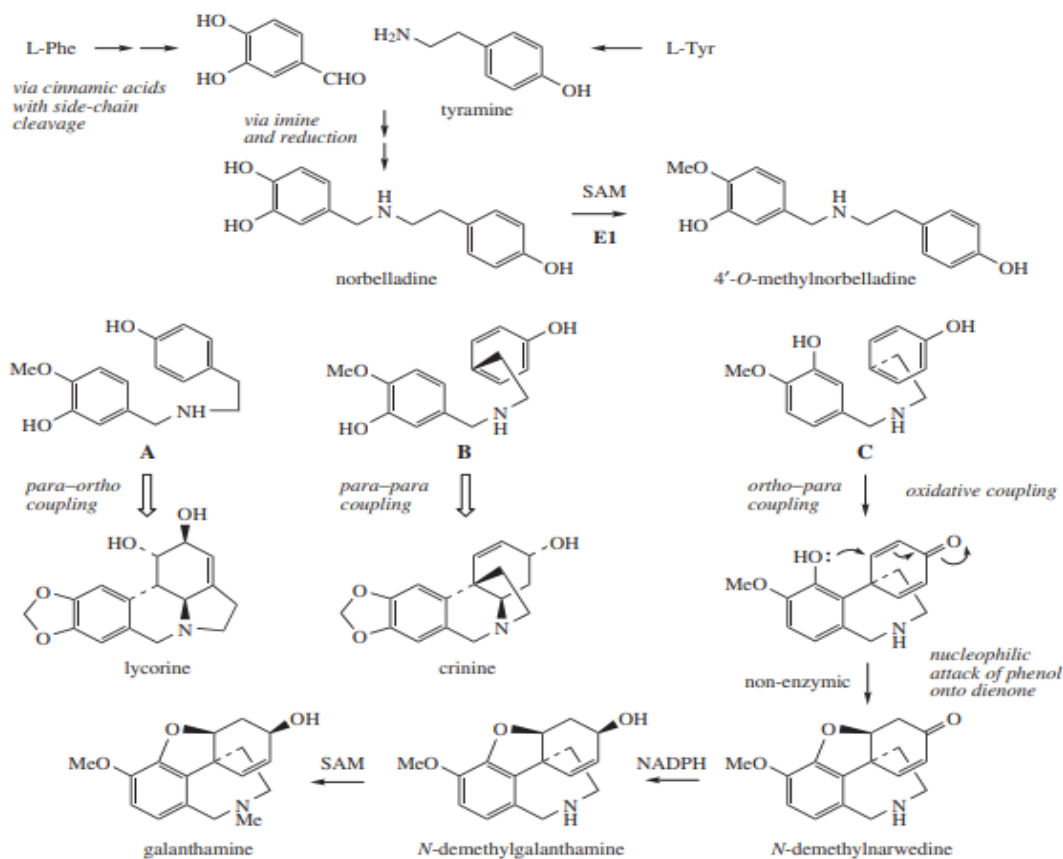


Figura 2. Vías de biosíntesis de alcaloides de Amaryllidaceae (fuente: Dewick, 2002).

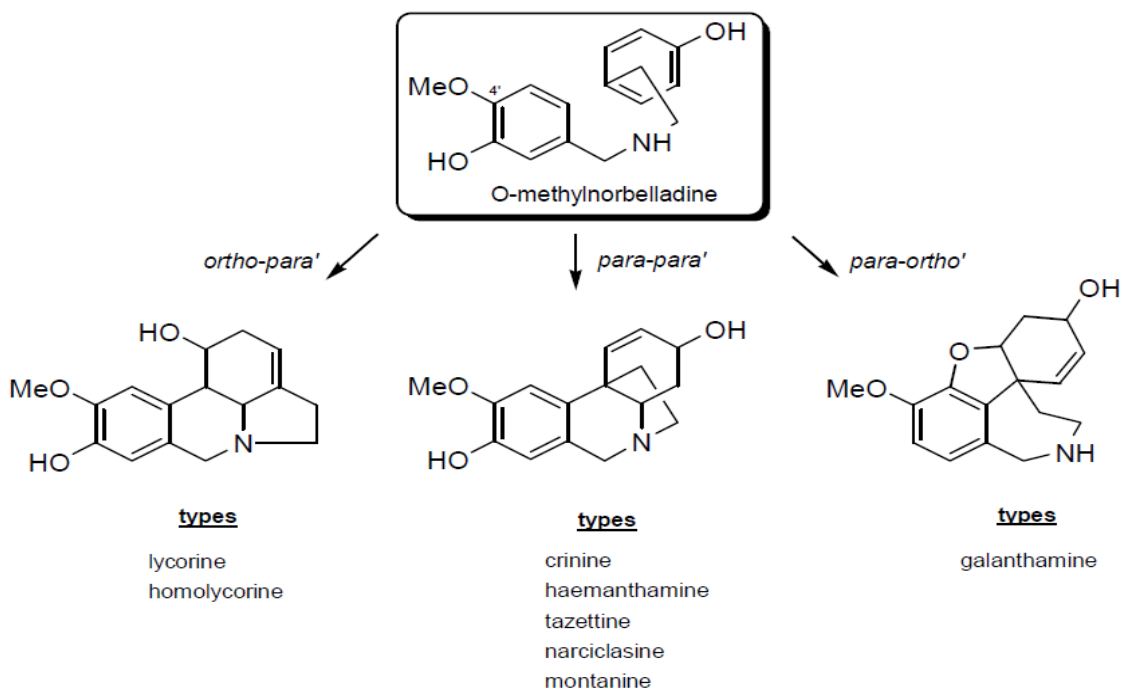


Figura 3. Tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae derivados de los diferentes acoplamientos oxidativos (fuente: Bastida et al., 2011)

1.5.1 Alcaloides tipo galantamina

Este tipo de alcaloides tienen un núcleo de dibenzofurano y se forman por un acoplamiento fenol oxidativo del tipo para-orto desde O-metilnorbelladina a una dienona que sufre un cierre espontáneo formando un éter para producir N-dimetilnarwedina, dando norgalantamina y después una reducción estereoselectiva (Bastida et al., 2011). La norgalantamina sufre una N-metilación a galantamina en el paso final de la biosíntesis. La ruta biosintética de este grupo de alcaloide se ilustra en la figura 2.

La galantamina puede aislarse de varias especies de las Amaryllidaceae, incluyendo *Galanthus* ssp, *Narcissus pseudonarcissus* y especies del género *Leucojum*, donde el contenido típico varía del 0,05 al 0,2% en los bulbos. También están presentes varios alcaloides estructuralmente relacionados. Actualmente se aísla para uso farmacológico de los bulbos de especies silvestres de *Leucojum aestivum* y *Galanthus*, para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer. Al igual que otros tratamientos de la enfermedad del Alzheimer, no cura la enfermedad, sino que simplemente minimiza o ralentiza el ritmo de deterioro cognitivo (Dewick, 2009).

1.5.2 Alcaloides tipo hemantamina

Este grupo de alcaloides se originan por acoplamiento fenol-oxidativo *para-para*., incluye estructuras derivadas de 5,10b-etanofenantridino (**Figura 2**). otra ruta descrita para la hemantamina que se forma de un acoplamiento *para-para* que ocurra en la estructura enantiomérica de la crinina y es el precursor de tazetina, montanina y narciclasina (Cedron, 2010).

1.6 Actividades biológicas y farmacológicas de alcaloides de Amaryllidaceae

Hasta la fecha, se han aislado más de 600 alcaloides estructuralmente diversos de plantas de la familia Amaryllidaceae (Jin, 2019), y se ha descubierto que poseen una amplia gama de propiedades biológicas. Actividades antitumorales, antibacterianas, antifúngicas, antipalúdicas, antivirales, analgésicas y actividades inhibitorias de las colinesterasas (AChE y BuChE) (He et al., 2015). Debido a sus estructuras únicas e inherentes, el estudio de la química y la biología de los alcaloides de Amaryllidaceae han atraído mucha atención (Jin, 2013).

1.7 Importancia económica ornamental de Amaryllidaceae

Además de sus propiedades medicinales, estas plantas son altamente valoradas en el ámbito económico debido a su uso como ornamentales, gracias a sus inflorescencias de colores llamativos vistosos. Se utilizan alrededor de 30 géneros diferentes con este propósito, incluyendo *Amarillis*, *Crinum*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Lycoris*, *Narcissus* y *Zephyranthes* (Zomlefer, 1994). Sin duda, las especies chilenas de Amaryllidaceae también poseen un gran potencial ornamental (Schiappacasse et al., 2002). Por ejemplo, el género *Rhodophiala* presenta flores en tonos rojos, rosados, naranjas y amarillos, ideales para el cultivo en macetas o para arreglos florales (Bridgen, 1994). En la actualidad, especies como *Rhodophiala bagnoldii*, *Rhodophiala phycelloides*, *Rhodolirium laetum* y *Rhodolirium montanum* se están cultivando con este propósito (Bridgen, 1994). Otros géneros con potencial ornamental incluyen *Amaryllis*. Este interés ha impulsado investigaciones sobre la propagación y el desarrollo de estas plantas en las últimas décadas (Schiappacasse et al., 2002).

2. ANTECEDENTES

2.1 *Phycella cyrtanthoides*

Phycella cyrtanthoides (Sims) Lindl, es una especie particularmente muy llamativa, ya que posee un intenso color rojo con amarillo además de su valor patrimonial, ya que en ella se cuenta una bella historia de amor, de la princesa Añañuca, la cual es el nombre común como se conoce a este género de plantas, las Añañucas. *Phycella* es un género endémico de Chile con taxonomía algo confusa. Muy relacionado con los géneros *Rhodophiala*, y *Placea* (García et al., 2019). Se distribuye entre las regiones de Coquimbo, Valparaíso, Metropolitana, O'Higgins y el Maule (Ravenna, 2003), esta especie se puede encontrar a nivel del mar hasta una altura de 1500 m.s.n.m, (**Figura 4**).

Inflorescencia de 1 o varias flores. Flores pediceladas o cabeceantes. Perigonio tubular o estrechamente campanulado, en su mayoría de color rojo brillante, a menudo de color amarillo verdoso o amarillo en la mitad o tercio inferior. Tépalos estrechamente oblanceolados, connados en la base, brevemente recurvados en el ápice o tercio superior. Filamentos estrechamente fasciculados, rectos, o raramente con sus ápices ligeramente ascendentes, 2 o 4 seriados; apéndices basales, si están presentes, en pares cerca de la base de la serie episepalo, discretos, blancos, oblongos o cultriformes. Anteras versátiles, elípticas, pequeñas. Ovario obovoide-oblongo, pluriovulado; placentación axilar. Estilo colocado debajo del fascículo del estambre o, a veces, en el medio de este, nunca encima de él. El ápice suele ser moderadamente ascendente, de lo contrario recto. Estigma diminutamente clavado o capitado, húmedo. Cápsula subglobosa o depresivamente globosa-tricocosa. Semillas numerosas en forma de una D u ovadas, planas, negras, con bordes membranosos (Ravenna, 2003)

Plantas vivaces, frágiles, delicuescentes. Bulbo ovoide, generalmente no se encuentra tan profundo en el suelo, emitiendo raíces débiles y anuales. Hojas lineales o lineal-oblanceoladas, bastante flácidas, de borde redondeados o angulados, con parénquima laminar o esponjoso en su interior. Tallo marcadamente fistuloso, quebradizo. Valvas de la espata libre casi hasta la base, ampliamente lanceoladas a ovadas, marcescentes (Ravenna, 2003).

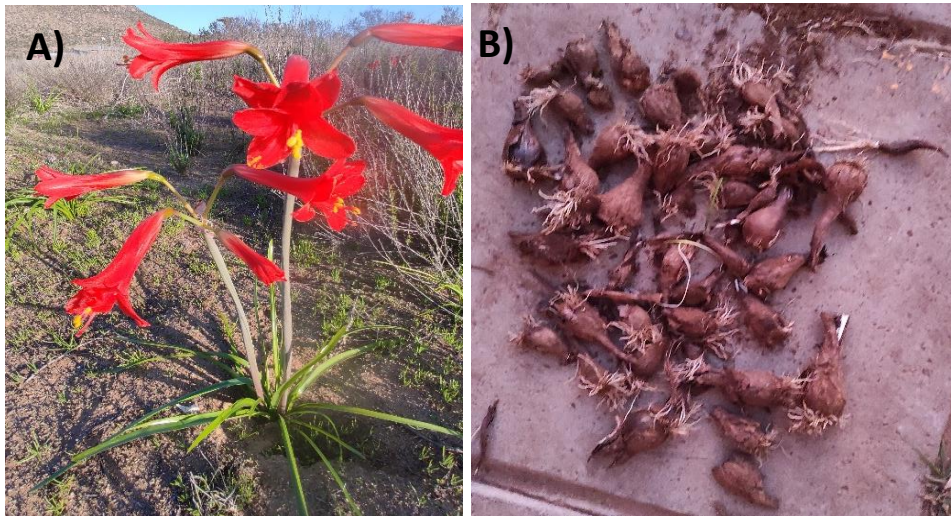


Figura 4. A) Flor de *Phycella cyrtanthoides*. B) Bulbos de *Phycella cyrtanthoides*

2.2 *Zephyranthes maculata*

Zephyranthes maculata (L, Her). Es uno de los géneros endémicos de Chile (Ravenna ,2003) su distribución está presente en la regio del Bio-Bio y la Araucanía, en zonas muy cercanas a la costa, con una altitud de hasta los 300 m.s.n.m (Ravenna, 2003).

En Chile, las especies de *Zephyranthes* se encuentran en las zonas desérticas y semidesérticas de la costa, en la cordillera de la costa, en el valle central y en las llanuras y colinas de la precordillera de los Andes, entre la Región de Antofagasta y la Región de Los Lagos (Schiappacasse et al., 2002).

Este género se caracteriza por tener un perigonio en forma de embudo de 6 tépalos; un androceo de 6 estambres ligeramente desiguales, y un gineceo tricarpelar de ovario inferior, terminado en un estigma trifido (Ravenna, 2003). También presenta flores de color rojo, rosa, naranja, blancas y amarillo, (**Figura 5**). Como todas las Amaryllidaceae son plantas bulbosas perennes, presenta hojas con venación paralela. Estas plantas tienen un alto valor ornamental (Baeza et al., 2009).



Figura 5. A) Flor de *Zephyranthes maculata*. B) Bulbos de *Zephyranthes maculata*.

3. Hipótesis de trabajo

La familia Amaryllidaceae es conocida por sus metabolitos secundarios característicos, que están relacionados biogenéticamente y pueden sintetizar alcaloides específicos de la familia. Estos alcaloides presentan diversas bioactividades y son altamente activos. Las especies chilenas de Amaryllidaceae deberían ser capaces de sintetizar los alcaloides típicos de la familia. Actualmente, el alcaloide más significativo de las Amaryllidaceae es la galantamina, que se utiliza para tratar la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, los estudios recientes sobre la galantamina se han centrado únicamente en su capacidad para inhibir la enzima AChE, limitando la exploración de sus otras bioactividades potenciales. Se ha demostrado que los alcaloides de las Amaryllidaceae poseen diversas bioactividades, como propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes. Por lo tanto, se proponen la siguiente hipótesis y pregunta de investigación:

¿Pregunta de investigación?

- ¿Cuál es el potencial uso y aplicaciones de los alcaloides de especies chilenas de la familia Amaryllidaceae, en especial el alcaloide galantamina?
- **Hipótesis 1**
Especies de la familia Amaryllidaceae de los géneros *Phycella* y *Zephyranthes* tienen la capacidad de biosintetizar altas concentraciones de galantamina, con potencial uso farmacológico.

4. Objetivos

Objetivo general

- Identificar los alcaloides de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*, determinar la actividad antioxidante y determinar el potencial antifúngico y antibacteriano de los extractos sobre especies de microorganismos de importancia clínica y agrícola.

Objetivos específicos

- Identificar alcaloides presentes en los extractos y fracciones obtenidos de los bulbos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* mediante análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Determinar la actividad antioxidante que presentan las fracciones y los extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*.
- Determinar la actividad antibacteriana que presentan los extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*. sobre distintas cepas de importancia clínica.
- Determinar la actividad antifúngica que presentan los extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*, sobre distintas cepas de importancia clínica y agrícola.

5. Materiales y métodos

5.1 Recolección y tratamiento del material vegetal

Los bulbos de *Phycella cyrtanthoides* se recolectaron el 13 de Agosto del 2022 comuna de Coquimbo en sector de Guanaqueros cerca Ruta 5, en las coordenadas 30° 11'22" S y 30°11'22"O, a 65 msnm y voucher de colecta Marcelo Rosas 9576.

Los bulbos de *Zephyranthes maculata* se colectó en 9 enero de 2023, en la Península de Hualpén (Región del Bio Bio), en el parque botánico Hualpén, en las coordenadas 36°47'S 73°10'O, a 60 m.s.n.m y voucher de colecta F. Crisosto S/N (CONC).

5.2 Extracción de Alcaloides

La extracción de los alcaloides se realizó mediante la metodología descrita por Robinson, 1981. Para la extracción de los alcaloides los bulbos frescos (100g de *Zephyranthes maculata* y 100g de *Phycella cyrtanthoides*) se extrajeron 3 veces con metanol a temperatura ambiente durante 72 horas. El disolvente se evaporo a presión reducida, quedando 20g de *Z. maculata* y 14g de *P. cyrtanthoides*. A cada extracto se le agregaron 300ml de agua ligeramente acida (2%) y se lavó la muestra con éter de petróleo, se extrajeron 3 veces con 200ml de cloroformo a pH ácido y básico, en la fracción de pH básico se encuentra la mayor parte de los alcaloides, obteniendo así, un extracto alcaloideo final.

5.3 Detección e Identificación de alcaloides

5.3.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se utilizaron cromatofolios de aluminio recubiertos con sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania). Para la separación de los alcaloides se utilizó como fase móvil cloroformo: metanol (80:20). La detección de los alcaloides se llevó a cabo mediante revelado con reactivo de Dragendorff.

5.3.2 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)

Las fracciones obtenidas fueron resuspendidos en cloroformo 100 µL y filtradas. Para realizar la cromatografía de gases capilar-espectrometría de masas se inyectó 1 µL, del extracto a un cromatógrafo de gases capilar Agilent Technologies 7890 System VLMSD, con columna

capilar HP-5MS (30mx0, 25mm d.i.), acoplado a un espectrómetro de masas con detector HP Model.5975. El gas de arrastre fue helio con un flujo de 1mL/min. Las temperaturas del inyector y el detector fueron 250°C y 300°C, respectivamente. El programa de temperatura fue de 100°C 2min, isotérmica de 100°C-280°C a 8°C/min, 280°C, 40 min. Rango barrido de masas 100-500 AMU.

La abundancia relativa de alcaloides se calculó considerando las áreas de los picos del cromatograma, mientras que la identificación de los alcaloides se llevó a cabo comparando los espectros de masas obtenidos con los de la biblioteca del software y con los reportados en la literatura.

5.4. Separación de alcaloides

5.4.1 Cromatografía en columna

Los extractos totales de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* se sometieron a cromatografía en columna (40cm x 4cm), utilizando gel de sílice 60 (200g) y cloroformo mezclado gradualmente con metanol al 10%, 20% y al 50% como eluyente. Se examinaron diferentes fracciones (50mL), mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice y se rociaron con el reactivo Dragendorff. Se combinaron las fracciones de contenido similar, obteniendo así, un total de 5 fracciones alcaloidales para *P. cyrtanthoides* y 3 fracciones para *Z. maculata*, de las cuales se seleccionó una fracción de cada especie para posteriores análisis y experimentos, para *P. cyrtanthoides* se seleccionó la fracción PF3 (**Figura 7**), y para *Z. maculata* se seleccionó la fracción ZF2B (**Figura 10**). Las fracciones se seleccionaron en base al contenido relativo de alcaloides, la fracción con mayor porcentaje relativo de alcaloides fue la fracción seleccionada.

5.5 Preparación de los extractos

Las soluciones utilizadas en los ensayos antioxidantes, antifúngicos y antibacteriano se prepararon 24h antes de la realización de cada ensayo. Para la solución stock de los extractos, se tomaron 10 mg de uno de los extractos y fracciones, se disolvieron en 1 mL de metanol. Posteriormente, a partir de la solución stock se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones que fueron puestas a prueba en los ensayos (10000, 1000, 800, 600, 400,

200, 100 y 50 µg/mL). Estas soluciones pertenecen a *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes maculata* respectivamente

5.6 Actividad antioxidante

5.6.1 Ensayo DPPH

El ensayo de eliminación de radicales DPPH se realizó mediante el procedimiento descrito por Qian et al. 2020, con algunas modificaciones. En primer lugar, se disolvió el DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) en metanol a una concentración de 0.1 mM. Para la reacción, se mezclaron 100µL de cada una de las muestras y 100µL de la solución de DPPH en una microplaca SPL 96 Well Plate Type 35096 y se dejó incubar por 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 517nm en el lector de microplaca BioTek Epoch™. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La actividad de eliminación de radicales fue expresada como % de inhibición, los cuales fueron calculados a partir de la fórmula descrita por (Masek et al., 2020).

$$\text{Inhibición [\%]} = [(Ac - Am) / Ac] \times 100$$

donde Ac es la absorbancia control y Am es la absorbancia de la muestra.

5.7 Actividad antifúngica

5.7.1 Técnica poison food

Se comprobó la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* mediante la técnica poison food descrita por (Ma et al., 2010). Se utilizó agar patata dextrosa (PDA) como medio de cultivo para todos los hongos de prueba. Los hongos de prueba fueron *Aspergillus niger* ATCC 16888, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 y *Trichoderma* ssp. Primero, se prepararon los extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* a una concentración de (1000ug/mL) en placas de agar papa dextrosa (PDA), luego se incubaron las placas con extractos hasta que el solvente se evapore. Posteriormente se cultivaron discos de 4 mm de diámetro con hongos previamente seleccionados y se inocularon en el centro de la placa Petri, por último, se dejó incubando a 25°C. Cada hongo se replicó por tres veces. Después de una incubación de 4 a 7 días, cuando los hongos del control crecieron casi por completo en la placa de agar, se midió el diámetro del crecimiento

del micelio de hongos (cm) en las placas de Petri tratadas (T) y de control (C). El porcentaje de inhibición del crecimiento (I) se calculó utilizando la ecuación

$$I (\%) = [(C-T) / C] \times 100 \%$$

5.8 Actividad antibacteriana

5.8.1 Ensayo de difusión en agar sobre cepas bacterianas

Se realizó una prueba de sensibilidad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en agar descrito por (Herrera, 1999), sobre 7 cepas de interés clínico *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Salmonella typhi*. Las bacterias fueron cultivadas en medio Müller Hilton y las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. A continuación, el caldo de la bacteria de ensayo se extendió uniformemente en una placa de agar nutritivo en condiciones estériles. Los extractos y fracciones alcaloides fueron resuspendidos a una concentración de 10 mg/mL. Luego se añadió un volumen de 20 µL y 50 µL de extracto en discos de papel filtro Whatman n°1 estériles, equivalente a 200 µg y 500 µg respectivamente (Aqueveque et al. 2006). Como control positivo se utilizó estreptomycin (Streptomycin sulfate salt ~95%, Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 µg/mL (Aqueveque et al., 2006). Cada disco se colocó uniformemente en la placa de PDA, que se había inoculado con la bacteria correspondiente. El disco con metanol se utilizó como control negativo, ya que el solvente de las muestras se encuentra en metanol. Las placas se incubaron a 37°C tras 24h y 48h, se midió el diámetro de cualquier zona de inhibición alrededor de los discos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.9 Análisis de datos

Los resultados se analizaron utilizando los criterios del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI 2015). Los extractos que produjeron un halo de inhibición mayor o igual a 20 mm de diámetro fueron considerados activos contra las cepas bacterianas, para las cepas fúngicas fueron considerados los extractos activos con una inhibición del micelio de <30 y 60 %>. Los análisis para la actividad antioxidante se computaron con el idioma de programación R v4.1.2 (R Core Team, 2021), bajo la plataforma R studio v.2023.12.01 (Posit team, 2023). Se procedió a graficar los datos con la ayuda del paquete ggplot2 v3.5.0

(Wickham H, 2016). Con la ayuda del paquete drc v.3.0-1 (Ritz et al., 2015), se procedió de computar el valor de IC_{50} por medio del ajuste de un modelo linear-logarítmico de 2 parámetros. Ninguna prueba de significancia estadística se utilizó en el trabajo.

6. Resultados

6.1 Obtención de extractos alcaloideos a partir de los bulbos de las especies *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes maculata*

Tabla 1. Cantidad de extracto obtenido en relación con el peso fresco de la muestra y su rendimiento.

Parte de la planta	Peso muestra (g)	Extracto total (g)	Extracto alcaloideo (mg)	Rendimiento (%)
Bulbos <i>P. cyrtanthoides</i>	100	6,2	980	0,98
Bulbos <i>Z. maculata</i>	100	5,3	550	0,55

Tabla 2. Cantidad de extracto obtenido en relación con el peso seco de la muestra y su rendimiento.

Parte de la planta	Peso de la muestra (g)	Extracto total (mg)	Rendimiento (%)
Bulbos <i>P. cyrtanthoides</i>	20	214	1
Bulbos <i>Z. maculata</i>	20	42	0,21

6.2 Realización de un análisis cualitativo de los extractos alcaloideos mediante una cromatografía de gases con espectrómetro de masas (GC-MS).

6.2.1 Bulbos de *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes maculata*

Una vez obtenidos los extractos alcaloideos a partir de bulbos de *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes maculata*, el análisis de cromatografía de gas con espectrometría de masas (GC-MS), dio como resultado la presencia de veintidós alcaloides en *P. cyrtanthoides* y diez en *Z. maculata*, tal como indican las tablas 3 y 4:

Tabla 3. Alcaloides en bulbos de *P. cyrtanthoides*

Alcaloide	Nombre	Tiempo de retención		
		M+	(MIN)	Área (%)
1	Galantamina	287	18.629	15.1
2	Licoramina	289	18.695	1.6
3	Crinan-3-ol,1,2-didehidro-(3b-	271	19.026	0.8
4	Galantaminon	285	19.111	1.1
5	Tazettina , 6a-deoxi-	315	19.385	1.2
6	Norpluvina	273	19.461	0.08
7	3-Acetil-pancracina	329	19.471	0.4
8	Crinamina, 6-metoxi-	331	19.575	0.7
9	Crinan-3-uno	271	19.802	0.3
10	Nerinina	347	19.849	1.2
11	Dihidroepinatalensina	303	19.896	0.2
12	Criwelina,6a-desoxi-6-metoxi	345	19.915	0.6
13	Dihidrohemantidina	319	20.066	0.7
14	Bufanitina	319	20.114	1.3
15	Dihidrotazettadiol	335	20.284	0.4
16	Hemantamina	301	20.312	3.7
17	Tazettina	331	20.341	1.9
18	Dihidro-1-acetil-licorina	332	20.662	0.7
19	Chidantina, 1.2-dihidro-	289	20.832	0.3
20	Licorina	287	21.173	2.2
21	O-Acetildihidrocrinina	315	21.532	3.4
22	Hippeastrina	315	22.355	0.7

En el estudio realizado a los bulbos de *P. cyrtanthoides* se determinó la presencia de 22 alcaloides estructuralmente diversos característicos de la familia Amaryllidaceae (**Tabla 3**). Los métodos cromatográficos resultaron ser útiles en la determinación de la abundancia

relativa (área) de estos alcaloides, resultando galantamina (**Figura 8**), el que presenta mayor abundancia, un 15.1% en la muestra analizada, lo sigue la hemantamina con una abundancia del 3.7% seguido de O-Acetildihidrocrinina con un 3.4%, (**Figura 6**). Para la fracción PF3 el alcaloide mayoritario fue la galantamina con un porcentaje relativo del 50%.

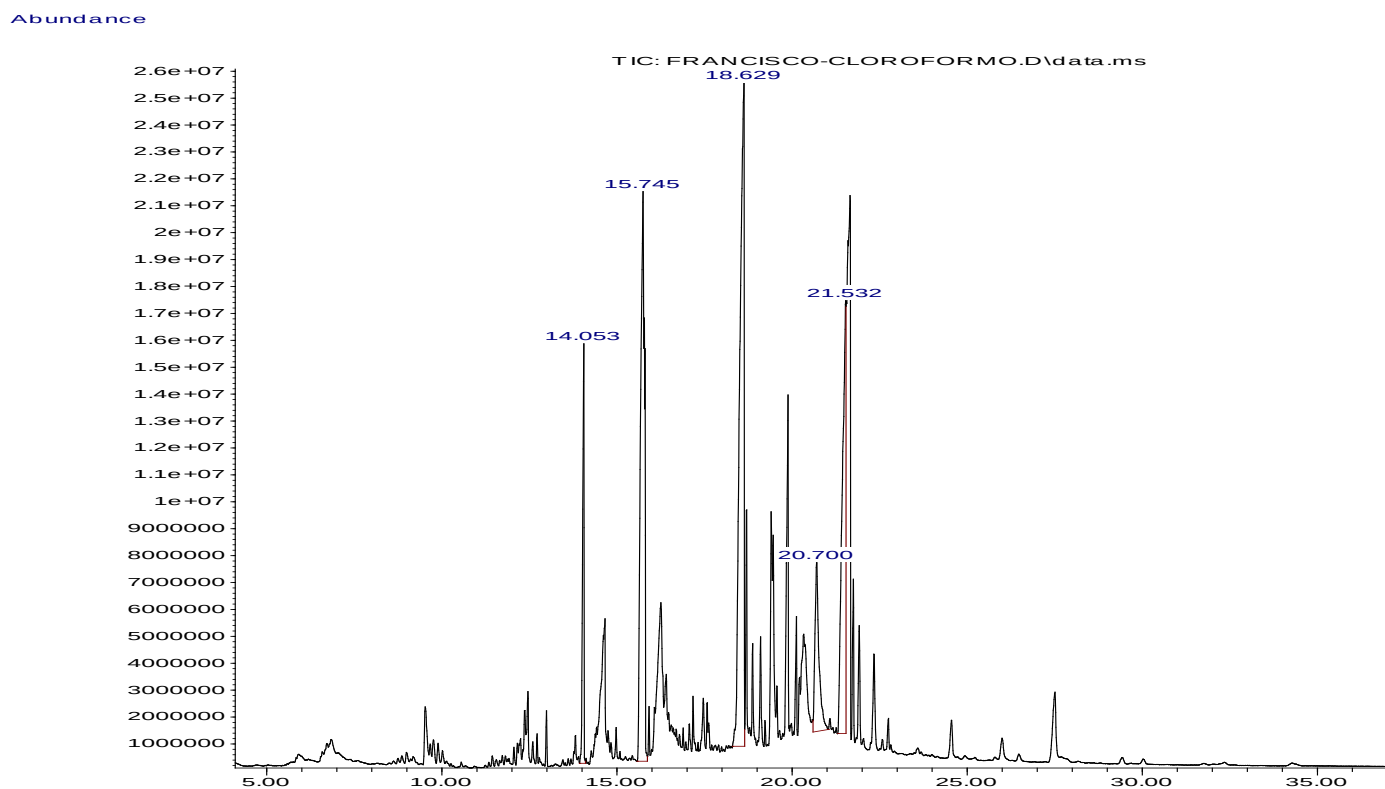


Figura 6. Espectro GC-MS analizado en extracto alcaloideo de los bulbos de *Phycella cyrtanthoides*, el pico más representativo fue el alcaloide galantamina, con un tiempo de retención de 18.629.

Abundance

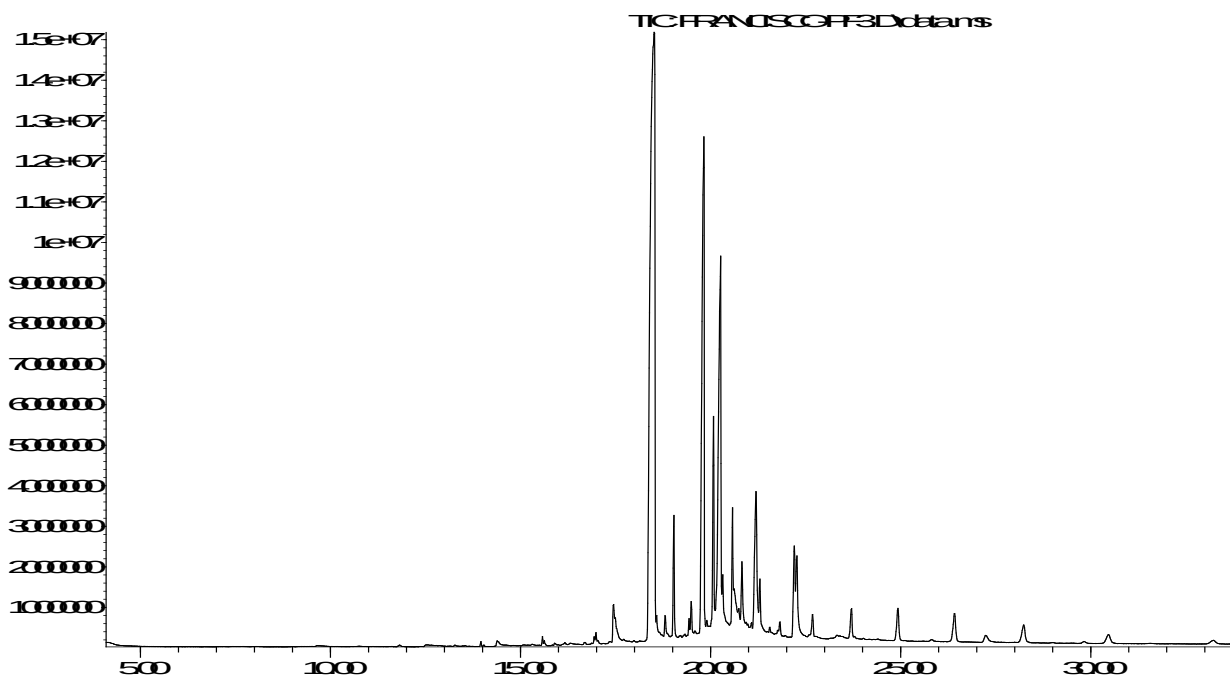


Figura 7. Espectro GC-MS analizado de *Phycella cyrtanthoides*, perteneciente a la fracción PF3, la molécula en mayor concentración en muestra es la: galantamina, con un porcentaje en área relativo del 50% total de la muestra.

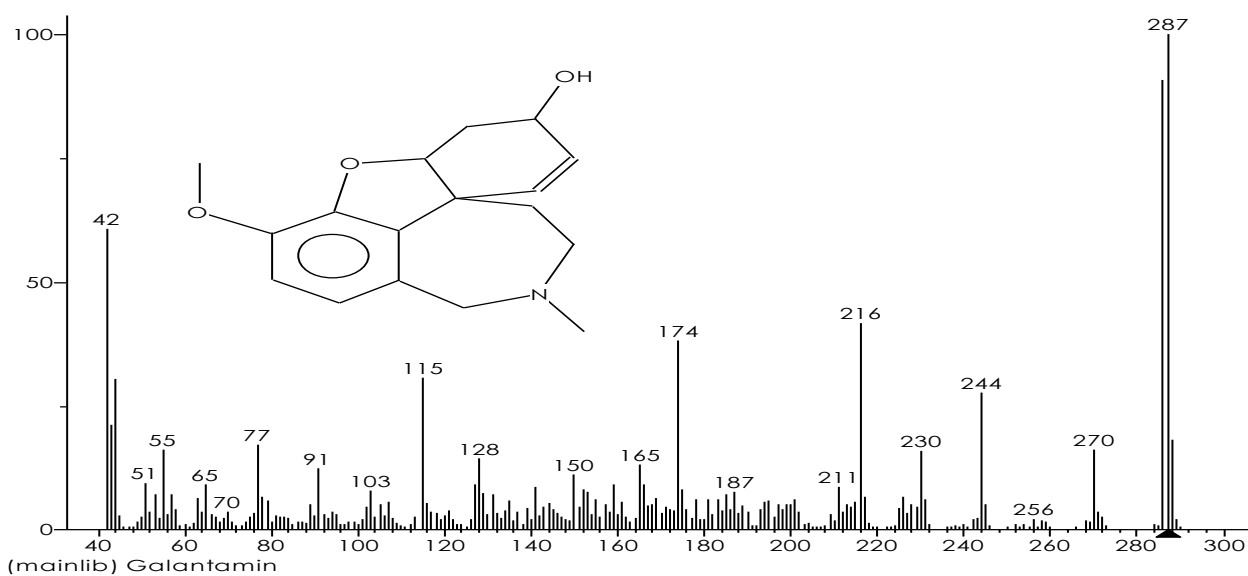


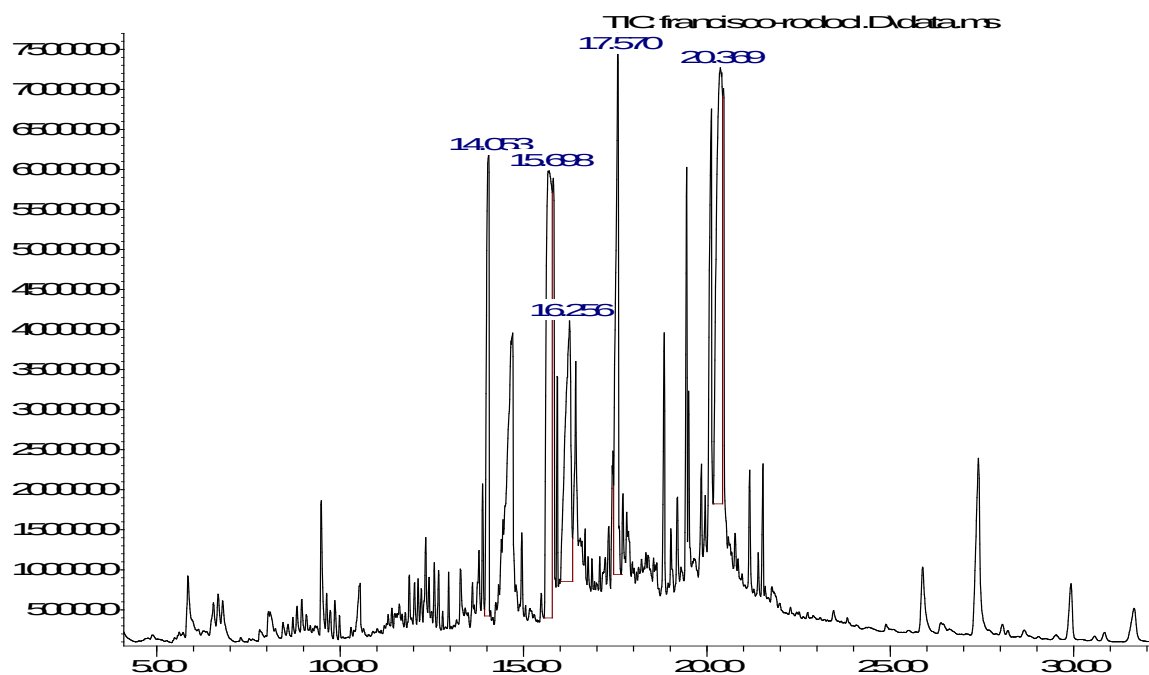
Figura 8. Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide galantamina, de *Phycella cyrtanthoides* por GC-MS.

Tabla 4. Alcaloides en bulbos de *Zephyranthes maculata*

Alcaloide	Nombre	M+	Tiempo de retención (MIN)	Área (%)
1	Salutaridina	327	19.889	0.09
2	Hemantamina	301	20.389	9.8
3	Galantamina	287	18.679	0.7
4	3-Acetil-pancracina	329	19.915	0.3
5	Krigeina	347	19.509	0.08
6	O-Acetildihidrocrinine	315	19.745	1.1
7	Hemantidina	317	20.180	0.5
8	Tazettina	331	20.274	1.0
9	Coccinina	301	20.123	0.6
10	Licorina	287	21.135	0.4

En cuanto al estudio realizado a los bulbos de *Z. maculata* se determinó la presencia de diez alcaloides diferentes característicos de la familia (**Tabla 4**), mediante análisis de cromatografía de gas con espectrometría de masas (GC-MS), resultando la hemantamina (**Figura 11**), el que presenta una mayor abundancia en la muestra, cerca del 9.8% seguido de O-Acetildihidrocrinina con un 1.1% (**Figura 9**). Para la fracción ZF2B el alcaloide en mayor concentración fue la hemantamina con un 52% de porcentaje relativo en área, (**Figura 10**).

Abundance



Time→

Figura 9. Espectro GC-MS analizados en extracto total de los bulbos de *Zephyranthes maculata*, el pick más representativo fue hemantamina con un tiempo de retención de 20.389.

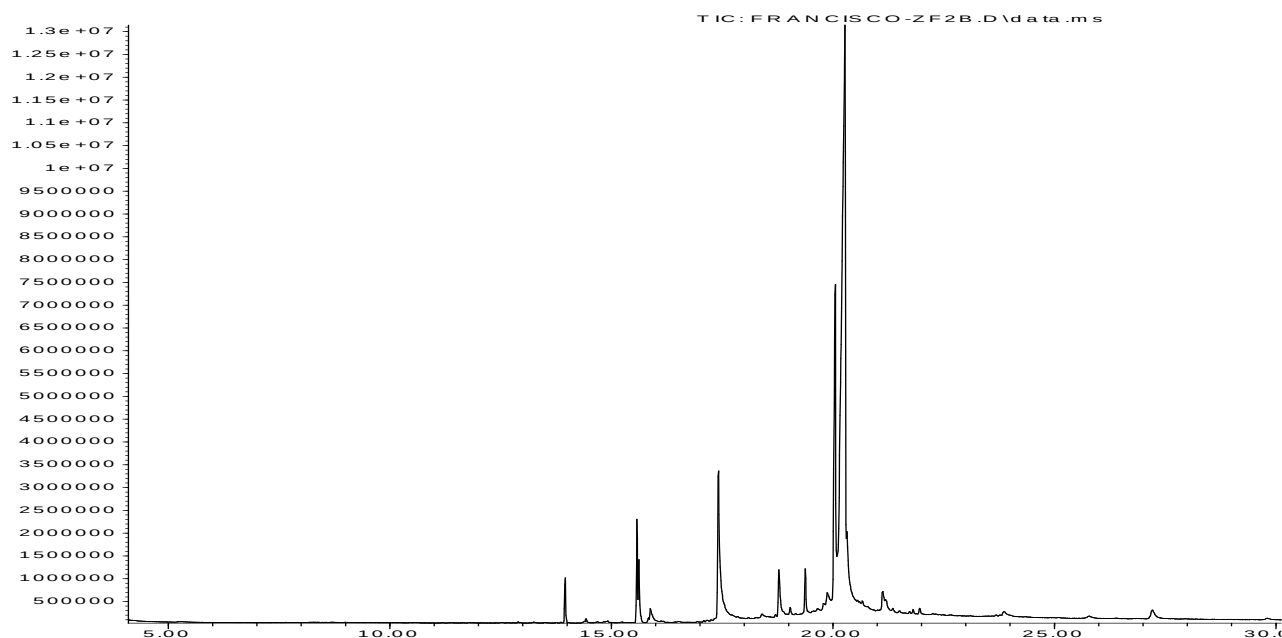


Figura 10. Espectro GC-MS analizado de *Zephyranthes maculata*, perteneciente a la fracción ZF2B, la molécula en mayor concentración en muestra es la: hemantamina, con un porcentaje en área relativo del 52% del total de la muestra.

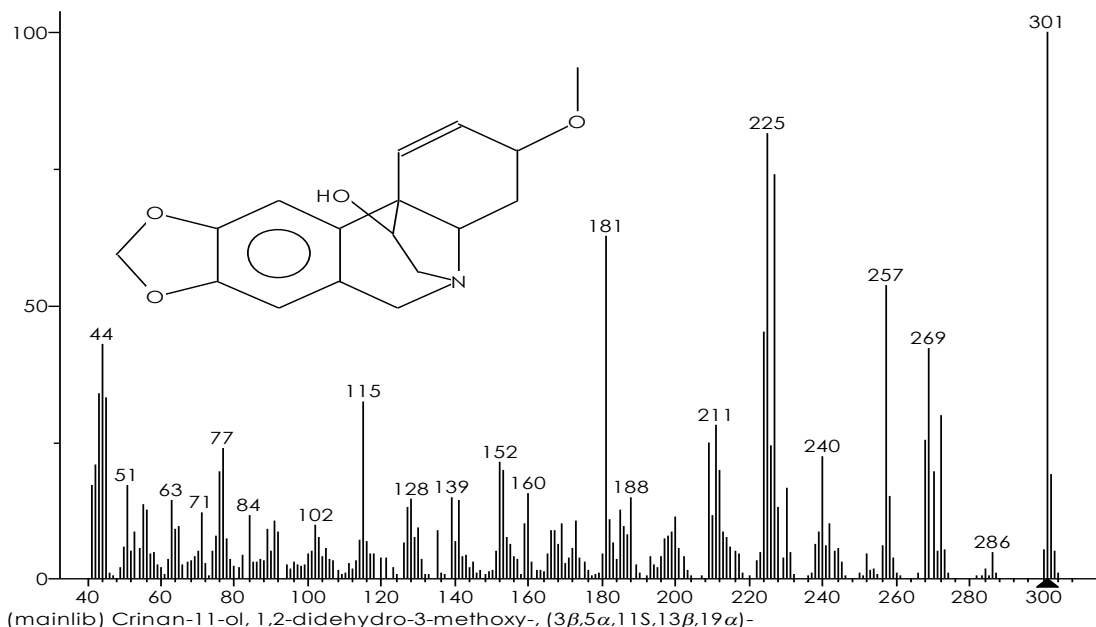


Figura 11. Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide hemantamina de *Zephyranthes maculata* por GC-MS.

6.3 Realización del ensayo antioxidante

6.3.1 Ensayo de neutralización del radical (DPPH)

El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) es un radical libre que al ser disuelto en etanol o metanol da lugar a una solución de color violeta, cuyo rango máximo de absorción se da a los 517 nm. Este ensayo determina la capacidad antioxidante de una molécula, mediante un mecanismo de donación de átomos de hidrógeno. La donación de estos produce una reducción de la molécula de DPPH, y con ello un cambio de color en la solución (Garcia et al., 2012; Gupta, 2015).

El porcentaje de inhibición del radical DPPH exhibido por las distintas concentraciones de extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*, mostraron algunas diferencias alcanzando un valor máximo de $87,7\% \pm 7,21\%$ a una concentración de 10mg/mL para el extracto de *P. cyrtanthoides* y un $73,4\% \pm 9,21\%$ a una concentración de 10 mg/mL para *Z. maculata*, (**Figura 12**).

P. cyrtanthoides es el que mostro un mayor poder de neutralización del radical con un 92,8% a una concentración de 10mg/ml, esto pertenece al extracto alcaloideo, por su parte el

extracto fraccionado presento una inhibición del 82,5% a una concentración de 10mg/mL. Los valores IC_{50} fueron $3061 \pm 298,16 \mu\text{g/mL}$ para el extracto total y $3862 \pm 271,125 \mu\text{g/mL}$ para la fracción, (**Figura 13,14**).

Z. maculata presento una inhibición del radical libre de hasta un 67,1% para el extracto total a una concentración de 5mg/mL y un 73,4% para el extracto fraccionado (ZF2B) a una concentración de 10mg/mL. Los valores IC_{50} $2303,257 \pm 298,16 \mu\text{g/mL}$ para el extracto total y un IC_{50} de $7283,801 \pm 402,286 \mu\text{g/mL}$, (**Figura 15,16**).

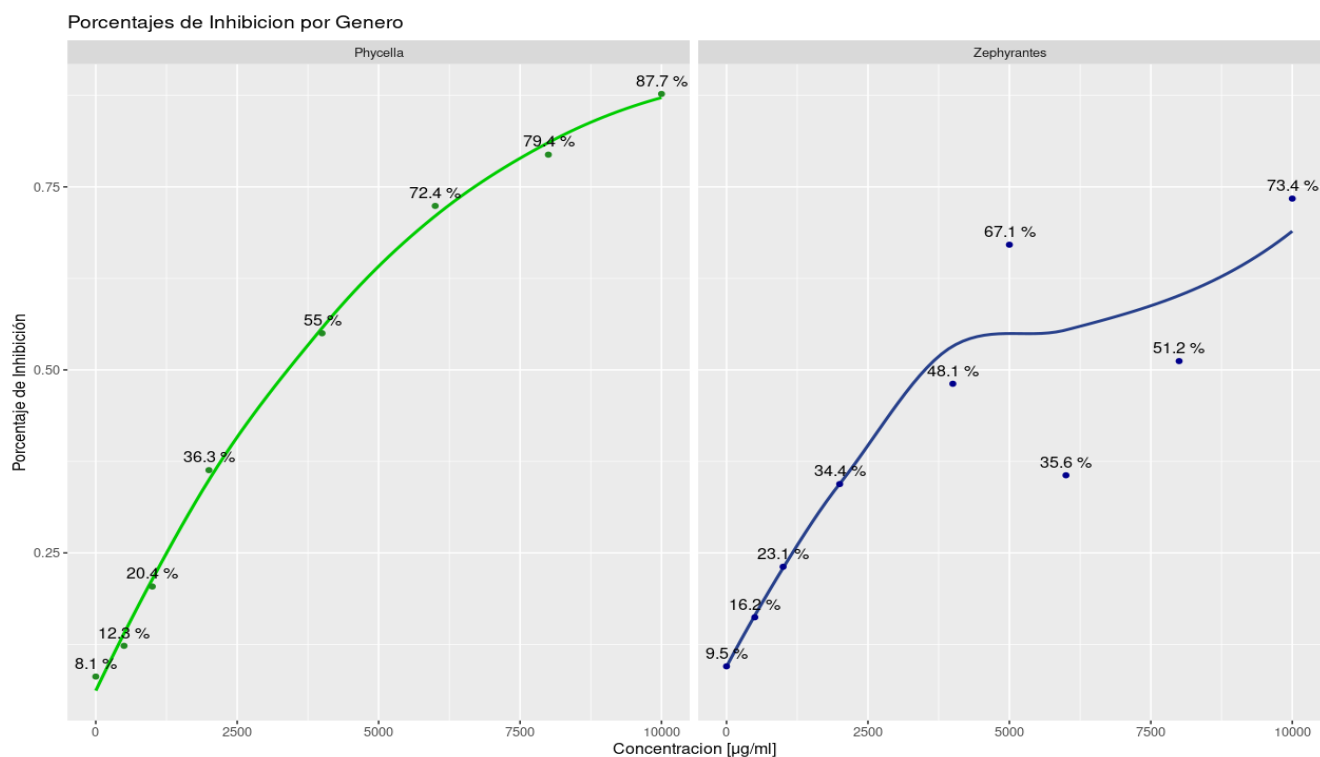


Figura 12. Porcentajes de inhibición del radical libre DPPH para las especies *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes maculata*.

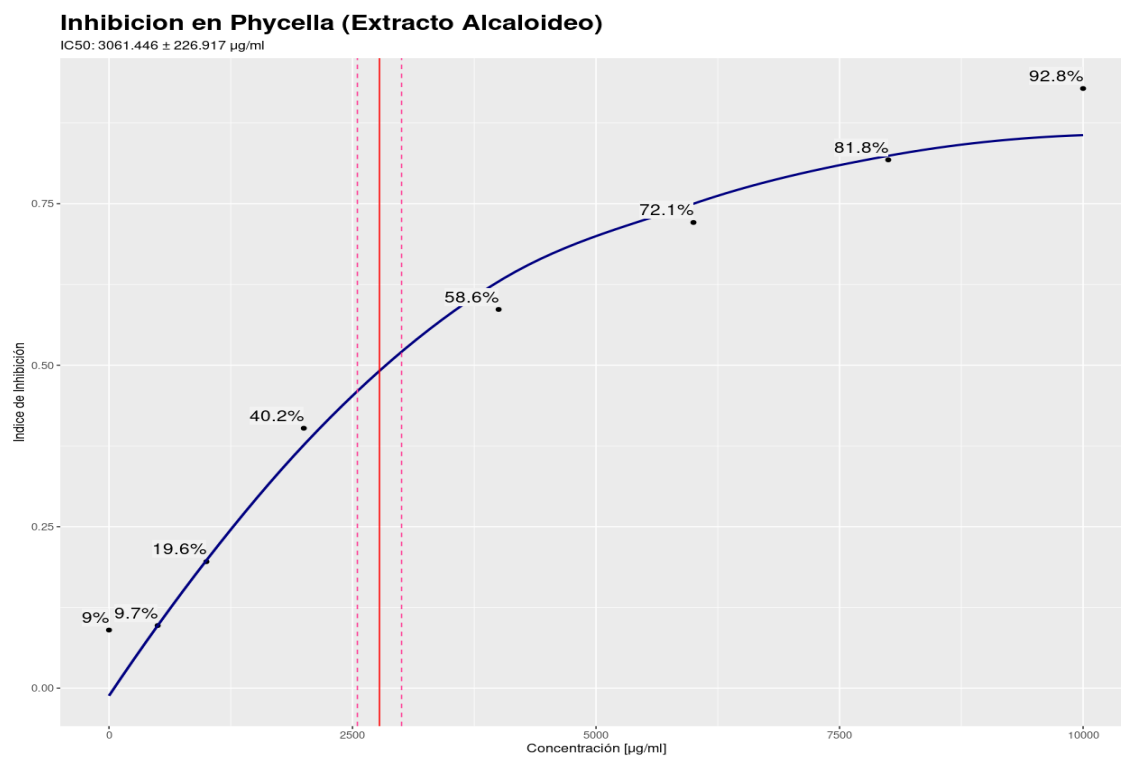


Figura 13. Inhibición del radical libre DPPH para el extracto total de *P. cyrtanthoides*.

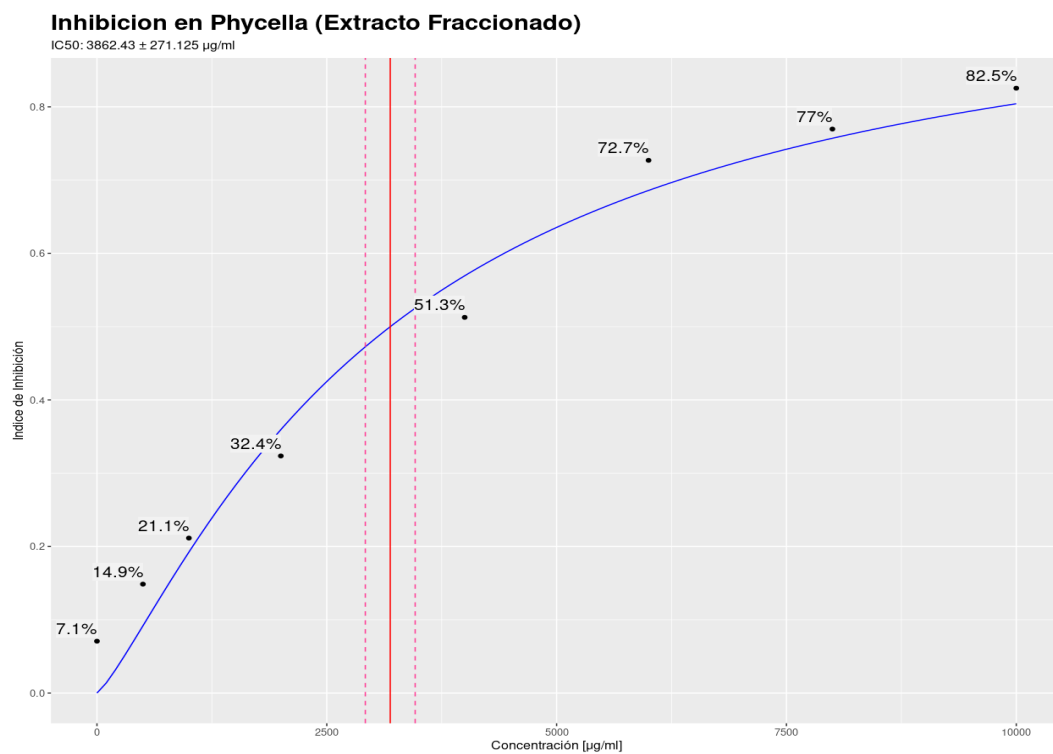


Figura 14. Inhibición del radical libre DPPH para la fracción PF3 de *P. cyrtanthoides*.

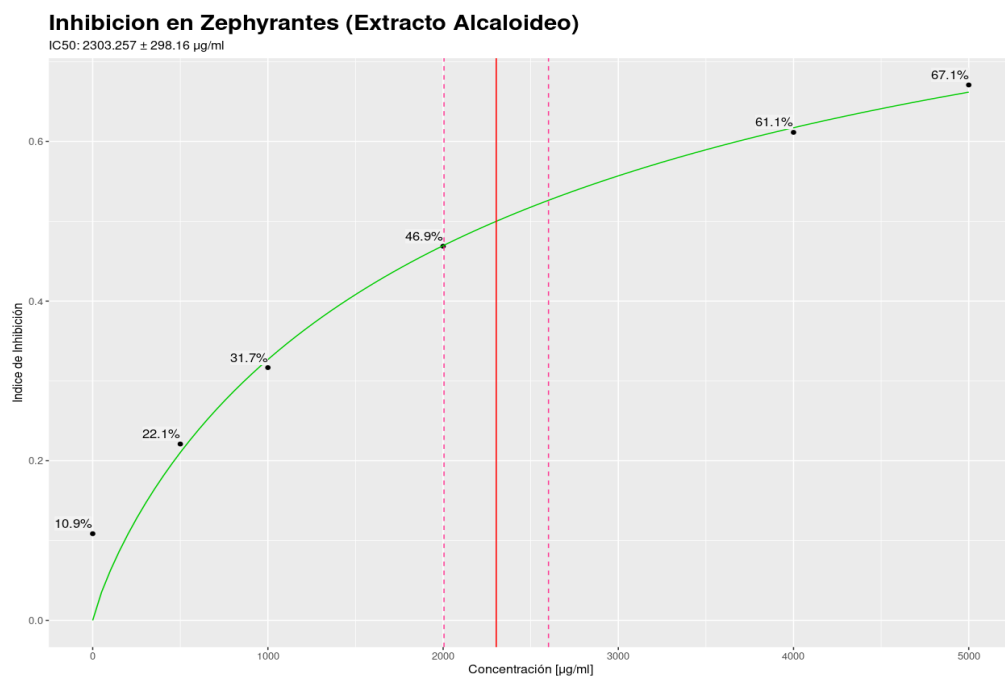


Figura 15. Inhibición del radical libre DPPH para el extracto total de *Z. maculata*.

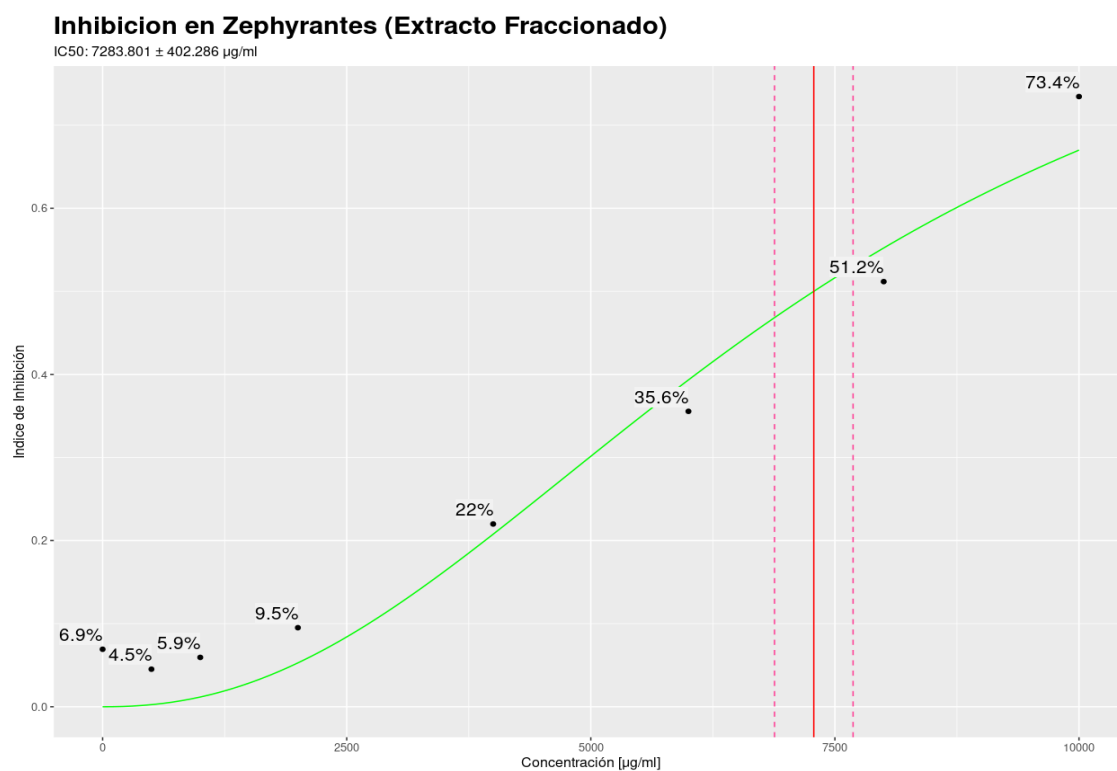


Figura 16. Inhibición del radical libre DPPH para la fracción ZF2B de *Z. maculata*.

6.4 Realización de la prueba antifúngica

6.4.1 Técnica poison food

La actividad antifúngica de los extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* se probó en las cepas de *A. nigger*, *A. fumigatus* y *Trichoderma* ssp, tanto como para extracto de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*, se considerará una actividad inhibitoria fuerte cuando el porcentaje de inhibición del micelio sea de ($>60\%$), una actividad inhibitoria moderada ($>30\%$ y $\leq 60\%$) y una actividad inhibitoria débil cuando en porcentaje de inhibición del micelio sea ($<30\%$) (Ma et al., 2010).

La actividad antifúngica los extractos mostraron una fuerte actividad inhibitoria *in vitro* del micelio, especialmente en *A. niger* donde hubo una inhibición del 68,75 % del micelio con extractos de *Z. maculata* y en un 62,5% para el extracto de *P. cyrtanthoides*, en tanto las especies de *A. fumigatus* y *Trichoderma* ssp obtuvieron una inhibición moderada del micelio, *A. fumigatus* se inhibió en un 56,3% con el extracto de *Z. maculata* y en un 31,3% con el extracto de *P. cyrtanthoides*, por su parte *Trichoderma* ssp se inhibió en un 47,2% con el extracto de *Z. maculata* y en un 33,3% con el extracto de *P. cyrtanthoides*, no se observó una inhibición del micelio débil en ninguna de las especies de hongos, (**Figura 17**).

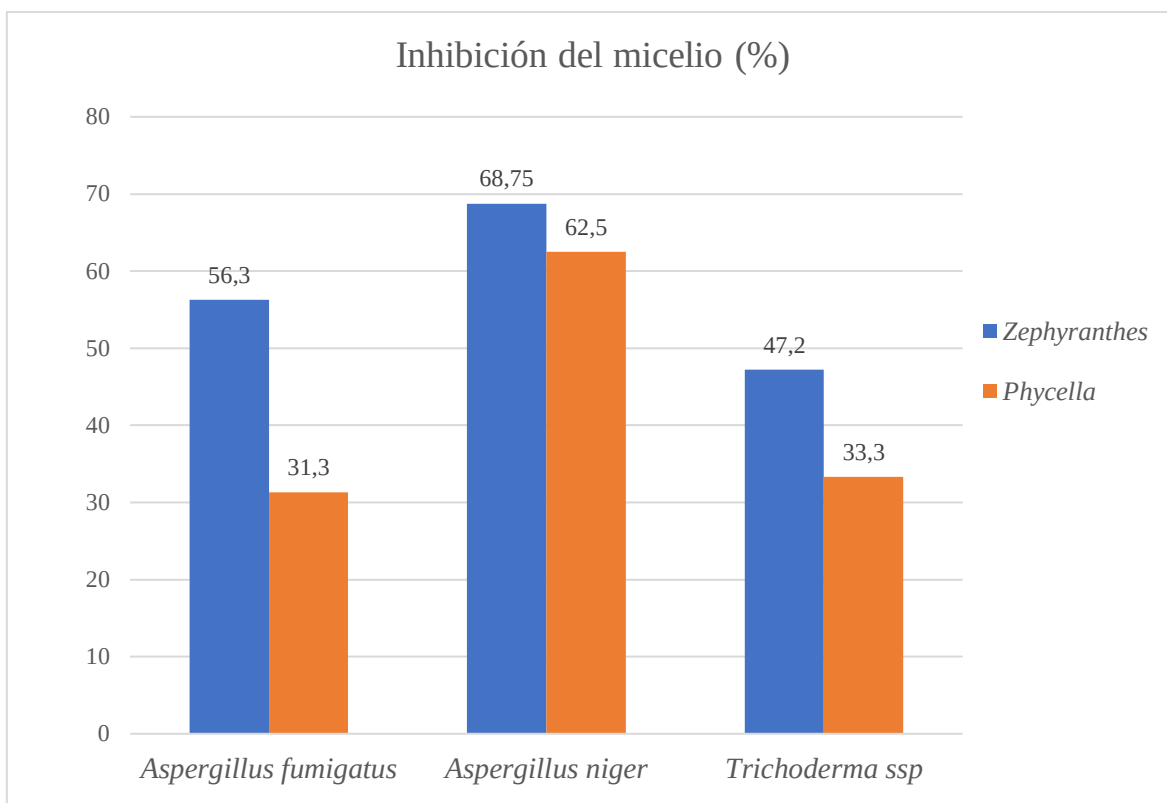


Figura 17. Porcentaje de inhibición de micelio en hongos tratados, con extractos alcaloides totales de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*.

6.4.2 Observaciones morfológicas macroscópicas y microscópicas

Las observaciones morfológicas microscópicas de los hongos tratados se realizaron con un microscopio óptico, se recogieron y observaron los micelios de *A. niger*, *A. fumigatus* y *Trichoderma ssp*, de los grupos tratados (T) y el grupo control (C) utilizando aumento de 10X y 40X, respectivamente. La estructura del micelio fue diferente entre los grupos de control y los tratados. En el caso de *Aspergillus niger* (**Figura 18**), el micelio del grupo control, presentaban ramificaciones largas y poco densas, con un micelio muy estirado y sin interrupciones, para los grupos tratados con extracto de *P. cyrtatnhoides* como para *Z. maculata*, el micelio presentaba ramificaciones cortas, con una tendencia a bifurcarse en los extremos, con un micelio muy denso y deformados, esto para ambos extractos, especialmente en el extracto de *P. cyrtatnhoides*, el cual presento un micelio muy denso y deformado.

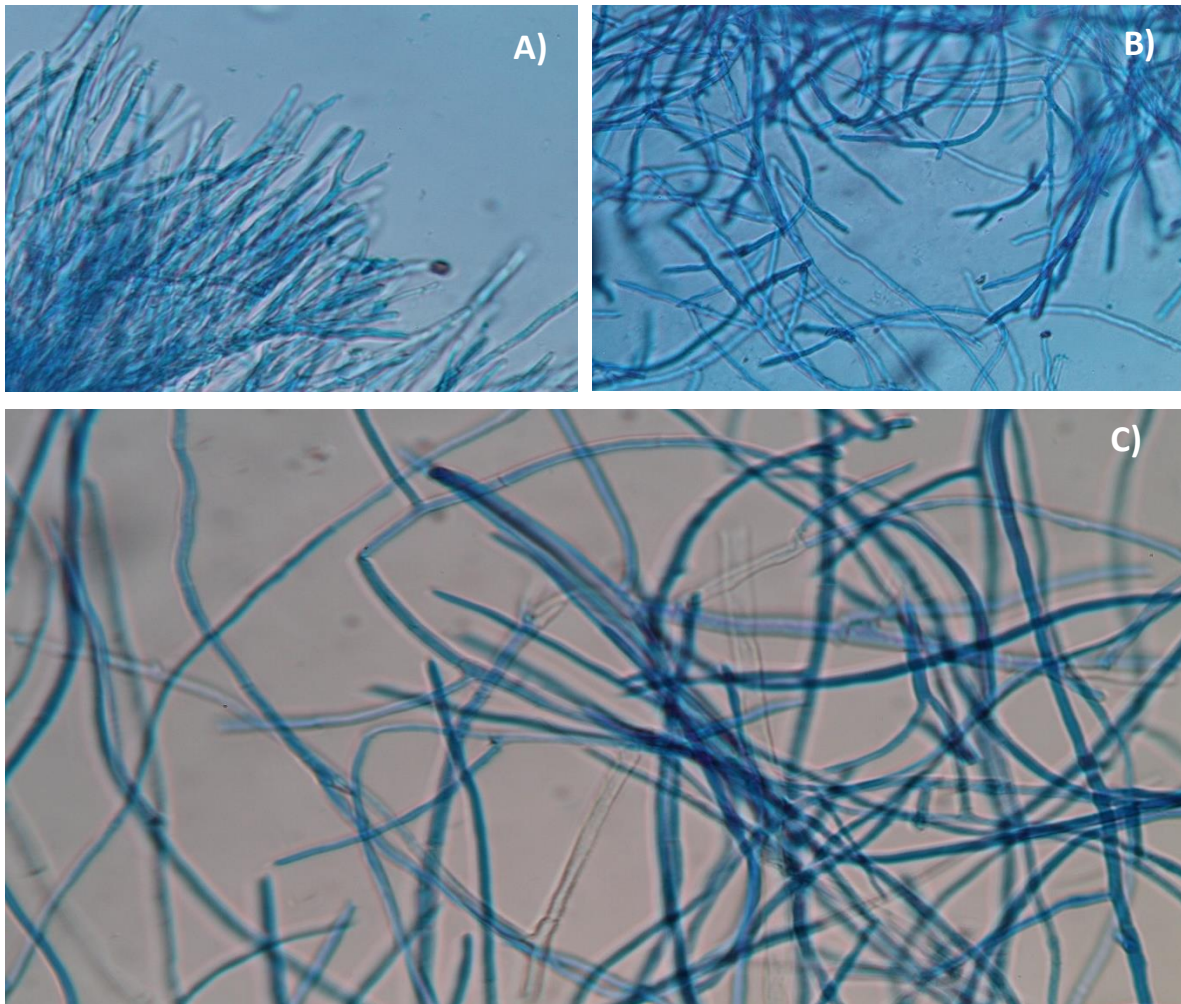


Figura 18. Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos alcaloideos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* contra el hongo *Aspergillus niger* mediante microscopia optica a un aumento de 10X y 40X, los micelios fueron teñidos con azul de lactofenol; A) Micelio de *A. niger* con extracto de *P. cyrtanthoides*; B) Micelio de *A. niger* con extracto de *Z. maculata*; C) Micelio placa control de *A. niger*.

A nivel macroscópico o a simple vista, se pueden observar diferencias, por ejemplo, en *Trichoderma* ssp (**Figura 19**), el grupo control (C) exhibió un micelio fino y completo con ramas significativas, el micelio cambia el color del medio a un amarillo intenso, sin embargo, los grupos tratados (T) con extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* se observa un micelio más débil, con ramificaciones más cortas, no cambia el color del medio y presentan un tono amarillento pálido. *Aspergillus fumigatus* (**Figura 20**), a nivel macroscópico presenta diferencia en el micelio respecto al grupo control, ya que el control presenta un micelio denso

con muchos conidios de color verde oscuro, sin embargo, los grupos tratados presentan un micelio agrupado en pequeñas colinas, no se observa un color verde oscuro y el micelio está muy compactado en pequeñas colonias blancas/amarillas. Lo mismo sucede con *Aspergillus niger* (**Figura 21**), presenta un micelio muy parecido a *A. fumigatus*, con la diferencia que las colonias que se forman son de un diámetro un poco más grande, pero sigue igual de compactado el micelio, de color blanquecino.

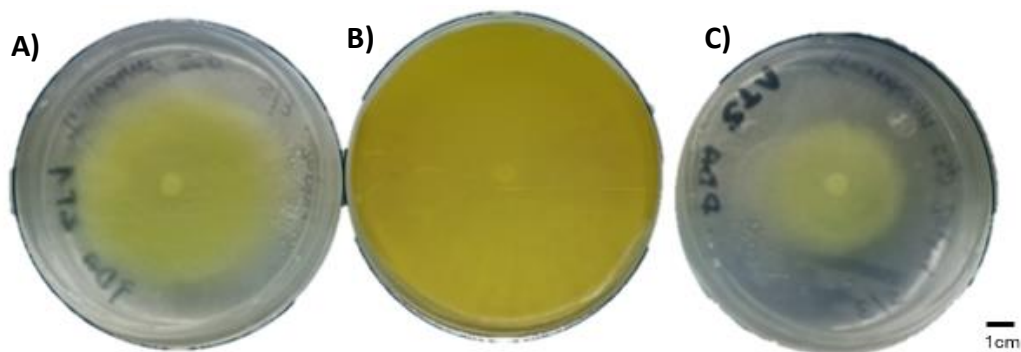


Figura 19. Actividad antifúngica de los extractos totales de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* a una concentración de 1mg/mL; A) Micelio en placa de *Trichoderma* ssp con extracto de *P. cyrtanthoides*; B) Placa control de *Trichoderma* ssp; C) Micelio en placa de *Trichoderma* ssp con extracto de *Z. maculata*.

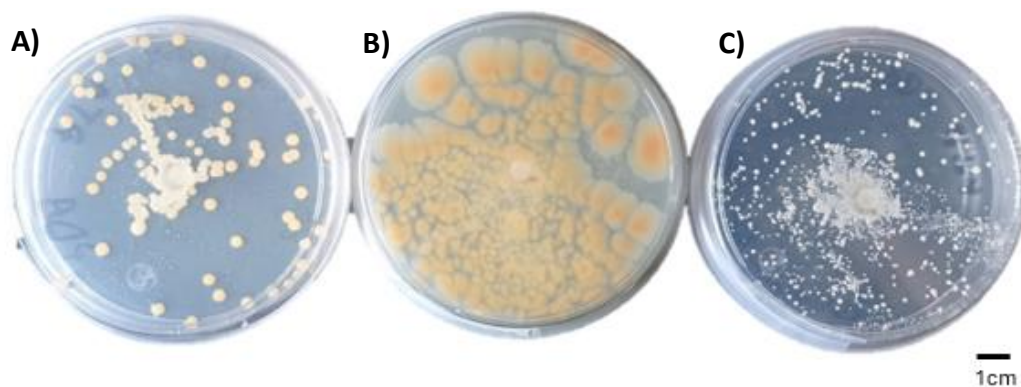


Figura 20. Actividad antifúngica de los extractos totales de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* a una concentración de 1mg/mL; A) Placa con micelio de *Aspergillus fumigatus* con extracto de *P. cyrtanthoides*; B) Placa control con *Aspergillus fumigatus*; C) Micelio en placa de *Aspergillus fumigatus* con extracto de *Z. maculata*.

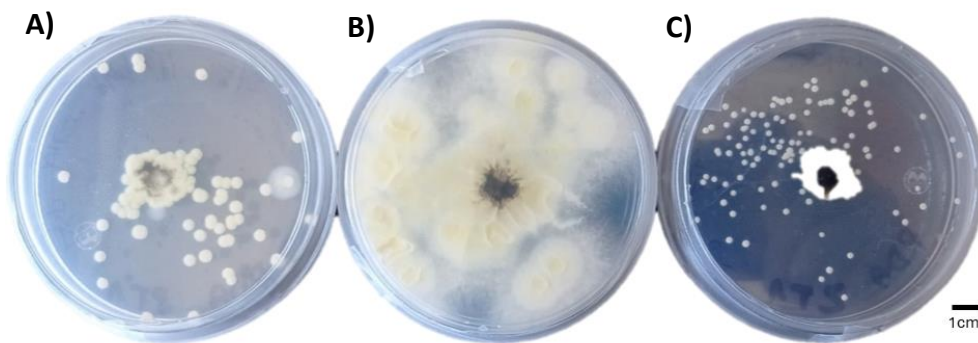


Figura 21. Actividad antifúngica de los extractos totales de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* a una concentración de 1 mg/mL; A) Micelio en placa de *Aspergillus niger* con extracto de *P. cyrtanthoides*; B) Placa control de *Aspergillus niger*; C) Micelio en placa de *Aspergillus niger* con extracto de *Z. maculata*.

6.5 Realización de prueba antibacteriana

6.5.1 Ensayo de difusión en agar sobre cepas bacterianas

La cantidad de extracto utilizado en los ensayos fue de 200µg y 500µg por cada disco puesto en el agar, a excepción del blanco que solo tenía metanol. Los extractos no ejercieron ningún efecto sobre las cepas bacterianas probadas (**Figura 22**), luego de 24h y 48h de incubación.

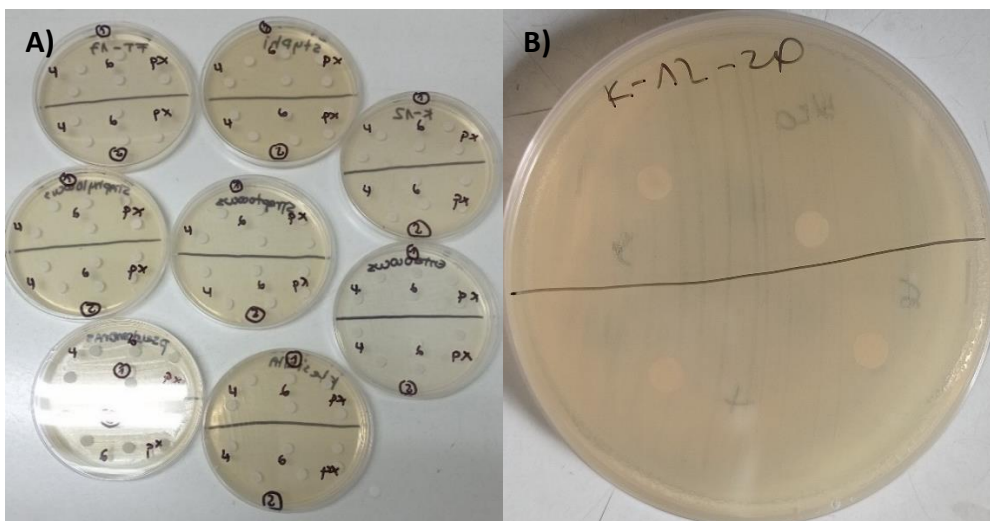


Figura 22. A) Cepas bacterianas tratadas con extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*; B) Placa con cepa de *E. coli* sin actividad ni halos de inhibición.

7. Discusión

De acuerdo con los objetivos planteados, se logró obtener extractos alcaloideos a partir de bulbos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*. Con dichos extractos totales, se realizó un análisis cualitativo de los extractos alcaloideos mediante una Cromatografía de Gas con Espectrometría de Masas (GC/MS), cuyos resultados arrojaron la composición alcaloidea de las especies de Amaryllidaceae nativas de Chile en estudio.

De acuerdo con los análisis anteriormente descritos y realizados por (Fernández-Galleguillos et al., 2022), destaca el alto contenido relativo del alcaloide galantamina (15,1%) en la especie *Phycella cyrtanthoides*, ya que los autores no reportaron el alcaloide galantamina en la misma especie, en cambio, sí reportaron otros alcaloides como, por ejemplo, alcaloides tipo crinina, hemantamina y tazzetina. El estudio de (L. Bizama, 2016), para *Phycella cyrtanthoides* reportó un contenido relativo de 0,4%, un porcentaje mucho menor a lo reportado en este estudio, de igual manera reportó alcaloides tipo crinina, hemantamina y licorina. No se encontraron más estudios de esta especie y la composición de alcaloides que presenta.

Zephyranthes maculata por otra parte exhibió un alto contenido relativo del alcaloide hemantamina (9.8%), seguido de crinina (1,1%) y galantamina, sin embargo, de acuerdo con lo descrito por (Trujillo Chacón, L. 2020), la misma especie presentó un porcentaje relativo del alcaloide hemantamina (24,3%), muy superior a lo determinado en este estudio, por otra parte, el contenido de galantamina (0,27%) es muy similar. El análisis de (Correa Otero, DI, 2020), reporta un porcentaje relativo de hemantamina (16,89%) y tazzetina (5,02%). En efecto, los porcentajes reportados por (Trujillo Chacón, L. 2020), son casi el doble a los obtenidos en este trabajo, especialmente del alcaloide hemantamina.

Para ambas especies el perfil químico reportado en este estudio, son concordantes con otros para las mismas especies (L. Bizama, 2016; Correa Otero, DI, 2020; Fernández-Galleguillos et al., 2022), sin embargo, la cantidad relativa en las muestras de alcaloides eran muy variables, no así el perfil químico, ya que muchos presentaban los mismos alcaloides.

El tipo y la cantidad de alcaloides en estas plantas es muy variable, debido principalmente al hecho, que los alcaloides presentan un equilibrio dinámico entre biosíntesis y degradación,

de manera que en una misma planta tiene lugar importantes fluctuaciones debidas a factores ecológicos, climáticos y fisiológicos. Por lo tanto, los alcaloides en un vegetal se encuentran en función de la situación ambiental, órgano de la planta y momento de la ontogénesis en que se realice el estudio (Jin, 2013).

7.1 Actividad antioxidante

En este estudio se evaluó la actividad antioxidante del extracto alcaloideo de *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes maculata* mediante el ensayo DPPH. Los resultados mostraron que los extractos y las fracciones puestas a prueba tiene una actividad antioxidante moderada, pues es menor y mayor a lo reportado en otros estudios de especies de Amaryllidaceae como en lo reportado por (Genç et al., 2019), donde los extractos hexánicos y clorofórmicos de *Galanthus woronowii* presentaron un IC_{50} de $69,07 \pm 0,42$ y $34,63 \pm 0,21$ respectivamente, muy por debajo de lo reportado en este trabajo, ya que *Z. maculata* obtuvo un IC_{50} de $2303,257 \pm 298,16$ $\mu\text{g/mL}$, el extracto alcaloideo y un $7283,801 \pm 402,286$ $\mu\text{g/mL}$, la fracción ZF2B, de *P. cyrtanthoides* el extracto total tubo un IC_{50} de $3061 \pm 298,16$ $\mu\text{g/mL}$, y la fracción PF3 un valor de $3862 \pm 271,125$ $\mu\text{g/mL}$, valores muy cercanos entre sí, Por su parte (Chen et al., 2018), reporta para la especie *Crinum latifolium* un IC_{50} de $130,7$ $\mu\text{g/mL}$, del compuesto 5, y de $62,1$ para el compuesto 3, muy parecido al valor del control Trolox, con un IC_{50} de $43,2$ $\mu\text{g/mL}$. En el caso del estudio de (Conforti, et al., 2010), para la especie *Galanthus reginae-olgae* subsp. *Vernalis* reporta un IC_{50} de $10 \pm 0,0020$ $\mu\text{g/mL}$ para el extracto EtOAc y un $39 \pm 0,067$ $\mu\text{g/mL}$ para el extracto de MeOH, valores muy por debajo de los reportados en este estudio. (Leporini et al., 2018), para *Pancratium maritimum* reporta un IC_{50} de $923 \pm 50,6$ para el extracto etanólico de los bulbos. (Jin, 2019), para la especie *Scadoxus pseudocaulus*, las fracciones de metanol presentaron un IC_{50} de $7,25$ y $44,6$ mg/mL , valores muy concordantes con este estudio. Para las mismas especies descritas en este estudio no se encontró información disponible en literatura de la capacidad antioxidante que presentan los alcaloides, mediante el radical libre DPPH.

7.2 Actividad antibacteriana

Se evaluó la actividad biológica de los extractos totales de los bulbos de *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes maculata*, frente a un conjunto de cepas de relevancia clínica. El solvente utilizado para la obtención de los extractos totales fue metanol. La cantidad de

extracto utilizado fue de 200µg y 500µg por cada disco en agar. Los extractos evaluados no ejercen ningún efecto en las cepas bacterianas. Una razón posible del nulo efecto de los extractos probados puede ser la cantidad utilizada. (Nair et al., 2019), reporta una actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* de 2048 µg/ml, esto para el alcaloide galantamina, una cantidad muy superior por lo puesto a prueba en este estudio, además que solo la especie *P. cyrtanthoides* presenta una concentración del alcaloide galantamina mayoritario. (Nkanwen et al., 2009), reporta para el compuesto aislado 3 (4,5-etano-9-hidroxi-10-metoxi-7-fenantridona o pratorimina) presenta una zona de inhibición de 9mm en *E. coli*, de 7mm en *S. aureus*, de 8mm en *S. typhi* y 7mm en *P. aeruginosa*, a las mismas concentraciones realizadas en este estudio a 200µg por disco en agar, es por esto que otra de las razones por la cual no se registró actividad es la pureza de los compuesto, ya que los extractos de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* presentaban alcaloides mayoritarios en alrededor de un 15 y 10%, respectivamente, por lo que talvez el conjunto de moléculas no son activas contra cepas bacterianas, pero si los alcaloides individualmente aislados.

7.3 Actividad antifúngica

Se evaluó la actividad biológica de los extractos alcaloideos totales de los bulbos de *Phycella cyrtanthoides* y *Zephyranthes maculata*, frente a un conjunto de cepas fúngicas de relevancia clínica y agrícola. Los extractos totales alcaloideos de *Z. maculata* y *P. cyrtanthoides* lograron una inhibición del micelio de *A. niger* del 68,8% y el 62,5%, respectivamente. En cambio, el micelio de las especies *A. fumigatus* y *Trichoderma* ssp se inhibió moderadamente. *A. fumigatus* se inhibió en un 56,3% con el extracto total de *Z. maculata* y en un 31,3% con el extracto total de *P. cyrtanthoides*, mientras que *Trichoderma* ssp se inhibió en un 47,2% con el extracto total de *Z. maculata* y en un 33,3% con el extracto total de *P. cyrtanthoides*, a una concentración de 1000µg/mL, (Shen et al., 2014) reporta una inhibición del 15,5% del micelio para *Trichoderma atrovoride* a una concentración de 500µg/mL, este porcentaje de inhibición del micelio se obtuvo a través del alcaloide licorina, (Rasheed et al., 2017), en el caso de estudio reporta una inhibición de *Aspergillus niger* para el extracto de las flores rojas, secas de *Amarillis belladonna* (ABFRDE) de un 58% del micelio y de *Aspergillus fumigatus* una inhibición del 55% a una concentración de 1,5mg/mL,

este valor es muy cercano al obtenido a este estudio, en donde el extracto de flores de *Amarillis belladonna* presentaba alrededor de un 6,1% de alcaloides relativo en la muestra. Adicionalmente se realizó una descripción macroscópica del micelio de cada hongo puesto a prueba, esto para ver las diferencias entre el micelio control y el micelio tratado, se lograron ver cambio en la forma de crecimiento del micelio, cambios de color y el tiempo de colonización del micelio en la placa. También se obtuvieron imágenes microscópicas, para ver que deformaciones presentaban los micelios a nivel celular, se observaron, crecimientos de los micelios más pequeños, con deformaciones o irregulares, respecto a los controles.

8. Conclusiones

1. Los alcaloides principales presentes en los bulbos de *Phycella cyrtanthoides*, son los siguientes: galantamina, O-acetilhidrocrinina y hementamina, con el alcaloide galantamina en mayor porcentaje relativo.
2. Los alcaloides principales en bulbos de *Zephyranthes maculata*, son los siguientes: hemantamina, tazettina y O-Acetildihidrocrinina, con el alcaloide hemantamina en mayor porcentaje relativo.
3. La actividad antioxidante para los extractos totales presentó una actividad moderada con un potencial de inhibición de hasta el 87,7% y 73,4% para *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* respectivamente.
4. *Z. maculata* fue quien presento un mejor valor de IC₅₀ de todos los extractos puestos a prueba, en donde su valor promedio es de 3000 µg/mL.
5. La actividad antibacteriana fue nula, los extractos totales alcaloideos no presentaron actividad frente a cepas bacterianas de importancia clínica puestas a prueba, en ninguna cepa y en ninguna concentración
6. La actividad antifúngica presentó valores de inhibición fuerte para la especie *Aspergillus niger*, con una inhibición del micelio del 68,75% y 62,5% para *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata* respectivamente, a una concentración de 1mg/mL, *Aspergillus fumigatus* y *Trichoderma* ssp obtuvieron una inhibición moderada, tanto para el extracto de *P. cyrtanthoides* y *Z. maculata*.
7. Finalmente, es importante mencionar que futuros estudios acerca de los alcaloides de Amaryllidaceae, deben centrarse en purificar los alcaloides individualmente, esto para saber cuál es el alcaloide responsable de la bioactividad puesta a prueba, también, como las propiedades químicas de estas, interfieren en su bioactividad.
8. La hipótesis se acepta ya que los especies de Amaryllidaceae chilenas presentaban el alcaloide galantamina, en especial *P. cyrtanthoides*, el cual presentó un elevado porcentaje relativo en muestra, la actividad antioxidante fue moderada, pero con un alto porcentaje de inhibición del radical y la actividad antifúngica presentó una inhibición fuerte del micelio en algunas especies, por lo que los alcaloides de Amaryllidaceae chilenas tiene un potencial uso farmacológico.

9. Referencias

- Aqueveque, P., Becerra, J., Palfner, G., Silva, M., Alarcón, J., Anke, T., & Sterner, O. (2006). Antimicrobial activity of metabolites from mycelial cultures of Chilean basidiomycetes. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 51(4), 1057-1060.
- Arnold, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Elsevier, *Fungal Biology Reviews* 21(2–3): 51–66.
- Arroyo, S. C., & Cutler, D. F. 1984. Evolutionary and Taxonomic Aspects of the Internal Morphology in Amaryllidaceae from South America and Southern Africa. *Kew Bulletin*, 39(3), 467pp.
- Baeza, C. M., Mariangel, C., Ruiz, E., & Negritto, M. 2009. El cariotipo fundamental en *Rhodolirium speciosum* (HERB.) Ravenna Y R. Andicola (POEPP.) Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana - Botanica*, 66(1): 99–102.
- Baquero, E., Giraldo, D., Molina, C., & Bermúdez, A. J. (2009). Situación actual del comercio de plantas medicinales en Venezuela: potencialidades y amenazas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(1), 24-32.
- 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
- Bridgen, MP. 1994. Flowering geophytes of Chile have ornamental potential. Seminario Panamericano de Semillas: 216-230.
- Cedrón, J. C., Del Arco-Aguilar, M., Estévez-Braun, A., & Ravelo, Á. G. (2010). Chapter 1—Chemistry and Biology of *Pancreatium* Alkaloids
- 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

- Chen, (Chen, M. X., Huo, J. M., Hu, J., Xu, Z. P., & Zhang, X. (2018). Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum latifolium* with cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia*, 130, 48-53.)
- Conforti, F., Loizzo, M. R., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., & Menichini, F. (2010). Quantitative determination of Amaryllidaceae alkaloids from *Galanthus reginae-olgae* subsp. *vernalis* and *in vitro* activities relevant for neurodegenerative diseases. *Pharmaceutical biology*, 48(1), 2-9.
- Correa, D. I., Pastene-Navarrete, E., Baeza, M., Bustamante, L., & Alarcón-Enos, J. (2022). Effect of plant growth regulators on alkaloid the production in cell cultures of Chilean Amaryllidaceae: *Rhodophiala pratensis*, *Rhodophiala splendens*, *Rhodophiala advena*, and *Rhodolirium speciosum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151(3), 521-534
- Henning, C. P., Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). Compuestos secundarios nitrogenados: alcaloides. *Libros de Cátedra*.
- Herrera Castro, C. D. R. (2020). Principios activos de plantas medicinales con actividad antimicrobiana contra microorganismos de interés estomatológico: Una revisión.
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33-41.
- Fernández-Galleguillos, C., Romero-Parra, J., Puerta, A., Padrón, J. M., & Simirgiotis, M. J. (2022). Alkaloid profiling, anti-enzymatic and antiproliferative activity of the endemic Chilean
- Gámez, Y. D. T., del Mazo, L. D., González, S. F., Ruiz, A. D. L. Á. C., y Mateo, A. G. (2014). Eficacia del extracto fluido de Vimang® en el tratamiento de pacientes con alveolitis. *Medisan*, 18(09).
- García, N., Meerow, A. W., Arroyo-Leuenberger, S., Oliveira, R. S., Dutilh, J. H., Soltis, P. S., & Judd, W. S. 2019. Generic classification of Amaryllidaceae tribe Hippeastreae. *TAXON*, 68(3): 481–498

García, N., Meerow, A. W., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2014). Testing deep reticulate evolution in Amaryllidaceae tribe Hippeastreae (Asparagales) with ITS and chloroplast sequence data. *Systematic Botany*, 39(1), 75-89.

Garcia, E. J., Oldoni, T. L., Alencar, S. M., Reis, A., Loguercio, A. D. & Grande, R. H. 2012. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian dental journal* 23(1): 22-27.

Guerrero, M. F. (2009). Elementos para la evaluación eficaz de productos naturales con posibles efectos antihipertensivos. *Biomédica*, 29(4), 547-557.

Gupta, D. 2015. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International journal of pharmaceutical sciences and research* 6: 546-566.

He, M, Qu, C, Gao, O, Hu, X y X Hong. 2015. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* 5: 16562-16574.

Hesse, M. 1978. *Alkaloid Chemistry*. Georg Thieme Verlag. New York.

Jin, Z. 2013. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports* 30: 849-868.

Jin, Z., & Yao, G. (2019). Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*, 36(10), 1462-1488.

Leporini, M., Catinella, G., Bruno, M., Falco, T., Tundis, R., & Loizzo, M. R. (2018). Investigating the antiproliferative and antioxidant properties of *Pancratium maritimum* L. (Amaryllidaceae) stems, flowers, bulbs, and fruits extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018

Lizama Bizama, I. D. R. (2018). Quimiotaxonomía de Amaryllidaceae chilenas alcaloides como marcadores taxonómicos. Amaryllidaceae *Phycella cyrtanthoides*. *Metabolites*, 12(2), 188.

López-Padrón, I., Martínez-González, L., Pérez-Domínguez, G., Cedeño-Rodríguez, L., Reyes-Guerrero, Y., Cárdenas-Travieso, R. M., ... & Cabrera-Rodríguez, J. A. (2021). Efectos de productos bioactivos en plantas de *Cicer arietinum* L. *Cultivos Tropicales*, 42(1).

- Ma, B. J., Wu, T. T., Ruan, Y., Shen, J. W., Zhou, H., Yu, H. Y., & Zhao, X. (2010). Antibacterial and antifungal activity of scabronine G and H in vitro. *Mycology*, 1(3), 200-203.
- Machín, M. P., & Rodríguez, F. M. (2011). Consideraciones farmacológicas sobre principios activos en plantas medicinales con actividad diurética. *Revista Latinoamericana de Hipertension*, 6(2).
- Masek, A., Latos-Brozio, M., Kałużna-Czaplińska, J., Rosiak, A. & Chrzescijanska, E. 2020. Antioxidant properties of green coffee extract. *Forests* 11: 557.
- Meerow, A. W., & Snijman, D. A. (1998). Amaryllidaceae. In *Flowering Plants: Monocotyledons: Liliaceae (except Orchidaceae)* (pp. 83-110). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Nair, J. J., Wilhelm, A., Bonnet, S. L., & van Staden, J. (2017). Antibacterial constituents of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(22), 4943-4951.
- Nkanwen, E. R. S., Gatsing, D., Ngamga, D., Fodouop, S. P. C., & Tane, P. (2009). Antibacterial agents from the leaves of *Crinum purpurascens* herb (Amaryllidaceae). *African health sciences*, 9(4).
- Paul M. Dewick. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley.
- Posit team (2023). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.
- Rasheed, H., Ullah, F., Khan, S. U., Iqbal, T., & Khan, M. H. U. (2017). In-Vitro Evaluation of Phytochemical Profile and Pharmacological Potential of Methanol Derived, Natural Red Dye Extracted from Flowers of *Amaryllis Belladonna*. *International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy (IJBMSp)*, 7(2).
- Ravenna, P. 2003. Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. *Botanica Australis* 2(1): 1-21.

Saxton, J.E. 1975. "The Alkaloids" Volumen V. Specialist Periodical Reports, The Chemical Society. Burlington House, London. pp. 93-102.

Shen, J. W., Ruan, Y., Ren, W., Ma, B. J., Wang, X. L., & Zheng, C. F. (2014). Lycorine: a potential broad-spectrum agent against crop pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 354-358

Tunco Cabana, S. V. (2019). Eficacia de la harina de haba (*Vicia faba*) como ayudante de coagulación del sulfato de aluminio en el tratamiento de agua para consumo humano.

Wickham H (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D (2015). "Dose-Response Analysis Using R." PLOS ONE, 10(e0146021). <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146021>.

Robinson, T., & Robinson, T. (1981). General theories of alkaloid biosynthesis. *The Biochemistry of Alkaloids*, 12-19.

Schiappacasse, F., Peñailillo, P. Yáñez. 2002. Propagación de bulbosas chilenas ornamentales. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile. 65 págs.

Zomlefer, WB. 1994. Guide to flowering plant families. Chapel Hill and London. EE.UU. 430 págs.