

ANALISIS DEL CONTENIDO ALCALOIDICO DE *CALIPHRURIA SUBEDENTATA* BAKER (AMARYLLIDACEAE) POR EL METODO CG-EM

FABIO CABEZAS¹*, NATALIA PIGNI², JAUME BASTIDA², CARLES CODINA² Y FRANCESC VILADOMAT²

(Recibido Junio 2012; Aceptado Marzo 2013)

Este manuscrito está dedicado al Dr. Tirso Ríos en reconocimiento a su trayectoria en la investigación de los Productos Naturales

ABSTRACT

Caliphruria is a genus of bulbous plants in the Amaryllidaceae family. It consists of four species distributed in tropical regions of South America, three of them are endemic of Colombia. This genus is infrequent in nature, with restricted geographical distribution. *C. subedentata* Baker is threatened by extinction. The polar extract showed moderate cytotoxic activity. In previous phytochemical studies, by classical methods, we isolated six alkaloids: galanthamine, lycorine, haemantamine, maritidine, homolycorine and hamayna. In this work we report 18 compounds identified by GC-MS technique: ismine, trisphaeridine, 5,6-dihydrobicolorine, galanthamine, clidantine, narwedine, kirkine, galantindol, maritidine, anhydrolycorine, deoxytazetine, 6-methoxytazetine, tazetine, haemantamine, 11,12-dehydroanhydrolycorine, lycorine, homolycorine, epimacronine and one alkaloid not identified. www.relaquim.com

Keywords. Alkaloids, galanthamine, lycorine, *Caliphruria subedentata*, Amaryllidaceae, GC-EM method, biological activity.

RESUMEN

Caliphruria es un género de plantas bulbosas perteneciente a la familia Amaryllidaceae. Consiste en cuatro especies distribuidas en regiones tropicales de Sur América, tres de las cuales son endémicas de Colombia. Este género es muy escaso en la naturaleza, con distribución geográfica restringida. *C. subedentata* Baker está considerada en vía de extinción. El extracto polar mostró una moderada actividad citotóxica. En estudios fitoquímicos previos, por el método clásico, aislamos seis alcaloides: galantamina, licorina, hemantamina, maritidina, homolicorina y hamayna. En este trabajo reportamos 18 compuestos identificados por la técnica CG-EM: ismina, trisferidina, 5,6-dihidrobicolorina, galantamina, clidantina, narwedina,

¹Departamento de Química. Grupo: Química de Compuestos Bioactivos, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Universidad del Cauca. Calle 5 N° 4-70. Popayán (Cauca), Colombia.

²Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Avenida Joan XXIII, 08028. Barcelona, España

*Autor para correspondencia: Fabio Cabezas: Tel. 0572-8209800 ext 2607. Fax 0572-8209860. E-mail. facabz@unicauca.edu.co

kirkina, galantindol, maritidina, anhidrolicorina, deoxitazetina, 6-metoxipretazetina, tazetina, hemantamina, 11,12-deshidroanhidrolicorina, licorina, homolicorina, epimacronina y un alcaloide no identificado. www.relaquim.com

Palabras clave. alcaloides, galantamina, licorina, *Caliphruria subedentata*, Amaryllidaceae, método CG-EM, actividad biológica.

INTRODUCCIÓN

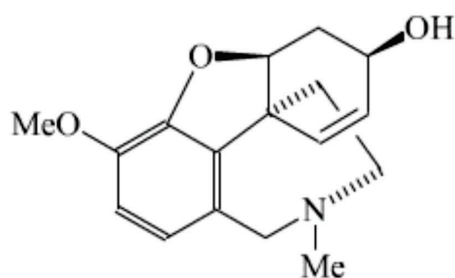
El género *Caliphruria* es poco abundante en la naturaleza. Sólo se conocen cuatro especies distribuidas en algunas regiones tropicales de Sur América, adaptadas a bosques húmedos y a condiciones de baja luminosidad (Meerow, 1989). Una de estas especies *Caliphruria korsakofii* (Traub) Meerow es reportada en el Perú, mientras que las otras tres, *C. hartwegiana* Herb, *C. subedentata* Baker y *C. tenera* Baker, son endémicas de Colombia, esta última considerada extinguida y las otras dos amenazadas de extinción (Walter, 1998; Calderón, 2003). Las pocas colectas reportadas muestran su ubicación geográfica restringida a las Cordilleras Central y Occidental en los departamentos de Valle, Cauca, Cundinamarca y Huila (Cabezas, 2012). Son plantas herbáceas, perennes y bulbosas pertenecientes a la subfamilia Amaryllidaceae (Meerow, 1987; Stevens, 2001), siendo potencialmente productoras de alcaloides tipo Amaryllidaceae, importante grupo de metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividad biológica (Bastida, 2006). Este género está relacionado estrechamente con los géneros *Eucharis* y *Urceolina*, todos ellos conocidos como “Lirios amazónicos” (Meerow, 1987).

El extracto etanólico mostró una moderada actividad citotóxica lo cual se manifiesta mediante un bloqueo premitótico, originando la disminución del índice mitótico, dependiendo de la concentración del extracto, lo cual permite vislumbrar un posible uso de estas plantas no sólo como inhibidores de enzimas dada la presencia de galantamina y licorina, sino también

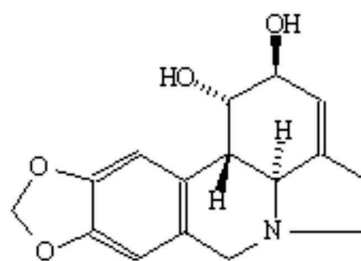
como antimaláricos o tratamiento de células cancerígenas (Acosta, 1996). Según nuestros estudios de la histología del tejido fotosintético y la estructura del cloroplasto la fijación del carbono sigue, probablemente, la ruta metabólica C_3 (Benavidez, 2009). En estudios fitoquímicos previos, utilizando métodos clásicos (Domínguez, 1973), reportamos la presencia de seis alcaloides: galantamina, licorina, hemantamina, maritidina, homolicorina y hamayna (Cabezas, 2005; Segura y López, 2003). En el presente trabajo se detectaron 19 compuestos utilizando la técnica CG-EM (Berkov *et al.*, 2011; Torras Claveria *et al.*, 2010), de los cuales 18 fueron identificados como ismina, trisferidina, 5,6-dihidrobicolorina, galantamina, clidantina, narwedina, kirkina, galantindol, maritidina, anhidrolicorina, deoxitazetina, 6-metoxipretazetina, tazetina, hemantamina, 11,12-deshidroanhidrolicorina, licorina, homolicorina y epimacronina y un alcaloide no pudo ser identificado. Este es el primer reporte sobre estudios fitoquímicos en esta especie utilizando la técnica CG-EM.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal, conocido popularmente como Varita de San José, fue colectado en el Jardín Botánico “Alvaro José Negret” situado a 3 Km de la ciudad de Popayán, vereda la Rejoya. Un ejemplar de *C. subedentata* Baker está depositado en el Herbario de la Universidad de Cauca con el número de inclusión 0027587. La metodología es la seguida y estandarizada en los laboratorios de investigación en Química de Compues-



Galantamina



Licorina

tos Bioactivos en Colombia (Universidad del Cauca) y en Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología en España (Universidad de Barcelona). Los resultados obtenidos se compararon con la base de datos en esta última institución, en la cual se tiene información de 30 años de investigación en química de Amaryllidaceae.

El material vegetal (hojas) se pesó en fresco, se desinfectó y posteriormente se cortó en trozos. Se secó a una temperatura no mayor de 24 °C durante 72 horas. Una vez secado el material se pesó de nuevo. Finalmente, se determinó el porcentaje de humedad.

Obtención del extracto crudo. El material seco y cortado (o triturado), se dejó en maceración en un recipiente con metanol durante 48 horas. Para el presente caso, se realizó un recambio del disolvente cada 24 horas. Adicionalmente, el macerado fue sometido a 1 hora diaria de sonicación con el objeto de asegurar completa disolución de los metabolitos de interés. El extracto metanólico obtenido se filtró y se concentró mediante un evaporador rotatorio (o calor para muestras pequeñas) hasta sequedad. Finalmente, se pesó el extracto seco. Para el presente estudio se utilizaron 1.1083 g de hojas en peso seco y 75 mL de metanol, obteniéndose 0.310 g de extracto crudo (total) seco.

Limpieza y extracción de alcaloides. El extracto metanólico seco (310 mg) fue macerado en un frasco volumétrico de 10 mL con 5 mL de H₂SO₄ (2%, v/v) por 6 ho-

ras en un baño de ultrasonido a 40 °C. Se limpió con 5 mL de (C₂H₅)₂O, desechando la fase orgánica. Lo anterior se repitió por 4 veces hasta lograr transparencia. La fase acuosa fue basificada con 1 mL de NH₄OH (25%) hasta pH 9.5 y el volumen se ajustó hasta 10 mL con agua destilada. Después de 5 minutos se extrajo con 15 mL de EtOAc. La fase orgánica se evaporó, obteniéndose 9.6 mg de extracto de alcaloides.

Análisis por el método CG-EM. 5 mg del crudo de alcaloides se disolvieron en 300 µL de MeOH. Se utilizó un equipo Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico MSD 5975 operando a 70eV a una temperatura de 230 °C en la fuente iónica. El cromatógrafo dispone de una columna DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). El programa de temperatura fue: 100-180 °C., 15 °C/min, 1 minuto a 180 °C, 180-300 °C., 5 °C/min, y 1 minuto a 300 °C. Se empleó una temperatura de 280 °C en el inyector y el flujo de helio fue de 0.8 mL/min. Adicionalmente, se utilizó el modo de dilución (split) en una proporción 1:20. Para la obtención de los datos espectrales se utilizó el software AMDIS 2.64 (NIST). La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la comparación con compuestos de referencia, teniendo en cuenta los patrones de fragmentación y los índices de retención de Kovats (RI). Se utilizó una mezcla patrón de hidrocarburos para la calibración de los RI (C9-C36, Restek, cat no. 31614).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del contenido alcaloídico en *C. subedentata* Baker, se muestran en la Tabla 1, teniendo en cuenta el tiempo de retención (RT) del metabolito, mientras que la cantidad porcentual es la referida al TIC (total ion current) de la mezcla y no del extracto crudo. Los compuestos no identificados se reportan como relación masa/carga (m/z). Por la técnica CG-EM, se reportan 19 alcaloides en diferentes proporciones, de los cuales se identificaron 18 mientras uno no está registrado en la base de datos.

El componente mayoritario es galantamina (24.776%), metabolito muy importante utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer dada su actividad farmacológica como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, además de otras acciones biológicas. Le siguen maritidina (21.454%), tazetina (12.447%), galantindol (8.447%), hemantamina (5.455%), ismina (4.279%), narwedina (3.788%), licorina (2.731%), deoxitazetina (2.324%), clidantina (1.185%), 5,6-dihidrobicolorina (0.780%), 6-metoxipretazetina (0.717%), epimacronina (0.647%), kirkina (0.400%). triferidina, 11,12-deshidroanhidrolicorina

y homolicorina se encuentran en proporciones bajas, mientras que anhidrolicorina está presente en trazas (< 1%). El compuesto desconocido de relación m/z 238 (299) se encuentra en moderada proporción (6.906%). La presencia de licorina, aunque en baja proporción, es interesante ya que se trata de uno de los alcaloides de Amaryllidaceae más abundante en diferentes géneros de esta familia, con importancia farmacológica dado su amplio rango de actividad biológica incluyendo inhibición enzimática, siendo potencialmente útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y demencias relacionadas (McNulty *et al.*, 2010). Narwedina, presente en moderada concentración, es considerado un precursor en la ruta biosintética de galantamina (Heldt, 2005), por lo cual se puede considerar promisorio para futuros procesos de hemisíntesis.

CONCLUSIONES

Los alcaloides aislados de *C. subedentata* Baker pertenecen a diferentes tipos de cadenas carbonadas típicas de la familia Amaryllidaceae: galantamina, licorina y

Tabla 1. Contenido de alcaloides en el extracto de *Caliphurria subedentata* Baker.

COMPUESTO	RT	RI	% TIC	COMPUESTO	RT	RI	%TIC
Ismina	20.7	2267.6	4.279	Deoxitazetina	25.0	2540.9	2.324
Triferidina	21.0	2284.1	0.262	Kirkina	25.2	2552.6	0.400
5,6-Dihidrobicolorina	21.7	2326.8	0.780	6-Metoxipretazetina	25.9	2600.5	0.717
Galantamina	22.7	2396.3	24.776	11,12-Deshidroanhidrolicorina	26.0	2607.5	0.360
Clidantina	23.3	2428.3	1.185	Hemantamina	26.4	2635.2	5.455
m/z 238 (299) *	23.7	2455.7	6.906	Tazetina	26.6	2651.7	12.447
Narwedina	24.0	2472.2	3.788	Licorina	28.1	2747.1	2.731
Galantindol	24.4	2499.2	8.447	Homolicorina	28.8	2795.4	0.158
Anhidrolicorina	24.4	2504.0	trazas	Epimacronina	28.9	2803.1	0.647
Maritidina	24.6	2516.4	21.454				

Fuente: Jaume Bastida A. Universidad de Barcelona (2011).

RT: Tiempo de retención, RI: Índice de retención, * No identificado

tazetina. La presencia de metabolitos secundarios de una marcada actividad biológica como galantamina y licorina permiten vislumbrar un futuro promisorio como posibles fuentes naturales de estos principios activos en procesos agroindustriales para lo cual, teniendo en cuenta la amenaza de extinción de la especie, se deben definir programas de propagación (vía cultivo de tejidos) y conservación (vía bancos de germoplasma). El uso de la técnica analítica CG-EM, dada su sensibilidad, permite detectar compuestos de interés en diferentes

proporciones, por lo cual se pueden planificar estudios posteriores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Cauca y a la Universidad de Barcelona por el apoyo académico y financiero para el desarrollo del presente trabajo. Al profesor Doctor Bernardo Ramírez P., curador del Herbario de la Universidad del Cauca, por la clasificación del material vegetal.

REFERENCIAS

- Acosta, C.P., Álvarez, R.G., Bonilla, L., Tovar, C.I. (1996) Evaluación del efecto citotóxico bloqueador del ciclo genotóxico y clastogénico del extracto crudo del "Lirio Pequeño" (*Caliphruria subedentata*). Tesis de Pregrado, Departamento de Biología, Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.
- Bastida, J., Lavilla, R., Villadomat, F. (2006) The chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In: Alkaloids, Elsevier. Inc. Vol. 63, Chapter. 3, 87-179.
- Benavidez, L., Bermudez, O., Cabezas, F., Mosquera, P., Torres, A. (2009) Aproximación a la ruta metabólica de *Caliphruria subedentata* (Amaryllidaceae), mediante característica histológica de la lámina foliar. *Acta Microscópica* **18**, Supp. C: 481-482.
- Berkov, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. (2011) Development and validation of GC-MS method for rapid determination of galanthamine in *Leucojum aestivum* and *Narcissus* ssp: A metabolomic approach. *Talanta* **83**: 1455-1465.
- Cabezas, F., López, D., Segura, C., Codina, C., Bastida, J., Viladomat, F. (2005) Alcaloides de *Caliphruria subedentata* Baker (Amaryllidaceae). *Actualidades Biológicas*. **27** (Supl. 1): 141.
- Cabezas, F. F. (2012) Biogénesis, obtención y caracterización de alcaloides de Amaryllidaceae. Editorial Universidad del Valle. En prensa.
- Calderon, S.E. (2003) Instituto Alexander Von Humboldt, Programa biología de la Conservación. Proyecto flora amenazada. Lista roja de plantas fanerógamas de Colombia. Familia Amaryllidaceae.
- Domínguez, X.A. (1973) Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa Wiley. México.
- Heldt, H.W. (2005) Plant Biochemistry. Third Edition. Elsevier Academic Press. Burlington, MA, USA.
- Meerow, A.W. (1987) Chromosome cytology of *Eucharis*, *Caliphruria* and *Urceolina* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* **74** (10): 1559-1575.
- Meerow, A.W. (1989) Systematics of the Amazon Lilies: *Eucharis* and *Caliphruria* (Amaryllidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **76** (1): 136-220.
- McNulty, J., Nair, J.J., Little J., Brennan, J., Bastida J. (2010) Structure activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**: 5290-5294.

- Segura, C. y López, D. (2003) Contribución al estudio químico del contenido alcaloídico en *Caliphruria subedentata* (Amaryllidaceae). Tesis pregrado en Química, Universidad del Cauca.
- Stevens, P.F. (2001). Angiosperm phylogeny. Website: Asparagales: Amaryllidoideae.
- Torras Claveria, L., Berkov, S., Jauregui, O., Cajapé, F., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J. (2010). Metabolic profiling of bioactive *Pancratium canadiense* extracts by GC-MS. *Phytochemical Analysis* **21**: 80-88.
- Walter, K.S., Gillet, H.J [eds.]. (1998). 1997 IUCN Red list of threatened plants. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.